

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

Note : le laboratoire se référera au tableau du § 9 du document Cofrac SH GTA 04 rev 01 pour connaître les paramètres à déterminer dans le cadre d'une vérification sur site (portée A) ou d'une validation (portée B) et complètera **une fiche par examen de biologie médicale**

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE
<b>Identification du paramètre (comme identifié dans la liste détaillée des examens) :</b>  <b>ACPA : ANALYSE CHROMOSOMIQUE SUR PUCE A ADN</b>
<b>Processus simple <input type="checkbox"/> ; Processus complexe <input checked="" type="checkbox"/> (nombre de sous-processus : 4)</b>

DESCRIPTION DU PROCESSUS		
Sous-processus 1 :  <b>Extraction d'ADN par méthode manuelle</b>	Éléments à vérifier	Modalités de vérification/validation <sup>1</sup> : <input type="checkbox"/> 1. Répétabilité <input type="checkbox"/> 2. Fidélité intermédiaire <input checked="" type="checkbox"/> 3. Variabilité inter-opérateurs <input type="checkbox"/> 4. Justesse <input type="checkbox"/> 5. Exactitude <input checked="" type="checkbox"/> 6. Sensibilité et spécificité analytique <input type="checkbox"/> 7. Incertitudes <input checked="" type="checkbox"/> 8. Etendue de mesure <input checked="" type="checkbox"/> 9. Comparaison de méthodes <input checked="" type="checkbox"/> 10. Interférences <input checked="" type="checkbox"/> 11. Contamination <input checked="" type="checkbox"/> 12. Robustesse et fiabilité des réactifs <input checked="" type="checkbox"/> 13. Intervalle de référence
Sous-processus 2 :  <b>marquage</b>	Éléments à vérifier	Modalités de vérification/validation : <input type="checkbox"/> 1. Répétabilité <input type="checkbox"/> 2. Fidélité intermédiaire <input checked="" type="checkbox"/> 3. Variabilité inter-opérateurs <input type="checkbox"/> 4. Justesse <input type="checkbox"/> 5. Exactitude <input checked="" type="checkbox"/> 6. Sensibilité et spécificité analytique <input type="checkbox"/> 7. Incertitudes <input checked="" type="checkbox"/> 8. Etendue de mesure <input checked="" type="checkbox"/> 9. Comparaison de méthodes <input checked="" type="checkbox"/> 10. Interférences <input checked="" type="checkbox"/> 11. Contamination <input checked="" type="checkbox"/> 12. Robustesse et fiabilité des réactifs <input checked="" type="checkbox"/> 13. Intervalle de référence

<sup>1</sup> Note : Pour la vérification/validation de méthodes quantitatives, le renseignement des items 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 est attendu a minima. Pour la vérification/validation de méthodes qualitatives, le renseignement des items 3, 6, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 est attendu, a minima.

Le types de vérification (bibliographique ou essais) est à indiquer.

L'absence d'applicabilité de certains items (NA) doit être justifiée dans le corps du document.

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

<p>Sous-processus 3 :</p> <p><b>Hybridation</b></p>	<p>Éléments à vérifier</p>	<p>Modalités de vérification/validation :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 1 Répétabilité</li> <li><input type="checkbox"/> 2 Fidélité intermédiaire</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> 3 Variabilité inter-opérateurs</li> <li><input type="checkbox"/> 4 Justesse</li> <li><input type="checkbox"/> 5 Exactitude</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> 6 Sensibilité et spécificité analytique</li> <li><input type="checkbox"/> 7 Incertitudes</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> 8 Etendue de mesure</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> 9 Comparaison de méthodes</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> 10 Interférences</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> 11 Contamination</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> 12 Robustesse et fiabilité des réactifs</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> 13 Intervalle de référence</li> </ul>
<p>Sous-processus 4 :</p> <p><b>Analyse bioinformatique</b></p>	<p>Éléments à vérifier</p>	<p>Modalités de vérification/validation :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 1 Répétabilité</li> <li><input type="checkbox"/> 2 Fidélité intermédiaire</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> 3 Variabilité inter-opérateurs</li> <li><input type="checkbox"/> 4 Justesse</li> <li><input type="checkbox"/> 5 Exactitude</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> 6 Sensibilité et spécificité analytique</li> <li><input type="checkbox"/> 7 Incertitudes</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> 8 Etendue de mesure</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> 9 Comparaison de méthodes</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> 10 Interférences</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> 11 Contamination</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> 12 Robustesse et fiabilité des réactifs</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> 13 Intervalle de référence</li> </ul>

Pour chaque étape, le laboratoire procèdera à la vérification / validation des items attendus, et dupliquera autant que de besoin les pages 2 à 8 (évaluation des performances de la méthode) du présent document. Si un autre élément du processus lui semble critique, il devra vérifier / valider cette étape et le préciser dans la conclusion argumentée. C'est cette vérification qui lui permettra de maîtriser ce point critique.

Argumentaire (le cas échéant) :

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

## SOUS-PROCESSUS 1 : Extraction d'ADN par méthode manuelle

Portée A  ; Portée B

### DESCRIPTION DE LA METHODE

<b>Analyte / Mesurande :</b>	ADN (acide désoxyribonucléique)
<b>Principe de la Méthode :</b>	<p>L'extraction permet d'isoler l'ADN. La description de la méthode est détaillée dans les modes opératoires selon la méthode utilisée :</p> <p>-Phénol : La méthode est basée sur la solubilité différentielle des acides nucléiques et des protéines entre deux phases non miscibles.</p> <p>-Capture magnétique (kit Chemagic) : La méthode est basée sur la liaison réversible de l'ADN à une surface solide/billes/particules qui interagit spécifiquement avec l'ADN.</p> <p>-Extraction et purification d'ADN à partir du kit de collecte « Oragene OG-575 et du kit de purification « preplT-L2P » : La méthode comprend une étape d'inactivation des nucléases, des étapes de purification et une précipitation de l'ADN à l'éthanol</p> <p><u>Modèle d'étude :</u></p> <p>Les extractions d'ADN sont pratiquées à partir de matrices (sang, tissus, cultures cellulaires) dépendant du contexte de prescription. Le modèle d'étude proposé reflète l'activité pratiquée au laboratoire. La méthode d'extraction en phénol-chloroforme permet de prendre en charge des matrices différentes (tissus solides, tissus liquides, cultures, sang).</p> <p>Les extractions d'ADN pratiquées au laboratoire sont majoritairement pratiquées sur des prélèvements de diagnostic prénatal (81% période 2013-2018). Il s'agit de prélèvements précieux qu'il n'est pas envisageable d'utiliser pour faire des extractions en double car ceci nécessiterait d'utiliser une trop grande quantité du prélèvement natif ; prélèvement natif utilisé par ailleurs pour une analyse directe (direct BT, FISH sur LANC) et une mise en culture de sauvegarde.</p> <p>Les prélèvements pour extraction sur sang frais, dont le volume de l'échantillon permettrait de proposer une extraction en double, n'arrivent pas en nombre suffisant de façon concomitante pour envisager une étude en double sur 30 échantillons (89 extractions sur sang frais en 2018)</p>
<b>Type d'échantillon primaire :</b>	Sang, tissus, cultures cellulaires
<b>Type de récipient, additifs :</b>	Tube EDTA, flacon, flacon de culture, kit de collecte ORAgene DNA
<b>Prétraitement de l'échantillon :</b>	Variable selon la nature de l'échantillon primaire (cf mode opératoire correspondant)

