



# 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
Identification du paramètre (comme identifié dans la liste détaillée des examens) : <b>Hybridation d'ADN sur puce à ADN (ACPA)</b>
Processus simple <input checked="" type="checkbox"/> ; Processus complexe <input type="checkbox"/> (nombre de sous-processus :

DESCRIPTION DU PROCESSUS		
Recherche de déséquilibres chromosomiques (CNV) à partir d'ADN génomique	Éléments à vérifier (argumentation)	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 checked="" type="checkbox"/> 5. Exactitude <input checked="" type="checkbox"/> 6. Sensibilité et spécificité analytique <input type="checkbox"/> 7. Incertitudes <input type="checkbox"/> 8. Etendue de mesure <input 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

Pour chaque étape, le laboratoire procédera 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

**Processus** : Recherche de déséquilibres chromosomiques (CNV) à partir d'ADN génomique

**Portée A**  ; **Portée B**  (à justifier)  
(modification mineure du protocole d'extraction d'ADN)

## DESCRIPTION DE LA METHODE

<b>Analyte / Mesurande :</b>	ADN
<b>Principe de la Méthode :</b>	Hybridation moléculaire (CGH-array)
<b>Type d'échantillon primaire :</b>	Sang total (ou ADN)
<b>Type de récipient, additifs :</b>	Tube EDTA
<b>Prétraitement de l'échantillon :</b>	Extraction d'ADN :
<b>Unités :</b>	Mise en évidence de CNV. Si N est le nombre de copie d'une région génomique donnée : N=0 : délétion homozygote N=1 : délétion hétérozygote N=3 : duplication N>3 : amplification Ce principe est valable pour les autosomes et peut varier pour les gonosomes Le principe détaillé est rédigé dans le document <b>LGCM-ANA-MO-023</b>
<b>Critères d'interprétation<sup>1</sup> :</b>	Tout CNV d'une taille supérieure à 400 kpb doit être mis en évidence par la technique. Les CNV en mosaïque supérieure ou égale à 20% doivent être décelés
<b>Marquage CE (Oui/Non) :</b>	Marquage CE (Oui/ <b>Non</b> )
<b>Codage C.N.Q. (s'il existe) :</b>	Non
<b>Équipement (instrument, analyseur, etc.) :</b>	Scanner Agilent Technologies G2566BA (upgrade C)
<b>Référence du réactif :</b>	Kit d'extraction d'ADN (QIAGEN) ref 51104  Kit de Marquage (Agilent Technologies) Réactifs d'hybridations Puces à ADN Tampons de lavages <b>Voir LGCM-ANA-MO-021</b>
<b>Matériau d'étalonnage (références) :</b>	Non applicable
<b>Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :</b>	Non applicable

## MISE EN ŒUVRE

<b>Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :</b>	Frédéric BILAN, Radu HARBUZ, Valerie CHARRAUD, Patricia DUMAINE, Barbara MANIERE
<b>Procédure de validation/mode opératoire :</b>	<b>BIOL-ANA-PR-001</b>
<b>Procédure de gestion de la portée flexible :</b>	<b>BIOL-ANA-PR-002</b>
<b>Période d'étude :</b>	<b>Méthode utilisée depuis le 01/01/2009 01/01/2009 à 01/06/2015</b>
<b>Date de 1<sup>ère</sup> utilisation :</b>	01/01/2009 (mise en route de l'automate)

<sup>1</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>2</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
Matière (échantillons)	Identitovigilance	5	Formation du personnel préleveur	<b>INS-EXA-007</b> : Manuel de prélèvements
	Présence de documents obligatoires : -Consentement signé par le patient -Attestation signée du médecin prescripteur -Feuille de renseignements cliniques -Feuille d'indication de l'ACPA	5 5 3 2	S'assurer que le prescripteur dispose des documents nécessaires	<b>Intranet-Pôle de Biologie-Analyses biologique</b> Présence des documents obligatoires à imprimer  <b>LGCM-PANA-MO-001</b> Prise en charge du prélèvement
	Type de contenants primaires Tubes EDTA	5	Formation des préleveurs	<b>Intranet-Pôle de Biologie-Analyses biologique</b>
	Nature et volume de l'échantillon Prélèvement veineux 1 tube 5 ml (enfant, adulte) 1 tube 1 ml (nouveau né)	3	Contrôle à réception par les techniciens de la RCP	<b>BIOL-PANA-DI-002</b> : liste des contenants  <b>LGCM-PANA-MO-001</b> Prise en charge du prélèvement
	Délai et température avant traitement analytique 1 semaine à température ambiante	1	Gestion logistique (navettes, enceintes de transport)	
	Type de contenant secondaire Tube de type eppendorf	1	Intégrité du tube, stockage	Formation des techniciennes <b>LGCM-ANA-MO-006</b> : Utilisation du nanodrop
	Nature et volume de l'échantillon 0,51 µg à 50 ng/µl d'ADN au minimum	5	Quantité et qualité d'ADN	<b>LGCM-ANA-MO-008</b> : électrophorèse en gel d'agarose  <b>LGCM-ANA-MO-020</b> : Extraction d'ADN pour ACPA
	Délai et température avant traitement analytique Stockage à -20°C (sans limite de conservation) Stockage à 4°C (1 mois)	3	Stockage	<b>LGCM-PANA-PR-001</b> : Conservation des échantillons avant analyse

<sup>2</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

<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>2</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>Milieu</b>	Conditions de conservation des réactifs (t°, ...) Température ambiante, 4°C ou -20°C	2	Métrie/suivi des enceintes, Logiciel SIRIUS	<b>BIOL-MET-PR-003</b> : gestion des enceintes thermostatées et des conditions ambiantes
	Conditions d'utilisation des réactifs (t°, ...)	3		
	Exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur	1	Contrôle des températures des locaux	Climatisation ou rafraîchissement des locaux
<b>Matériel (équipements)</b>	Nanodrop	5	Maintenance	<b>LGCM-ANA-MO-006</b> : Utilisation du nanodrop
	Scanner	5	Maintenance-Suivi des rapports de l'appareil	<b>Contrat de maintenance annuel</b> <b>LGCM-MAT-EXT-005</b> : Manuel d'utilisation du scanner <b>LGCM-MAT-EXT-002</b> : Manuel d'utilisation du four à hybrider <b>LGCM-MAT-EXT-003</b> : procédure de calibration du four
	Four à Hybrider	5	Maintenance-Suivi des températures	
	Bac de lavage	3	Entretien après chaque technique	
	Agitateur magnétique	2	Fonctionnement	<b>LGCM-MAT-MO-002</b> : maintenance petits matériels spécifiques à l'ACPA
	Agitateur magnétique chauffant	3	Fonctionnement	
	Minuteur	2	Précision	<b>BIOL-MET-PR-002</b> : suivi des minuteurs
	Pipettes	4	Précision des volumes	<b>BIOL-MET-PR-001</b> : Suivi, maintenance, contrôle des pipettes automatiques.
	Bain à sec	2	Fonctionnement	<b>LGCM-MAT-MO-002</b> : maintenance petits matériels spécifiques à l'ACPA
	Bain Marie	3	Maintenance et Fonctionnement	<b>BIOL-MAT-PR-004</b> : Entretien et maintenance du matériel de laboratoire.
	Cuve d'électrophorèse	3	Fonctionnement	<b>LGCM-MAT-MO-002</b> : maintenance petits matériels spécifiques à l'ACPA
	Balance	2	Maintenance/métrie des équipements	<b>BIOL-MAT-MO-006</b> : Utilisation des balances

# 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>2</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
	Imageur UV	3	Maintenance	<b>LGCM-MAT-MO-002</b> : maintenance petits matériels spécifiques à l'ACPA
	Informatique			
	Enregistrement de l'analyse	3	Base de données Microsoft Access	<b>LGCM-PANA-MO-001</b> : prise en charge des prélèvements
	Préparation de la feuille de travail	3	Logiciel Microsoft Excel	<b>LGCM-ANA-MO-019</b> : feuille de travail ACPA
	Pilotage du scanner	5	Logiciel Agilent Scan control	<b>LGCM-ANA-MO-022</b> : ACPA partie technique n°2
	Analyse	5	Logiciel Agilent Cyto genomics	<b>LGCM-INF-EXT-002</b> : Manuel du logiciel Feature extraction <b>LGCM-ANA-MO-023</b> : ACPA partie analyse
		1		
Edition des résultats	5	Logiciels Microsoft office (Word, powerpoint)	<b>LGCM-POAN-DI-001</b> : Feuille de rendu de résultat <b>LGCM-POAN-PR-001</b> : Procédure de rendu de résultat au médecin prescripteur	
Sauvegardes des données	5	Sécurité des données / serveur distant	<b>LGCM-INF-PR-001</b> : Procédure de sauvegarde des données ACPA	
<b>Matériel (réactifs)</b>	Conservation et conditions d'utilisation	3	Métrie des enceintes (cartographie et suivi des températures)	<b>BIOL-MET-PR-003</b> : gestion des enceintes thermostatées et des conditions ambiantes
	Gestion des stocks	3	Acceptation à réception des réactifs /Gestion des stocks	<b>BIOL-ACH-MO-001/2/3/4</b> : Gestion des demandes, commandes, destockage des produits dans le logiciel SAPANET
	Reconstitution des réactifs	3	Respect du mode opératoire de reconstitution et gestion des stocks	<b>CYT-ANA-DI-002</b> : fiche de reconstitution des réactifs
<b>Méthode</b>	Limites de la méthode (détection, quantification, linéarité, interférences, ...)	5	Limite de détection, limite de quantification, Sensibilité, spécificité	<b>LGCM-ANA-VM-003</b> : Dossier de validation des méthodes ACPA <b>LGCM-QUA-EXT-001</b> : Guide des bonnes pratiques de l'ACPA
			Transfusion non précisée et faite moins de 4 jours avant le prélèvement	Renseignements cliniques



# 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>2</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>Main d'œuvre (Personnel)</b>	Compétence et de maintien de la compétence du personnel	4	Formation et évaluation des compétences du personnel	<b>BIOL-RH-PR-002</b> : Procédure d'habilitation du personnel  Agrément des Biologistes



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

## EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

### REPETABILITE

Applicable  ; non applicable (à justifier)  Méthode qualitative

Argumentaire de la conclusion : L'analyse étant très couteuse, cet item n'a pas été évalué, d'autant plus que l'analyse est réalisée deux fois pour un patient (en inversant les fluorochromes).

### FIDELITE INTERMEDIAIRE

Applicable  ; non applicable (à justifier)  Méthode qualitative

Argumentaire de la conclusion : L'analyse étant très couteuse, cet item n'a pas été évalué, d'autant plus que l'analyse est réalisée deux fois pour un patient (en inversant les fluorochromes).

### VARIABILITE INTER-OPERATEURS

Applicable  ; non applicable

Opérateur évalué 1 : VC

Opérateur évalué 2 : PD

...

Expérimentation test du 28/04/2015 et 05/05/2015, échantillon UNP 32583

Suivi des contrôles qualités internes à l'expérimentation (à chaque expérimentation)

**Annexe** : Validation de méthode ACPA

**LGCM-RH-PR-001** : Procédure d'habilitation du personnel de génétique moléculaire (voir paragraphe ACPA)

Argumentaire de la conclusion : 100 % de concordance au niveau des CNV décelés et rendus lors de l'analyse test. Qualité d'hybridation similaire (DLRS<0,20). Le suivi des contrôles qualités internes à l'expérimentation (fournis par le fabricant) permettent de suivre la variabilité inter-opérateurs.

### JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés)

Applicable  ; non applicable (à justifier)  pas de CIQ externalisés existants

Argumentaire de la conclusion : Cet item pour l'ACPA est peu différent de l'exactitude qui est évaluée par les EEQ.

### EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ)

Contrôles quantitatifs  ; Contrôles qualitatifs

Argumentaire de la conclusion : EEQ-ACPA réalisé par l'ACLF. Participation depuis 2011. Résultats conformes pour l'ensemble des EEQ réalisés (documents en annexe). Procédure **LGCM-QUA-PR-001** : Gestion de l'EEQ ACPA

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

<b>SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE</b> (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"/>	
<b>Voir document : LGCM-ANA-VM-003 : Dossier de validation des méthodes ACPA</b>	
<p><b>Sensibilité Analytique : reflète la capacité à déceler tout CNV de taille &gt;400 kpb</b></p> <p><b>Spécificité Analytique : reflète la présence réelle ou non des CNV détectés par l'ACPA</b></p> <p>Ces deux paramètres dépendant grandement des valeurs des contrôles qualités internes à la puce (Derivative log ratio spread, DLRS en particulier, voir document <b>LGCM-ANA-VM-003</b> : Processus de validation de méthode ACPA)</p>	<p><b>Etude expérimentale rétrospective menée sur 6 mois (18/12/2014 au 18/05/2015) soit 74 patients auxquels on peut ajouter 4 EEQ et 7 ADN témoins porteurs d'une anomalie. Passage de 11 ADN commerciaux témoins (masculins et féminins) sur la période du 01/04/2014 au 09/06/2015.</b></p> <p><b>Vrais positifs 54 CNV+4 EEQ+7 ADN témoins porteurs d'une anomalie</b>            Détail des 54 CNV décelés par ACPA en routine            - 16 délétions (taille&lt;0,4 Mb) vérifiées par biologie moléculaire            - 2 délétions (taille &lt;0,4 Mb) vérifiées par biologie moléculaire            - 10 délétions (taille&gt;0,4 Mb) vérifiées par FISH            - 11 duplications (taille&lt;0,4 Mb) vérifiées par biologie moléculaire            - 1 tetrasomie (taille&lt;0,4 Mb) vérifiée par FISH            - 8 duplications vérifiées par biologie moléculaire            - 6 duplications vérifiées par FISH  <b>Faux positifs 1</b> (duplication &lt;0,4 Mb) non confirmée par biologie moléculaire</p> <p><b>Vrais négatifs 4EEQ - 11 ADNs commerciaux témoins - 33 patients supposés normaux</b>  <b>Faux négatifs 0</b></p>

Argumentaire de la conclusion : Les éléments de preuves sont détaillés en **Annexe** : Validation de méthode ACPA. Le taux de détection des CNV est supérieur ou égale à celui trouvé dans la littérature (> 20%). Un seul CNV décelé (faux positif) n'a pas été confirmé par une autre technique. Les résultats obtenus pour les EEQ sont conformes à ceux attendus : 100% des anomalies trouvées, pas de CNV détecté non attendu. Les ADNs commerciaux ne montrent pas de CNV suspect. Pour l'ACPA il est difficile de se prononcer sur les items vrais négatifs et faux négatifs en dehors d'EEQ ou d'analyse d'ADN commerciaux. Les patients étant analysés deux fois, il est quasi impossible de ne pas détecter un CNV de taille >0,4 Mb qui est le seuil de détection recommandé par le réseau AChropuce.

<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"/>	
<p><b>Limite de détection :</b></p> <p>Résolution moyenne des puces Agilent 105K            21,7 kpb sur le génome entier            18,9 kpb au niveau des gènes répertoriés dans refseq (NCBI)</p> <p>Résolution moyenne des puces Agilent 180K            17,6 kpb sur le génome entier            11,2 kpb au niveau des gènes répertoriés dans refseq (NCBI)</p> <p>Résolution recommandée pour le rendu du résultat :            400 kpb.</p> <p>Seuil minimal attendu de détection d'une anomalie :            30 kpb (soit environ 3 sondes déviantes contiguës sur le génome, critère strict pour retenir un CNV si DLRS&lt;0,30)</p> <p>Taille moyenne des CNV rendus : 100 kpb            Seuil de détection des anomalies en mosaïque :            20%</p>	<p>Voir document <b>LGCM-ANA-VM-003</b> : Dossier de validation des méthodes ACPA, <b>LGCM-ANA-MO-023</b> (mode opératoire de l'analyse) et <b>Annexe</b> : Validation de méthode ACPA.</p> <p>CNV décelés par ACPA et vérifiés par une autre technique :            -duplication 15 kpb            -duplication 25 kpb            - délétion 31 kpb            - délétion 32 kpb</p> <p>Concordance entre puce 105K et 180K : 5 ADNs patients passés sur 105K et réanalysés en 180K.</p> <p>Mosaïque :            - délétion de 15,3 Mb dont la mosaïque est estimée expérimentalement entre 16% et 19%</p>



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

(cytogénétique conventionnelle : 11%)

Argumentaire de la conclusion : Les seuils de détections observés sont conformes à ceux attendus. L'ensemble CNVs détectés par l'ACPA avec la lame Agilent 105K ont été confirmés et précisés par la lame 180K.

## COMPARAISON DE METHODES :

Applicable  ; non applicable (à justifier)

**L'ACPA est la méthode de référence**

Argumentaire de la conclusion : l'ACPA est la méthode de référence pour établir un caryotype moléculaire.

## 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)

**La quantité minimale d'ADN pour une ACPA est strictement de 0,5 µg (et 1 µg pour une analyse en trio)**

Argumentaire de la conclusion : L'ACPA n'est réalisée que si les quantités d'ADN requises sont respectées (avant et après marquage)

## 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  ; non applicable (à justifier)

**Génotype non conforme**

Transfusion sanguine de moins de 4 jours

**Echec de l'analyse**

Pathologie ou prise médicamenteuse diminuant le nombre de lymphocytes B

Argumentaire de la conclusion : Nécessité d'avoir des renseignements cliniques pour rendre un résultat fiable.

## CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B)

(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles)

Applicable  ; non applicable (à justifier)

**Contaminations inter échantillons :**

- identification des tubes tout au long de la technique/analyse

- Hybridation en « dye-swap » : les CNV doivent se retrouver en « miroir » avec une valeur de  $\log_2$  ratio cohérente en fonction de la nature (voir document **LGCM-ANA-VM-003** : Dossier de validation des méthodes ACPA)

- Hybridation entre individus de même sexe

Argumentaire de la conclusion : Pas de contamination relevée à ce jour.

## ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS

(étude expérimentale indispensable en portée B)

(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles)

Applicable  ; non applicable (à justifier)

**Température d'hybridation (68°C)**

Température testée 2°C en dessous : ne change pas la qualité de l'analyse (**Annexe** : Validation de méthode ACPA)

**Efficacité de marquage**

Contrôle de l'efficacité du marquage fluorescent des ADN après leur purification au spectrophotomètre Nanodrop (voir documents **LGCM-ANA-MO-006** et **LGCM-ANA-MO-021**).

3 paramètres : Rendement (valeur comprise entre 8 et 14 µg) ; Activité spécifique CY3 : 20-60 pmol/µg ;




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

	Activité spécifique CY5 : 20-60 pmol/ $\mu$ g  L'utilisation d'un kit de marquage reconnu défectueux par le fabricant n'a pas altéré de manière significative l'analyse ( <b>Annexe</b> : Validation de méthode ACPA)
<b>Stabilité des réactifs après ouverture</b>	Les réactifs (reconstitués ou non) sont stockés et utilisés selon la période recommandée par le fabricant. Le DLRS et le bruit de fond ont été suivis au cours de l'année 2015 ( <b>Annexe</b> : Validation de méthode ACPA).

Argumentaire de la conclusion : La méthode d'ACPA est robuste : une variation sensible de la température d'hybridation et de l'efficacité de marquage de l'ADN n'affecte pas la qualité finale de l'analyse. Le DLRS et le bruit de fond restent stables.

INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
<b>Valeurs de référence</b> Les données fournies dans ce tableau sont valables pour un caryotype moléculaire construit selon la formule suivante : $\text{Log}_2 \frac{[\text{CY5}] \text{ADN patient}}{[\text{CY3}] \text{ADN référence}}$	<b>Délétion homozygote ou hemizygote</b> $\text{Log}_2 \frac{[\text{CY5}] \text{ADN patient}}{[\text{CY3}] \text{ADN référence}} = \text{Log}_2 \frac{0}{1} = -\infty$ <b>Délétion hétérozygote</b> $\text{Log}_2 \frac{[\text{CY5}] \text{ADN patient}}{[\text{CY3}] \text{ADN référence}} = \text{Log}_2 \frac{1}{2} = -1$ Intervalle [-1,3 ; -0,7] <b>Duplication (autosome)</b> $\text{Log}_2 \frac{[\text{CY5}] \text{ADN patient}}{[\text{CY3}] \text{ADN référence}} = \text{Log}_2 \frac{3}{2} = 0,58$ Intervalle [0,3 ; 0,8] <b>Duplication gonosome (46XY)</b> $\text{Log}_2 \frac{[\text{CY5}] \text{ADN patient}}{[\text{CY3}] \text{ADN référence}} = \text{Log}_2 \frac{2}{1} = 1$ Intervalle [0,7 ; 1,3]  Voir document <b>LGCM-ANA-MO-023</b> (guide de l'Analyse de l'ACPA) et <b>LGCM-ANA-VM-003</b> : Processus de validation de méthode ACPA

Argumentaire de la conclusion : Ces intervalles de référence sont garants d'une bonne sensibilité et spécificité analytique (voir document **LGCM-ANA-VM-003** : Processus de validation de méthodes ACPA).

DECLARATION d'APTITUDE	
Conclusion : méthode conforme utilisée depuis le 01/01/2009 Dossier conforme à partir du 30/06/2015 Révision le 19/04/2019 Autorisée par : F. BILAN Signature 	



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

## Bibliographie

Vermeesch JR, Fiegler H, de Leeuw N, Szuhai K, Schoumans J, Ciccone R, Speleman F, Rauch A, Clayton-Smith J, Van Ravenswaaij C, Sanlaville D, Patsalis PC, Firth H, Devriendt K, Zuffardi O. Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. *Eur J Hum Genet.* 2007 Nov;15(11):1105-14

Pinto D, Darvishi K, Shi X, Rajan D, Rigler D, Fitzgerald T, Lionel AC, Thiruvahindrapuram B, Macdonald JR, Mills R, Prasad A, Noonan K, Gribble S, Prigmore E, Donahoe PK, Smith RS, Park JH, Hurles ME, Carter NP, Lee C, Scherer SW, Feuk L. Comprehensive assessment of array-based platforms and calling algorithms for detection of copy number variants. *Nat Biotechnol.* 2011 May 8;29(6):512-20.

Guide des bonnes pratiques de l'ACPA V1.0 Novembre 2010 (Groupe qualité du réseau AChroPuce et réunion plénière de consensus des praticiens de l'ACPA).

## I. Présentation de la technique, de l'appareillage et du mode opératoire, domaine d'application et but de la validation de méthode

### 1) Description de la méthode

Etude structurale des chromosomes (microdélétions, amplifications) par recherche et identification de loci chromosomiques déséquilibrés. Cette méthode appelée Analyse Chromosomique sur Puce à ADN (ou ACPA) encore appelée caryotype moléculaire est considérée comme une méthode qualitative. Il s'agit ici de détecter des régions d'ADN génomique dont le nombre de copies peut varier d'un individu à l'autre. Ces régions sont appelées CNV (Copy Number Variations). Le génome humain étant diploïde, on distingue plusieurs types de CNV :

- (1) la perte d'une région chromosomique (appelée délétion), qui peut être soit hétérozygote (ne concerne qu'un seul allèle), soit homozygote (et concerne les deux allèles). Pour les chromosomes sexuels, le cas est particulier et on peut parler de délétion hémizygote, lorsqu'il n'y a qu'un seul chromosome impacté.
- (2) Le gain d'une région chromosomique. Dans la plupart des cas on observe une copie surnuméraire (3 copies, avec un allèle contenant 2 copies dupliquées en tandem, ou transloquée dans une autre région chromosomique), voire deux copies surnuméraires (plus rare), on parle alors de tétrasomie. De façon exceptionnelle, on peut avoir un nombre de copie supérieur à 4, on parle généralement d'une amplification.

