

Comment accréditer un panel de mutation par NGS destiné au diagnostic/pronostic des Néoplasies Myéloprolifératives

1

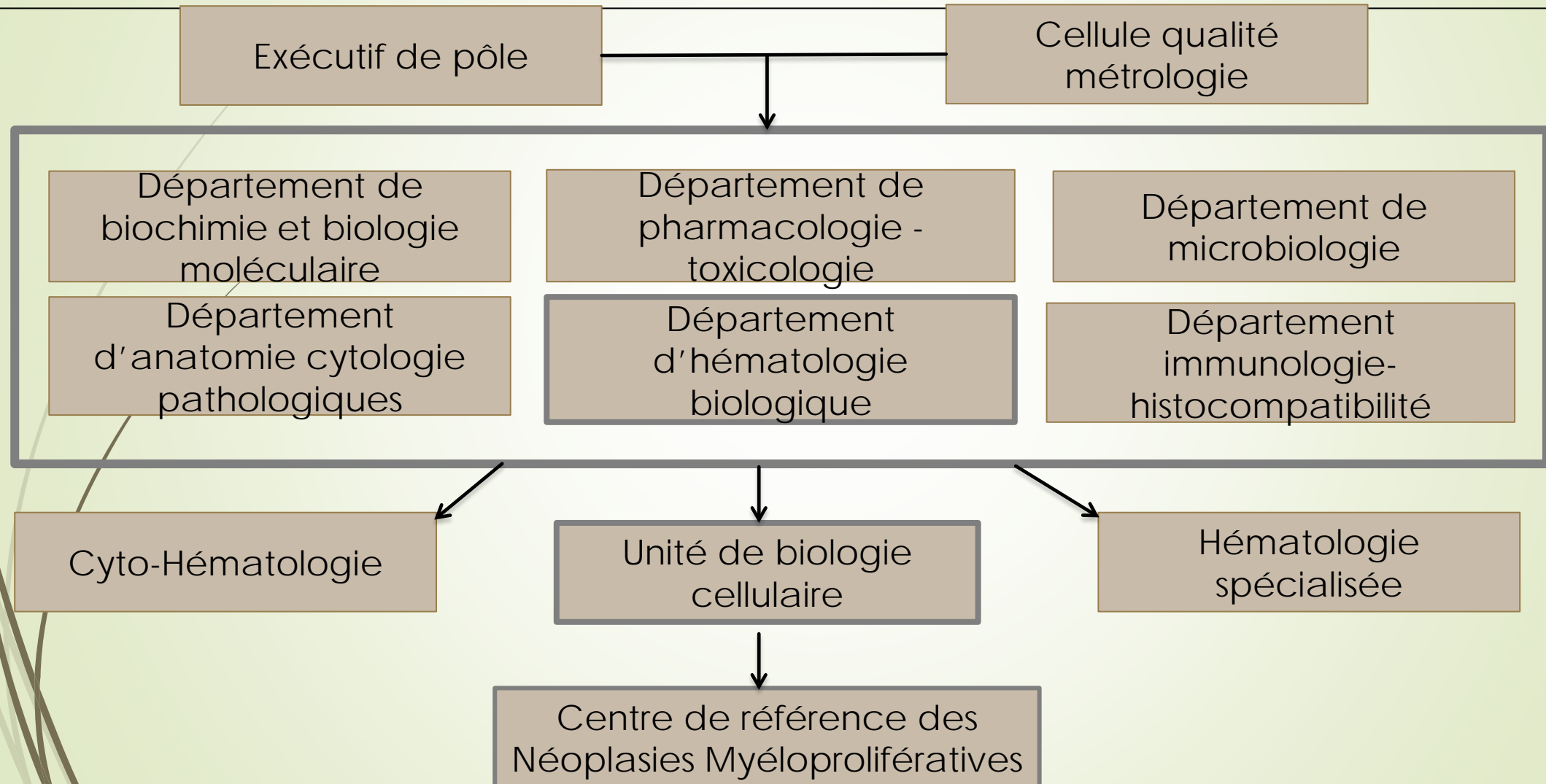
Frédérique FLEURY

Technicienne de laboratoire

Hôpital Saint-Louis – Unité de Biologie cellulaire

Organigramme du laboratoire de biologie médicale du pôle B2P (Biologie – Physiologie – Pathologie)

2



Pour répondre à la question comment accréditer un panel de mutation par NGS il est indispensable

- A l'aide du SH INF 50, de définir la portée d'accréditation, pour décrire les compétences nécessaires à la réalisation de cet examen.
 - Famille: Biochimie – Génétique
 - Sous domaine: Génétique
 - Sous Famille: Génétique somatique
- Et de constituer un dossier de validation de méthode pour prouver la maîtrise du processus analytique et donc la fiabilité des résultats

Mais qu'est-ce que le Next Generation Sequencing?

