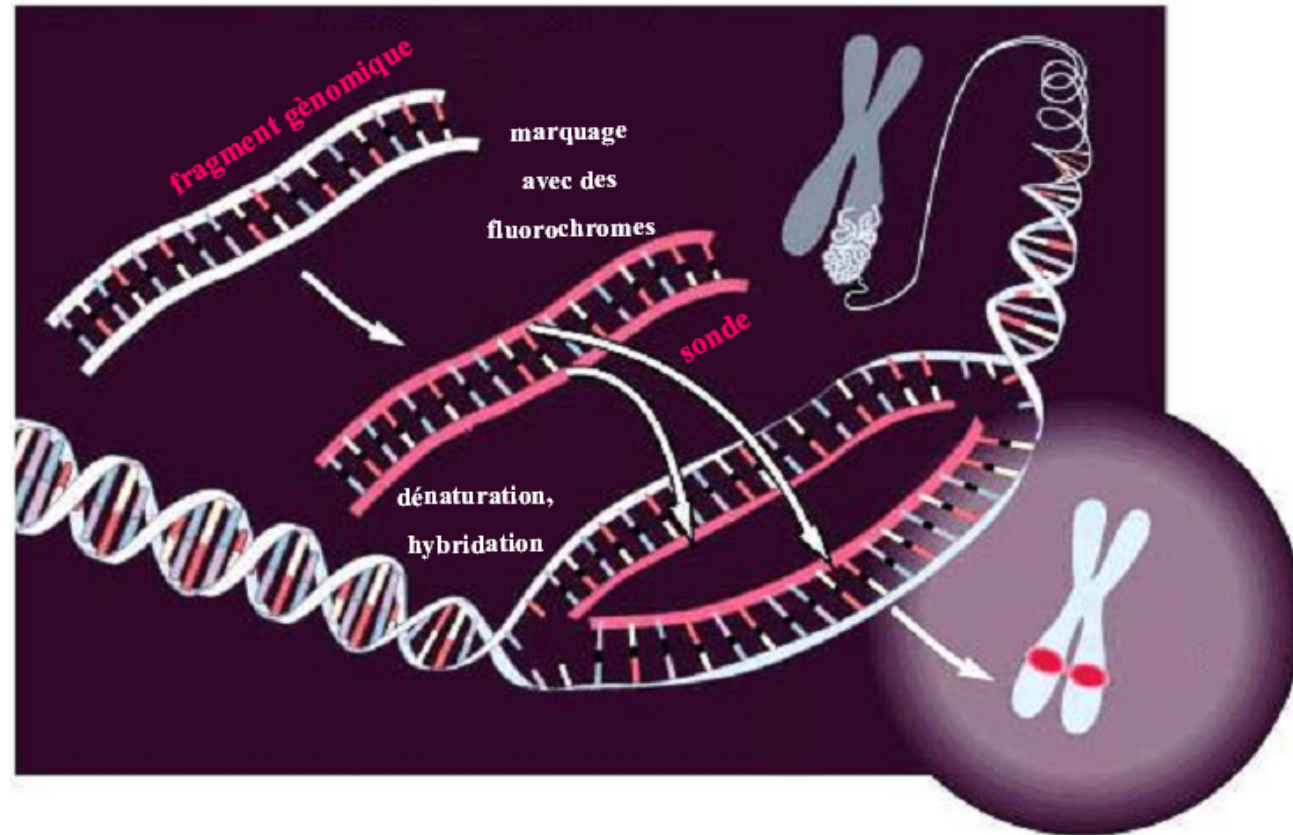


Validation de méthodes d'analyse qualitative en portée flexible B en cytogénétique moléculaire

