

# 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](#) et le [compte-rendu](#) de l'examen) :

**Exemple : Séquençage parallèle massif des gènes de xxxxx (référence)**

Note : La référence renvoie dans cet exemple à un document de version du panel, décrivant : modalités de design, définition de la cible diagnostique, épidémiologie mutationnelle de la cible, couverture de la cible dans les conditions de production (multiplexage & capacité de séquençage définis)...

Processus simple  ; Processus complexe  Nombre de sous-processus :

Exemple de justifications :

L'analyse de régions d'intérêt au sein d'ADN génomiques par Séquençage Parallèle Massif (ou Séquençage de Nouvelle Génération NGS) repose sur un processus analytique modulaire :

1. Extraction d'ADN génomique
2. Préparation des bibliothèques d'ADN
3. Enrichissement des bibliothèques
4. Séquençage parallèle massif, proprement dit
5. Analyse bioinformatique

L'option prise dans le présent dossier de validation est d'assimiler les étapes 2 à 5 à un processus simple sur la base des arguments suivants :

- Le séquençage parallèle massif est un test qualitatif, basé sur des données quantitatives (Mattocks *et al*, 2010). Les données quantitatives sont représentées par des métriques intermédiaires et terminales. Les données qualitatives sont quant à elles terminales.
- Les métriques intermédiaires, fournies par chaque sous-processus, sont plus exploitées à titre de contrôles qualité (*quality contrôle* : QC) dans le cadre du suivi continu de la qualité (*quality assurance* : QA), que dans celui de l'évaluation des performances de l'examen proprement dites.
- Les performances de l'examen sont évaluées à partir de métriques terminales:
  - quantitatives : nombre total de variant, ratio SNV/indels, ratio Ti/Tv, nombre de lectures alignées par échantillon, profondeur moyenne/médiane sur l'intervalle diagnostique, couverture à un seuil de profondeur donné, pourcentage de duplicats, etc.
  - qualitatives : vrai/faux positifs/négatifs dont sont dérivées les valeurs de sensibilité et VPP analytiques notamment

Sont liés à ce dossier les documents suivants :

- Validation des méthodes d'extraction d'acides nucléiques (référence)
- Qualifications des matériels utilisés (références)
- Qualification des solutions bioinformatiques (référence)
- Analyse des risques analytiques (référence)
- Description du panel / dossier de version du panel (références)

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

- Description des échantillons étalons (référence)

### Définitions :

**Indels :** sont entendues par indels dans le présent dossier : insertions, délétion, duplications de petite taille (préciser la taille maximum) ou combinaisons de ces évènements

**VAF :** *Variant Allele Fraction*, fraction allélique de l'allèle alternatif

**Cible diagnostique :** intervalle génomique effectif (fichier .bed) sur lesquels seront rapportés les variants dans le compte-rendu final de l'analyse

Etc.

### DESCRIPTION DU PROCESSUS

Éléments à vérifier : **il est possible de se limiter aux items qualitatifs (voir note au bas de la page). Néanmoins, la méthode étant basée sur des données quantitatives, le présent dossier et le plan expérimental qui l'accompagne proposent aux laboratoires qui le souhaitent une stratégie pour aborder chacun des items.**

#### Modalités de vérification/validation<sup>1</sup> :

- 1. Répétabilité (essai)
- 2. Fidélité intermédiaire (essai)
- 3. Variabilité inter-opérateurs (essai)
- 4. Justesse (essai)
- 5. Exactitude (essai)
- 6. Sensibilité et spécificité analytique (essai)
- 7. Incertitudes (bibliographie/essai)
- 8. Limite de détection (essai)
- 9. Comparaison de méthodes (essai)
- 10. Interférences (bibliographie)
- 11. Contamination (essai)
- 12. Robustesse et fiabilité des réactifs (essai)
- 13. Intervalle de référence (essai)

<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

### PROCESSUS SIMPLE :

*Exemple : Détection de variants constitutionnels (SNV, indels) par capture (SeqCap EZ Roche), séquençage parallèle massif (NextSeq 500, Illumina) et analyse bioinformatique interne/externalisée (préciser le fournisseur)*

Portée A  ; Portée B  (à justifier)

Portée B : préciser les éléments de la méthode ayant fait l'objet d'adaptation et/ou de développement

Portée A si offre « bundle » CE-IVD (par exemple)