4

C'est une méthode complexe composée de plusieurs processus comprenant:

Méthode d'enrichissement/chimie du séquençage/analyse bio-informatique

Qui a été développée par le laboratoire (donc de portée B) et qui va permettre, de rechercher dans 23 gènes la présence de mutations par comparaison à des séquences de références du génome humain

Mais que doit contenir le dossier de validation de méthode?

5

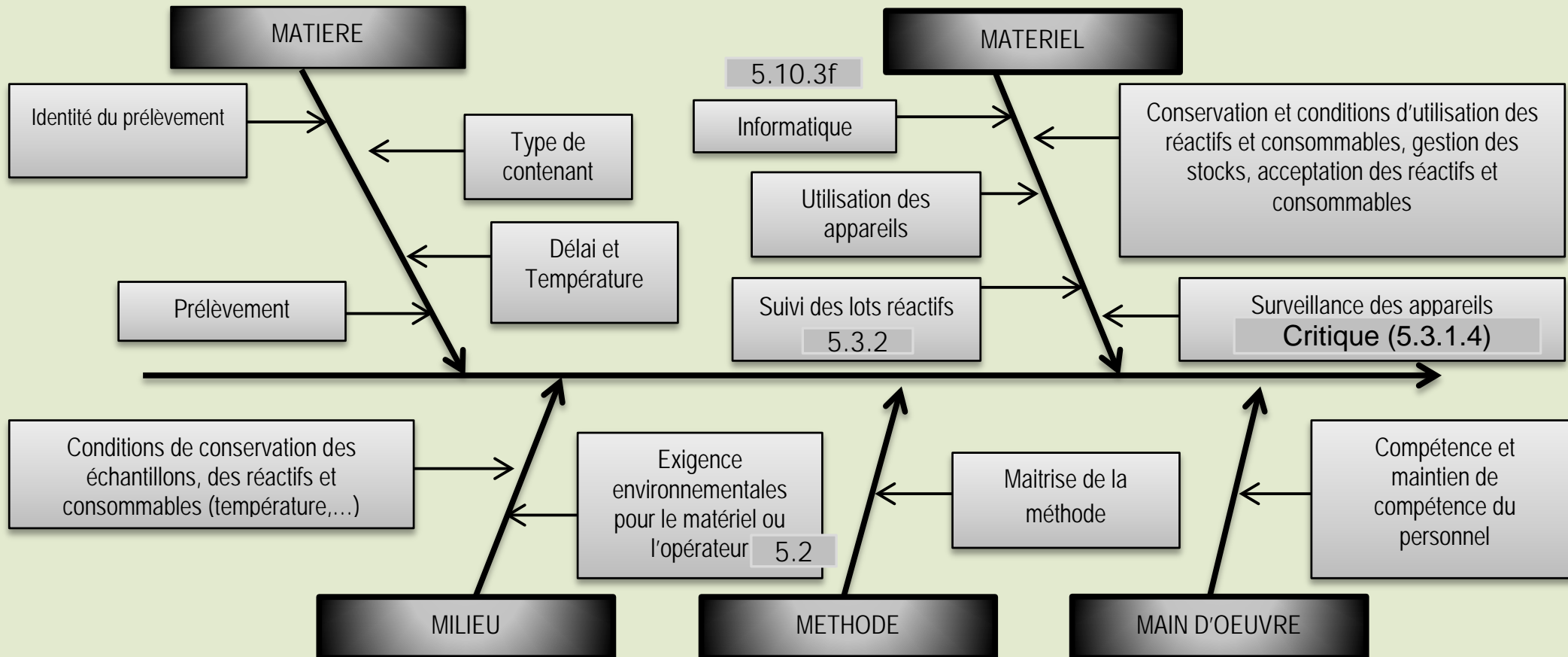
- Une analyse de risque où est consigné tous les points critiques, pour placer des indicateurs de qualité et ainsi réduire voire éliminer les risques de défaillances potentielles.
- Définir les critères de performances à évaluer et leurs limites acceptables
- La bibliographie
- Les vérifications expérimentales
- Et enfin la conclusion et la déclaration d'aptitude de la méthode

L'Analyse des 5M à l'aide du Diagramme d'Ishikawa

6

Maitrise du processus pré-ana (chap 5.4 de la norme)

(chap 5.1 de la norme)



(chap 5.5 de la norme)

(chap 5.1 de la norme)

Mais qu'elles sont les critères à évaluer pour une analyse de portée B?

