



Université Pierre et Marie Curie –
Sorbonne Universités

MÉMOIRE
POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME UNIVERSITAIRE
« ASSURANCE QUALITÉ AU LABORATOIRE
DE BIOLOGIE MÉDICALE »

VÉRIFICATION / VALIDATION DE MÉTHODES
« DÉTECTION DE LA MUTATION JAK2 V617F »

Marie-Thérèse Piot Chimeno
Année 2017-2018

Note au lecteur

« Les mémoires des stagiaires du Diplôme Universitaire « Assurance Qualité au laboratoire médicale » sont des travaux réalisés pendant l'année de formation.

Les opinions exprimées n'engagent que les auteurs.

Les travaux ne peuvent faire l'objet d'une publication en tout, ou partie, sans l'accord de l'auteur et du responsable du DU concerné.

AUTEUR

PIOT-CHIMENO Marie-Thérèse

Technicienne de laboratoire

Secteur : Hématologie Moléculaire

Service d'Hématologie Biologique

Pôle de Biologie Médicale et Pathologie

Groupe Hospitalier Universitaire Pitié-Salpêtrière Charles Foix

Assistance Publique - Hôpitaux de Paris



[Hôpital Pitié- Salpêtrière](#)



[Hôpital Charles Foix](#)

Remerciements

Je remercie le Pr Frédéric Davi, chef du service d'Hématologie, biologiste et responsable de l'UF « Hématologie Moléculaire » et les responsables et cadres du pôle de Biologie Médicale et Pathologie des Hôpitaux Universitaires Pitié- Salpêtrière – Charles Foix d'avoir soutenu ma candidature pour le diplôme universitaire « Assurance Qualité au Laboratoire de Biologie Médicale ».

Je remercie le Dr. Vaubourdolle et le Dr. Pernet pour leur accueil ainsi que l'ensemble des intervenants pour la qualité de leurs enseignements.

Je remercie Dr. Mickael Degaud, biologiste de l'UF « Hématologie Moléculaire », et le Dr. Myrto Costopoulos, biologiste de l'UF « Phénotypes des Hémopathies », pour leur soutien, conseil et relecture de ce mémoire.

Toute ma gratitude au Dr. Touafek Fériel (biologiste responsable du secteur moléculaire et référent qualité du service de Parasitologie et Mycologie des Hôpitaux Universitaires Pitié- Salpêtrière – Charles Foix et sa technicienne Isabelle Joly pour leur disponibilité et leurs précieux conseils.

Je remercie mes collègues techniciens pour leur contribution à ce projet.

Un merci tout particulier à ma collègue technicienne de l'UF « Phénotypes des Hémopathies » Martine Brissard, pour son soutien moral et la relecture de ce mémoire.

Table des matières

Glossaire.....	1
INTRODUCTION.....	2
I ENVIRONNEMENT.....	3
1.1 Hôpital Pitié-Salpêtrière.....	3
1.2 Hôpital Charles-Foix.....	3
1.3 Hôpital Universitaire Pitié Salpêtrière- Charles Foix.....	3
Les chiffres clés 2016 - Pitié Salpêtrière - APHP.....	3
1.4 Le pôle biologie médicale et pathologie.....	4
1.5 Le service d'Hématologie Biologique – UF d'Hématologie Moléculaire.....	4
1.5.1 Le service d'Hématologie Biologique.....	4
1.5.2 L'UF d'Hématologie Moléculaire.....	4
1.6 La démarche qualité de l'HU PSL-CFX.....	5
1.6.1 La démarche qualité du pôle biologie médicale et pathologie (BMP).....	5
1.6.2 La démarche qualité de l'UF d'Hématologie Moléculaire.....	6
II EXIGENCES NORMATIVES-OBJECTIFS-CONTEXTE CLINIQUE.....	6
2.1 Exigences normatives.....	6
2.2 Objectifs.....	7
2.3 Contexte clinique.....	7
III METHODOLOGIE.....	8
3.1) La roue de Deming.....	8
3.2 La documentation.....	8
3.3 La cartographie Identification des processus.....	9
3.4 La méthode des 5M l'analyse des risques.....	10
IV PLAN D'ACTION.....	10
4.1 Planifier.....	10
4.2 Faire et vérifier.....	11
4.2.1 Sous processus « Extraction automatisée de l'ADN et dosage ».....	11
4.2.2 Sous processus « détection de la mutation <i>JAK2 V617F</i> ».....	17
4.3 Les améliorations à prévoir ajustements pour.....	28
4.3.1 Le sous processus « extraction automatisée de l'ADN et dosage ».....	28
4.3.2 Le sous processus « détection de la mutation <i>JAK2 V617F</i> ».....	29
4.3.2 Améliorations communes aux deux sous processus.....	31
V CONCLUSION.....	31
BIBLIOGRAPHIE.....	32
Annexes.....	33
Résumé.....	36

Glossaire

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BCR- ABL	Break point Cluster Region - Abelson
BMP	Biologie médicale et pathologie
CALR	Calréticuline
CE/IVD	Communauté européenne / dispositif de diagnostic in vitro
CIQ	Contrôle interne de qualité
COFRAC	Comité français d'accréditation
CTP	Cytidine triphosphate
CV	Coefficient de variation
CXCR4	CXC Chemokine Receptor type 4
DM/DIV	Dispositif médical / diagnostic in vitro
EDTA	Ethylènediaminatétraacides
EEQ	Examen externe de qualité
ERIC	European Research Initiative on CLL
ET	Écart-type
FRET	Fluorescence résonance énergie transfert
GBMHM	Groupe biologistes spécialisés en biologie moléculaire des hémopathies malignes
GTP	Guanosine triphosphate
HLA	Human leukocyte antigen (Antigène des leucocytes humains)
HU-PSL-CFX	Hôpitaux universitaires Pitié-Salpêtrière-Charles Foix
IGVH	Immunoglobuline variable heavy chain / région variable des chaînes lourdes des immunoglobulines
LBM	Laboratoire de biologie médicale
MYD88	Myeloid Differentiation Primary Response 88
PCR	Polymérisation chaîne réaction / réaction en chaîne par polymérase
PDCA	Plan-Do-Check-Act
PML-RARA	Leucémie promyelocytaire –récepteur de l'acide rétinoïque
PV	Polyglobulie de Vaquez
TE	Thrombocytémie essentielle
TP53	Tumeur protéine 53
TTP	Thymidine triphosphate
UF	Unité fonctionnelle
U.V	Ultra-violet
WT	Wild type / non muté

INTRODUCTION

L'ordonnance du 31 mai 2010, rend obligatoire l'accréditation de tous les laboratoires de biologie médicale (LBM), privés et publics, selon la norme NF EN ISO 15189. En France, l'organisme habilité à délivrer l'accréditation d'un LBM est le comité français d'accréditation (COFRAC). Un calendrier d'accréditation des examens a été établi, imposant que 50% des examens soient accrédités avant le 1^{er} novembre 2016, 70% avant le 1^{er} novembre 2018 et que 100% des examens le soient pour le 1^{er} novembre 2020.

Les examens réalisés dans un laboratoire de biologie médicale (LBM) doivent faire l'objet d'une vérification ou d'une validation de méthode qui est une des exigences de la norme NF EN ISO 15189. L'Hôpital universitaire Pitié Salpêtrière – Charles Foix a obtenu sa première accréditation en 2014, sur des examens de biochimie et d'hémostase.

L'unité fonctionnelle (UF) d'Hématologie Moléculaire du service d'Hématologie Biologique de la Pitié-Salpêtrière (PSL) n'a, à ce jour, aucun examen accrédité.

L'objectif de ce mémoire est d'acquérir une méthodologie pour valider l'ensemble des analyses réalisées au sein de notre UF, qu'elles soient en portée A ou portée B, et de ce fait, participer à la démarche qualité du laboratoire pour satisfaire au quota de 100 % du nombre d'examens accrédités en 2020.

Nous allons commencer par un dossier de vérification/validation de méthodes sur l'examen « DÉTECTION DE LA MUTATION *JAK2* V617F ».

Dans un premier temps, nous allons présenter la structure des Hôpitaux universitaires Pitié-Salpêtrière-Charles Foix (HU-PSL-CFX), l'UF d'Hématologie Moléculaire et son avancement en assurance qualité. Puis nous aborderons la validation de méthode de cet examen avec la méthodologie utilisée, le principe de la détection de la mutation *JAK2* V617F, les résultats obtenus aux différentes évaluations des performances et enfin les améliorations apportées.

I ENVIRONNEMENT

1.1 Hôpital Pitié-Salpêtrière

Il est situé dans le 13^{ème} arrondissement de Paris, construit en 1656 sous le nom de l'hôpital général de Paris. Il est constitué de plusieurs établissements dont la Pitié et la Salpêtrière. Celle-ci a tout d'abord une fonction de prison et d'hospice avant de devenir un véritable lieu de soins en 1921. En 1964, la Pitié et la Salpêtrière fusionnent pour former le groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière avec en 1966, la création d'une faculté de médecine ^[1].

1.2 Hôpital Charles-Foix

Il est situé à Ivry sur seine. Créé en 1869, il fut successivement un hospice en 1889 puis un hôpital militaire en 1915 pour devenir en 1975 un centre hospitalo-universitaire gériatrique. Il regroupe l'ensemble des activités de prise en charge des personnes âgées.

1.3 Hôpital Universitaire Pitié Salpêtrière- Charles Foix

C'est dans le cadre de la réorganisation de l'Assistance publique -Hôpitaux de Paris en 12 groupes que l'hôpital Charles Foix fusionne en 2011 avec la Pitié-Salpêtrière pour former le groupe Hôpitaux Universitaires Pitié Salpêtrière-Charles Foix (HU-PSL-CFX).

Celui-ci est constitué de 11 pôles d'activités différentes couvrant l'ensemble des disciplines médicales et chirurgicales à l'exception de la pédiatrie, la dermatologie et le traitement des grands brûlés.

Pôles	Disciplines
1	Chirurgie-Néphrologie-Urologie-Gynécologie-Maxillo Faciale et stomatologie odontologie
2	Pneumologie-Réanimation-Anesthésie-Gériatrie-Urgences-Explorations Fonctionnelles Respiratoires-Sommeil
3	Maladies du Système Nerveux
4	Chirurgie Neurosensorielle
5	Coeur-Métabolisme
6	Biologie Médicale et Pathologie
7	Immunité-Infection-Inflammation
8	Imagerie
9	Santé Publique-Evaluation et produits de Santé
10	Oncologie, Radiothérapie-Soins palliatifs-Hématologie-Hémobiothérapie
11	Pôle Gériatrique Paris-Val de Marne

Le groupe HU-PSL-CFX héberge des centres de recherche d'envergure internationale tels que l'institut du cerveau et de la moelle épinière à la Pitié-Salpêtrière et le centre de recherche dédié au vieillissement à Charles-Foix ^[2]

Les chiffres clés 2016 - Pitié Salpêtrière - APHP

11 pôles; 73 services ; 2 instituts hospitalo-universitaire ; 4 départements Hospitalo-universitaire

1542 médecins ; 7880 paramédicaux ; 2186 lits

175413 hospitalisations ; 75089 séjours en hospitalisation complète ; 100324 séjours en ambulatoire

636229 consultations ; 127678 passages aux urgences. ^[3]

1.4 Le pôle biologie médicale et pathologie

Créé en 2011, il est actuellement sous la direction du Pr. Jean-Marc Lacorte.

Il est composé de 12 secteurs d'activités répartis entre le site de la Pitié -Salpêtrière et le site de Charles Foix (Cf. [Annexe I](#))

- Département d'immunologie
- Département de Génétique
- Le centre de Tri
- Service d'Hématologie Biologique
- Service de bactériologie -Hygiène
- Service de Biochimie Endocrinienne et Oncologique
- Service de Biochimie Métabolique
- Service de coprologie Fonctionnelle
- Service de Parasitologie -Mycologie
- Service de Virologie
- Service de Biothérapies
- Service d'Anatomie et Cytologie Pathologique

Chaque secteur est sous la direction d'un chef de service et d'un cadre paramédical de santé, eux-mêmes sous la responsabilité du chef de pôle et du cadre de pôle.

1.5 Le service d'Hématologie Biologique – UF d'Hématologie Moléculaire

1.5.1 Le service d'Hématologie Biologique

Le service d'Hématologie Biologique est composé de cinq unités fonctionnelles (UF) (Hématologie Cellulaire, Hémostase, Phénotypage des Hémopathies, Cytogénétique Hématologique et Hématologie Moléculaire).

Chaque UF est composée de biologistes, techniciens, et d'agents médico-techniques.

Depuis mars 2018, une plateforme a été créée, regroupant le service de biochimie, d'Hématologie Cellulaire et d'Hémostase. (Cf. [Annexe II](#))

Ils sont actuellement répartis sur 4 bâtiments qui sont

- ✓ Bâtiment « pharmacie et laboratoires » pour la plateforme « Hémostase, Hématologie Cellulaire, Biochimie »
- ✓ Bâtiment « Écologie Cellulaire » pour l'UF « Phénotypage des Hémopathies »
- ✓ Bâtiment « Layani » pour l'UF de Cytogénétique Hématologique
- ✓ Bâtiment « Laveran » pour l'UF d'Hématologie Moléculaire

Un projet de déménagement est prévu cet automne pour notre UF celui du Phénotypage des Hémopathies, et celui de Cytogénétique Hématologique. Nous devrions courant 2018, intégrer le bâtiment « pharmacie et laboratoires ». (Cf. [Annexe III](#))

1.5.2 L'UF d'Hématologie Moléculaire

L'UF d'Hématologie Moléculaire est constituée du chef de service, par ailleurs chef de l'UF, d'un assistant hospitalo-universitaire, d'un ingénieur de recherche clinique, d'un attaché de recherche clinique et de cinq technicien(ne)s.

Ses activités sont axées sur le diagnostic et le suivi des hémopathies myéloïdes et lymphoïdes.

Les objectifs de l'UF sont d'aider le clinicien dans

- Le diagnostic par la mise en évidence d'anomalies génétiques permettant de conforter, confirmer ou infirmer un diagnostic.
- L'estimation du pronostic
- Le suivi de l'évolution du patient pendant et après un traitement à l'aide de marqueurs moléculaires
- Le choix ou la modification de la prise en charge thérapeutique.

Les analyses réalisées au sein de l'UF sont

- Pour les hémopathies myéloïdes nous réalisons le diagnostic et le suivi de transcrits de fusion tels que *PML-RARA*, *BCR-ABL*, *RUNX1-RUNX1T1*, la recherche de mutations ponctuelles telles que *JAK2 V617F* et *CalR*.
- Pour les hémopathies lymphoïdes nous faisons la recherche de mutations ponctuelles telles *MYD88*, *CXCR4*, *TP53*, l'étude de la Clonalité lymphoïde B et T et celle du statut mutationnel de la région des chaînes lourdes des immunoglobulines (IGVH) pour les leucémies lymphoïdes chroniques.

1.6 La démarche qualité de l'HU PSL-CFX

1.6.1 La démarche qualité du pôle biologie médicale et pathologie (BMP)

Le BMP est engagé dans la démarche qualité depuis 2010.

Afin de satisfaire aux exigences de la Norme ISO 15189, il a mis en place

- Une cellule de management de la qualité elle est constituée du chef de pôle, de son adjoint, du cadre paramédical de pôle, de la directrice « qualité groupe hospitalier », d'un responsable qualité démarche d'accréditation, de son adjointe, et d'un responsable qualité démarche d'accréditation Légionnelle.
- Une cellule qualité dirigée par un responsable qualité et son adjoint (ce sont les pilotes).

La cellule qualité est soutenue par des référents qualité et leurs suppléants au sein de chaque service (un référent médical et un référent non médical) et un ingénieur qualité.

Ensemble, ils ont pour mission de définir, déployer et coordonner, au sein du pôle, la politique qualité définie. (Cf. [Annexe IV](#))

Le pôle s'est également doté du logiciel qualité « Kalilab » qui permet la gestion documentaire, la logistique du matériel (suivi des maintenances et de la métrologie), et la validation de méthode.

Le pôle BMP est accrédité selon la norme NF EN ISO 15189 depuis juin 2014 pour 4 examens dans les sous familles Biochimie et Hémostase sous le n°8-3253.

Depuis, des extensions et des ajouts d'accréditation ont été créés pour les examens des sous familles bactériologie, immunologie cellulaire spécialisée et histocompatibilité (groupage HLA), hématologie-cytologie, sérologie infectieuse, parasitologie-mycologie, virologie, génétique constitutionnelle.

Suite à la mise en route de la plateforme « hémostase-hématologie-biochimie », le pôle BMP a retiré et suspendu environ 70 examens de l'accréditation. Cependant, 53.6% des examens sont à ce jour accrédités.

1.6.2 La démarche qualité de l'UF d'Hématologie Moléculaire

L'UF est entré dans la démarche qualité par la mise en place de la gestion documentaire dans Kalilab. Il collabore avec des sociétés savantes qui établissent des programmes d'évaluation externe de la qualité en proposant des contrôles externes (EEQ) pour certaines analyses de biologie moléculaire, afin de garantir la fiabilité des résultats rendus.

Ces sociétés savantes sont

- Groupe de Biologistes d'hôpitaux spécialisés en Biologie Moléculaire des Hémopathies Malignes (GBMHM) Ce groupe nous envoie des EEQ pour la détection de la mutation *JAK2* V617F, le diagnostic et la quantification des différents transcrits *BCR-ABL*, l'étude de la Clonalité lymphoïde B et T et pour la détection de la mutation du gène *TP53*.
- EUROCLONALITY pour l'étude de la Clonalité lymphoïde B et T
- European Research Initiative on CLL (ERIC) pour l'étude du statut mutationnel (IGVH).

Mais, pour l'instant, aucun examen n'est accrédité.

II EXIGENCES NORMATIVES-OBJECTIFS-CONTEXTE CLINIQUE

2.1 Exigences normatives

La norme ISO 15189 prévoit des exigences concernant la qualité et la compétence des LBM. Pour cela, des exigences sont prévues au niveau des processus du pré-analytique, analytique et post-analytique.

Dans les chapitres 5.4 et 5.5 de la norme NF EN ISO 15189 sont abordées respectivement les exigences concernant les processus du pré-analytique et de l'analytique.

- §5.4 « Le laboratoire doit disposer de procédures documentées et d'informations pour les activités pré-analytiques afin de garantir la validité des résultats des examens ».
- §5.5 « Le laboratoire doit sélectionner les procédures analytiques qui ont été validées pour leur utilisation prévue. L'identité des personnes effectuant les procédures analytiques doit être enregistrés ».

En Santé Humaine, les LBM ont pour obligation de « valider » leurs méthodes. Elles sont de deux types

- **Méthodes reconnues (portée flexible Portée de type A)** méthode normalisée (méthode équipement/réactif « fournisseur » correspondant à l'utilisation de dispositif médical de diagnostic in vitro (DM-DIV) marqués Communauté Européenne (CE) (au titre de la directive 98/79CE) reposant sur des compétences techniques précédemment démontrées.
- **Méthodes adaptées ou développées en internes (portée flexible Portée de type B)** méthode validée qui a été modifiée pour l'ajuster aux besoins du laboratoire.

2.2 Objectifs

L'UF souhaite constituer un dossier de validation de méthode d'une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) de discrimination allélique pour la détection de la mutation *JAK2* V617F.

Cet examen s'inscrit selon le document SH-INF-50 sur la ligne de portée GB9 de la sous famille génétique somatique.

C'est un processus complexe comprenant deux sous-processus

- Un sous-processus concernant l'extraction automatisée de l'acide désoxyribonucléique (ADN) il s'agit d'une méthode « fournisseur » Communauté Européenne / Dispositif In Vitro (CE/IVD), pour laquelle seule une vérification est nécessaire. Elle s'inscrit donc dans une portée de type A. Dans ce sous processus les techniques suivantes seront réalisées
 - Extraction de l'ADN à partir d'un prélèvement sanguin prélevé sur de l'éthylènediaminatétraacides (EDTA)
 - Dosage de l'ADN par spectrophotométrie
- Un sous-processus concernant la détection de la mutation *JAK2* V617F. C'est une méthode développée au laboratoire. Conformément à l'exigence de la norme NF EN ISO 15189, une validation de méthode de portée de type B est requise. (Cf. [Annexe V](#))

L'objectif est de réaliser la vérification et la validation sur site des performances des méthodes d'extraction automatisée d'ADN et de la détection de la mutation *JAK2* V617F dans le but d'une demande d'accréditation. Par la suite, la rédaction d'un mode opératoire d'une vérification/validation de méthode est envisagée. Il servirait de référence pour la constitution des dossiers des autres examens à réaliser au sein du laboratoire.

2.3 Contexte clinique

La mutation *JAK2* V617F se retrouve dans les syndromes myéloprolifératifs (SMP). Les SMP sont caractérisés par une prolifération clonale de cellules souches hématopoïétiques myéloïdes conduisant à une production médullaire excessive de cellules myéloïdes, sans blocage de maturation.

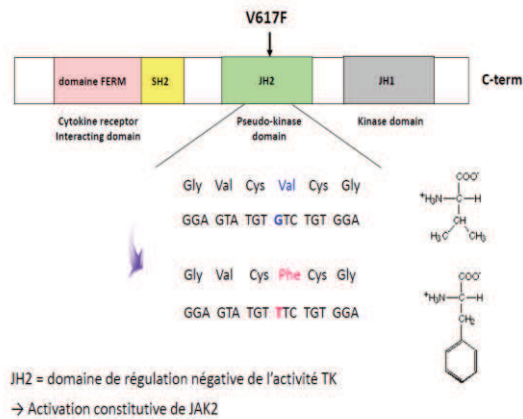
JAK2 (Janus Kinase 2) est une protéine de type Tyrosine Kinase présente dans les précurseurs myéloïdes, où elle possède une fonction de régulation. Elle est impliquée dans la voie de signalisation des récepteurs à l'érythropoïétine et à la thrombopoïétine.

La mutation somatique correspond à un changement de nucléotide (Guanine devenant Thymine) en position 1879 du gène *JAK2* (dans l'exon 14), entraînant le remplacement au niveau du codon 617 de la valine par une phénylalanine.

La mutation *JAK2* V617F est située dans le domaine pseudokinase de la protéine, dont le rôle physiologique est d'inhiber l'activité du domaine Kinase.

Elle entraîne une activation permanente de la voie de signalisation de l'érythropoïétine, à l'origine de la prolifération cellulaire clonale.

La mutation JAK2V617F



Source Thomas Boyer [4]

La recherche de la mutation *JAK2* V617F n'est pas spécifique du diagnostic des SMP mais selon la classification des pathologies myéloïdes de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), elle reste un outil de diagnostic important de la polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocythémie essentielle (TE) et la myélofibrose primitive.

III METHODOLOGIE

3.1) La roue de Deming

Nous avons utilisé la roue de Deming qui permet de revoir, adapter, corriger l'organisation d'un système et ce dans le but d'atteindre un niveau optimal de qualité.

Elle nous a permis d'établir le calendrier suivant, et de planifier toutes les étapes essentielles de ce projet.

- Planifier février

Détermination de l'objectif (validation de méthode de la technique de PCR pour la détection de la mutation *JAK2* V617F) et planifier les actions à mener.

- Faire Mars-Avril

Réalisation des différentes actions du protocole

- Vérifier Mai-Juin

Analyse des résultats

- Agir Juillet -Septembre

Améliorations à apporter et rédaction du mémoire

3.2 La documentation

Pour effectuer la validation de méthode nous nous sommes appuyés sur les documents suivants

- BIBLIOGRAPHIE” Development of a Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of the *JAK2* V617F Mutation”. (Cf. Annexe VI)

- NORME NF EN ISO 15189 document de référence qui spécifie les exigences de qualité et de compétence applicable aux laboratoires de biologie médicale.
- SH-REF-02 document de référence qui explicite, dans le cadre légal applicable en France, les exigences des normes NF EN ISO 15189, prises en compte pour l'accréditation des LBM.
- SH-INF-50 document informatif qui présente les portées types recensant les examens classiques de biologie médicale, ainsi que les analyses ou tests des autres domaines relevant de l'accréditation par la Santé Humaine du Cofrac, classés selon la thématique de la section Santé Humaine (Domaines/ Familles/ Sous domaines/ Sous familles) dans le but de faciliter et d'harmoniser l'expression des portées d'accréditation.
- SH-GTA-04 guide technique qui explicite les exigences des paragraphes 5.3, 5.4, 5.5 de la norme NF EN ISO 15189 concernant la vérification/validation de méthode en biologie médicale.
- SH-FORM-43 ce document est un formulaire présentant une fiche type de vérification/validation d'une méthode de biologie médicale.
- NOTICES FOURNISSEURS
- PROCEDURES documents produits par le laboratoire. Ils mentionnent le descriptif opérationnel des processus. Ils définissent les rôles et les tâches de chaque intervenant au sein des processus.
- MODES OPERATOIRES documents produits par le laboratoire. Ils décrivent comment réaliser des tâches précises.

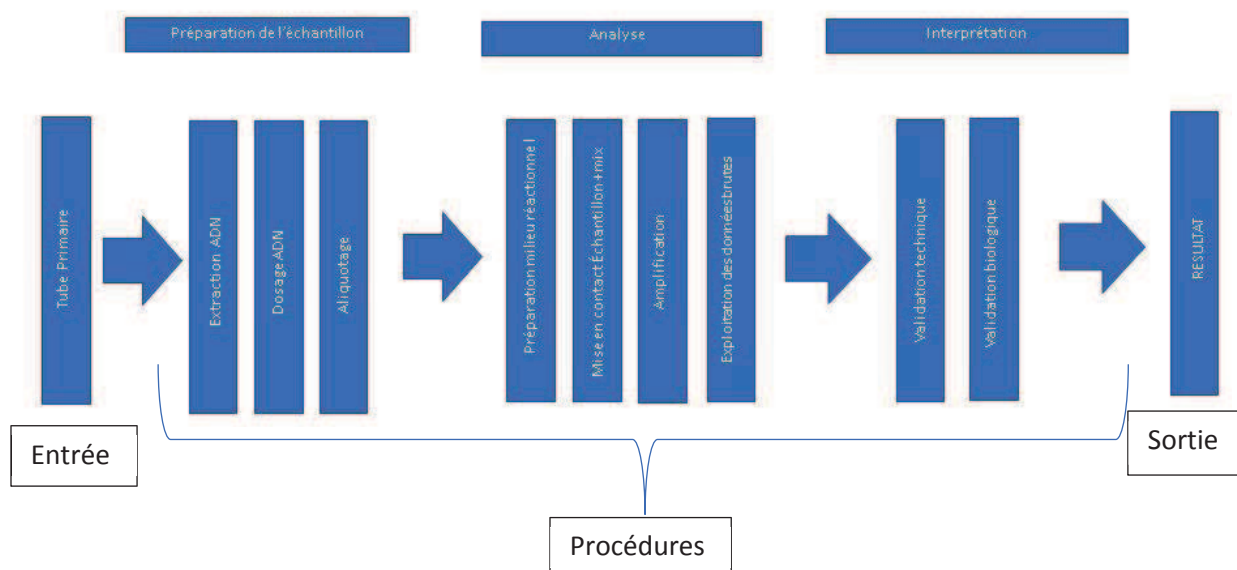
3.3 La cartographie Identification des processus

Cet outil nous a permis de schématiser et décomposer le processus de la détection de la mutation *JAK2 V617F* en trois sous-processus (Pré-analytique, Analytique et Post-analytique) avec en entrée du processus, le tube de sang primaire sur lequel la mutation est recherchée et en sortie, le résultat (présence ou absence de la mutation).

En réalisant cette cartographie, nous avons pu identifier les fiches identitaires et les procédures correspondantes, identifier les risques majeurs pour chaque sous-processus, mettre en place des indicateurs qualité et prévoir des axes d'améliorations.

Seuls les deux premiers sous processus seront traités dans ce mémoire.

Processus de la recherche de la mutation V617F (pré ana/analytique/post analytique)



1^{ER} sous processus extraction automatisée de l'ADN, méthode quantitative

2^{ème} sous processus détection de la mutation *JAK2* V617F, technique de PCR maison, méthode qualitative

3.4 La méthode des 5M l'analyse des risques

Cet outil m'a permis de réaliser la maîtrise des risques des deux sous processus.

Il a été réalisé sous la forme du diagramme d'Ishikawa.

Il permet d'identifier les points critiques, de définir les éléments à maîtriser et les moyens de maîtrise concernant (Cf. Annexe VII)

- Le milieu environnement
- La matière échantillon
- La main d'œuvre personnel
- La méthode technique
- Le matériel automate/ réactifs/ équipements....

IV PLAN D'ACTION

4.1 Planifier

Le premier travail du mémoire a été de planifier les actions suivantes

- Définir l'objectif
- Identifier les processus
- Choix de la portée A ou B
- Identifier pour chaque processus, l'ensemble des étapes critiques à maîtriser (matériel, réactifs, consommables, CIQ/EEQ etc...) selon la méthode des 5M.
- Rédiger les modes opératoires, les instructions de travail, les enregistrements en lien avec les processus.

- Effectuer la validation/vérification de méthode (répétabilité, fidélité intermédiaire, variabilité inter opérateur, contamination inter échantillons, seuil de détection, effet de bord, robustesse...)

4.2 Faire et vérifier

4.2.1 Sous processus « Extraction automatisée de l'ADN et dosage »

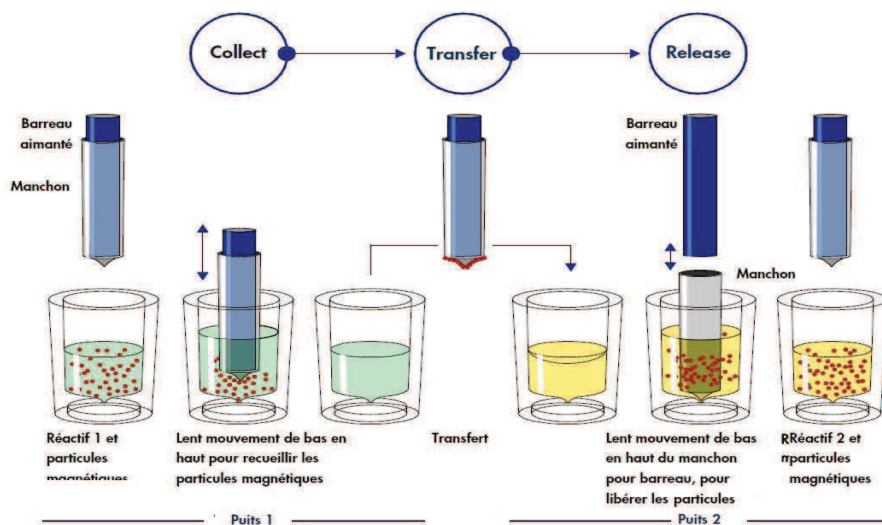
4.2.1.1 Extraction de l'ADN

A) Principe de la technique

L'extraction d'ADN est une technique qui isole de l'ADN cellulaire en quantité et en qualité suffisante pour permettre une analyse.

Classiquement, les principales étapes de l'extraction sont la lyse des cellules et la libération de l'ADN, l'élimination des protéines et la précipitation de l'ADN, le lavage de l'ADN et de son élution (mise en solution tampon afin d'être conservé).

La méthode d'extraction automatisée de l'ADN sur l'extracteur « QIASymphony® » de chez Qiagen utilise comme support des billes magnétiques chargées positivement sur lesquelles va s'accrocher l'ADN chargé négativement. Il est capable de traiter simultanément jusqu'à 24 échantillons.



Les étapes 1 et 2 sont répétées plusieurs fois au cours du traitement de l'échantillon.

- **Protocole**

- ✓ L'échantillon est du sang total prélevé sur EDTA, stocké entre 4°C et 8°C, le volume de la prise d'essai est de 1.5 ml minimum et le volume d'éluât est de 200µl.
- ✓ L'extraction se fait avec le kit DSP DNA Midi Kit 96, version 1, réactif marqué « CE-IVD ». Il est stocké à température ambiante.

B) Les paramètres à évaluer

Les paramètres à évaluer sont la répétabilité, la fidélité intermédiaire et la contamination inter échantillons.

1) Répétabilité

Pour des raisons techniques (volume d'essai minimum 1.5 ml) nous n'avons pour ce test que 6 valeurs. Nous avons à disposition 4 tubes d'un même prélèvement. Nous les avons homogénéisés et répartis dans différents tubes de façon à obtenir 6 échantillons puis nous avons lancé un run d'extraction dans les conditions opératoires préconisées par le fournisseur.

REPETABILITE DE L'EXTRACTION AUTOMATISEE DE L'ADN : 06/04/2018							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons Patients	Nombre de valeurs (N)	Moyenne ng/µl	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire	Conclusion
sang total sur tube EDTA	6	145,35	6,68	4,6	NA	5	CONFORME

Tableau de résultats Cf. Annexe VIII

Pour déterminer le CV retenu par le laboratoire, la question est de savoir si la concentration en ADN pour la détection de la mutation JAK2 V617F a un impact sur le résultat rendu s'est posée.