### DESCRIPTION DE LA METHODE : Exemple

<b>Mesurande :</b>	Variants génomiques : <ul style="list-style-type: none"> <li>Type : SNV, etc.</li> <li>Zygotie : homozygote, hétérozygote, hémizygote.</li> </ul>
<b>Principe de la Méthode :</b>	Enrichissement par capture SeqCap EZ Roche et séquençage parallèle massif (NextSeq 500, Illumina) : voir description détaillée reportée ci-après
<b>Matériel d'entrée du processus</b>	ADN génomique
<b>Type de récipient, additifs :</b>	Tube Eppendorf sec
<b>Prétraitement de l'échantillon :</b>	Dilution à 50ng/µl dans Low TE 1x
<b>Unités :</b>	NA : résultats qualitatifs (voir mesurandes)
<b>Critères d'interprétation<sup>2</sup> :</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>profondeur sur position variante</li> <li>fraction allélique du variant (ou VAF)</li> <li>visualisation du Bam le cas échéant (ex : Indels)</li> </ul>
<b>Marquage CE (Oui/Non) :</b>	Marquage CE (Oui/Non)
<b>Codage C.N.Q. (s'il existe) :</b>	NA
<b>Equipement (instrument, analyseur, etc.) :</b>	xxx xxx ...
<b>Référence du réactif :</b>	xxx xxx ...
<b>Matériau d'étalonnage (références) :</b>	Raccordement thermocycleurs Raccordement pipettes Raccordement enceintes Etalon pour dosage sur Qubit Phi X ...
<b>Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :</b>	NA

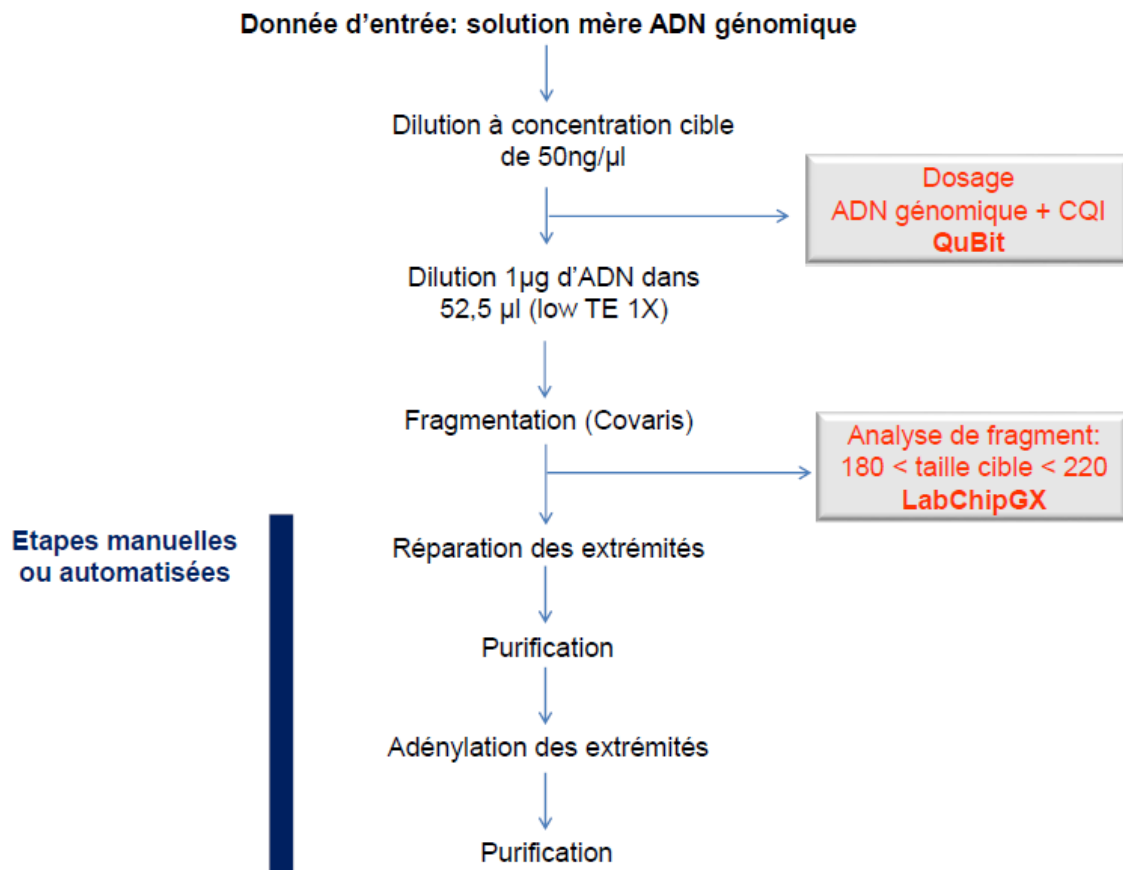
<sup>2</sup> Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge...