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

Unités :	concentration en ng/µl
Critères d'interprétation <sup>2</sup> :	<p>Les méthodes d'évaluation de l'ADN extrait reposent sur</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- des <u>paramètres qualitatifs</u> : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Migration de l'ADN sur gel d'agarose 1%</li> </ul> </li> <li>- <u>paramètres quantitatifs</u> au spectrophotomètre : <ul style="list-style-type: none"> <li>- la présence/ou l'absence d'ADN (par mesure de la concentration d'ADN à 260 nm)</li> <li>- mesure de l'absorbance à 280 nm (mesure la quantité de protéines résiduelles dans la solution d'ADN) et à 230 nm (mesure de sels)</li> </ul> </li> </ul>
Marquage CE (Oui/Non) :	<p>NON : Chemagic</p> <p>OUI : prepIT-L2P, kit d'extraction ORAgene-DNA</p>
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	NA
Équipement (instrument, analyseur, etc.) :	<p>Spectrophotomètre</p> <p>Fluorimètre</p> <p>Cuve à électrophorèse</p> <p>TECAN (gels)</p>
Référence du réactif :	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Phénol stabilisé 500 ml Saturé en Tris pH 8.20 Eurobio ref. GEXPHE03-01</li> <li>- Chloroforme 500 ml Sigma Aldrich Chimie ref. 1026345</li> <li>- 2-Propanol VWR ref. 20842.312</li> <li>- Ethanol absolu (AnalaR NORMAPUR) VWR ref. 20821.31</li> <li>- Alcool 70% dilué à partir de l'Ethanol absolu VWR ref. 20821.31</li> <li>- Acétate de sodium 3M pH 7.0 Sigma ref. S2404-100ML</li> <li>- Tampon de lyse de GR (Annexe Ext sang phénol)</li> <li>- Tampon de lyse de GB (Annexe Ext sang phénol)</li> <li>- Protéinase K 100 mg EUROBIO Ref. GEXPRK00-6R</li> <li>- Tris-EDTA pH 8.0 Affimetrix USB ref. J75793</li> <li>- EDTA 0.5M pH 8.0 Euromedex ref. EU0084.B</li> <li>- SDS (&gt;99%) 10% Euromedex ref. EU0760.A</li> <li>- Trizma hydrochloride 1M pH 7.5 Sigma ref. T2319-100ML</li> <li>- NaCl 5M Sigma ref. T2319-100ML</li> <li>- Distilled Water DNase/RNase Free Gibco ref. 10977-035</li> <li>- Kit prepIT-L2P ref. PT-L2P-5</li> <li>- Chemagic DNA Cyto Pure Kit ref. CMG-196</li> </ul>
Matériau d'étalonnage (références) :	<p>-Fluorimètre : plaque test de mesure « MultiCheck-Plus Test Plate Measurement</p> <p>-MySpec : solution de calibration Cat. No. 732-2537</p> <p>-NanoDrop ® ND-2000 : Thermo Scientific CF-1 calibration fluid.</p>
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	<b>Vérification de la calibration du Nanodrop et du MySpec tous les 6 mois selon les recommandations du fournisseur.</b>

<sup>2</sup> Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge...

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

Nanodrop: Vérification en 10 mesures d'une solution commerciale étalon

## MISE EN ŒUVRE

<b>Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :</b>	Sylvie NUSBAUM Jean-Michel LAPIERRE Catherine OZILLOU Céline BERNARDIN
<b>Procédure de validation/mode opératoire :</b>	Vérification/validation des méthodes (NE-PBPS-ANA-PG-001-03)
<b>Procédure de gestion de la portée flexible :</b>	Gestion de la portée flexible (NE-PBPS-QUAL-PG-011-02)
<b>Période d'étude :</b>	<b>07/06/2017 au 21/03/2018</b> Et données antérieures
<b>Date de 1<sup>ère</sup> utilisation :</b>	2008 (TECAN)

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

<b>MAITRISE DES RISQUES</b>				
(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
5M	Points critiques	Echelle de criticité <sup>3</sup>	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
<b>Matière (échantillons)</b>	Identité	6 G=3 F=1 D=2	Contrôle à réception	Procédure d'identitovigilance du laboratoire
	Nature et volume de l'échantillon	4 G=2 F=2 D=1	Contrôle à l'enregistrement	Gestion des non conformités préanalytiques
	Prétraitement : centrifugation, ...	4 G=2 F=1 D=2	Identitovigilance des contenants secondaires	MO : Technique d'examen direct sur villosités chorales Extraction ADN phénol culot GB Extraction d'ADN phénol sang frais Extraction ADN par kit Chemagic Extraction ADN Kit PrepIT L2p Extraction d'ADN par phénol d'échantillons fœtaux Création worklist pour TECAN
	Conditions de conservation des échantillons (t°, ...)	1 G=1 F=1 D=1	Information des préleveurs	BIB Feuille de demande
<b>Milieu</b>	Conditions de conservation et d'utilisation des réactifs (t°, ...)	6 G=3 F=1 D=2	Métrie/suivi des enceintes	Instructions de conservation Enregistrements métrologiques Exigences / manuel d'utilisation du fournisseur
	Exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur	2 G=2 F=1 D=1	Entretien des locaux	Cartographie des locaux
<b>Matériel (équipements)</b>	Surveillance des dérives Maintenance	2 G=2 F=1 D=1	Périodicité des maintenances Maîtrise des équipements (suivi métrologique, raccordement, ...)	Enregistrements des maintenances Traçabilité métrologique, Kalilab
	Contamination	6 G=3 F=1 D=2	Respect des conditions opératoires du fournisseur	Cf. enregistrement de l'essai sur site
	Conservation et conditions d'utilisation	4 G=2 F=1 D=2	Métrie des enceintes (cartographie et suivi des températures)	Fiches fournisseur Traçabilité métrologique Cartographie des locaux

<sup>3</sup> Se référer au mode opératoire « analyse et maîtrise des risques » NE-PBPS-QUAL-MO-004-02  
Indice de criticité=Gravité (G) x Fréquence (F) x Détectabilité (D)

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

<b>MAITRISE DES RISQUES</b> (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
5M	Points critiques	Echelle de criticité <sup>3</sup>	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
Matériel (réactifs)	Gestion des stocks	4 G=2 F=1 D=2	Acceptation à réception des réactifs Gestion des stocks	Procédure de gestion des stocks (y compris acceptation à la livraison)
	Reconstitution des réactifs, étalons, contrôles	6 G=3 F=1 D=2	Respect du mode opératoire de reconstitution et gestion des stocks (y compris acceptation)	Traçabilité métrologique Instructions de reconstitution
Méthode	Limites de la méthode (détection, quantification, linéarité, interférences, ...)	6 G=2 F=3 D=1	Volume d'échantillon primaire insuffisant	Manuel de prélèvement Feuille de demande
	Causes d'incertitude de mesure	6 G=2 F=3 D=1	Spectrophotomètre fluorimètre	Calibration / Maintenance
Main d'œuvre (Personnel)	Compétence et maintien de compétence du personnel	3 G=3 F=1 D=1	Formation et évaluation des compétences du personnel, plan de formation Disponibilité du personnel pour assurer le respect de la procédure	Habilitation/maintien de compétences  MO : Dosage de l'ADN par le spectrophotomètre VWR myspec Dosage Microarray par Nanodrop 2000

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

## EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, ...) : échantillons patients

REPETABILITE Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source <sup>4</sup> )	Conclusion <sup>5</sup>
Type de matrice (plasma, sérum, CIQ, niveaux...)							

Argumentaire de la conclusion : NA , analyse qualitative

FIDELITE INTERMEDIAIRE Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source <sup>4</sup> )	Conclusion <sup>5</sup>
Type de matrice (plasma, sérum, CIQ, niveaux...)							

Argumentaire de la conclusion : NA , analyse qualitative

VARIABILITE INTER-OPERATEURS Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>										
Opérateur évalué	Nb d'extractions	Concentration en ng/µl			260/280			260/230		
		Moy	Min	Max	Moy	Min	Max	Moy	Min	Max
JML	25	335,6	22,5	1014,4	1,79	1,49	2,05	1,47	0,28	2,42
CO	19	114,1	87,2	208,2	1,88	1,70	1,97	2,02	1,13	3,14
SN	4	163,7	101,5	187,5	1,82	1,85	1,7	1,19	0,83	1,84
CB	15	526,9	88,69	1017	1,87	1,78	2,15	2,08	1,13	2,49

Argumentaire de la conclusion :

Les ADN ont tous été extraits avec succès

La qualité des ADN obtenus par chaque opérateur a permis de pratiquer un marquage satisfaisant et une CGH interprétable pour l'ensemble des échantillons

Les différences de quantité d'ADN obtenues sont attribuables à la nature différente des échantillons pris en charge (LANC et VC pour l'opérateur CO).

<sup>4</sup> Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA...). Préciser la référence utilisée.

<sup>5</sup> Conforme/non conforme



# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

L'échantillon ayant donné un résultat d'ADN à 22,5 a été extrait au cours d'une nouvelle technique, par le même opérateur (JML) mais en changeant de méthode (Chemagen pour la première technique puis Phénol chloroforme pour la deuxième technique) avec un résultat satisfaisant.

