

Université Pierre et Marie Curie  
Paris 6

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

**MISE EN PLACE D'UN SYSTÈME DE CIQ**  
**DANS L'UNITÉ DE CYTOGÉNÉTIQUE**  
**DU CHRU DE MONTPELLIER**

**PELLESTOR Franck**  
**2012 - 2013**

## **Note au lecteur**

Les mémoires des stagiaires du Diplôme Universitaire « Assurance Qualité au laboratoire de biologie médicale » sont des travaux réalisés pendant l'année de formation.

Les opinions exprimées n'engagent que les auteurs.

Les travaux ne peuvent faire l'objet d'une publication en tout, ou partie, sans l'accord de l'auteur et du responsable du D.U. concerné.

## **Auteur**

PELLESTOR Franck

MCU-PH en Histologie, Cytologie, Embryologie et Cytogénétique (CNU 42-02)

Unité de Génétique Chromosomique

Département de Génétique Médicale

Hôpital Arnaud de Villeneuve

CHRU de Montpellier

## Remerciements

Mes remerciements s'adressent en premier lieu aux responsables et aux enseignants du D.U « Assurance Qualité au laboratoire de biologie médicale » qui avaient la rude tâche de nous initier et de nous intéresser à la démarche Qualité, et qui ont pleinement rempli leur mission avec beaucoup de générosité et sympathie.

Je remercie tous les membres de l'unité de Cytogénétique qui se sont investis dans la démarche Qualité à mes côtés, et en particulier Mme le Dr Geneviève Lefort avec qui j'ai partagé cette riche année de formation.

Mes remerciements s'adressent aussi à Mme le Dr Indira Tamby, responsable Qualité du LBM du CHRU de Montpellier, qui nous a ouvert la voie de la démarche Qualité vers l'accréditation et qui a su nous transmettre son enthousiasme pour ce challenge.

Enfin, je tiens à remercier le CHRU de Montpellier qui m'a autorisé à faire cette formation et qui l'a financé.

## SOMMAIRE

<b>GLOSSAIRE .....</b>	<b>5</b>
<b>1° Introduction .....</b>	<b>7</b>
1.1 Intérêt et objectifs .....	7
1.2 Limites de l'étude.....	8
1.3 Plan d'action .....	9
<b>2° Contexte de mise en œuvre du programme de CIQ.....</b>	<b>9</b>
2.1 Contexte réglementaire et normatif.....	9
2.2 La démarche qualité au LBM du CHRU de Montpellier.....	11
2.3 La démarche qualité au sein de l'unité de Cytogénétique.....	12
2.4 L'analyse cytogénétique classique et moléculaire face au CIQ.....	14
<b>3° Mise en place du programme de CIQ.....</b>	<b>15</b>
3.1 Etat des lieux.....	15
3.2 Définition et sélection des indicateurs de performance à inclure dans le CIQ ..	17
3.3 Périodicité des CIQ.....	23
<b>4° Bilan et analyse de la mise en place d'un système de CIQ en Cytogénétique.....</b>	<b>23</b>
<b>5° Conclusion.....</b>	<b>25</b>
<b>6° Bibliographie.....</b>	<b>27</b>
<b>7° Annexes.....</b>	<b>28</b>

# GLOSSAIRE

## Définitions

**Action corrective:** Action visant à éliminer la cause d'une non-conformité pour éviter sa réapparition.

**Accréditation :** Procédure selon laquelle un organisme faisant autorité fournit une reconnaissance formelle qu'une organisation est compétente pour réaliser des tâches spécifiques.

**Action préventive :** Action entreprise pour éliminer les causes d'une non-conformité, d'un défaut et de tout autre événement indésirable potentiel pour empêcher qu'ils ne se produisent.

**Analyse :** Ensemble d'opérations destinées à déterminer la valeur ou les caractéristiques d'une propriété.

**Bandes chromosomiques :** C'est la succession de bandes sombres et claires révélées le long d'un chromosome par diverses techniques de marquage et permettant une identification précise de chaque chromosome individuel. Cette succession de bandes est identique chez tous les individus pour un chromosome donné.

**Caryotype :** Arrangement standard de l'ensemble des chromosomes d'une cellule, à partir d'une prise de vue microscopique.

**Comparaison interlaboratoire :** Organisation, exécution et évaluation des mesures ou des essais réalisés sur des éléments identiques ou similaires par au moins deux laboratoires en fonction de conditions préalablement déterminées.

**Compétence :** Capacité démontrée à appliquer des connaissances et savoir-faire.

**Contrôle externe de qualité :** Procédure d'évaluation des performances d'un laboratoire par le biais d'une comparaison inter-laboratoire réalisée par une tierce organisation.

**Contrôle interne de la qualité :** Ensemble des procédures destinées à être conduites dans un laboratoire pour surveiller en continu les performances de ce laboratoire.

**Echantillon :** Une ou plusieurs parties prélevées à partir d'un échantillon primaire.

**Examen :** Ensemble des opérations destinées à déterminer la valeur ou les caractéristiques d'une propriété.

**Indicateur qualité :** Mesure de l'aptitude d'un ensemble de caractéristiques intrinsèques à satisfaire des exigences.

**Non-conformité :** Non observation d'une exigence.

**Processus :** Ensemble d'activités corrélées ou interactives qui transforment des éléments d'entrée en éléments de sortie.

**Qualité :** Aptitude d'un ensemble de caractéristiques intrinsèques à satisfaire des exigences.

**Validation :** Confirmation par des preuves objectives que les exigences pour une utilisation spécifique ou une application prévue ont été satisfaites.

## **Abréviations**

**ACLF** : Association des Cytogénéticiens de Langue Française

**CIL** : Comparaison Inter Laboratoire

**CIQ** : Contrôle Interne de Qualité

**COFRAC** : Comité Français pour l'Accréditation

**CEQ** : Contrôle Externe de Qualité

**D.U.** : Diplôme Universitaire

**ECA** : European Cytogeneticists Association

**FISH** : Fluorescence In Situ Hybridization

**LBM** : Laboratoire de Biologie Médicale

**RQA** : Responsable Qualité Adjoint

**RQ** : Responsable Qualité

## 1° Introduction

### 1.1 Intérêt et objectifs

Garantir la qualité des procédures analytiques et des résultats délivrés est une obligation légale pour l'ensemble des laboratoires de biologie médicale (LBM), qui s'inscrit dans les exigences de la norme ISO 15189 relatives aux compétences techniques propres aux LBM.

La norme ISO 15189 définit les exigences de qualité et de compétence des laboratoires de biologie médicale, indispensables à l'octroi d'une accréditation par le COFRAC.

Le chapitre de la norme portant sur la façon dont le LBM s'assure de la maîtrise des processus analytiques et de la fiabilité des résultats d'examens (§ 5.6), met l'accent sur 3 approches complémentaires que sont : les contrôles internes de qualité (CIQ), les contrôles externes de qualité (CEQ) et les comparaisons inter-laboratoires (CIL). Ces 3 approches sont explicitées dans les documents COFRAC SH GTA 01 (Guide technique d'accréditation en biologie médicale) et SH GTA 06 (Guide technique d'accréditation : contrôle de qualité en biologie médicale).

Pour la plupart des secteurs de la biologie médicale, l'évaluation externe de la qualité fait l'objet de programmes nationaux et/ou internationaux de contrôle, à partir d'échantillons de résultats inconnus, gérés par des organismes référencés d'évaluation externe de la qualité, voire directement par les sociétés savantes faisant autorité dans le domaine biologique considéré.

Les CIQ s'inscrivent dans une démarche de vérification et d'amélioration continue des performances des processus analytiques. En d'autres termes, ils englobent l'ensemble des procédures permettant de surveiller en permanence et de manière indépendante la reproductibilité des techniques d'analyse en cours dans le laboratoire, la fiabilité des résultats obtenus, mais aussi de déceler les erreurs du processus analytique, de les corriger et de les prévenir.

Dans le cadre de méthodes analytiques de type quantitatif, la mise en place de CIQ repose sur la validation de résultats chiffrés issus de séries d'analyses ou de matériaux de références et sur la définition de valeurs cibles et de limites d'acceptabilité, le tout pouvant être ultérieurement analysé et interprété par le biais de tests statistiques.

Pour une discipline basée sur l'utilisation de méthodes analytiques qualitatives et observationnelles, comme la cytogénétique médicale, la conception et la mise en place d'une démarche de CIQ constitue un véritable défi qu'il était intéressant et utile de relever afin de :

- réaliser un état de lieux des processus analytiques en cytogénétique, quelque peu empreinte de « traditionalisme »,

- réfléchir sur les étapes critiques et les facteurs de risque inhérents à l'analyse chromosomique en biologie médicale,
- mettre en exergue la spécificité des disciplines morphologiques, dont fait partie la cytogénétique, vis à vis des exigences de la norme ISO 15189 en matière de contrôle de la qualité.

Ce travail de mise en place d'un système de CIQ des processus analytiques en cytogénétique médicale a uniquement concerné 2 procédures de base, correspondant à deux aspects complémentaires de l'activité de cytogénétique médicale, à savoir la cytogénétique classique par réalisation du caryotype, et la cytogénétique moléculaire basée sur l'utilisation des techniques de FISH.

L'objectif de ce travail a donc été d'élaborer un système de CIQ simple, cohérent et facilement exploitable dans ces 2 processus analytiques, le caryotype et la FISH, afin d'assurer leur fiabilité et de prévenir la détérioration de leurs performances analytiques conformément à la norme ISO 15189,

## **1.2 Limites de l'étude**

La cytogénétique a été une des premières disciplines biologiques à s'impliquer dans une démarche qualité (en 1972 dans le New York State Laboratory Quality Assurance Program), car cette notion de qualité est indispensable pour la réalisation d'une analyse chromosomique et l'obtention d'un résultat interprétable. Toutefois, la cytogénétique classique est une science « morphologique », basée sur une approche observationnelle et sur des techniques que certains qualifient d'artisanales dans la mesure où leur maîtrise nécessite un long apprentissage et que de nombreux paramètres « environnementaux » peuvent influencer leur réalisation.

