Date de Création : ***19/08/2013***

Date de la remise à jour : ***21/01/2014***

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **Nom** | **Hôpital** | **Date** |
| Rédacteur(s) | ***Marie-Pierre BUISINE******Groupe de travail ANPGM*** | CHRU Lille | 19/08/2013 |
| Approbateur(s) | **Conseil d’Administration** |  | 26/02/2014 |

**Groupe de travail** : Marie-Pierre Buisine (Lille), Bénédicte Gérard (Strasbourg), Etienne Rouleau (I. Curie, Paris ; groupe InterLOQT), Pascale Saugier-Veber (Rouen), Jérôme Bouligand (AP-HP Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre), Myriam Bronner (Nancy), Catherine Costa (AP-HP Cochin, Paris), Claire-Marie Dhaenens (Lille), Bruno Francou (AP-HP Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre), Mathilde Frétigny (Lyon), Tonio Lovecchio (Lille), Michèle Misrahi (AP-HP Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre), Béatrice Parfait (AP-HP Cochin, Paris), Jean-Pierre Rabès (AP-HP Ambroise Paré, Boulogne), Cécile Saint-Martin (APHP Pitié-Salpêtrière, Paris), Aline Saunier (Nancy), Rosa Vargas-Poussou (AP-HP HEGP, Paris), Marie-Claire Vincent (Montpellier)

**Ce document a été présenté à l’AG de l’ANPGM, le 30 janvier 2014**

**FICHE TYPE QUALITATIF**

Vérification (portée A) / validation (portée B) d’une méthode de biologie médicale

**Référence : SH FORM 44**

|  |
| --- |
| **DESCRIPTION DE LA METHODE** |
| **Analyte/Mesurande:** | Ratios normalisés ou quotients de dosage (DQ) Concerne les gènes / régions suivant(e)s : xxx |
| **Principe de la Mesure :** | Le principe est basé sur la comparaison du profil obtenu pour le patient à ceux de sujets contrôles normaux (et/ou des autres patients à tester). Les données quantitatives générées sont interprétées et les résultats obtenus (DQ) placés dans une série limitée de catégories, typiquement : 2 copies (normal : 1;1), 1 copie (délétion hétérozygote : 1;0), 3 copies (duplication hétérozygote : 1;2), 0 copie (délétion homozygote : 0;0), 4 copies (duplication homozygote : 2;2, ou triplication : 1;3) |
| **Méthode de mesure :** | Comparaison des intensités de fluorescence (aire sous la courbe ou hauteur des pics) des sondes d’intérêt en les normalisant à partir de écarts constatés sur les sondes contrôles afin d’éliminer les biais.Cette comparaison est réalisée via l’utilisation du logiciel xxx / d’une feuille de calcul / macro … |
| **Marquage CE (Oui/Non)** | Non |
| **Codage C.N.Q. (s’il existe) :** | N/A |

|  |
| --- |
| **MISE EN OEUVRE** |
| **Opérateurs (Habilitation) :**  |   |
| **Procédure de validation :** | Faire référence à la Procédure générale concernant la Validation de méthode Faire référence à la Fiche d’instruction : Validation de la méthode MLPA pour la recherche de variation de nombre de copies en génétique constitutionnelle |
| **Procédure de gestion de la portée flexible :** | Faire référence à la Procédure générale : Gestion des portées d’accréditation |
| **Période d'évaluation :** |  |
| **Date de mise en service :** |  |
| **Autorisation par :** |  |