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

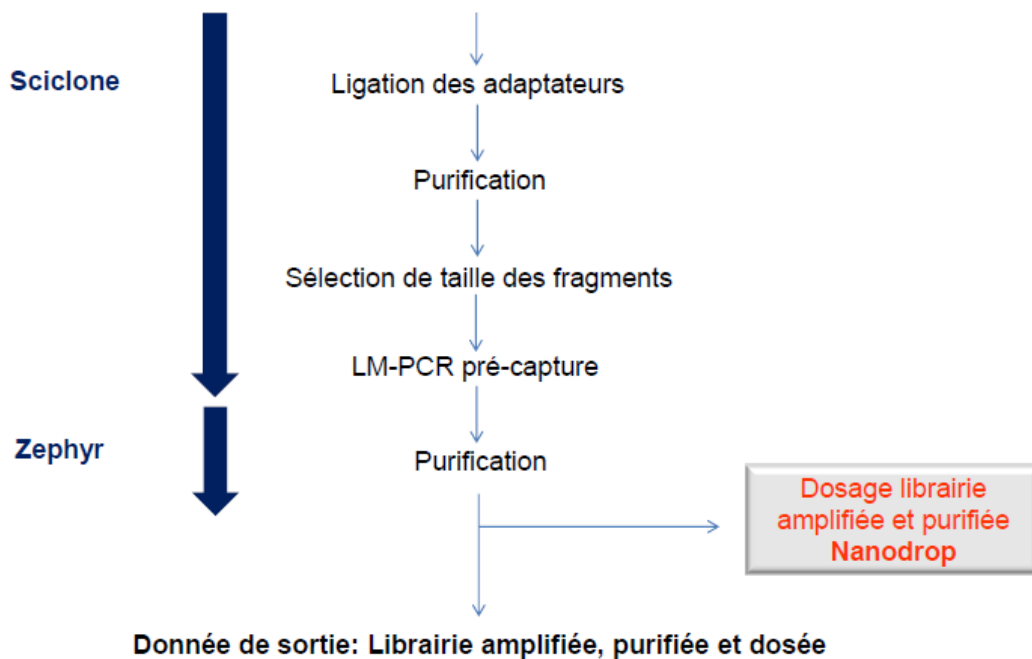
## PRINCIPE DE LA METHODE : Exemple

La phase technique (ou 'wet lab') comporte plusieurs étapes (préparation des librairies, enrichissement par capture, puis préparation de la matrice de séquençage et séquençage parallèle massif). Chaque phase est décrite ci-après avec données d'entrée et de sortie, ainsi que contrôles qualités intermédiaires. La phase bioinformatique est décrite dans le dossier de qualification correspondant (référence).