De manière plus rigoureuse, la cytogénétique se définit comme la discipline ayant pour objet l'étude de la structure et du fonctionnement normal et pathologique des chromosomes et de la chromatine. La cytogénétique médicale vise à détecter les anomalies chromosomiques (de nombre ou de structure) constitutionnelles ou acquises grâce à des techniques microscopiques ou de biologie moléculaire, afin d'établir un diagnostic biologique et d'assurer un conseil génétique. La cytogénétique moléculaire est le domaine de la cytogénétique regroupant les techniques d'analyse in situ basées sur les homologies de séquences ADN (essentiellement la technique FISH) et permettant l'identification spécifique de tout ou partie d'un ou de plusieurs chromosomes, en complément du caryotype.

Le caractère qualitatif des procédures analytiques en cytogénétique rend difficile l'élaboration de CIQ. Une revue des principaux guides de bonnes pratiques publiés par des sociétés savantes de cytogénétique, telles que l'Association des Cytogénéticiens de Langue Française (ACLF), l'European Cytogeneticists Association (ECA), l'American College of

Medical Genetics (ACMG) ou l'Association of Cytogenetic Technologists (ACT), montre que les recommandations professionnelles en matière de contrôle de qualité portent essentiellement sur la réalisation de CEQ.

Basés sur l'examen direct ou virtuel de lames d'échantillons pré-traités et anonymisés, ces CEQ apprécient l'interprétation et la qualité du compte-rendu accompagnant le résultat. Ce type de contrôle est donc plus focalisé sur la phase post-analytique que sur la partie analytique à proprement parler. Le seul critère proposé pour juger de la qualité d'une analyse cytogénétique classique, est la résolution du caryotype qui s'exprime en nombre de bandes observées sur l'ensemble des chromosomes.

Un autre facteur pouvant limiter, voire même biaiser la réalisation de CIQ des processus analytique cytogénétique, est la part de subjectivité que comporte irrémédiablement l'analyse microscopique et son interprétation, en fonction de l'analyste, de son expérience, voire même de ces connaissances de la mécanique chromosomique puisque le nombre et le type d'anomalies chromosomiques sont potentiellement illimités.

### **1.3 Plan d'action**

Pour répondre à l'objectif que nous nous étions fixé, le plan d'action élaboré a consisté à :

- 1) identifier les points critiques dans les différentes étapes des 2 procédures analytiques sélectionnées, et définir les indicateurs de performance pertinents à évaluer.
- 2) concevoir des procédures de CIQ simples et claires, adaptées aux procédures analytiques du caryotype et de la technique FISH.
- 3) mettre en pratique ces procédures dans l'unité de cytogénétique afin de pouvoir exploiter rapidement et en continu les données de ces contrôles de qualité.

## **2° Contexte de mise en œuvre du programme de CIQ**

### **2.1 Contexte réglementaire et normatif**

En 2010, l'ordonnance n°2010-46 du 13 janvier 2010 a donné une dimension légale à la démarche d'assurance qualité au sein des LBM. L'ensemble des LBM français est désormais tenu de passer d'une obligation de moyens, basée sur l'application du GBEA, à une obligation de résultats en obtenant l'accréditation selon la norme ISO 15189, délivrée par le COFRAC.

Les informations concernant les exigences relatives au contrôle interne de la qualité sont présentées et commentées dans différents documents.

Dans la norme ISO 15189, les contrôles de qualité interne et externe font l'objet d'un paragraphe spécifique dans le chapitre 5 concernant les exigences techniques. Il s'agit du paragraphe 5.6. Il est important de noter que l'intitulé et la teneur de ce paragraphe ont été

significativement modifiés entre la deuxième version de la norme éditée en 2007 et codifiée NF EN ISO 15189 (Norme Française et Européenne) et la nouvelle version en vigueur depuis fin 2012 et codifiée ISO/FDIS 15189 (Norme Internationale).

Dans la version de 2007, le paragraphe 5.6 était intitulé « Assurer la qualité de procédures analytiques », et il stipulait que :

*« Le laboratoire doit concevoir des systèmes de contrôle interne de qualité permettant de vérifier que la qualité des résultats est bien obtenue. Il est important que ce système de maîtrise permette aux membres du personnel d'obtenir des informations claires et faciles à comprendre sur lesquelles baser leurs décisions techniques et médicales. Il convient de veiller particulièrement à éliminer les erreurs susceptibles de se produire dans le processus de traitement des échantillons ... »* (NF EN ISO 15189 - § 5.6.1).

*« Le laboratoire doit déterminer l'incertitude des résultats dans la mesure où cela est pertinent et possible »* (NF EN ISO 15189 - § 5.6.2).

*« Le laboratoire doit participer à des comparaisons interlaboratoires, telles que celles organisées dans le cadre de programmes d'évaluation externe de la qualité »* (NF EN ISO 15189 - § 5.6.4).

Dans la nouvelle version de 2012, le paragraphe 5.6 est désormais intitulé « Garantie de qualité des résultats ». Il débute par des considérations généralistes indiquant que :

*« Le laboratoire doit garantir la qualité des examens en les réalisant dans des conditions définies. Le laboratoire ne doit fabriquer aucun résultat »* (ISO/FDIS 15189 - § 5.6.1).

La formulation des exigences présentées dans ce paragraphe, ainsi que de leur mise en application, apparaît plus souple ; peut-être est-ce en raison de la prise en compte des difficultés de mise en place de CIQ pour les procédures analytique qualitatives ?

Ainsi, les notions de « détermination de l'incertitude des résultats » et de « traçabilité » ont disparu du paragraphe 5.6.

Le nouveau texte met l'accent sur l'exploitation des données du contrôle qualité :

*« Le laboratoire doit disposer d'une procédure visant à éviter de libérer les résultats des patients en cas de défaillance du contrôle qualité. Les données de contrôle qualité doivent être revues régulièrement pour détecter les tendances de réalisation d'analyses qui peuvent indiquer des problèmes dans le système d'analyse »* (ISO/FDIS 15189 - § 5.6.2.3).

Par ailleurs, la comparabilité des résultats d'examens est désormais explicite :

*« Il doit exister un moyen défini permettant de comparer les procédures, équipements et méthodes utilisés et d'établir la comparabilité des résultats des échantillons de patients dans les intervalles cliniques appropriés pour des procédures et/ou équipements identiques et/ou des sites différents »* (ISO/FDIS 15189 - § 5.6.4).

Ces exigences de la norme sont explicitées et commentées dans plusieurs guides techniques publiés par le COFRAC:

- le document SH GTA 06 intitulé «Guide technique d'accréditation : contrôle de qualité en biologie médicale » qui concerne spécifiquement les exigences du paragraphe 5.6 et qui se base sur les bonnes pratiques et l'état de l'art en biologie médicale. Le dernier chapitre porte sur « La maîtrise de la qualité des examens – Méthodes de type qualitatif » mais il ne consacre seulement qu'un paragraphe de 11 lignes au CIQ (§ 11.6 « Contrôle interne de qualité »).

- le document SH GTA 01 intitulé «Guide technique d'accréditation en biologie médicale » consacre un paragraphe aux contrôles de qualité (§ 6.23 « Assurer la qualité des procédures analytiques et des résultats – Contrôles de qualité »). Concernant les CIQ, ce paragraphe souligne l'importance pour le laboratoire de définir ses propres tolérances (bornes) pour chaque contrôle mis en œuvre, ainsi que des seuils d'alarme et d'action en cas d'écart sur un résultat de contrôle. Le cas des examens à résultats qualitatifs, en particulier fondés sur une identification morphologique, est abordé avec la recommandation pour le laboratoire « *d'évaluer régulièrement la qualification des opérateurs réalisant cette tâche* » et en précisant qu'« *un moyen alternatif de contrôle peut être le recours à des doubles lectures par différents opérateurs* » (SH GTA 01 - § 6.23).

- le document SH GTA 04 intitulé «Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale » fait aussi mention des CIQ pour les examens à résultats qualitatifs dans son sous-paragraphe 9.2 « Vérification/validation d'une méthode d'analyse qualitative – Contenu du dossier » en indiquant que les CIQ doivent concerner les paramètres essentiels que sont la spécificité analytique, la sensibilité diagnostique, mais aussi la stabilité des réactifs et la robustesse de divers paramètres (incubation, pH ..).

- le document SH REF 02 intitulé «Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale » revient sur les contrôles de qualité (§ 5.6) en soulignant quelques dispositions réglementaires et exigences normatives, agrémentées de 2 notes sur l'organisation des comparaisons interlaboratoires et les incertitudes de mesure.

## **2.2 La démarche qualité au LBM du CHRU de Montpellier**

Le CHRU de Montpellier est organisé en 13 pôles d'activité hospitalo-universitaires : 11 pôles cliniques, un pôle pharmacie et un pôle Biologie-Pathologie.

Le LBM du CHRU qui recouvre l'ensemble de la biologie médicale et de la biologie de la reproduction, est à cheval sur 2 pôles d'activité (cf. organigramme en Annexe I) :

- le pôle Biologie-Pathologie, regroupant la biochimie, l'hématologie, l'immunologie, la génétique, la bactériologie, la virologie, la parasitologie-mycologie et la biologie délocalisée,

- le pôle Naissance et Pathologie de la Femme, qui comprend l'AMP et la Cytogénétique constitutionnelle.

Son fonctionnement est assuré par une équipe de direction constituée d'un responsable du LBM, le chef de pôle Biologie-Pathologie, d'un cadre supérieur de santé et d'un cadre administratif de gestion.