Cf. Fichier « CGH Données de validation de méthode » onglet « Extraction Variab Inter Opé »

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>								
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Valeurs Labo	Cible (groupe de pairs)	Biais (%) /groupe de pairs	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) / moyenne générale	Biais (%) Limite <sup>4</sup>	Conclusion <sup>5</sup>
Echantillon CIQ niveau 1								
Echantillon CIQ niveau 2								

Argumentaire de la conclusion : NA , analyse qualitative

EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ) Contrôles quantitatifs <input type="checkbox"/> ; Contrôles qualitatifs <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Valeur Labo	Cible (groupe de pairs)	Cible (toutes techniques)	Biais (%) / groupe de pairs	Biais (%) / toute technique	Biais (%) limite <sup>4</sup>	Conclusion <sup>5</sup>
				A renseigner pour les contrôles quantitatifs			

Argumentaire de la conclusion : NA , pas d'EEQ pour l'extraction qui n'est pas un examen

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Vrais positifs	Spécificité, sensibilité, VPN, VPP
Faux positifs	
Vrais négatifs	
Faux négatifs	

Argumentaire de la conclusion :

Objectif : obtenir un ADN de qualité satisfaisante

Evaluation :

- sensibilité : probabilité d'obtenir un ADN après extraction
- spécificité : probabilité d'obtenir un ADN de bonne qualité

Evaluation de la sensibilité :

Les 63 ADN ont tous été extraits avec succès :

-5 culots GB, 3 LA cultivés, 4 GB, 6 LA non cultivé, 1 placenta (congelé), 3 salives, 31 sangs, 3 muscles (congelés) , 7 villosités chorales non cultivées

Evaluation de la spécificité :

La qualité des ADN obtenus a permis de pratiquer un marquage satisfaisant et une CGH interprétable pour l'ensemble des échantillons

Cf. Fichier « CGH Données de validation de méthode » onglet « Extraction Se et Spe Analytique»

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) : Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) <input checked="" type="checkbox"/> ; calcul <input type="checkbox"/>		
	Incertitudes calculées	Exigence de performances
Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :		
Quantification de l'incertitude (niveau 1) :		
Quantification de l'incertitude (niveau 2) :		
Quantification de l'incertitude (niveau xxx) :		

Argumentaire de la conclusion (impact sur la zone décisionnelle ?) :

Pas de calcul (méthode qualitative), les risques ayant été écartés :

- par la maîtrise du risque par la métrologie des instruments de mesure
- par les tests effectués pour la validation de méthode de ce sous-processus
- par le succès du marquage et de l'hybridation des ADN issus de ces extractions et dosages

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

<b>LIMITE DE DETECTION (étude expérimentale indispensable en portée B)</b> (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Limite de détection :	Données fournisseur de l'automate de dosage (Nanodrop et Myspec) : 2ng/μl à 15μg/μl pour l'ADN double brin

Argumentaire de la conclusion :

- Données fournisseur de l'automate de dosage (Nanodrop et Myspec) : 2ng/μl à 15μg/μl pour l'ADN double brin
- le marquage de l'ADN (sous-processus 2) confirme la présence d'ADN et son dosage

<b>COMPARAISON DE METHODES :</b> Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :	Sambrook, Fritsch, Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Edition, Vol. 3, pages E3 - E4; Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989  <a href="http://www.chemagen.com">http://www.chemagen.com</a>
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBMD :	Etude sur site. Comparaison entre 3 méthodes : -Phénol -Kit Chemagic -Kit DNA genotek
Nombre de mesures :	-Phénol-Chloroforme : 31 extractions -Kit Chemagic : 29 extractions -Kit DNA genotek : 3 extractions (salive)
Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :	Entre les 3 méthodes : -Comparaison des rapports d'absorbances :  - 260/280 nm : contamination par les protéines Phénol : moyenne 1,87 (1,70-1,97) Kit Chemagic : moyenne 1,83 (1,57-2,05) Kit DNA Genotek : moyenne 1,68(1,48-1,85)  - 260/230 nm : contamination par les sels Phénol : moyenne 2,06 (1,02-3,14) Kit Chemagic : moyenne 1,53 (0,28-2,29) Kit DNA Genotek : moyenne 0,85(0,65-1,07)
Méthode d'exploitation des résultats :	Rapports d'absorbance Migration sur gel marquage positif de l'ADN CGH-array interprétables

Argumentaire de la conclusion :

L'ensemble des techniques d'extraction a permis d'obtenir une quantité suffisante d'ADN de qualité satisfaisante

Tous les ADN ont été marqués et hybridés avec succès

Cf. Fichier « CGH Données de validation de méthode » onglet « Extraction Comp de Méthode »

<b>ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B)</b> (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, ...) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>		
Limite de détection :	Etude bibliographique (sources et valeurs)	Etude expérimentale (valeurs)
Limite de quantification :	Etude bibliographique (sources et	Etude expérimentale (valeurs)

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

	valeurs)	
Limite supérieure de linéarité :	Etude bibliographique (sources et valeurs)	Etude expérimentale (valeurs)

## Argumentaire de la conclusion :

- Données fournisseur de l'automate de dosage : 2ng/µl à 15µg/µl pour l'ADN double brin
- le marquage de l'ADN confirme la présence d'ADN et son dosage

<b>INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B)</b> (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, ... - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
	Les interférences possibles sont liées : - à la nature de l'échantillon (richesse en ARN, en protéines ...) - à la conservation de l'échantillon primaire avant extraction

## Argumentaire de la conclusion :

La maîtrise des risques de l'étape pré-analytique limite les risques d'interférences liées aux conditions de prélèvement et de conservation de l'échantillon primaire.

Pour réduire les interférences une étape de purification d'ADN est pratiquée :

- Par purification alcoolique dans la méthode Phénol
- Par la captation de l'ADN sur billes dans la méthode sur colonnes

<b>CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B)</b> (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, βHCG, ...) :	Essai sur site
Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, ...) :	NA

## Argumentaire de la conclusion :

Cône à filtre changé entre chaque échantillon  
Ouverture d'un seul tube à la fois

Absence de contamination interéchantillon : absence d'ADN dans les échantillons d'eau intercalés dans les techniques d'extraction (Cf. Fichier « CGH Données de validation de méthode » onglet « Dosage extraction ADN»)

<b>ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS</b> (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Paramètres sensibles testés (t°, pH, position sur un support, ...) Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, ...	Données fournisseurs : kit stable 1 an après réception et conservé à température ambiante entre 15 et 25°C

## Argumentaire de la conclusion :

- Paramètres sensibles :
- pas d'effet de position (technique manuelle)
  - pièce technique climatisée

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

Stabilité des réactifs :  
 -sur données fournisseurs.  
 -Pas de réactifs embarqués

Données de l'expérience : échec d'extraction sur LA et BT

	Echec	terminé	Total général
<b>2013</b>	<b>3</b>	<b>130</b>	<b>133</b>
Liquide amniotique cultivé	1	13	14
Liquide amniotique non cultivé	2	89	91
Villosites chorales cultivées	0	0	0
Villosites chorales non cultivées	0	28	28
<b>2014</b>	<b>7</b>	<b>370</b>	<b>377</b>
Liquide amniotique cultivé	1	28	29
Liquide amniotique non cultivé	3	257	260
Villosites chorales cultivées	1	10	11
Villosites chorales non cultivées	2	75	77
<b>2015</b>	<b>6</b>	<b>466</b>	<b>472</b>
Liquide amniotique cultivé	2	47	49
Liquide amniotique non cultivé	0	294	294
Villosites chorales cultivées	4	14	18
Villosites chorales non cultivées	0	111	111
<b>2016</b>	<b>9</b>	<b>879</b>	<b>888</b>
Liquide amniotique cultivé	2	73	75
Liquide amniotique non cultivé	2	500	502
Villosites chorales cultivées	1	20	21
Villosites chorales non cultivées	4	286	290
<b>2017</b>	<b>5</b>	<b>795</b>	<b>800</b>
Liquide amniotique cultivé	0	70	70
Liquide amniotique non cultivé	3	444	447
Villosites chorales cultivées	0	18	18
Villosites chorales non cultivées	2	263	265
<b>2018</b>	<b>11</b>	<b>790</b>	<b>801</b>
Liquide amniotique cultivé	0	60	60
Liquide amniotique non cultivé	7	482	489
Villosites chorales cultivées	0	12	12
Villosites chorales non cultivées	4	236	240
<b>Total général</b>	<b>41</b>	<b>3430</b>	<b>3471</b>

Les données de l'expérience montrent un taux d'échec de 1,18% sur les six dernières années  
 Ceci permet de conclure à la stabilité des réactifs, dont le tampon de lyse utilisé

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B)  
Applicable  ; non applicable

Valeurs de référence

NA

Argumentaire de la conclusion :

Pas d'intervalle de référence : la quantité d'ADN obtenue dépend du volume et de la nature de l'échantillon