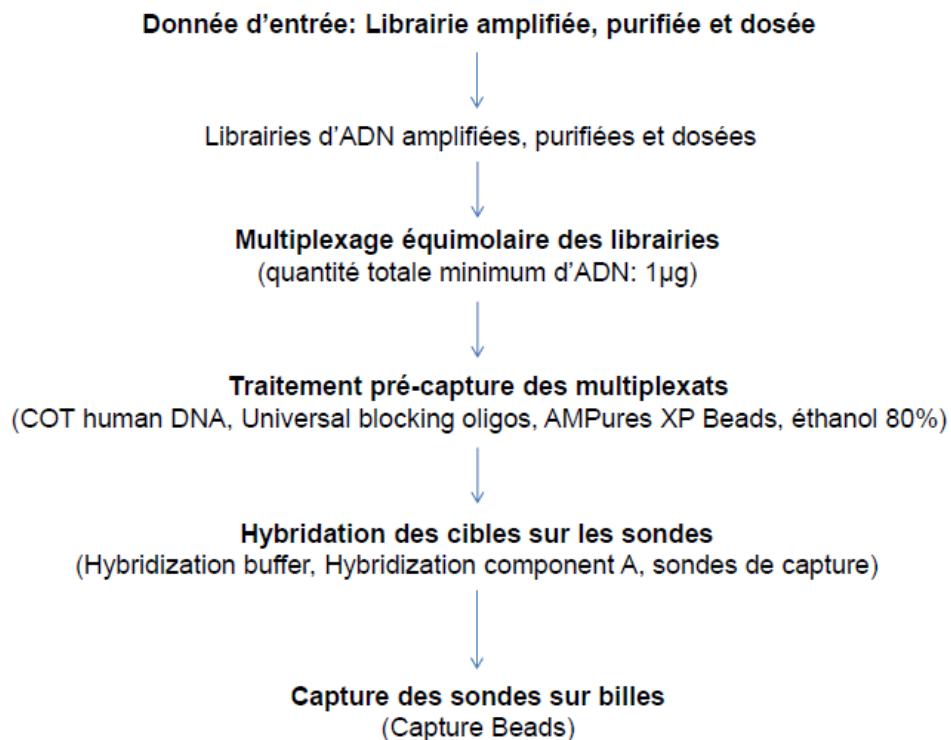
### Préparation des librairies



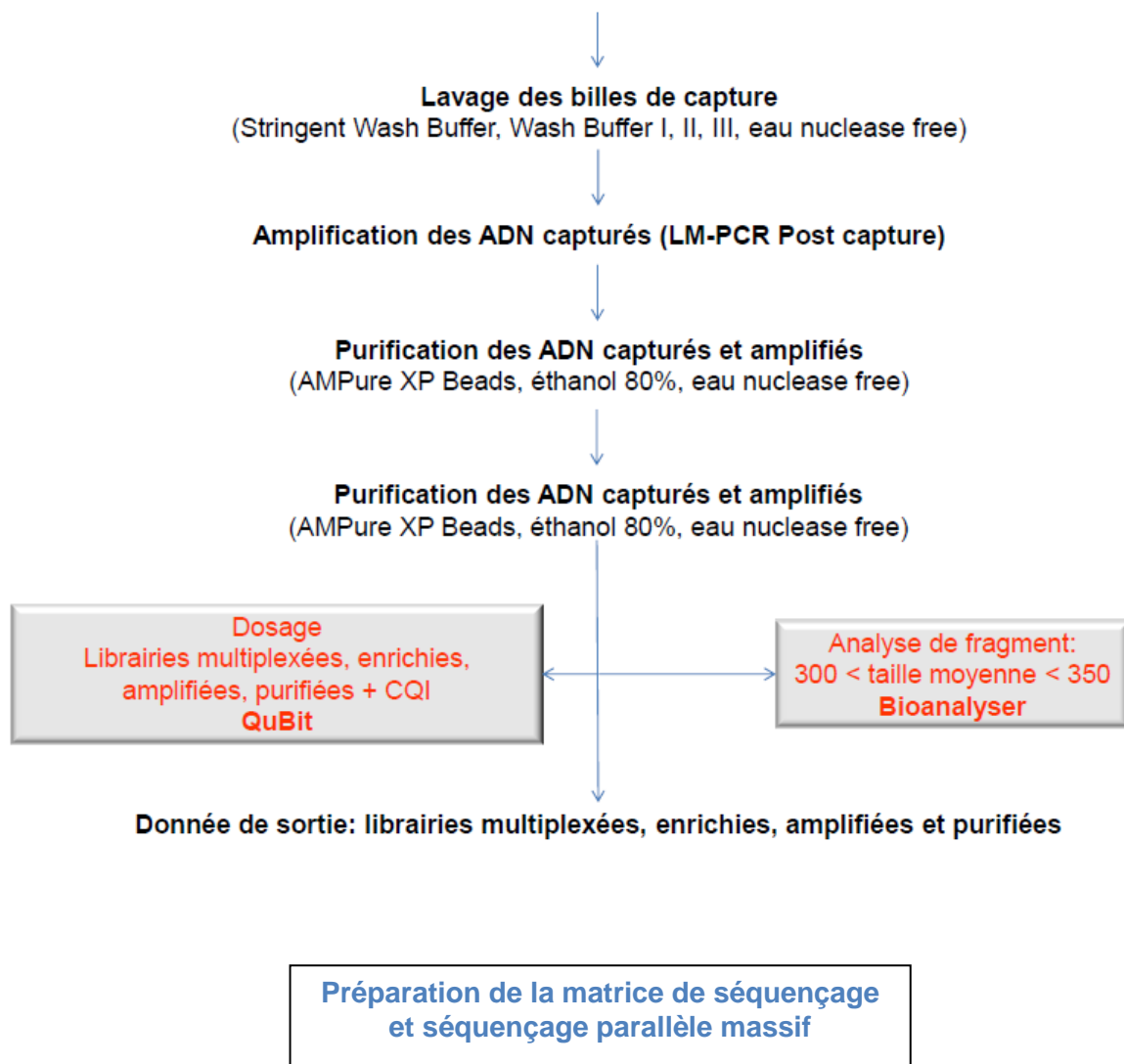
# Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale



## Enrichissement des librairies par capture



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



La méthode de séquençage parallèle massif utilisée sur les machines ILLUMINA® repose sur le principe d'élongation par terminaison réversible (ou séquençage par synthèse : Sequencing By Synthesis, SBS).

Brièvement, la quantité d'ADN engagée (en pM) dans la réaction de séquençage est déterminée après qualification et quantification des fragments d'ADN de sorte à atteindre la densité de cluster recommandée pour le bon fonctionnement du système. La librairie dénaturée est dispersée par le système fluïdique de la machine à l'intérieur de la Flow Cell où se dérouleront l'hybridation de la librairie, l'amplification clonale sur support solide (amplification par pont, ou 'bridge amplification'), puis le séquençage par synthèse (SBS). Un cycle de séquençage est caractérisé par l'apport des quatre nucléotides, leur incorporation et l'acquisition des signaux de fluorescence (au moyen de 4 longueurs d'onde pour un MiSeq, 2 pour un NextSeq 500). Le nombre de cycle détermine la taille des lectures (exemple : 300 cycles : lecture de 2x150 bases en 'paired-end'). Le logiciel RTA (embarqué sur le système) extrait en temps réels les intensités des images, définit les bases ('base calling'), et associe un score de qualité à chaque base (Phred-score), avec pour fichier de sortie le BCL (ce dernier peut être directement transformé en fichier FASTQ sur le MiSeq). RTA effectue également l'alignement du PhiX (control interne facultatif) et élabore des rapports de qualité dans les fichiers InterOp.