Lorsque le CNV est déjà répertoriée dans une banque de données de polymorphisme (exemple Database of Genomic Variant), on parlera de CNP (pour Copy Number Polymorphism) qui ne figurera pas dans la formule chromosomique finale de l'analyse. Les CNV décrits clairement comme délétères (exemple base de données DECIPHER) feront l'objet d'une étude familiale par une autre technique (FISH, qPCR, MP/LC, MLPA) et seront mentionnés dans la formule chromosomique. Enfin les CNV non répertoriés feront aussi l'objet d'une étude familiale. L'interprétation finale du CNV (polymorphisme, délétère, probablement délétère, variation de signification clinique inconnue) sera décidée par le Biologiste. Ce CNV s'il n'est pas un polymorphisme sera mentionné dans la formule chromosomique de l'analyse.

### 2) Présentation de l'appareillage et du mode opératoire

#### a. Présentation du scanner Agilent

(document de référence : LGCM-MAT-EXT-005 )

- Appareil sous contrat de maintenance annuel (Garantie Silver Agilent Technologies)
- Pas de maintenance journalière particulière
- Participation au CQE ACPA annuel organisé par l'ACLF
- Personnels techniques habilités
- Suivi régulier des rapports de contrôle qualité générés pour chaque analyse par l'appareil (suivi sur feuilles de calculs de type excel) afin d'éviter toute dérive anormales des mesures, ou tout problème technique en amont du scan de la puce à ADN.

#### b. Présentation du Logiciel d'analyse

(Document de référence : LGCM-ANA-MO-023)

## c. *Présentation des modes opératoires associés*

- Technique d'extraction des acides nucléiques (document LGCM-ANA-MO-020)
- Technique de marquage de l'ADN et sa purification (document LGCM-ANA-MO-021)
- Hybridation des acides nucléiques sur une puce à ADN (document LGCM-ANA-MO-021)
- Procédure de lavage d'une puce à ADN (document LGCM-ANA-MO-022)
- Procédure de scan d'une puce à ADN (document LGCM-ANA-MO-022)

### **3) Domaine d'application et but de la validation de méthode**

Ce dossier de Validation concerne la recherche de réarrangements chromosomiques déséquilibrés de tailles supérieures à 0,4 Mb (conférence de consensus). Cette technique ne détecte pas les réarrangements équilibrés (translocation chromosomique équilibrées, les unidisomies) et les mosaïques où l'anomalie chromosomique n'est présente que dans moins de 20% des cellules analysées.

Le but de la validation de méthode de l'ACPA est de vérifier

- (1) que le caryotype moléculaire généré par l'analyse est de qualité suffisante pour détecter un déséquilibre de taille supérieure ou égale à 0,4 Mb
- (2) que l'analyse est capable de détecter à l'état hétérozygote, homozygote (ou hémizygotte) des microdélétions, des duplications ou tout autre amplification d'une région chromosomique. Les puces utilisées ont une résolution de 105K. Ne sont retenus que des CNV constitués de 3 sondes déviantes consécutives (qui s'écartent de manière significative de la ligne de base), ce qui correspond en moyenne à des CNV de 30 kpb. Il n'y a pas de taille maximale pour la taille d'un CNV.

## **II. Liste des critères de performance à vérifier et leurs limites acceptables**

### **1) Paramètre majeur de qualité : le DLRS (Derivative Log Ratio Spread)=CIQ**

Le DLRS (Derivative Log Ratio Spread) est un paramètre qui permet l'estimation pour une puce donnée du bruit de fond moyen généré par chaque sonde de la puce. Ce paramètre est calculé à partir du ratio (en échelle logarithmique) de l'intensité de la fluorescence CY5 sur l'intensité de fluorescence en CY3 mesurée pour chaque sonde, donc pour chaque puits de la puce.

La dérivée de la valeur des Log Ratio correspond à la différence entre les valeurs des Log Ratio obtenues pour deux sondes contiguës (voir figure 1)

Le suivi du DLRS (CIQ) est réalisé sur un fichier Excel (lecteur réseau « Gene » gene\Lecture\_ACPA\QCmetrics\). Des graphiques peuvent être produits pour visualiser toutes dérives anormales.

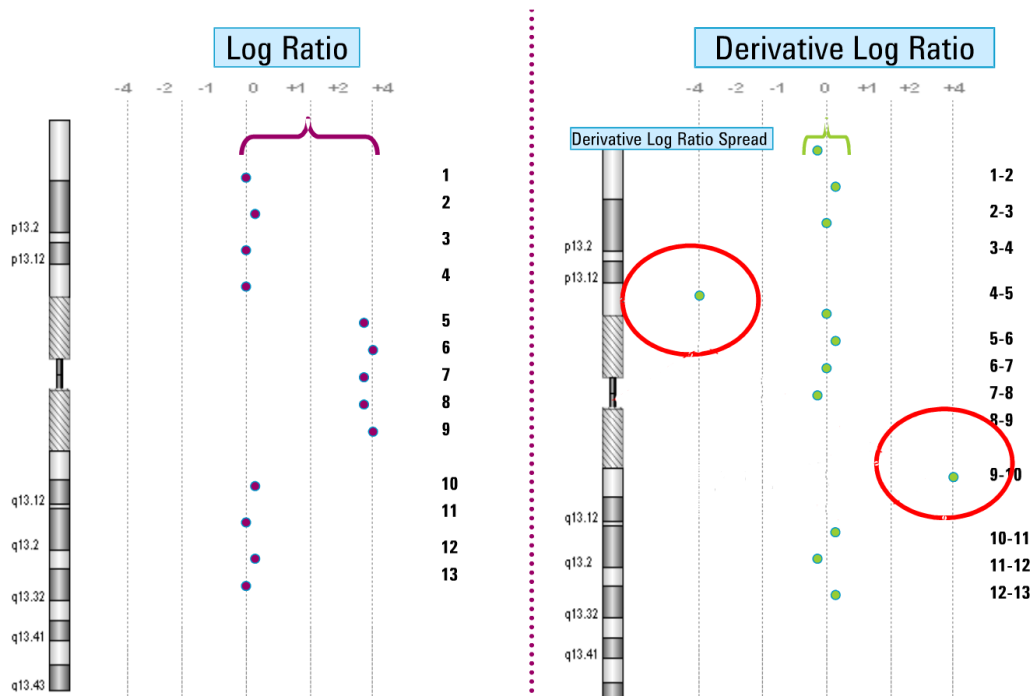


Figure 1 Comparaison Log Ratio et dérivée du Log Ratio

La valeur du DLRS correspond à la déviation standard des valeurs de la dérivée des Log ratio des sondes constituant la puce.

Selon les normes du fabricant, le DLRS est excellent lorsqu'il est strictement inférieur à 0,2, il est bon quand il est compris entre 0,2 et 0,3 et la puce est à évaluer (par le biologiste) lorsqu'il est strictement supérieur à 0,3.

Des exemples de l'impact du DLRS sur la qualité d'un caryotype moléculaire sont présentés figure 2 :

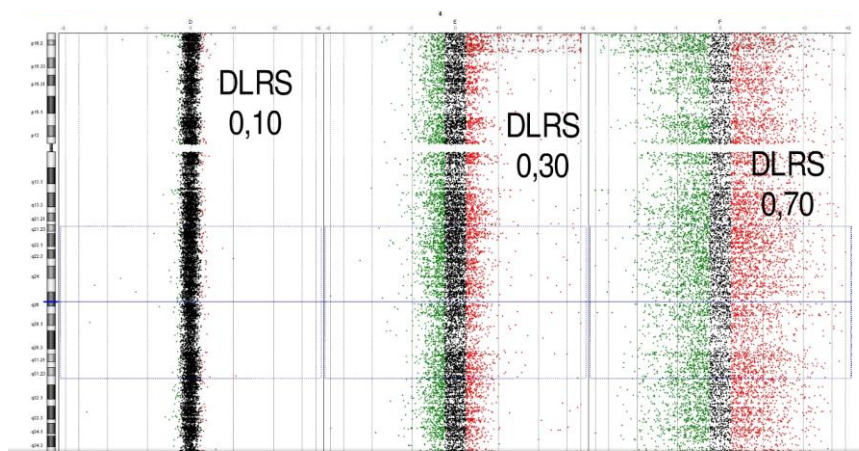


Figure 2 : Impact du DLRS sur la qualité de l'ACPA

## 2) Sensibilité et spécificité analytique=reflet de l'exactitude

Pour l'ACPA, les faux positifs analytiques (détection d'un CNV qui n'existe pas) et les faux négatifs analytiques (défaut de détection d'un CNV présent) peuvent être secondaires à une qualité insuffisante de l'ADN, de son marquage par un fluorochrome, un problème technique affectant l'hybridation (arrêt de la rotation du four à hybrider, température du four incorrecte, présence de très nombreuses bulles dans la chambre à hybrider) ou un défaut de lavage de la puce à ADN. L'ensemble de ces biais expérimentaux génère notamment un bruit de fond trop important (valeur de DLRS > 0.3). **La valeur du DLRS dans les limites tolérées** restent le critère de qualité majeur. Une valeur comprise entre 0,3 et 0,5 doit être soumise à l'acceptation du biologiste. Toute autre valeur conduit à une nouvelle technique de l'échantillon primaire voire à un nouveau prélèvement du patient.

L'utilisation de **la technique d'hybridation en trio** que nous utilisons permet d'éliminer la plupart des biais expérimentaux (chaque CNV relevant doit être visualisé « en miroir » sur chacune des puces). Les CNV d'un patient qui n'appartiennent pas à la catégorie des polymorphismes (voir document de référence LGCM-ANA-MO-023.) font l'objet d'une vérification par une autre technique (MLPA, MP/LC, FISH).

En pratique, la sensibilité et la spécificité analytiques sont difficiles à déterminer de façon rigoureuse (analyse d'un très grand nombre d'échantillons nécessaire, absence de contrôle positif pour chaque région chromosomique potentiellement variante). Cependant ces notions peuvent être approchées par différentes valeurs de qualité obtenues pour chaque analyse (chaque ACPA) dans sa globalité (l'ensemble des oligonucléotides utilisés sur la puce qui permettent d'analyser l'ensemble du génome humain) qui sont indiquées par le logiciel d'analyse utilisé.

A noter que les CNV détectés en ACPA sont systématiquement vérifiés par une autre technique : en général sonde **FISH** pour les anomalies supérieures à 0,4 Mb et **MP/LC** à façon (2-3 amplicons) pour les anomalies de tailles inférieures. Lorsque le CNV n'est pas confirmé il existe deux cas de figures :

- Ceux dont la taille est supérieure à 0,1 Mb : choix d'une nouvelle sonde /nouveaux amplicons, si le CNV n'est toujours pas confirmé étude des autres patients utilisés lors de l'hybridation en trio. Si le CNV n'est toujours pas confirmé, demande d'un nouveau prélèvement pour une nouvelle ACPA.
- Ceux dont la taille est inférieure strictement à 0,1 Mb (pouvant résulter d'un bruit de fond trop important) : choix de nouveaux amplicons. Si le CNV n'est toujours pas confirmé alors on conclut à l'existence d'un faux positif.