Depuis 2005, le pôle s'est doté d'une cellule transversale qualité, le bureau Qualité, qui coordonne la démarche qualité de l'ensemble des unités du LBM. Le bureau Qualité est composé du responsable Qualité (RQ) du LBM, biologiste nommé par la direction générale du CHRU et le président de la commission médicale d'établissement, de son suppléant, biologiste nommé par le responsable du LBM, du cadre supérieur de santé du pôle Biologie-Pathologie, du responsable des audits internes, d'un secrétaire, d'un technicien d'une unité du LBM et d'un ingénieur qualité de la direction qualité gestion des risques référent du LBM. (cf. organigramme en Annexe II).

Le bureau Qualité a pour fonctions essentielles : de piloter le projet d'accréditation dans son aspect opérationnel, de définir la politique Qualité en concertation avec le responsable du LBM, de définir les niveaux de mutualisation, de fixer et de suivre les plans d'actions généraux et de vérifier l'adéquation des moyens aux besoins constatés.

Les dispositions générales prévues dans le cadre de la politique qualité du LBM et mises en place pour obtenir et garantir la qualité de ses prestations, sont présentées dans le manuel Qualité du LBM. Le manuel Qualité est complété par des procédures et des documents Qualité qui précisent les dispositions opérationnelles, organisationnelles et managériales relatives au LBM.

L'ensemble de ces documents sont gérés au travers d'une procédure de gestion documentaire (Ref : LBM /TRANSVERSAL/002/v1).

### **2.3 La démarche qualité au sein de l'unité de Cytogénétique**

L'unité de Cytogénétique fait partie du département de Génétique médicale, sous l'appellation « Unité médicale de Génétique Chromosomique et plateforme de recherche de microremaniements par puces à ADN ». Elle est intégrée au pôle Naissance et Pathologie de la Femme.

L'unité est composée de 6 biologistes, une cadre de santé, 2 ingénieurs hospitaliers, 8 techniciennes, une secrétaire et 2 agents de service.

Au niveau organisationnel, l'unité est divisée en 6 secteurs (cf l'organigramme de l'unité de Cytogénétique – Annexe III).

Du point de vue de l'activité de biologie médicale, l'unité comprend 5 secteurs :

- le secteur prénatal qui concerne la réalisation des caryotypes fœtaux à partir de cultures cellulaires de liquides amniotiques ou de prélèvements de villosités choriales.
- le secteur postnatal qui s'occupe de la réalisation des diagnostics postnataux sur caryotypes métaphasiques à partir de prélèvements sanguins ou tissulaires.
- le secteur FISH, correspondant à l'activité de cytogénétique moléculaire, permet de compléter et d'approfondir les résultats des diagnostics réalisés dans les 2 précédents secteurs, en particulier pour les diagnostics suspects. La technique FISH peut être réalisée sur les métaphases ou sur les noyaux interphasiques. Utilisée sur des cellules non cultivées, elle permet de délivrer rapidement un diagnostic. Cependant, la technique FISH ne peut en aucun cas remplacer une étude complète du caryotype.
- le secteur Puces à ADN développe une nouvelle forme d'analyse chromosomique basée sur l'hybridation de l'ADN du patient sur un réseau de séquences d'ADN disposées sur des lames baptisées puces à ADN. Le pouvoir de résolution de cette nouvelle méthode d'analyse des chromosomes est 10 à 1000 fois supérieur à celui du caryotype. Elle permet donc de mettre en évidence des déséquilibres chromosomiques non visibles sur le caryotype, en s'affranchissant de la culture cellulaire et de l'analyse morphologique des chromosomes.
- Le secteur Cellules Souches (baptisé Chromostem) regroupe les analyses chromosomiques (caryotype, FISH, puces à ADN) réalisées sur les cellules souches pluripotentes pour les laboratoires de divers organismes de recherche.

La mise en œuvre de la politique Qualité du LBM au sein de l'unité de Cytogénétique s'est accompagnée de la nomination d'un responsable Qualité adjoint (RQA) et d'un suppléant par le coordonnateur du département, et de la création d'une cellule Qualité composée de:

- un responsable Qualité adjoint (RQA) et un suppléant, qui ont pour fonction d'animer la cellule Qualité. Le RQA participe aux réunions transversales du LBM.
- deux représentants de chaque secteur d'activité (un biologiste et un technicien), désignés comme référents Opération dont la fonction est d'assister le RQA pour développer la démarche Qualité dans leur secteur d'activité.

Cette organisation a conduit à la constitution de 6 groupes de travail Qualité correspondant aux 6 secteurs organisationnels de l'unité (cf. organigramme de la cellule Qualité - Annexe IV).

La mission première de la cellule Qualité est de mettre en œuvre la politique Qualité définie par la direction, en déclinant les axes de celle-ci dans les différentes activités techniques, managériales et supports.

Elle prend en charge l'optimisation des processus et la gestion de la documentation interne à l'unité. Ceci concerne la rédaction, la révision, la gestion, la diffusion et l'archivage des documents du système Qualité. Sa fonction est aussi de gérer les non-conformités à travers la maîtrise des risques. Enfin, elle a une mission importante d'information et de motivation auprès de l'équipe pour sa participation active à la démarche Qualité.

Le travail de la cellule Qualité s'articule autour de réunions hebdomadaires des groupes de travail, à raison d'un groupe par semaine (le mardi de 10h à 11h30). Ainsi, la démarche Qualité dans chaque secteur est analysée toutes les 6 semaines.

De la même façon que pour le LBM, le RQA et cellule Qualité organise une fois par an une revue de direction, en concertation avec le coordonnateur du département, pour évaluer les résultats obtenus sur les objectifs Qualité fixés par le LBM et l'unité.

#### **2.4 L'analyse cytogénétique classique et moléculaire face au CIQ**

L'examen cytogénétique classique repose sur la réalisation du caryotype, aussi bien dans le secteur prénatal que postnatal. La procédure technique de réalisation du caryotype peut être divisée en 4 phases :

- la phase de culture des cellules
- la phase de réalisation des préparations chromosomiques
- la phase de marquage des chromosomes
- la phase d'analyse microscopique des préparations chromosomiques

L'analyse de cytogénétique moléculaire par FISH s'effectue sur noyaux interphasiques ou sur métaphases, à partir de préparations cellulaires fixées sur lame. Elle peut aussi être schématiquement divisée en 4 phases :

- la phase d'étalement des cellules sur une lame
- la phase de pré-traitement de la lame
- la phase d'hybridation in situ des sondes sur la lame
- la phase d'analyse microscopique de la lame

Dans ces 2 types d'analyse, le caryotype et la FISH, le résultat repose sur l'estimation qualitative au microscope soit directement de la composition des métaphases (présence ou non d'une anomalie chromosomique), soit de la présence ou de l'absence in situ de signaux fluorescents permettant l'identification spécifique d'un chromosome ou d'un domaine chromosomique.

Il s'agit donc de méthodes manuelles de nature qualitative qui demandent une très bonne technicité. La spécialisation de technicien en cytogénétique nécessite une formation et un apprentissage d'au moins un an pour acquérir une compétence spécifique. Par ailleurs, le

nombre moyen d'examens effectués par technicien doit être suffisant pour permettre la qualité et la fiabilité des résultats (ACLF. Guide de Bonnes Pratiques en Cytogénétique, Révision 3 - Juin 2011).

Le bureau Qualité du LBM a mis à la disposition des unités de biologie médicale du CHRU de Montpellier des programmes de CIQ. Une procédure décrit les modalités de gestion des CIQ (Ref : LBM /PR/5.4/03) et une fiche de suivi de CIQ quantitatif est disponible (Ref : LBM /TRANSVERSAL/077/v1). Cependant, ces documents concernent uniquement les méthodes de type quantitatif, et ils ne peuvent donc pas être appliqués aux processus analytiques de la cytogénétique classique et moléculaire.

Au sein du LBM, d'autres unités sont confrontées au même problème de mise en place de CIQ pour des analyses morphologiques de type qualitatif. Aussi, en 2012, un groupe de travail des RQA « morphologistes », comprenant des biologistes des unités d'Anatomo-Pathologie, d'Hématologie, de Parasitologie-Mycologie et de Cytogénétique, s'est constitué pour réfléchir à la définition et à la mise en place de CIQ en sciences morphologiques. La confrontation des différentes expériences a mis l'accent sur la difficulté d'adapter la pratique des CQI aux domaines morphologiques.

### **3° Mise en place du programme de CIQ**

#### **3.1 Etat des lieux**

La mise en place d'un système de CIQ en cytogénétique peut se concevoir de 2 manières. La première consiste à évaluer le résultat final d'un examen, en fonction par exemple d'indications cliniques ou phénotypiques. En cytogénétique, le résultat découle de l'observation microscopique et il peut être de différents types : dénombrement d'un marquage spécifique ou d'une formule chromosomique, détection d'une anomalie avérée ou identification d'une nouvelle anomalie.

La seconde est d'introduire des contrôles à certaines étapes critiques du mode opératoire, susceptibles d'influencer le résultat de l'examen.

L'utilisation de ces 2 approches est concevable en cytogénétique, mais la deuxième approche paraît mieux appropriée aux procédures analytiques de cytogénétique, dans la mesure où il est difficile, voire parfois impossible de ré-analyser un échantillon ou de disposer d'un nouvel prélèvement afin de réitérer l'examen, en particulier en cytogénétique prénatale. L'instauration d'un contrôle de qualité continu de la phase analytique doit donc tenir compte des possibilités techniques, mais aussi des coûts de mise en place qui doivent rester raisonnables.

Selon le document SH GTA 01, « *il appartient au laboratoire de définir ses propres tolérances (bornes) pour chaque contrôle mis en œuvre, en adéquation avec les performances analytiques du laboratoire.* ».

Le guide indique aussi que « *dans le cas d'examen à résultats qualitatifs, en particulier lorsqu'il repose sur une lecture réalisée par l'opérateur (identification fondée sur la morphologie), il appartient au laboratoire d'évaluer régulièrement la qualification des opérateurs réalisant cette tâche* » (SH GTA 01 - § 6.23.1).