Les fichiers RunInfo.xml, RunParameters.xml et InterOp sont utilisés par le logiciel SAV pour générer les métriques de qualité du run de séquençage.

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

## MISE EN ŒUVRE

Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :	Techniciens : Ingénieurs : Biologistes :
Procédure de validation/mode opératoire :	référence et version de la procédure utilisée
Procédure de gestion de la portée flexible :	référence et version de la procédure utilisée
Période d'étude :	Préciser Du : xx/xx/xx au xx/Xx/xx (période d'étude, données rétrospectives comprises)
Date de 1 <sup>ère</sup> utilisation :	Préciser xx/xx/xx

## MAITRISE DES RISQUES

L'analyse des risques est traitée en annexe de ce dossier (référence)

## EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

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

[Voir description des échantillons étalon \(référence\)](#)

### REPETABILITE

Applicable  ; non applicable (à justifier)

Exemple : préparation des librairies de manière automatisée (Sciclone® - Zephyr®) ou de manière manuelle en mode dégradé. Un essai de répétabilité est effectué pour chacune de ces conditions.

#### Méthodologie :

- les essais sont réalisés dans les conditions suivantes : même opérateur, mêmes lots de réactifs, mêmes instruments, même série (capture identique, même run de séquençage et d'analyse bioinformatique)
- Echantillon étalon technique en triplicata depuis l'étape de fragmentation

Critères d'évaluation : la répétabilité est évaluée sur les métriques de l'échantillon ainsi que sur la capacité du test à détecter les variants sélectionnés à la VAF attendue

Critères de validation : [à préciser](#)

Date et référence des essais :

Note : la liste des métriques est indicative

Préparation de librairie manuelle

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

Métriques de l'échantillon étalon		Réplica1	Réplica2	Réplica3	Conclusion
Nombre total de variants					
Nombre total de SNV					
Nombre total d'Indels (<xxpb)					
Ratio SNV/indels					
Nombre total de variants hétérozygotes					
Nombre total de variants homozygotes					
Ratio transition/transversion (Ti/Tv)					
Nombre total de lectures alignées					
Pourcentage de bases hors cible					
profondeur moyenne/médiane sur cible diagnostique,					
couverture sur cible diagnostique au seuil de profondeur retenu					
pourcentage de duplicats					
Liste des variants confirmés ou à haute confiance (intérêt notamment pour les variants à faible VAF en somatique)	VAF théorique	Réplica1	Réplica2	Réplica3	Conclusion
Variant 1 : exemple	50%	48%; 200x	52%; 188x	47%; 235x	Conforme
Variant 2					
Variant 3					
....	...				

Argumentaire de la conclusion :

Préparation de librairie automatisée



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

Métriques de l'échantillon étalon		Réplica1	Réplica2	Réplica3	Conclusion
Nombre total de variants					
Nombre total de SNV					
Nombre total d'Indels (<xxpb)					
Ratio SNV/indels					
Nombre total de variants hétérozygotes					
Nombre total de variants homozygotes					
Ratio transition/transversion (Ti/Tv)					
Nombre total de lectures alignées					
Pourcentage de bases hors cible					
profondeur moyenne/médiane sur cible diagnostique,					
couverture sur cible diagnostique au seuil de profondeur retenu					
pourcentage de duplicats					
Liste des variants confirmés ou à haute confiance	VAF théorique	Réplica1	Réplica2	Réplica3	Conclusion
Variant 1					
Variant 2					
Variant 3					
....	...				

Argumentaire de la conclusion :

**FIDELITE INTERMEDIAIRE**  
Applicable  ; non applicable (à justifier)

L'essai de fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire) est réalisé en faisant varier les conditions suivantes :

- l'opérateur : voir *variabilité inter-opérateur*
- le temps, les lots de réactif : voir *robustesse et stabilité des réactifs*

**Note :** attention à l'équivocité de certaines notions, au 9.6.2.2 du SH GTA 04, la notion de « fidélité » réfère au calcul de la valeur prédictive positive.

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

### VARIABILITE INTER-OPERATEURS

Applicable  ; non applicable

Exemple : préparation des librairies de manière automatisée (Sciclone® - Zephyr®) ou de manière manuelle en mode dégradé.