### 3) Autres paramètres de qualité

- ✓ Bruit de fond rouge / Bruit de fond vert : ces valeurs reflètent l'écart type de l'intensité de fluorescence corrigée mesurée au niveau des sondes dites contrôles négatifs qui ne sont pas complémentaires de séquence d'ADN génomique humain. (Valeur strictement inférieure à 5 : excellent, comprise entre 5 et 10 : bonne et mauvaise lorsque strictement supérieure à 10.
- ✓ Intensité du signal rouge / Intensité du signal vert : ces valeurs reflètent la moyenne de l'intensité du signal corrigé mesurée pour chaque puits de la puce (Valeur strictement

supérieure à 150 : excellent, comprise entre 50 et 150 : bon et strictement inférieure à 50 : mauvais.

- ✓ Rapport Signal/Bruit rouge et Rapport Signal/Bruit vert : « Valeur intensité du signal » divisée par la valeur « Bruit de fond ». Valeur strictement supérieure à 100 : excellent, comprise entre 30 et 100 : bon et strictement inférieure à 30 : mauvais
- ✓ Reproductibilité rouge / Reproductibilité vert : Ces valeurs représentent la moyenne du pourcentage du coefficient de variation de l'intensité de signal corrigée calculé pour chaque sonde répliquée plusieurs fois sur la puce à ADN. Valeur strictement inférieure à 0,05 : excellent, comprise entre 0,05 et 0,2 : bon et strictement supérieur à 0,2 : mauvais.

Critère Majeur : DLRS : bon ou excellent. Critères mineurs (les autres critères décrits ci-dessus) : bon ou excellent. La présence d'un ou plusieurs critères qualifiés de mauvais doit être signalée au Biologiste qui prendra la décision finale de l'interprétation ou non de la puce.

## 4) Limites de détection

### ✓ résolution moyenne

Résolution moyenne des puces Agilent 105K

21,7 kpb sur le génome entier

18,9 kpb au niveau des gènes répertoriés dans refseq (NCBI)

Résolution moyenne des puces Agilent 180K

17,6 kpb sur le génome entier

11,2 kpb au niveau des gènes répertoriés dans refseq (NCBI)

Résolution recommandée pour le rendu du résultat : 400 kpb.

Seuil de détection des anomalies en mosaïque : 20%

### ✓ taille de détection

La taille de détection actuellement recommandée (conférence de consensus) est de 0,400 Mb, ce qui est très supérieur à la résolution moyenne observée sur les puces 2X105K où l'on est capable de détecter fréquemment des CNV dont la taille avoisine les 30 kb. Par exemple, nous avons mis en évidence deux duplications de 15 kpb et 25 kpb ainsi que deux microdélétions de 31 kpb et 32 kpb qui ont toutes été confirmées par MP/LC (voir dossier « Qualité ACPA » situé sur le lecteur réseau « gene »). Même dans des conditions de critères de qualité non satisfaisants nous décelons des CNV de 100 kb environ (ex d'une délétion du gène NRXN1 de 100 kb (UNP 16284, DLRS : 0,32). La présence de ce CNV a été confirmée par MP/LC.

### ✓ nombre de copie (cas des mosaïques)

Exemple de détection d'une délétion en mosaïque (figure 3). Patient 24213, valeurs des Log<sub>2</sub> ratio disponible dans le dossier « Qualité ACPA » du lecteur réseau « gene ».

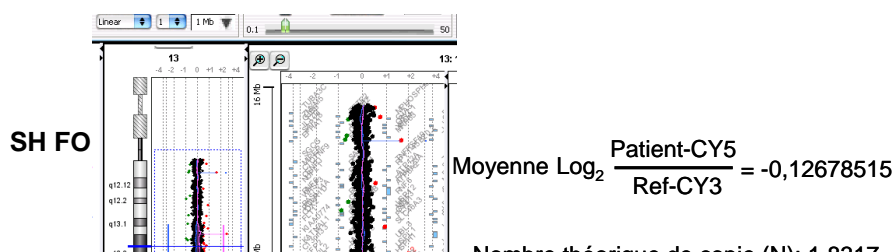


Figure 3 : Mise en évidence d'une délétion de 15,3 Mb en mosaïque (les cellules porteuses de l'anomalie sont estimées expérimentalement entre 16% et 19%). En cytogénétique conventionnelle, la mosaïque a été estimée à 11%

## **5) Comparaison de méthode**

La méthode d'ACPA constitue la méthode de référence. Par défaut une comparaison peut être obtenue par d'autres méthodes tel que le caryotype classique ou haute résolution, la détection d'anomalie chromosomiques par MLPA (kits dédiés syndrome microdélétionnels, anomalies sub-télomériques, étude d'aneuploidies fréquentes etc...)

## **6) Qualité des réactifs**

Les protocoles sont réalisés selon les recommandations du fabricant.

Facteurs susceptibles d'affecter la technique :

Qualité (pureté, intégrité de l'ADN), température d'incubation, réactifs de marquage, purification.

Contrôle de l'efficacité du marquage fluorescent des ADN après leur purification au spectrophotomètre Nanodrop (voir documents LGCM-ANA-MO-006 et LGCM-ANA-MO-021).

3 paramètres : Rendement (valeur comprise entre 8 et 14 µg)

Activité spécifique CY3 : 20-60 pmol/µg

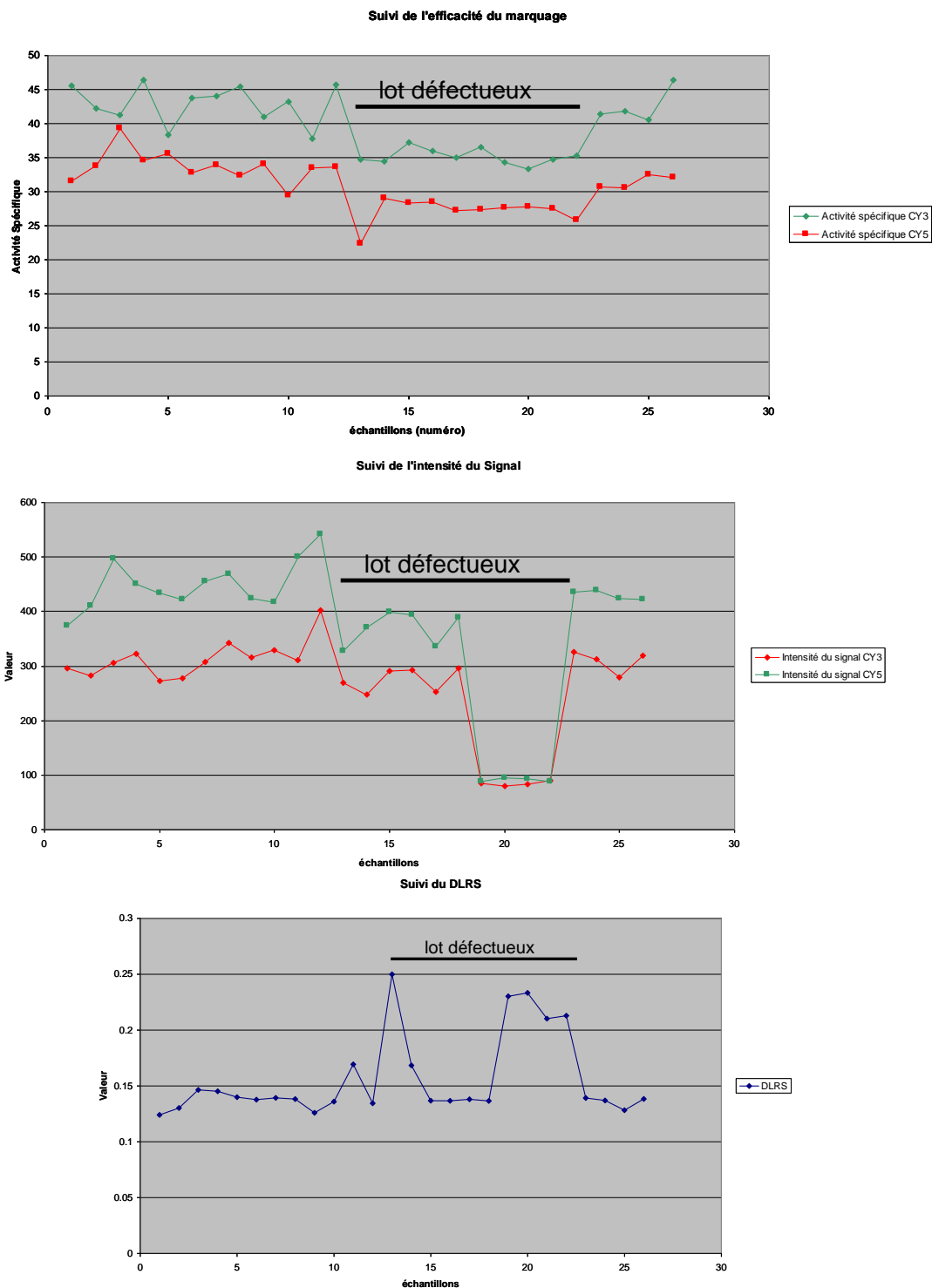
Activité spécifique CY5 : 20-60 pmol/µg

- Hybridation, lavage des puces

Contrôles de qualité du fabriquant après lecture de la puce.

**La cyanine 5 est sensible à l'ozone (décroissance de la fluorescence). Ce phénomène n'a jamais été constaté au CHU de Poitiers**

Figure 4 : Mise en évidence d'un lot de réactif de marquage défectueux par suivi des CQI



## Références bibliographiques

Document de référence : Guide des bonnes pratiques ACPA version 1.0 Novembre 2010 (Groupe qualité du réseau AChroPuce et réunion plénière de consensus des praticiens de l'ACPA).

Vermeesch JR, Fiegler H, de Leeuw N, Szuhai K, Schoumans J, Ciccone R, Speleman F, Rauch A, Clayton-Smith J, Van Ravenswaaij C, Sanlaville D, Patsalis PC, Firth H, Devriendt K, Zuffardi O. Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. *Eur J Hum Genet.* 2007 Nov;15(11):1105-14

Pinto D, Darvishi K, Shi X, Rajan D, Rigler D, Fitzgerald T, Lionel AC, Thiruvahindrapuram B, Macdonald JR, Mills R, Prasad A, Noonan K, Gribble S, Prigmore E, Donahoe PK, Smith RS, Park JH, Hurles ME, Carter NP, Lee C, Scherer SW, Feuk L. Comprehensive assessment of array-based platforms and calling algorithms for detection of copy number variants. *Nat Biotechnol.* 2011 May 8;29(6):512-20.

Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale– SH GTA 04

# 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>	Identitovigilance	5	Formation du personnel préleveur	<b>INS-EXA-007</b> : Manuel de prélèvements
	Présence de documents obligatoires : -Consentement signé par le patient -Attestation signée du médecin prescripteur -Feuille de renseignements cliniques -Feuille d'indication de l'ACPA	5 5 3 2	S'assurer que le prescripteur dispose des documents nécessaires	<b>Intranet-Pôle de Biologie-Analyses biologique</b> Présence des documents obligatoires à imprimer  <b>LGCM-PANA-MO-001</b> Prise en charge du prélèvement
	Type de contenants primaires Tubes EDTA	5	Formation des préleveurs	<b>Intranet-Pôle de Biologie-Analyses biologique</b>
	Nature et volume de l'échantillon Prélèvement veineux 1 tube 5 ml (enfant, adulte) 1 tube 1 ml (nouveau né)	3	Contrôle à réception par les techniciens de la RCP	<b>BIOL-PANA-DI-002</b> : liste des contenants  <b>LGCM-PANA-MO-001</b> Prise en charge du prélèvement
	Délai et température avant traitement analytique 1 semaine à température ambiante	1	Gestion logistique (navettes, enceintes de transport)	
	Type de contenant secondaire Tube de type eppendorf	1	Intégrité du tube, stockage	Formation des techniciennes <b>LGCM-ANA-MO-006</b> : Utilisation du nanodrop
	Nature et volume de l'échantillon 0,51 µg à 50 ng/µl d'ADN au minimum	5	Quantité et qualité d'ADN	<b>LGCM-ANA-MO-008</b> : électrophorèse en gel d'agarose  <b>LGCM-ANA-MO-020</b> : Extraction d'ADN pour ACPA
	Délai et température avant traitement analytique Stockage à -20°C (sans limite de conservation) Stockage à 4°C (1 mois)	3	Stockage	<b>LGCM-PANA-PR-001</b> : Conservation des échantillons avant analyse

<sup>3</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

<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
Milieu	Conditions de conservation des réactifs (t°, ...) Température ambiante, 4°C ou -20°C	2	Métrieologie/suivi des enceintes, Logiciel SIRIUS	<b>BIOL-MET-PR-003</b> : gestion des enceintes thermostatées et des conditions ambiantes
	Conditions d'utilisation des réactifs (t°, ...)	3		
	Exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur	1	Contrôle des températures des locaux	Climatisation ou rafraîchissement des locaux
Matériel (équipements)	Nanodrop	5	Maintenance	<b>LGCM-ANA-MO-006</b> : Utilisation du nanodrop
	Scanner	5	Maintenance-Suivi des rapports de l'appareil	<b>Contrat de maintenance annuel</b> <b>LGCM-MAT-EXT-005</b> : Manuel d'utilisation du scanner <b>LGCM-MAT-EXT-002</b> : Manuel d'utilisation du four à hybrider <b>LGCM-MAT-EXT-003</b> : procédure de alibration du four
	Four à Hybrider	5	Maintenance-Suivi des températures	
	Bac de lavage	3	Entretien après chaque technique	
	Agitateur magnétique	2	Fonctionnement	<b>LGCM-MAT-MO-002</b> : maintenance petits matériels spécifiques à l'ACPA
	Agitateur magnétique chauffant	3	Fonctionnement	
	Minuteur	2	Précision	<b>BIOL-MET-PR-002</b> : suivi des minuteurs
	Pipettes	4	Précision des volumes	<b>BIOL-MET-PR-001</b> : Suivi, maintenance, contrôle des pipettes automatiques.
	Bain à sec	2	Fonctionnement	<b>LGCM-MAT-MO-002</b> : maintenance petits matériels spécifiques à l'ACPA
	Bain Marie	3	Maintenance et Fonctionnement	<b>BIOL-MAT-PR-004</b> : Entretien et maintenance du matériel de laboratoire.
	Cuve d'électrophorèse	3	Fonctionnement	<b>LGCM-MAT-MO-002</b> : maintenance petits matériels spécifiques à l'ACPA
	Balance	2	Maintenance/métrieologie des équipements	<b>BIOL-MAT-MO-006</b> : Utilisation des balances

# 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
	Imageur UV	3	Maintenance	<b>LGCM-MAT-MO-002</b> : maintenance petits matériels spécifiques à l'ACPA
	Informatique			
	Enregistrement de l'analyse	3	Base de données Microsoft Access	<b>LGCM-PANA-MO-001</b> : prise en charge des prélèvements
	Préparation de la feuille de travail	3	Logiciel Microsoft Excel	<b>LGCM-ANA-MO-019</b> : feuille de travail ACPA
	Pilotage du scanner	5	Logiciel Agilent Scan control	<b>LGCM-ANA-MO-022</b> : ACPA partie technique n°2
	Analyse	5	Logiciel feature extraction	<b>LGCM-INF-EXT-002</b> : Manuel du logiciel Feature extraction
		5	Logiciel Agilent Cytogenomics	<b>LGCM-ANA-MO-023</b> : ACPA partie analyse
1				
Edition des résultats	5	Logiciels Microsoft office (Word, powerpoint)	<b>LGCM-POAN-DI-001</b> : Feuille de rendu de résultat <b>LGCM-POAN-PR-001</b> : Procédure de rendu de résultat au médecin prescripteur	
5	Sauvegardes des données	5	Sécurité des données / serveur distant	<b>LGCM-INF-PR-001</b> : Procédure de sauvegarde des données ACPA
Matériel (réactifs)	Conservation et conditions d'utilisation	3	Méetrologie des enceintes (cartographie et suivi des températures)	<b>BIOL-MET-PR-003</b> : gestion des enceintes thermostatées et des conditions ambiantes
	Gestion des stocks	3	Acceptation à réception des réactifs /Gestion des stocks	<b>BIOL-ACH-MO-001/2/3/4</b> : Gestion des demandes, commandes, destockage des produits dans le logiciel SAPANET
	Reconstitution des réactifs	3	Respect du mode opératoire de reconstitution et gestion des stocks	<b>CYT-ANA-DI-002</b> : fiche de reconstitution des réactifs
Méthode	Limites de la méthode (détection, quantification, linéarité, interférences, ...)	5	Limite de détection, limite de quantification, Sensibilité, spécificité	<b>LGCM-ANA-VM-003</b> : Dossier de validation des méthodes ACPA <b>LGCM-QUA-EXT-001</b> : Guide des bonnes pratiques de l'ACPA
			Transfusion non récisée et faite moins de 4 jours avant le prélèvement	Renseignements cliniques



# 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
Main d'œuvre (Personnel)	Compétence et maintien de compétence du personnel	4	Formation et évaluation des compétences du personnel	<b>BIOL-RH-PR-002</b> : Procédure d'habilitation du personnel  Agrément des Biologistes

## III. Plan d'expérience et mise en œuvre dans le laboratoire de la validation de méthode

### 1) Plan d'expérience

Chaque analyse est réalisée selon le schéma dit du « **trio de patients** ». Il n'y a généralement pas l'utilisation d'ADN contrôle ou de référence, c'est l'ADN de chaque patient qui sert tour à tour de contrôle (voir procédure LGCM-ANA-MO-023). L'utilisation d'ADN contrôle est ponctuelle dans le cadre de l'activité diagnostique prénatale.

Un autre paramètre est contrôlé à chaque expérimentation : le  $\log(2)$  ratio des chromosome sexuels en fonction du type d'hybridation : **sex-match** ou **sex-mismatch** (figure 9). En hybridation de type sex-match, le  $\log(2)$  ratio des sondes réparties sur ces chromosomes doit être aux alentours de 0. En sex-mismatch, ce  $\log(2)$  ratio se trouve modifié comme montré dans l'exemple figure 5

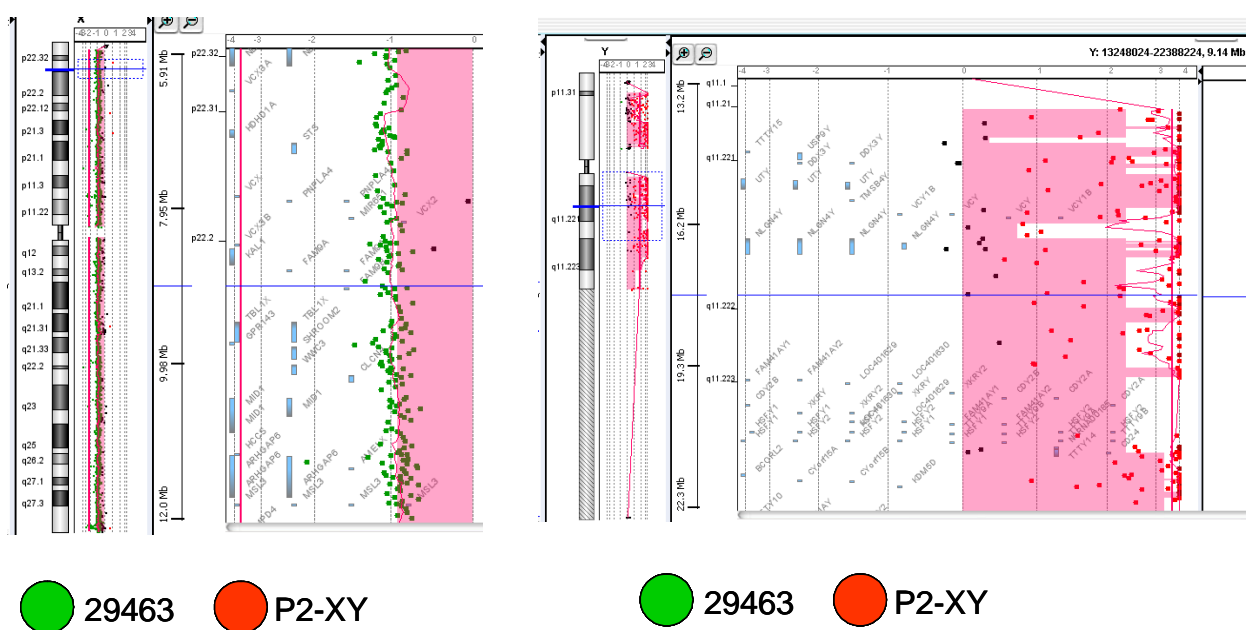


Figure 5 : hybridation en sex-mismatch. Les sondes du chromosome X sont décalées vers la valeur -1, les sondes du chromosome Y sont décalées vers  $+\infty$  (29463 est de sexe féminin).

Le pan d'expérience en sex-match permet de mettre en évidence des anomalies chromosomiques des gonosomes : exemple figure 10 où deux ADN de phénotype masculin ont été hybridés ensemble.

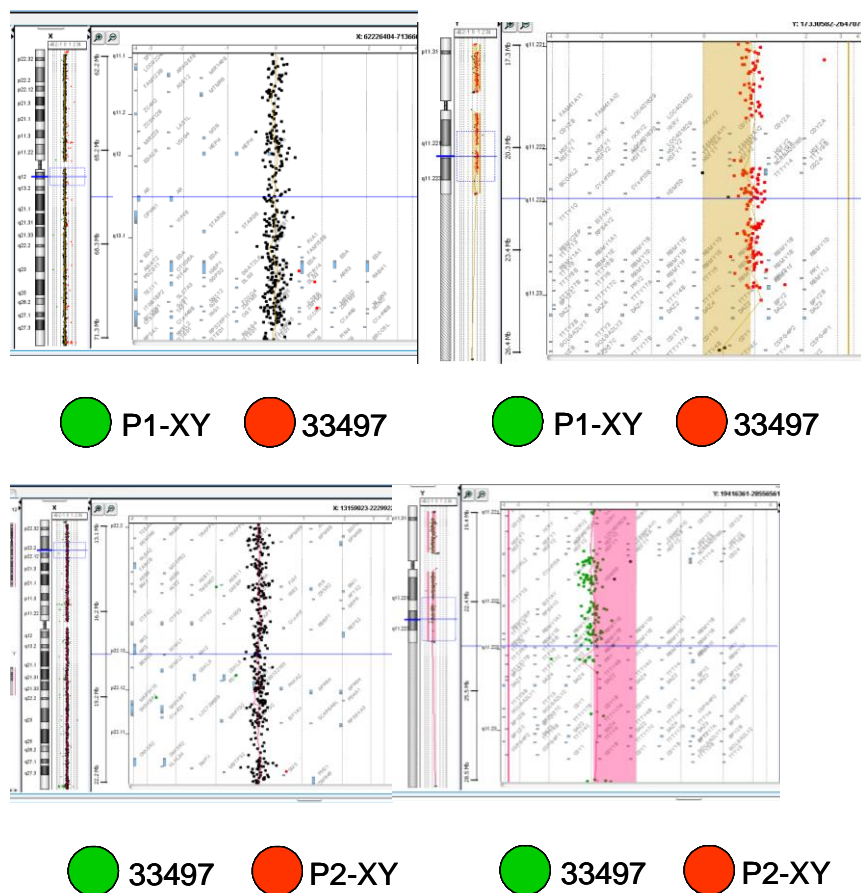


Figure 6 : Mise en évidence d'un syndrome 47,XYY (patient 33497) où l'on observe en dye-swap une duplication entière du chromosome Y.