appliqués au

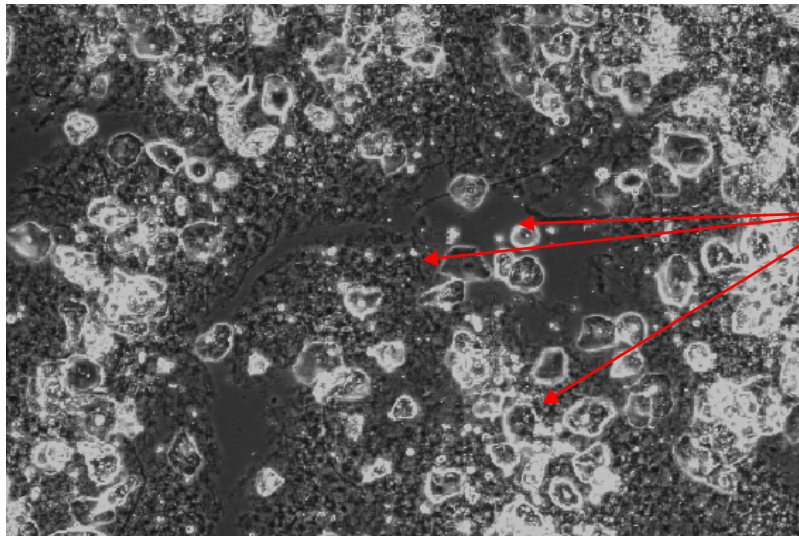
**Test de détection des anomalies numériques des chromosomes 21, 18, 13
par FISH**

Principe du test d'hybridation in situ en fluorescence (FISH)

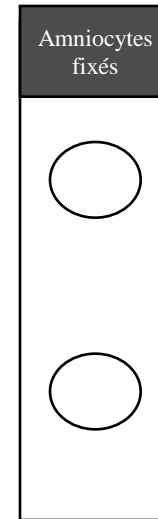


Test de détection des aneuploïdies 21, 18 et 13 (ADN cible)

Matrice : fraction de ponction de liquide amniotique

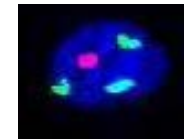
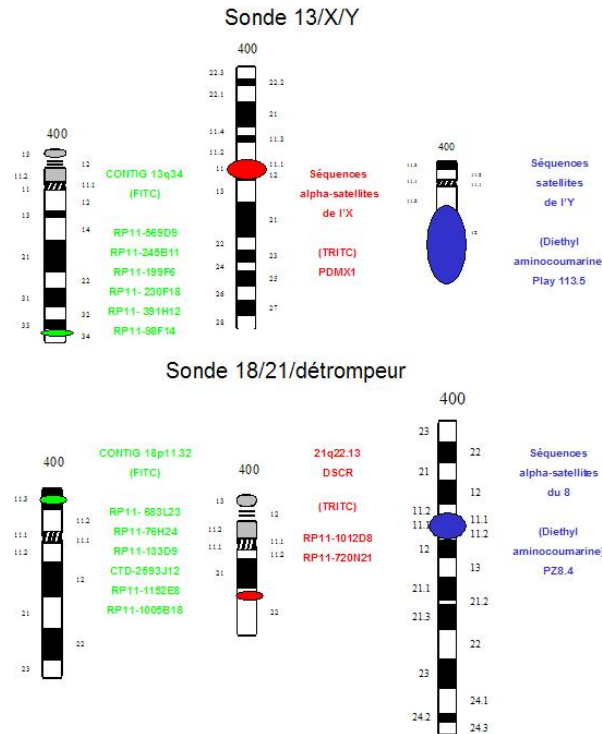
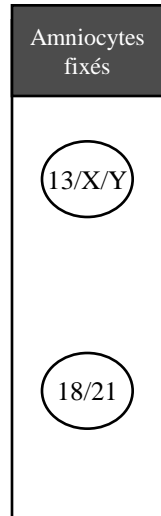


Noyaux



Amniocytes (x 1000)

Test de détection des aneuploïdies 21, 18 et 13 (SONDES)



➤ Test diagnostique utilisé depuis 8 ans au laboratoire.