#### Méthodologie :

- La variabilité inter-opérateur est évaluée pour la méthode manuelle, mais également pour la méthode automatisée dans la mesure où l'automatisation ne porte que sur quelques étapes seulement de la phase technique (voir description de la méthode). Les étapes manuelles résiduelles peuvent être sujettes à variabilité inter-opérateur (selon analyse des risques analytiques).
- Conditions fixées : mêmes lots de réactifs, mêmes appareils et automates, même run de séquençage et d'analyse bioinformatique

Critères d'évaluation et de validation : voir essai de répétabilité

Dates et références des essais :

Préparation de librairie manuelle				
Métriques de l'échantillon étalon	Opérateur 1	Opérateur 2	...	Conclusion
Nombre total de variants				
Nombre total de SNV				
Nombre total d'Indels (<xxpb)				
Ratio SNV/indels				
Nombre total de variants hétérozygotes				
Nombre total de variants homozygotes				
Ratio transition/transversion (Ti/Tv)				
Nombre total de lectures alignées				
Pourcentage de bases hors cible				
profondeur moyenne/médiane sur cible diagnostique				
couverture sur cible diagnostique au seuil de profondeur retenu				
pourcentage de duplicats				

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

Liste des variants confirmés ou à haute confiance	VAF théorique	Réplica1	Réplica2	Réplica3	Conclusion
Variant 1					
Variant 2					
Variant 3					
....	...				

Argumentaire de la conclusion :

Préparation de librairie automatisée					
Métriques de l'échantillon étalon	Opérateur 1	Opérateur 2	...	Conclusion	
Nombre total de variants					
Nombre total de SNV					
Nombre total d'Indels (<xxpb)					
Ratio SNV/indels					
Nombre total de variants hétérozygotes					
Nombre total de variants homozygotes					
Ratio transition/transversion (Ti/Tv)					
Nombre total de lectures alignées					
Pourcentage de bases hors cible					
profondeur moyenne/médiane sur cible diagnostique					
couverture sur cible diagnostique au seuil de profondeur retenu					
pourcentage de duplicats					
Liste des variants confirmés ou à haute confiance	VAF théorique	Réplica1	Réplica2	Réplica3	Conclusion
Variant 1					
Variant 2					
Variant 3					
....					

Argumentaire de la conclusion :

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

**JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés)**  
Applicable  ; non applicable (à justifier)

**Méthodologie :** Ci-après, l'échantillon « CQI AAA » désigne un échantillon externalisé, i.e. ayant fait l'objet d'une comparaison interlaboratoire (voir échantillons étalons: référence). Les variants compris sur un intervalle génomique commun aux laboratoires partenaires sont exploités.

**Critères d'évaluation :** extraction des métriques sur l'intervalle diagnostique commun aux laboratoires

**Critères de validation :** taux de concordance à préciser et analyse approfondie des discordances

**Dates et références des essais :**

**Note 1 :** attention à l'équivocité de certaines notions : au 9.6.2.2 du SH GTA 04, la notion de « justesse » renvoie à celle d'« overall accuracy ». La notion de valeur vraie étant parfois difficile à établir en génomique, la section justesse du présent dossier correspond à une comparaison interlaboratoire conduite à partir d'un CIQ externalisé lorsque cela est possible. La justesse (au sens 'overall accuracy') est estimée dans la section sensibilité et spécificité analytique.

**Note 2 :** la liste des métriques est indicative

Métriques	CQI AAA LBMMS	CQI AAA LBM partenaire	Conclusion
Nombre total de variants			
Nombre de SNVs			
Nombre d'indels			
Nombre de variants non-sens			
Nombre de variants hétérozygotes			
Nombre de variants homozygotes			
Ratio Ti/Tv			
Nombre total de variants de VAF < 20%			
Nombre total de variants multi-alléliques			
Variant pathogène contrôle			

Argumentaire de la conclusion :

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

**EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ)**  
Contrôles quantitatifs  ; Contrôles qualitatifs

EEQ (voir échantillons étalons : références)

Note : en règle, une EEQ NGS est le plus souvent réalisable. Cas particulier : panels contenant très peu de gènes, contenant eux même très peu de positions polymorphes. Dans ce cas, des comparaisons interlaboratoires répétées (à partir d'échantillons contenant des variants d'intérêt) peuvent représenter un équivalent-EEQ, en ligne avec le 5.6.3.2 de la norme NF EN ISO 15189.

Année	Référence échantillon	Date et référence essai	VP	FP	FN	Sensibilité analytique et VPP	Note / Conclusion
...							
2017							
2018							

Argumentaire de la conclusion :

**SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE**  
(étude expérimentale indispensable en portée B)  
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A)  
Applicable  ; non applicable (à justifier)

**Méthodologie :**

- La sensibilité analytique ne peut faire l'objet que d'une estimation par échantillonnage sur l'ensemble des positions génomiques de l'intervalle diagnostique.
- La capacité du test à détecter des variations ne requiert aucune hypothèse préalable quant au caractère pathogène ou non de ces variations. Peuvent donc être exploitées dans cette évaluation à la fois des variants pathogènes et non pathogènes.
- Données de référence : exemple : étalon type NA12878 ou autres, échantillons antérieurement séquencés en Sanger... (voir échantillons étalon : référence)