## 2) Contrôle des critères de qualité pour la validation de méthode

### 2.1) Répétabilité

Non applicable. Méthode qualitative.

### 2.2) Fidélité intermédiaire-Variabilité Inter-opérateurs.

#### ✓ Analyse test de fidélité intermédiaire :

Comparaison de résultats obtenus d'un même échantillon techniqué par 2 personnes différentes à des jours différents.

#### ✓ Test de contrôle des DLRS inter-opérateurs

Ce paramètre permet l'estimation du bruit moyen généré par chaque sonde de la puce. Vu le coût de la technique, les puces comportent toutes des échantillons de patients différents. Il faut noter que les valeurs de DLRS peuvent varier en fonction de la nature du trio (les échantillons pré-nataux ont généralement un DLRS plus élevé que les échantillons post-nataux).

✓ *Ce critère peut aussi être évalué lors des EEQ*

Les EEQ sont toujours réalisés par deux techniciens différents (1 technicien pour le marquage en CY3 et un autre pour le marquage en CY5 pour le même EEQ) et l'on compare les 2 profils qui doivent être concordants.

## **2.3) Justesse**

Non applicable. Méthode qualitative.

## **2.4) Exactitude**

Participation au CQE ACPA annuel organisé par l'ACLF

## **2.5) Sensibilité et spécificité analytique**

### **Confirmation des performances en pratique quotidienne : CIQ et EEQ :**

Le suivi des CIQ (DLRS) est réalisé sur un fichier Excel (lecteur réseau « Gene » gene\Lecture\_ACPA\QCmetrics\).

Plusieurs stratégies ont été mise en place pour le suivi de la plateforme.

- La plateforme est strictement utilisée par le Laboratoire
- Suivi des valeurs obtenues pour chaque échantillon après purification des ADN<sub>s</sub> marqués
- Utilisation ponctuelle d'ADN contrôle commerciaux
- la plupart des hybridations sont effectuées en « sex match » ce qui permet un contrôle de la ligne de base au niveau des chromosomes sexuels
- Utilisation ponctuelle d'hybridation en « sex mismatch » (selon les besoins de l'activité diagnostic du laboratoire : exemple échantillon devant être passé en urgence) ce qui permet de vérifier la déviation correcte (valeurs de  $\text{Log}(2)$  ratio attendues) de la ligne de base au niveau des chromosomes sexuels.
- Utilisation ponctuelle d'échantillons porteurs d'anomalies chromosomiques connues (en fonction des besoins de l'activité diagnostic du laboratoire)
- Hybridation réalisée en trio (chaque échantillon est analysé deux fois en utilisant un fluorochrome différent) ce qui permet d'observer « en miroir » les CNV de l'échantillon.
- Participation à l'EEQ ACPA annuel réalisé par l'ACLF

## **2.6) Incertitudes de mesure**

**La valeur du DLRS dans les limites tolérées** restent le critère majeur d'acceptation d'une analyse. Selon les normes du fabricant, le DLRS est excellent lorsqu'il est strictement inférieur à 0,2. Une valeur comprise entre 0,3 et 0,5 doit être soumise à l'acceptation du biologiste. Toute autre valeur conduit à une nouvelle technique de l'échantillon primaire voire à un nouveau prélèvement du patient.

## **2.7) Etendue de mesure**

La taille de détection actuellement recommandée (conférence de consensus) est de 0,400 Mb, ce qui est très supérieur à la résolution moyenne observée sur les puces 2X105K ou 180K où l'on est capable de détecter fréquemment des CNV dont la taille avoisine les 30 kb.

## **2.8) Comparaison de méthode**

L'ACPA est la méthode de référence. On peut cependant comparer retrospectivement les CNV détectés en ACPA avec une autre méthode (MLPA, MP/LC, FISH) vu que ces CNV sont systématiquement vérifiés.

## **2.9) Interférences**

Non applicable. Le matériel de départ est l'ADN.

## **2.10) Contamination**

L'extraction d'ADN et le marquage des échantillons sont réalisés dans des pièces dédiées. Le plan expérimental de la technique (pour chaque patient) est visualisé sur une feuille papier, les différents tubes utilisés sur l'intégralité de l'expérience sont annotés. La technique d'ACPA présentée ici ne fait pas appel à une technique d'amplification par PCR ce qui limite les contaminations liés aux acides nucléiques.

La présence de CNV rares sur un échantillon permet aussi de s'assurer de l'absence de contamination par des acides nucléiques. Les CNV communs doivent avoir un Log Ratio cohérent en fonction de leur nature (délétion duplication, amplification).

Les puces à ADN possèdent un code barre qui est lu par le scanner, ce qui attribue un numéro unique à l'analyse de la puce (il existe donc une traçabilité de l'échantillon depuis son extraction jusqu'à l'analyse finale par le logiciel permettant l'interprétation des résultats).

L'analyse de patient en trio (voir schéma d'analyse document ..... ) permet d'observer les CNV « en miroir » ce qui limite *in fine* considérablement la confusion entre deux échantillons (ou inversion de tubes). L'hybridation en « sex-match » peut aussi aider à la détection de contamination.

Les échantillons en mosaïque sont rares et pourront faire l'objet d'une étude spécialisée (par exemple étude de plusieurs régions microsatellites) si un doute de contamination existe.

Les CNV détectés sur un échantillon donné sont vérifiés par une autre technique (semi quantitative (MP/LC) ou qualitative (FISH)). La vérification est réalisée soit à partir d'un nouveau prélèvement (FISH), d'une nouvelle extraction (techniques de biologie moléculaire, où du tube d'ADN primaire (celui reçu d'un laboratoire extérieur). Dans le cas de vérifications par biologie moléculaire, il est rarement demandé un nouveau prélèvement, sauf dans les cas où la qualité du prélèvement est remise en cause.

Dans le cas des échantillons pré-nataux, les contaminations d'origine maternelle sont recherchées à l'aide de séquences microsatellites.

## **2.11) Robustesse et stabilité des réactifs**

### **Facteurs susceptibles d'affecter la technique :**

**Qualité de l'ADN :** Vérification de la pureté (Nanodrop)-Intégrité (Migration sur gel d'agarose). Sauf échantillon précieux, les ADN dégradés (présence de plusieurs fragments ou « smear » d'ADN) ne passent pas à l'étape de marquage fluorescent. Un nouveau prélèvement est demandé.

**Température et temps d'incubation pour réactifs de marquage, purification**

Les températures et temps d'incubation ne sont pas critiques.

Le contrôle de l'efficacité du marquage fluorescent des ADN s'effectue après leur purification au spectrophotomètre Nanodrop (voir document LGCM-ANA-MO-021).

3 paramètres : Rendement : valeur comprise entre 8 et 14  $\mu\text{g}$   
Activité spécifique CY3 : 20-60 pmol/ $\mu\text{g}$   
Activité spécifique CY5 : 20-60 pmol/ $\mu\text{g}$

Cette étape de contrôle n'est réalisée qu'à titre indicatif, afin de dépister éventuellement un réactif défectueux. Sauf avis contraire du Biologiste ou en cas de valeurs d'activités spécifiques inférieures à la limite basse recommandée par le fabricant, des valeurs situées en dehors des limites recommandées ci dessus, ne doivent pas empêcher l'étape suivante d'hybridation des ADN. Depuis la création de la plateforme d'analyse en 2009, il n'a pas été constaté de corrélations fines entre ces valeurs recommandées par le fabricant et la qualité finale de l'ACPA.

### **Hybridation, lavage des puces.**

La température du four à hybrider (température d'hybridation) et le temps d'hybridation ne sont pas critiques Les 40 heures d'hybridation sont évaluées à l'aide d'une horloge depuis 2009.

La cyanine 5 est sensible à l'ozone (décroissance de la fluorescence). Ce phénomène n'a jamais été constaté au CHU de Poitiers

### **Stabilité des réactifs**

Le suivi des réactifs est entièrement informatisé (Stomelia) : suivi du numéro de lot, de la date de péremption etc... Le suivi des CQI sur tableau excel permet de détecter des réactifs défectueux

Toute dérive répétée (sur 2 semaines par exemple) des mesures effectuées après la purification des ADN fluorescents conduit à une demande de support technique auprès du fabricant (Agilent Technologies), notamment afin de s'assurer que le lot utilisé est hors de cause. Nous disposons d'ADN commerciaux contrôles (Promega, homme et femme) validés par le fabricant qui permettent si besoin de contrôler l'efficacité du kit de marquage utilisé. Il en est de même pour les contrôles qualités générés par le scanner (voir critères définis paragraphe 2.1). Toute dérive constatée sur l'un de ses critères conduit à un examen de l'image (.TIFF) de la puce à ADN. Cet examen permet de déterminer entre autre s'il y a eu un problème d'hybridation (chambre ou joint défectueux), si la puce était conforme (tous les puits présents), s'il y a eu un problème lié aux réactifs de lavage.

## Annexe : Validation de méthode ACPA

### Variabilité inter-opérateurs

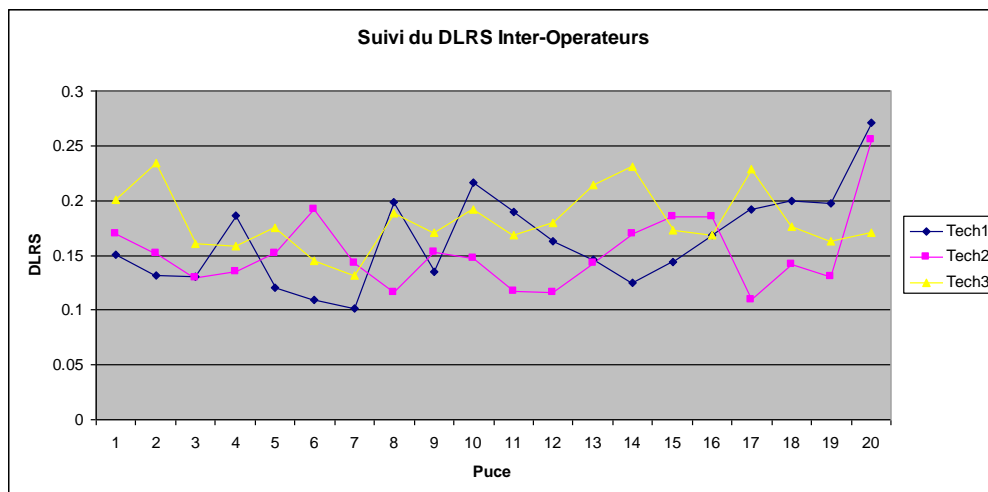
L'exemple ci-dessous est un même échantillon d'ADN traité par deux techniciens différents à 2 jours différents :

Technicien	DLRS	SB Vert	SB Rouge	SI Vert	SI Rouge	BF Vert	BF Rouge	repro vert	repro rouge
1	0.11	227	215	533	679	2.34	3.14	7.88	8.10
2	0.14	209	206	549	647	2.61	3.13	9.27	9.19

L'analyse des CNV par les deux personnes a donné 100% de concordance, résultat confirmé par le rapport de l'EEQ 2015 (rapport des CNV disponible sur le lecteur réseau gene : gene\Lecture\_ACPA\33583).

On a comparé les DLRS obtenus sur 20 puces par 3 techniciens différents (figure 1).

Figure 1 : Une analyse du DLRS sur 20 puces ne montre pas de variabilité significative du DLRS en fonction de l'opérateur qui oscille entre 0.11 et 0.26. Le DLRS est en revanche impacté ponctuellement en fonction de la nature des échantillons analysés.



En conclusion, nous ne décelons pas de variabilité inter-opérateur significative aussi bien au niveau de la technique proprement dite que pour l'analyse des données, ceci à des jours techniques différents.

CQE-ACPA (2011 à 2015) : La formule chromosomique donnée par notre laboratoire est exacte dans 100 % des cas.