Les diverses sources de variabilité et les facteurs pouvant impacter le résultat d'un processus analytique peuvent être identifiés et représentés via la réalisation du diagramme de cause d'Ishikawa. Dans cette représentation graphique en arête de poisson, les causes sont réparties en 5 catégories constituant les 5M : Matière, Matériel, Méthode, Main d'œuvre et Milieu.

La réalisation de ce type d'évaluation pour les processus analytiques en cytogénétique classique et moléculaire, avec l'aide des groupes de travail Qualité de l'unité, a abouti au diagramme suivant :

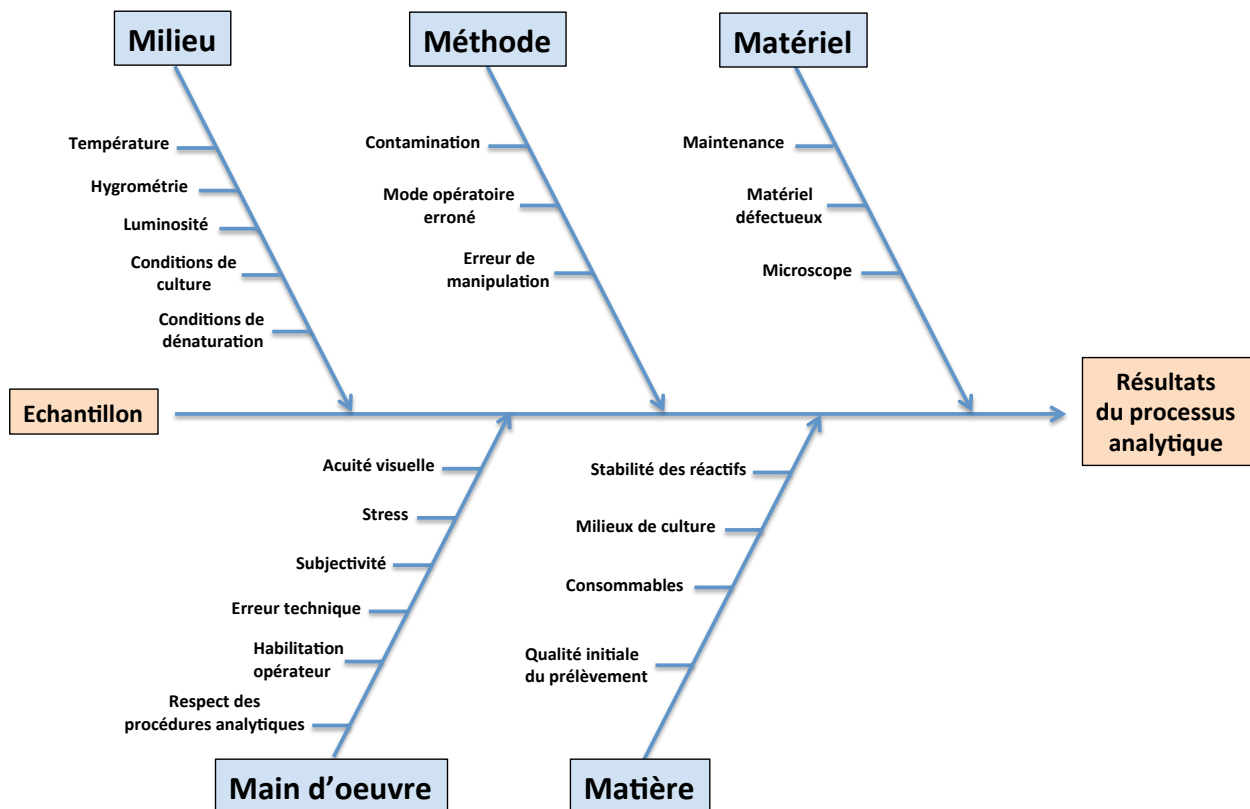


Diagramme des 5M (Ishikawa) appliqué aux processus analytiques du caryotype et de la technique FISH

Toutes les causes répertoriées ont un impact, plus ou moins important, sur le résultat des analyses, et il convient d'en assurer au mieux la maîtrise.

En ce qui concerne les paramètres matériels, il faut noter que du matériel spécifique est obligatoire et en 2 exemplaires pour la réalisation des examens de cytogénétique (Arrêté du 11 décembre 2000 fixant la liste des équipements des laboratoires d'analyses de biologie médicale nécessaires à la réalisation des examens des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales). C'est le cas des incubateurs, des centrifugeuses, des réfrigérateurs et des microscopes. Si ces équipements critiques ne sont pas dupliqués, une stratégie de secours doit exister qui doit donner lieu à une procédure dégradée en cas de panne.

En outre, la climatisation des locaux est nécessaire pour assurer une atmosphère avec le minimum de variation de température et de pression. Le contrôle qualité de ce dernier facteur, comme celui du système électrique régulé ou du suivi métrologique du matériel, ne relèvent pas de la compétence du technicien et du biologiste opérant en cytogénétique. De ce fait, ils ne peuvent pas être retenus comme indicateurs de performance pour établir le CIQ des processus analytiques en cytogénétique.

### **3.2 Définition et sélection des indicateurs de performances à inclure dans le CIQ**

La démarche de contrôle de la qualité d'une méthode qualitative peut porter sur l'analyse de plusieurs critères. En premier lieu, il s'agit de l'exactitude. Ce n'est pas une valeur qui s'exprime numériquement. Elle est liée à la notion d'incertitude. On peut considérer que les 2 composants de l'exactitude sont :

- la sensibilité qui évalue la capacité du test à donner un résultat positif lorsque l'anomalie est présente,
- la spécificité qui évalue la capacité du test à donner un résultat négatif lorsqu'il n'y a pas d'anomalie.

L'autre paramètre essentiel à prendre en compte est la robustesse. Le guide SH GTA 06 précise que « *Par robustesse d'une technique d'analyse, on entend une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des variations faibles mais délibérées des paramètres de la méthodes, et qui fournit une indication sur sa fiabilité dans les conditions normales d'utilisation* » (SH GTA 06 - § 6.3.4).

Enfin, dans le cas de méthodes qualitatives, la justesse des techniques utilisées est aussi un critère de performance qui peut s'évaluer en vérifiant la cohérence entre les résultats obtenus par 2 techniques différentes, mais aussi par des comparaisons interlaboratoires. Le suivi de ce critère va dans le sens de la nécessité de tester la comparabilité des méthodes et

des résultats, clairement stipulée dans la nouvelle version de la norme ISO 15189 (ISO/FDIS 15189 - § 5.6.4).

Comme le souligne très justement le guide SH GTA 06 dans son chapitre 11 : « *Pour les examens qualitatifs, la maîtrise des résultats et du processus analytique pourra être plus complexe que pour les examens de type quantitatif et nécessitera la mise en œuvre de moyens divers. Les sources de variations sont nombreuses et les différentes étapes du processus seront à maîtriser* » (SH GTA 06 - § 11).

Fort de ces recommandations et des résultats de l'évaluation des risques et de criticité des différentes étapes menée par le biais du diagramme d'Ishikawa, nous avons sélectionné des facteurs de risque pour chacune des 4 étapes des 2 processus analytiques, en veillant à ce que ces CIQ n'augmentent pas la charge de travail au détriment des objectifs cliniques recherchés, et qu'il puissent fournir aux opérateurs des informations claires sur le déroulement de chaque processus analytique.

Ce choix des indicateurs de performance a tenu compte des préconisations des sociétés savantes de Cytogénétique que sont l'ACLF et l'ECA. Pour chaque indicateur, nous avons définis des limites d'acceptabilité en fonction des bonnes pratiques et des performances communément observées et acceptées (état de l'art) dans les laboratoires de cytogénétique, toujours en conformité avec les recommandations de l'ACLF et de l'ECA.

A noter que dans cette démarche, nous avons fait abstraction d'un paramètre essentiel qui est la qualité initiale du prélèvement. Bien qu'elle conditionne le succès de l'ensemble du processus analytique, en particulier par le risque de contamination lié à certains types de prélèvement (liquide amniotique, sang fœtal, villosités choriales..), nous avons considéré que le contrôle de ce paramètre faisait parti de la phase prè-analytique et qu'en conséquence, il ne serait pas pris en compte dans ce travail focalisé uniquement sur la phase analytique.

Pour les 4 phases analytiques de la réalisation du caryotype, nous avons défini les indicateurs de performance suivants :

➤ Phase de culture des cellules :

Un test de pousse basé sur la mise en culture des cellules dans 2 milieux différents, et une culture réalisée en double dans 2 incubateurs distincts.

Le critère de conformité est l'obtention d'une pousse cellulaire identique et sans contamination dans les 2 milieux entre le 4<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jour de culture.

La limite d'acceptabilité est l'absence de pousse cellulaire attestée sous microscope inversé (x10) après 10 jours de culture.

➤ Phase de réalisation des préparations chromosomiques :

Un test de réactif portant sur la colcémid, facteur de blocage des cellules en métaphases. A chaque nouveau lot de colcémid employé, un test de comparabilité est réalisé, en comparant sur un même échantillon de cellules la teneur en métaphases obtenues avec le nouveau lot et le lot précédemment utilisé, servant de contrôle.

Le critère de conformité est l'obtention d'une teneur identique de métaphases de qualité morphologique similaire, attesté sous microscope (x40).

La limite d'acceptabilité est une teneur en métaphases diminuée de moitié.

Un test d'étalement visant à contrôler la qualité de l'étalement des métaphases sur lame. En respectant les paramètres spécifiques de température et d'hygrométrie pour chaque type de prélèvement dans l'enceinte dédiée à l'étalement, plusieurs lames sont préparées pour chaque échantillon cellulaire, puis observées au microscope. Le nombre moyen de métaphases par champ d'observation est estimé au faible grossissement (x10), ainsi que la qualité morphologique des métaphases au grossissement x40.