Mise en conformité avec les exigences de la norme NF ISO 15189
dossier de validation de méthode type SH FORM 44

Revoir le procès de fabrication des réactifs du test

SH FORM 44

✓ étude bibliographique

(la sensibilité, la spécificité, la stabilité , la robustesse etc...)

✓ essais sur site

Actuellement on maîtrise la fabrication des sondes de FISH en petit volume (45 μ L soit environ 15 tests).

Objectif : changer d'échelle, fabriquer un lot de réactif suffisant pour plus de 500 test (projet d'automatisation sur automate pipeteur)

Assurer la traçabilité des sondes

Définir une identification univoque pour chaque lot de sondes

- ✓ assurer une traçabilité de son utilisation
- ✓ gestion facilitée des documents

Mise en place d'un système de code barre.

Spécificité et Sensibilité (1/3)

Un test FISH est spécifique quand il donne un nombre de signaux attendus chez des patients sains ayant un caryotype normal.

Un test FISH est sensible quand il détecte l'altération du locus ou des loci étudiés.

Spécificité et Sensibilité (2/3) (étude bibliographique)

SPECIFICITE & SENSIBILITE DIAGNOSTIQUES (indispensable en portée B)

Extrait formulaire SH FORM 44

**Spécificité = 95% sur le tissus de référence
(Pool de 5 préparations cytogénétiques de lymphocytes T de patients
sains de sexe masculin de caryotype normal)**

(Guide de bonne pratique en cytogénétique de l'ACLF, juin 2011 p18).

Sensibilité > 90 %

(CNEPGM, Génétique Médicale, MASSON, Paris, 2004 p107).

**Test non adapté à la détection des mosaïques faibles
et de certains réarrangements
(moins de 10% des cas de trisomie 21, 18 et 13).**

Comparaison de méthode

CYGE-F-FORE-COMP

APHP Hôpital Necker-Enfants Malades Laboratoire de génétique et produits de sang Cytogénétique Plateforme FISH	FORMULAIRE COMPARAISON DE MÉTHODE TEST DIAGNOSTIQUE	CYGE-F-FORE-COMP Version : 0 Date d'application : Page : 1/2
OPERATEUR		
TEST DIAGNOSTIQUE Test de détection des aneuploïdie 21,18 et 13		
ECHANTILLON B N° d'échantillon (ème de la grossesse)	Résultat METHODE RBH	Résultat METHODE COMPLEMENTAIRE (ACPA) METHODE DE REFERENCE (Caryotype)
1. 10-0030 (33sem.) 2. 10-0037 (33sem.) 3. 10-0602 (29sem.) 4. 10-0783 (29sem.) 5. 10-1025 (29sem.) 6. 10-1688 (27sem.) 7. 10-1788 (27sem.) 8. 10-2294 (27sem.) 9. 10-2517 (16sem.) 10. 10-2682 (31sem.) 11. 10-2967 (23 sem.) 12. 10-3009 (28sem.)	Pas d'aneuploïdie Pas d'aneuploïdie Trisomie 18 homoploie Pas d'aneuploïdie Pas d'aneuploïdie Pas d'aneuploïdie Pas d'aneuploïdie Pas d'aneuploïdie Pas d'aneuploïdie Pas d'aneuploïdie Pas d'aneuploïdie Pas d'aneuploïdie Pas d'aneuploïdie	46,XY 46,XY 47,XY,+18 46,XY,Sp,h 46,XX,N Profil normal (ACPA) 46,XX 46,XY 46,XY 46,XY 46,XY 46,XY 46,XX 46,XX 46,XX,del(22)(q11.2q11.2)
N° de dossier N		
COMBAT		
VALIDITE DU TEST DIAGNOSTIQUE		
OUI/MON		Vers du biologiste
Page 1/2 Validation conseil FISH Validation conseil APHP/Necker/Enfants Malades/FORE Comparaison de méthode aneuploïdie		

Stabilité des sondes

Tester la stabilité des sondes (maintient de la fluorescence, non dégradation de la sonde)

Mois +1, +2, +3, + N... sur des étalements d'amniocytes témoins, analyse automatisable avec un compteur de signaux.