**Critères d'évaluation :**

- VP: position variante identique dans les 2 jeux de données
- VN: position non variante identique dans les 2 jeux de données
- FN: variant présent dans jeu de référence, absent dans le jeu obtenu
- FP: variant absent dans jeu de référence, présent dans le jeu obtenu
- Sensibilité analytique : % de positions variantes correctement identifiées =  $VP/(VP+FN)$
- Valeur prédictive positive analytique : % de positions variantes correctement identifiées parmi toutes les positions variantes =  $VP/(VP+FP)$
- Justesse : % de bases (variantes ou non) correctement identifiées, parmi toutes les positions =  $(VP+VN)/(VP+VN+FP+FN)$

**Critères de validation:** à préciser

**Dates et références des essais :**

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

**Note 1 :**

- sensibilité analytique = 'analytic sensitivity' or 'positive percentage agreement' or 'recall'
- valeur prédictive positive = 'precision' or 'analytical positive predictive value'
- justesse = 'overall percentage accuracy' or 'overall percentage agreement'

**Note 2 :** l'estimation de la spécificité peut être problématique ou d'un moindre intérêt (voir Roy *et al*, 2018, p24)

	VP	VN	FN	FP	Sensibilité VPP Justesse	Conclusion
NA12878						
Autre...						

Argumentaire de la conclusion :

**INCERTITUDE DE MESURE** (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) :  
**Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle)  ; calcul**

L'incertitude de mesure est liée aux éléments de variabilité du processus.

Son analyse repose sur l'inventaire de tous les facteurs susceptibles d'influencer le résultat, ainsi que sur la pondération de ces facteurs (influence jugée significative ou non).

En séquençage parallèle massif, l'incertitude de mesure renvoie à tout paramètre du processus analytique susceptible d'entraîner :

- la non-détection d'un variant présent dans l'échantillon biologique (faux-négatif)
- la détection d'un variant non-présent dans l'échantillon (faux-positif).

Ces paramètres sont multiples, dans la phase technique comme la phase bioinformatique (voir analyse des risques : référence)

Leur influence peut être considérée comme maîtrisée lorsque le nombre minimal de lectures supportant un variant au sein de l'intervalle diagnostique est défini au-dessus d'un seuil intégrant cette incertitude (voir document de qualification bioinformatique et document de version du panel : références)

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

La limite de détection (« *limit of detection : LOD* », voir Roy *et al*, 2018, p14) recouvre deux paramètres indissociables :

- la profondeur minimale à une position variante
- la fraction allélique alternative (ou VAF) minimale

En découle le nombre minimal de lectures par lesquelles un allèle variant est soutenu (voir document de qualification bioinformatique et document de version du panel : références)

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

Note : A l'usage, la limite de détection est plutôt utilisée comme une limite de validation (i.e. : nombre minimal de lectures sur variant, au-dessus duquel un niveau de sensibilité est garanti). En pratique, elle correspond aux seuils (profondeur sur variant et VAF minimales) déclarés dans le compte-rendu d'examen.

Limite de détection :

Valeur retenue et/ou références bibliographiques

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

« Le laboratoire pourra comparer les résultats d'une méthode en cours de vérification, soit à la méthode précédemment utilisée, soit à la méthode automatisée » (SH GTA 04, § 9.6.2.5)

La comparaison entre préparation de librairie manuelle et automatisée est traitée dans la section *robustesse*.

La comparaison à la méthode précédemment utilisée est traitée ci-dessous.

**Méthodologie (exemples):**

- reséquençage d'échantillons séquencés en Sanger ou par méthode NGS antérieure (ou par toute autre méthode antérieure : MLPA, ACPA, etc.)
- exploitation des séquences Sanger produites pour la confirmation des variants détectés en NGS
- exploitation des données bibliographiques si disponibles
- en cas CIL organisée entre plusieurs LBM utilisant des méthodes différentes: exploitation des résultats collectifs.

**Critères d'évaluation :** taux de concordance et analyse approfondie des discordances

**Critères de validation:** à préciser

**Dates et références des essais :**

Note 1 : utiliser l'intégralité des séquences Sanger pour extraire positions variantes et non variantes

**Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :**

Références méthodes

		Méthode A (séquençage Sanger ou méthode NGS antérieure par exemple)	
		+	-
Méthode NGS testée	+		
	-		

Concordance :

Analyse des discordances :

Argumentaire de la conclusion :

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

**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)

Les mesurandes terminaux de l'examen sont de nature qualitative.

La limite de quantification et la limite supérieure de linéarité son non applicables

Se reporter au paragraphe *limite de détection*, pour la profondeur minimale sur base et la VAF minimale

**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)

Analyse des interférences décrites dans la notice fournisseur ou la littérature

**CONTAMINATION** (étude expérimentale indispensable en portée B)  
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles)  
Applicable  ; non applicable (à justifier)

## Notes générales :

La contamination correspond à la fraction de variants d'un échantillon attribuable à un autre échantillon.