L'hybridation des puces a été réalisée du 01/07/2014 au 31/12/2014 2 degrés en dessous de la température recommandée par le fabricant sans aucun impact mesuré sur la qualité moyenne des puces relevées sur une même période en 2015 (figure 4).



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

## Sensibilité et spécificité analytique

1. Etude rétrospective sur la période du 18/12/2014 au 18/05/2015 portant sur 74 patients présentant une anomalie en ACPA que l'on a vérifié par une autre technique :

Nature/taille du CNV	Méthode de vérification	Patients dont le CNV a été confirmé	Patients dont le CNV n'a pas été confirmé
Délétion < 0,4 Mb	Biologie moléculaire	16284-21576 <sub>(2)</sub> - 27434-28102-29076- 29106-29264-29803- 29863 <sub>(2)</sub> -30099 <sub>(2)</sub> - 31445-31610- 31959 <sub>(HMZ)</sub>	27843 <sub>(97 kpb)</sub> ( <i>faux positif déjà suspecté dans le résultat ACPA</i> )
	FISH	φ	φ
Duplication (ou N>3) < 0,4 Mb	Biologie moléculaire	27393-27884-28359- 28752-29253 <sub>(3)</sub> - 30300-30928-31108	30731 <sub>(N&gt;3, 24 kpb)</sub> ( <i>faux positif déjà suspecté dans le résultat ACPA</i> ) 30732 <sub>(88 kpb)</sub>
	FISH	27377	φ
Délétion > 0,4 Mb	Biologie moléculaire	30190-31942	φ
	FISH	22319-27230-27377- 29437-29509-29903- 29904-30732-31122- 31565	φ
Duplication > 0,4 Mb	Biologie moléculaire	22319 <sub>(N=4)</sub> -29585- 30060-30190-30554- 31330-31650-31869- 31942	φ
	FISH	27884-28359-29264- 29863-29872-30732	φ

Conclusions : Sur 57 CNVs décelés, la présence de 54 d'entre eux a bien été confirmée par une autre technique, deux autres étaient proposés comme résultant de biais expérimentaux (données également vérifiées par une autre technique). Un seul CNV sur les 57 détectés en ACPA n'a pas été confirmé : une duplication de 88 kpb.

2. Etude retrospective sur la période du 18/12/2014 au 18/05/2015 sur 7 ADNs de patients ayant une anomalie chromosomique suspectée au caryotype et contrôlée par ACPA :

Témoins positifs (ADN porteurs d'une anomalie chromosomique suspectée au caryotype)

Numéro du Patient	Conclusion caryotype	Résultat ACPA
22589	Trisomie partielle 22q	arr[hg18] 22q11.2q12.3 (19,075,124-30,892,815)x3
22892	47,XY,+mar-ish mar(WCP21-)	arr[hg18] 4p16.3p15.33(7,040-14,840,693)x3, 21p11.2q21.1(9,896,630-19,756,345)x3
23654	46,XX,der(18)?	arr[hg18] 18p11.32p11.2(123,157-14,968,134)x1, 18q21.31q23(53,577,677-76,111,023)x3
25994	Chromosome Y isodicentrique	arr[hg18] Yp11.32q11.221(2,715,688- 16,777,203)x1~2, Yq11.221-11.23(17,073,540- 27,177,529)x0
28331	t(X,Y)	arr[hg18] Yq11.2q11.23(13,208,776-27,069,142)x2
17991	46,XY (2008) 46,XY,del(8q)?	arr[hg18] 8q12.3q21(64,554,401-74,048,647)x1
19374	Délétion 2p25	arr[hg18] 2p24.3p24.1(12,720,093-23,978,891)

Conclusions : l'ensemble des anomalies chromosomiques initialement décelée par caryotype classique ont été confirmées et précisées.

3. Etude rétrospective d'ADN commerciaux contrôles négatifs (16 expérimentations, 7 ADNs masculins, 9 ADNs féminins) sur la période du 01/04/2014 au 01/10/2015.

ADN masculin		ADN féminin	
Localisation (hg19)	type	Localisation (hg19)	type
chr1:196,744,721-196,799,302	complexe (del/dup)	chr2:89,163,862-89,319,978	del
chr2:89,163,862-89,319,978	del	chr3:162,514,534-162,619,141	del(hmz) ou complexe
chr3:162,514,534-162,619,141	del(hmz) ou complexe	chr4:69,375,140-69,483,277	complexe
chr4:69,375,140-69,483,277	complexe	chr8:39,237,438-39,380,654	Del(hmz)
chr8:7,053,186-8,079,920	complexe	chr14:106,342,663-107,214,893	Del(hmz) / del
chr8:39,237,438-39,380,654	Complexe (généralement N=4 copies)	chr15:20,575,646-22,558,756	complexe
chr14:106,342,663-107,214,893	Del(hmz) / del	chr22:23,056,562-23,228,869	Del(hmz)
chr15:20,575,646-22,558,756	complexe		

Conclusions : Seuls les CNV fréquents et appartenant pour la plupart à la catégorie « complexe » sont détectés dans les échantillons témoins. Les témoins commerciaux contrôle négatifs sont donc toujours sortis négatifs.

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

4. Etude rétrospective sur la période du 20/02/2019 au 20/03/2019 portant sur 7 patients présentant une anomalie en ACPA identifiée sur lame Agilent 180K que l'on a vérifié par une autre technique :

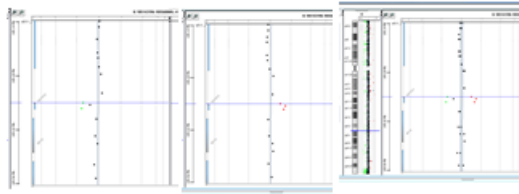
Nature/taille du CNV	Méthode de vérification	Patients dont le CNV a été confirmé	Patients dont le CNV n'a pas été confirmé
Délétion < 0,4 Mb	Biologie moléculaire (MP/LC)	38320-38548	φ
Duplication < 0,4 Mb	Biologie moléculaire	38306-38548	φ
Délétion > 0,4 Mb	Biologie moléculaire : NGS	41915	φ
	Caryotype	40609	φ
Duplication > 0,4 Mb	Biologie moléculaire : MLPA	40960	φ
	Biologie moléculaire : MP/LC	41145	φ

Conclusions : Sur 8 CNVs décelés, la présence de la totalité d'entre eux a bien été confirmée par une autre technique.

## Limite de détection

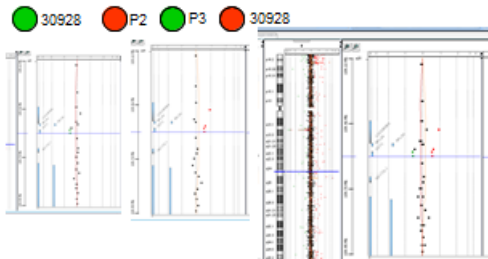
### 1. Seuil de détection des CNVs

La taille de détection actuellement recommandée (conférence de consensus) est de 0,400 Mb, ce qui est très supérieur à la résolution moyenne observée sur les puces 2X105K où l'on est capable de détecter fréquemment des CNV dont la taille avoisine les 30 kb. Par exemple, nous avons mis en évidence deux duplications de 15 kpb et 25 kpb ainsi que deux microdélétions de 31 kpb et 32 kpb qui ont toutes été confirmées par MP/LC. Même dans des conditions de critères de qualité non satisfaisants nous décelons des CNV de 100 kb environ (ex d'une délétion du gène NRXN1 de 100 kb (UNP 16284, DLRS : 0,32). La présence de ce CNV a été confirmée par MP/LC.



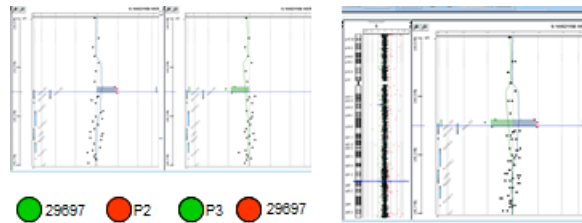
● 28242 ● P2 ● P3 ● 28242

arr[hg19]8q22.3(105,352,043-105,367,203)x3{0,015 Mb}  
DLRS 0,12 / 0,13



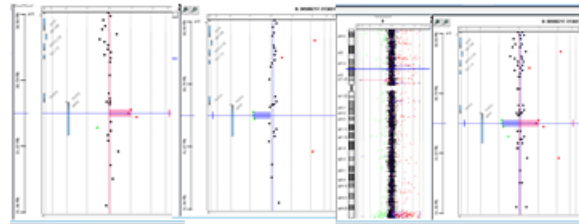
● 30928 ● P2 ● P3 ● 30928

arr[hg19]4q25(109,563,016-109,588,419)x3{0,025 Mb}  
DLRS 0,09/0,11



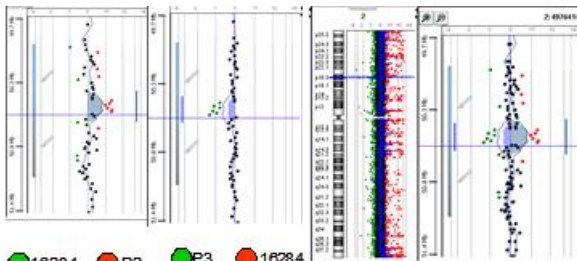
● 29897 ● P2 ● P3 ● 29897

arr[hg19]5q32(145,132,120-145,163,370)x1{0,031 Mb}  
DLRS 0,15 / 0,17



● 29108 ● P2 ● P3 ● 29108

arr[hg19]8p12(30,921,916-30,954,337)x1{0,032 Mb}  
DLRS: 0,15 / 0,16



● 16284 ● P2 ● P3 ● 16284

arr[hg18]2p16.3(50,473,743-50,567,027)x1{0,100 Mb}  
DLRS: 0,32

## 2. Etude de concordance portant sur 5 patients présentant une anomalie en ACPA identifiée sur lame Agilent 105K et contrôlés sur lame Agilent 180K :

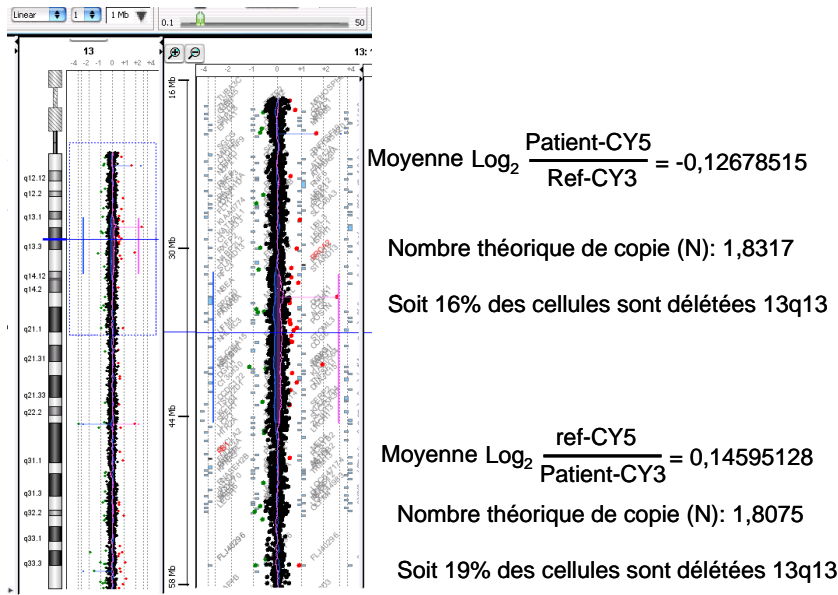
Nous avons comparé des échantillons (UNP numéros 36121, 37357, 37349, 37439 et 39461) qui ont été analysés à l'aide des lames 2x105K et 4x180K. Ces techniques ont été réalisées par la même technicienne afin de limiter un éventuel impact dû uniquement à l'opérateur.