Le critère de conformité est la présence d'un minimum de 3 métaphases de bonne qualité par champ d'observation.

La limite d'acceptabilité est la présence d'une seule métaphase ou l'absence de métaphases sur 4 champs d'observation consécutifs.

➤ Phase de marquage des chromosomes :

Un test de marquage en bandes. La génération de bandes spécifiques le long des chromosomes permet leur identification et la détection des anomalies chromosomiques au microscope. Plusieurs systèmes de marquage en bandes existent dont le niveau de résolution peut être apprécié au microscope. Ce test évalue le nombre de bandes obtenues sur un même échantillon par 2 systèmes de marquage différents, les bandes R et les bandes G.

Le critère de conformité est l'obtention de 400 à 500 bandes sur chaque métaphase et la reconnaissance de certaines bandes caractéristiques sur les chromosomes 5, 7, 8 et 11, conformément aux normes internationales établies (ISCN 2013 : An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. S Karger, Basel 2013). Un score peut être établi en fonction de la qualité des bandes et comparé dans les 2 systèmes de marquage utilisé (score de qualité des bandes).

La limite d'acceptabilité est l'obtention de 150 bandes ou moins par métaphase.

➤ Phase d'analyse microscopique des préparations chromosomiques :

Un test d'utilisation du microscope, basé sur la double lecture (appelée « confrontation interne ») d'une lame de préparation chromosomique par 2 opérateurs, pour effectuer la relocalisation de 5 métaphases préalablement sélectionnées au microscope (x100) par l'un et l'autre des 2 opérateurs en utilisant le logiciel de capture d'image couplé au microscope.

Le critère de conformité est la détection des 5 métaphases.

La limite d'acceptabilité est la relocalisation de seulement 3 métaphases.

Un test d'interprétation microscopique, permettant d'évaluer l'exactitude de l'analyse au microscope. Une confrontation de l'analyse microscopique d'un même échantillon par 2 opérateurs est réalisée, en comparant le résultat du caryotype établi sur 5 métaphases classées (énoncé de la formule chromosomique) et sa classification en normal ou pathologique. La vérification de la sensibilité et de la spécificité de l'analyse microscopique est réalisée par l'examen comparatif de la résolution en bandes sur les paires de chromosomes homologues. Ce test peut être combiné au test précédent d'utilisation du microscope.

Le critère de conformité est l'énoncé de la même formule chromosomique et une classification « normale/pathologique » identique pour les 2 opérateurs.

La limite d'acceptabilité est une erreur de formulation et de classification argumentée sur plus de 2 des 5 métaphases analysées.

Pour les 4 phases analytiques de l'examen par FISH, nous avons défini les indicateurs de performance suivants :

➤ la phase d'étalement des cellules sur une lame :

Un test d'étalement, basé sur le contrôle au microscope (x40) de la qualité de l'étalement de 2 lames préparées à partir du même échantillon, en terme de densité et d'aspect morphologique des noyaux (et/ou des métaphases), et de propreté de l'étalement.

Le critère de conformité est la visualisation nette de plus de 10 noyaux intacts (et/ou 2 métaphases) par champs d'observation.

La limite d'acceptabilité est la visualisation de moins de 3 noyaux et l'absence de métaphase, par champs d'observation

➤ la phase de pré-traitement de la lame :

Un test de réactif portant sur l'étape préliminaire et indispensable de dénaturation de l'ADN dans une solution de formamide à 70% à 73°C. La solution dénaturante étant

préparée une fois par semaine, un test de comparabilité est réalisé en effectuant sur 2 lames la dénaturation avec la nouvelle solution dénaturante et la précédente servant de contrôle.

Le critère de conformité est l'obtention d'une dénaturation optimale et permettant une l'hybridation correcte des sondes d'ADN fluorescente sur leurs cibles nucléaires ou métaphasiques, appréciée au microscope à fluorescence

La limite d'acceptabilité est l'absence totale de marquage ou l'excès de marquage constatés sur l'ensemble des noyaux et des métaphases observés.

➤ la phase d'hybridation in situ des sondes sur la lame :

Un test de stabilité des sondes. Pour les sondes commerciales, la date de péremption indiquée par le fabricant doit être respectée. Lors de l'emploi d'un nouveau lot de sonde, la stabilité de la sonde est testée par l'obtention du marquage spécifique attendu sur les 2 chromosomes homologues, avec une bonne qualité des signaux fluorescents. Le même type de contrôle est opéré pour les sondes fabriquées dans l'unité, en fixant à 2 ans la date de péremption de la sonde (conformément aux recommandations de l'ACLF).

Le critère de conformité est l'observation de 2 signaux homologues, de taille et d'intensité similaire dans 10 noyaux interphasiques et/ou sur 5 métaphases sur des chromosomes homologues.

La limite d'acceptabilité est la détection de signaux fluorescents corrects sur moins de 8 noyaux interphasiques et/ou 4 métaphases.

Un test de performances de la sonde, portant sur sa spécificité et sa sensibilité qui consiste à contrôler au microscope à fluorescence l'hybridation de la sonde sur le chromosome homologue au niveau du locus d'intérêt. Habituellement, un remaniement chromosomique n'étant recherché que sur un seul des 2 chromosomes d'une paire homologue, le chromosome non remanié peut servir de témoin. Pour certaines sondes, notamment commerciales, peut s'y rajouter le contrôle de la co-hybridation in situ d'une sonde témoin ciblant un autre domaine du chromosome considéré. Il convient de s'assurer de l'obtention d'un signal d'hybridation correct permettant une interprétation sans ambiguïté des signaux obtenus. Ce test peut être combiné avec le test de stabilité des sondes.

Le critère de conformité est l'observation de signaux d'hybridation corrects pour les locus d'intérêt et éventuellement les sondes témoins sur les 2 chromosomes homologues, dans 10 noyaux interphasiques et/ou sur 5 métaphases.

La limite d'acceptabilité est la détection de signaux fluorescents corrects sur moins de 8 noyaux interphasiques et/ou 4 métaphases.

- la phase d'analyse microscopique de la lame ;

Un test d'utilisation du microscope à fluorescence, basé sur la double lecture d'une lame d'hybridation par 2 opérateurs, pour effectuer la relocalisation de 5 noyaux interphasiques et/ou de 3 métaphases préalablement sélectionnées au microscope (x100) par l'un et l'autre des 2 opérateurs en utilisant le logiciel de capture d'image couplé au microscope à fluorescence, puis en vérifiant la fluorescence des signaux observé (bon choix de la combinaison de filtres, identification correcte des couleurs de signaux).

Le critère de conformité est la détection correcte d'au moins 4 noyaux interphasiques et/ou 2 métaphases avec une identification correcte de la fluorescence des signaux.

La limite d'acceptabilité est la relocalisation de seulement 2 noyaux interphasiques et /ou d'une métaphase accompagné d'une mauvaise identification de la fluorescence.

Un test d'exactitude de l'interprétation. Une confrontation de l'analyse microscopique d'une même lame d'hybridation par 2 opérateurs est réalisée, en comparant les résultats d'hybridation in situ établi par chaque opérateur sur 50 à 100 noyaux interphasiques, et/ou 10 à 30 métaphases (le nombre doit être adapté en fonction de l'échantillon analysé et de l'indication), et l'interprétation donnée à la lame analysée comme normale ou anormale. Ce test peut être combiné au test précédent d'utilisation du microscope.

Le critère de conformité est l'obtention d'un résultat d'interprétation similaire pour les 2 opérateurs, en terme de fréquence de signaux normaux et anormaux détectés sur la lame testée (calcul du rapport signaux anormaux/signaux normaux) et d'interprétation normale ou anormale.

La limite d'acceptabilité est un écart de plus de 10% entre les résultats d'interprétation de 2 opérateurs.

Dans ces 2 procédures analytiques, il est indispensable de tenir compte d'un paramètre supplémentaire qui est la performance des opérateurs. C'est un paramètre essentiel pour la maîtrise du processus analytique dans une discipline comme la cytogénétique car la formation d'un biologiste ou d'un technicien aux techniques usuelles en cytogénétique et à la réalisation d'un caryotype nécessitent un apprentissage d'au moins un an. Comme l'indique le recueil SH GTA 06 au sujet des méthodes de type qualitatif : « *La maîtrise de la qualité passe obligatoirement par une habilitation du personnel* » (SH GTA 06 - § 11.1).

Cette exigence de qualification technique nécessite un contrôle régulier de l'habilitation et du maintien continu des compétences des opérateurs. Nous avons donc défini un indicateur de performance intitulé :

Test de performance, basé sur le contrôle du niveau d'habilitation de l'opérateur pour la procédure analytique considérée. Le niveau d'habilitation est établi régulièrement par le biais d'une procédure spécifique menée 2 fois par an par des opérateurs référents pour l'ensemble du personnel, en fonction de leurs tâches, et résumé dans un tableau des habilitations du personnel de l'unité (Ref : LBM/TRANSVERSAL/026/v1). Ce contrôle tient compte des compétences techniques au poste de travail mais aussi du maintien de ces compétences au moyen de formations continues et de participations à des congrès, à des séminaires ou à diverses réunions professionnelles telles que les staffs techniques.

Le critère de conformité est l'habilitation en cours de l'opérateur pour la (les) phase(s) du processus analytique qu'il doit réaliser.

La limite d'acceptabilité est le défaut d'habilitation de l'opérateur pour la (les) phase(s) du processus analytique qu'il doit réaliser.

### **3.3 Périodicité des CIQ**

Il revient aux biologistes et au RQA de fixer le planning des CIQ en fonction de l'activité de l'unité et de la criticité des différentes étapes des processus analytiques par rapport au résultat.