- Estimation de la fidélité (la reproductibilité et la fidélité intermédiaire)
- Evaluation de la justesse/ Exactitude
- Estimation de l'incertitude de mesure
- Evaluation des interférence et des contaminations
- Définir les intervalles de références biologiques
- Définir l'intervalle de mesure et limite de détection
- Et évaluer la robustesse de la méthode

Dans le cas du NGS?

8

- L'évaluation des interférences et des contaminations est évaluée à l'aide d'un blanc, qui est répété à intervalle défini, qui suit le parcours d'un échantillon.
Et par le passage et l'analyse du contrôle interne de qualité (CIQ) qui permet de vérifier la présence éventuelle de contamination.
- Il n'existe pas d'intervalles de référence en génétique somatique, la présence d'une mutation dans le cadre d'une NMP, induit automatiquement la surveillance et le suivi du patient
- Le laboratoire a fixé l'intervalle de mesure à l'aide de l'expérience et les recommandations des groupes de travail spécialisés.
L'intervalle de mesure est comprise entre 5 et 100%
- La robustesse:
Au laboratoire, la robustesse est évaluée par le passage du CIQ et de son suivi à long terme en suivant la fiabilité intermédiaire.

Evaluation de la fidélité

9

- La fidélité intermédiaire: A été évalué à l'aide d'un mélange du deux CIQ de la société Horizon diagnostic sur 11 séries.
La fidélité intermédiaire obtenue pour les 18 mutations présentent, est conforme aux limites acceptables définies par le laboratoire
- La répétabilité sera évaluée ultérieurement, en répétant 10 fois le CIQ pur et 10 fois le CIQ diluée pour avoir des charges alléliques différentes

Evaluation de la justesse

10

- Pour étudier l'exactitude de la méthode, le laboratoire c'est inscrit à l'association GBMHM?
- A ce jour un seul EEQ (Evaluation Externe de la Qualité) a été analysé. Sur 12 mutations, une seule est revenue non conforme due à la présence d'un bruit de fond important.

Ce qui a conduit le laboratoire a réaliser une étude d'impact, sur les dossiers précédemment analysés,

➡ Aucune discordance n'a été constaté

Incertitude de mesure

11

- En raison d'un grand nombre de mutation possible et le passage d'un seul EEQ, l'incertitude de mesure n'a pu être évaluée à ce jour.
- En effet les mutations présentent dans le mélange de CIQ était différentes de celle présente dans l'EEQ

Comparaison de méthode

12

- Recherche de la mutation V617F dans le gène JAK2
- Recherche de la mutation dans l'exon 12 du gène JAK2
- Recherche de la mutation dans le gène MPL

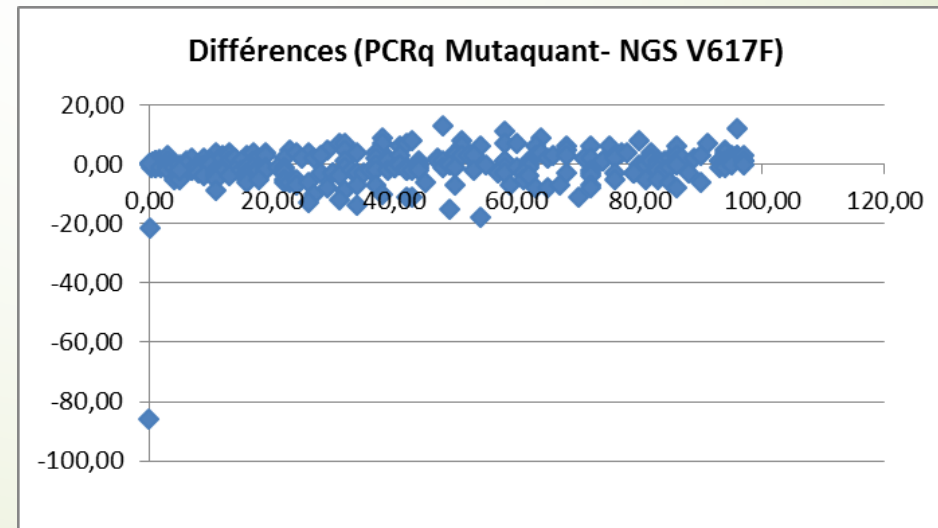
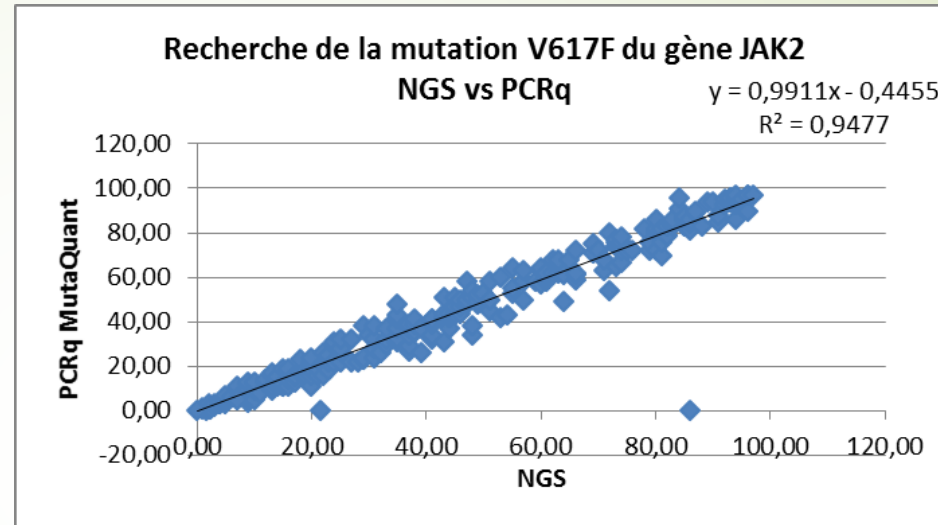
Comparaison de méthode « Recherche de la mutation JAK2 V617F »