Pour répondre à cette interrogation, le protocole suivant a été établi. Nous avons amplifié 6 ADN patients (ayant un statut mutationnel et des taux de mutations différents 1 ADN non muté et 5 ADN mutés de 2% à 50%) en faisant varier la concentration en ADN de - 50% et + 100% par rapport à la concentration de référence qui est de 20ng/µl. Les concentrations testées sont 10ng/µl et 40ng/µl

Ce test a été réalisé en duplicate pour chaque concentration. La moyenne des valeurs obtenues est indiquée dans le tableau ci-dessous.

Un contrôle interne négatif (Horizon WT) et deux positifs (Horizon 1% et Horizon 50%) ont été amplifiés selon le protocole de référence (température de dénaturation et d'hybridation respectivement de 92°C et 60°C)

- ✓ Tout échantillon présentant un résultat supérieur à celui du contrôle « Horizon 1% maison » est considéré comme étant muté.
- ✓ Tout échantillon présentant un résultat inférieur à celui du contrôle « Horizon 1% maison » est considéré comme étant non muté.

Concentrations: ng/µl	PATIENTS: Résultats des allèles 2						Contrôles Horizons: résultats des allèles 2		
	LLI 2%	WIT 3%	LES 12%	PIC(12%-50%)	JEG 50%	BRE	WT	1% maison	50%
Référence : 20ng/µl	1,04	1,57	2,57	2,9	3,86	0,58	0,64	0,74	3,8
Résultats attendus	Muté	Muté	Muté	Muté	Muté	Non muté			
10 ng/µl	1,03	1,49	2,26	2,88	3,83	0,57			
40 ng/µl	1,04	1,6	2,4	2,88	3,82	0,57			
Résultats obtenus	Muté	Muté	Muté	Muté	Muté	Non muté			
Conclusion	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme			

Tableau de résultats Cf. Annexe IX

Nous constatons que les valeurs des résultats obtenus pour l'ADN non muté et celles des ADN mutés sont respectivement inférieures à celles du contrôle « Horizon 1% maison » et supérieures à celles de

ce même contrôle. De plus, les valeurs obtenues pour les ADN mutés augmentent avec le taux de mutation, ce qui est cohérent.

Aucune différence significative du résultat n'a été constatée quel que soit le taux de mutation de l'échantillon. Les résultats des six échantillons montrent que leur statut mutationnel reste inchangé.

Une variation de la concentration d'ADN de - 50% ou + 100% de l'échantillon n'a pas d'impact sur le résultat de la PCR « détection de la mutation *JAK2 V617F* ». La concentration de 20ng/μl n'est pas critique pour la détection de la mutation *JAK2 V617F* ; un CV plus élevé pour la l'évaluation de la performance de la répétabilité de l'extraction automatisée de l'ADN peut être toléré.

Conclusion répétabilité La valeur du CV obtenue est inférieure au CV retenu par le laboratoire, la méthode est considérée comme conforme aux exigences et aux performances attendues. L'extraction de l'ADN est donc répétable.

2) Fidélité intermédiaire

Un même échantillon sanguin a subi trois runs d'extraction ; les runs ont été lancé par trois opérateurs différents et ce dans les conditions opératoires préconisées par le fournisseur.

Pour les mêmes raisons techniques que celles évoquées précédemment, nous n'avons pour ce test que trois valeurs.

FIDELITE INTERMEDIAIRE : EXTRACTION AUTOMATISEE DE L'ADN 26/09/2017							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons Patients	Nombre de valeurs (N)	Moyenne ng/μl	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire	Conclusion
sang total sur tube EDTA	3	128,43	3,3	2,57	NA	5%	CONFORME

Tableau de résultats Cf. Annexe X

Conclusion La valeur du CV obtenue est inférieure au CV retenu par le laboratoire (5% est la valeur du CV qui est toléré en biologie moléculaire et retenu suite au test précédemment décrit, la méthode est considérée comme conforme aux exigences et aux performances attendues.

3) Contamination inter échantillons

Pour évaluer cette performance, un run d'extraction a été effectué en alternant 12 échantillons sanguins avec 12 échantillons d'eau Nuclease Free, suivi d'un dosage des éluats obtenus (ADN et eau). Les résultats obtenus sont dans le tableau ci-dessous.

Sample ID/RUN	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280
Sang 1	31/05/2018	08:28	332,44	6,176	3,367	1,83
H2O 1	31/05/2018	08:29	1,24	0,02	0,014	-1,45
Sang 2	31/05/2018	08:30	7,88	0,13	0,035	3,69
H2O 2	31/05/2018	08:31	2,22	0,024	0,01	2,4
Sang 3	31/05/2018	08:31	228,08	4,44	2,404	1,85
H2O 3	31/05/2018	08:32	1,66	0,022	0,005	4,12
Sang 4	31/05/2018	08:33	389,31	7,45	4,039	1,84
H2O 4	31/05/2018	08:33	2,64	0,05	0,017	2,8
Sang 5	31/05/2018	08:34	58,73	1,111	0,582	1,91
H2O 5	31/05/2018	08:35	1,31	0,008	-0,016	-0,51

Tableau de résultats Cf. Annexe XI

Conclusion les valeurs obtenues lors du dosage des éluats d'eau ne sont pas significatives. Il n'y a pas de contamination inter-échantillons lors du processus d'extraction.

C) Améliorations apportées ajustements

Comme les résultats de ces performances sont très satisfaisants, aucune modification du protocole n'est nécessaire. Seule la notification de la date de début et de fin d'utilisation de la cartouche de réactifs de l'extracteur d'ADN ayant une période de stabilité d'un mois a été mise en place.

D) Conclusion

Les résultats des performances évaluées (répétabilité, fidélité intermédiaire et contamination inter échantillons) sont conformes aux exigences et performances attendues ; la partie « extraction » du sous processus « extraction automatisée » est considéré comme conforme.

4.2.1.2 Dosage de l'ADN

A) Principe

Le dosage s'effectue par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 260nm. Le spectrophotomètre utilisé est le Nanodrop ND1000.

Les acides nucléiques absorbent fortement dans l'ultra-violet (UV) à une longueur d'onde de 260nm. D'après la loi de Beer Lambert, il existe une correspondance entre l'absorbance mesurée à 260nm et la concentration en acides nucléiques.

Une unité d'absorbance à 260nm (densité optique lue au spectrophotomètre) correspond pour

- ✓ 1 solution d'ADN double brin à 50µg/ml
- ✓ 1 solution d'ADN simple brin à 37µg/ml

Ceci pour des acides nucléiques parfaitement purs et en solution homogène.

Les protéines absorbent aussi à 260 nm mais leur maximum d'absorption se situe à 280nm.

Aussi le rapport 260/280 constitue un moyen de contrôle de la pureté de la solution d'ADN et permet d'apprécier une éventuelle contamination de la solution d'ADN.

- ✓ Rapport entre 1.8 et 2 solution pure d'ADN
- ✓ Rapport <1.7 contamination par les protéines
- ✓ Rapport >2 contamination par l'acide ribonucléique (ARN)

Cf. Annexe XII

B) Les paramètres à évaluer

Les paramètres à évaluer sont la répétabilité, la fidélité intermédiaire, la variabilité inter opérateur et le test de contamination inter échantillons.

1) Répétabilité

Ce test a été réalisé sur deux échantillons d'ADN patient de concentrations différentes (20 et 80 ng/µl).

Les concentrations testées sont représentatives des extremums de concentration habituellement utilisées pour nos techniques de routine comprises entre 20 et 65 ng/µl.

30 mesures ont été réalisées pour chaque échantillon.

REPETABILITE DU DOSAGE D'ADN du 19/01/2018 au 23/05/2018							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne ng/µl	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire	Conclusion
ADN patient 80 ng/µl	30	80,09	0,5	0,62	NA	5%	CONFORME
ADN patient 20 ng/µl	30	21,25	0,43	2,01	NA	5%	CONFORME

Tableau de résultats Cf. Annexe XIII A

Conclusion la valeur du CV obtenue est inférieure au CV retenu par le laboratoire (5% est le CV toléré en biologie moléculaire), la méthode est considérée comme conforme aux exigences et aux performances attendues. Le dosage de l'ADN est donc répétable.

2) Fidélité intermédiaire

Ce test a été réalisé sur deux échantillons d'ADN patient de concentrations différentes (20 et 70 ng/µl).

Les concentrations testées sont représentatives des extremums de concentration habituellement utilisées pour nos techniques de routine comprises entre 20 et 65 ng/µl.

30 mesures ont été réalisées pour chaque échantillon à des dates différentes et par trois opérateurs différents. Ces mêmes valeurs nous ont également servi à évaluer la variabilité inter-opérateur.

FIDELITE INTERMEDIAIRE DU DOSAGE D'ADN du 09/07/2018 au 24/07/2018							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne ng/µl	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire	Conclusion
ADN 1 patient 20 ng/µl	30	22,75	1	4,42	NA	5%	CONFORME
ADN 2 patient 70ng/µl	30	71,53	2,35	3,29	NA	5%	CONFORME

Tableau de résultats Cf. Annexe XIII B

Conclusion la valeur du CV obtenue est inférieure au CV retenu par le laboratoire (5% est le CV toléré en biologie moléculaire), la méthode est considérée comme conforme aux exigences et aux performances attendues.

3) Variabilité inter opérateurs

Nous avons exploité les résultats obtenus lors du test de la fidélité intermédiaire.

VARIABILITE INTER OPERATEUR DU DOSAGE D'ADN du 09/07/2018 au 24/07/2018								
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>								
Echantillons	Opérateurs	Nombre de valeurs (N)	Moyenne ng/µl	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire	Conclusion
ADN 1 patient 20 ng/µl	HA	11	22,59	1,03	4,57%	NA	5%	CONFORME
	PR	11	22,92	0,92	4,01%	NA	5%	CONFORME
ADN 2 patient 70 ng/µl	HA	11	71,39	2,44	3,42%	NA	5%	CONFORME
	PR	11	72,23	2,51	3,48%	NA	5%	CONFORME

Tableau de résultats Cf. Annexe XIII C

Conclusion Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différences significatives entre les différents opérateurs. La valeur du CV obtenue est inférieure au CV retenu par le laboratoire (5% est le CV toléré en biologie moléculaire), la méthode est considérée comme conforme pour les différents opérateurs, la variabilité inter opérateurs est satisfaisante.

4) Contamination inter échantillons

Pour ce test, deux échantillons d'ADN ayant des concentrations très différentes ont été utilisés.

ADN Haut environ 400 ng/µl et ADN Bas environ 8 ng/µl

Le protocole suivant a été utilisé dans une même série, nous avons effectué trois dosages successifs de l'ADN Haut (ADN H1, ADN H2, ADN H3 ; de moyenne « m H ») suivi de trois dosages de l'ADN Bas (ADN B1, ADN B2, ADN B3) ; nous avons répété cette séquence trois fois.

H1H2H3 B1B2B3 H1H2H3 B1B2B3 H1H2H3 B1B2B3

B1 échantillon susceptible d'être contaminé

B3 échantillon susceptible de ne pas être contaminé

Les moyennes m B1 et m B3 ont été calculées (m B1=8.27ng/µl m B3= 8.24ng/µl mH= 386.84ng/µl) et le pourcentage de contamination calculé selon la formule Cf. Annexe XIII D

$$\begin{aligned} \text{Contamination en \%} &= (m \text{ B1} - m \text{ B3}) / (m \text{ H} - m \text{ B3}) \times 100 \\ &= (8.27 - 8.24) / (386.84 - 8.24) \times 100 \end{aligned}$$

$$\text{Contamination en \%} = 0.0079 \%$$

Conclusion Le pourcentage de contamination calculé est très faible (<0.01%) absence de contamination inter-échantillons significative.

C) Améliorations apportées ajustements

Il a été mis en place

- Un contrôle interne pour le dosage de l'ADN. Ce contrôle nous est fourni par l'association « GBMHM ». Il se présente sous forme de capsule. Il s'agit d'ADN extrait à partir d'une lignée cellulaire « NALM-6 ». Il est dosé une fois par mois, les résultats sont enregistrés dans un tableau et le suivi représenté sous forme de graphe.

D) Conclusion

Les résultats des performances évaluées (répétabilité, fidélité intermédiaire, variabilité inter opérateur et contamination inter échantillon) sont conformes aux exigences et performances attendues ; la partie « dosage de l'ADN » du sous processus « extraction automatisée » est considéré comme conforme.

Aux vues des résultats obtenus, le sous processus « extraction automatisée » de l'ADN est conforme aux exigences et performances attendues.

4.2.2 Sous processus « détection de la mutation *JAK2* V617F »

A) Principe de la technique

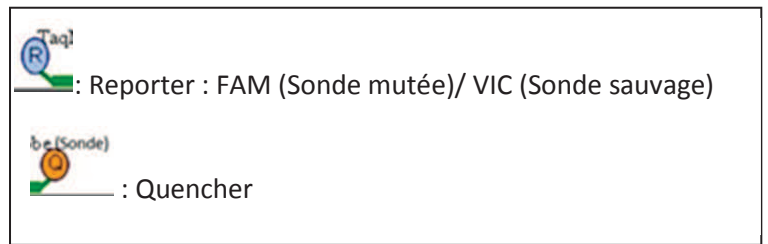
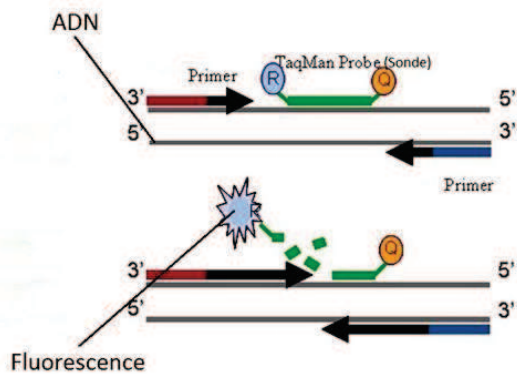
La technique utilisée est une PCR qui dérive de la PCR conventionnelle. Elle est dite « Technique de discrimination allélique utilisant des sondes Taqman® ». Elle est basée sur deux principes

- ✓ L'activité 5' exonucléasique de la Taq polymérase
- ✓ La Technologie FRET (Fluorescence Resonance Energie Transfert)

Cette technique utilise des sondes fluorescentes qui diffèrent uniquement par un nucléotide et qui sont complémentaires soit de l'allèle sauvage soit de l'allèle muté. Ces sondes sont marquées à leur extrémité 5' par un fluorochrome émetteur de fluorescence nommé « Reporter » et à leur extrémité 3' par un fluorochrome suppresseur de fluorescence nommé « Quencher ».

La sonde spécifique de l'allèle sauvage et celle spécifique de l'allèle muté ont respectivement comme « Reporter » VIC et Fam.

Cette technique consiste à hybrider à la séquence d'ADN cible, ces deux sondes fluorescentes. Au cours de la PCR, seules les sondes correctement hybridées seront dégradées par la Taq polymérase (grâce à son activité 5' exonucléasique) et émettront un signal fluorescent correspondant à la fluorescence du « Reporter ». Elles permettent ainsi de mettre en évidence soit l'allèle sauvage, soit l'allèle muté, soit les deux. Le résultat est rendu sous forme qualitative avec présence ou absence de la mutation.



- **Protocole utilisé**

Composition du Mix	Automate utilisé	Concentration ng/μl	volume de la prise d'essai μl	Volume du Mix μl
	Programme			
	Nombre de cycle			
Master Mix 2X	Automate : Taqman 7500 Fast Real PCR	20ng/μl	2,5μl	17μl
Sonde mutée (FAM) 10μM	Programme de référence : dénaturation : 92°C 15"			
Sonde sauvage (VIC) 10μM	hybridation : 60°C 1'			
Amorce sens 20μM	élongation : 60°C 1'			
Amorce anti-sens 20μM	Nombre de cycles : 50			
eau				

Cf. Annexes XIV et XV

- **Contrôles utilisés**

Deux contrôles sont issus de lignées cellulaires humaines. Ils sont commercialisés chez « AmpliTech »

- Horizon 50% contrôle contenant 50% d'allèles mutés
- Horizon WT contrôle ne contenant pas d'allèles mutés

Il s'agit d'ADN prêt à l'emploi, leur concentration est de 50ng/μl.

Un contrôle **Horizon 1% « maison »** est préparé au laboratoire à partir des deux contrôles « Horizon 50% » et « Horizon WT ». La validité du contrôle « Horizon 1% maison » (la justesse de la dilution) sera à vérifier.

- **L'interprétation des résultats**

Les échantillons sont déposés en duplicate sur la plaque, on vérifie, avant toute interprétation des résultats, la bonne corrélation des duplicates.

L'interprétation des résultats se fait par rapport aux contrôles « Horizon WT » et « Horizon 1% maison ».

Chaque échantillon possède deux valeurs d'intensité de fluorescence une intensité de fluorescence pour l'allèle 1 (allèle non muté) et une intensité de fluorescence pour l'allèle 2 (allèle muté).

Actuellement, on compare la valeur de l'intensité de fluorescence de l'allèle 2 de chaque échantillon avec celle du contrôle « Horizon 1% maison »

- Tout échantillon ayant une valeur d'intensité de fluorescence supérieure à celle du contrôle « Horizon1% maison » est considéré comme étant muté.
- Tout échantillon ayant une valeur d'intensité de fluorescence inférieure à celle du contrôle « Horizon1% maison » est considéré comme étant non muté.

- Tout échantillon ayant une valeur d'intensité de fluorescence égale ou légèrement inférieure à celle du contrôle « Horizon1% maison » est considéré comme étant douteux et un contrôle sera effectué sur un nouveau prélèvement.

B) Les paramètres à évaluer

C'est une méthode de type B qualitatif. Les paramètres à évaluer sont le seuil de positivité, la validité du contrôle « Horizon1% maison », la répétabilité, la fidélité intermédiaire, la variabilité inter-opérateurs, les contaminations inter-échantillons, les interférences, l'exactitude, la sensibilité et la spécificité analytique, la robustesse (stabilité des réactifs, variations de températures de dénaturation et d'hybridation, variations de la quantité d'ADN dans la prise d'essai, l'effet de bord et la variations de la concentration en ADN de l'échantillon déjà abordé dans le chapitre »répétabilité de l'extraction).

1) Seuil de positivité – validité du contrôle « Horizon 1% maison »

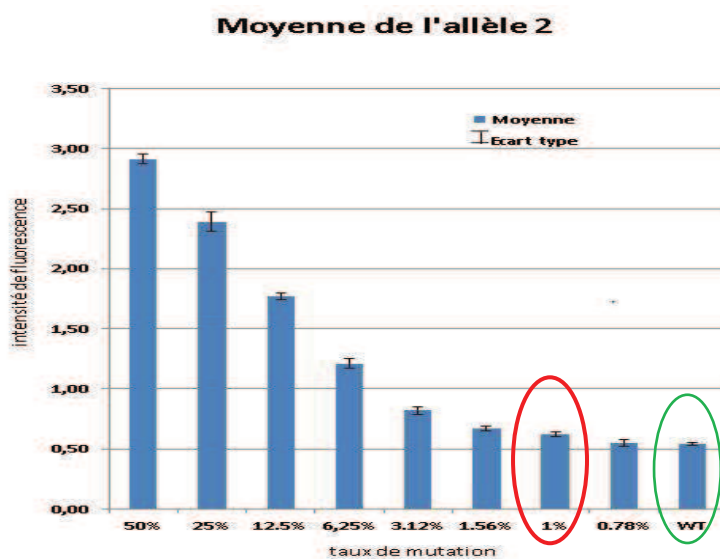
➤ Seuil de positivité

À partir d'un échantillon de contrôle positif « Horizon 50% », nous avons réalisé des dilutions successives, dans une matrice biologique (Contrôle Horizon WT), de façon à obtenir une gamme de concentrations allant de 0.78% à 50% d'allèles mutés. (0.78%, 1%, 1.56%, 3.12%, 6.25%, 12.5%, 25%, 50%). La mutation a été recherchée dix fois dans chaque dilution avec le programme de PCR de référence température de dénaturation 92°C, d'hybridation 60°C

Le contrôle négatif « Horizon WT » a été traité dans les mêmes conditions.

Le seuil de positivité correspond à la concentration conduisant à un signal significativement différent de celui du contrôle négatif.

Nous avons exploité les résultats en déterminant l'écart-type et le coefficient de variation du signal de l'allèle 2 de chaque dilution. Le graphe « Moyenne de l'allèle 2 » (« valeurs du taux de mutation en abscisse, valeurs de l'intensité de fluorescence en ordonné ») nous permet d'interpréter les résultats.



Conclusion La concentration « 1% » est la dilution conduisant à un signal significativement différent de celui du contrôle négatif. 1% de taux de mutation est bien le seuil de positivité.

Tableau de résultats Cf. Annexe XVI

➤ **Validité du contrôle 1%**

Le contrôle « Horizon maison 1% » étant réalisé au laboratoire, nous avons voulu nous assurer de sa justesse et de son exactitude. Pour cela nous avons établis ces deux protocoles

- 1^{er} protocole vérification de la justesse de la réalisation du contrôle

Les pipettes du laboratoire n'étant pas certifiées « Cofrac », une réalisation du contrôle « Horizon 1% maison » a été confrontée avec un contrôle « Horizon 1% maison » réalisé avec des pipettes certifiées « Cofrac ». Une répétabilité sur 24 valeurs a été réalisée pour chaque contrôle « Horizon 1% maison ». Les contrôles internes « Horizon WT » et « Horizon 50% » ont également été déposés respectivement avec une pipette certifiée « Cofrac » et avec une pipette du laboratoire non certifiée « Cofrac ».

Valeur des contrôles (allèle 1 / allèle 2)

« Horizon WT » Pipette laboratoire (4.03 / 0.47) Pipette « Cofrac » (4.04 / 0.46)

« Horizon 50% » Pipette laboratoire (3.71 / 2.79) Pipette « Cofrac » (3.63 / 2.83)

Répétabilité des contrôles "Horizon 1% maison" avec et sans pipettes "Cofrac" 22/06/2018						
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>						
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	Résultats obtenus	CV Limite pour les deux allèles %
		allele1/allele2	allele1/allele2	allele1/allele2		
CONTRÔLE HORIZON 1% pipette Cofrac	24	4,04 / 0,60	0,06 / 0,02	1,38 / 3,39	Muté	5
CONTRÔLE HORIZON 1% pipette non Cofrac	24	4,07 / 0,58	0,05 / 0,02	1,26 / 4,33	Muté	5

Tableau de résultats Cf. Annexe XVII A

Les résultats obtenus pour les contrôles préparés ou prélevés avec des pipettes non certifiées « Cofrac » ne diffèrent pas de ceux préparés ou prélevés avec des pipettes certifiées « Cofrac ». Le contrôle « Horizon 1% maison non Cofrac » ne montre aucune différence significative avec le contrôle « Horizon 1% maison Cofrac ».

Conclusion Le contrôle « Horizon 1% maison » est considéré comme étant juste et les pipettes de dilution non critiques.

- 2^{ème} protocole vérification de l'exactitude du contrôle

Nous avons repris deux EEQ fournis par le GBMHM (CQ19.1JA muté à un taux de 1.02% et CQ20.1JC muté à un taux de 0.96%). Nous avons réalisé une répétabilité de ces deux EEQ sur 12 valeurs.

Nous avons confronté les résultats obtenus avec ceux obtenus pour le contrôle « Horizon 1% maison » utilisé lors de la répétabilité.

REPETABILITE DU CONTRÔLE "HORIZON 1% " ET DES EEQ CQ19,1JA							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	Résultats obtenus	CV Limite pour les deux allèles %	Conclusion
		allele1/allele2	allele1/allele2	allele1/allele2			
CONTRÔLE HORIZON 1% pipette non Cofrac	24	4,07 / 0,58	0,05 / 0,02	1,26 / 4,33	Muté	<10	CONFORME
CONTRÔLE EEQ CQ19,1 JA (1,02%)	12	4,09 / 0,58	0,04 / 0,03	1,0 / 5,14	Muté	<10	CONFORME
CONTRÔLE EEQ CQ20,1 JC (0,96%)	12	4,03 / 0,55	0,03 / 0,03	0,71 / 4,84	Muté	<10	CONFORME

Tableau de résultats Cf. Annexes XVII-B et XVII-C

La valeur de l'allèle 2 du contrôle « Horizon 1% maison » est identique à celle de l'EEQ CQ19.1JA car les deux contrôles ont un taux de mutation pratiquement identiques (0.02% de différence).

La valeur de l'allèle 2 du contrôle « Horizon 1% maison » est légèrement supérieure à celle de l'EEQ CQ20.1JC car son taux de mutation est supérieur.

Les résultats obtenus sont cohérents, le taux de mutation du contrôle « Horizon 1% maison » est bien de 1%.

Conclusion Les résultats obtenus sont conformes avec les résultats attendus ; le contrôle « Horizon 1% maison » est considéré comme étant exact.

2) Répétabilité

Ce test a été réalisé sur deux ADN patient un ADN ayant un taux de mutation d'environ 50% (ADN muté fort) et le second ayant un taux de mutation d'environ 1% (ADN muté faible).

24 déterminations ont été réalisées pour chaque échantillon.

L'intensité de fluorescence du contrôle « Horizon 1% maison » est de 0.65. Celles obtenues pour l'ADN muté faible, lors de la répétabilité, sont comprises entre 0.73 et 0.84, ce qui le situe bien, au-dessus du contrôle « Horizon 1% maison ». Le statut mutationnel de l'ADN muté bas reste inchangé.

REPETABILITE "DETECTION DE LA MUTATION <i>Jak2V617F</i> " 18/05/2018							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne intensité fluorescence	Ecart type intensité fluorescence	CV %	Résultats obtenus pour les 24 valeurs	CV Limite pour les deux allèles %	Conclusion
		allele1/allele2	allele1/allele2	allele1/allele2			
ADN muté faible(environ 1%)	24	4,07 / 0,78	0,06 / 0,03	1,50 / 3,62	muté faible	5	CONFORME
ADN muté fort (environ 50%)	24	3,85 / 2,83	0,08 / 0,05	1,97 / 1,67	muté haut	5	CONFORME

Tableau de résultats Cf. Annexe XVIII-A

Conclusion Le CV de répétabilité est inférieur au CV retenu par le laboratoire. Les résultats obtenus correspondent aux résultats attendus par le laboratoire, la méthode est considérée comme conforme aux exigences et aux performances attendues. La détection de la mutation *JAK2V617F* est donc répétable

3) Fidélité intermédiaire

Pour évaluer cette performance, nous avons exploité les valeurs des contrôles « Horizons 1% maison », « Horizons 50% » et « Horizon WT » passés dans chaque série. 12 séries ont été réalisées.

FIDELITE INTERMEDIAIRE "DETECTION DE LA MUTATION <i>Jak2V617F</i> " : Période du 22/06/2017 au 04/12/2017							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	Résultats obtenus pour les 12 valeurs	CV Limite pour les deux allèles %	Conclusion
		allele1/allele2	allele1/allele2	allele1/allele2			
Horizon 1%	12	4,26 / 0,66	0,15/ 0,02	3,45/ 2,45	Muté	5%	CONFORME
Horizon 50%	12	3,68 / 3,67	0,11/ 0,12	3,01 / 3,19	Muté	5%	CONFORME
Horizon Wt	12	4,24 / 0,55	0,14 / 0,02	3,36/ 3,59	Non muté	5%	CONFORME

Tableau de résultats Cf. Annexe XVIII-B

Conclusion Le CV de la fidélité intermédiaire est inférieur celui retenu par le laboratoire. Les résultats obtenus correspondent aux résultats attendus par le laboratoire, la méthode est considérée comme conforme aux exigences et aux performances attendues.

4) Variabilité inter-opérateurs

Ce paramètre a été évalué en exploitant les résultats des contrôles internes obtenus sur 12 séries effectuées principalement par deux opérateurs HA et MT

VARIABILITE INTER OPERATEUR "DETECTION DE LA MUTATION <i>Jak2V617F</i> ": Série 1 à 12 : Période du 22/06/2017 au 04/12/2017								
Echantillons	Opérateur	Nombre de valeurs (N)	Moyenne Fluorescence	Ecart-type Fluorescence	CV (%)	Résultats obtenus	CV Limite pour les deux allèles %	Conclusion
			allele1/allele2	allele1/allele2	allele1/allele2			
Horizon 1%	HA	8	4,19 / 0,66	0,11 / 0,02	2,62 / 3,03	Muté	5%	CONFORME
	MT	3	4,43 / 0,63	0,10 / 0,01	2,25 / 1,53	Muté	5%	CONFORME
Horizon 50%	HA	8	3,63 / 3,63	0,09 / 0,12	2,47 / 3,3	Muté	5%	CONFORME
	MT	3	3,81 / 3,75	0,05 / 0,10	1,31 / 2,66	Muté	5%	CONFORME
Horizon WT	HA	8	4,17 / 0,55	0,12 / 0,02	2,87 / 3,63	Non muté	5%	CONFORME
	MT	3	4,40 / 0,55	0,03 / 0,03	0,68 / 5,45	Non muté	5%	CONFORME

Tableau de résultats Cf. Annexe XVIII-C

Conclusion Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différences significatives entre les différents opérateurs notamment pour le contrôle « Horizon 1% maison » qui est notre seuil de décision de diagnostic. La valeur du CV obtenue est inférieure au CV retenu par le laboratoire, la méthode est considérée comme conforme pour les différents opérateurs, la variabilité inter opérateurs semble être satisfaisante.

Toutefois nous constatons que les séries sont principalement effectuées par le même opérateur, ce qui démontre un dysfonctionnement dans la gestion de l'occupation des postes. Une amélioration sera apportée en créant des plannings de paillasse.

5) Contamination inter-échantillons

Il est important de montrer que la présence d'un ADN muté proche d'un ADN non muté sur la plaque de PCR n'influe pas sur le résultat de celui-ci.

Pour cela, deux échantillons d'ADN patients ayant des statuts mutationnels différents ont été utilisés

ADN JEG statut mutationnel muté (taux de mutation compris entre 25% et 50%)

ADN BRE statut mutationnel non muté

Le protocole suivant a été utilisé dans une même série (sur une même plaque), nous avons effectué trois amplifications successives de l'ADN JEG (ADN JEG1, ADN JEG2, ADN JEG 3 ; de moyenne « m JEG ») suivi de trois amplifications de l'ADN BRE (ADN BRE 1, ADN BRE 2, ADN BRE 3) ; nous avons répété cette séquence trois fois.

JEG1JEG2JEG3BRE1BRE2BRE3JEG1JEG2JEG3BRE1BRE2BRE3JEG1JEG2JEG3
BRE1BRE2BRE3

BRE1 échantillon susceptible d'être contaminé

BRE3 échantillon susceptible de ne pas être contaminé

Pour les deux allèles les moyennes m BER1 et m BER3 ont été calculées et le pourcentage de contamination calculé selon la formule

$$\text{Contamination en \%} = (m \text{ BRE1} - m \text{ BRE3}) / (m \text{ JEG} - m \text{ BRE3}) \times 100$$

- **Résultats**

ALLELE 1 m **BRE1** = 4.00 Contamination en %= -5.1%
 m **BRE3** = 3.98
 m **JEG** = 3.59

ALLELE 2 m **BRE1** = 0.46 Contamination en %= 0.00%
 m **BRE3** = 0.46
 m **JEG** = 2.79

Conclusion Les pourcentages de contamination obtenus ne montrent aucune contamination inter échantillon. Les résultats obtenus correspondent aux résultats attendus par le laboratoire, il n'y a pas de contamination inter échantillons.

Tableau de résultats Cf. Annexe XVIII-D

6) Interférences

A l'heure actuelle aucune particularité de ce paramètre n'est décrite dans la bibliographie pour la technique.

7) Exactitude

Le service participe depuis 2014 au programme d'évaluation externe de la qualité (EEQ) de l'association du GBMHM pour la détection de la mutation « JAK2 V617F ». Deux évaluations sont réalisées par an comprenant chacune 4 échantillons à analyser.

En décembre 2016, nous avons eu une non-conformité pour un des quatre échantillons de l'EEQ CQ19.1. (Résultat attendu présence de la mutation ; Résultat rendu absence de la mutation).

La cause étant l'utilisation, à l'époque, d'une lignée Human Erythroleukemia (HEL) (utilisée pour la calibration et diluée de 0.1 à 100%) dans laquelle il y avait une duplication de la mutation. De ce fait, le taux de mutation de départ était supérieur à 100% entraînant une surestimation de notre point à 1%.