Hormis les CIQ réalisés à chaque changement de lot de réactifs ou à la suite d'une opération importante de maintenance, ou encore suite à la résolution d'une panne d'équipement, il apparaît raisonnable que la fréquence des CIQ ne soit pas inférieure 2 contrôles mensuels. Compte tenu du caractère qualitatif des 2 processus analytiques considérés, nous avons préconisé l'instauration d'un CIQ par semaine pour chaque processus.

## **4° Bilan et analyse de la mise en place d'un système de CIQ en Cytogénétique**

Pour concevoir cette procédure de CIQ, nous nous sommes appuyés, dans la mesure du possible, sur le texte de la norme ISO 15189 et sur les quelques recommandations dispensées dans les guides COFRAC au sujet du contrôle qualité des méthodes de type qualitatif.

Pour compenser l'absence de documents de référence et notre manque d'expérience, nous avons pris pour base de réflexion puis de conception, quelques mots-clés extraits du paragraphe 5.6 de la version 2012 de la norme ISO 15189 (ISO/FDIS 15189), comme la garantie de qualité, l'acceptabilité des résultats, et leur comparabilité.

Les indicateurs de performance retenus pour chacun des 2 processus analytiques ont désormais été mis en place dans l'unité de cytogénétique, de manière à être testé et évalué par les opérateurs, techniciens et biologistes, lors des procédures techniques de réalisation des caryotypes et des analyses par FISH.

Cette première phase d'utilisation est importante car elle devrait rapidement permettre d'évaluer la pertinence, la clarté et l'efficacité des CIQ proposés, et éventuellement nous amener à les modifier pour améliorer leur utilisation et leur performance. D'ores et déjà, certains points sont débattus par l'équipe technique, comme la mise en place des contrôles en double lecture pour les caryotypes et les critères de conformité pour le test de pousse des cultures cellulaires. Ces discussions ont pour effet d'impliquer tous les membres de l'unité dans la démarche Qualité, de manière très pragmatique et concrète, et de leur faire prendre conscience de la place que la démarche Qualité doit désormais occuper dans leur activité professionnelle et dans la routine de l'unité.

Lorsque cette phase d'adaptation sera finie, ces CIQ rempliront pleinement leur fonction de suivre régulièrement des processus analytiques et de les valider.

Le suivi des CIQ se fera à l'aide de fiches de CIQ dont un modèle est présenté en annexe (cf Annexe V). Ces fiches présentent de manière synthétique et chronologique les contrôles à effectuer pour chacune des 4 étapes des techniques de caryotypage et de FISH. Elles ont aussi pour fonction d'assurer la traçabilité des CIQ et l'exploitation de leurs résultats.

Pour être efficace, l'interprétation des CIQ doit être immédiate, d'où la nécessité de disposer d'indicateurs de performance simples et pertinents et d'assurer la traçabilité des résultats des CIQ. Pour faciliter la détection des erreurs et des résultats déviants, il est possible de hiérarchiser ces événements en fonction de leurs impacts sur le processus analytique et son résultat. Une telle démarche a été instaurée dans plusieurs laboratoires de cytogénétique d'Allemagne et du Royaume-Uni avec l'établissement d'un « Quality Score » noté de 2 à 6, en fonction du nombre de bandes chromosomiques et de l'augmentation proportionnelle du niveau de résolution. Dans notre test de marquage en bandes, une telle hiérarchisation pourrait améliorer l'interprétation du test et la détection de déviance dans le processus analytique.

Une interprétation différée des résultats des CIQ (sur un mois ou un trimestre) doit permettre, dans le meilleur de cas, de surveiller la « garantie de qualité », mais aussi de déceler d'éventuelles tendances à la dégradation ou la récurrence d'erreurs. Ceci doit permettre de définir le type d'erreur rencontrée : aléatoire ou systématique.

Dans le cas d'analyses qualitatives comme celles pratiquées en cytogénétique ou l'observation d'une caractéristique (présence ou absence d'une erreur chromosomique) conditionne entièrement le résultat de l'examen, les erreurs possibles sont essentiellement des erreurs aléatoires ou grossières.

La détection d'erreur ou de déviance dans le processus analytique fait office d'alerte pour le déclenchement d'une action corrective et l'établissement d'une déclaration de non-conformité. Cette démarche peut s'accompagner de la mise en place d'actions préventives pour éviter la récurrence des erreurs, comme par exemple le renforcement de la maintenance d'appareils critiques.

Le regroupement des résultats de CIQ et des alertes dans un tableau de bord récapitulatif devrait faciliter leur exploitation et leur archivage.

L'ensemble de ces données fera l'objet d'une présentation et d'une analyse lors de notre revue de direction annuelle, car il est indispensable de restituer le bilan des CIQ auprès de l'équipe technique qui en assure le suivi. Par ailleurs, l'analyse synthétique des résultats de CIQ peut permettre de construire un indicateur Qualité utilisable pour la validation de méthodes qualitatives.

Dans l'immédiat, l'emploi de CIQ en cytogénétique va être formalisé par la rédaction d'une procédure de gestion des CIQ qui validera la série de tests que nous avons choisi d'utiliser en cytogénétique classique et cytogénétique moléculaire. Ce texte pourra être utilisé comme trame pour la rédaction de procédure de CIQ dans d'autres secteurs du LBM où des processus analytiques de type morphologique et qualitatif sont employés.

Pour une meilleure compréhension de notre procédure de CIQ, nous avons choisi de la représenter sous forme d'un logigramme (cf. Annexe VI). Cette représentation minimaliste permet de bien visualiser les différentes étapes qui composent le CIQ, ainsi que les actions qui découlent de son fonctionnement.

## **5° Conclusion**

La mise en place de ce premier système de CIQ au sein de notre unité de cytogénétique était un véritable challenge en raison des spécificités morphologiques et qualitatives des analyses de cytogénétique et du manque de référentiels en la matière pour nous aider à aborder ce sujet. Ce travail a donc grandement bénéficié de l'apport de l'enseignement dispensé dans le cadre du D.U. « Assurance Qualité au LBM ».

Petit à petit, ce projet a mûri et a conduit à l'élaboration de CIQ qui sont désormais passés du stade de la conception à leur validation pratique par des utilisateurs, les biologistes et les technicien(ne)s de cytogénétique, pour qui la notion de qualité est indissociable de la réussite de l'analyse chromosomique. Ce haut niveau d'exigence est la garantie d'une analyse critique des CIQ proposés et donc d'une implication de tous les membres de l'unité dans la démarche Qualité.

Parallèlement à l'élaboration de ce système de CIQ, ce travail a mis l'accent sur différents points qu'il nous sera indispensable d'aborder rapidement pour pouvoir finaliser la démarche entreprise avec ce projet.

Ainsi, Il nous paraît intéressant de mettre en place des CIQ complets, englobant les phases pré-analytiques, analytiques et post-analytiques de réalisation et de validation d'un caryotype ou d'un examen FISH. En effet, de nombreux facteurs pré-analytiques (comme la qualité initiale de l'échantillon) ou post-analytiques (comme le traitement informatique des résultats) conditionnent la qualité de l'examen de cytogénétique.

Il est aussi essentiel d'étendre la pratique des CIQ à l'ensemble des secteurs de notre unité, et en particulier aux analyses sur puces à ADN qui relèvent à la fois de méthodes qualitatives et quantitatives, et pour lesquelles les facteurs de risques sont nombreux et variés.

Enfin, conformément aux exigences de la norme ISO 15189, il est urgent de mettre en place des comparaisons inter-laboratoires, dont les procédures restent à définir en Cytogénétique.

## 6° BIBLIOGRAPHIE

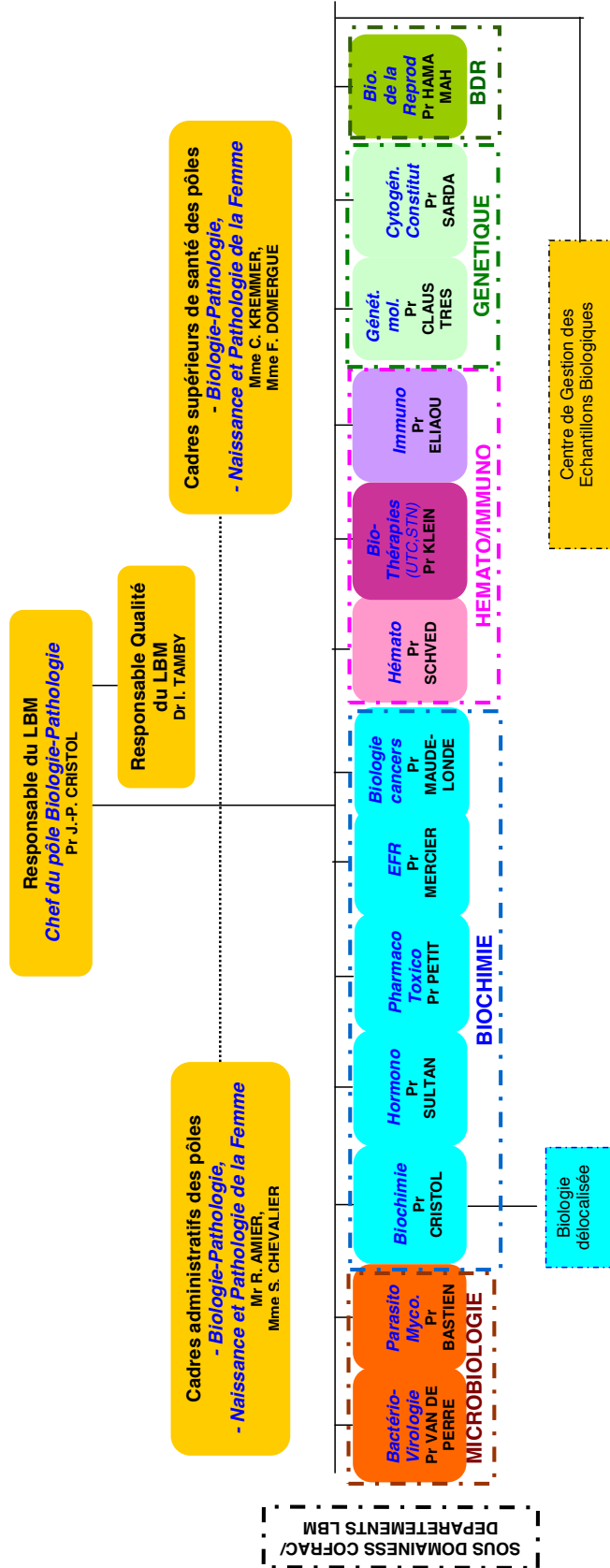
- SH GTA 01 : Guide technique d'accréditation en biologie médicale
- SH GTA 06 : Guide technique d'accréditation : contrôle de qualité en biologie médicale
- Ordonnance n°2010-46 du 13 janvier 2010
- Norme NF EN ISO 15189. Afnor, Août 2007
- Norme Internationale ISO/FDIS 15189 :2012 (F)
- SH GTA 01 : Guide technique d'accréditation en biologie médicale
- SH REF 02 : Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale
- Guide de Bonnes Pratiques en Cytogénétique. ACLF, révision 3 – Juin 2011
- LBM /TRANSVERSAL/002/v1 : Manuel Qualité du LBM CHRU de Montpellier
- LBM /PR/5.4/03 : Gestion des contrôles de qualité internes
- LBM /TRANSVERSAL/077/v1 : Fiche de suivi des CIQ
- Arrêté du 11 décembre 2000 fixant la liste des équipements des laboratoires d'analyses de biologie médicale nécessaires à la réalisation des examens des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales
- General Guidelines and Quality Assurance for Cytogenetics. ECA Newsletter N°29, January 2012
- ISCN. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature-. Karger Basel 2013.
- LBM/TRANSVERSAL/026/v1 : Tableau des habilitations du personnel.