## DECLARATION d'APTITUDE

Conclusion : méthode conforme utilisée à partir du .../.../21 Janvier 2019

Autorisée par :  
Signature

*Serge ROMANA*

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

## SOUS-PROCESSUS 2 : marquage

Portée A  ; Portée B

## DESCRIPTION DE LA METHODE

<b>Analyte / Mesurande :</b>	ADN marqué
<b>Principe de la Méthode :</b>	Le multi-random priming, ou multi-amorçage au hasard, est une technique de marquage enzymatique de l'ADN permettant de synthétiser un ADN bicaténaire marqué à l'aide d'un fluorochrome  Modèle d'étude : Afin de montrer la variété des anomalies détectées en CGH array, nous avons choisi à partir du sous processus marquage, d'utiliser des ADN à anomalie connue. Les ADN marqués puis analysés à partir du sous-processus marquage sont différents des ADN utilisés pour le sous-processus extraction
<b>Type d'échantillon primaire :</b>	ADN
<b>Type de récipient, additifs :</b>	microtube
<b>Prétraitement de l'échantillon :</b>	Modalités de prétraitement de l'échantillon : Normalisation de l'ADN à 100ng/µl Note : pour les besoins de la validation de méthode les échantillons utilisés pour le sous processus marquage et le sous processus hybridation ne sont pas ceux du sous-processus extraction
<b>Unités :</b>	pmol/µl
<b>Critères d'interprétation<sup>6</sup> :</b>	-Vérification systématique de la coloration après marquage -Dosage des cyanines au spectrophotomètre (systématique pour les marquages manuels, par sondage pour les marquages automate)
<b>Marquage CE (Oui/Non) :</b>	NON
<b>Codage C.N.Q. (s'il existe) :</b>	NA
<b>Equipement (instrument, analyseur, etc.) :</b>	Thermocycleur Nanodrop TECAN ROBOT PIPETEUR EVO COMPLET_100375023
<b>Référence du réactif :</b>	SureTag DNA Labeling Kit™ Agilent Technologies ref. 5190-03400 Human Genomic DNA Male Promega ref. 5190-03400 G147A Human Genomic DNA Female Promega ref. 5190-03400 G152A
<b>Matériau d'étalonnage (références) :</b>	Raccordement métrologique
<b>Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :</b>	Un contrôle interne dans chaque série en alternance : - un ADN sans déséquilibre génomique dans une série sur deux en sex match - un ADN avec un CNV ou un sex mismatch dans une série sur deux

## MISE EN ŒUVRE

Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la

Sylvie NUSBAUM  
Jean-Michel LAPIERRE

<sup>6</sup> Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge...



# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

<b>vérification/validation de méthode :</b>	Marie-Laure MAURIN
<b>Procédure de validation/mode opératoire :</b>	Vérification-validation de méthodes (NE-PBPS-ANA-PG-001-02)
<b>Procédure de gestion de la portée flexible :</b>	Gestion de la portée flexible (NE-PBPS-QUAL-PG-011-01)
<b>Période d'étude :</b>	Du : 12/02/2018 au 23/02/2018
<b>Date de 1<sup>ère</sup> utilisation :</b>	2008 (TECAN)

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

<b>MAITRISE DES RISQUES</b> (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
<b>5M</b>	<b>Points critiques</b>	<b>Echelle de criticité<sup>7</sup></b>	<b>Éléments à maîtriser</b>	<b>Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...)</b>
<b>Matière (échantillons)</b>	Identitovigilance sur les tubes d'ADN	<b>6</b> G=3 F=1 D=2	Formation du personnel	- Les tubes d'ADN avant marquage sont identifiés et rangés selon le schéma inscrit sur le cahier du technicien/ingénieur et le fichier de travail Excel (document d'enregistrement) - Qualification du personnel (Kalilab)
	Conditions de conservation des échantillons (t°, ...)	<b>6</b> G=3 F=1 D=2	Métrieologie/suivi des enceintes	Enregistrements métrologiques : -réfrigérateurs/congérateurs
	Contamination	<b>6</b> G=3 F=1 D=2	Formation du personnel	enregistrement de l'essai sur site

<sup>7</sup> Se référer au mode opératoire « analyse et maîtrise des risques » NE-PBPS-QUAL-MO-004-02  
 Indice de criticité=Gravité (G) x Fréquence (F) x Détectabilité (D)

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

<b>MAITRISE DES RISQUES</b> (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
<b>5M</b>	<b>Points critiques</b>	<b>Echelle de criticité<sup>7</sup></b>	<b>Éléments à maîtriser</b>	<b>Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...)</b>
<b>Milieu</b>	Conditions de conservation et d'utilisation des réactifs (t°, ...)	<b>6</b> G=3 F=1 D=2	Métrologie/suivi des enceintes	Instructions de conservation Enregistrements métrologiques Exigences / manuel d'utilisation du fournisseur
	Exigences environnementales pour le matériel	<b>1</b> G=1 F=1 D=1		Cartographie des locaux
	Surveillance des dérives	<b>4</b> G=2 F=1 D=2	CIQ/EEQ Maintenance/métrologie des équipements	Enregistrements des maintenances dans Kalilab CQI et EEQ dans DIAMM et fichier de travail
	Informatique embarquée (paramétrage, étalonnage, connexions, archivage des données)	<b>4</b> G=2 F=1 D=2	Métrologie des enceintes (cartographie et suivi des températures) TECAN ROBOT PIPETEUR EVO COMPLET_100375023	Fiches fournisseur
	Acceptation à réception des réactifs, gestion des stocks	<b>4</b> G=2 F=1 D=2	Gestion des stocks	Procédure de gestion des stocks (y compris acceptation)
<b>Méthode</b>	Suivi des procédures et modes opératoires	<b>6</b> G=3 F=1 D=2	Conditions opératoires	Mode opératoire: Marquage par Random Priming pour Microarray Agilent 1x, 2x, 4x, 8x Dosage Microarray par Nanodrop 2000 Purification alcoolique Microarray Agilent 8x Purification sur colonne Microarray Agilent 1x, 2x, 4x Dosage Microarray par Nanodrop 2000
	Limites de la méthode (détection, quantification, linéarité, interférences, ...)	<b>8</b> G=2 F=2 D=2	Bibliographie et/ou essai sur site	essai sur site : CNV en mosaïque
<b>Main d'œuvre (Personnel)</b>	Causes d'incertitude de mesure	<b>6</b> G=3 F=2 D=1	spectrophotomètre	Calibration du spectrophotomètre  MO : Dosage Microarray par Nanodrop 2000 Dosage des carbocyanines 3 et 5 par le spectrophotomètre VWR myspec

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

<b>MAITRISE DES RISQUES</b> (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
<b>5M</b>	<b>Points critiques</b>	<b>Echelle de criticité<sup>7</sup></b>	<b>Éléments à maîtriser</b>	<b>Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...)</b>
	Compétence et maintien de compétence du personnel	<b>3</b> G=3 F=1 D=1	Procédure formation/habilitation du personnel, plan de formation	Enregistrements d'habilitation du personnel (Kalilab) réunions techniques

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

## EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, ...) : échantillons, contrôle

REPETABILITE Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source <sup>8</sup> )	Conclusion <sup>9</sup>
Type de matrice (plasma, sérum, CIQ, niveaux...)							

Argumentaire de la conclusion : pas de calcul, méthode qualitative

La coloration obtenue après marquage est systématiquement vérifiée

Le dosage des cyanines au spectrophotomètre permet de confirmer la bonne coloration observée

FIDELITE INTERMEDIAIRE Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source <sup>4</sup> )	Conclusion <sup>5</sup>
Type de matrice (plasma, sérum, CIQ, niveaux...)							

Argumentaire de la conclusion : NA, méthode qualitative

VARIABILITE INTER-OPERATEURS Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>							
Opérateur évalué	Nb de marquages	Dye1 Conc. Cy3 pmol/µl			Dye2 Conc. Cy5 pmol/µl		
		Moy	Min	Max	Moy	Min	Max
JML	24	13,49	8,1	16,1	10,67	7,5	14
SN	20	10,39	5,3	19,3	7,89	5,2	13,7
TECAN JML	38	13,95	5,5	17,6	10,19	4,2	13,5

Argumentaire de la conclusion :

-l'ensemble des ADN a été marqué avec succès par les différents opérateurs (JML, SN, TECAN JML)

-l'ensemble des ADN marqué a donné lieu à une CGH interprétable

Cf. Fichier « CGH Données de validation de méthode » onglet « Dosage Carbocyanines »

<sup>8</sup> Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA...). Préciser la référence utilisée.