Les actions curatives prises par le laboratoire ont été

- ✓ L'abandon de la lignée « HEL » et utilisation des deux contrôles commercialisés « Horizons 50% » et « Horizon WT » à partir de mars 2017.
- ✓ Une deuxième analyse du contrôle EEQ « CQ19.1 » en utilisant les nouveaux contrôles « Horizon » (Résultat obtenu présence de la mutation avec le contrôle « Horizon 1% maison »).

✓ Une analyse de tous les dossiers rendus entre le dernier EEQ conforme (juin 2016) et juin 2017. Pour deux patients le résultat a été rendu « douteux à contrôler » avec l'ancien contrôle. L'analyse a été refaite pour ces deux patients sur de nouveaux échantillons le résultat a été rendu « muté » avec le nouveau contrôle « Horizon 1% maison ». Il n'y a donc pas d'impact clinique. Depuis que nous utilisons les contrôles « Horizons », une non-conformité a été attribuée à un autre EEQ (CQ20.1JC) pour des raisons de rendus des résultats. En effet, nous l'avions trouvé « douteux », à la limite du 1%. (Valeur d'intensité de fluorescence de l'allèle 2 était de 0.63 et 0.68 celle du contrôle « Horizon 1% maison » de 0.68). Dans le rendu des résultats nous ne pouvions rendre que « absence » ou « présence ». Nous avons laissé « douteux », et le GBMHM a enregistré notre résultat comme étant « absence ». (Alors que la mutation était présente à un faible taux faiblement décelable).

Conclusion Mise à part ces deux échantillons, EEQ CQ19.1 EEQ CQ20.1JC, les résultats de toutes les autres enquêtes depuis 2014 sont conformes. En tout, cela représente 32 échantillons de contrôle. La méthode est considérée comme étant exacte.

NB pour la non-conformité du EEQ CQ19.1, une fiche qualité a été enregistrée dans le logiciel qualité « Kalilab » ce qui permet de tracer et de mieux maîtriser la gestion des EEQ. [Cf. Annexe XXV](#)

8) Sensibilité – spécificité

➤ Définitions

- **Sensibilité** Probabilité qu'un dispositif donne un résultat positif en présence du marqueur cible. Elle se calcule selon la formule

Sensibilité diagnostique= Nombre de vrais positifs / (Nombre de vrais positifs + nombre de faux négatifs) x 100

- **Spécificité** Probabilité qu'un dispositif rende un résultat négatif en l'absence d'un marqueur cible. Elle se calcule selon la formule

Spécificité diagnostique= Nombre de vrais négatifs / (Nombre de vrais négatifs + nombre de faux positifs) x 100

➤ But de l'évaluation

Les performances de la technique doivent viser une spécificité et une sensibilité de 100%.

➤ Calcul et résultat

Les pourcentages de la sensibilité et de la spécificité sont calculés en exploitant les résultats des EEQ (32 EEQ au total) obtenus lors des enquêtes du programme d'évaluation externe de la qualité de l'association du GBMHM. 24 EEQ datant d'avant la mise en place des nouveaux contrôles

« Horizons » en 2017 ont été ré analysés avec la technique actuelle. Les résultats sont inchangés sauf pour un EEQ le CQ19.1JA, on obtient le résultat attendu par le GBMHM. Cf. *Annexe XIX*

Contrôles EEQ Nombre total 32	Résultats du GBMHM Nombre d'EEQ	Résultats du laboratoire Nombre d'EEQ
Vrais positifs	22	21
Vrais négatifs	10	10
Faux positifs	/	0
Faux négatifs	/	1

Sensibilité= $21 / (21+1) \times 100 = 100\%$

Spécificité= $10 / (10+0) \times 100 = 95.5\%$

NB : sans problème de nomenclature pour ce « faux négatif », nous aurions eu une sensibilité de 100%.

➤ **Conclusion** les résultats obtenus correspondent aux résultats attendus, nous considérons la méthode sensible et spécifique.



Cf. *Annexes XX-A et XX-B*

9) Étude de la robustesse

a) Étude de la stabilité des sondes et amorces

• Les sondes

Les sondes et les amorces sont les seuls réactifs qui n'ont pas de date de péremption. Seules les températures de conservation nous sont fournies par les fournisseurs (-20°C). Aussi, pour déterminer la stabilité de celles-ci, nous avons déterminé un intervalle de référence de fluorescence de base en nous basant sur le niveau de fluorescence de base des fluorochromes émetteurs « FAM » et « VIC » des sondes respectivement mutée et non mutée au niveau du puit de l'échantillon d'eau (contrôle négatif) et ce pendant une période de 11 mois (juin 2017-mai 2018). Les moyennes, écarts-types et les CV ont été calculés.

Fluorescence de base des fluorochromes des sondes FAM et VIC						
sondes	Nombre de séries	Moyenne	Ecart-type	CV%	2ET	intervalle de référence des fluorochromes
Jak mut-PR FAM Lot: 590-20-1	23	433100	57386	13,20%	114772	318328  547872
jak wt-PR VIC Lot: 590-10-1	23	374566	36649	9,78%	73298	301268  447864

L'intervalle de référence est compris entre -2ET et +2ET de la moyenne de fluorescence de base de chaque sonde. Chaque série est validée d'une part en tenant compte de la valeur de fluorescence de base de chaque fluorochrome et d'autre part par la validité des contrôles « horizons » à chaque série.

Les sondes étant utilisées depuis mars 2014, nous avons relevé les fluorescences de base des sondes au niveau des échantillons « H2O NC » des premiers runs effectués respectivement en 2014, 2015, 2016 et 2017 et vérifié leur niveau de fluorescence de base.

Année	Fluorescence de base des fluorochromes		
	Lignée HEL/ Horizons	VIC	FAM
2014	Lignée HEL	442427	560606
2015	Lignée HEL	442763	411363
2016	Lignée HEL	361303	484879
2017	Lignée HEL	314599	408278
2018	Horizons	360725	433782
<i>tableau 5: relevé de la fluorescence de base des fluorochromes "FAM" et "VIC" de la 1ère série de chaque année</i>			

Conclusion aucune variation significative de la fluorescence de base des fluorochromes émetteurs « FAM » et « VIC » n'a été constatée. La fluorescence de base est comprise dans l'intervalle de référence de fluorescence, elles ont donc une stabilité d'au moins 4 ans à -20°C.

Tableau de résultats Cf. Annexe XXI

- **Les amorces**

Les amorces sont utilisées depuis août 2008 et conservées à -20°C. Étant utilisées avec les sondes et les contrôles « Horizons » qui valident les séries, leur durée de stabilité est d'au moins de 10 ans à -20°C.

Conclusion les amorces ont une stabilité d'au moins 10 ans à -20°C.

b) Variations de température de dénaturation et d'hybridation

Pour évaluer l'impact d'une variation de la température de dénaturation ou d'hybridation dans le bloc chauffant du Taqman 7500 Fast, nous avons utilisé les échantillons (ADN « muté fort 50% », ADN « muté bas 1% ») testés lors du test de la répétabilité (24 valeurs). La moyenne des 24 valeurs obtenues est indiquée dans le tableau ci-dessous « test référence ».

Des PCR ont été réalisées en modifiant uniquement que les températures de dénaturation et/ou d'hybridation de +/- 1°C par rapport au programme de référence selon le mode opératoire indiqué dans le tableau ci-dessous.

Ce test a été réalisé six fois pour chaque échantillon. La moyenne des valeurs obtenues est indiquée dans le tableau ci-dessous.

Les contrôles internes « Horizons 1% maison », « horizon 50% » et « Horizon WT » ont été amplifiés dans les mêmes conditions que celles des échantillons.

Tous les autres paramètres de la PCR (volume de prise d'essai, concentration en ADN des échantillons, volume du Mix, nombre de cycles d'amplification) restent inchangés.

TESTS	Nombres de cycles (n)	Volume µl	T° dénaturation (°C)	Température hybridation (°C)	ADN muté fort	ADN muté bas	Contrôles Horizons			RESULTATS
			Temps :secondes	Temps :secondes	Allèle 2	Allèle 2	WT	1% maison	50%	
Référence	50	20	92°C 15"	60°C 1'	2,83	0,78	0,53	0,65	3,06	Muté
1	50	20	93°C 15"	60°C 1'	2,71	0,74	0,49	0,6	2,82	Muté
2	50	20	92°C 15"	61°C 1'	2,51	0,64	0,42	0,52	2,64	Muté
3	50	20	93°C 15"	61°C 1'	2,4	0,58	0,4	0,49	2,48	Muté
4	50	20	91°C 15"	60°C 1'	2,81	0,76	0,51	0,64	2,92	Muté
5	50	20	92°C 15"	59°C 1'	3,11	0,94	0,64	0,8	3,23	Muté
6	50	20	91°C 15"	59°C 1'	3,08	0,91	0,62	0,78	3,21	Muté

Tableau de résultats Cf. Annexes XXII-A, XXII-B, XXII-C, XXII-D, XXII-E, XXII-F

Les résultats des allèles 2 obtenus pour chaque test des deux ADN ont été comparés à celui obtenu pour le test « référence ». Aucune différence significative du résultat n'a été constatée quel que soit le taux de mutation de l'échantillon. Le résultat pour les deux ADN reste inchangé. Les deux ADN sont mutés.

Conclusion La variation d'un degré de la température de dénaturation ou d'hybridation en plus ou en moins par rapport à la valeur de référence n'a pas d'impact sur le résultat de la PCR « détection de la mutation JAK2 V617F ».

c) Variation de la quantité d'ADN dans la prise d'essai

Pour évaluer l'impact d'une variation de la quantité d'ADN dans la prise d'essai, nous avons utilisé les échantillons testés lors du test de la répétabilité (ADN « muté fort », ADN « muté bas »). La moyenne des 24 valeurs obtenues est indiquée dans le tableau ci-dessous « test référence ».

Des PCR ont été réalisées selon le programme d'amplification de référence, seul le volume de la prise d'essai d'ADN a été modifié de +/- 30% et de +/- 50% par rapport à la prise d'essai de référence qui est de 2.5µl. Les volumes testés sont 1.3µl, 1.8µl, 3.3µl, 3.8µl.

Ce test a été réalisé en triplicate pour chaque échantillon. La moyenne des valeurs obtenues est indiquée dans le tableau ci-dessous.

Les contrôles internes « Horizons » ont été amplifiés selon le protocole de référence.

Tests	Prise d'essai	ADN muté fort	ADN muté faible	Contrôles Horizons Allèle 2		
	Volume µl	Allèle 2	Allèle 2	WT	1%	50%
Référence	2,5	2,83	0,78	0,53	0,65	3,06
Résultats attendus		Muté	Muté	Non muté	Muté	Muté
1	1,3	2,69	0,7	0,51	0,63	2,92
2	1,8	2,82	0,81	0,51	0,63	2,92
3	3,3	2,85	0,79	0,51	0,63	2,92
4	3,8	2,86	0,81	0,51	0,63	2,92
Reésultats obtenus		Muté	Muté	Non muté	Muté	Muté
Conclusion		Conforme	Conforme	Conforme		

Tableau de résultats Cf. Annexes XXIII

Les résultats des allèles 2 obtenus pour chaque test des deux ADN ont été comparés à celui obtenu pour le test de référence, aucune différence significative du résultat n'a été constatée quel que soit le niveau de mutation de l'échantillon. Le résultat des deux ADN patients reste inchangé, les deux ADN restent mutés.

Conclusion Une variation du volume de +/- 50% de la prise d'essai n'a pas d'impact sur le résultat de la PCR « détection de la mutation JAK2 V617F ».

d) Effet de bord

L'ADN d'un patient ayant la mutation (taux de mutation entre 12% et 50%) a été déposé dans les 96 puits d'une plaque de PCR, l'objectif étant de comparer les résultats de l'ensemble des puits de la plaque.

Celle-ci a été réalisée dans les conditions de référence au niveau programme d'amplification, prise d'essai et concentration de l'échantillon.

Les résultats obtenus pour l'allèle 2 sont Moyenne 2.07 ; Écart type 0.06 ; CV% 2.89%, le CV retenu par le laboratoire est de 5%.

Aucune différence significative du résultat n'a été constatée quel que soit le puits de la plaque utilisé. Le résultat du patient reste inchangé, son statut mutationnel reste inchangé ainsi que le taux de mutation.

Conclusion La position de l'échantillon sur la plaque n'a pas d'impact sur le résultat de la PCR « détection de la mutation *JAK2V617F* ».il n'y a pas d'effet de bord.

Tableau de résultats Cf. Annexes XXIV

C) Les améliorations

Il a été mis en place

- L'attribution d'un numéro de lot au contrôle « Horizon 1% maison ». Ce numéro est composé des numéros de lots des deux contrôles « Horizons » (WT et 50%) qui ont servi à sa réalisation et la date de 1^{ère} utilisation.
- Et traçabilité de l'opérateur ayant réalisé le contrôle ainsi que la date de réalisation.

D) conclusion

La performance de la PCR « détection de la mutation *JAK2V617F* » n'est pas influencée par des variations de température de +/- 1°C du bloc chauffant ni par des variations de +/- 30% de la quantité d'ADN présente dans le Mix de la réaction ni par des variations de – 50% et + 100% de la concentration en ADN de l'échantillon ce qui rend la méthode robuste dans la pratique quotidienne du service.

Les pipettes nécessaires à la réalisation du contrôle « Horizon 1% maison » et aux dépôts des échantillons dans la plaque ne sont pas critiques.

4.3 Les améliorations à prévoir ajustements pour

4.3.1 Le sous processus « extraction automatisée de l'ADN et dosage »

Il est prévu

- Le stockage des échantillons sanguins sur la pailasse à température ambiante comme le préconise le fournisseur.
- La création d'un code personnalisé pour chaque utilisateur de du QIASymphony afin d'améliorer la traçabilité au niveau de l'extraction.
- Une évaluation annuelle des performances de la fidélité intermédiaire du QIASymphony et du Nanodrop afin d'éviter les dérives.
- Une maintenance pour le Nanodrop.

4.3.2 Le sous processus « détection de la mutation JAK2 V617F »

Il est prévu

- La détermination de la durée de stabilité du contrôle « Horizon 1% maison » et par conséquent l'attribution d'une date de péremption.
- Une meilleure traçabilité de la préparation des aliquotes des sondes et des amorces (date de préparation, date de 1^{ère} utilisation, opérateur, numéro de lot).
- Le dépôt en duplicate des contrôles internes « Horizons » sur la plaque comme les échantillons à analyser.

Il est également prévu une harmonisation pour la validation des résultats en créant une « zone grise ».

Actuellement, l'interprétation des résultats pour la détection de la mutation JAK2 V617F se fait en tenant compte des valeurs d'intensité de fluorescence des contrôles « Horizon maison 1% » et « Horizon WT » et plus précisément en comparant la valeur d'intensité de fluorescence de l'allèle 2 de l'échantillon avec celle du contrôle « Horizon maison 1% ».

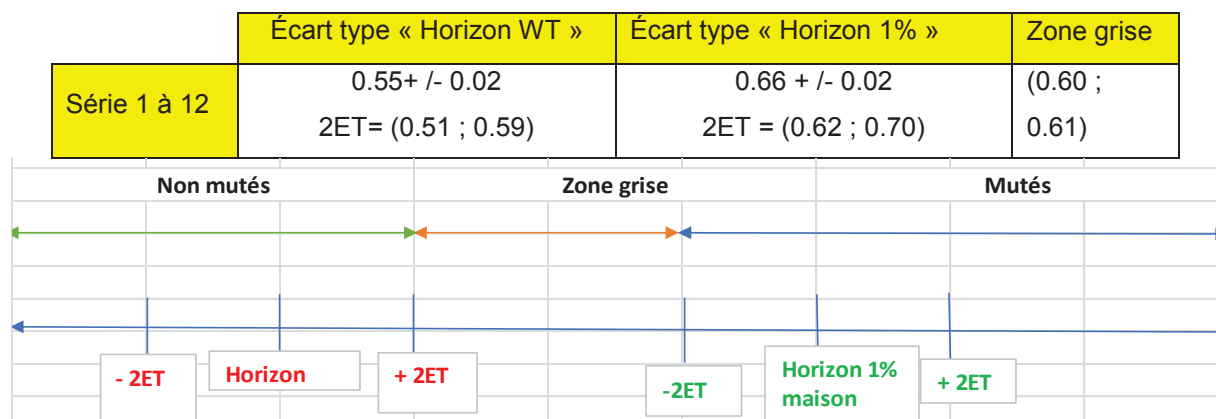
- Si l'intensité de fluorescence de l'allèle 2 de l'échantillon > à l'intensité fluorescence de l'allèle 2 du contrôle « Horizon maison 1% » présence de la mutation.
- Si l'intensité de fluorescence de l'allèle 2 de l'échantillon < à l'intensité de fluorescence du contrôle « Horizon maison 1% » absence de la mutation.

Or, nous avons constaté que les valeurs des deux contrôles « Horizon maison 1% » et « Horizon WT » sont proches et varient à chaque run et de ce fait il existe une zone dans laquelle le risque de rendre un résultat faux existe Nous la nommons « zone grise ».

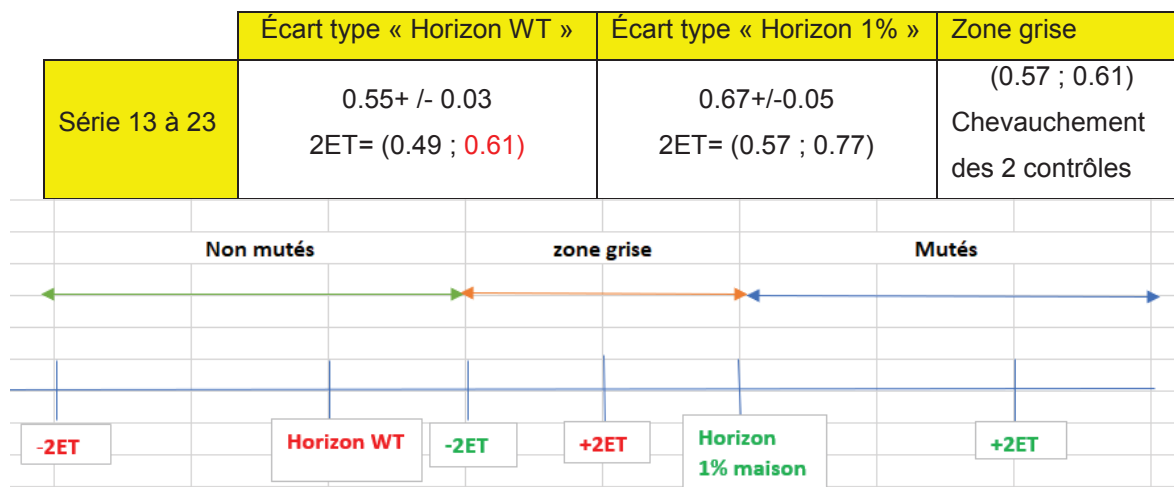
Pour cela, nous avons exploité les résultats (écart type « ET ») obtenus pour les contrôles lors du test de la fidélité intermédiaire et déterminé une zone grise de la façon suivante

$$+2ET \text{ « Horizon WT »} < \text{Zone grise} < \text{valeur de } -2ET \text{ « Horizon maison 1\% »}$$

Tous les résultats compris dans la zone grise devraient être rendus douteux et contrôlés sur un nouveau prélèvement.



Nous avons constaté lors d'un changement de lots des contrôles que les résultats (écarts types) obtenus lors du test de la fidélité intermédiaire montraient un chevauchement du contrôle « Horizon WT » au niveau de la zone grise.



La 1^{ère} règle adoptée correspondant à « si l'intensité de fluorescence de l'allèle 2 de l'échantillon < à l'intensité de fluorescence du contrôle « Horizon maison 1% » absence de la mutation » n'est pas suffisante pour assurer la fiabilité des résultats car un résultat se situant dans cette zone grise serait rendu non muté avec le contrôle « Horizon WT » et muté avec le contrôle « Horizon 1% maison ».

Cela nous a amené à adopter une règle pour formaliser l'interprétation des résultats.

Le résultat sera rendu de la façon suivante :

- Si absence d'un chevauchement des écarts types des deux contrôles
 - ✓ « Muté » pour tout résultat dont la valeur de l'intensité de fluorescence est supérieure à celle du contrôle « Horizon 1% maison ».
 - ✓ « Douteux » pour tout résultat dont la valeur de l'intensité de fluorescence est comprise entre +2ET du contrôle « Horizon WT » et la valeur -2ET du contrôle « Horizon 1% maison ».
 - ✓ « Non muté » tout résultat dont la valeur de l'intensité de fluorescence est inférieure à +2ET du contrôle « Horizon WT ».

- Si présence d'un chevauchement des écarts types des deux contrôles
 - ✓ « Muté » pour tout résultat dont la valeur de l'intensité de fluorescence est supérieure à celle du contrôle « Horizon 1% maison ».
 - ✓ « Douteux » pour tout résultat dont la valeur de l'intensité de fluorescence est comprise entre - 2ET du contrôle « Horizon 1% maison » et la valeur de l'intensité de fluorescence du contrôle « Horizon 1% maison ».
 - ✓ « Non muté » tout résultat dont la valeur de l'intensité de fluorescence est inférieure à - 2ET du contrôle « Horizon 1% maison ».

Cette zone grise sera prédéterminée à chaque changement de lots des contrôles. Aussi, nous allons faire la demande auprès de notre fournisseur d'une réservation de lots pour l'année.

- La mise en place d'un indicateur : les délais du rendu des résultats.

4.3.2 Améliorations communes aux deux sous processus

Il est prévu

- La pose de sondes Sirius dans les pièces technique avec l'enregistrement des températures dans un logiciel et formation du personnel au logiciel pour la gestion des alarmes.
- La gestion des maintenances de nos appareils critiques (QIASymphony et Taqman) dans le logiciel de qualité « Kalilab ».
- La rédaction de documents manquants (enregistrements, modes opératoires, des procédures) tels que la grille d'habilitation pour l'utilisation des appareils et la réalisation de leur maintenance, des plannings de maintenance, une procédure dégradée en cas de panne.
- La création d'un tableau de bord selon le modèle ci-dessous, pour le suivi de tous nos EEQ. Il servira pour l'habilitation des techniciens et des biologistes (maintien des compétences), la performance des automates, des méthodes et facilitera la gestion documentaire.

Organisme	Code identifiant EEQ	Pathologie	Cas N°	Nom du gène	Date de reception EEQ	Date de l'analyse	Automate	Technicien opérateur	biologiste valideur et date de validation	date de transmission des résultats	date de retour des résultats	conclusion ou note de l'organisme évaluateur	conclusion du laboratoire OK ou non-conformité
-----------	----------------------	------------	--------	-------------	-----------------------	-------------------	----------	----------------------	---	------------------------------------	------------------------------	--	--

- La mise en place d'un indicateur : le taux d'erreurs de saisies des résultats.

V CONCLUSION

A mon inscription au « D.U Assurance Qualité au Laboratoire de Biologie Médicale », les notions que j'avais concernant la constitution d'un dossier de validation de méthode et de la qualité en générale, étaient très vagues.

C'est ainsi que j'ai pu commencer à constituer le tout premier dossier de validation de méthode du secteur, entraînant au passage une émulation au sein de mes collègues et biologistes.

Conduire ce projet s'est révélé être, d'un point de vue professionnel, une expérience très enrichissante ; il m'a permis de me familiariser avec les méthodologies applicables à la démarche qualité (Roue de Deming, cartographie, méthode d'Ishikawa « 5M ») et de m'investir plus précisément au sein de mon secteur.

Outre l'objectif de satisfaire aux exigences de la norme NF EN ISO 15189, les conclusions des travaux effectués ont mis en évidence la nécessité de mettre en place des actions correctives ; En effet, nous avons pu constater lors de l'évaluation de la variabilité inter-opérateur pour la détection de la mutation, une mauvaise gestion de l'occupation des postes par manque de plannings.

Répondre aux exigences de la norme NF EN ISO 15189 est devenue une priorité au sein du service ; la démarche qualité, de par ses exigences (maîtrise des risques), nous invite à examiner de façon plus précise la technique et nous amène ainsi vers une amélioration continue de la qualité.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) Development of a Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of the *JAK2* V617F Mutation
Journal of Molecular Diagnostics. Vol .9 N°1.February 2007.
- 2) Norme NF EN ISO 15189
- 3) SH-REF-02, Révision 05
- 4) SH-INF-50, révision 5, applicable le 01/09/2018, COFRAC
- 5) SH-GTA-04, révision 01
- 6) SH-FORM-43, révision 01 15 avril 2015
- 7) « Validation de méthodes pour la recherche de mutations en génétique somatique »
Septembre 2014. (*Institut National du Cancer*)

Annexes

ANNEXE I ORGANIGRAMME POLE BIOLOGIE MEDICALE ET PATHOLOGIE-HOPITAUX UNIVERSITAIRES PITIE SALPETRIERE

ANNEXE II ORGANIGRAMME SERVICE HEMATOLOGIE BIOLOGIQUE- HOPITAUX UNIVERSITAIRES PITIE SALPETRIERE CHARLES FOIX

ANNEXE III LOCALISATION DES DIFFÉRENTS SECTEURS D'ACTIVITÉS DU PÔLE BIOLOGIE MÉDICALE ET PATHOLOGIE SITE PITIÉ-SALPÊTRIÈRE

ANNEXE IV ORGANISATION QUALITE DU POLE DE BIOLOGIE MEDICALE ET PATHOLOGIE HOPITAUX UNIVERSITAIRES PITIE SALPETRIERE CHARLES FOIX

ANNEXE V VUE D'ENSEMBLE DE L'ANALYSE POUR LA DÉTECTION DE LA MUTATION *JAK2* V617F

ANNEXE VI BIBLIOGRAPHIE

ANNEXE VII IDENTIFICATION DES PRINCIPAUX RISQUES POTENTIELLEMENT

ANNEXE VIII RÉPÉTABILITÉ DE L'EXTRACTION AUTOMATISÉE DE L'ADN SUR SANG TOTAL EDTA

ANNEXE IX VARIATION DES CONCENTRATIONS DE L'ECHANTILLON D'ADN

ANNEXE X FIDÉLITÉ INTERMÉDIAIRE DE L'EXTRACTION AUTOMATISÉE DE L'ADN SUR SANG TOTAL EDTA

ANNEXE XI TEST DE CONTAMINATION SUR L'EXTRACTION AUTOMATISÉE DE L'ADN (SANG TOTAL EDTA)

ANNEXE XII PRÉSENTATION ET PRINCIPE DU SPECTROPHOTOMÈTRE « NANODROP ND-1000

ANNEXE XIII-A RÉPÉTABILITÉ DU DOSAGE DE L'ADN PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE

ANNEXE XIII-B FIDÉLITÉ INTERMÉDIAIRE DU DOSAGE DE L'ADN PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE

ANNEXE XIII-C VARIABILITÉ INTER-OPÉRATEUR DU DOSAGE DE L'ADN PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE

ANNEXE XIII-D CONTAMINATION INTER-ÉCHANTILLON

ANNEXE XIV SCHÉMA DE L'AMPLIFICATION DE FRAGMENTS D'ADN IN VITRO LA PCR

ANNEXE XV PRINCIPE DES SONDAS TAQMAN®

ANNEXE XVI DÉTECTION DU SEUIL DE POSITIVITÉ

ANNEXE XVII-A VALIDITÉ DU CONTRÔLE "HORIZON 1% MAISON"
TEST DE COMPARAISON CONTRÔLE HORIZON À 1% AVEC PIPETTE NON CERTIFIÉE VS CERTIFIÉE COFRAC

ANNEXE XVII-B VALIDITÉ DU CONTRÔLE "HORIZON 1% MAISON"
TEST DE COMPARAISON CONTRÔLE HORIZON À 1% PIPETTE NON CERTIFIÉE COFRAC VS EEQ CQ19.1JA (1,02%)

ANNEXE XVII-C VALIDITÉ DU CONTRÔLE "HORIZON 1% MAISON"
TEST DE COMPARAISON CONTRÔLE HORIZON À 1% PIPETTE NON CERTIFIÉE COFRAC VS EEQ CQ20.1JC (0,98%)

ANNEXE XVIII-A REPETABILITE DÉTECTION MUTATION JAK2 V617F SUR ADN BAS (FAIBLEMENT MUTÉ) ET ADN HAUT (TRÈS MUTÉ)

ANNEXE XVIII-B FIDELITE INTERMEDIAIRE DÉTECTION DE LA MUTATION JAK2 V617F SUR LES CONTRÔLES INTERNES

ANNEXE XVIII-C VARIABILITE INTER-OPERATEURS DÉTECTION DE LA MUTATION JAK2 V617F SUR LES CONTRÔLES INTERNES

ANNEXE XVIII-D TEST DE CONTAMINATION DÉTECTION MUTATION JAK2 V617F SUR ADN MUTÉ ET ADN NON MUTÉ

ANNEXE XIX ETUDE DE L'EXACTITUDE

ANNEXE XX-A SPÉCIFICITÉ ET SENSIBILITÉ ANALYTIQUE

ANNEXE XX-B SPÉCIFICITÉ ET SENSIBILITÉ

ANNEXE XXI STABILITÉ DES SONDÉS ET AMORCES

ANNEXE XXII-A À F VARIATION DE LA TEMPÉRATURE DE DÉNATURATION ET/OU D'HYBRIDATION

ANNEXE XXIII VARIATION DE LA QUANTITÉ D'ADN DANS LA PRISE D'ESSAI

ANNEXE XXIV EFFET DE BORD

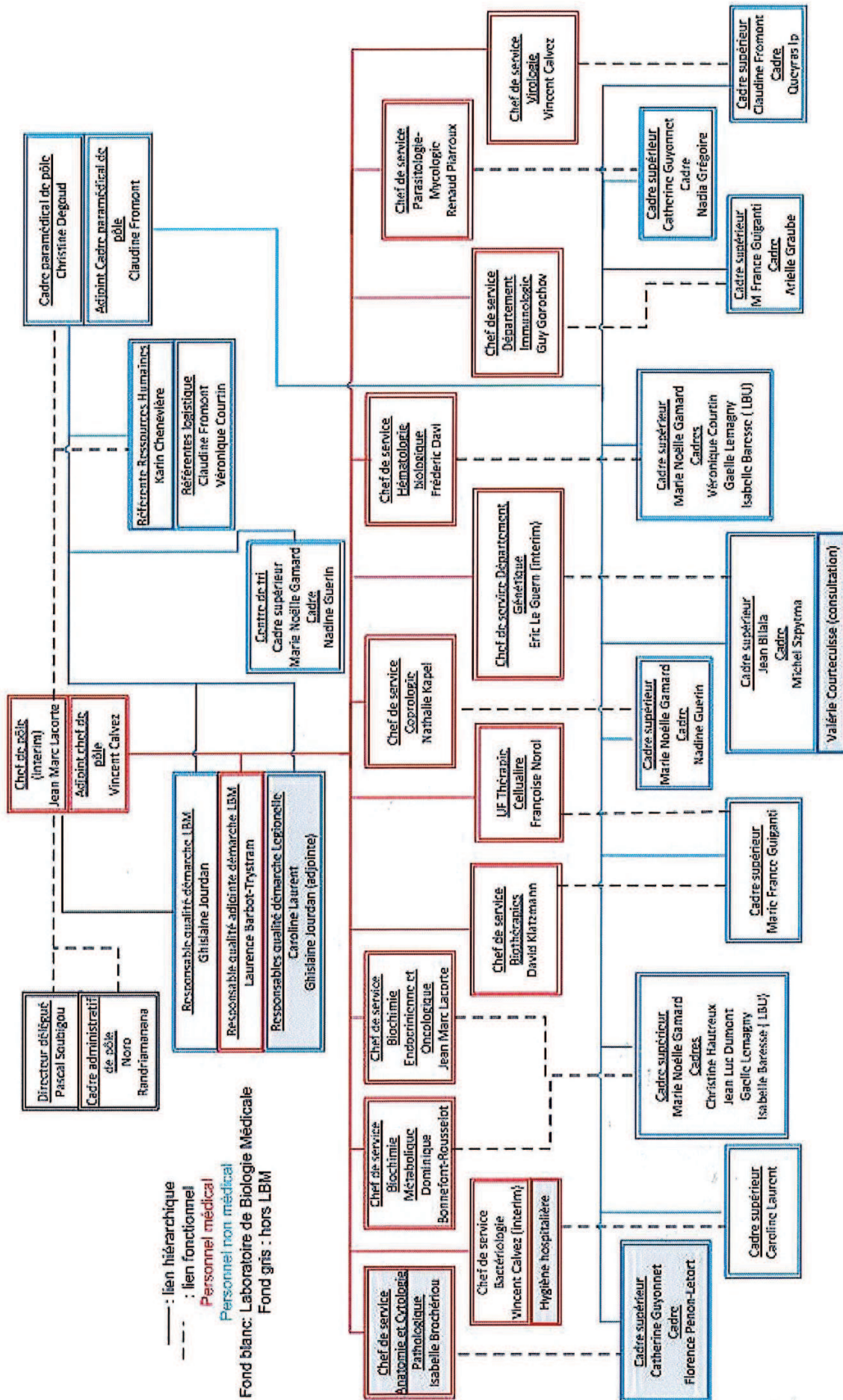
ANNEXE XXV FICHE DE NON CONFORMITÉ EEQ CQ19.1 JA

Résumé

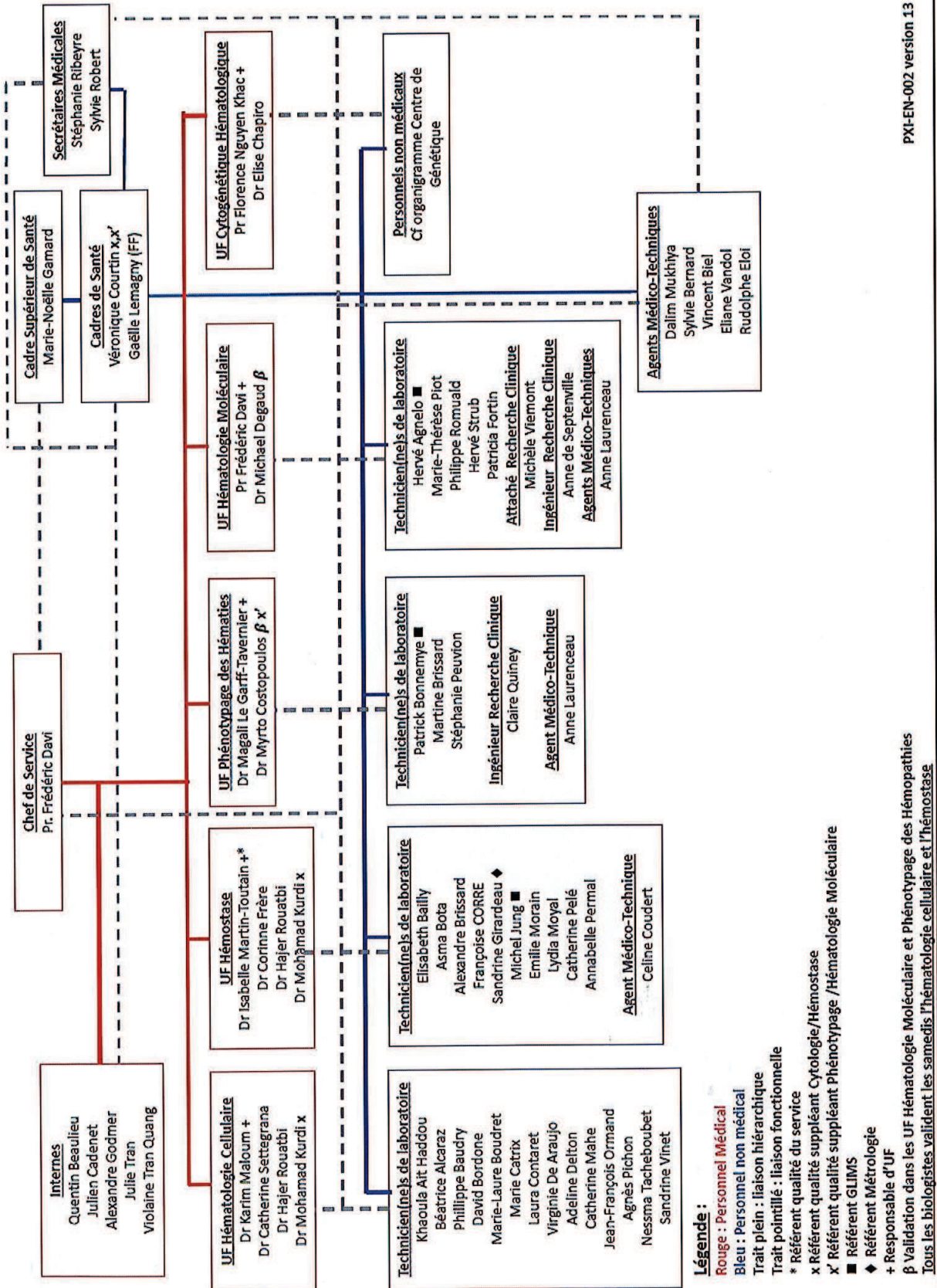
Dans le cadre de l'accréditation de notre UF d'Hématologie Moléculaire selon la norme NF EN ISO 15189, nous allons constituer notre premier dossier de vérification/validation de méthode sur l'examen « détection de la mutation *JAK2 V617F* ».

Au cours de ce processus, une méthode d'extraction automatisée de l'ADN en portée A et une méthode d'amplification par PCR en portée B ont été vérifiées/validées selon les critères du SH-FORM-43.

Ce mémoire décrit la méthodologie utilisée, les paramètres évalués pour chaque méthode, les résultats obtenus, l'interprétation de l'évaluation des performances ainsi que les améliorations apportées à l'ensemble du processus.



HOPITAUX UNIVERSITAIRES PITIE SALPETRIERE CHARLES FOIX

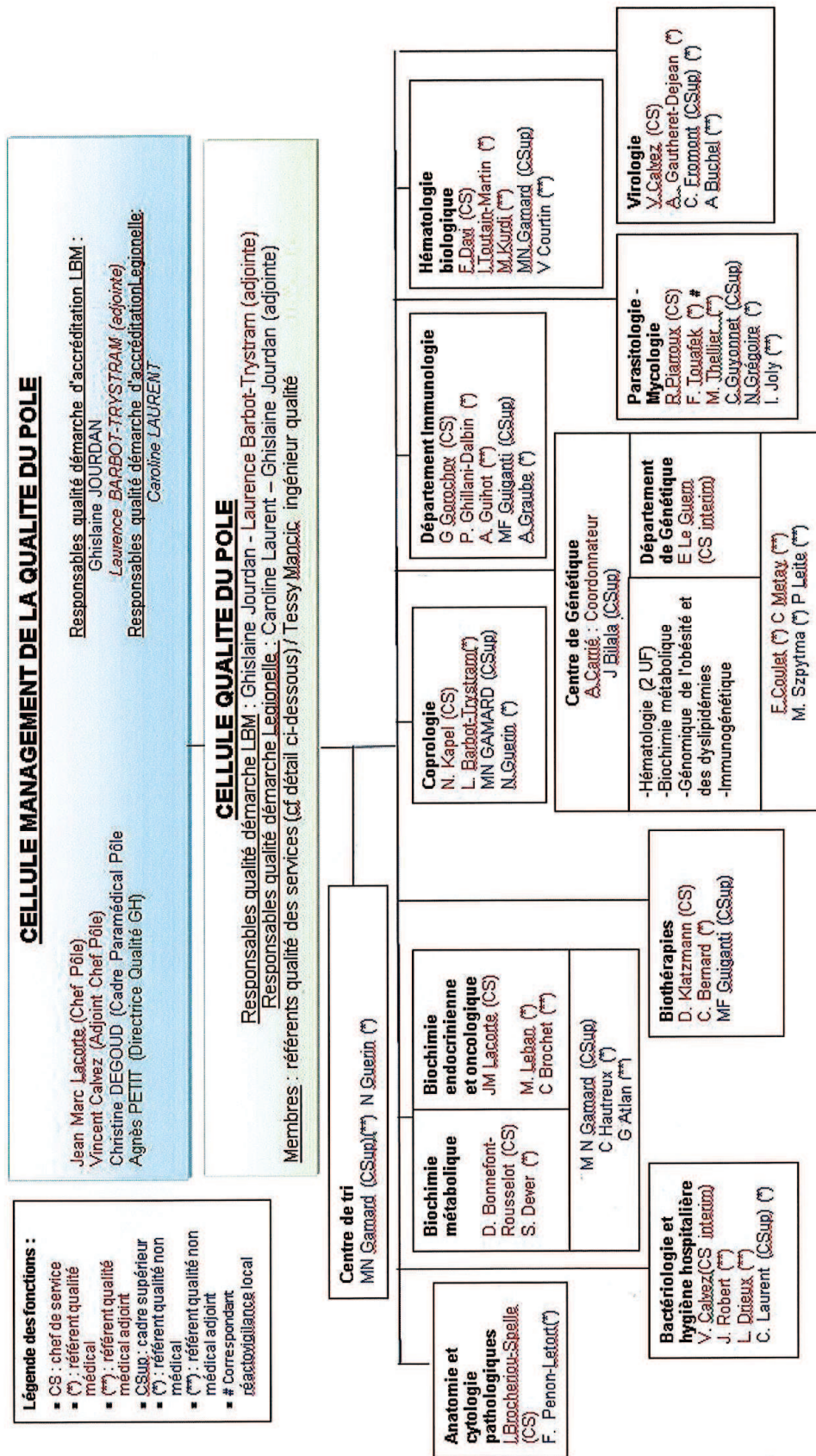


Annexe III : Localisation des différents secteurs d'activités du pôle Biologie Médicale et Pathologie Site Pitié-Salpêtrière

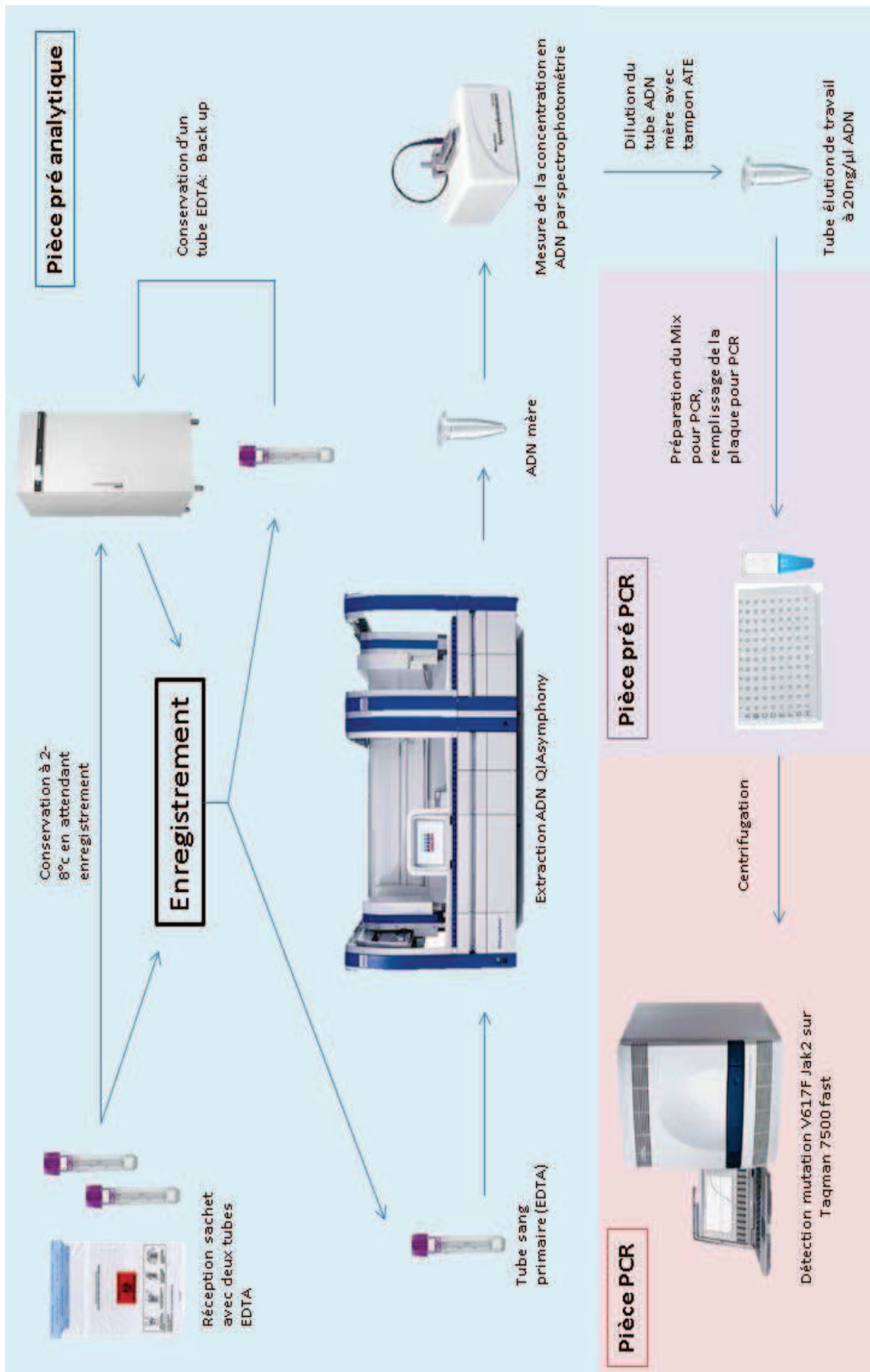


- 1** Parasitologie et Mycologie, Hématologie (biologie moléculaire)
- 2** Bactériologie- Hygiène, Biochimies, Hématologie, Centre de tri des examens
- 3** virologie et département d'Immunologie **8** hématologie (immuno phénotypage)
- 4** Coprologie **7** Département de Génétique
- 5 et 6** Urgences LBU **9** Anatomie et Cytologie

HOPITAUX UNIVERSITAIRES PITIE SALPETRIERE CHARLES FOIX



Annexe V : Vue d'ensemble de l'analyse pour la détection de la mutation V617FJak2



Development of a Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of the *JAK2* V617F Mutation

Elizabeth C. Wolstencroft,* Katy Hanlon,*[†]
Lorna W. Harries,*[†] Graham R. Standen,[‡]
Alexander Sternberg,[§] and Sian Ellard*[†]

From the Molecular Genetics Department,* Royal Devon and Exeter National Health Service (NHS) Foundation Trust, Exeter; Institute of Biomedical and Clinical Science,[†] Peninsula Medical School, Exeter; Department of Haematology,[‡] Bristol Royal Infirmary, Bristol; and Department of Haematology,[§] Royal Devon and Exeter NHS Foundation Trust, Exeter, United Kingdom

Achieving a specific diagnosis of polycythemia vera (PV) and other myeloproliferative disorders (MPDs) is often costly and complex. However, the recent identification of a V617F mutation in the JH2 domain of the *JAK2* gene in a high proportion of patients suffering from MPDs may provide confirmation of a diagnosis. This is an acquired mutation and, as such, may only be present in a small number of cells within a sample. There is therefore a clinical need for highly sensitive detection techniques. We have developed a sensitive real-time polymerase chain reaction (PCR)-based approach for both detection and quantification of the *JAK2* V617F mutation load, which allows determination of mutation status without the need for prior purification of granulocytes. We have performed a comparison of this assay with two previously published detection methods. Although an amplification refractory mutation system (ARMS) was shown to be slightly superior in terms of sensitivity, our real-time PCR method provides the potential for quantification of the *JAK2* V617F mutation, having potential future applications in the monitoring of minimal residual disease or predicting outcome of disease severity. (*J Mol Diagn* 2007, 9:42–46; DOI: 10.2353/jmoldx.2007.060083)

Myeloproliferative disorders (MPDs) are diseases characterized by proliferation of one or more myeloid cell lineages in the bone marrow and increased numbers of mature and immature cells in the peripheral blood. Examples include polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), and idiopathic myelofibrosis (IMF). These conditions are reported to have an annual inci-

dence of 2 to 3, 1.5 to 2, and 0.5 to 1.5 per 100,000 of the population, respectively.

The diagnosis of MPDs can be complex, expensive, and, in the case of ET, based solely on exclusion criteria. There is therefore a real clinical need for a faster, more specific, and more efficient test. The recent discovery of an acquired point mutation (c.1849G>T, p.V617F) within the Janus kinase 2 (*JAK2*) gene in a percentage of these patients has allowed a definitive diagnosis^{1–5} by providing a specific target for genetic testing. The mutation causes a valine to phenylalanine substitution (V617F) in the JH2 domain of the protein. This region has been suggested to play a direct role in the negative regulation of *JAK2* signaling.⁶ The substitution of a valine residue by the large aromatic amino acid phenylalanine is likely to disrupt this regulation. The *JAK2* V617F mutation has been shown to be present in the majority of patients with polycythemia vera (65 to 97%) and approximately half of patients with essential thrombocythemia (23 to 57%) or idiopathic myelofibrosis (43 to 50%).^{1,3,5}

The identification of this acquired mutation establishes the presence of a clonal disorder and has allowed new approaches to the diagnosis and treatment of these diseases.⁷ Because this acquired mutation may be present only in a small proportion of cells, sensitive detection methods are required. Previously published detection techniques include an allele-specific PCR that uses a single common reverse primer and two forward primers, one specific to the mutant allele and one that serves to generate an internal control product¹; an amplification refractory mutation system (ARMS), which uses two primer pairs to amplify specifically the normal and mutant sequences plus a positive control band in a single reaction⁵; direct fluorescent dye chemistry sequencing⁴; pyrosequencing⁵; restriction length polymorphism¹; and real-time assays based on melt-curve analysis.^{8,9} These approaches, although sensitive, are not quantitative. A recent publication demonstrated a correlation between hematological improvement and a reduction in the proportion of the *JAK2* V617F mutant alleles.¹⁰ An approach

Accepted for publication August 16, 2006.

Address reprint requests to Sian Ellard, Institute of Biomedical and Clinical Science, Peninsula Medical School, Molecular Genetics Department, Royal Devon and Exeter NHS Foundation Trust, Barrack Rd., Exeter, UK EX2 5DW. E-mail: Sian.Ellard@rdehc-tr.swest.nhs.uk.

Table 1. Sequence of Primers and Probes Used in Quantitative Real-Time PCR

<i>JAK2</i> forward primer	5'-AAGCTTTCACAAGCATTGGTTT-3'
<i>JAK2</i> reverse primer	5'-AGAAAGGCATTAGAAAGCCGTAGTT-3'
<i>JAK2</i> wild-type probe	5'-TCTCCACAGACACATAC (VIC)-3'
<i>JAK2</i> mutant probe	5'-TCCACAGAAACATAC (6-FAM)-3'

Genotype is determined by probes that differ only at the position of the mutation (indicated in bold and underlined). Probes specific to the wild-type (G) and mutant (T) alleles are labeled 5' with VIC and 6-FAM, respectively.

that permits both detection and quantitation may therefore be of use in the future.

In this study, we have developed and validated a novel real-time, quantitative allele-specific PCR assay using the TaqMan 7000 platform to detect the *JAK2* V617F mutation in a cohort of 200 patients suffering from a variety of MPDs. We have validated our approach by comparing these results with those achieved using two previously published methods in terms of sensitivity and specificity. The development of an approach that is able to quantify *JAK2* mutation load as well as detect the presence of the mutation may prove to have clinical use in the future.

Materials and Methods

Patients

Samples were received from 200 consecutive patients initially referred for investigation of one or more of high hemoglobin, platelet count, neutrophilia, or blood film suggestive of an MPD. Patients were classified by their MPD diagnosis into five categories: idiopathic myelofibrosis ($n = 9$), polycythemia vera ($n = 74$), essential thrombocythemia ($n = 51$), secondary polycythemia ($n = 49$), apparent polycythemia ($n = 7$), or other (for example, unclassifiable myeloproliferative disease or CMML) ($n = 10$). The diagnostic criteria for polycythemia vera, apparent polycythemia, and secondary polycythemia were derived from the British Committee for Standards in Hematology Guidelines (2004) (<http://www.bcshguidelines.com/pdf/polycythaemia.pdf>). Diagnosis of essential thrombocythemia and idiopathic myelofibrosis was based on World Health Organization criteria.¹¹ All cases of idiopathic myelofibrosis presented *de novo*. There was nothing histologically to imply a fibrotic transformation of polycythemia vera; however, this cannot be excluded. Those cases of myelofibrosis with known antecedent PV were classified as polycythaemia vera. This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki as revised in 2000.

Sample Preparation

Total DNA was extracted from peripheral blood using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Paisley, UK). DNA concentration and sample absorbance at 260 and 280 nm were measured using a ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). Samples with a 260:280 ratio less than 1.8 were rejected as unsuitable for analysis.

Real-Time Assay Development

Allele-specific real-time quantitative PCR was performed using the ABI Prism 7000 platform as previously described.¹² An assay specific for the *JAK2* V617F mutation was designed using the Assays-by-Design service from Applied Biosystems (Foster City, CA). The assay contains probes specific to the wild-type (G) and mutant (T) alleles labeled 5' with VIC and 6-fluorescein (6-FAM), respectively. Our assay uses a single set of primers, so mutation discrimination is achieved by the use of probes that differ only at the position of the V617F mutation (probe and primer sequences are given in Table 1). This approach has the advantage that detection of the *JAK2* mutation is independent of amplification efficiency. The labeling of the probes with different fluorophores allows detection of the two alleles in a single-tube analysis. The presence of a probe against the wild-type sequence acts as an internal control to assess quality of the DNA and also allows quantification of mutation load by calculation of a wild-type to mutant allele ratio.

PCR reactions mixture contained 10 μ l of TaqMan Universal PCR MasterMix (Applied Biosystems), 0.08 μ mol/L of each probe, 0.36 μ mol/L of each primer and 40 ng of DNA, in a total volume of 20 μ l. PCR conditions were 2 minutes at 50°C and 10 minutes at 95°C, followed by 50 cycles of denaturation for 15 seconds at 95°C and annealing/extension for 1 minute at 60°C. The fluorescent signal intensities were recorded and analyzed during PCR in an ABI Prism 7000 sequence detector system (Applied Biosystems) using the SDS (version 1.0) software (Applied Biosystems).

The assay was validated for accuracy by the construction of standard curves using a 1:2 serial dilution of DNA containing both mutant and normal alleles. Each dilution was set up in triplicate to allow calculation of SE. The sensitivity of our real-time assay was determined by mixing experiments involving the dilution of pure V617F mutant DNA in normal DNA. Concentrations of mutant DNA ranged from 100 to 0.5%. The pure mutant *JAK2* template was generated as previously described.¹

Comparison of Detection Methods

Patient samples were simultaneously analyzed for the *JAK2* V617F mutation by two previously described techniques^{1,5} The sensitivity of the assays was compared using the χ^2 test.

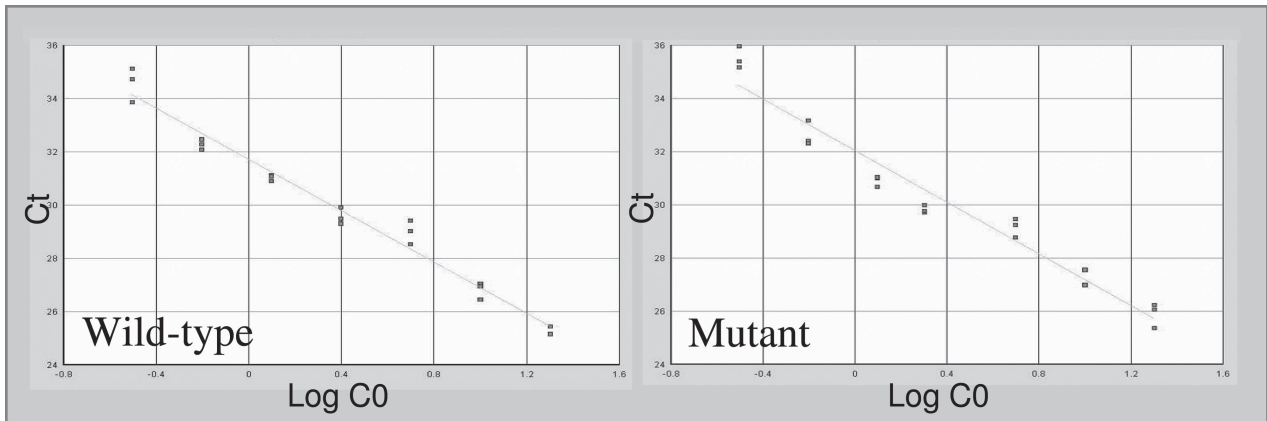


Figure 1. Standard curves for the mutant and wild-type *JAK2* probes generated by 1:2 serial dilution of DNA.

Results

Validation of the Assay

Standard curves were constructed for both wild-type and mutant probes (Figure 1). The gradients of the standard curves for the two alleles were within 0.03, indicating that both alleles were detected with equal efficiency. Because primers are common, efficiency of amplification was unaffected by genotype. There was a high correlation between input DNA and crossing point [r^2 values of 0.975 (wild-type) and 0.950 (mutant)].

The sensitivity of the assay was determined by generating serial dilutions of the 100% mutant DNA with 100% wild-type DNA to generate samples with the *JAK2* V617F mutant allele present at levels of 100, 10, 7.5, 5, 2.5, 1, and 0.5%. This method showed the assay to be sensitive enough to detect 2.5% mutant DNA (Figure 2A). A small nonspecific signal from the mutant probe binding to wild-type sequences was noted. This is due to cross-hybridization, which is a common observation where sequences differ by a single base and is easily distinguished from genuine low positives (Figure 2B). Such signals are inherent to exonuclease assays where discrimination is at the single bp level.¹³

Comparison of *JAK2* V617F Detection Methods

Samples from 200 patients with MPD were tested for the presence of the *JAK2* V617F mutation by three methods (Table 2). Using the real-time approach, 76/196 (39%) of the samples gave a positive result. Two tests were inconclusive, and two samples failed to give a result. Of the 69 patients who tested positive by the Baxter et al¹ allele-specific PCR method, 68 samples were also positive by the real-time PCR technique (one was inconclusive). All samples found to be positive by the real-time and allele-specific PCR techniques were also detected by the Jones et al⁵ ARMS technique. The ARMS assay detected the V617F mutation in a further five samples where the real-time PCR test was negative and 12 where the allele-specific PCR test was negative. We have shown the ARMS assay as described by Jones et al⁵ to be more

sensitive than either the real-time technique (χ^2 , $P = 0.0125$) or the allele-specific PCR method described by Baxter et al¹ (χ^2 , $P = 0.0001$). These results are consistent with the sensitivity of these assays in other laborato-

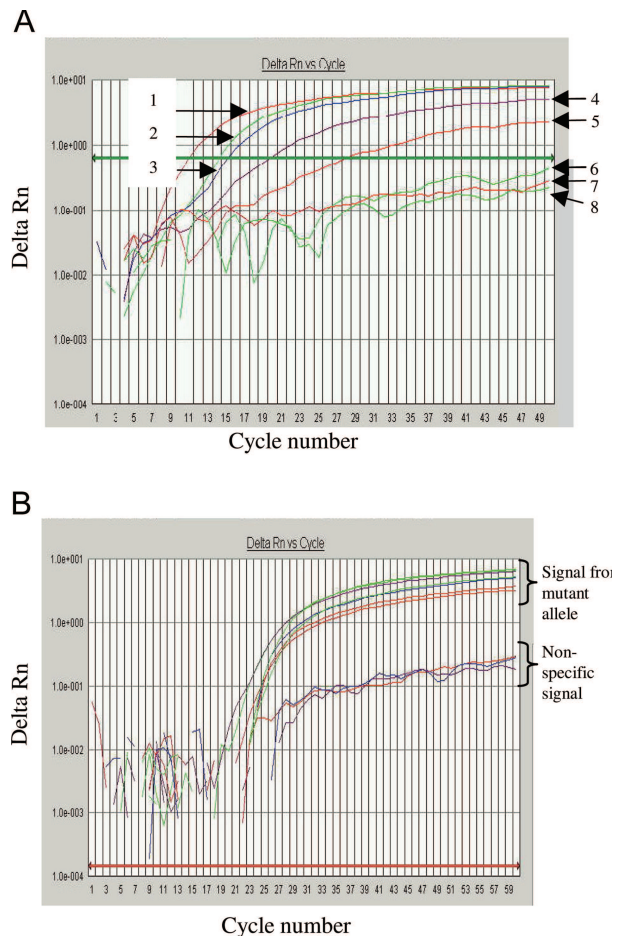


Figure 2. A: Mixing curve showing limit of detection of the real-time PCR assay. 1, 100% mutant; 2, 10% mutant; 3, 7.5% mutant; 4, 5% mutant; 5, 2.5% mutant; 6, 1% mutant; 7, 0.5% mutant; and 8, 100% wild type. **B:** The nonspecific hybridization of the mutant probe to wild-type sequence can easily be distinguished from genuine low positives.

Table 2. Number of Patients in Each of the Six MPD Categories Tested As Positive for the *JAK2* V617F Mutation by the Three Different Mutation Detection Techniques

Patient classification	TaqMan-positive samples	ARMS-positive samples	Allele-specific PCR-positive samples
Myelofibrosis	6/9 (67%)	6/9 (67%)	5/9 (56%)
Polycythemia vera	48/72* [†] (67%)	51/73 [†] (70%)	44/73 [†] (60%)
Essential thrombocythemia	19/50* (38%)	22/51 (43%)	17/51 (33%)
Secondary polycythemia	0/49	0/49	0/49
Apparent polycythemia	0/7	0/7	0/7
Other	3/9 [†]	3/9 [†]	3/9 [†]
Total	76/196 (39%)	82/198 (41%)	69/198 (34.5%)

*One sample reported as inconclusive.

[†]One sample failed.

ries, which have been reported as 1 to 2% and 3% for the ARMS and allele-specific PCR methods, respectively.^{1,5}

Discussion

Previously published techniques for detection of the *JAK2* V617F mutation include allele-specific PCR,¹ an ARMS,⁵ direct fluorescent dye chemistry sequencing,⁴ pyrosequencing,⁵ restriction length polymorphism,¹ and real-time assays based on melt-curve analysis.^{8,9} We have developed and validated a quantitative real-time PCR assay to detect the *JAK2* V617F mutation and have shown this assay to be able to sensitive enough to detect 2.5% mutant DNA in an artificial mixture of pure mutant and wild-type DNA. However, it should be noted that in a more heterogeneous mixed population without prior purification of granulocytes, this sensitivity may be compromised.

Each of these techniques provides a faster, cheaper, and less invasive diagnostic tool than previously available techniques for the diagnosis of myeloproliferative disorders such as the red cell mass test. Of these tests, the allele-specific PCR,¹ the ARMS method,⁵ and real-time assays based on either melt-curve analysis^{8,9} or TaqMan technology have proved to be the most sensitive. However, because both allele-specific PCR and ARMS techniques rely on the discrimination of genotypes at the level of amplification, differences in amplification efficiency between allele-specific primers may be a complicating factor. This is not an issue with the real-time approach because mutation detection uses a common set of primers and is thus independent of amplification. As previously stated, although each of these assays provide a faster diagnostic tool for myeloproliferative disorders than those previously available, recent advances in TaqMan technology allow up to 96 samples to be analyzed in 35 minutes.

A comparison of the real-time PCR technique with the allele-specific PCR¹ and ARMS⁵ methods revealed that this assay was able to detect the V617F mutation in 76 (39%) of all samples tested, including seven samples that were negative by the allele-specific PCR technique.¹ The ARMS assay⁵ detected the V617F mutation in a further five samples where the real-time PCR test was negative. In keeping with other studies, we were able to detect the V617F mutation in the majority of patients with PV by all three methods (60 to 70%; Table 2) and nearly half of the

patients with ET (33 to 43%; Table 2). It was noted that in our study, all three methods detected a higher than expected number of V617F-positive results for patients with myelofibrosis (56 to 67%; Table 2). This may be due to the relatively small sample number within this category for this study and differences in classification criteria.

In conclusion, we have developed a novel quantitative real-time PCR approach to the detection of the V617F mutation of the *JAK2* gene associated with polycythemia vera and other MPDs. We have also performed a comprehensive validation of our approach compared with two previously published methods.^{1,5} An ARMS detection method⁵ proved to be slightly more sensitive than the real-time PCR approach (1 to 2% versus 2.5%), and we now routinely use this technique in our laboratory. However, unlike this ARMS detection method and other previously published techniques,^{1,4,5,8,9} our technique has the potential for quantitative analysis. Recent reports indicate a possible correlation of hematological improvement with reduced V617F mutation load.¹⁰ Our method may therefore have future applications for monitoring minimal residual disease, predicting disease progression or thrombotic events.

Acknowledgments

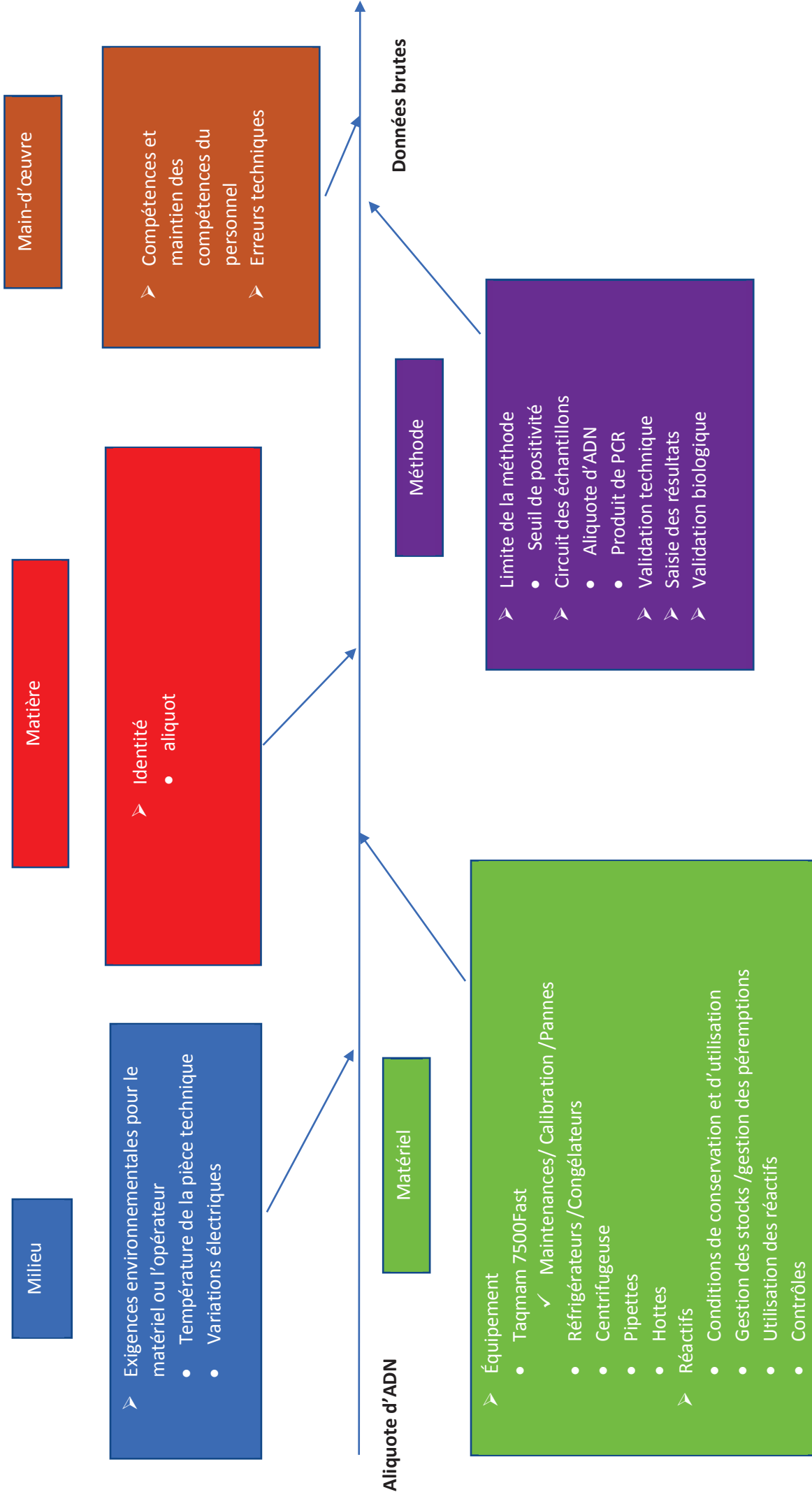
We thank Dr. M.V. Joyner, Dr. R. Lee, Dr. M. Pocock, Dr. C. Rudin, and Dr. P. Vyas for providing samples for this study.

References

- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR: Acquired mutation of the tyrosine kinase *JAK2* in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005, 365:1054–1061
- James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W: A unique clonal *JAK2* mutation leading to constitutive signaling causes polycythemia vera. *Nature* 2005, 434:1144–1148
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC: A gain-of-function mutation of *JAK2* in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005, 352:1779–1790
- Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, Zhao ZJ: Identification of an acquired *JAK2* mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem* 2005, 280:22788–22792
- Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, Score J, Seear R, Chase AJ, Grand FH, White H, Zoi C, Loukopoulou D, Terpos

- E, Vervessou EC, Schultheis B, Emig M, Ernst T, Lengfelder E, Hehlmann R, Hochhaus A, Oscier D, Silver RT, Reiter A, Cross NC: Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005, 106:2162–2168
6. Lindauer K, Loerting T, Liedl KR, Kroemer RT: Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising the two carboxy-terminal domains reveals a mechanism for autoregulation. *Protein Eng* 2001, 14:27–37
 7. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, Duffy A, Boyd EM, Bench AJ, Scott MA, Vassiliou GS, Milligan DW, Smith SR, Erber WN, Bareford D, Wilkins BS, Reilly JT, Harrison CN, Green AR: Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet* 2005, 366:1945–1953
 8. Murugesan G, Aboudola S, Szpurka H, Verbic MA, Maciejewski JP, Tubbs RR, Hsi ED: Identification of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders using FRET probes and melting curve analysis. *Am J Clin Pathol* 2006, 125:625–633
 9. McClure R, Mai M, Lasho T: Validation of two clinically useful assays for evaluation of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia* 2006, 20:168–171
 10. Jones AV, Silver RT, Waghorn K, Curtis C, Kreil S, Zoi K, Hochhaus A, Oscier D, Metzgeroth G, Lengfelder E, Reiter A, Chase AJ, Cross NC: Minimal molecular response in polycythemia vera patients treated with imatinib or interferon alpha. *Blood* 2006, 107:3339–3341
 11. WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Edited by ES Jaffe, NL Harris, H Stein, JW Vardiman. Lyon, France, IARC Press, 2001
 12. Harries LW, Ellard S, Jones RW, Hattersley AT, Bingham C: Abnormal splicing of hepatocyte nuclear factor-1 beta in the renal cysts and diabetes syndrome. *Diabetologia* 2004, 47:937–942
 13. Singh R, Ellard S, Hattersley A, Harries LW: Rapid and sensitive real-time PCR method for detection and quantification of 3243A>G mitochondrial point mutation. *J Mol Diagn* 2006, 8:225–230

Annexe VII : Identification des principaux risques potentiellement critiques du sous-processus « détection mutation JAK2 V617F »



Annexe VIII : Répétabilité de l'extraction automatisée de l'ADN sur sang total EDTA

RESULTATS DE L'EVALUATION DES PERFORMANCES DE L'EXTRACTION AUTOMATISEE

Répétabilité extraction automatisée de l'ADN sur sang total
6 extractions sur un même prélèvement

DATE 06/04/2018
RESPONSABLE Marie-Thérèse Piot
OPERATEURS HA/SH
EXTRACTION EXTRACTEUR QIA Symphony SP SN: 8017
DSP DNA Midi kit version 1 96 tests Ref: 937255 Lot: 160012820 Exp: 08/2019
DOSAGE ADN SUR NANODROP ND1000
TECHNIQUE Spectrophotométrie
UNITE ng/ μ l

Sample ID	Date	Time	ng/ μ l	A260	A280	260/280
PATIENT1	06/04/2018	13:51	133,61	2,672	1,407	1,9
PATIENT1	06/04/2018	13:52	147,4	2,948	1,56	1,89
PATIENT1	06/04/2018	13:53	151,21	3,024	1,598	1,89
PATIENT1	06/04/2018	13:55	144,1	2,882	1,526	1,89
PATIENT1	06/04/2018	13:56	143,83	2,877	1,514	1,9
PATIENT1	06/04/2018	13:57	151,92	3,038	1,606	1,89
	moyenne		145,35			1,89
	écart type		6,68			0,00
	CV%		4,60%			0,25

REPETABILITE DE L'EXTRACTION AUTOMATISEE DE L'ADN : 06/04/2018						
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>						
Échantillons Patients	Nombre de valeurs (N)	Moyenne ng/ μ l	Écart-type	CV (%)	CV retenu par le laboratoire	Conclusion
sang total sur tube EDTA	6	145,35	6,68	4,6	NA	5% CONFORME

Annexe IX : VARIATION DES CONCENTRATIONS DE L'ECHANTILLON D'ADN

TEST DE ROBUSTESSE

Réactifs	Numéros de lots
Eau proméga	243740
Sonde Mutée 10µM	5192590-20-1
Sonde Sauvage WT 10µM	5192590-10-1
Primer F 20µM	2050461
Primer R 20µM	5912710
Master Mix 2x	1711042 Exp 02/2019
Horizon WT (non muté)	23891 du 09/08/2017
Horizon 50% (muté)	26343 du 09/08/2017
Horizon 1% (muté)	23891+26343

Taqman 7500 Fast Numéro de série: 275012017

Programme de référence

50°C 2mn

95°C 10mn

92°C 15s

60°C 1mn

50 cycles

Volume de Mix 17,5µl

Prise d'essai 2,5µl

Concentration de référence 20ng/µl

Concentrations testées 10ng/µl et 40ng/µl

Concentrations: ng/µl	PATIENTS: Résultats des allèles 2							Contrôles Horizons: résultats des allèles 2		
	LLI (2%)	WIT (3%)	LES (12%)	PIC (12% à 50%)	JEG (50%)	BRE (WT)	WT	1% maison	50%	
Référence : 20ng/µl	1,04	1,57	2,57	2,9	3,86	0,58	0,64	0,74	3,8	
10 ng/µl	1,03	1,49	2,26	2,88	3,83	0,57				
40 ng/µl	1,04	1,6	2,4	2,88	3,82	0,57				
Résultats obtenus	Muté	Muté	Muté	Muté	Muté	Non muté				
Résultats attendus	Muté	Muté	Muté	Muté	Muté	Non muté				
Conclusion	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme				

Sample Name	SNP Assay Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn
Horizon Wt	JAK2	4,06	0,64
Horizon 1%	JAK2	4,06	0,74
Horizon 50%	JAK2	3,50	3,80
H2O	JAK2	0,10	0,13
PIC 10 ng/μl	JAK2	3,88	2,88
PIC 10 ng/μl	JAK2	3,85	2,89
PIC 40 ng/μl	JAK2	3,97	2,88
PIC 40 ng/μl	JAK2	3,92	2,88
PIC 20 ng/μl	JAK2	3,98	2,92
PIC 20 ng/μl	JAK2	3,93	2,89
WITT 10 ng/μl	JAK2	4,04	1,39
WITT 10 ng/μl	JAK2	4,14	1,59
WITT 40 ng/μl	JAK2	4,11	1,59
WITT 40 ng/μl	JAK2	4,13	1,61
WITT 20 ng/μl	JAK2	4,08	1,56
WITT 20 ng/μl	JAK2	4,16	1,58
LES 10 ng/μl	JAK2	4,02	2,19
LES 10 ng/μl	JAK2	4,05	2,33
LES 40 ng/μl	JAK2	4,12	2,41
LES 40 ng/μl	JAK2	4,05	2,40
LES 20 ng/μl	JAK2	4,24	2,65
LES 20 ng/μl	JAK2	4,13	2,49

Sample Name	SNP Assay Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn
JEG 10 ng/μl	JAK2	3,73	3,87
JEG 10 ng/μl	JAK2	3,71	3,79
JEG 40 ng/μl	JAK2	3,84	3,81
JEG 40 ng/μl	JAK2	3,83	3,82
JEG 20 ng/μl	JAK2	3,78	3,84
JEG 20 ng/μl	JAK2	3,85	3,88
LLI 10 ng/μl	JAK2	4,16	1,00
LLI 10 ng/μl	JAK2	4,10	1,06
LLI 40 ng/μl	JAK2	4,25	1,03
LLI 40 ng/μl	JAK2	4,18	1,04
LLI 20 ng/μl	JAK2	4,21	1,01
LLI 20 ng/μl	JAK2	4,16	1,07
BRE 10 ng/μl	JAK2	4,13	0,57
BRE 10 ng/μl	JAK2	4,19	0,57
BRE 40 ng/μl	JAK2	4,14	0,58
BRE 40 ng/μl	JAK2	4,18	0,56
BRE 20 ng/μl	JAK2	4,24	0,58
BRE 20 ng/μl	JAK2	4,18	0,58

Annexe X : Fidélité intermédiaire de l'extraction automatisée de l'ADN sur sang total EDTA

**RESULTATS DE L'EVALUATION DES PERFORMANCES DE L'EXTRACTION
AUTOMATISEE**

Fidélité intermédiaire de l'extraction automatisée de l'ADN sur sang total
3 extractions différentes du même patient: 3 RUNS

DATE 26/09/2017
RESPONSABLE Marie-Thérèse Piot
OPERATEURS HA/PHI/MT
EXTRACTION EXTRACTEUR QIA Symphony SP SN: 8017
DSP DNA Midi kit version 1 96 tests Ref: 937255 Lot: 157025682 Exp: 02/2019
DOSAGE ADN SUR NANODROP ND1000
TECHNIQUE Spectrophotométrie
UNITE ng/ μ l

Sample ID	Date	Time	ng/ μ l	A260	A280	260/280
1/ RUN 1	26/09/2017	11:36	127,39	2,548	1,355	1,88
1/ RUN 2	26/09/2017	13:22	132,12	2,642	1,413	1,87
1/ RUN 3	26/09/2017	14:29	125,78	2,516	1,325	1,9
	moyenne		128,43			1,88
	écart type		3,30			0,01
	CV%		2,57%			0,66

FIDELITE INTERMEDIAIRE : EXTRACTION AUTOMATISEE DE L'ADN 26/09/2017						
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>						
Échantillons Patients	Nombre de valeurs (N)	Moyenne ng/ μ l	Écart-type	CV (%)	CV retenu par le laboratoire	Conclusion
sang total sur tube EDTA	3	128,43	3,3	2,57	NA	5% CONFORME

Annexe XI : Test de contamination sur l'extraction automatisée de l'ADN (sang total EDTA)

**RESULTATS DE L'EVALUATION DES PERFORMANCES DE L'EXTRACTION
AUTOMATISEE**

Test de contamination au niveau de l'extracteur

DATE 31/05/2018
RESPONSABLE Marie-Thérèse Piot
OPERATEURS Marie-Thérèse Piot
EXTRACTION EXTRACTEUR QIA Symphony SP SN: 8017
DSP DNA Midi kit version 1 96 tests Ref: 937255 Lot: 157025682 Exp: 02/2019
DOSAGE ADN SUR NANODROP ND1000
TECHNIQUE Spectrophotométrie
UNITE ng/ μ l

FIDELITE INTERMEDIAIRE : EXTRACTION AUTOMATISEE DE L'ADN 26/09/2017							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Échantillons Patients	Nombre de valeurs (N)	Moyenne ng/ μ l	Écart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV retenu par le laboratoire	Conclusion
H2O	12	1,69	0,49	28,99	NA	NA	CONFORME

Sample ID/RUN	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280
Sang 1	31/05/2018	08:28	332,44	6,176	3,367	1,83
H2O 1	31/05/2018	08:29	1,24	0,02	0,014	-1,45
Sang 2	31/05/2018	08:30	7,88	0,13	0,035	3,69
H2O 2	31/05/2018	08:31	2,22	0,024	0,01	2,4
Sang 3	31/05/2018	08:31	228,08	4,44	2,404	1,85
H2O 3	31/05/2018	08:32	1,66	0,022	0,005	4,12
Sang 4	31/05/2018	08:33	389,31	7,45	4,039	1,84
H2O 4	31/05/2018	08:33	2,64	0,05	0,017	2,8
Sang 5	31/05/2018	08:34	58,73	1,111	0,582	1,91
H2O 5	31/05/2018	08:35	1,31	0,008	-0,016	-0,51
Sang 6	31/05/2018	08:35	59,86	1,189	0,618	1,92
H2O 6	31/05/2018	08:36	1,15	0,017	-0,012	-1,43
Sang 7	31/05/2018	08:37	89,67	1,718	0,918	1,87
H2O 7	31/05/2018	08:37	2	0,027	0,006	4,8
Sang 8	31/05/2018	08:38	105,89	2,061	1,099	1,87
H2O 8	31/05/2018	08:39	1,45	0,01	-0,021	-0,49
Sang 9	31/05/2018	08:40	375,52	7,153	3,889	1,84
H2O 9	31/05/2018	08:40	1,09	0,018	-0,017	-1,04
Sang 10	31/05/2018	08:41	230,17	4,492	2,421	1,86
H2O 10	31/05/2018	08:42	2,08	0,018	-0,015	-1,21
Sang 11	31/05/2018	08:42	181,44	3,56	1,914	1,86
H2O 11	31/05/2018	08:43	1,4	0,022	0,001	19,04
Sang 12	31/05/2018	08:44	231,02	4,414	2,388	1,85
H2O 12	31/05/2018	08:44	2,02	0,037	0,023	1,62
Moyenne H2O			1,69			1,74
Écart type (ET)			0,49			5,70
CV%			28,99			

Annexe XII : Présentation et principe du spectrophotomètre « NanoDrop ND-1000

Labtech France
2 bis Rue Léon Blum
91120 Palaiseau
Tel : + 33 (0)825 848 832
Fax : + 33 (0)820 568 811
Contact@labtech.fr
www.labtech.fr

Labtech
France

Caractéristiques techniques du NanoDrop ND-1000

Le NanoDrop ND-1000 offre de nombreux avantages en comparaison avec les autres spectrophotomètres. Le spectrophotomètre NanoDrop est un système novateur basé sur une technologie brevetée de rétention d'échantillon par tension de surface. 1 μ L d'échantillon suffit donc pour mesurer l'absorbance entre des concentrations de 1,5 à 3700 ng/ μ L avec précision, reproductibilité et simplicité. Aucune cuvette n'est requise pour le fonctionnement du NanoDrop ND1000.



Précision, reproductibilité et stabilité:

La précision et la reproductibilité du Nanodrop s'appuient sur le double ajustement automatique du trajet optique à 1mm et à 0,2 mm, **sans intervention de l'utilisateur**. L'appareil détermine automatiquement quel trajet optique permet d'avoir la meilleure précision de mesure.

Le trajet optique **est ajusté mécaniquement à chaque ouverture de fonction** par l'utilisateur et une simple vérification annuelle permet de valider avec la plus grande précision l'ajustement de celui-ci.

- Faibles volumes d'échantillons: mesures avec seulement **1 μ L**: volume de travail suffisant même si la mesure ne dépend pas du volume utilisé
- **Capacité de hautes absorbances**: 50 fois plus qu'avec des spectrophotomètres traditionnels
- **Pas de Dilutions**
- **Spectre UV-Vis complet** (220-750nm)
- **Temps de mesure : 10 secondes**
- **Pas de cuvettes** ni capillaires
- Ajustement précis des 2 trajets optiques (1 mm et 0,2 mm)
- Faible encombrement
- Installation et utilisation très facile
- Enregistrement systématique des données dans un fichier Excel
- Pilotage par un logiciel sur PC

Simplicité d'utilisation:

La simplicité du Nanodrop permet une utilisation performante de l'appareil pour une utilisation quotidienne au laboratoire par tout le personnel hospitalier et de recherche. Il suffit de déposer 1 μ L de son échantillon sur la surface de mesure, de rabattre le bras pour que la colonne de liquide se forme. La mesure et l'intégration des résultats se réalisent en moins de 10 secondes.

Annexe XIII-A : Répétabilité du dosage de l'ADN par spectrophotométrie

RESULTATS DE L'EVALUATION DES PERFORMANCES POUR LE DOSAGE DE L'ADN

DATE 19/01/2018 et 23/05/2018
RESPONSABLE Marie-Thérèse Piot
OPERATEUR Marie-Thérèse Piot
DOSAGE ADN SUR NANODROP ND1000
Blanc: Tampon ATE Qiagen Lot : 157028638 Exp 04/2019
TECHNIQUE Spectrophotométrie
UNITE ng/µl

REPETABILITE DU DOSAGE D'ADN du 19/01/2018 au 23/05/2018							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Échantillons Patients	Nombre de valeurs (N)	Moyenne ng/µl	Écart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire	Conclusion
ADN patient 80 ng/µl	30	80,09	0,5	0,62	NA	5%	CONFORME
ADN patient 20 ng/µl	30	21,25	0,43	2,01	NA	5%	CONFORME

ADN patient 80 ng/μl	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
1	19/01/2018	13:18	79,79	1.596	0.854	1,87	2.24
2	19/01/2018	13:18	79,36	1.587	0.852	1,86	2.29
3	19/01/2018	13:19	79,61	1.592	0.856	1,86	2.31
4	19/01/2018	13:20	79,73	1.595	0.846	1,89	2.38
5	19/01/2018	13:21	79,68	1.594	0.852	1,87	2.35
6	19/01/2018	13:21	79,97	1.599	0.856	1,87	2.34
7	19/01/2018	13:22	79,62	1.592	0.845	1,88	2.36
8	19/01/2018	13:23	80,59	1.612	0.863	1,87	2.38
9	19/01/2018	13:23	79,73	1.595	0.849	1,88	2.31
10	19/01/2018	13:24	79,71	1.594	0.840	1,9	2.34
11	19/01/2018	13:24	80,18	1.604	0.844	1,9	2.35
12	19/01/2018	13:25	79,88	1.598	0.859	1,86	2.38
13	19/01/2018	13:26	79,56	1.591	0.859	1,85	2.22
14	19/01/2018	13:26	80	1.600	0.854	1,87	2.37
15	19/01/2018	13:27	80,52	1.610	0.867	1,86	2.31
16	19/01/2018	13:28	79,27	1.585	0.839	1,89	2.16
17	19/01/2018	13:29	79,5	1.590	0.839	1,9	2.29
18	19/01/2018	13:29	81,15	1.623	0.883	1,84	2.32
19	19/01/2018	13:30	80,22	1.604	0.867	1,85	2.29
20	19/01/2018	13:31	80,09	1.602	0.866	1,85	2.29
21	19/01/2018	13:31	80,26	1.605	0.855	1,88	2.33
22	19/01/2018	13:32	80,99	1.620	0.857	1,89	2.16
23	19/01/2018	13:32	80,86	1.617	0.882	1,83	2.31
24	19/01/2018	13:33	80,52	1.610	0.880	1,83	2.21
25	19/01/2018	13:34	80,67	1.613	0.885	1,82	2.24
26	19/01/2018	13:34	80,22	1.604	0.865	1,85	2.28
27	19/01/2018	13:35	80,14	1.603	0.882	1,82	2.28
28	19/01/2018	13:35	80,45	1.609	0.872	1,85	2.28
29	19/01/2018	13:36	80,67	1.613	0.879	1,84	2.27
30	19/01/2018	13:36	79,82	1.596	0.838	1,9	2.31
moyenne			80,09			1,86	
écart type			0,50			0,02	
CV			0,62%			1,075	

ADN patient20 ng/μl	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
1	23/05/2018	12:00	20,84	0,417	0,206	2,02	1,95
2	23/05/2018	12:01	21,44	0,429	0,237	1,81	2,02
3	23/05/2018	12:01	21,09	0,422	0,21	2,01	1,98
4	23/05/2018	12:02	21,54	0,431	0,227	1,9	2,01
5	23/05/2018	12:03	21,28	0,426	0,23	1,85	2,08
6	23/05/2018	12:03	21,6	0,432	0,231	1,87	2
7	23/05/2018	12:04	21,25	0,425	0,231	1,84	2
8	23/05/2018	12:05	21,41	0,428	0,243	1,76	1,94
9	23/05/2018	12:05	21,54	0,431	0,23	1,87	1,98
10	23/05/2018	12:06	20,76	0,415	0,207	2,01	2,16
11	23/05/2018	12:07	21,44	0,429	0,229	1,87	2,14
12	23/05/2018	12:07	21,76	0,435	0,238	1,83	1,99
13	23/05/2018	12:08	19,8	0,396	0,214	1,85	2,66
14	23/05/2018	12:09	21,71	0,434	0,244	1,78	2,08
15	23/05/2018	12:09	21,44	0,429	0,232	1,85	1,95
16	23/05/2018	12:10	21,51	0,43	0,225	1,91	1,97
17	23/05/2018	12:11	21,43	0,429	0,234	1,83	1,95
18	23/05/2018	12:12	20,83	0,417	0,21	1,99	2,19
19	23/05/2018	12:12	21,48	0,43	0,23	1,87	2,13
20	23/05/2018	12:13	20,77	0,415	0,213	1,95	2,09
21	23/05/2018	12:14	21,69	0,434	0,237	1,83	1,97
22	23/05/2018	12:14	21,72	0,434	0,239	1,82	1,94
23	23/05/2018	12:15	21,04	0,421	0,226	1,86	2,13
24	23/05/2018	12:16	20,88	0,418	0,228	1,83	2,2
25	23/05/2018	12:16	21,31	0,426	0,24	1,78	2,06
26	23/05/2018	12:17	20,93	0,419	0,219	1,91	2,17
27	23/05/2018	12:18	21,83	0,436	0,248	1,76	1,93
28	23/05/2018	12:18	21,19	0,424	0,225	1,89	2,13
29	23/05/2018	12:19	21,34	0,427	0,241	1,77	2,01
30	23/05/2018	12:21	20,74	0,415	0,208	1,99	2,06
moyenne			21,25			1,86	
écart type			0,43			0,02	
CV			2,01%			1,075	

Annexe XIII-B : Fidélité intermédiaire du dosage de l'ADN par spectrophotométrie

RESULTATS DE L'EVALUATION DES PERFORMANCES POUR LE DOSAGE DE L'ADN

DATE du 09/07/2018 au 24/07/2018
RESPONSABLE Marie-Thérèse Piot
OPERATEUR HA/PHI/ SH
DOSAGE ADN SUR NANODROP ND1000
Blanc: Tampon ATE Qiagen Lot : 157028638 Exp 04/2019
TECHNIQUE Spectrophotométrie
UNITE ng/µl

FIDELITE INTERMEDIAIRE DU DOSAGE D'ADN du 09/07/2018 au 24/07/2018							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Échantillons Patients	Nombre de valeurs (N)	Moyenne ng/µl	Écart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire	Conclusion
ADN 1 patient 20 ng/µl	30	22,75	1	4,42	NA	5%	CONFORME
ADN 2 patient 70ng/µl	30	71,53	2,35	3,29	NA	5%	CONFORME

ADN 1 Patient 20ng/μl	Opérateurs	Date	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
1	HA	09/07/2018	20,71	0,414	0,237	1,75	1,27
2	SH	09/07/2018	21,23	0,425	0,238	1,79	1,39
3	HA	10/07/2018	22,15	0,443	0,259	1,71	1,46
4	PR	10/07/2018	22	0,44	0,247	1,78	1,45
5	SH	10/07/2018	22,08	0,442	0,251	1,76	1,53
6	HA	11/07/2018	22,12	0,442	0,239	1,85	1,57
7	PR	11/07/2018	21,97	0,439	0,236	1,86	1,48
8	HA	12/07/2018	22,02	0,44	0,255	1,73	1,45
9	PR	12/07/2018	21,5	0,43	0,239	1,8	1,47
10	SH	12/07/2018	22,22	0,444	0,266	1,67	1,55
11	HA	13/07/2018	21,65	0,433	0,23	1,88	1,47
12	PR	13/07/2018	22,61	0,452	0,253	1,79	1,48
13	SH	13/07/2018	22,04	0,441	0,235	1,88	1,29
14	HA	16/07/2018	22,6	0,452	0,252	1,8	1,42
15	PR	16/07/2018	22,25	0,445	0,228	1,96	1,63
16	SH	16/07/2018	23,29	0,466	0,26	1,79	1,42
17	HA	17/07/2018	22,74	0,455	0,257	1,77	1,49
18	SH	17/07/2018	24,77	0,495	0,277	1,79	1,27
19	PR	17/07/2018	23,25	0,465	0,243	1,91	1,42
20	PR	18/07/2018	24,04	0,481	0,275	1,75	1,32
21	HA	18/07/2018	23,05	0,461	0,252	1,83	1,42
22	SH	18/07/2018	23,95	0,479	0,286	1,67	1,32
23	HA	19/07/2018	23,38	0,468	0,278	1,68	1,43
24	PR	19/07/2018	22,99	0,46	0,24	1,91	1,43
25	SH	19/07/2018	22,27	0,445	0,236	1,89	1,49
26	HA	20/07/2018	23,6	0,472	0,252	1,87	1,38
27	PR	20/07/2018	23,45	0,469	0,256	1,83	1,37
28	HA	23/07/2018	24,49	0,49	0,285	1,72	1,4
29	PR	23/07/2018	24,16	0,483	0,285	1,69	1,39
30	PR	24/07/2018	23,9	0,478	0,254	1,88	1,32
moyenne			22,75				
écart type			1,00				
CV			4,42%				

ADN 2 Patient 70ng/μl	Opérateurs	Date	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
1	HA	09/07/2018	66,07	1,321	0,722	1,83	3,75
2	SH	09/07/2018	68,1	1,362	0,759	1,8	4,88
3	HA	10/07/2018	69,06	1,381	0,775	1,78	3,67
4	PR	10/07/2018	69,15	1,383	0,754	1,83	3,52
5	SH	10/07/2018	68,01	1,36	0,737	1,85	2,76
6	HA	11/07/2018	69,18	1,384	0,748	1,85	1,63
7	PR	11/07/2018	69,48	1,39	0,757	1,84	3,3
8	HA	12/07/2018	70,33	1,407	0,745	1,89	3,15
9	PR	12/07/2018	68,56	1,371	0,759	1,81	3,16
10	SH	12/07/2018	69,5	1,39	0,766	1,81	3,54
11	HA	13/07/2018	72,01	1,44	0,824	1,75	2,99
12	PR	13/07/2018	69,9	1,398	0,750	1,86	3,03
13	SH	13/07/2018	71,31	1,426	0,809	1,76	2,81
14	HA	16/07/2018	72,54	1,451	0,776	1,87	2,61
15	PR	16/07/2018	72,02	1,44	0,816	1,76	2,4
16	SH	16/07/2018	71,74	1,435	0,783	1,83	2,44
17	HA	17/07/2018	73,2	1,464	0,813	1,8	2,39
18	SH	17/07/2018	73,11	1,462	0,803	1,82	2,83
19	PR	17/07/2018	73,66	1,473	0,812	1,81	2,44
20	PR	18/07/2018	75,46	1,509	0,820	1,84	2,33
21	HA	18/07/2018	72,59	1,452	0,786	1,85	2,77
22	SH	18/07/2018	72,59	1,452	0,810	1,79	2,36
23	HA	19/07/2018	73,27	1,465	0,785	1,87	2,46
24	PR	19/07/2018	73,58	1,472	0,810	1,82	2,58
25	SH	19/07/2018	71,79	1,436	0,780	1,84	2,4
26	HA	20/07/2018	74,19	1,484	0,822	1,81	2,41
27	PR	20/07/2018	73,65	1,473	0,818	1,8	2,56
28	HA	23/07/2018	72,84	1,457	0,802	1,82	2,47
29	PR	23/07/2018	74,12	1,482	0,826	1,79	1,81
30	PR	24/07/2018	74,93	1,499	0,843	1,78	1,91
moyenne			71,53				
écart type			2,35				
CV			3,29%				

Annexe XIII-C : Variabilité inter-opérateur du dosage de l'ADN par spectrophotométrie

RESULTATS DE L'EVALUATION DES PERFORMANCES POUR LE DOSAGE DE L'ADN

DATE du 09/07/2018 au 24/07/2018
RESPONSABLE Marie-Thérèse Piot
OPERATEUR HA/PHI/ SH
DOSAGE ADN SUR NANODROP ND1000
Blanc: Tampon ATE Qiagen Lot : 157028638 Exp 04/2019
TECHNIQUE Spectrophotométrie
UNITE ng/µl

VARIABILITE INTER OPERATEUR DU DOSAGE D'ADN du 09/07/2018 au 24/07/2018									
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>									
Échantillons	Opérateurs	Nombre de valeurs (N)	Moyenne ng/µl	Écart-type	CV	CV (%) fournisseur	CV retenu par le laboratoire	Conclusion	
ADN 1 patient 20 ng/µl	HA	11	22,59	1,03	4,57%	NA	5%	CONFORME	
	PR	11	22,92	0,92	4,01%	NA	5%	CONFORME	
ADN 2 patient 70 ng/µl	HA	11	71,39	2,44	3,42%	NA	5%	CONFORME	
	PR	11	72,23	2,51	3,48%	NA	5%	CONFORME	

ADN 1 Patient 20ng/μl	Opérateurs	Date	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
1	HA	09/07/2018	20,71	0,414	0,237	1,75	1,27
2	SH	09/07/2018	21,23	0,425	0,238	1,79	1,39
3	HA	10/07/2018	22,15	0,443	0,259	1,71	1,46
4	PR	10/07/2018	22	0,44	0,247	1,78	1,45
5	SH	10/07/2018	22,08	0,442	0,251	1,76	1,53
6	HA	11/07/2018	22,12	0,442	0,239	1,85	1,57
7	PR	11/07/2018	21,97	0,439	0,236	1,86	1,48
8	HA	12/07/2018	22,02	0,44	0,255	1,73	1,45
9	PR	12/07/2018	21,5	0,43	0,239	1,8	1,47
10	SH	12/07/2018	22,22	0,444	0,266	1,67	1,55
11	HA	13/07/2018	21,65	0,433	0,23	1,88	1,47
12	PR	13/07/2018	22,61	0,452	0,253	1,79	1,48
13	SH	13/07/2018	22,04	0,441	0,235	1,88	1,29
14	HA	16/07/2018	22,6	0,452	0,252	1,8	1,42
15	PR	16/07/2018	22,25	0,445	0,228	1,96	1,63
16	SH	16/07/2018	23,29	0,466	0,26	1,79	1,42
17	HA	17/07/2018	22,74	0,455	0,257	1,77	1,49
18	SH	17/07/2018	24,77	0,495	0,277	1,79	1,27
19	PR	17/07/2018	23,25	0,465	0,243	1,91	1,42
20	PR	18/07/2018	24,04	0,481	0,275	1,75	1,32
21	HA	18/07/2018	23,05	0,461	0,252	1,83	1,42
22	SH	18/07/2018	23,95	0,479	0,286	1,67	1,32
23	HA	19/07/2018	23,38	0,468	0,278	1,68	1,43
24	PR	19/07/2018	22,99	0,46	0,24	1,91	1,43
25	SH	19/07/2018	22,27	0,445	0,236	1,89	1,49
26	HA	20/07/2018	23,6	0,472	0,252	1,87	1,38
27	PR	20/07/2018	23,45	0,469	0,256	1,83	1,37
28	HA	23/07/2018	24,49	0,49	0,285	1,72	1,4
29	PR	23/07/2018	24,16	0,483	0,285	1,69	1,39
30	PR	24/07/2018	23,9	0,478	0,254	1,88	1,32
moyenne			22,75				
écart type			1,00				
CV			4,42%				

ADN 2 Patient 70ng/μl	Opérateurs	Date	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
1	HA	09/07/2018	66,07	1,321	0,722	1,83	3,75
2	SH	09/07/2018	68,1	1,362	0,759	1,8	4,88
3	HA	10/07/2018	69,06	1,381	0,775	1,78	3,67
4	PR	10/07/2018	69,15	1,383	0,754	1,83	3,52
5	SH	10/07/2018	68,01	1,36	0,737	1,85	2,76
6	HA	11/07/2018	69,18	1,384	0,748	1,85	1,63
7	PR	11/07/2018	69,48	1,39	0,757	1,84	3,3
8	HA	12/07/2018	70,33	1,407	0,745	1,89	3,15
9	PR	12/07/2018	68,56	1,371	0,759	1,81	3,16
10	SH	12/07/2018	69,5	1,39	0,766	1,81	3,54
11	HA	13/07/2018	72,01	1,44	0,824	1,75	2,99
12	PR	13/07/2018	69,9	1,398	0,750	1,86	3,03
13	SH	13/07/2018	71,31	1,426	0,809	1,76	2,81
14	HA	16/07/2018	72,54	1,451	0,776	1,87	2,61
15	PR	16/07/2018	72,02	1,44	0,816	1,76	2,4
16	SH	16/07/2018	71,74	1,435	0,783	1,83	2,44
17	HA	17/07/2018	73,2	1,464	0,813	1,8	2,39
18	SH	17/07/2018	73,11	1,462	0,803	1,82	2,83
19	PR	17/07/2018	73,66	1,473	0,812	1,81	2,44
20	PR	18/07/2018	75,46	1,509	0,820	1,84	2,33
21	HA	18/07/2018	72,59	1,452	0,786	1,85	2,77
22	SH	18/07/2018	72,59	1,452	0,810	1,79	2,36
23	HA	19/07/2018	73,27	1,465	0,785	1,87	2,46
24	PR	19/07/2018	73,58	1,472	0,810	1,82	2,58
25	SH	19/07/2018	71,79	1,436	0,780	1,84	2,4
26	HA	20/07/2018	74,19	1,484	0,822	1,81	2,41
27	PR	20/07/2018	73,65	1,473	0,818	1,8	2,56
28	HA	23/07/2018	72,84	1,457	0,802	1,82	2,47
29	PR	23/07/2018	74,12	1,482	0,826	1,79	1,81
30	PR	24/07/2018	74,93	1,499	0,843	1,78	1,91
moyenne			71,53				
écart type			2,35				
CV			3,29%				

Annexe XIII-D : Contamination inter-échantillon

RESULTATS DE L'EVALUATION DES PERFORMANCES POUR LE DOSAGE DE L'ADN

DATE 31/05/2018
RESPONSABLE Marie-Thérèse Piot
OPERATEUR HA
DOSAGE ADN SUR NANODROP ND1000
 Blanc/Tampon ATE Qiagen Lot : 157028638 Exp 04/2019
TECHNIQUE Spectrophotométrie
UNITE ng/µl

Sample ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
ADN HAUT	31/05/2018	08:47	389,76	7,795	4,238	1,84	2,51
ADN HAUT	31/05/2018	08:48	388,49	7,77	4,216	1,84	2,51
ADN HAUT	31/05/2018	08:48	387,71	7,754	4,199	1,85	2,51
ADN BAS	31/05/2018	08:49	8,21	0,164	0,072	2,3	0,91
ADN BAS	31/05/2018	08:49	7,93	0,159	0,077	2,06	0,75
ADN BAS	31/05/2018	08:50	8,58	0,172	0,094	1,82	0,77
ADN HAUT	31/05/2018	08:51	384,51	7,69	4,177	1,84	2,51
ADN HAUT	31/05/2018	08:52	385,87	7,717	4,183	1,85	2,51
ADN HAUT	31/05/2018	08:52	384,58	7,692	4,16	1,85	2,52
ADN BAS	31/05/2018	08:53	8,1	0,162	0,083	1,95	0,85
ADN BAS	31/05/2018	08:54	7,62	0,152	0,075	2,03	0,7
ADN BAS	31/05/2018	08:54	7,75	0,155	0,074	2,1	0,7
ADN HAUT	31/05/2018	08:55	384,03	7,681	4,183	1,84	2,48
ADN HAUT	31/05/2018	08:55	389,14	7,783	4,233	1,84	2,51
ADN HAUT	31/05/2018	08:56	387,47	7,749	4,196	1,85	2,52
ADN BAS	31/05/2018	08:57	8,49	0,17	0,102	1,67	0,67
ADN BAS	31/05/2018	08:57	8,26	0,165	0,09	1,84	0,96
ADN BAS	31/05/2018	08:58	8,38	0,168	0,071	2,37	0,93
Moyenne ADN BAS			8,27				
Moyenne ADN BAS			8,24				
Moyenne ADN HAUT			386,84				

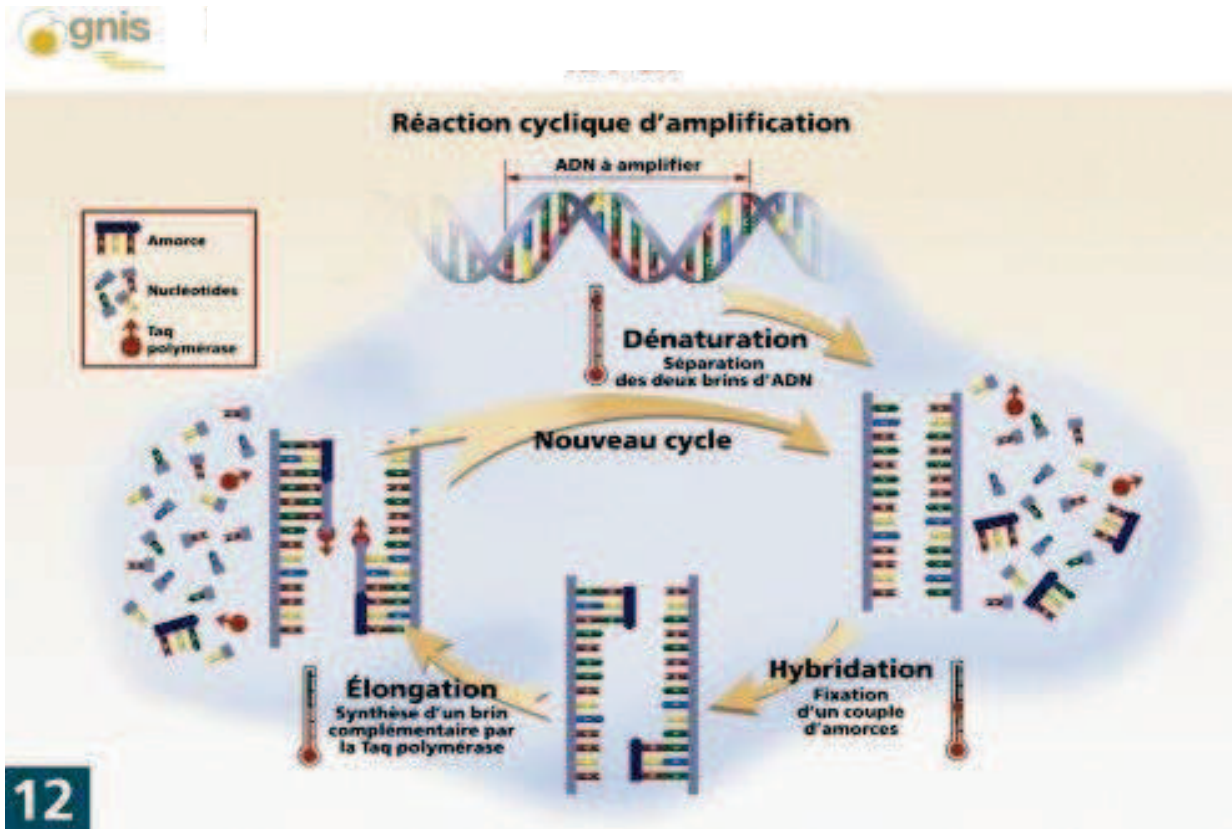
ADN BAS Échantillon susceptible d'être contaminé

ADN BAS Échantillon susceptible de ne pas être contaminé

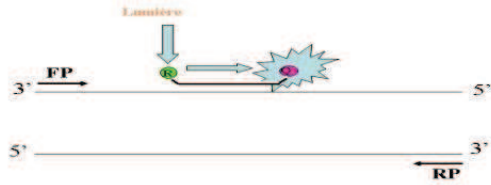
$$\text{RAPPORT} = \frac{\text{ADN BAS (Contaminé)} - \text{ADN BAS (pas contaminé)}}{\text{ADN HAUT} - \text{ADN BAS (pas contaminé)}} \times 100$$

$$\text{RAPPORT} = \frac{8,27 - 8,24}{386,84 - 8,24} \times 100 = 0,01\%$$

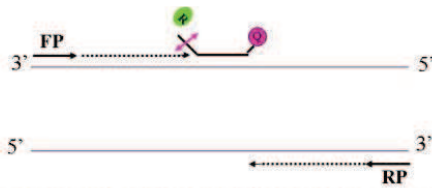
Annexe XIV : Schéma de l'amplification de fragments d'ADN in vitro : LA PCR



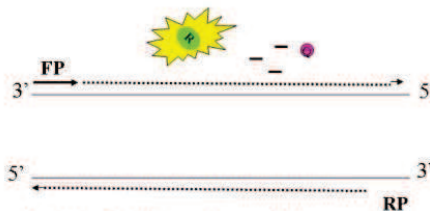
Annexe XV : Principe des sondes Taqman®



- FRET (fluorescence resonance energy transfer) depuis le reporteur (haute énergie) vers le quencher (faible énergie),
 → pas de signal fluorescent émis par le reporteur quand la sonde est intacte



- au cours de l'élongation catalysée par la Taq Pol l'activité 5' nucléase coupe la sonde → libération du reporteur



- lorsque la polymérisation est complétée, pour chaque molécule d'ADN synthétisée un reporteur émet de la fluorescence.

Légendes :

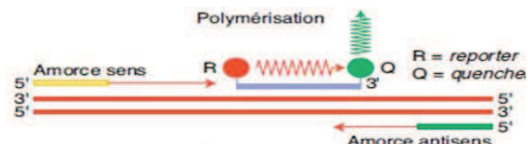
FP : Amorce sens

RP : Amorce antisens

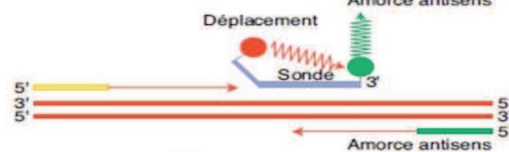
R : Reporter

Q : Quencher

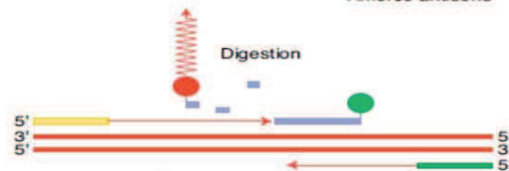
1) Polymérisation



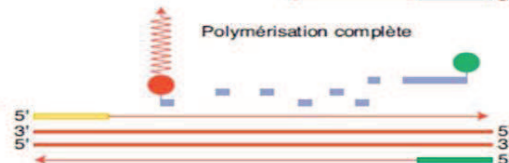
2) Déplacement de la sonde



3) Dégradation de la sonde



4) Séparation du Reporter et du Quencher



Annexe XVI : Détection du seuil de positivité

RESULTATS DE L'EVALUATION DES PERFORMANCES POUR LA DETECTION DE LA MUTATION JAK2 V617F

Date : 30/05/2018

Réactifs	Numéros de lots
Eau proméga	243740
Sonde Mutée 10µM	5192590-20-1
Sonde Sauvage WT 10µM	5192590-10-1
Primer F 20µM	2050461
Primer R 20µM	5912710
Master Mix 2x	1711042 Exp 02/2019
Horizon WT (non muté)	28829
Horizon 50% (muté)	28866
Horizon 1%maison (muté)	28829+28866

Taqman 7500 Fast Numéro de série 275012017

Programme référence 50°C 2mn

95°C 10mn

Volume de Mix 17,5µl

92°C 15s

Prise d'essai 2,5µl

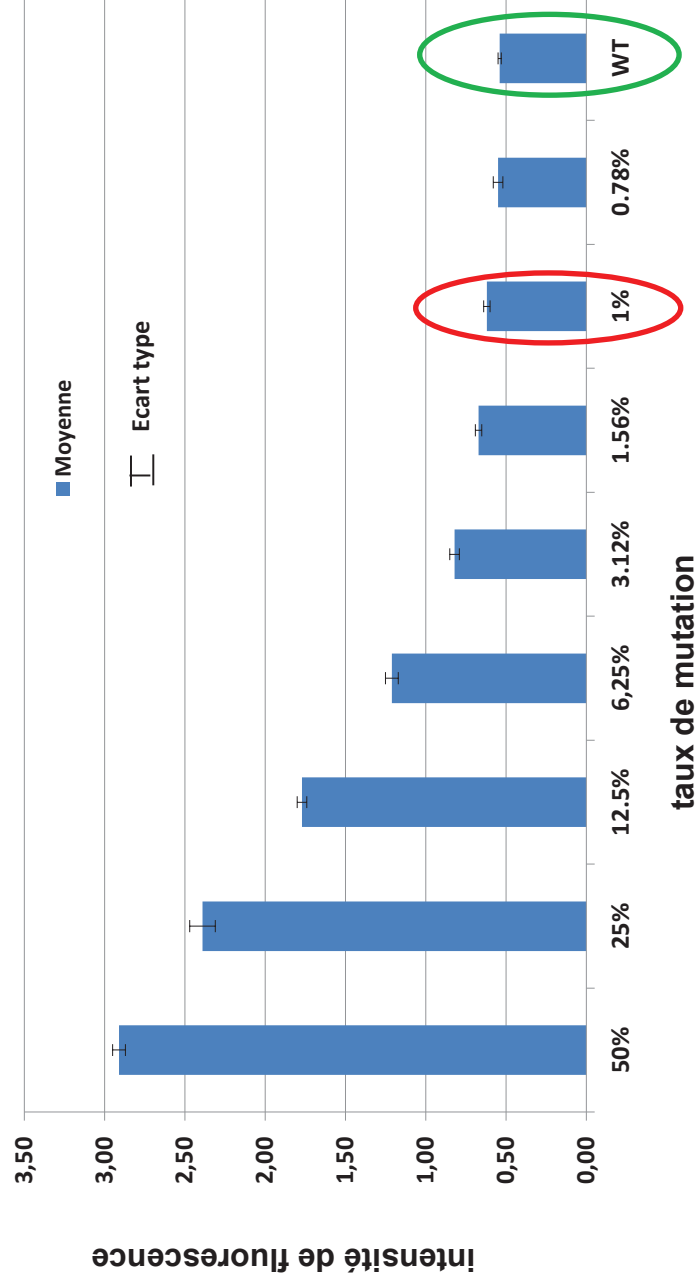
60°C 1mn

[ADN] 20ng/µl

50 cycles

REPETABILITE						
Échantillons	Nombre de valeurs (N)	Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>			CV (%) retenu par le laboratoire	Conclusion
		Moyenne	Écart-type	CV (%)		
		allele1/allele2	allele1/allele2	allele1/allele2		
point 50%	10	3,46 / 2,91	0,05 / 0,04	1,31 / 1,46	5%	CONFORME
point 25%	10	3,80 / 2,39	0,08 / 0,08	2,03 / 3,27	5%	CONFORME
point 12,5%	10	3,91 / 1,77	0,04 / 0,03	0,93 / 1,77	5%	CONFORME
point 6,25 %	10	3,96 / 1,21	0,05 / 0,04	1,26 / 3,32	5%	CONFORME
point 3,12 %	10	3,97 / 0,82	0,05 / 0,03	1,15 / 4,12	5%	CONFORME
point 1,56 %	10	4,0 / 0,67	0,05 / 0,02	1,37 / 3,69	5%	CONFORME
point 1%	10	3,97 / 0,62	0,05 / 0,02	1,31 / 3,37	5%	CONFORME
point 0,78 %	10	3,92 / 0,55	0,04 / 0,03	0,93 / 4,75	5%	CONFORME
WT	10	3,97 / 0,54	0,08 / 0,01	2,12 / 1,76	5%	CONFORME

Moyenne de l'allèle 2



Well	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn
A1	50%	3,39	3,00
A2	50%	3,49	2,91
A3	50%	3,52	2,92
A4	50%	3,52	2,96
A5	50%	3,49	2,93
A6	50%	3,40	2,86
A7	50%	3,45	2,89
A8	50%	3,42	2,90
A9	50%	3,46	2,85
A10	50%	3,45	2,91
Moyenne		3,46	2,91
Écart Type		0,05	0,04
CV		1,31	1,46

Well	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn
D1	6.25%	3,96	1,20
D2	6.25%	3,98	1,20
D3	6.25%	4,07	1,26
D4	6.25%	4,00	1,21
D5	6.25%	3,99	1,21
D6	6.25%	3,92	1,16
D7	6.25%	3,94	1,16
D8	6.25%	3,89	1,16
D9	6.25%	3,95	1,22
D10	6.25%	3,94	1,28
Moyenne		3,96	1,21
Écart Type		0,05	0,04
CV		1,26	3,32

Well	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn
G1	1%	3,86	0,62
G2	1%	4,05	0,61
G3	1%	3,99	0,59
G4	1%	3,98	0,61
G5	1%	3,96	0,62
G6	1%	4,04	0,61
G7	1%	3,98	0,62
G8	1%	3,93	0,61
G9	1%	3,97	0,64
G10	1%	3,98	0,67
Moyenne		3,97	0,62
Écart Type		0,05	0,02
CV		1,31	3,37

Well	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn
B1	25%	3,65	2,31
B2	25%	3,85	2,43
B3	25%	3,91	2,50
B4	25%	3,84	2,41
B5	25%	3,81	2,34
B6	25%	3,78	2,35
B7	25%	3,72	2,26
B8	25%	3,76	2,39
B9	25%	3,83	2,45
B10	25%	3,87	2,48
Moyenne		3,80	2,39
Écart Type		0,08	0,08
CV		2,03	3,27

Well	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn
E1	3.12%	4,01	0,82
E2	3.12%	3,96	0,83
E3	3.12%	4,00	0,82
E4	3.12%	4,04	0,84
E5	3.12%	3,97	0,75
E6	3.12%	3,97	0,81
E7	3.12%	3,94	0,83
E8	3.12%	3,88	0,77
E9	3.12%	3,94	0,84
E10	3.12%	3,97	0,87
Moyenne		3,97	0,82
Écart Type		0,05	0,03
CV		1,15	4,12

Well	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn
H1	0.78%	3,90	0,54
H2	0.78%	3,97	0,54
H3	0.78%	3,97	0,53
H4	0.78%	3,89	0,54
H5	0.78%	3,88	0,53
H6	0.78%	3,90	0,55
H7	0.78%	3,88	0,55
H8	0.78%	3,91	0,55
H9	0.78%	3,94	0,58
H10	0.78%	3,94	0,61
Moyenne		3,92	0,55
Écart Type		0,04	0,03
CV		0,93	4,75

Well	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn
C1	12.5%	3,86	1,74
C2	12.5%	3,93	1,75
C3	12.5%	3,93	1,78
C4	12.5%	3,98	1,80
C5	12.5%	3,92	1,74
C6	12.5%	3,95	1,77
C7	12.5%	3,88	1,75
C8	12.5%	3,87	1,76
C9	12.5%	3,90	1,84
C10	12.5%	3,89	1,80
	Moyenne	3,91	1,77
	Écart Type	0,04	0,03
	CV	0,93	1,77

Well	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn
F1	1.56%	3,95	0,67
F2	1.56%	3,98	0,68
F3	1.56%	4,09	0,66
F4	1.56%	3,99	0,64
F5	1.56%	4,05	0,66
F6	1.56%	4,03	0,64
F7	1.56%	4,01	0,67
F8	1.56%	3,90	0,65
F9	1.56%	3,97	0,70
F10	1.56%	3,97	0,72
	Moyenne	4,00	0,67
	Écart Type	0,05	0,02
	CV	1,37	3,69

Well	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn
A11	WT	3,86	0,53
A12	WT	3,92	0,53
B11	WT	4,11	0,54
B12	WT	4,06	0,54
C11	WT	3,94	0,56
C12	WT	3,85	0,54
D11	WT	4,04	0,54
D12	WT	3,96	0,53
E11	WT	4,02	0,52
E12	WT	3,97	0,53
	Moyenne	3,97	0,54
	Écart Type	0,08	0,01
	CV	2,12	1,76

Annexe XVII-A : Validité du contrôle "HORIZON 1% MAISON"

RESULTATS DE L'EVALUATION DES PERFORMANCES POUR LA DETECTION DE LA MUTATION JAK2 V617F

TEST DE COMPARAISON: Contrôle HORIZON à 1% avec pipette non certifiée vs certifiée COFRAC

fait le 22/06/2018

Taqman 7500 Fast Numéro de série: 275012017

Réactifs	Numéros de lots
Eau proméga	243740
Sonde Mutée 10µM	5192590-20-1
Sonde Sauvage WT 10µM	5192590-10-1
Primer F 20µM	2050461
Primer R 20µM	5912710
Master Mix 2x	1711042 Exp 02/2019
Horizon WT (non muté)	28829
Horizon 50% (muté)	28866
Horizon 1%maison (muté)	28829+28866

Programme de référence

50°C 2mn

95°C 10mn

92°C 15s 50 cycles

60°C 1mn

Volume de Mix

17,5µl

Prise d'essai

2,5µl

[ADN]

20ng/µl

Répétabilité des contrôles "Horizon 1% maison" avec et sans pipettes certifiées COFRAC 22/06/2018									
Échantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne		Écart-type		CV (%)	Résultats obtenus	CV Limite pour les deux allèles %	Conclusion
		allele1/allele2	allele1/allele2	allele1/allele2	allele1/allele2				
CONTRÔLE HORIZON 1% pipette COFRAC	24	4,04 / 0,60	0,06 / 0,02	1,38 / 3,39	Muté	5	CONFORME		
CONTRÔLE HORIZON 1% pipette non certifiée	24	4,07 / 0,58	0,05 / 0,02	1,26 / 4,33	Muté	5	CONFORME		

Applicable ; non applicable (à justifier)

Well	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn	Résultat obtenu
B7	WT COFRAC	4,04	0,46	Undetermined
B8	50 COFRAC	3,63	2,83	Undetermined
B9	Horizon WT	4,03	0,47	Undetermined
B10	Horizon 1%	4,03	0,64	Undetermined
B11	Horizon 50%	3,71	2,79	Undetermined
B12	H2O	0,09	0,10	Négative Control

1	1% pipette COFRAC	4,02	0,57	Muté
3	1% pipette COFRAC	4,05	0,59	Muté
4	1% pipette COFRAC	4,02	0,59	Muté
5	1% pipette COFRAC	4,09	0,61	Muté
5	1% pipette COFRAC	4,06	0,59	Muté
6	1% pipette COFRAC	4,06	0,60	Muté
7	1% pipette COFRAC	4,00	0,59	Muté
8	1% pipette COFRAC	4,01	0,59	Muté
9	1% pipette COFRAC	3,99	0,62	Muté
10	1% pipette COFRAC	4,05	0,62	Muté
11	1% pipette COFRAC	4,01	0,63	Muté
12	1% pipette COFRAC	3,97	0,63	Muté
13	1% pipette COFRAC	3,92	0,55	Muté
14	1% pipette COFRAC	4,06	0,59	Muté
15	1% pipette COFRAC	4,18	0,60	Muté
16	1% pipette COFRAC	4,11	0,60	Muté
17	1% pipette COFRAC	4,10	0,59	Muté
18	1% pipette COFRAC	4,02	0,59	Muté
19	1% pipette COFRAC	4,03	0,56	Muté
20	1% pipette COFRAC	3,96	0,57	Muté
21	1% pipette COFRAC	4,02	0,61	Muté
22	1% pipette COFRAC	4,04	0,62	Muté
23	1% pipette COFRAC	4,10	0,60	Muté
24	1% pipette COFRAC	3,99	0,60	Muté
MOYENNE		4,04	0,60	
ECART TYPE		0,06	0,02	
CV%		1,38%	3,39%	

Well	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn	Résultat obtenu
1	1% pipette non certifiée	4,14	0,61	Muté
3	1% pipette non certifiée	4,07	0,58	Muté
4	1% pipette non certifiée	4,10	0,60	Muté
5	1% pipette non certifiée	4,13	0,59	Muté
5	1% pipette non certifiée	4,09	0,55	Muté
6	1% pipette non certifiée	4,10	0,55	Muté
7	1% pipette non certifiée	4,00	0,54	Muté
8	1% pipette non certifiée	3,98	0,55	Muté
9	1% pipette non certifiée	4,00	0,58	Muté
10	1% pipette non certifiée	4,05	0,59	Muté
11	1% pipette non certifiée	4,06	0,60	Muté
12	1% pipette non certifiée	4,04	0,60	Muté
13	1% pipette non certifiée	4,12	0,59	Muté
14	1% pipette non certifiée	4,02	0,58	Muté
15	1% pipette non certifiée	4,15	0,59	Muté
16	1% pipette non certifiée	4,09	0,58	Muté
17	1% pipette non certifiée	4,15	0,56	Muté
18	1% pipette non certifiée	4,10	0,55	Muté
19	1% pipette non certifiée	4,05	0,55	Muté
20	1% pipette non certifiée	4,02	0,55	Muté
21	1% pipette non certifiée	4,02	0,58	Muté
22	1% pipette non certifiée	4,02	0,56	Muté
23	1% pipette non certifiée	4,07	0,57	Muté
24	1% pipette non certifiée	4,14	0,65	Muté
MOYENNE		4,07	0,58	
ECART TYPE		0,05	0,02	
CV%		1,26%	4,33%	

Annexe XVII-B : Validité du contrôle "HORIZON 1% MAISON"

RESULTATS DE L'EVALUATION DES PERFORMANCES POUR LA DETECTION DE LA MUTATION JAK2 V617F

TEST DE COMPARAISON: Contrôle HORIZON à 1% pipette non certifiée COFRAC vs EEQ CQ19.1JA (1,02%)

fait le 22/06/2018

Taqman 7500 Fast Numéro de série
275012017

Réactifs	Numéros de lots
Eau proméga	243740
Sonde Mutée 10µM	5192590-20-1
Sonde Sauvage WT 10µM	5192590-10-1
Primer F 20µM	2050461
Primer R 20µM	5912710
Master Mix 2x	1711042 Exp 02/2019
Horizon WT (non muté)	28829
Horizon 50% (muté)	28866
Horizon 1%maison (muté)	28829+28866

Programme de référence	50°C	2mn
	95°C	10mn
	92°C	15s
	60°C	1mn
		50 cycles

Volume de Mix 17,5µl
Prise d'essai 2,5µl
[ADN] 20ng/µl

Répétabilité du contrôle "Horizon 1% maison" avec des pipettes non certifiées COFRAC et du EEQ CQ19.1JA								
Échantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne		CV (%)		Résultats obtenus	Résultats attendus par le laboratoire	Conclusion
		allele1/allele2	Écart-type	allele1/allele2	allele1/allele2			
CONTRÔLE HORIZON 1% maison pipette non certifiée COFRAC	24	4,07 / 0,58	0,05 / 0,02	1,26 / 4,33	Muté	<10	CONFORME	
CONTRÔLE EEQ CQ19.1JA (1,02%)	12	4,09 / 0,58	0,04 / 0,03	1,0 / 5,14	Muté	<10	CONFORME	

Applicable ; non applicable (à justifier)

Well	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn	Résultat obtenu
B9	Horizon WT	4,03	0,47	Undetermined
B10	Horizon 1%	4,03	0,64	Undetermined
B11	Horizon 50%	3,71	2,79	Undetermined
B12	H2O	0,09	0,10	Négative Control
Well	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn	Résultat obtenu
1	1% pipette non Cofrac	4,14	0,61	Muté
2	1% pipette non Cofrac	4,07	0,58	Muté
3	1% pipette non Cofrac	4,10	0,60	Muté
4	1% pipette non Cofrac	4,13	0,59	Muté
5	1% pipette non Cofrac	4,09	0,55	Muté
6	1% pipette non Cofrac	4,10	0,55	Muté
7	1% pipette non Cofrac	4,00	0,54	Muté
8	1% pipette non Cofrac	3,98	0,55	Muté
9	1% pipette non Cofrac	4,00	0,58	Muté
10	1% pipette non Cofrac	4,05	0,59	Muté
11	1% pipette non Cofrac	4,06	0,60	Muté
12	1% pipette non Cofrac	4,04	0,60	Muté
13	1% pipette non Cofrac	4,12	0,59	Muté
14	1% pipette non Cofrac	4,02	0,58	Muté
15	1% pipette non Cofrac	4,15	0,59	Muté
16	1% pipette non Cofrac	4,09	0,58	Muté
17	1% pipette non Cofrac	4,15	0,56	Muté
18	1% pipette non Cofrac	4,10	0,55	Muté
19	1% pipette non Cofrac	4,05	0,55	Muté
20	1% pipette non Cofrac	4,02	0,55	Muté
21	1% pipette non Cofrac	4,02	0,58	Muté
22	1% pipette non Cofrac	4,02	0,56	Muté
23	1% pipette non Cofrac	4,07	0,57	Muté
24	1% pipette non Cofrac	4,14	0,65	Muté
MOYENNE		4,07	0,58	
ECART TYPE		0,05	0,02	
CV		1,26%	4,33%	

Well	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn	Résultat obtenu
1	EEQ CQ19.1JA	4,07	0,58	Muté
2	EEQ CQ19.1JA	4,09	0,59	Muté
3	EEQ CQ19.1JA	4,19	0,59	Muté
4	EEQ CQ19.1JA	4,12	0,59	Muté
5	EEQ CQ19.1JA	4,09	0,58	Muté
6	EEQ CQ19.1JA	4,10	0,53	Muté
7	EEQ CQ19.1JA	4,04	0,52	Muté
8	EEQ CQ19.1JA	4,05	0,55	Muté
9	EEQ CQ19.1JA	4,07	0,58	Muté
10	EEQ CQ19.1JA	4,07	0,58	Muté
11	EEQ CQ19.1JA	4,09	0,63	Muté
12	EEQ CQ19.1JA	4,12	0,61	Muté
MOYENNE		4,09	0,58	
ECART TYPE		0,04	0,03	
CV		1,00%	5,14%	

Annexe XVII-C : Validité du contrôle "HORIZON 1% MAISON"

RESULTATS DE L'EVALUATION DES PERFORMANCES POUR LA DETECTION DE LA MUTATION JAK2 V617F

TEST DE COMPARAISON: Contrôle HORIZON à 1% pipette non certifiée COFRAC vs EEQ CQ20.1JC (0,98%)

fait le 22/06/2018

Taqman 7500 Fast Numéro de série
275012017

Réactifs	Numéros de lots
Eau proméga	243740
Sonde Mutée 10µM	5192590-20-1
Sonde Sauvage WT 10µM	5192590-10-1
Primer F 20µM	2050461
Primer R 20µM	5912710
Master Mix 2x	1711042 Exp 02/2019
Horizon WT (non muté)	28829
Horizon 50% (muté)	28866
Horizon 1%maison (muté)	28829+28866

Programme de référence	50°C	2mn
	95°C	10mn
	92°C	15s
	60°C	1mn
		50 cycles

Volume de Mix 17,5µl
Prise d'essai 2,5µl
[ADN] 20ng/µl

Répétabilité du contrôle "Horizon 1% maison" avec des pipettes non certifiées COFRAC et du EEQ CQ20.1JC						
Échantillons	Nombre de valeurs (N)	Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>		Résultats obtenus	Résultats attendus par le laboratoire	Conclusion
		Moyenne	Écart-type			
CONTRÔLE HORIZON 1% maison pipette non certifiée COFRAC	24	4,07 / 0,58	0,05 / 0,02	1,23 / 3,45	Muté	CONFORME
CONTRÔLE EEQ CQ20.1JC (0,96%)	12	4,03 / 0,55	0,03 / 0,03	0,74 / 5,45	Muté	CONFORME

Well	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn	Résultat obtenu
B9	Horizon WT	4,03	0,47	Undetermined
B10	Horizon 1%	4,03	0,64	Undetermined
B11	Horizon 50%	3,71	2,79	Undetermined
B12	H2O	0,09	0,10	Negative Control
Well	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn	Résultat obtenu
1	1% pipette non Cofrac	4,14	0,61	Muté
2	1% pipette non Cofrac	4,07	0,58	Muté
3	1% pipette non Cofrac	4,10	0,60	Muté
4	1% pipette non Cofrac	4,13	0,59	Muté
5	1% pipette non Cofrac	4,09	0,55	Muté
6	1% pipette non Cofrac	4,10	0,55	Muté
7	1% pipette non Cofrac	4,00	0,54	Muté
8	1% pipette non Cofrac	3,98	0,55	Muté
9	1% pipette non Cofrac	4,00	0,58	Muté
10	1% pipette non Cofrac	4,05	0,59	Muté
11	1% pipette non Cofrac	4,06	0,60	Muté
12	1% pipette non Cofrac	4,04	0,60	Muté
13	1% pipette non Cofrac	4,12	0,59	Muté
14	1% pipette non Cofrac	4,02	0,58	Muté
15	1% pipette non Cofrac	4,15	0,59	Muté
16	1% pipette non Cofrac	4,09	0,58	Muté
17	1% pipette non Cofrac	4,15	0,56	Muté
18	1% pipette non Cofrac	4,10	0,55	Muté
19	1% pipette non Cofrac	4,05	0,55	Muté
20	1% pipette non Cofrac	4,02	0,55	Muté
21	1% pipette non Cofrac	4,02	0,58	Muté
22	1% pipette non Cofrac	4,02	0,56	Muté
23	1% pipette non Cofrac	4,07	0,57	Muté
24	1% pipette non Cofrac	4,14	0,65	Muté
MOYENNE		4,07	0,58	
ECART TYPE		0,05	0,02	
CV		1,26%	4,33%	

Well	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn	Résultat obtenu
1	EEQ CQ20.1JC	4,00	0,55	Muté
2	EEQ CQ20.1JC	4,04	0,55	Muté
3	EEQ CQ20.1JC	4,06	0,52	Muté
4	EEQ CQ20.1JC	4,03	0,54	Muté
5	EEQ CQ20.1JC	4,06	0,51	Muté
6	EEQ CQ20.1JC	4,01	0,53	Muté
7	EEQ CQ20.1JC	3,99	0,55	Muté
8	EEQ CQ20.1JC	4,02	0,52	Muté
9	EEQ CQ20.1JC	4,01	0,55	Muté
10	EEQ CQ20.1JC	4,02	0,58	Muté
11	EEQ CQ20.1JC	4,06	0,59	Muté
12	EEQ CQ20.1JC	4,07	0,59	Muté
MOYENNE		4,03	0,55	
ECART TYPE		0,03	0,03	
CV		0,71%	4,84%	

Annexe 16A : REPETABILITE: Détection mutation JAK2 V617F sur ADN BAS (faiblement muté) et ADN HAUT (très muté)

RESULTATS DE L'EVALUATION DES PERFORMANCES POUR LA DETECTION DE LA MUTATION JAK2 V617F

Réactifs	Numeros de lots
Eau proméga	243740
Sonde Mutée 10µM	5192590-20-1
Sonde Sauvage WT 10µM	5192590-10-1
Primer F 20µM	2050461
Primer R 20µM	5912710
Master Mix 2x	1711042 Exp/02/2019
Horizon WT (non muté)	23891
Horizon 50% (muté)	26343
Horizon 1% maison (muté)	23891 + 26343

Taqman 7500 Fast Numéro de série: 275012017

Programme de référence	50°C	95°C
	92°C	50 cycles
	60°C	

Volume de Mix 17,5µl
Prise d'essai 2,5µl
[ADN] 20ng/µl

TABLEAU DE RESULTATS : fait le 18/05/2018 par MT

Well	Sample Name	SNP Assay Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn	Call
A9	Horizon Wt	JAK2	3,98	0,53	Undetermined
A10	Horizon 1%	JAK2	4,06	0,65	Undetermined
A11	Horizon 50%	JAK2	3,55	3,06	Undetermined
A12	H2O	JAK2	0,10	0,11	Negative Control (NC)
A1	ADN muté faible (GIN)	JAK2	3,92	0,84	Muté
A2	ADN muté faible (GIN)	JAK2	3,99	0,76	Muté
A3	ADN muté faible (GIN)	JAK2	4,04	0,77	Muté
B1	ADN muté faible (GIN)	JAK2	4,01	0,82	Muté
B2	ADN muté faible (GIN)	JAK2	4,08	0,82	Muté
B3	ADN muté faible (GIN)	JAK2	4,14	0,79	Muté
C1	ADN muté faible (GIN)	JAK2	4,05	0,78	Muté
C2	ADN muté faible (GIN)	JAK2	4,11	0,81	Muté

C3	ADN muté faible (GIN)	JAK2	4,09	0,79	Muté
D1	ADN muté faible (GIN)	JAK2	4,01	0,76	Muté
D2	ADN muté faible (GIN)	JAK2	4,10	0,78	Muté
D3	ADN muté faible (GIN)	JAK2	4,22	0,82	Muté
E1	ADN muté faible (GIN)	JAK2	4,03	0,77	Muté
E2	ADN muté faible (GIN)	JAK2	4,07	0,75	Muté
E3	ADN muté faible (GIN)	JAK2	4,09	0,78	Muté
F1	ADN muté faible (GIN)	JAK2	4,13	0,79	Muté
F2	ADN muté faible (GIN)	JAK2	4,06	0,78	Muté
F3	ADN muté faible (GIN)	JAK2	4,14	0,79	Muté
G1	ADN muté faible (GIN)	JAK2	4,03	0,78	Muté
G2	ADN muté faible (GIN)	JAK2	4,11	0,75	Muté
G3	ADN muté faible (GIN)	JAK2	4,06	0,76	Muté
H1	ADN muté faible (GIN)	JAK2	4,01	0,73	Muté
H2	ADN muté faible (GIN)	JAK2	4,07	0,75	Muté
H3	ADN muté faible (GIN)	JAK2	4,08	0,74	Muté
	MOYENNE		4,07	0,78	
	ECART TYPE		0,06	0,03	
	CV		1,50%	3,62%	
	Résultat obtenu en routine		4,03	0,77	Muté

A4	ADN muté fort (FOUR)	JAK2	3,75	2,86	Muté
A5	ADN muté fort (FOUR)	JAK2	3,78	2,87	Muté
A6	ADN muté fort (FOUR)	JAK2	3,67	2,85	Muté
B4	ADN muté fort (FOUR)	JAK2	3,83	2,90	Muté
B5	ADN muté fort (FOUR)	JAK2	3,84	2,88	Muté
B6	ADN muté fort (FOUR)	JAK2	3,78	2,83	Muté
C4	ADN muté fort (FOUR)	JAK2	3,93	2,92	Muté
C5	ADN muté fort (FOUR)	JAK2	3,87	2,84	Muté
C6	ADN muté fort (FOUR)	JAK2	3,88	2,90	Muté
D4	ADN muté fort (FOUR)	JAK2	3,93	2,89	Muté
D5	ADN muté fort (FOUR)	JAK2	3,93	2,86	Muté
D6	ADN muté fort (FOUR)	JAK2	3,85	2,79	Muté
E4	ADN muté fort (FOUR)	JAK2	3,88	2,84	Muté

E5	ADN muté fort (FOUR)	JAK2	3,92	2,78	Muté
E6	ADN muté fort (FOUR)	JAK2	3,92	2,80	Muté
F4	ADN muté fort (FOUR)	JAK2	3,90	2,86	Muté
F5	ADN muté fort (FOUR)	JAK2	3,95	2,83	Muté
F6	ADN muté fort (FOUR)	JAK2	3,95	2,80	Muté
G4	ADN muté fort (FOUR)	JAK2	3,84	2,78	Muté
G5	ADN muté fort (FOUR)	JAK2	3,86	2,82	Muté
G6	ADN muté fort (FOUR)	JAK2	3,93	2,82	Muté
H4	ADN muté fort (FOUR)	JAK2	3,77	2,77	Muté
H5	ADN muté fort (FOUR)	JAK2	3,76	2,75	Muté
H6	ADN muté fort (FOUR)	JAK2	3,78	2,77	Muté
	MOYENNE		3,85	2,83	
	ECART TYPE		0,08	0,05	
	CV		1,97%	1,67%	
	Résultat obtenu en routine		4,01	2,95	Muté

REPETABILITE "DETECTION DE LA MUTATION JAK2 V617F" 18/05/2018							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne intensité fluorescence	Ecart type intensité fluorescence	CV (%)	Résultats obtenus pour les 24 valeurs	CV Limite pour les deux allèles	Conclusion
		allele1/allele2	allele1/allele2	allele1/allele2			
ADN muté faible(environ 1%)	24	4,07 / 0,78	0,06 / 0,03	1,50 / 3,62	muté faible	5%	CONFORME
ADN muté fort (environ 50%)	24	3,85 / 2,83	0,08 / 0,05	1,97 / 1,67	muté haut	5%	CONFORME

Annexe 16B : FIDELITE INTERMEDIAIRE : Détection de la mutation JAK2 V617F sur les contrôles internes

RESULTATS DE L'EVALUATION DES PERFORMANCES POUR LA DETECTION DE LA MUTATION JAK2 V617F

Période : du 22/06/2017 au 31/05/2018

OPERATEURS : HA/PR/MT/PAT

N° de lot	Horizon Wt	Horizon 50%	Horizon 1% maison
Série 1 à 12	23891	18105	23891 + 18105
Série 13 à 23	23891	26343	23891 + 26343

Séries	Opérateur	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn
1	PR	Horizon 1%	4,34	0,66	Horizon 50%	3,76	3,72	Horizon Wt	4,28	0,53
2	HA	Horizon 1%	4,20	0,66	Horizon 50%	3,70	3,76	Horizon Wt	4,12	0,54
3	HA	Horizon 1%	4,33	0,66	Horizon 50%	3,74	3,75	Horizon Wt	4,22	0,58
4	HA	Horizon 1%	4,20	0,68	Horizon 50%	3,63	3,73	Horizon Wt	4,12	0,56
5	MT	Horizon 1%	4,49	0,65	Horizon 50%	3,84	3,73	Horizon Wt	4,41	0,56
6	HA	Horizon 1%	4,27	0,67	Horizon 50%	3,67	3,68	Horizon Wt	4,41	0,57
7	HA	Horizon 1%	4,28	0,68	Horizon 50%	3,68	3,67	Horizon Wt	4,25	0,55
8	MT	Horizon 1%	4,32	0,66	Horizon 50%	3,75	3,85	Horizon Wt	4,37	0,57
9	HA	Horizon 1%	4,01	0,63	Horizon 50%	3,54	3,48	Horizon Wt	4,01	0,52
10	MT	Horizon 1%	4,48	0,65	Horizon 50%	3,83	3,66	Horizon Wt	4,42	0,52
11	HA	Horizon 1%	4,1	0,63	Horizon 50%	3,59	3,49	Horizon Wt	4,16	0,55
12	HA	Horizon 1%	4,1	0,64	Horizon 50%	3,48	3,51	Horizon Wt	4,08	0,54
		Moyenne	4,26	0,66	Moyenne	3,68	3,67	Moyenne	4,24	0,55
		Écart type	0,15	0,02	Écart type	0,11	0,12	Écart type	0,14	0,02
		CV	3,45%	2,45%	CV	3,01%	3,19%	CV	3,36%	3,59%

FIDELITE INTERMEDIAIRE "DETECTION DE LA MUTATION JAK2 V617F" : Série 1 à 12 Période du 22/06/2017 au 04/12/2017

Échantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Écart-type	CV (%)	Résultats obtenus pour les 12 valeurs	CV Limite pour les deux allèles	Conclusion
		allele1/allele2	allele1/allele2	allele1/allele2			
Horizon 1%	12	4,26 / 0,66	0,15 / 0,02	3,45 / 2,45	Muté	5%	CONFORME
Horizon 50%	12	3,68 / 3,67	0,11 / 0,12	3,01 / 3,19	Muté	5%	CONFORME
Horizon Wt	12	4,24 / 0,55	0,14 / 0,02	3,36 / 3,59	Non muté	5%	CONFORME

Séries	Opérateur	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn
13	HA	Horizon 1%	4,16	0,65	Horizon 50%	3,48	3,55	Horizon Wt	4,06	0,55
14	HA	Horizon 1%	4,03	0,66	Horizon 50%	3,47	3,51	Horizon Wt	4,14	0,54
15	HA	Horizon 1%	4,04	0,67	Horizon 50%	3,49	3,58	Horizon Wt	4,10	0,58
16	PAT	Horizon 1%	4,41	0,61	Horizon 50%	3,65	3,36	Horizon Wt	4,34	0,53
17	HA	Horizon 1%	3,92	0,66	Horizon 50%	3,34	3,46	Horizon Wt	3,88	0,55
18	HA	Horizon 1%	3,93	0,8	Horizon 50%	3,38	3,66	Horizon Wt	3,81	0,62
19	HA	Horizon 1%	3,68	0,63	Horizon 50%	3,24	2,98	Horizon Wt	3,63	0,52
20	HA	Horizon 1%	4,02	0,73	Horizon 50%	3,51	3,18	Horizon Wt	4,02	0,58
21	MT	Horizon 1%	4,16	0,66	Horizon 50%	3,65	3,22	Horizon Wt	4,15	0,54
22	HA	Horizon 1%	4,04	0,65	Horizon 50%	3,55	3,05	Horizon Wt	3,98	0,53
23	MT	Horizon 1%	4,11	0,65	Horizon 50%	3,61	3,07	Horizon Wt	4,07	0,52
		Moyenne	4,05	0,67	Moyenne	3,49	3,33	Moyenne	4,02	0,55
		Écart type	0,18	0,05	Écart type	0,13	0,24	Écart type	0,19	0,03
		CV	4,47%	7,78%	CV	3,71%	7,19%	CV	4,73%	5,59%

2ème FIDELITE INTERMEDIAIRE "DETECTION DE LA MUTATION JAK2 V617F" : Série 13 à 23 Période du 08/01/2018 au 31/05/2018						
Échantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne intensité fluorescence	Écart type intensité fluorescence	CV (%)	Résultats obtenus pour les 11 valeurs	Conclusion
Horizon 1%	11	4,05 / 0,67	0,18 / 0,05	4,47 / 7,78	Muté	CONFORME
Horizon 50%	11	3,49 / 3,33	0,13 / 0,24	3,71 / 7,19	Muté	CONFORME
Horizon Wt	11	4,02 / 0,55	0,19 / 0,03	4,73 / 5,59	Non muté	CONFORME

Annexe XVIII-C : VARIABILITE INTER-OPERATEURS : Détection de la mutation JAK2 V617F sur les contrôles internes

RESULTATS DE L'EVALUATION DES PERFORMANCES POUR LA DETECTION DE LA MUTATION JAK2 V617F

Période : du 22/06/2017 au 30/04/2018

N° de lot	Horizon Wt	Horizon 50%	Horizon 1% maison
Série 2 à 12	23891	18105	23891 + 18105
Série 13 à 23	23891	26343	23891 + 26343

VARIABILITE INTER OPERATEUR "DETECTION DE LA MUTATION JAK2 V617F" : Série 2 à 12 : Période du 22/06/2017 au 04/12/2017

Échantillons	Opérateur	Nombre de valeurs (N)	Moyenne Fluorescence	Écart-type Fluorescence	CV (%)	Résultats obtenus	CV Limite pour les deux allèles	Conclusion
Horizon 1%	HA	8	4,19 / 0,66	0,11 / 0,02	2,62 / 3,03	Muté	5%	CONFORME
	MT	3	4,43 / 0,63	0,10 / 0,01	2,25 / 1,53	Muté	5%	CONFORME
Horizon 50%	HA	8	3,63 / 3,63	0,09 / 0,12	2,47 / 3,3	Muté	5%	CONFORME
	MT	3	3,81 / 3,75	0,05 / 0,10	1,31 / 2,66	Muté	5%	CONFORME
Horizon WT	HA	8	4,17 / 0,55	0,12 / 0,02	2,87 / 3,63	Non muté	5%	CONFORME
	MT	3	4,40 / 0,55	0,03 / 0,03	0,68 / 5,45	Non muté	5%	CONFORME

VARIABILITE INTER OPERATEUR "DETECTION DE LA MUTATION JAK2 V617F" : série 13 à 23 : Période du 22/06/2017 au 30/04/2018

Échantillons	Opérateur	Nombre de valeurs (N)	Moyenne Fluorescence	Écart-type Fluorescence	CV (%)	Résultats obtenus	CV Limite pour les deux allèles %	Conclusion
Horizon 1%	HA	8	3,98 / 0,68	0,14 / 0,05	3,51 / 7,35	Muté	<10	CONFORME
	MT	2	4,14 / 0,66	0,04 / 0,01	0,96 / 1,51	Muté	<10	CONFORME
Horizon 50%	HA	8	3,43 / 3,37	0,10 / 0,26	2,91 / 7,71	Muté	<10	CONFORME
	MT	2	3,63 / 3,15	0,03 / 0,11	0,82 / 3,49	Muté	<10	CONFORME
Horizon WT	HA	8	3,95 / 0,56	0,17 / 0,03	4,3 / 5,35	Non muté	<10	CONFORME
	MT	2	4,11 / 0,53	0,06 / 0,01	1,45 / 1,88	Non muté	<10	CONFORME

Série 2 à 12

OPERATEUR : HA				OPERATEUR : MT			
Séries	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn	Séries	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn
2	Horizon 1%	4,20	0,66	5	Horizon 1%	4,49	0,65
	Horizon 50%	3,70	3,76		Horizon 50%	3,84	3,73
	Horizon Wt	4,12	0,54		Horizon Wt	4,41	0,56
3	Horizon 1%	4,33	0,66	8	Horizon 1%	4,32	0,66
	Horizon 50%	3,74	3,75		Horizon 50%	3,75	3,85
	Horizon Wt	4,22	0,58		Horizon Wt	4,37	0,57
4	Horizon 1%	4,20	0,68	10	Horizon 1%	4,48	0,65
	Horizon 50%	3,63	3,73		Horizon 50%	3,83	3,66
	Horizon Wt	4,12	0,56		Horizon Wt	4,42	0,52
6	Horizon 1%	4,27	0,67	Moyenne	Horizon 1%	4,43	0,65
	Horizon 50%	3,67	3,68		Horizon 50%	3,81	3,75
	Horizon Wt	4,41	0,57		Horizon Wt	4,40	0,55
7	Horizon 1%	4,28	0,68	Écart type	Horizon 1%	0,10	0,01
	Horizon 50%	3,68	3,67		Horizon 50%	0,05	0,10
	Horizon Wt	4,25	0,55		Horizon Wt	0,03	0,03
9	Horizon 1%	4,01	0,63	CV%	Horizon 1%	2,25	1,53
	Horizon 50%	3,54	3,48		Horizon 50%	1,31	2,66
	Horizon Wt	4,01	0,52		Horizon Wt	0,68	5,45
11	Horizon 1%	4,1	0,63				
	Horizon 50%	3,59	3,49				
	Horizon Wt	4,16	0,55				
12	Horizon 1%	4,1	0,64				
	Horizon 50%	3,48	3,51				
	Horizon Wt	4,08	0,54				
Moyenne	Horizon 1%	4,19	0,66				
	Horizon 50%	3,63	3,63				
	Horizon Wt	4,17	0,55				
Écart type	Horizon 1%	0,11	0,02				
	Horizon 50%	0,09	0,12				
	Horizon Wt	0,12	0,02				
CV%	Horizon 1%	2,62	3,03				
	Horizon 50%	2,47	3,3				
	Horizon Wt	2,87	3,63				

Série 13 à 23

OPERATEUR : HA				OPERATEUR : MT			
Séries	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn	Séries	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn
13	Horizon 1%	4,16	0,65	21	Horizon 1%	4,16	0,66
	Horizon 50%	3,48	3,55		Horizon 50%	3,65	3,22
	Horizon Wt	4,06	0,55		Horizon Wt	4,15	0,54
14	Horizon 1%	4,03	0,66	23	Horizon 1%	4,11	0,65
	Horizon 50%	3,47	3,51		Horizon 50%	3,61	3,07
	Horizon Wt	4,14	0,54		Horizon Wt	4,07	0,52
15	Horizon 1%	4,04	0,67	Moyenne	Horizon 1%	4,14	0,66
	Horizon 50%	3,49	3,58		Horizon 50%	3,63	3,15
	Horizon Wt	4,10	0,58		Horizon Wt	4,11	0,53
17	Horizon 1%	3,92	0,66	Écart type	Horizon 1%	0,04	0,01
	Horizon 50%	3,34	3,46		Horizon 50%	0,03	0,11
	Horizon Wt	3,88	0,55		Horizon Wt	0,06	0,01
18	Horizon 1%	3,93	0,8	CV%	Horizon 1%	0,96	1,51
	Horizon 50%	3,38	3,66		Horizon 50%	0,82	3,49
	Horizon Wt	3,81	0,62		Horizon Wt	1,45	1,88
19	Horizon 1%	3,68	0,63				
	Horizon 50%	3,24	2,98				
	Horizon Wt	3,63	0,52				
20	Horizon 1%	4,02	0,73				
	Horizon 50%	3,51	3,18				
	Horizon Wt	4,02	0,58				
22	Horizon 1%	4,04	0,65				
	Horizon 50%	3,55	3,05				
	Horizon Wt	3,98	0,53				
Moyenne	Horizon 1%	3,98	0,68				
	Horizon 50%	3,43	3,37				
	Horizon Wt	3,95	0,56				
Écart type	Horizon 1%	0,14	0,05				
	Horizon 50%	0,10	0,26				
	Horizon Wt	0,17	0,03				
CV%	Horizon 1%	3,51	7,35				
	Horizon 50%	2,91	7,71				
	Horizon Wt	4,3	5,35				

Annexe 16D : TEST DE CONTAMINATION: Détection mutation JAK2 V617F sur ADN muté et ADN non muté

RESULTATS DE L'EVALUATION DES PERFORMANCES POUR LA DETECTION DE LA MUTATION JAK2 V617F

Réactifs	Numéros de lots
Eau proméga	255579
Sonde Mutée 10µM	5192590-20-1
Sonde Sauvage WT 10µM	5192590-10-1
Primer F 20µM	2050461
Primer R 20µM	5912710
Master Mix 2x	1711042 Exp 02/2019
Horizon WT (non muté)	28829
Horizon 50% (muté)	28866
Horizon 1% maison (muté)	28829+28866

Taqman 7500 Fast Numéro de série: 275012017

Programme de référence

50°C	2min
95°C	10mn
92°C	15s
60°C	1mn
	50 cycles

Volume de Mix 17,5µl

Prise d'essai 2,5µl

[ADN] 20ng/µl

Date : 22/06/2018 MT

Sample Name	SNP Assay Name	Task	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn	Pass.Ref	Call
Horizon WT	JAK2V617F	UNKNOWN	4.03	0.47	382557	Undetermined
Horizon 1%	JAK2V617F	UNKNOWN	4.03	0.64	389259	Undetermined
Horizon 50%	JAK2V617F	UNKNOWN	3.71	2.79	381942	Undetermined
H2O	JAK2V617F	NTC	0.09	0.10	423935	Negative Control (NC)
JEG	JAK2V617F	UNKNOWN	3.54	2.81	406496	Muté
JEG	JAK2V617F	UNKNOWN	3.58	2.76	409420	Muté
JEG	JAK2V617F	UNKNOWN	3.65	2.80	404099	Muté
BRE	JAK2V617F	UNKNOWN	3.97	0.47	406749	Non muté
BRE	JAK2V617F	UNKNOWN	3.97	0.46	397639	Non muté
BRE	JAK2V617F	UNKNOWN	3.95	0.49	387043	Non muté
JEG	JAK2V617F	UNKNOWN	3.57	2.79	368925	Muté

JEG	JAK2V617F	UNKNOWN	3,53	2,80	372317	Muté
JEG	JAK2V617F	UNKNOWN	3,44	2,67	387840	Muté
BRE	JAK2V617F	UNKNOWN	3,98	0,45	375936	Non muté
BRE	JAK2V617F	UNKNOWN	3,95	0,48	379028	Non muté
BRE	JAK2V617F	UNKNOWN	4,01	0,46	381224	Non muté
JEG	JAK2V617F	UNKNOWN	3,61	2,82	369927	Muté
JEG	JAK2V617F	UNKNOWN	3,67	2,84	400648	Muté
JEG	JAK2V617F	UNKNOWN	3,72	2,86	382244	Muté
BRE	JAK2V617F	UNKNOWN	4,06	0,46	398146	Non muté
BRE	JAK2V617F	UNKNOWN	4,05	0,45	375949	Non muté
BRE	JAK2V617F	UNKNOWN	3,98	0,44	377283	Non muté

Moyenne BRE	4,00	0,46
Moyenne BRE	3,98	0,46
Moyenne JEG	3,59	2,79

BRE Échantillon susceptible d'être contaminé
BRE Échantillon susceptible de ne pas être contaminé

$$\text{RAPPORT} = \frac{\text{BRE (Contaminé)} - \text{BRE (pas contaminé)}}{\text{JEG - BRE (pas contaminé)}} \times 100$$

RAPPORT ALLELE 1 =	$\frac{4,00 - 3,98}{3,59 - 3,98}$	$\frac{100}{100}$	RAPPORT ALLELE 2 =	$\frac{0,46 - 0,46}{2,79 - 0,46}$	$\frac{100}{100}$
RAPPORT =	-5,13%		RAPPORT ALLELE 2 =	0,00%	

Annexe 19 : ETUDE DE L'EXACTITUDE

RESULTATS DE L'EVALUATION DES PERFORMANCES POUR LA DETECTION DE LA MUTATION JAK2 V617F

PROGRAMME D'EVALUATION EXTERNE DE LA QUALITE ASSOCIATION GBMHHM

TABLEAU DE RESULTATS : Étude de la mutation JAK2 V617F

Période de 2013 à 2017

Années	EEQ	Nos Mesures	Valeurs Cibles	Notes	Performances	Limites acceptables	Moyenne Laboratoires
nov-13	CQ16.1 JA	Absence	Présence <1%	/	100%	75%	99%
	CQ16.1 JB	Absence	Absence	A			
	CQ16.1 JC	Présence	Présence	A			
avr-14	CQ16.2 JA	Présence	Présence	A	100%	75%	99%
	CQ16.2 JB	Présence	Présence	A			
	CQ16.2 JC	Absence	Absence	A			
oct-14	CQ17.1 JA	Présence	Présence	A	100%	75%	99%
	CQ17.1 JB	Absence	Absence	A			
	CQ17.1 JC	Présence	Présence	A			
	CQ17.1 JD	Présence	Présence	A			
avr-15	CQ17.2 JA	Présence	Présence	A	100%	75%	100%
	CQ17.2 JB	Absence	Mutation<1%	/			
	CQ17.2 JC	Négatif	Négatif	A			
	CQ17.2 JD	Présence	Présence	A			
nov-15	CQ18.1 JA	Négatif	Négatif	A	100%	75%	100%
	CQ18.1 JB	Présence	Présence	A			
	CQ18.1 JC	Présence	Présence	A			
	CQ18.1 JD	Présence	Présence	A			
juin-16	CQ18.2 JA	Négatif	Négatif	A	100%	75%	99,02%
	CQ18.2 JB	Présence	Présence	A			
	CQ18.2 JC	Présence	Présence	A			
	CQ18.2 JD	Présence	Présence	A			
déc-16	CQ19.1 JA	Négatif	Présence	D	75%	75%	94,90%
	CQ19.1 JB	Présence	Présence	A			
	CQ19.1 JC	Négatif	Négatif	A			
	CQ19.1 JD	Présence	Présence	A			
sept-17	CQ19.2 JA	Négatif	Négatif	A	100%	75%	97,22%
	CQ19.2 JB	Présence	Présence	A			
	CQ19.3 JC	Présence	Présence	A			
	CQ19.2 JD	Présence	Présence	A			
déc-17	CQ20.1 JA	Présence	Présence	A	66,67%	75%	95,76%
	CQ20.1 JB	Négatif	Négatif	A			
	CQ20.1 JC	Négatif	Présence	D			
	CQ20.1 JD	Négatif	Présence	/			

Annexe XX-A : Spécificité et sensibilité

RESULTATS DE L'EVALUATION DES PERFORMANCES POUR LA DETECTION DE LA MUTATION JAK2 V617F

fait le 03/07/2018

Réactifs	Numéros de lots
Eau proméga	243740
Sonde Mutée 10µM	5192590-20-1
Sonde Sauvage WT 10µM	5192590-10-1
Primer F 20µM	2050461
Primer R 20µM	5912710
Master Mix 2x	1711042 Exp 02/2019
Horizon WT (non muté)	28829
Horizon 50% (muté)	28866
Horizon 1% maison (muté)	28829+28866

Programme référence

50°C	2mn
95°C	10mn
92°C	15s
60°C	1mn
50 cycles	

Taqman 7500 Fast Numéro de série 275012017

Volume de Mix 17,5µl
Prise d'essai 2,5µl
[ADN] 20ng/µl

Sample Name	Allèle1 ΔRn	Allèle2 ΔRn
H2O	0,09	0,09
Horizon 1%	3,95	0,56
Horizon 50%	3,52	2,80
Horizon WT	3,90	0,45

vrais positifs

vrais négatifs

faux négatif

Légende	
Laboratoire	Résultats obtenus lors de l'analyse actuelle avec les nouveaux contrôles
rendu	Résultats obtenus lors de l'enquête EEQ avec les anciens contrôles
EEQ	Résultats attendus par le GBM/HM

Sample	Allèle 1	Allèle 2	Résultat Laboratoire	Résultat rendu	Résultat EEQ
CQ16.1JB	4,10	0,47	Absence	Absence	Absence
CQ16.1JB	4,04	0,44			
CQ16.1JC	4,10	0,80	Présence	Présence	Présence
CQ16.1JC	4,10	0,80			
CQ16.2JA	4,05	2,57	Présence	Présence	Présence
CQ16.2JA	3,93	2,48			
CQ16.2JB	4,15	0,75	Présence	Présence	Présence
CQ16.2JB	4,13	0,75			
CQ16.2JC	4,15	0,43	Absence	Absence	Absence
CQ16.2JC	4,19	0,42			
CQ17.1JA	4,11	0,77	Présence	Présence	Présence
CQ17.1JA	4,15	0,72			
CQ17.1JB	4,09	0,43	Absence	Absence	Absence
CQ17.1JB	4,03	0,43			
CQ17.1JC	4,04	0,81	Présence	Présence	Présence
CQ17.1JC	4,02	0,81			
CQ17.1JD	3,99	1,78	Présence	Présence	Présence
CQ17.1JD	4,00	1,80			
CQ17.2JA	4,06	0,72	Présence	Présence	Présence
CQ17.2JA	4,00	0,71			
CQ17.2JC	4,01	0,44	Absence	Absence	Absence
CQ17.2JC	4,04	0,45			
CQ17.2JD	4,11	0,87	Présence	Présence	Présence
CQ17.2JD	4,06	0,85			
CQ18.1JA	4,09	0,42	Absence	Absence	Absence
CQ18.1JA	4,08	0,42			
CQ18.1JB	4,01	0,71	Présence	Présence	Présence
CQ18.1JB	4,03	0,69			
CQ18.1JC	4,03	1,34	Présence	Présence	Présence
CQ18.1JC	4,07	1,26			
CQ18.1JD	4,04	0,95	Présence	Présence	Présence
CQ18.1JD	4,09	0,97			

Sample	Allèle 1	Allèle 2	Résultat Laboratoire	Résultat rendu	Résultat EEQ
CQ18.2JA	4,07	0,49	Absence	Absence	Absence
CQ18.2JA	4,10	0,50			
CQ18.2JB	4,00	1,92	Présence	Présence	Présence
CQ18.2JB	4,03	2,02			
CQ18.2JC	4,09	0,92	Présence	Présence	Présence
CQ18.2JC	4,08	0,94			
CQ18.2JD	4,09	0,66	Présence	Présence	Présence
CQ18.2JD	4,11	0,66			
CQ19.1JA	4,06	0,61	Présence	Absence	Présence
CQ19.1JA	4,05	0,62			
CQ19.1JB	4,12	0,81	Présence	Présence	Présence
CQ19.1JB	4,09	0,83			
CQ19.1JC	4,06	0,50	Absence	Absence	Absence
CQ19.1JC	4,02	0,50			
CQ19.1JD	4,11	0,78	Présence	Présence	Présence
CQ19.1JD	4,03	0,74			

Annexe XX-B : Spécificité et sensibilité

RESULTATS DE L'EVALUATION DES PERFORMANCES POUR LA DETECTION DE LA MUTATION JAK2 V617F

fait le 03/07/2018

Réactifs	Numéros de lots
Eau proméga	243740
Sonde Mutée 10µM	5192590-20-1
Sonde Sauvage WT 10µM	5192590-10-1
Primer F 20µM	2050461
Primer R 20µM	5912710
Master Mix 2x	1711042 Exp 02/2019
Horizon WT (non muté)	28829
Horizon 50% (muté)	28866
Horizon 1%maison (muté)	28829+28866

Taqman 7500 Fast Numéro de série
275012017

Volume de Mix 17,5µl
Prise d'essai 2,5µl
[ADN] 20ng/µl

Programme référence

50°C	2mn
95°C	10mn
92°C	15s
60°C	1mn
50 cycles	

Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn		
H2O	0,09	0,12		vrais positifs
Horizon 1%	4,27	0,67		vrais négatifs
Horizon 50%	3,67	3,68		faux négatif
Horizon WT	4,41	0,57		
			Résultat rendu	Résultat EEQ
CQ19.2 JA	4,36	0,47	Absence	Absence
CQ19.2 JA	4,28	0,50		
CQ19.2 JB	4,29	0,65	Présence	Présence
CQ19.2 JB	4,34	0,66		
CQ19.2 JC	4,28	1,72	Présence	Présence
CQ19.2 JC	4,29	1,77		
CQ19.2 JD	4,07	0,62	Présence	Présence
CQ19.2 JD	4,25	0,64		

Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn		
H2O	0,10	0,13		
Horizon 1%	4,41	0,68		
Horizon 50%	3,63	3,61		
Horizon WT	4,41	0,60		
			Résultat rendu	Résultat EEQ
CQ20.1 JA	4,41	1,11	Présence	Présence
CQ20.1 JA	4,46	1,12		
CQ20.1 JB	4,42	0,51	Absence	Absence
CQ20.1 JB	4,46	0,57		
CQ20.1 JC	4,45	0,63	Absence	Présence
CQ20.1 JC	4,45	0,68		
CQ20.1 JD	4,49	0,57	Absence	Absence
CQ20.1 JD	4,5	0,57		

Légende	
rendu	Résultats obtenus lors de l'enquête EEQ avec nouveaux contrôles
EEQ	Résultats attendus par le GBMHM

Annexe XXI : TEST DE ROBUSTESSE

ETUDE DE LA STABILITE DES SONDES JAKwt-PR ET JAKmut-PR
Relevé des valeurs de fluorescence de base de "FAM" pour la sonde
JAKmut-PR et de "VIC" pour la sonde JAKwt-PR

tableau 5: relevé de la fluorescence de base des fluorochromes

"FAM" et "VIC" de la 1ère série de chaque année

Période du 22/06/2017 au 31/05/2018

Series	JAKmut-PR FAM Lot: 590-20-1	JAKwt-PR VIC Lot: 590-10-1
1	537024	456139
2	513383	434487
3	503364	427893
4	489796	415972
5	446505	382438
6	478774	404677
7	502032	411121
8	452458	359480
9	488405	395464
10	420919	366236
11	453165	393974
12	433782	360725
13	420654	340917
14	388762	323473
15	389249	324632
16	389944	352542
17	409710	329061
18	455927	367117
19	363676	347605
20	359801	349713
21	368667	360361
22	339621	352488
23	355684	358506
moyenne	433100	374566
écart type	57386	36649
CV%	13,2	9,78
2ET	114772	73298
Intervalle 2ET	318328 - 547872	301268 - 447864

Année	Fluorescence de base		
	Lignée	FAM	VIC
2014	Lignée HEL	560606	442427
2015	Lignée HEL	411363	442763
2016	Lignée HEL	484879	361303
2017	Lignée HEL	408278	314599
2018	Horizons	433782	360725

Annexe XXII-A: Variation de la température de dénaturation et/ou d'hybridation

TEST DE ROBUSTESSE

TEST 1 fait le 23/05/2018 MT

Réactifs	Numéros de lots
Eau proméga	243740
Sonde Mutée 10µM	5192590-20-1
Sonde Sauvage WT 10µM	5192590-10-1
Primer F 20µM	2050461
Primer R 20µM	5912710
Master Mix 2x	1711042 Exp 02/2019
Horizon WT (non muté)	28829
Horizon 50% (muté)	28866
Horizon 1%maison (muté)	28829+28866

Taqman 7500 Fast Numéro de série	Programme référence
275012017	50°C 2mn 95°C 10mn
Volume de Mix 17,5µl	92°C 15s 60°C 1mn
Prise d'essai 2,5µl	
[ADN] 20ng/µl	
Programme utilisé	
50°C 2mn	
95°C 10mn	
93°C 15s	50 cycles
60°C 1mn	

Variation de température de dénaturation et/ou d'hybridation : dénaturation: 93°C hybridation : 60°C									
Échantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne		Écart-type		CV (%)	Résultats obtenus	Résultats attendus par le laboratoire	Conclusion
		allele1/allele2	allele1/allele2	allele1/allele2	allele1/allele2				
ADN Muté fort	6	3,81 / 2,71	0,07 / 0,05	1,83 / 1,84	Muté	Muté	CONFORME		
ADN Muté faible	6	4,03 / 0,74	0,03 / 0,02	0,74 / 2,70	Muté	Muté	CONFORME		

TEST DE ROBUSTESSE VARIATION DE TEMPERATURE DE DENATURATION ET D'HYBRIDATION 93 60
23/05/2018 MT

Well	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn
A9	Horizon Wt	3,85	0,49
A10	Horizon 1%	3,92	0,60
A11	Horizon 50%	3,43	2,82
A12	H2O	0,10	0,10
1	ADN Muté fort	3,69	2,61
2	ADN Muté fort	3,81	2,73
3	ADN Muté fort	3,84	2,74
4	ADN Muté fort	3,88	2,77
5	ADN Muté fort	3,82	2,71
6	ADN Muté fort	3,81	2,71
	Moyenne	3,81	2,71
	Écart type	0,07	0,05
	CV%	1,83	1,84

Well	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn
1	ADN Muté faible	4,05	0,75
2	ADN Muté faible	3,98	0,73
3	ADN Muté faible	4,02	0,75
4	ADN Muté faible	4,07	0,74
5	ADN Muté faible	4,01	0,71
6	ADN Muté faible	4,03	0,75
	Moyenne	4,03	0,74
	Écart type	0,03	0,02
	CV%	0,74	2,70

Annexe XXII-B: Variation de la température de dénaturation et/ou d'hybridation

TEST DE ROBUSTESSE

TEST 2 fait le 24/05/2018 MT

Réactifs	Numéros de lots
Eau proméga	243740
Sonde Mutée 10µM	5192590-20-1
Sonde Sauvage WT 10µM	5192590-10-1
Primer F 20µM	2050461
Primer R 20µM	5912710
Master Mix 2x	1711042 Exp 02/2019
Horizon WT (non muté)	28829
Horizon 50% (muté)	28866
Horizon 1% maison (muté)	28829+28866

Taqman 7500 Fast Numéro de série

275012017

Volume de Mix 17,5µl

Prise d'essai 2,5µl

[ADN] 20ng/µl

Programme référence

50°C

95°C

92°C

60°C

15s

1mn

50 cycles

Programme utilisé

50°C

95°C

92°C

61°C

15s

1mn

50 cycles

Variation de température de dénaturation et /ou d'hybridation : hybridation à 60°C versus 61°C

Applicable ; non applicable (à justifier)

Échantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne		Écart-type		CV (%)	Résultats obtenus	Résultats attendus par le laboratoire	Conclusion
		allele1/allele2	allele1/allele2	allele1/allele2	allele1/allele2				
ADN Muté fort	6	3,51 / 2,53	0,09 / 0,11	2,56 / 4,34	Muté	Muté	CONFORME		
ADN Muté faible	6	3,83 / 0,64	0,05 / 0,01	1,30 / 1,56	Muté	Muté	CONFORME		

TEST DE ROBUSTESSE VARIATION TEMPERATURE DE DENATURATION ET D'HYBRIDATION 92 61 24/05/2018 MT

Well	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn
A9	Horizon Wt	3,69	0,42
A10	Horizon 1%	3,69	0,52
A11	Horizon 50%	3,08	2,64
A12	H2O	0,10	0,10
1	ADN Muté fort	3,34	2,35
2	ADN Muté fort	3,51	2,58
3	ADN Muté fort	3,56	2,59
4	ADN Muté fort	3,60	2,62
5	ADN Muté fort	3,54	2,61
6	ADN Muté fort	3,48	2,46
	Moyenne	3,51	2,53
	Écart type	0,09	0,11
	CV%	2,56	4,34

Well	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn
1	ADN Muté faible	3,85	0,64
2	ADN Muté faible	3,74	0,63
3	ADN Muté faible	3,81	0,64
4	ADN Muté faible	3,90	0,66
5	ADN Muté faible	3,82	0,63
6	ADN Muté faible	3,86	0,66
	Moyenne	3,83	0,64
	Écart type	0,05	0,01
	CV%	1,30	1,56

Annexe XXII-C: Variation de la température de dénaturation et/ou d'hybridation

TEST DE ROBUSTESSE

TEST 3 fait le 25/05/2018 MT

Réactifs	Numéros de lots
Eau proméga	243740
Sonde Mutée 10µM	5192590-20-1
Sonde Sauvage WT 10µM	5192590-10-1
Primer F 20µM	2050461
Primer R 20µM	5912710
Master Mix 2x	1711042 Exp 02/2019
Horizon WT (non muté)	28829
Horizon 50% (muté)	28866
Horizon 1%maison (muté)	28829+28866

Taqman 7500 Fast Numéro de série 275012017

Volume de Mix 17,5µl
Prise d'essai 2,5µl
[ADN] 20ng/µl

Programme référence 50°C 2mn
95°C 10mn
92°C 15s 50 cycles
60°C 1mn

Programme utilisé 50°C 2mn
95°C 10mn
93°C 15s 50 cycles
61°C 1mn

Variation de température de dénaturation et /ou d'hybridation : dénaturation: 93°C hybridation : 61°C					
Échantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne		Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
		allele1/allele2	allele1/allele2	Écart-type	CV (%)
ADN Muté fort	6	3,74 / 2,40	0,07 / 0,04	0,22 / 1,72	Muté
ADN Muté faible	6	4,07 / 0,58	0,05 / 0,01	1,22 / 1,72	Muté
				Résultats obtenus	Résultats attendus par le laboratoire
				Muté	Muté
				Muté	Muté
					Conclusion
					CONFORME
					CONFORME

TEST DE ROBUSTESSE VARIATION DE TEMPERATURE DE DENATURATION ET D'HYBRIDATION 93 61 24/05/2018 MT

Well	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn
A9	Horizon Wt	3,91	0,40
A10	Horizon 1%	3,93	0,49
A11	Horizon 50%	3,30	2,48
A12	H2O	0,11	0,11
1	ADN Muté fort	3,61	2,35
2	ADN Muté fort	3,76	2,42
3	ADN Muté fort	3,78	2,42
4	ADN Muté fort	3,80	2,45
5	ADN Muté fort	3,74	2,38
6	ADN Muté fort	3,75	2,39
	Moyenne	3,74	2,40
	Écart type	0,07	0,04
	CV%	1,87	1,66

Well	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn
1	ADN Muté faible	3,99	0,58
2	ADN Muté faible	4,04	0,57
3	ADN Muté faible	4,11	0,60
4	ADN Muté faible	4,13	0,59
5	ADN Muté faible	4,06	0,57
6	ADN Muté faible	4,09	0,57
	Moyenne	4,07	0,58
	Écart type	0,05	0,01
	CV%	1,22	1,72

ANNEXE XXII-D : VARIATION DE TEMPERATURE DE DENATURATION ET/OU D'HYBRIDATION

TEST DE ROBUSTESSE

TEST 4 fait le 25/05/2018 MT

Réactifs	Numéros de lots
Eau proméga	243740
Sonde Mutée 10µM	5192590-20-1
Sonde Sauvage WT 10µM	5192590-10-1
Primer F 20µM	2050461
Primer R 20µM	5912710
Master Mix 2x	1711042 Exp 02/2019
Horizon WT (non muté)	28829
Horizon 50% (muté)	28866
Horizon 1% maison (muté)	28829+28866

Programme référence

50°C	2mn
95°C	10mn
92°C	15s
60°C	1mn
	50 cycles

Taqman 7500 Fast Numéro de série:

275012017

Volume de Mix

17,5µl

Prise d'essai

2,5µl

[ADN]

20ng/µl

Programme utilisé

50°C	2mn
95°C	10mn
91°C	15s
60°C	1mn
	50 cycles

Variation de température de dénaturation et /ou d'hybridation : dénaturation: **91°C** hybridation : 60°C

Applicable ; non applicable (à justifier)

Échantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Écart-type	CV (%)	Résultats obtenus	Résultats attendus par le laboratoire	Conclusion
		allele1/allele2	allele1/allele2	allele1/allele2			
ADN Muté fort	6	3,88 / 2,81	0,08 / 0,05	2,09 / 1,77	Muté	Muté	CONFORME
ADN Muté faible	6	4,10 / 0,76	0,03 / 0,01	0,73 / 1,31	Muté	Muté	CONFORME

TEST DE ROBUSTESSE VARIATION DE TEMPERATURE DE DENATURATION ET D'HYBRIDATION 91 60 25/05/2018 MT

Well	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn
A9	Horizon Wt	3,98	0,51
A10	Horizon 1%	3,99	0,64
A11	Horizon 50%	3,57	2,92
A12	H2O	0,10	0,09
1	ADN Muté fort	3,75	2,71
2	ADN Muté fort	3,91	2,84
3	ADN Muté fort	3,94	2,83
4	ADN Muté fort	3,95	2,84
5	ADN Muté fort	3,85	2,83
6	ADN Muté fort	3,91	2,80
	Moyenne	3,88	2,81
	Écart type	0,08	0,05
	CV%	2,09	1,77

Well	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn
1	ADN Muté faible	4,12	0,77
2	ADN Muté faible	4,07	0,76
3	ADN Muté faible	4,11	0,75
4	ADN Muté faible	4,14	0,76
5	ADN Muté faible	4,08	0,76
6	ADN Muté faible	4,11	0,78
	Moyenne	4,10	0,76
	Écart type	0,03	0,01
	CV%	0,73	1,31

Annexe XXII-E: Variation de la température de dénaturation et/ou d'hybridation

TEST DE ROBUSTESSE

TEST 5 fait le 25/05/2018 MT

Réactifs	Numéros de lots
Eau proméga	243740
Sonde Mutée 10µM	5192590-20-1
Sonde Sauvage WT 10µM	5192590-10-1
Primer F 20µM	2050461
Primer R 20µM	5912710
Master Mix 2x	1711042 Exp 02/2019
Horizon WT (non muté)	28829
Horizon 50% (muté)	28866
Horizon 1%maison (muté)	28829+28866

Taqman 7500 Fast Numéro de série 275012017

Volume de Mix 17,5µl
Prise d'essai 2,5µl
[ADN] 20ng/µl

Programme référence 50°C 2mn
95°C 10mn
92°C 15s
60°C 1mn 50 cycles

Programme utilisé 50°C 2mn
95°C 10mn
92°C 15s
59°C 1mn 50 cycles

Variation de température de dénaturation et /ou d'hybridation : hybridation à 60°C versus 59°C							
Échantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne		CV (%)		Résultats attendus par le laboratoire	Conclusion
		allele1/allele2	Écart-type	allele1/allele2	allele1/allele2		
ADN Muté fort	6	3,79 / 3,11	0,07 / 0,05	1,85 / 1,61	Muté	Muté	CONFORME
ADN Muté faible	6	3,99 / 0,94	0,03 / 0,03	0,75 / 2,70	Muté	Muté	CONFORME

Applicable ; non applicable (à justifier)

TEST DE ROBUSTESSE VARIATION DE TEMPERATURE DE DENATURATION ET D'HYBRIDATION 92 59
25/05/2018 MT

Well	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn
A9	Horizon Wt	3,86	0,64
A10	Horizon 1%	3,89	0,80
A11	Horizon 50%	3,51	3,23
A12	H2O	0,09	0,10
1	ADN Muté fort	3,66	3,01
2	ADN Muté fort	3,81	3,13
3	ADN Muté fort	3,84	3,15
4	ADN Muté fort	3,83	3,15
5	ADN Muté fort	3,80	3,11
6	ADN Muté fort	3,80	3,13
	Moyenne	3,79	3,11
	Écart type	0,07	0,05
	CV%	1,85	1,61

Well	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn
1	ADN Muté faible	3,99	0,98
2	ADN Muté faible	3,95	0,92
3	ADN Muté faible	4,00	0,94
4	ADN Muté faible	4,04	0,95
5	ADN Muté faible	3,98	0,94
6	ADN Muté faible	3,99	0,90
	Moyenne	3,99	0,94
	Écart type	0,03	0,03
	CV%	0,75	3,19

Annexe XXII-F : Variation de la température de dénaturation et/ou d'hybridation

TEST DE ROBUSTESSE

TEST 6 fait le 25/05/2018 MT

Réactifs	Numéros de lots
Eau proméga	243740
Sonde Mutée 10µM	5192590-20-1
Sonde Sauvage WT 10µM	5192590-10-1
Primer F 20µM	2050461
Primer R 20µM	5912710
Master Mix 2x	1711042 Exp/02/2019
Horizon WT (non muté)	28829
Horizon 50% (muté)	28866
Horizon 1% maison (muté)	28829+28866

Taqman 7500 Fast Numéro de série 275012017

Programme référence 50°C 2mn
95°C 10mn

Volume de Mix 17,5µl
Prise d'essai 2,5µl
[ADN] 20ng/µl

92°C 15s 50 cycles
60°C 1mn

Programme utilisé 50°C 2mn
95°C 10mn

91°C 15s 50 cycles
59°C 1mn

Variation de température de dénaturation et /ou d'hybridation : dénaturation: 91°C hybridation : 59°C							
Échantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Écart-type	CV (%)	Résultats obtenus	Résultats attendus par le laboratoire	Conclusion
		allele1/allele2	allele1/allele2	allele1/allele2			
ADN Muté fort	6	3,97 / 3,08	0,07 / 0,05	1,76 / 1,62	Muté	Muté	CONFORME
ADN Muté faible	6	4,18 / 0,91	0,04 / 0,02	0,96 / 2,20	Muté	Muté	CONFORME

Applicable ; non applicable (à justifier)

TEST DE ROBUSTESSE VARIATION DE TEMPERATURE DE DENATURATION ET D'HYBRIDATION 91 59 25/05/2018 MT

Well	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn
A9	Horizon Wt	3,99	0,62
A10	Horizon 1%	4,07	0,78
A11	Horizon 50%	3,66	3,21
A12	H2O	0,10	0,10
1	ADN Muté fort	3,84	2,99
2	ADN Muté fort	4,01	3,11
3	ADN Muté fort	4,00	3,09
4	ADN Muté fort	4,02	3,11
5	ADN Muté fort	3,98	3,07
6	ADN Muté fort	3,99	3,10
	Moyenne	3,97	3,08
	Écart type	0,07	0,05
	CV%	1,76	1,62

Well	Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn
1	ADN Muté faible	4,21	0,93
2	ADN Muté faible	4,14	0,89
3	ADN Muté faible	4,18	0,94
4	ADN Muté faible	4,24	0,89
5	ADN Muté faible	4,15	0,92
6	ADN Muté faible	4,18	0,88
	Moyenne	4,18	0,91
	Écart type	0,04	0,02
	CV%	0,96	2,20

Annexe XXIII : VARIATION DE LA QUANTITE D'ADN DANS LA PRISE D'ESSAI

TEST DE ROBUSTESSE

Réactifs	Numéros de lots
Eau proméga	243740
Sonde Mutée 10µM	5192590-20-1
Sonde Sauvage WT 10µM	5192590-10-1
Primer F 20µM	2050461
Primer R 20µM	5912710
Master Mix 2x	1711042 Exp 02/2019
Horizon WT (non muté)	28829
Horizon 50% (muté)	28866
Horizon 1%maison (muté)	28829+28866

Taqman 7500 Fast Numéro de série: 275012017

Programme de référence

50°C	2mn
95°C	10mn
92°C	15s
60°C	1mn

Volume de Mix 17,5µl

[ADN] 20ng/µl

50 cycles

Prise d'essai de référence 2,5µl

Prises d'essai testées (+/- 30%) 1,8µl et 3,3µl
(+/- 50%) 1,3µl et 3,8µl

fait le 24/05/2018 MT

Variation de la quantité d'ADN dans la prise d'essai 24/05/2018							
Échantillons	Prise d'essai µl	Nombre de valeurs	Moyenne allele1/allele2	Écart-type allele1/allele2	CV (%)	Résultats attendus par le laboratoire	Conclusion
					allele1/allele2		
Répétabilité ADN Muté fort	2,5	24	3,85 / 2,83	0,08 / 0,05	2,07 / 1,76	Muté	CONFORME
ADN Muté fort	1,8	3	3,68 / 2,82	0,06 / 0,02	1,63 / 0,70	Muté	CONFORME
	3,3	3	3,79 / 2,85	0,05 / 0,06	1,31 / 2,10	Muté	CONFORME
	1,3	3	3,55 / 2,69	0,02 / 0,03	0,56 / 1,11	Muté	CONFORME
	3,8	3	3,85 / 2,86	0,03 / 0,03	0,77 / 1,04	Muté	CONFORME
Répétabilité ADN Muté faible	2,5	24	1,07 / 0,78	0,06 / 0,03	1,47 / 3,84	Muté	CONFORME
ADN Muté faible	1,8	3	3,97 / 0,81	0,08 / 0,02	1,97 / 2,46	Muté	CONFORME
	3,3	3	4,06 / 0,79	0,06 / 0,02	1,47 / 2,53	Muté	CONFORME
	1,3	3	3,84 / 0,70	0,03 / 0,05	0,78 / 7,14	Muté	CONFORME
	3,8	3	4,01 / 0,80	0,07 / 0,04	1,74 / 5,00	Muté	CONFORME

Applicable ; non applicable (à justifier)

CONTROLES	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn
Horizon Wt	3,79	0,51
Horizon 1%	3,88	0,63
Horizon 50%	3,42	2,92
H2O	0,10	0,10

Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn
PATIENT Muté fort 1.8	3,62	2,80
PATIENT Muté fort 1.8	3,67	2,83
PATIENT Muté fort 1.8	3,74	2,85
moyenne	3,68	2,82
écart type	0,06	0,02
CV%	1,63	0,70

PATIENT Muté fort 3.3	3,81	2,91
PATIENT Muté fort 3.3	3,82	2,85
PATIENT Muté fort 3.3	3,73	2,80
moyenne	3,79	2,85
écart type	0,05	0,06
CV%	1,31	2,10

PATIENT Muté fort 1.3	3,54	2,67
PATIENT Muté fort 1.3	3,53	2,72
PATIENT Muté fort 1.3	3,57	2,69
moyenne	3,55	2,69
écart type	0,02	0,03
CV%	0,56	1,11

PATIENT Muté fort 3.8	3,87	2,88
PATIENT Muté fort 3.8	3,82	2,87
PATIENT Muté fort 3.8	3,85	2,82
moyenne	3,85	2,86
écart type	0,03	0,03
CV%	0,77	1,04

VALEURS DE LA REPETABILITE FORT 2,5 μ l		
moyenne	3,85	2,83
écart type	0,08	0,05
CV%	2,07	1,76

Sample Name	Allele1 ΔRn	Allele2 ΔRn
PATIENT Muté faible 1.8	3,97	0,78
PATIENT Muté faible 1.8	3,88	0,82
PATIENT Muté faible 1.8	4,05	0,83
moyenne	3,97	0,81
écart type	0,08	0,02
CV%	1,97	2,46

PATIENT Muté faible 3.3	4,10	0,79
PATIENT Muté faible 3.3	4,09	0,82
PATIENT Muté faible 3.3	3,99	0,77
moyenne	4,06	0,79
écart type	0,06	0,02
CV%	1,47	2,53

PATIENT Muté faible 1.3	3,86	0,68
PATIENT Muté faible 1.3	3,80	0,66
PATIENT Muté faible 1.3	3,85	0,75
moyenne	3,84	0,70
écart type	0,03	0,05
CV%	0,78	7,14

PATIENT Muté faible 3.8	4,03	0,81
PATIENT Muté faible 3.8	4,06	0,84
PATIENT Muté faible 3.8	3,94	0,76
moyenne	4,01	0,80
écart type	0,07	0,04
CV%	1,74	5,00

VALEURS DE LA REPETABILITE FAIBLE 2,5 μ l		
moyenne	4,07	0,78
écart type	0,06	0,03
CV%	1,47	3,84

Annexe XXIV : EFFET DE BORD

TEST DE ROBUSTESSE

Réactifs	Numéros de lots
Eau proméga	243740
Sonde Mutée 10µM	5192590-20-1
Sonde Sauvage WT 10µM	5192590-10-1
Primer F 20µM	2050461
Primer R 20µM	5912710
Master Mix 2x	1711042 Exp 02/2019
Horizon WT (non muté)	23891 du 16/01/2018
Horizon 50% (muté)	26343 du 16/01/2018
Horizon 1%/maison (muté)	23891 + 26343

fait le 22/03/2018 MT

Taqman 7500 Fast SN# 275012017

Volume de Mix 17,5µl
[ADN] 20ng/µl 2,5µl

Programme référence

50°C 2min

95°C 10min

92°C 15sec

60°C 1min

50 cycles

	Allèle 1	Allèle 2
MOYENNE	4,05	2,07
ECART TYPE	0,07	0,06
CV %	1,66	2,92

Puits	Sample Name	Target	Allèle 1	Allèle 2
A3	BEL	JAK2	3,97	2,04
A4	BEL	JAK2	3,99	1,98
A5	BEL	JAK2	3,95	2,02
A6	BEL	JAK2	3,93	2,03
A7	BEL	JAK2	3,92	2,03
A8	BEL	JAK2	3,94	2,06
A9	BEL	JAK2	3,89	1,99
A10	BEL	JAK2	3,96	2,02
A11	BEL	JAK2	3,92	2,09
A12	BEL	JAK2	3,96	2,09
B1	BEL	JAK2	4,00	2,07
B2	BEL	JAK2	3,99	2,10
B3	BEL	JAK2	4,07	2,14
B4	BEL	JAK2	4,04	2,07
B5	BEL	JAK2	4,07	2,02
B6	BEL	JAK2	4,00	2,10
B7	BEL	JAK2	4,03	2,09
B8	BEL	JAK2	3,99	2,08
B9	BEL	JAK2	3,95	2,14
B10	BEL	JAK2	3,98	2,14
B11	BEL	JAK2	4,02	2,12
B12	BEL	JAK2	4,08	2,20
C1	BEL	JAK2	4,05	2,04
C2	BEL	JAK2	4,12	2,18
C3	BEL	JAK2	4,09	2,10
C4	BEL	JAK2	4,12	2,15
C5	BEL	JAK2	4,10	2,08
C6	BEL	JAK2	4,09	2,04
C7	BEL	JAK2	4,01	2,10
C8	BEL	JAK2	4,05	2,11
C9	BEL	JAK2	4,00	2,09
C10	BEL	JAK2	4,07	2,15

Puits	Sample Name	Target	Allèle 1	Allèle 2
C11	BEL	JAK2	4,04	2,17
C12	BEL	JAK2	4,01	2,14
D1	BEL	JAK2	4,13	2,08
D2	BEL	JAK2	4,09	2,11
D3	BEL	JAK2	4,22	2,19
D4	BEL	JAK2	4,18	2,12
D5	BEL	JAK2	4,15	2,08
D6	BEL	JAK2	4,06	1,99
D7	BEL	JAK2	4,05	1,98
D8	BEL	JAK2	3,99	2,05
D9	BEL	JAK2	4,03	2,08
D10	BEL	JAK2	4,01	2,14
D11	BEL	JAK2	4,09	2,10
D12	BEL	JAK2	3,99	2,07
E1	BEL	JAK2	4,15	2,09
E2	BEL	JAK2	4,02	2,01
E3	BEL	JAK2	4,13	2,06
E4	BEL	JAK2	4,17	2,09
E5	BEL	JAK2	4,15	2,04
E6	BEL	JAK2	4,11	2,01
E7	BEL	JAK2	4,06	1,97
E8	BEL	JAK2	4,02	1,94
E9	BEL	JAK2	4,03	2,06
E10	BEL	JAK2	4,07	2,12
E11	BEL	JAK2	4,08	2,10
E12	BEL	JAK2	4,01	2,08
F1	BEL	JAK2	4,13	2,10
F2	BEL	JAK2	4,06	2,11
F3	BEL	JAK2	4,21	2,11
F4	BEL	JAK2	4,13	2,10
F5	BEL	JAK2	4,19	2,04
F6	BEL	JAK2	4,15	2,02

Puits	Sample Name	Target	Allèle 1	Allèle 2
F7	BEL	JAK2	4,05	1,91
F8	BEL	JAK2	4,06	2,03
F9	BEL	JAK2	4,03	2,09
F10	BEL	JAK2	4,05	2,10
F11	BEL	JAK2	4,08	2,13
F12	BEL	JAK2	4,07	2,05
G1	BEL	JAK2	4,09	2,10
G2	BEL	JAK2	4,13	2,07
G3	BEL	JAK2	4,20	2,11
G4	BEL	JAK2	4,12	2,08
G5	BEL	JAK2	4,12	2,07
G6	BEL	JAK2	4,14	2,03
G7	BEL	JAK2	4,06	1,98
G8	BEL	JAK2	4,05	1,99
G9	BEL	JAK2	4,06	2,04
G10	BEL	JAK2	4,05	2,10
G11	BEL	JAK2	4,03	2,09
G12	BEL	JAK2	4,08	2,09
H1	BEL	JAK2	4,01	2,03
H2	BEL	JAK2	4,08	1,94
H3	BEL	JAK2	4,05	1,94
H4	BEL	JAK2	4,03	2,01
H5	BEL	JAK2	4,06	1,92
H6	BEL	JAK2	4,03	1,94
H7	BEL	JAK2	4,00	2,00
H8	BEL	JAK2	3,99	2,00
H9	BEL	JAK2	4,04	2,04
H10	BEL	JAK2	4,02	2,07
H11	BEL	JAK2	4,06	2,09
H12	BEL	JAK2	4,05	2,09

Annexe XXV

PSL-HEMATOLOGIE



Hôpitaux Universitaires Pitié
Salpêtrière - Charles Foix

Récapitulatif de la Non-Conformité
PXI-06-18-267 du 07-06-2018

Tél :
Fax :

Nature :	Analytique	Type :	Contrôle qualité
Enregistrée par : AGNELO HERVE			
Le : 07-06-2018			

Nature : Analytique

Type : Contrôle qualité

Description Brève : EEQ non conforme

Description : BM-Non conformité du EEQ "CQ19.1 JA" concernant la recherche de la mutation V617F JAK2

Survenance

Type : Technique

N° dossier et/ou client
concerné :

Date / Heure : 00-00-0000 00:00:00

Service(s) concerné
(s) : BIOLOGIE MOLECULAIRE(17)**Etude de causes**

Identification des causes : pas de vrai "étalon" à 1%, utilisation d'une lignée diluée. Duplication de la mutation dans cette lignée, donc taux de départ >100%, entraînant une surestimation du point à 1%.

Informations spécifiques au typeTechniques et
automates concernésTechniques
manuelles

Automates

Examen(s) concerné
(s)

Type : Interne

Fournisseur

Impact

Sur le client : Non

Sur analyse : Oui

Sur coût : Oui

Cotation 1

Risque de rendre un échantillon "douteux" au lieu de "faible positif". Aucune sanction clinique ou thérapeutique n'en découle.

Cliniquement significatif : Non

Cotation: 1

Valeur perte: 0

Refaire la manipe

Mesure(s) prise(s)

Id.	Description	Resp	Validation
-----	-------------	------	------------

Aucune

Suivi / ConclusionSuivi : Réalisation d'un vrai "étalon à 1% à partir des contrôles négatifs et à 50%
Repassage du EEQ "CQ19.1 JA", positif faible avec le nouvel étalon.