## 7° ANNEXES

Annexe I : Organigramme du LBM du CHRU de Montpellier	p 29
Annexe II : Organisation Qualité au sein du LBM du CHRU de Montpellier	p 30
Annexe III: Organigramme de l'unité de Génétique Chromosomique	p 31
Annexe IV : Organigramme de la cellule Qualité de l'unité de Cytogénétique	p 32
Annexe V : Modèle de fiche de suivi de CIQ	p 33
Annexe VI : Logigramme de gestion des CIQ dans l'unité de Cytogénétique	p 34

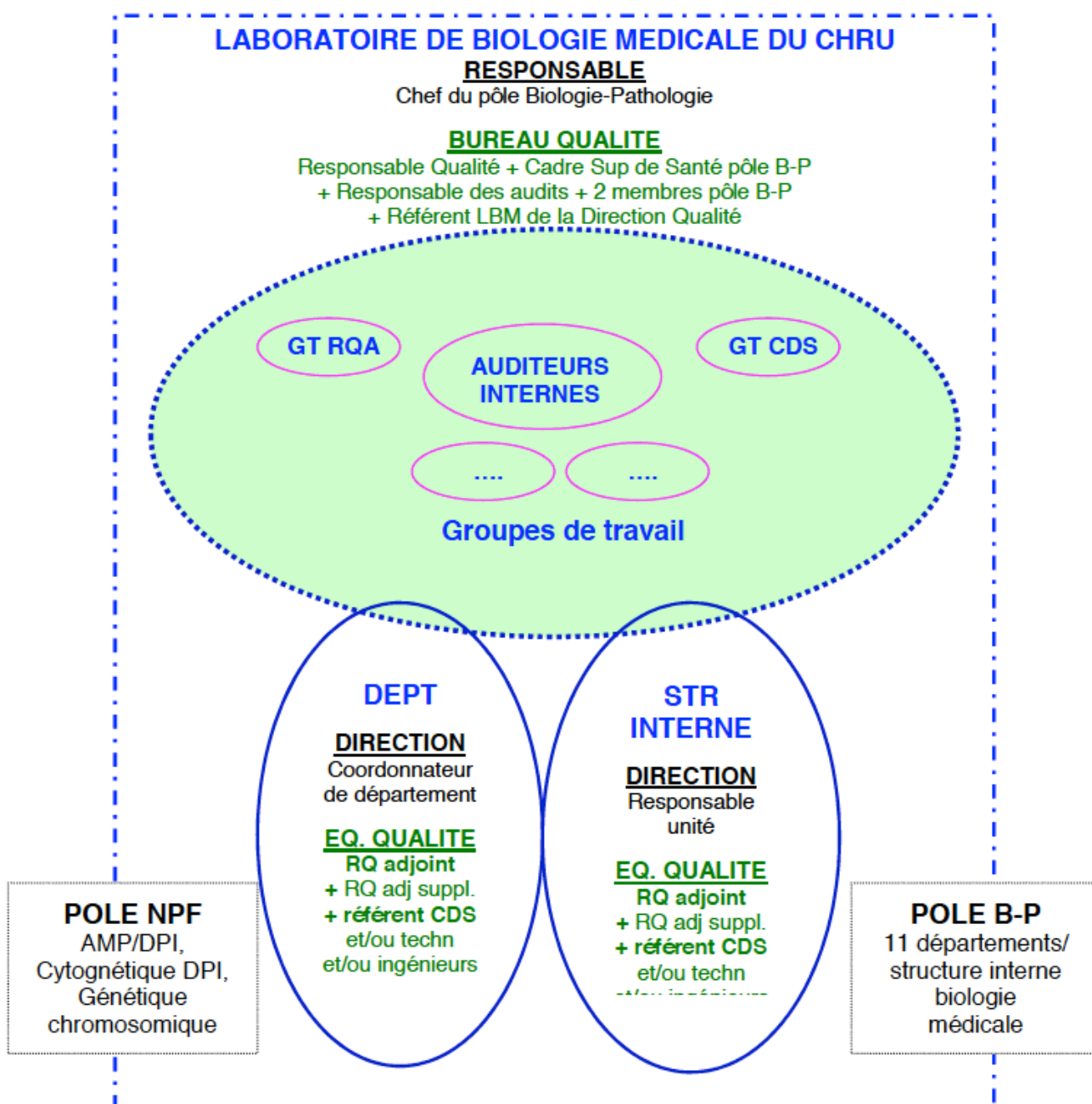
Annexe I

Organigramme du LBM du CHRU de Montpellier



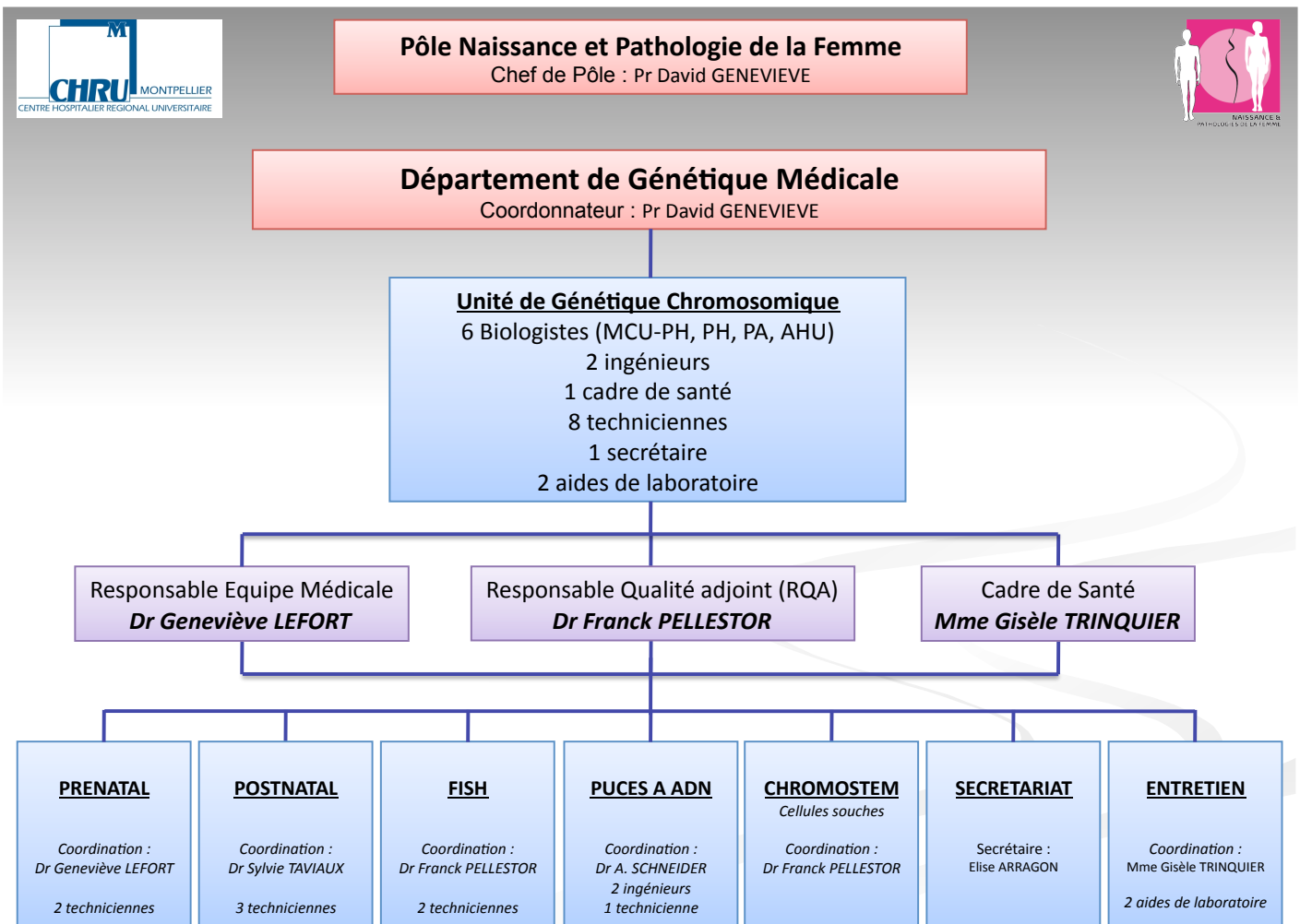
Annexe II

Organisation Qualité au sein du LBM du CHRU de Montpellier



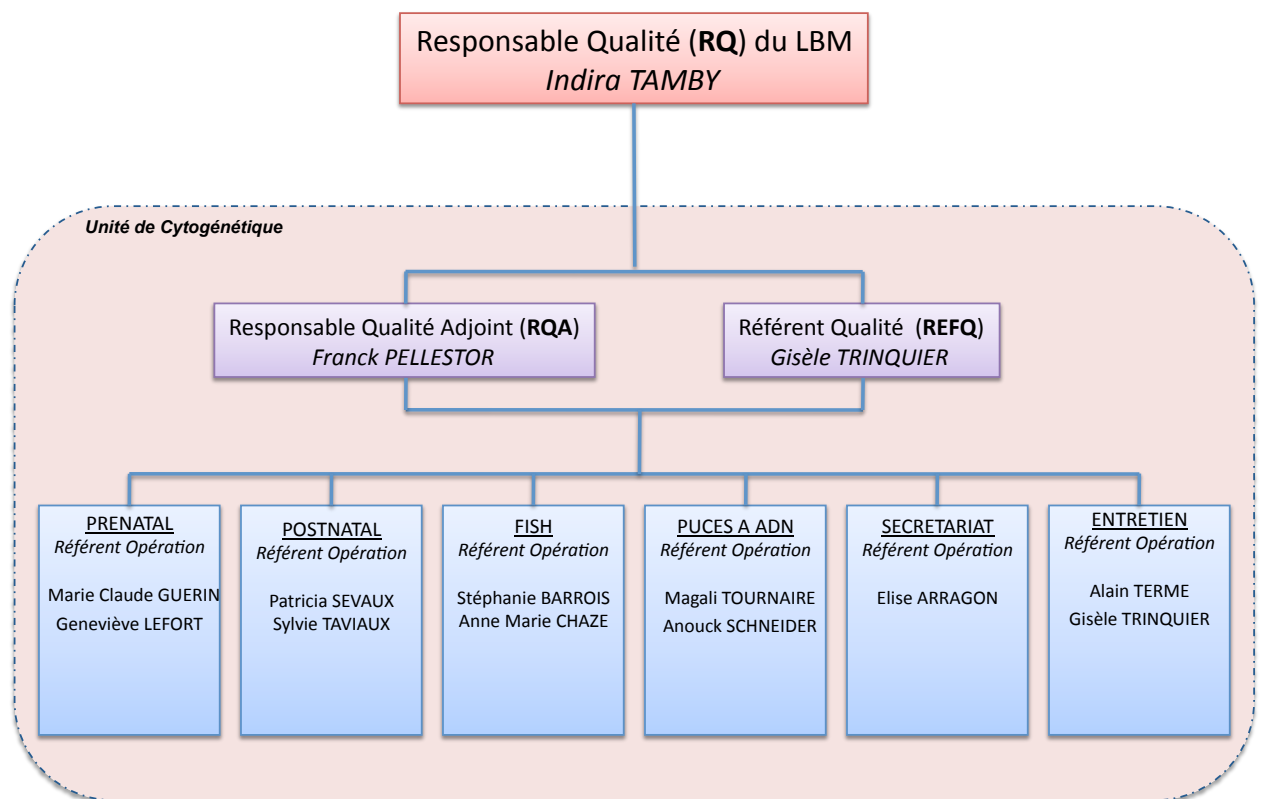
## Annexe III

### Organigramme de l'unité de Génétique Chromosomique



## Annexe IV

### Organigramme de la cellule Qualité de l'unité de Cytogénétique



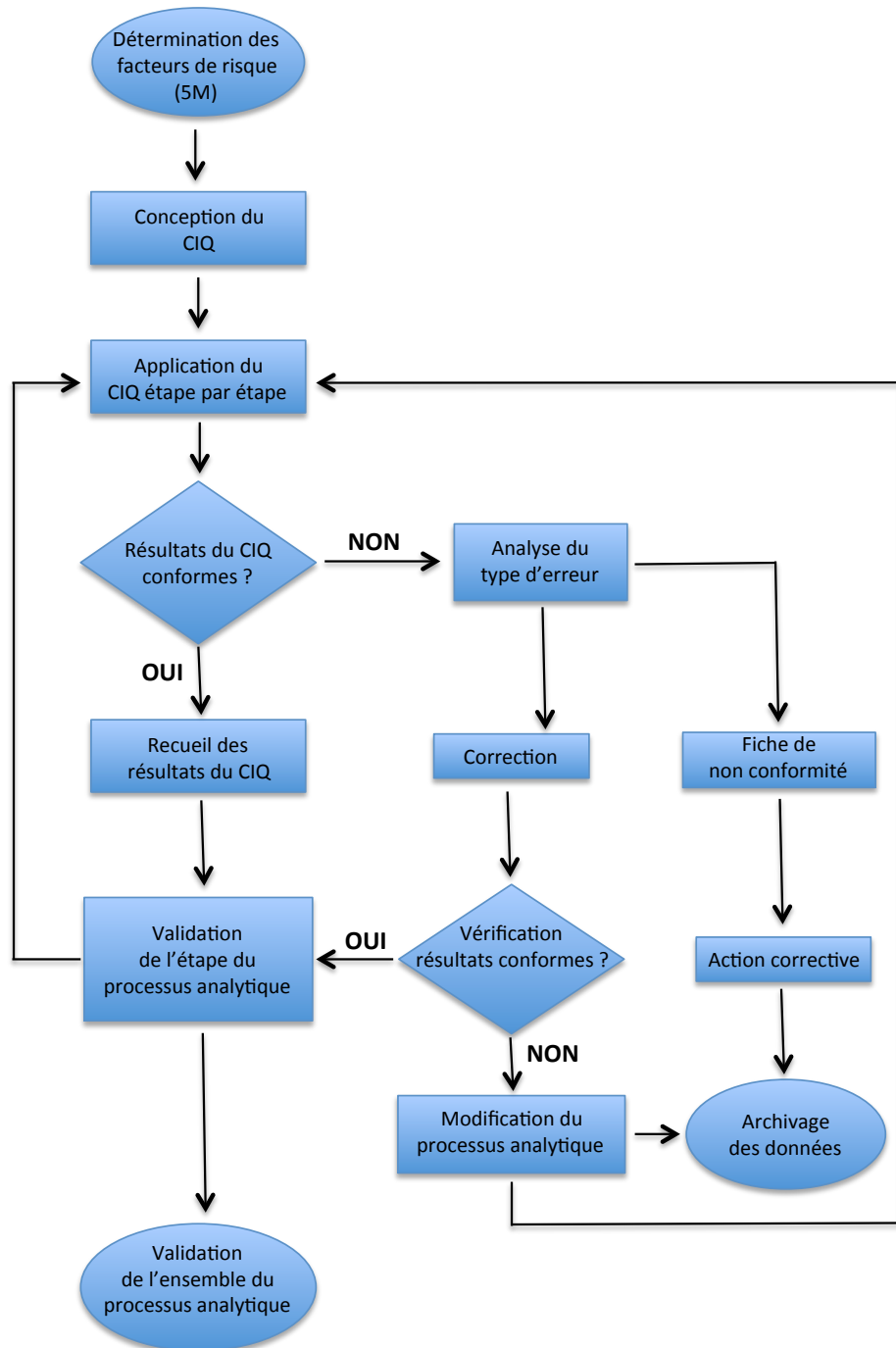
## Annexe V

### Modèle de fiche de suivi de CIQ

Étape Analytique	Habilitation opérateur	Test	Résultats	Critère de conformité	Observations
Phase de culture		Test de pousse		Pousse cellulaire dans 2 milieux	
Phase de préparation chromosome		Test réactif		Teneur en métaphases / lot réactifs	
		Test étalement		> 3 métaphases / champ	
Phase de marquage		Test nombre de bandes		> 400 - 500 bandes G et R	
Phase d'analyse microscopique		Test utilisation du microscope		Relocalisation de 5 métaphases en double lecture	
		Test interprétation microscope		Contrôle du caryotype sur 5 métaphases en double lecture	