| **MAITRISE DES RISQUES** |
| --- |
| Données d'entrée | Points critiques à maîtriser | Modalités de maîtrise |
| **Type d'échantillon primaire (urine, sang, Type de récipient (tubes, …), Additifs :** | Qualité de l’ADN :- ADN extrait de divers types d’échantillon reçu au laboratoire : sang prélevé sur EDTA, culot cellulaire, tissu, biopsie de trophoblaste, liquide amniotique- ADN reçu extrait par un autre laboratoire | Par ex.- Détermination de la concentration de l’ADN extrait et de sa qualité par analyse au NanoDrop- Vérification de la robustesse de la méthode (ADN extraits de différents types d’échantillons primaires, selon différents modes d’extraction) - Témoins et échantillons à tester extraits par la même méthode, dans la mesure du possible |
| **Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, …) :** | Qualité de la matrice= produit d’amplification  | - Vérification de la qualité des produits de MLPA (intensité de fluorescence, fragments Q et D *(kits MRC-Holland)*, absence d’excédent d’amorces) - Vérification de l’absence de contamination inter-échantillons (blanc sans matrice) ;- Suivi continu des performances cf. dossiers de validation par gène  |
| **Main d'œuvre (habilitation du personnel) : Préciser les références des procédures et enregistrements.** | - Habilitation du personnel technique - Habilitation du personnel médical | - Habilitation : réf.- Habilitation : réf. ; agrément par l’Agence de Biomédecine  |
| **Conditions ambiantes requises (ex : température, organisation des locaux, éclairage,…) :** | - Température adaptée au bon fonctionnement des séquenceurs - Qualité de l’eau pour les séquenceurs *(si issue d’une station d’approvisionnement)*- **Organisation des locaux** pour éviter les contaminations par de l’ADN étranger  | - Contrôle de la température et entretien de la climatisation - Maintenance du système d’approvisionnement en eau et contrôle continu de sa résistivité - Sectorisation des pièces pré- et post-PCR ; autorisation des locaux par l’Agence Régionale de Santé (ARS) ; - Procédure de prévention des contaminations : # réf.; procédure d’entretien des locaux : réf. |
| **Référence du réactif  (référence fournisseur, version) :** | - Coffrets MLPA / TaqADN polymérase- Réactifs pour l’analyse de fragments : standard de taille, formamide, polymère (POP7…) | - Validation des sondes (vérification de leur localisation, de l’absence de SNP fréquent, de leur spécificité) ; suivi des n° de version ;suivi continu des performances :cf. dossiers de validation par gène- Conditions de stockage, suivi des stocks et numéros de lot - Conditions de stockage, suivi des stocks et numéros de lot  |
| **Matériau de références (témoins) :** | - Contrôles internes de la qualité - Contrôles de qualité spécifiques de gènes (CIL/EEQ) | - Procédures de suivi continu de la qualité : cf. dossier de validation initiale de la méthode MLPA ; dossiers de validation par gène - Fiche de suivi des CIQ fragments : # réf.  |
| **Equipements :****Exigences métrologiques\* (définir les paramètres critiques)****Exigences informatiques\* spécifiques** | **Séquenceurs :**- Panne(*le niveau de criticité dépend de l’existence ou non d’autres séquenceurs ou/et de méthodes alternatives n’utilisant pas le séquenceur)*- Température adaptée au bon fonctionnement des séquenceurs - Alimentation électrique - Réseau informatique  *(le niveau de criticité dépend de l’existence ou non d’un serveur d’archivage et de sécurisation des données…)* **Logiciels d’analyse :** - Logiciel X (Genemapper…) :paramétrage**Feuilles de calcul :**- Coffalyseur / feuilles maison | Par ex.- Maintenances préventives hebdomadaires - x autres séquenceurs disponibles en cas de problème sur l’un d’entre eux- Contrôle de la température et entretien de la climatisation  - Equipements sur onduleur- Vérification hebdomadaire de la connexion vers le serveur - Paramétrage défini : # réf.- Feuilles de calculs verrouillées ; contrôle périodique à l’aide d’un jeu de données tests  |

**\* item à renseigner si nécessaire**

*Remarque : La maîtrise des risques peut également être présentée selon la méthode des 5M.*

**EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE**

Remarque : évaluation de deux paramètres supplémentaires jugés comme pertinents : Répétabilité et Fidélité intermédiaire.

*(Remarque : le nombre de données analysables est bien plus élevé que le nombre d’ADN testés ; il correspond au nombre de cibles testées)*

**Répétabilité:**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Echantillons** | **Nombre** (N) | **Moyenne****[[1]](#footnote-1)** | **Ecart-type** | **CV** (%) | **CV** (%) **fournisseur** | **CV** (%) **limite (hors fournisseurs****[[2]](#footnote-2))** | **Conclusion****[[3]](#footnote-3)** |
| Echantillon niveau 1 |  |  |  |  | N/A | N/A |  |
| Echantillon niveau 2 |  |  |  |  | N/A | N/A |  |

**Conclusions :**

**Fidélité intermédiaire :**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Echantillons** | **Nombre** (N) | **Moyenne**1 | **Ecart-type** | **CV** (%) | **CV** (%) **fournisseur** | **CV** (%) **limite (hors fournisseurs**2**)** | **Conclusion**3 |
| Echantillon niveau 1 |  |  |  |  | N/A | N/A |  |
| Echantillon niveau 2 |  |  |  |  | N/A | N/A |  |