Difficulté :

Poolage d'excédent de liquide amniotique : échec

Analyse automatisée, compteur de spot : échec

➤ A chaque sous-lot réaliser une étude de spécificité sur une préparation cytogénétique de référence : **CYGE-F-FORE-O-SPEC**

Contamination

CONTAMINATION (Extrait formulaire SH FORM 44)	
Inter échantillon pour les paramètres sensibles :	Contamination possible du liquide amniotique par des cellules maternelles (liquide amniotique hémorragique) ➤ sondes sur X et Y pour fœtus de sexe masculin ➤ analyse d'un plus grand nombre de cellules (et de leur morphologie) pour un fœtus de sexe féminin
Inter réactif si nécessaire :	Par effet de capillarité les deux lots de sondes du test peuvent se mélanger. ➤ plages d'hybridation suffisamment éloignées (utilisation d'un patron d'étalement)
Vérification bibliographique :	Non applicable
Vérification sur site :	Non applicable

Robustesse

La **robustesse** est la capacité à ne pas être affectée par de faibles variations des paramètres de la méthode.

Paramètres non maîtrisable :

- ✓ Conditions atmosphériques (température, hydrométrie)
- ✓ Qualité du prélèvement (grande variabilité inter-échantillon, dépendant du terme de la grosseur)
- Pré-traitement qui standardise la qualité des préparations **CYGE-F-MOPE-FISH**
- Sondes concentrées et de grande taille **CYGE-F-MOPE-SONDE**

Pas d'échec (étude de comparaison de méthode) **CYGE-F-FORE-COMP**

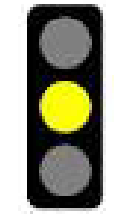
Maîtrise des risques

MAITRISE DES RISQUES (extrait formulaire SH FORM 44)		
Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Type d'échantillon primaire : Ponction de liquide amniotique	Concordance prélèvement / feuille de demande	Identitovigilance CYGE-F-PRANA-O-FISH Fiche de demande d'examen FISH
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...):		CYGE-F-PRANA-O-FISH
Main d'œuvre (habilitation du personnel) : Préciser les références des procédures et enregistrements.	Formation/ habilitation des opérateurs	COMB-B-FORE-02- Grille_HabilplateformFISH
Conditions ambiantes requises (ex : température, organisation des locaux, éclairage,...) :	Pièce noire pour la microscopie Précaution type L2	Protections individuelles et collectives (au mieux des moyens donnés)
Référence du réactif (référence fournisseur, version) :	Traçabilité des lots de réactif Confusion entre les 2 tests (13/X/Y et 18/21)	CYGE-F-PROG-0-VALFISH Détrompeur sur le chromosome 8
Matériau de références (témoins) :	Collecte de préparation témoin	CYGE-F-PROG-0-VALFISH
Equipements : Exigences métrologiques* (définir les paramètres critiques) Exigences informatiques* spécifiques	Bain marie 72 C(+/-2 C) Hybrite® Etuve 37 C (+/-2 C) Microscopes à fluorescence Logiciel d'acquisition d'images Sauvegarder des dossiers d'analyse génétique sur 30 ans	Fiche de vie équipement critique Maintenance préventive Certificat de métrologie

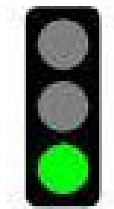
Avancement dans la démarche



Non formalisé



En cours



Satisfait à l'exigence

- Grille d'habilitation
- Fiche de poste
- Formulaire
- Plan expérimental, FDS
- Procédure/ Mode opératoire
- Fiche de vie équipement
- **Traçabilité**, code barre
- Vérification métrologique
- Automatisation, production à grande échelle (abandonnée, non prioritaire)