Les étapes critiques en termes de contamination sont celles situées en amont de la fixation des index aux fragments d'ADN (voir document Maitrise des risques en Annexe).

Des contaminations ultérieures sont possibles (phénomène de saut d'index notamment en technologie SBS), mais leur contribution demeure non-significative dans le cadre d'un examen de génétique constitutionnelle (contaminations cumulées par saut d'index au cours d'un même run <2-3%).

Les contaminations inter-run de séquençage en technologie SBS sont réputées négligeables et peuvent être évaluées le cas échéant par rotation des index.

**Méthodologie** (plusieurs méthodes sont possibles et non exclusives):

- **Essais techniques :**
  - Echantillon dépourvu d'ADN : 'Blanc d'essai'. Cette méthode peut être soumise à certaines limitations techniques (exemple : équilibrage des libraires en pré-séquençage SBS)
  - Essai de contamination technique d'un CQI par un ADN tiers (exemple : à 5%, 10%, 15%) : évaluation de la capacité de détection d'une contamination de cet ordre dans les conditions analytiques définies en routine
  - Les variants double-techniqués en vue de l'identité-vigilance peuvent rétrospectivement permettre d'évaluer le risque d'échange et de contamination inter-échantillon au cours de la méthode



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

- ...
- **Essais bioinformatiques :**
  - Etude rétrospective (si reprise de donnée possible) ou prospective de l'adéquation du sexe (sexe enregistré vs sexe génotypé)
  - Etude rétrospective (si reprise de donnée possible) ou prospective du CQI : métriques relatives aux variants (à préciser, exemple : suivi de variants homozygotes, etc.)
  - Nombre de variants rares partagés (préciser critères de sélection des variants, matrice de comparaison des échantillons et limitations)
  - Analyse de distribution des VAF / échantillon : détection d'un enrichissement anormal des variants à faible VAF (préciser seuil d'enrichissement 'alerte' et bin de VAF)
  - ...

Critères d'interprétation et de validation: à préciser

Dates et références des essais :

**Note relative aux variants homozygotes :** Les allèles alternatifs à l'état homozygote peuvent être exploités pour estimer la contamination inter-échantillons et/ou le bruit de fond de la méthode.

Exemple :

- rs2292597, Ancestral: C ; MAF: 0.45 (T)
- Echantillon analysé : Chr4(GRCh37):g.119237348C>T ; homozygote
- Nombre total de lectures à cette position = 1291 ; (C): 3 lectures ; (T) : 1284 lectures ; autre bases (A/G) : 4 lectures
- Bruit de fond : 4/1291 (0.3%)
- Contamination et/ou bruit de fond : 3/1291 (0.23%)

Argumentaire de la conclusion :

**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)

**Méthodologie :** peuvent être testés selon l'analyse des risques, à partir d'un CQI :

- le temps : même opérateur, même méthode, mêmes lots de réactif, même multiplexage, à deux dates différentes
- les lots de réactifs : même opérateur, même méthode, même multiplexage, selon deux lots de réactifs différents (prioriser si besoin selon analyse des risques et notices fournisseurs)
- Les automates utilisés en miroir : même opérateur, même méthode, mêmes lots de réactif, même multiplexage, sur appareils concernés
- Les types d'échantillons primaires (sang, salive, tissus...) et technique d'extraction (manuelles automatisées)
- Des variants difficiles à détecter si non réalisé dans le cadre de l'étude de sensibilité
- ...

Critères d'évaluation : taux de concordance et analyse approfondie des discordances

Critères de validation: à préciser

Dates et références des essais :

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

Impact du temps					
Date et référence de l'essai	Nombre de positions concordantes	Nombre de positions discordantes	Variant pathogène	....	Conclusion
Impact des lots de réactifs					
Date de l'essai et référence des lots	Nombre de positions concordantes	Nombre de positions discordantes	Variant pathogène	....	Conclusion
Impact des automates de séquençage					
Date de l'essai et référence l'automate	Nombre de positions concordantes	Nombre de positions discordantes	Variant pathogène	....	Conclusion
Nextseq500_1					
Nextseq500_2					
...					
...					

Argumentaire de la conclusion :

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

Les variations de l'intervalle de référence et/ou valeurs seuils sont établies en fonction de la nature de la matrice, des caractéristiques du patient (âge, sexe, poids, ethnie, etc.) et adaptées à l'usage des résultats par les cliniciens en pratique courante. (voir 9.6.29 SH-GTA 04)

A l'étape analytique, ces paramètres susmentionnés ne sont pas pertinents. En revanche, l'intervalle de référence peut se rapporter aux paramètres quantitatifs d'annotation des variants : seuils de VAF utilisés pour définir la zygotie (voir dossier de qualification bioinformatique : référence)

Exemple : la définition de la zygotie peut être effectuée par GATK HaplotypeCaller sur la base d'un calcul de vraisemblance.

	<b>Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale</b>	
--	---	--

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