**Conclusions :**

|  |
| --- |
| **SPECIFICITE & SENSIBILITE DIAGNOSTIQUES****(indispensable en portée B)** |
| **Résultats de l'étude des courbes ROC à partir d'une étude clinique :** | Courbes ROC : N/A Résultats : 100% de concordance entre génotype observé et génotype attendu des échantillons contrôles testés : * positifs : x/x testés
* négatifs : x/x testés

*(Remarque : le nombre de données analysables est bien plus élevé que le nombre d’ADN testés : n cibles par test)* **Conclusion :****- Sensibilité de la méthode ≥ X% (IC 95%)** **- Spécificité de la méthode ≥ X% (IC 95%)***(X étant fonction du nombre de cibles testées (cf. Mattocks et al, 2010))* |

|  |
| --- |
| **CONTAMINATION** |
| **Inter échantillon pour les paramètres sensibles :** | Vérification expérimentale de l’absence de contamination entre échantillons sur le séquenceur  |
| **Inter réactif si nécessaire :** | N/A |
| **Vérification bibliographique :** | Aucune référence bibliographique identifiée |
| **Vérification sur site :** | Résultat : absence de fragments spécifiques détectés dans les blancs réactifs sans matrice ou les blancs eau**Conclusion : Absence de contamination inter-échantillons ou inter-réactifs** |

|  |
| --- |
| **COMPARAISON DE METHODES**  |
| **Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire :** | N/A : pas de méthode de référence / autre méthode utilisée dans le laboratoire si disponible ?  |
| **Nombre de mesures :** |  |
| **Descriptif de l'échantillon étudié :** |  |
| **Méthode d'exploitation des résultats (études des concordances) :** | Pourcentage de concordance |
| **Résultats et interprétations des discordances :** | 100% de concordance entre les 2 méthodes, dans les limites de la méthode\* |
| **Conclusions et dispositions[[4]](#footnote-4) :** | **Résultats de MLPA conformes**  |

*\*Limites de la méthode MLPA : Les remaniements génomiques ne concernant qu’un amplicon peuvent être à l’origine de faux négatifs (cas des remaniements de petite taille situés en dehors de la région réellement couverte par les amorces/sondes) ; ils peuvent également être à l’origine de faux positifs (cas des mutations ou polymorphismes rares situés sous une sonde).*

|  |
| --- |
| **ROBUSTESSE****(indispensable en portée B)** |
| **Données bibliographiques :** | Aucune référence bibliographique identifiée |
| **Résultats :** | - Analyse d’échantillons variés selon les conditions usuelles (n = x échantillons correspondant à y cibles) (variables : nature de l’échantillon primaire, type d’extraction, concentration d’ADN (# *éléments à évaluer en priorité*), région génomique étudiée, opérateur, thermocycleurs, séquenceur…) Résultats : qualité des profils MLPA satisfaisante et 100% de concordance entre génotype observé et génotype attendu pour l’ensemble des conditions testées, dans les limites de la méthode\*.  |
| **Conclusions et dispositions2 :** | **La méthode de MLPA est robuste dans les conditions d’utilisation, quelle que soit la nature ou le traitement des échantillons analysés** |

|  |
| --- |
| **STABILITE****(indispensable en portée B)** |
| **Données bibliographiques :** | Aucune référence bibliographique identifiée |
| **Résultats :** | * Analyse répétée d’échantillons en début et fin de kit (n = x) / utilisation d’un contrôle identique pour toutes les expériences
* produits de MLPA stockés jusqu’à x jours à -20°C (n = x)

Résultats : qualité des profils MLPA et 100% de concordance entre génotype observé et génotype attendu pour l’ensemble des conditions testées, dans les limites de la méthode\*.  |
| **Conclusions et dispositions2 :** | **Réactifs stables dans les conditions d’utilisation** |

**Commentaires éventuels :**

**La méthode de MLPA est apte à détecter et à identifier les variations de nombre de copies pour l’ensemble des gènes / régions listé(e)s.**

**La méthode est validée.**

**Approbateur** :

1. Nombre de chiffres significatifs [↑](#footnote-ref-1)
2. Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA…). Préciser la référence utilisée. [↑](#footnote-ref-2)
3. Conforme/non conforme [↑](#footnote-ref-3)
4. Le laboratoire précise les dispositions mises en œuvre (par exemple : utilisation **transitoire et documentée** d'un facteur de correction). [↑](#footnote-ref-4)