13

Cette comparaison a été réalisée sur 472 échantillons passés à la fois en PCRq et en NGS.

L'équation de la droite de régression a été réalisée à partir des 300 échantillons positifs montre une pente très proche de 1 et une ordonnée à l'origine très proche de 0. Le coefficient de régression est très proche de 1. Les résultats obtenus par les deux méthodes sont donc statistiquement très bien corrélés.

Et le graphique des différences montre que les résultats obtenus n'excède pas les 20% et confirme donc la corrélation des 2 méthodes.



Le tableau de contingence rassemblant les résultats positifs et négatifs obtenus pour chaque méthode donne une concordance de 95%

	NGS	NGS Positif	Total
Négatif			
Mutaquant Négatif	172	2	174
Mutaquant Positif	22	276	298
Total	194	278	472

⇒ $((172+276) / 472) * 100 = 95\%$ de concordance avec les 2 techniques

En effet, 20 échantillons dont la charge allélique est inférieure à 1% avec la technique de référence Mutaquant ne sont pas détectés par le panel NGS prouvant que la sensibilité analytique de la technique NGS est inférieure à celle de la PCRq.

Et inversement 2 échantillons sur 472 ne sont pas détecté par la technique de référence dû à la présence d'une double mutation qui entraine l'absence d'amplification de l'ADN muté.

Comparaison de méthode sur la recherche de la mutation dans l'exon 12 du gène JAK2

Actuellement au laboratoire, cette recherche de mutation utilise la technique HRM en screening puis la technique de séquençage Sanger

	NGS Négatif	NGS Positif	Total
HRM Négatif	41	0	41
HRM Positif	0	4	4
Total	41	4	45

Comme on peut l'observer avec ce tableau de contingence, 100% des résultats sont concordants mais vu le faible nombre d'échantillons positifs, la comparaison de méthode est à poursuivre

Comparaison de méthode sur la recherche de la mutation dans le gène MPL

En routine, la présence d'une mutation dans la gène MPL est réalisée par discrimination allélique avec le kit Ipsogen MPL W515 L/K Mutascreen

	NGS Négatif	NGS Positif	Total
Discrimination allélique Négatif	135	1	136
Discrimination allélique Positif	0	15	15
Total	135	16	151

La comparaison de méthode montre 99% de concordance entre les 2 méthodes, en effet 1 échantillon donne des résultats discordant due à la présence d'une mutation dans le codon 505 et non 515

Conclusion

Même si les résultats obtenus jusqu'à présent montre que la technique NGS présente des performances conformes aux exigences du laboratoire (fidélité intermédiaire et exactitude) et des résultats concordants.

Avant de demander l'accréditation de l'analyse de ce panel de mutation par NGS, le laboratoire devra encore:

- tester la répétabilité
- poursuivre les comparaisons de méthode tout en suivant les résultats du CIQ et des EEQ pour s'assurer qu'il n'y a aucune dérive et pour pouvoir calculer son incertitude de mesure.

Merci de votre attention