<sup>9</sup> Conforme/non conforme

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>								
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Valeurs Labo	Cible (groupe de pairs)	Biais (%) /groupe de pairs	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) / moyenne générale	Biais (%) Limite <sup>4</sup>	Conclusion <sup>5</sup>
Echantillon CIQ niveau 1								
Echantillon CIQ niveau 2								

Argumentaire de la conclusion : NA, méthode qualitative

EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ) Contrôles quantitatifs <input type="checkbox"/> ; Contrôles qualitatifs <input checked="" type="checkbox"/>							
Echantillons	Valeur Labo	Cible (groupe de pairs)	Cible (toutes techniques)	Biais (%) / groupe de pairs	Biais (%) / toute technique	Biais (%) limite <sup>4</sup>	Conclusion <sup>5</sup>
				A renseigner pour les contrôles quantitatifs			

Argumentaire de la conclusion :

Le service HEC participe à l'EEQ ACPA national organisé par l'ACLF depuis 2014

Seuls les EEQ de post-natal reposent sur l'analyse d'un échantillon

Notes EEQ ACPA ACLF post-natal :

2015 : 18/20

2016 : 14/20

2017 : 20/20

2018 : 20/20

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Vrais positifs	Spécificité, sensibilité, VPN, VPP
Faux positifs	
Vrais négatifs	
Faux négatifs	

Argumentaire de la conclusion :

-l'ensemble des ADN a été marqué avec succès (82 marquages)

- la colorations après marquage était conforme à l'attendu

-les marquages effectués en Cy3 ont montré des dosages de 5,3 à 19,3 pmol/μl pour une moyenne à 12,94 pmol/μl

-les marquages effectués en Cy5 ont montré des dosages de 4,2 à 14 pmol/μl pour une moyenne à 9,77 pmol/μl

-l'ensemble des ADN marqué a donné lieu à une CGH-array interprétable

Cf. Fichier « CGH Données de validation de méthode » onglet « Dosage Carbocyanines»

INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) : Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) <input checked="" type="checkbox"/> ; calcul <input type="checkbox"/>		
	Incertitudes calculées	Exigence de performances

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	Formule utilisée :  Pas de formule de calcul : méthode qualitative	
Quantification de l'incertitude (niveau 1) :		
Quantification de l'incertitude (niveau 2) :		
Quantification de l'incertitude (niveau xxx) :		

Argumentaire de la conclusion (impact sur la zone décisionnelle ?) :

NA méthode qualitative

La conformité des DLRS après hybridation objective l'absence d'interférence résiduelle



# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

<b>LIMITE DE DETECTION (étude expérimentale indispensable en portée B)</b> (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Limite de détection :	LD du spectrophotomètre pour le dosage des cyanines

Argumentaire de la conclusion : limites de détection des automates de dosage

\* Nanodrop :

\* Cy3 0,2 à 100 pmol/µl

\* Cy5 0,12 à 60 pmol/µl

\* MySpec :

\* Cy3 100 pmol/µl

<b>COMPARAISON DE METHODES :</b> Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :	Données fournisseurs <a href="http://www.Agilent.fr">www.Agilent.fr</a> Fichier « G4410-90010_CGH_Enzymatic_Protocol_6.3.pdf »  Ref marquage TECAN (JM) : G4410-90010_CGH_Enzymatic_Protocol_6.3.pdf
Méthodes comparées : méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareils en miroir ou back-up, EBMD, ...	Marquage manuel vs automate TECAN
Nombre de mesures :	44 marquages manuels vs 38 marquages TECAN  Cf. Fichier « CGH Données de validation de méthode » onglet « Marquage Comp Interop »
Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :	Etendue de mesure du spectrophotomètre pour l'ADN : 190 -840 nm
Méthode d'exploitation des résultats :	NA méthode qualitative
Equation de la droite de régression :	NA méthode qualitative
Exploitation des résultats de comparaison (diagramme de différences, concordance catégorielle) :	Cf. tableau de comparaison des méthodes de marquage : 19 ADN patients marqués selon les deux méthodes  Cf. Fichier « CGH Données de validation de méthode » onglet « Marquage Comp Méthode »

Argumentaire de la conclusion :

Marquage manuel vs automate TECAN

L'ensemble des ADN a été marqué selon les deux méthodes puis hybridé

Les résultats de CGH-array sont comparables :

-CNV détecté

-Absence de discordance entre les analyses du même ADN avec deux méthodes de marquage différent

<b>ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B)</b> (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, ...) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Limite de détection :	limites de détection des automates de dosage * Nanodrop :
Limite de quantification :	

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

Limite supérieure de linéarité :	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Cy3 0,2 à 100 pmol/μl</li> <li>* Cy5 0,12 à 60 pmol/μl</li> <li>* MySpec :</li> <li>* Cy3 100 pmol/μl</li> </ul>
----------------------------------	---

Argumentaire de la conclusion :

Etendue de mesure des 82 marquages :

- Cy3 : de 5,3 à 19,3 pmol/μl pour une moyenne à 12,94 pmol/μl
- Cy5 : de 4,2 à 14 pmol/μl pour une moyenne à 9,77 pmol/μl

-l'ensemble des ADN marqué a donné lieu à une CGH-array interprétable

Cf. Fichier « CGH Données de validation de méthode » onglet « Marquage Comp Interop»

<p><b>INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B)</b>  <b>(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, ... - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire)</b>  <b>Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/></b></p>
<p>Les interférences éventuelles sont limitées :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-par la purification systématique de l'ADN extrait : <ul style="list-style-type: none"> <li>-soit dans la méthode phénol-chloroforme</li> <li>-soit sur colonne</li> </ul> </li> <li>-par une étape de purification de l'ADN marqué <ul style="list-style-type: none"> <li>-sur colonne</li> <li>-par purification alcoolique sous caisson anti ozone (cyanine 5)</li> </ul> </li> </ul>

Argumentaire de la conclusion :

Pas d'interférences constatées avec les méthodes utilisées

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

<b>CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B)</b> (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, $\beta$ HCG, ...):	Cf argumentaire
Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, ...):	NA

Argumentaire de la conclusion :

Absence de détection d'un CNV autre que le CNV attendu

Absence de contamination échantillons masculin/féminin marqués côte à côte

<b>ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS</b> (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Paramètres sensibles testés ( $t^\circ$ , pH, position sur un support, ...)	Préciser les données fournisseur ou essai sur site
Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, ...	Préciser les données fournisseur ou essai sur site 15 jours d'utilisation en pratique et 15 jours pour les tests

Argumentaire de la conclusion :

Température de la pièce : TECAN, pièce climatisée

Stabilité constatée des réactifs utilisés pour la validation de méthode (durée d'ouverture du kit) : 15 jours

Gros volume d'activité : kit/produit ouvert est rapidement utilisé : 15 jours d'utilisation en pratique

Réactifs embarqués : NA réactifs placés extemporanément

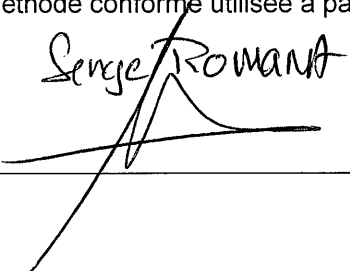
<b>INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B)</b> Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Valeurs de référence	essai sur site

Argumentaire de la conclusion :

-les marquages effectués en Cy3 ont montré des dosages de 2,9 à 19,3 pmol/ $\mu$ l pour une moyenne à 12,8 pmol/ $\mu$ l

-les marquages effectués en Cy5 ont montré des dosages de 4,2 à 14 pmol/ $\mu$ l pour une moyenne à 9,9 pmol/ $\mu$ l

Cf. Fichier « CGH Données de validation de méthode » onglet « Marquage Comp Interop »

<b>DECLARATION d'APTITUDE</b>	
Conclusion : méthode conforme utilisée à partir du .../.../... 21 Janvier 2019	
Autorisée par : Signature	