## Annexe VI

### Logigramme de gestion des CIQ dans l'unité de cytogénétique



## RÉSUMÉ

L'élaboration d'un système de Contrôle Interne de Qualité (CIQ) au sein de l'unité de Cytogénétique du LBM du CHRU de Montpellier a porté sur 2 processus analytiques essentiels en cytogénétique, à savoir le caryotype et l'analyse FISH.

Dans les 2 cas, les méthodes utilisées sont de type qualitatif et les résultats sont validés sur des critères morphologiques lors de l'observation microscopique. La définition d'indicateurs de performance a donc été délicate. Elle a nécessité une analyse précise des facteurs de risque pour chacune des étapes de ces 2 techniques, qui s'est soldée par la sélection de 6 indicateurs pour le caryotype, et 6 pour la technique FISH, ainsi que par la définition de limites d'acceptabilité conformes avec la pratique des examens de cytogénétique. Leur choix a reposé sur des notions de simplicité, de pertinence et d'efficacité, mais aussi sur la nécessité de ne pas alourdir les procédures analytiques et la charge de travail. Les phases pré-analytique et post-analytique n'ont pas été prises en compte dans ce projet. Un critère supplémentaire portant sur la qualification et le maintien des compétences du personnel a aussi été intégré dans le système de CIQ.

Les 2 systèmes de CIQ sont désormais en place pour être validés par l'équipe technique, avant d'être utilisés en continu et de pouvoir ainsi assurer le suivi et la maîtrise des processus analytiques.