Conclusions : L'ensemble des anomalies chromosomiques détectés par l'ACPA avec la lame Agilent 105K ont été confirmés et précisés par la lame 180K. Du fait de la meilleure résolution obtenue avec les 4x180K, d'autres CNVs non décelés sur une lame 2x105K sont alors détectés (région par exemple qui n'était pas couverte).

De plus le CQE ACPA de l'année 2018 a été réalisé avec succès en utilisant les 4x180K (cf Annexe EEQ), validant l'utilisation de lames 4x180K pour du diagnostic de routine.

### 3. Détection d'une anomalie chromosomique en mosaïque

Patient 24213 : Mise en évidence d'une délétion de 15,3 Mb en mosaïque (les cellules porteuses de l'anomalie sont estimées expérimentalement entre 16% et 19%). En cytogénétique conventionnelle, la mosaïque a été estimée à 11%



Définition d'une mosaïque :  $\frac{(2x+y)}{x+y} = N$

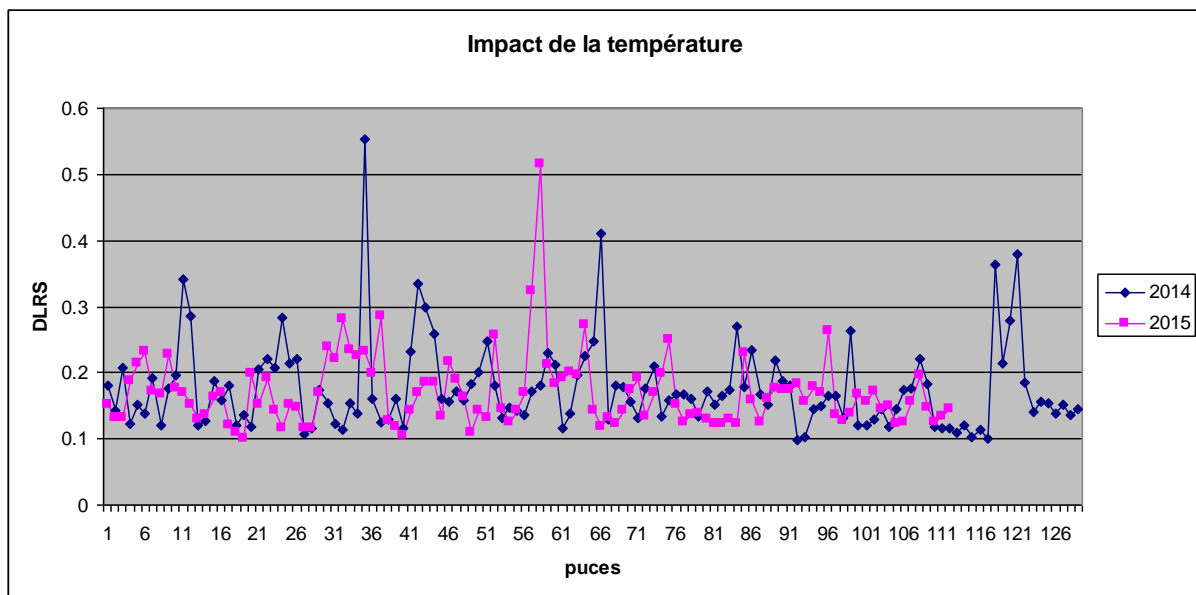
X pourcentage de cellules normales, Y pourcentage de cellules délétées  $x+y=1$

## Robustesse et stabilité des réactifs

### 1. Température d'hybridation

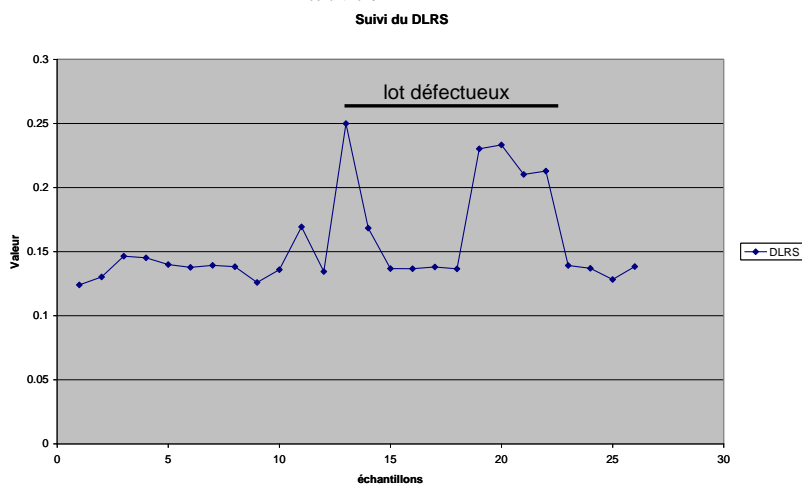
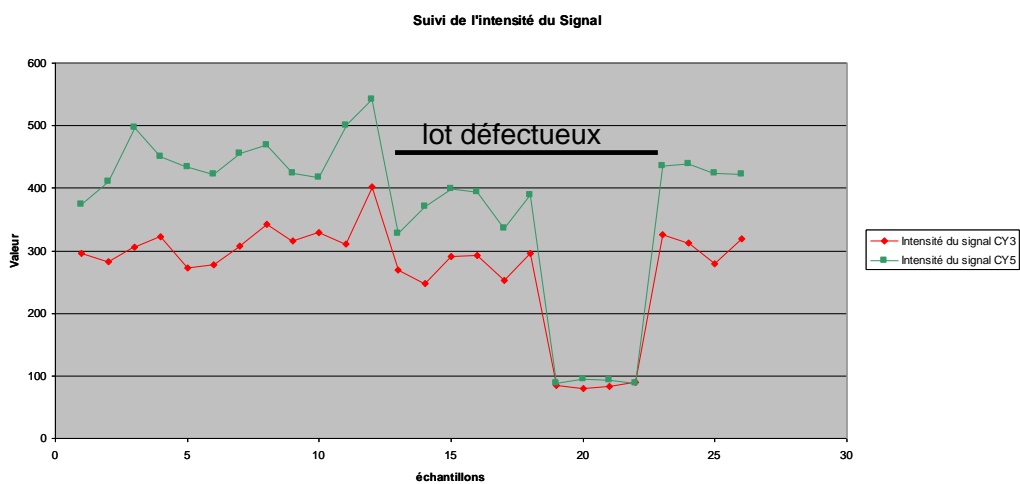
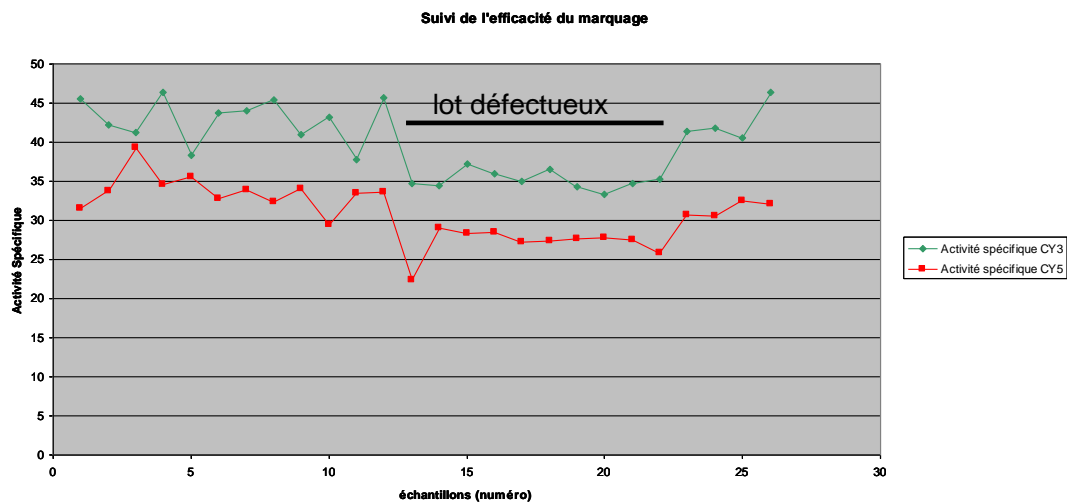
Etude comparative du DLRS sur la période de Juillet à Décembre des années 2014 et 2015. L'année 2014 est réalisée avec une température située 2°C en dessous de la température recommandée par le fabricant.

NB : pour l'année 2015, les données supérieures à 0.3 correspondent à des trios contenant des échantillons pré-nataux de mauvaise qualité



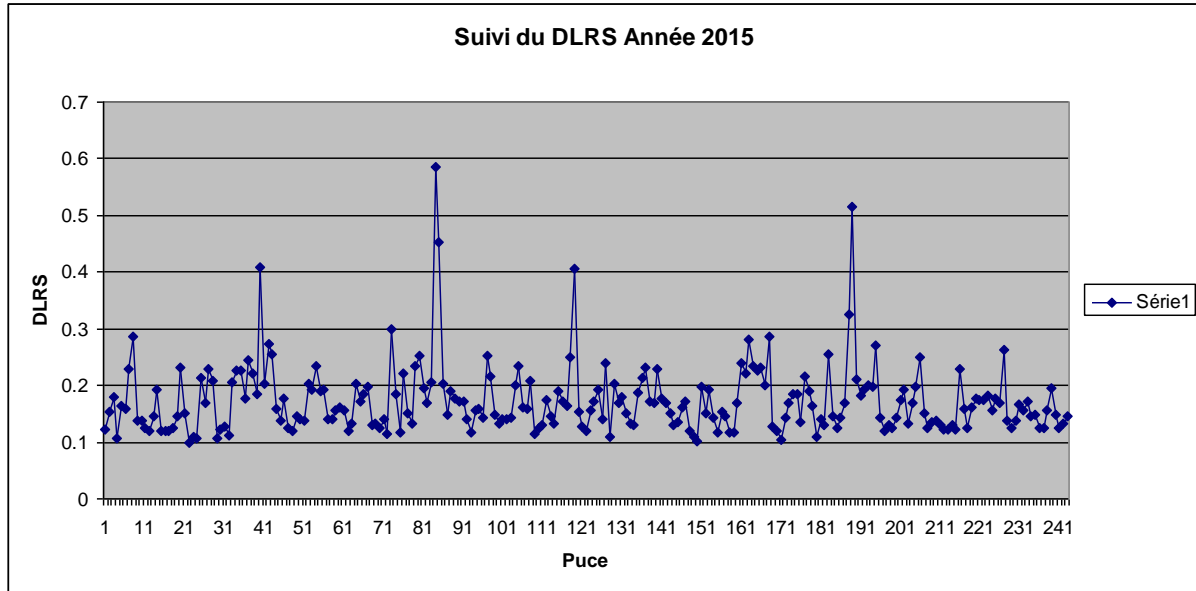
## 2. Efficacité de marquage

Mise en évidence d'un lot de réactif de marquage défectueux par suivi des CQI



### 3. Stabilité des réactifs : suivi du DLRS et du bruit de fond

Suivi du DLRS: le DLRS reste stable et dans l'intervalle souhaité sans dérive significative au cours de l'année 2015. Les données supérieures à 0.3 correspondent à des trios contenant des échantillons pré-nataux de mauvaise qualité.



Suivi du bruit de fond vert et rouge : le bruit de fond reste stable sans dérive significative sur l'année 2015. Les 4 valeurs au-dessus de 10 observées pour le BF-CY3 correspondent à une technique contenant des tissus fœtaux de très mauvaise qualité, avec un marquage CY3 de mauvaise qualité, qui explique le bruit de fond-CY3 élevé. Les valeurs de bruits de fond CY3/CY5 supérieures à 10 au sein d'une même expérimentation (même puce) sont dues à un ADN de mauvaises qualité.