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

## SOUS-PROCESSUS 3 : hybridation

Portée A  ; Portée B

### DESCRIPTION DE LA METHODE

<b>Analyte / Mesurande :</b>	Signaux d'hybridation
<b>Principe de la Méthode :</b>	-Hybridation concomitante sur microarray agilent de l'ADN testé marqué et d'ADN témoin marqué -Détection d'intensité de fluorescence sur scanner Agilent
<b>Type d'échantillon primaire :</b>	ADN marqué
<b>Type de récipient, additifs :</b>	tube
<b>Prétraitement de l'échantillon :</b>	Dénaturation et préhybridation (Cf MO Hybridation) Note : pour les besoins de la validation de méthode les échantillons utilisés pour le sous processus marquage et le sous processus hybridation ne sont pas ceux du sous-processus extraction
<b>Unités :</b>	Sans objet : image tiff
<b>Critères d'interprétation<sup>10</sup> :</b>	Image Tiff du scanner
<b>Marquage CE (Oui/Non) :</b>	Non
<b>Codage C.N.Q. (s'il existe) :</b>	NA
<b>Equipement (instrument, analyseur, etc.) :</b>	Four d'hybridation : SHELL G2545A Scanner/ DNA Microarray Scanner (old) Sure Scan Dx Microarray Scanner (new) Chambre d'hybridation : Hybridation Chamber G2534A-60000 Lames : AGILENT_LAME 8x60K_POSTANATAL AMADID 035431
<b>Référence du réactif :</b>	Gasket: ref. G2534-60015 Oligo aCGH/ChIP Hybridization Kit : ref. 5188-5220
<b>Matériau d'étalonnage (références) :</b>	Maintenance annuelle : - Four d'hybridation - scanner
<b>Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :</b>	Cf Fiche technique d'étalonnage

### MISE EN ŒUVRE

<b>Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :</b>	Sylvie NUSBAUM Jean-Michel LAPIERRE Marie-Laure MAURIN
<b>Procédure de validation/mode opératoire :</b>	Vérification/validation des méthodes (NE-PBPS-ANA-PG-001-03)
<b>Procédure de gestion de la portée flexible :</b>	Gestion de la portée flexible (NE-PBPS-QUAL-PG-011-02)
<b>Période d'étude :</b>	<b>Du : 12/02/2018 au 23/02/2018</b>
<b>Date de 1<sup>ère</sup> utilisation :</b>	Four Agilent: le 26-10-2016 Scanner Agilent Dx: le 17/10/2011

<sup>10</sup> Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge...

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

<b>MAITRISE DES RISQUES</b>				
(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
5M	Points critiques	Echelle de criticité <sup>11</sup>	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
<b>Matière (échantillons)</b>	Identitovigilances sur tubes de marquage et le dépôt sur lame	<b>6</b> G=3 F=1 D=2	Formation et information du personnel	Procédure d'identitovigilance du laboratoire Schéma de chaque lame (Cf. MO)
	Délai et température avant traitement analytique	<b>4</b> G=2 F=1 D=2	Métrieologie des enceintes	Marquage repris dans l'eau : congelé (1 semaine) Marquage ds TH à 4°C 72 h
<b>Milieu</b>	Conditions de conservation des échantillons (t°, ...) et des réactifs (t°, ...)	<b>3</b> G=3 F=1 D=1	Métrieologie/suivi des enceintes	Instructions de conservation Enregistrements métrieologiques
	Exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur	<b>2</b> G=2 F=1 D=1	Conditions environnementales	Cartographie des locaux
<b>Matériel (équipements)</b>	Surveillance des dérives	<b>2</b> G=2 F=1 D=1	Maintenances annuelles Maîtrise des équipements	CIQ dans chaque série
	Contamination	<b>6</b> G=3 F=1 D=2	Respect des conditions opératoires du fournisseur	Schéma de lame Chambre d'hybridation/gasket
	Informatique embarquée	<b>6</b> G=3 F=1 D=2	connexions, archivage des données, ...	Scanner Sauvegarde des données sur serveur informatique

<sup>11</sup> Se référer au mode opératoire « analyse et maîtrise des risques » NE-PBPS-QUAL-MO-004-02  
 Indice de criticité=Gravité (G) x Fréquence (F) x Détectabilité (D)

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

<b>MAITRISE DES RISQUES</b>				
(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
<b>5M</b>	<b>Points critiques</b>	<b>Echelle de criticité<sup>11</sup></b>	<b>Éléments à maîtriser</b>	<b>Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire</b>
<b>Matériel (réactifs)</b>	Conservation et conditions d'utilisation	<b>2</b> G=2 F=1 D=1	Métrie des enceintes (cartographie et suivi des températures)	Traçabilité métrologique
	Gestion des stocks	<b>6</b> G=3 F=1 D=2	Acceptation à réception des réactifs Gestion des stocks	Procédure de gestion des stocks (y compris acceptation à chaque livraison) Logiciel de commande
	Reconstitution des réactifs, étalons, contrôles	<b>6</b> G=3 F=1 D=2	Respect du mode opératoire de reconstitution et gestion des stocks (y compris acceptation)	Traçabilité métrologique Instructions de reconstitution
<b>Méthode</b>	Limites de la méthode (détection, quantification, linéarité, interférences, ...)	<b>4</b> G=2 F=1 D=2	Limite de détection, limite de quantification, linéarité, interférences, ... Sensibilité, spécificité	Formation du personnel
<b>Main d'œuvre (Personnel)</b>	Compétence et maintien de compétence du personnel	<b>6</b> G=3 F=1 D=2	Formation et évaluation des compétences du personnel, plan de formation	Formation du personnel MO : Hybridation sur Microarrays Agilent Lavage post-hybridation Guide utilisateur du scanner Dx Agilent

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

## EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, ...) : échantillon contrôle

REPETABILITE Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source <sup>12</sup> )	Conclusion <sup>13</sup>
Type de matrice (plasma, sérum, CIQ, niveaux...)							

Argumentaire de la conclusion : NA. Méthode qualitative

FIDELITE INTERMEDIAIRE Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source <sup>4</sup> )	Conclusion <sup>5</sup>
Type de matrice (plasma, sérum, CIQ, niveaux...)							

Argumentaire de la conclusion : NA. Méthode qualitative

VARIABILITE INTER-OPERATEURS Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Opérateur évalué 1 : JML	Lames 1, 2,5 et 6
Opérateur évalué 2 : SN	Lames 3 et 4
...	

Argumentaire de la conclusion :

Pas de différence constatée entre les deux opérateurs :

-les lames hybridées par les deux opérateurs ont donné lieu à une image tiff de scanner satisfaisante

<sup>12</sup> Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA...). Préciser la référence utilisée.

<sup>13</sup> Conforme/non conforme

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>								
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Valeurs Labo	Cible (groupe de pairs)	Biais (%) /groupe de pairs	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) / moyenne générale	Biais (%) Limite <sup>4</sup>	Conclusion <sup>5</sup>
Echantillon CIQ niveau 1								
Echantillon CIQ niveau 2								

Argumentaire de la conclusion : NA. Méthode qualitative

EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ) Contrôles quantitatifs <input type="checkbox"/> ; Contrôles qualitatifs <input checked="" type="checkbox"/>							
Echantillons	Valeur Labo	Cible (groupe de pairs)	Cible (toutes techniques)	Biais (%) / groupe de pairs	Biais (%) / toute technique	Biais (%) limite <sup>4</sup>	Conclusion <sup>5</sup>
				A renseigner pour les contrôles quantitatifs			

Argumentaire de la conclusion :

Le service HEC participe à l'EEQ ACPA national organisé par l'ACLF depuis 2014

Seuls les EEQ de post-natal reposent sur l'analyse d'un échantillon

Notes EEQ ACPA ACLF post-natal :

2015 : 18/20

2016 : 14/20

2017 : 20/20

2018 : 20/20

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Vrais positifs	Spécificité, sensibilité, VP, VPP
Faux positifs	
Vrais négatifs	
Faux négatifs	

Argumentaire de la conclusion :

-l'ensemble des lames hybridées a donné lieu à une image tiff de scanner satisfaisante

Par ailleurs, aucun CNV n'est rendu sans une technique complémentaire de confirmation (FISH) conformément aux recommandations (Guide de Bonnes Pratiques ACPA ACLF en vigueur)

Cf. classeur de résultats

INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) : Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) <input checked="" type="checkbox"/> ; calcul <input type="checkbox"/>		
	Incertitudes calculées	Exigence de performances
Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :		
Quantification de l'incertitude (niveau 1) :		
Quantification de l'incertitude (niveau 2) :		
Quantification de l'incertitude		



# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

(niveau xxx) :		
----------------	--	--

Maitrise de l'impact de l'ozone durant l'étape d'hybridation :

Lavage des lames sous caisson anti ozone

Scanner protégé contre l'ozone

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

<b>LIMITE DE DETECTION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/></b>	
Limite de détection :	LD trouvée ou référence bibliographique

Résolution du scanner : le pixel est réglé à 3 microns

<b>COMPARAISON DE METHODES : Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/></b>	
Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :	Références méthodes
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBMD :	FISH
Nombre de mesures :	30

Argumentaire de la conclusion :

Manip A

L'ensemble des CNV détecté suite à l'hybridation sur lame de CGH-array a été confirmé par une technique de FISH

<b>ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, ...) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/></b>		
Limite de détection :	Etude bibliographique (sources et valeurs)	Etude expérimentale (valeurs)
Limite de quantification :	Etude bibliographique (sources et valeurs)	Etude expérimentale (valeurs)
Limite supérieure de linéarité :	Etude bibliographique (sources et valeurs)	Etude expérimentale (valeurs)

Argumentaire de la conclusion :

Manip A

Les hybridations des CNV en mosaïque ont donné lieu à une image tiff satisfaisante

Les CNV en mosaïque à 50% et 20% ont été détectés en mode d'analyse usuel (monosomie X et trisomie 13)

Le CNV en mosaïque à 15 % n'a pas été détecté par le logiciel en mode d'analyse usuel malgré un profil décalé (analyse visuelle) et a été détecté en mode mosaïque (Tri 13)

Les CNV en mosaïque à 5 et 10% n'ont pas été signalés par le logiciel ni en mode d'analyse usuel ni en mode mosaïque (Tri 13 et monosomie X)

Ces résultats sont concordants avec les informations délivrées aux patients préalablement à la prescription d'une analyse en CGH array relatives aux limites de cette technique dans la détection des mosaïques faibles

<b>INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, ... - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/></b>	
Hémolyse	Préciser les données fournisseur ou essai de surcharge (module LIH)
Turbidité	Préciser les données fournisseur ou essai de surcharge (module LIH)
Bilirubine, ictère	Préciser les données fournisseur ou essai de surcharge (module LIH)
Médicaments	Préciser les données fournisseur ou essai de surcharge
...	Préciser les données fournisseur ou essai de surcharge

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

Argumentaire de la conclusion :

**Les interférences éventuelles sont limitées par la validation préalable des étapes d'extraction puis de marquage**

**Prévention de l'interférence de l'ozone durant l'étape d'hybridation : lavage des lames sous le caisson anti ozone et scanner protégé**

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

<b>CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B)</b> (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Inter échantillon	essai sur site
Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, ...) :	NA

Argumentaire de la conclusion :

Manip A

Absence de contamination d'un échantillon par les échantillons voisins confirmée après analyse bio-informatique : Cf. schéma de dépôt sur les lames

<b>ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS</b> (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Paramètres sensibles testés : position sur un support	essai sur site
Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, ...	Préciser les données fournisseur ou essai sur site

Argumentaire de la conclusion :

Absence d'effet de la variation de position de l'échantillon marqué sur la lame Cf schéma lame 1

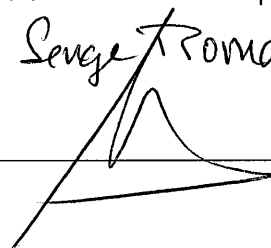
Stabilité des réactifs : taux d'échec en CGH array

Année	Echec CGH	Terminé	Total	% échec
2013	86	1798	1884	4,56
2014	109	1863	1972	5,53
2015	133	2060	2193	6,06
2016	162	2453	2615	6,20
2017	119	2431	2550	4,67
2018	136	2137	2273	5,98

<b>INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B)</b> Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Valeurs de référence	Préciser les données fournisseur ou essai sur site

Argumentaire de la conclusion :

NA . Pas de valeur seuil

<b>DECLARATION d'APTITUDE</b>	
Conclusion : méthode conforme utilisée à partir du .../.../... 21 janvier 2019	
Autorisée par : Signature	

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

## SOUS-PROCESSUS 4 : analyse bio informatique

Portée A  ; Portée B  (à justifier)

### DESCRIPTION DE LA METHODE

<b>Analyte / Mesurande :</b>	Recherche de Copy Number Variant (CNV)
<b>Principe de la Méthode :</b>	<p>Méthode qualitative de recherche de CNV dans l'ADN testé:</p> <p>-Intégration des données de scanner dans logiciel d'analyse Agilent Cytogenomics V4</p> <p>Logiciel Cytogenomics V4 :</p> <p>L'image tiff issue du scanner est un fichier d'entrée. Pour le logiciel cytogenomics. Chaque spot est individualisé et la fluorescence rouge et verte est calculée sur l'intégralité des pixels utilisables contenus dans chaque spot. Une suite de normalisation est appliquée pour compenser les biais expérimentaux ainsi que les variations interarray. Le signal normalisé rouge (ADN test) est divisé par le signal normalisé vert (ADN référence) pour obtenir un ratio de signal. Enfin ce ratio est transformé en log2 afin de centrer les valeurs sur 0 et non 1. Chaque spot est associé aux coordonnées génomiques de la sonde imprimée sur son emplacement sur l'array (Grace au fichier de design importé dans cytogenomics). Donc le log2 ratio d'un spot peut être visualisé sur un chromosome, à l'emplacement génomique qui lui est propre.</p> <p>Modèle d'étude :</p> <p>Manip A Evaluation de la comparaison inter opérateur sensibilité, spécificité, étendue de mesure, contamination et robustesse par analyse bio informatique d'analytes à anomalie connue (CNV, aneuploïdie en mosaïque)</p> <p>Manip B Evaluation de la comparaison de méthode et de la comparaison interopérateur par l'analyse bio-informatique de 30 fichiers tiff récents sur l'ensemble des analyseurs</p>
<b>Type d'échantillon primaire :</b>	Image tiff de scanner
<b>Type de récipient, additifs :</b>	Fichier informatique
<b>Prétraitement de l'échantillon :</b>	NA
<b>Unités :</b>	Log ratio
<b>Critères d'interprétation<sup>14</sup> :</b>	DLRS
<b>Marquage CE (Oui/Non) :</b>	Non
<b>Codage C.N.Q. (s'il existe) :</b>	NA
<b>Equipement (instrument, analyseur, etc.) :</b>	Logiciel d'analyse : Cytogenomics V4
<b>Référence du réactif :</b>	NA
<b>Matériau d'étalonnage (références) :</b>	NA
<b>Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :</b>	NA

### MISE EN ŒUVRE

<sup>14</sup> Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge...

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :	Jean-Michel Lapierre, Sylvie Nusbaum, Catherine Ozilou, Céline Bernardin, Aurore Bardary Camille Leroy, Marie-Paule Beaujard, Marie-Laure Maurin
Procédure de validation/mode opératoire :	Vérification/validation des méthodes (NE-PBPS-ANA-PG-001-03)
Procédure de gestion de la portée flexible :	Gestion de la portée flexible (NE-PBPS-QUAL-PG-011-02)
Période d'étude :	Du : 12/02/2018 au 23/02/2018 Et du 12/12/2018 au 18/01/2019 Et données antérieures
Date de 1 <sup>ère</sup> utilisation :	Logiciel Cytogenomics v4 Agilent: le 01-02-2017

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

<b>MAITRISE DES RISQUES</b> (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
5M	Points critiques	Echelle de criticité <sup>15</sup>	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
Matériau (échantillon)	Identité	6 G=3 F=1 D=2	Formation et information du personnel	Procédure d'identitovigilance du laboratoire
Milieu	Conditions de conservation des échantillons (t°, ...)	6 G=3 F=1 D=2	Sauvegarde des données brutes sur serveur	Fichier tiff
Matériel (équipements)	Surveillance des dérives	3 G=3 F=1 D=1	CIQ dans chaque série	CIQ/EEQ
	Informatique embarquée	3 G=3 F=1 D=1	Cytogenomics V4	Sauvegarde des données brutes et des données d'analyse sur serveur
Méthode	Limites de la méthode (détection, quantification, linéarité, interférences, ...)	6 G=2 F=1 D=2	DLRS, log ratio	Formation du personnel User Guide Cytogenomics V4
Main d'œuvre (Personnel)	Compétence et maintien de compétence du personnel	3 G=3 F=1 D=1	Formation et évaluation des compétences du personnel, plan de formation	Traçabilité de l'occupation des postes de travail

<sup>15</sup> A préciser par le laboratoire, par exemple 1 non critique – 5 très critique ;

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

## EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, ...) : fichiers tiff

REPETABILITE Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source <sup>16</sup> )	Conclusion <sup>17</sup>
Type de matrice (plasma, sérum, CIQ, niveaux...)							

Argumentaire de la conclusion : NA, méthode qualitative

FIDELITE INTERMEDIAIRE Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source <sup>4</sup> )	Conclusion <sup>5</sup>
Type de matrice (plasma, sérum, CIQ, niveaux...)							

Argumentaire de la conclusion : NA,

VARIABILITE INTER-OPERATEURS Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Manip A Opérateur évalué 1 : JML	Lames 1, 2,5 et 6
Manip A Opérateur évalué 2 : SN	Lames 3 et 4

Argumentaire de la conclusion :

Manip A

Pas de différence constatée entre les deux opérateurs :

- les images tiff de scanner ont donné lieu à une CGH interprétable

Manip B :

Les 30 fichiers ont été analysés par CO, SN, CB, SM, AB

Les 30 fichiers ont été réanalysés par JML

Pas de différence constatée entre les opérateurs

<sup>16</sup> Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA...). Préciser la référence utilisée.

<sup>17</sup> Conforme/non conforme



# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>								
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Valeurs Labo	Cible (groupe de paires)	Biais (%) /groupe de paires	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) / moyenne générale	Biais (%) Limite <sup>4</sup>	Conclusion <sup>5</sup>
Echantillon CIQ niveau 1								
Echantillon CIQ niveau 2								

Argumentaire de la conclusion :

Un CIQ Proméga est passé dans chaque série en sex match ou sex mismatch

La justesse du CIQ (sex match ou mis match) est un prérequis à la validation technique et biologique de la série

EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ) Contrôles quantitatifs <input type="checkbox"/> ; Contrôles qualitatifs <input checked="" type="checkbox"/>							
Echantillons	Valeur Labo	Cible (groupe de paires)	Cible (toutes techniques)	Biais (%) / groupe de paires	Biais (%) / toute technique	Biais (%) limite <sup>4</sup>	Conclusion <sup>5</sup>
				A renseigner pour les contrôles quantitatifs			

Argumentaire de la conclusion :

Le service HEC participe à l'EEQ ACPA national organisé par l'ACLF depuis 2014

Les EEQ de post-natal reposent sur l'analyse d'un échantillon

Les EEQ de prénatal reposent sur l'analyse d'un fichier informatique

Notes EEQ ACPA ACLF:

2015 : Post Natal 18/20

2016 : Post Natal 14/20, Prénatal 16/20

2017 : Post Natal 20/20, Prénatal 20/20

2018 : Post Natal 20/20, Prénatal 20/20

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Vrais positifs	
Faux positifs	
Vrais négatifs	
Faux négatifs	

Argumentaire de la conclusion :

Manip A

Argumentaire de la conclusion :

L'ensemble des CNV homogènes a été diagnostiqué

Les CNV en mosaïque à 50% et 20% ont été détectés en mode d'analyse usuel (monosomie X et trisomie 13)

Le CNV en mosaïque à 15 % n'a pas été détecté par le logiciel en mode d'analyse usuel malgré un profil décalé (analyse visuelle) et a été détecté en mode mosaïque (Tri 13)

Les CNV en mosaïque à 5 et 10% n'ont pas été signalés par le logiciel ni en mode d'analyse usuel ni en mode mosaïque (Tri 13 et monosomie X)

Ces résultats sont concordants avec les informations délivrées aux patients préalablement à la prescription d'une analyse en CGH array relatives aux limites de cette technique dans la détection des mosaïques faibles

Par ailleurs, aucun CNV n'est rendu sans une technique complémentaire de confirmation (FISH) conformément aux recommandations (Guide de Bonnes Pratiques ACPA ACLF en vigueur)

Cf. classeur de résultats

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) : Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) <input type="checkbox"/> ; calcul <input type="checkbox"/>		
	Incertitudes calculées	Exigence de performances
Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :		
Quantification de l'incertitude (niveau 1) :		
Quantification de l'incertitude (niveau 2) :		
Quantification de l'incertitude (niveau xxx) :		

Argumentaire de la conclusion (impact sur la zone décisionnelle ?) :

### **Manip A**

Argumentaire de la conclusion (impact sur la zone décisionnelle) :

Les CNV en mosaïque à 50% et 20% ont été détectés en mode d'analyse usuel (monosomie X et trisomie 13)

Le CNV en mosaïque à 15 % n'a pas été détecté par le logiciel en mode d'analyse usuel malgré un profil décalé (analyse visuelle) et a été détecté en mode mosaïque (Tri 13)

Les CNV en mosaïque à 5 et 10% n'ont pas été signalés par le logiciel ni en mode d'analyse usuel ni en mode mosaïque (Tri 13 et monosomie X)

Ces résultats sont concordants avec les informations délivrées aux patients préalablement à la prescription d'une analyse en CGH array relatives aux limites de cette technique dans la détection des mosaïques faibles

Par ailleurs, aucun CNV n'est rendu sans une technique indépendante de confirmation (FISH)

Cf. classeur de résultats

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

## LIMITE DE DETECTION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable ; non applicable

**Limite de détection :** LD trouvée ou référence bibliographique

Argumentaire de la conclusion :

Les CNV en mosaïque à 50% et 20% ont été détectés en mode d'analyse usuel (monosomie X et trisomie 13)

Le CNV en mosaïque à 15 % n'a pas été détecté par le logiciel en mode d'analyse usuel malgré un profil décalé (analyse visuelle) et a été détecté en mode mosaïque (Tri 13)

Les CNV en mosaïque à 5 et 10% n'ont pas été signalés par le logiciel ni en mode d'analyse usuel ni en mode mosaïque (Tri 13 et monosomie X)

Ces résultats sont concordants avec les informations délivrées aux patients préalablement à la prescription d'une analyse en CGH array relatives aux limites de cette technique dans la détection des mosaïques faibles

Cf. classeur de résultats

## COMPARAISON DE METHODES : Applicable ; non applicable (à justifier)

Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :	Références méthodes
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBMD :	Appareils: -MMNCK0287 -MMNCK0284 -DATASYSTEM (back up)
Nombre de mesures :	30
Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :	NA : concordance des données entre les trois analyses bio informatiques
Méthode d'exploitation des résultats :	Rapport Cytogenomics
Equation de la droite de régression :	NA
Diagramme des différences et/ou des rapports :	Pas de différence

Argumentaire de la conclusion :

Manip B

Les 30 fichiers tiff ont été analysés sur les trois analyseurs

Pour chaque fichier tiff, les trois rapports d'analyse montrent les mêmes résultats (Cf. classeur de résultat)

## ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, ...) Applicable ; non applicable (à justifier)

Limite de détection :		
Limite de quantification :		
Limite supérieure de linéarité :		

Argumentaire de la conclusion :

Manip A

Les CNV en mosaïque à 50% et 20% ont été détectés en mode d'analyse usuel (monosomie X et trisomie 13)

Le CNV en mosaïque à 15 % n'a pas été détecté par le logiciel en mode d'analyse usuel malgré un profil décalé (analyse visuelle) et a été détecté en mode mosaïque (Tri 13)

Les CNV en mosaïque à 5 et 10% n'ont pas été signalés par le logiciel ni en mode d'analyse usuel ni en mode mosaïque (Tri 13 et monosomie X)

Ces résultats sont concordants avec les informations délivrées aux patients préalablement à la prescription d'une analyse en CGH array relatives aux limites de cette technique dans la détection des mosaïques faibles

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

<b>INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B)</b> (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, ... - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>	
Hémolyse	
Turbidité	
Bilirubine, ictère	
Médicaments	
...	

Argumentaire de la conclusion :  
analyse bio informatique

Les interférences éventuelles sont limitées par la validation des sous processus précédents à chaque étape :

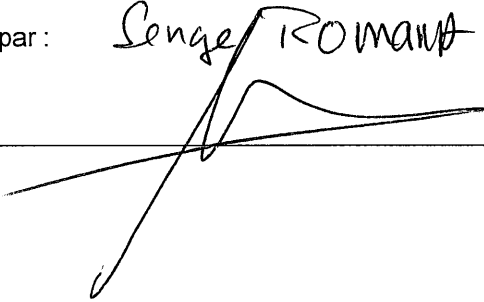
Vérification qualitative ADN  
Vérification qualitative marquage  
Vérification qualitative image tiff

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale

<b>CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B)</b> (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>	
Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, $\beta$ HCG, ...):	
Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, ...):	
Argumentaire de la conclusion : Manip A Absence de contamination d'un échantillon par les échantillons voisins confirmée après analyse bio-informatique : Cf. schéma de dépôt sur les lames	

<b>ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS</b> (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>	
Paramètres sensibles testés (t°, pH, position sur un support, ...)	
Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, ...	
Argumentaire de la conclusion : NA : analyse bio informatique : pas de réactifs	

<b>INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B)</b> Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable <input checked="" type="checkbox"/>	
Valeurs de référence	
Argumentaire de la conclusion : Pas d'intervalle de référence : détection des CNV présents	

<b>DECLARATION d'APTITUDE</b>	
Conclusion : méthode conforme utilisée à partir du .../.../... 21 janvier 2019	
Autorisée par : Signature	

# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale