

DU ASSURANCE QUALITE
Sorbonne Université
Session 2017-2018

VERIFICATION / VALIDATION
DE METHODES
Détection de la mutation « *JAK2V617F* »

Marie-Thérèse PIOT CHIMENO
Technicienne de Laboratoire
UF Hématologie Moléculaire –
Service Hématologie Biologique
Pôle de Biologie médicale et pathologie
Groupe hospitalier Universitaire Pitié-Salpêtrière Charles Foix

POURQUOI CE TRAVAIL ?

❖ Etat des lieux:

- Pôle:

- Juin 2014: 1^{ère} accréditation du Pôle BMP sous le N°863253
- 2017: 52% d'examens accrédités
- 2018: - mise en route de la plateforme « Biochimie-Hématologie-Hémostase »
- retrait et suspension par le pôle d'environ 70 examens de la portée d'accréditation
- 53,6% des examens sont à ce jour accrédités.

- U.F : Hématologie Moléculaire:

- A ce jour

- Aucun examen accrédité dans l'U.F d' Hématologie Moléculaire
- 1^{ère} expérience dans la constitution d'un dossier de vérification/validation de méthodes

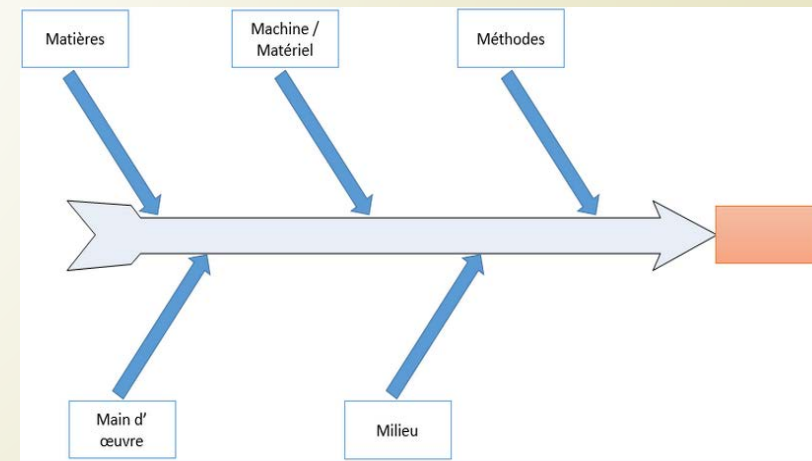
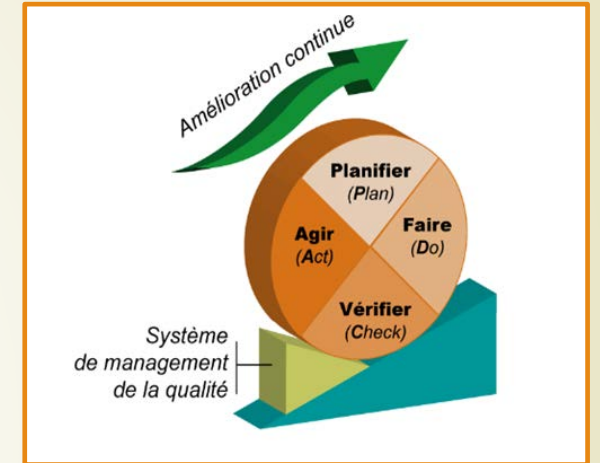
❖ Objectifs :

- L'UF souhaite constituer un DVM d'une PCR de discrimination allélique pour la détection de la mutation « *JAK2 V617F* ».
 - Cet examen s'inscrit selon le SH-INF-50 sur la ligne de portée GB9 de la sous famille génétique somatique;(extension)
 - Processus complexe :
 - Extraction automatisée de l'ADN :
 - DM-DIV commercialisés, marquage CE : portée A
 - « Amplification de l'ADN » :
 - PCR en temps réel « maison » : portée B résultat qualitatif
- Réaliser la vérification et la validation sur site des performances des méthodes d'extraction d'ADN et de la détection de la mutation dans le but d'une demande d'accréditation.
- Acquérir une bonne méthodologie pour la constitution des dossiers des autres examens réalisés au sein du laboratoire.

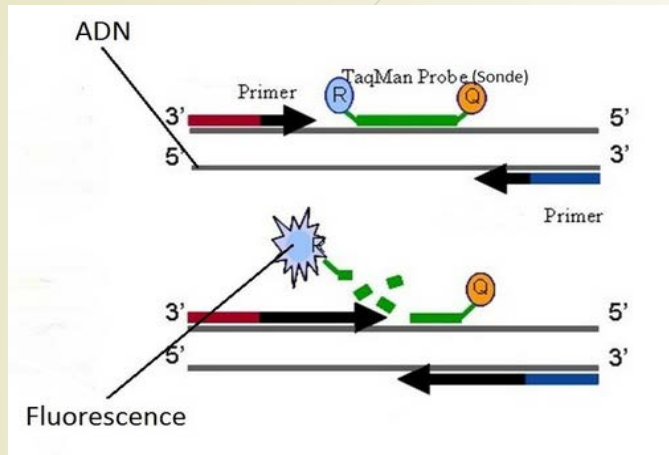
METHODOLOGIE UTILISEE



➤ Roue de DEMING:

- ❖ Roue de Deming : établir un calendrier et planifier les étapes essentielles.
- ❖ Documentation : bibliographie, norme NF EN ISO 15189, SH-INF-50, SH-FORM-43, SH-GTA-04, notices fournisseurs, procédures, modes opératoires.
- ❖ Cartographie :
 - ✓ Schématiser et décomposer le processus en 3 sous processus(préparation de l'échantillon, l'analyse et l'interprétation des résultats).
 - ✓ Identifier les procédures correspondantes à chaque sous – processus.
- ❖ Diagramme d'Ishikawa:5M:
 - ✓ Identification des risques majeurs pour chaque sous processus
 - ➔ Mise en place d'indicateurs
 - ➔ Apporter des améliorations



PRINCIPE DE LA TECHNIQUE



 : Reporter : FAM (Sonde mutée)/ VIC (Sonde sauvage)
 : Quencher

- Contrôles utilisés
- Horizon WT : contrôle sauvage : pas muté
- Horizon 50% : contrôle muté
- Horizon 1% maison : contrôle muté : dilution au 1/50^{ème} du contrôle Horizon 50%

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					

PLAN D'ACTION / RESULTATS

❖ Faire :

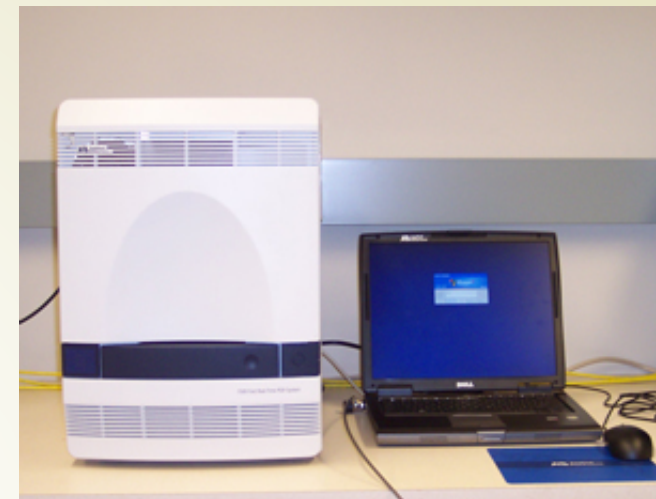
- ▶ Performances à évaluer:
 - « Extraction automatisée »
 - Extraction:
 - répétabilité
 - fidélité intermédiaire
 - contamination inter-échantillons
 - Dosage de l'ADN:
 - répétabilité
 - fidélité intermédiaire
 - variabilité inter-opérateurs
 - contamination inter-échantillons



❖ Faire :

PLAN D'ACTION / RESULTATS

- ▶ Performances à évaluer:
 - « Détection de la mutation *JAK2* V617F »
 - répétabilité
 - fidélité intermédiaire
 - variations inter-opérateurs
 - contamination inter-échantillons
 - interférences
 - exactitude
 - **seuil de positivité**
 - **validité du contrôle « Horizon maison » 1%**
 - sensibilité - spécificité



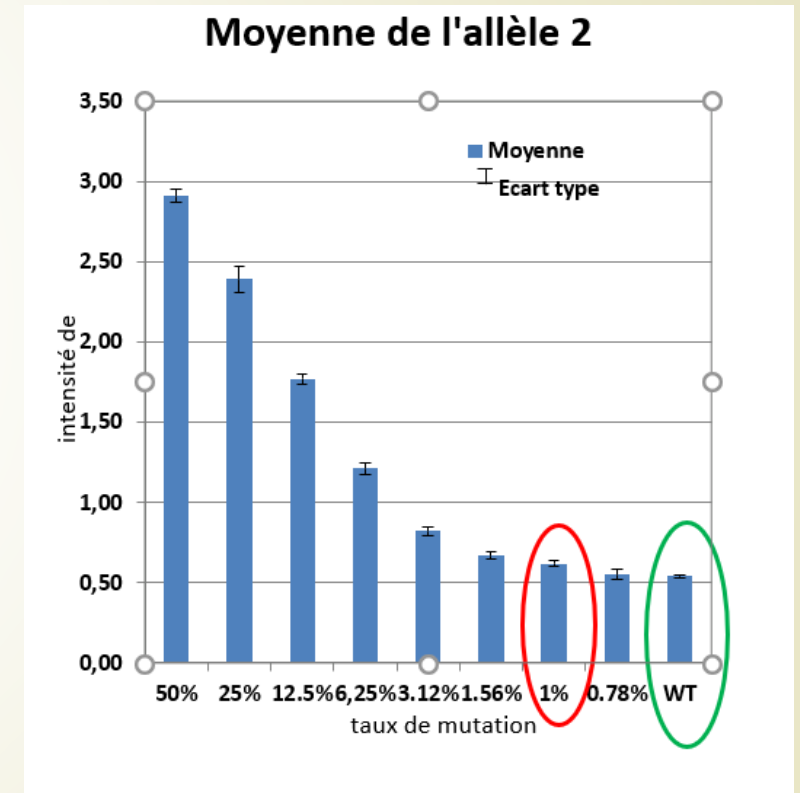
- **robustesse**
 - **variation de températures de dénaturation et d'hybridation**
 - **variation de la quantité d'ADN dans la prise d'essai**
 - **variation de la concentration de l'échantillon**
 - **stabilité des sondes**
 - **l'effet de bord**

DETECTION DE LA MUTATION « JAK2 V617F » (1)

- **Seuil de positivité**: le seuil de positivité correspond à la concentration conduisant à un signal significativement différent de celui du contrôle négatif.
 - Réalisation d'une gamme de 0,78% à 50% à partir du contrôle « Horizon 50% » dans une matrice biologique « Horizon WT »
 - Recherche de la mutation dix fois sur chaque échantillon
 - Calcul des moyennes et écart types

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.

Seuil de positivité



DETECTION DE LA MUTATION « JAK2 V617F » (2) Validité du contrôle « Horizon 1% maison »

- **Justesse** : confrontation d'un contrôle « Horizon 1% maison » réalisé avec pipettes certifiées Cofrac et d'un contrôle réalisé avec pipettes du laboratoire non certifiées Cofrac

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

Conclusion : le contrôle « Horizon 1% maison » non Cofrac ne montre aucune différence significative avec le contrôle « Horizon 1% maison » Cofrac. Le contrôle « Horizon 1% maison » est considéré comme étant juste et les pipettes de dilution non critiques.

DETECTION DE LA MUTATION « JAK2 V617F » (3) Validité du contrôle « Horizon 1% maison »

- **Exactitude** : confrontation de deux EEQ : CQ19,1JA (1,02%) et CQ20,1JC (0,96%) avec le contrôle « Horizon 1% maison »

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 nonCofrac	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
CONTRÔLE EEQ CQ20,1JC (0,96%)	12	4,03 / 0,55	0,03 / 0,03	0,71 / 4,84	Muté	<10	CONFORME

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

DETECTION DE LA MUTATION « JAK2 V617F » (4) : Variations de la température de dénaturation et d'hybridation (92°C et 60°C)

- 2 ADN : « ADN muté fort » et « ADN muté faible » (ayant servis pour la répétabilité sur 24 valeurs)
- Variation de la température de dénaturation et/ou d'hybridation de +/- 1°C par rapport au programme de référence.
- Test réalisé six fois pour chaque échantillon.

TESTS	Nombres de cycles (n)	Volume µl	T° dénaturation (°C)	Température hybridation (°C)	ADN muté fort	ADN muté bas	Controles 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

Conclusion :

- Aucune différence significative du résultat n'a été constatée quel que soit le taux de mutation.
- La variation d'un degré de la température de dénaturation ou d'hybridation en plus ou en moins par rapport à la température de référence n'a pas d'impact sur le résultat de la PCR « détection de la mutation JAK2V617F ».

DETECTION DE LA MUTATION « JAK2 V617F » (5) : Variation de la quantité d'ADN dans la prise d'essai

- 2 ADN : « ADN muté fort » et « ADN muté faible » (ayant servis pour la répétabilité)
- Variation du volume de la prise d'essai de +/- 30% et +/- 50% par rapport à la prise d'essai de référence : 2,5 µl volumes testés: 1,3 µl, 1,8 µl, 3,3 µl et 3,8 µl.
- Test réalisé en triplicate pour chaque échantillon.

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
Résultats obtenus		Muté	Muté	Non muté	Muté	Muté
Conclusion		Conforme	Conforme	Conforme		

Conclusion :

- Aucune différence significative du résultat n'a été constatée quel que soit le taux de mutation.
- une variation du volume de +/- 50% de la prise d'essai de l'échantillon, n'a pas d'impact sur le résultat de la PCR de la détection de la mutation JAK2V617F

DETECTION DE LA MUTATION « JAK2 V617F » (6) : Variation de la concentration en ADN de l'échantillon

- 6 ADN : taux de mutation et statut mutationnel différents
- Variation de la concentration de -50% et +100% par rapport à la concentration de référence : 20 ng/μl concentration testées : 10 ng/μl et 40 ng/μl
- Test réalisé en triplicate pour chaque échantillon

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
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 otenus	Muté	Muté	Muté	Muté	Muté	Non muté			
Résultats attendus	Muté	Muté	Muté	Muté	Muté	Non muté			
Conclusion	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme			

Conclusion :

- aucune différence significative constatée par rapport à la concentration de référence
- une variation de la concentration de -50% ou +100% de l'échantillon, n'a pas d'impact sur le résultat de la PCR de la détection de la mutation JAK2V617F

DETECTION DE LA MUTATION « JAK2 V617F » (7)

- **Stabilité des sondes et amorces :**

- Sondes depuis 2014 ; Amorces depuis 2008
- Calcul d'un intervalle de référence de la fluorescence de base des fluorochromes émetteurs « FAM » et « VIC » de l'échantillon « eau » et ce pendant une période de 11 mois [-2ET et +2ET]
- Série validée par
 - ✓ la valeur de fluorescence de base de chaque fluorochrome
 - ✓ la validité des contrôles à chaque série
- **Conclusion:** aucune variation significative de la fluorescence de base depuis 2014
Les sondes ont une stabilité d'au moins 4 ans à -20°C et les amorces de 10 ans

- **Effet de bord :**

- ADN : taux de mutation estimé entre 1% et 50%
- Dépôt sur les 96 puits : comparaison des résultats de l'ensemble des puits
- Les résultats obtenus pour l'allèle 2 sont : Moyenne : 2.07 ; Écart type : 0.06 ; CV% : 2.89%

- **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.

AMELIORATION PREVUES

- Mise en place d'un CQI pour le dosage de l'ADN (NALM6)
- Amélioration de la traçabilité du contrôle « Horizon 1% maison » : attribution d'un N° de lot, date de réalisation, nom de l'opérateur, durée de stabilité et date de péremption
- Dépôt en duplicate des contrôles comme les échantillons à tester
- Harmonisation de la validation des résultats (création d'une zone grise)
- Gestion du QIASymphony et Taqman dans le logiciel qualité « Kalilab »
- Réalisation de tableau de bord pour le suivi des EEQ
- Mise en place d'un indicateur : taux d'erreur de saisies des résultats
- Rédaction des documents manquants tels que planning des pailles, etc....

CONCLUSION

Ce travail a permis de :

- Améliorer la connaissance des caractéristiques de la technique
- Prendre conscience de certains dysfonctionnements tels que la mauvaise gestion de l'occupation des postes par manque de plannings
- Fédérer l'équipe
- Acquérir les outils et méthodes pour participer de façon efficace à la démarche qualité
- Constituer un DVM dans le logiciel de qualité Kalilab afin de faire une demande d'accréditation auprès du Cofrac.



Merci de votre attention

EXTRACTION AUTOMATISEE: Extraction de l'ADN (1)

Paramètres évalués	échantillons	Nbre de valeurs	Moyenne	Ecart type	CV %	CV retenu par le laboratoire	Conclusion
Répétabilité	Sang total sur EDTA	6	145,35	6,68	4,6%	5%	Conforme
Fidélité intermédiaire	Sang total sur EDTA	3	128,43	3,3	2,57	5%	Conforme

EXTRACTION AUTOMATISEE: Extraction d'ADN (2)

❖ Contamination inter échantillon

- Run effectué en alternant 12 échantillons sanguins avec 12 échantillons d'eau Nuclease Free
- Dosage des éluats: ADN et eau

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

❖ Conclusion:

- Les valeurs obtenues pour les éluats d'eau ne sont pas significatives,
- Il n'y a pas de contamination inter-échantillons

EXTRACTION AUTOMATISEE: dosage de l'ADN : (1)

Paramètres évalués	échantillons	opérateurs	Nbre de valeurs	Moyenne	Ecart type	CV %	CV retenu par le laboratoire	Conclusion
Répétabilité	ADN Patient 80ng/μl		30	80,09	0,5	0,62	5%	Conforme
	ADN Patient 20ng/μ		30	21,25	0,43	2,01	5%	Conforme
Fidélité intermédiaire	ADN Patient 70ng/μ		30	71,53	2,35	3,29	5%	Conforme
	ADN Patient 20ng/μ		30	22,75	1	4,42	5%	Conforme
Variabilité Inter opérateur	ADN Patient 70ng/μ	HA	11	71,39	2,44	3,42	5%	Conforme
		PR	11	72,23	2,51	3,48	5%	Conforme
	ADN Patient 20ng/μ	HA	11	22,59	1,03	4,57	5%	Conforme
		PR	11	22,92	0,92	4,01	5%	Conforme

EXTRACTION AUTOMATISEE: dosage de l'ADN : (2)

❖ Test de la contamination inter-échantillons

ADN Haut (400ng/μl) et ADN Bas(8ng/μl)

ADNH1-ADNH2-ADNH3-ADNB1-ADNB2-ADNB3-ADNH1-ADNH2-ADNH3-ADNB1-ADNB2-ADNB3

ADNB1: ADN susceptible d'être contaminé

ADNB3: ADN susceptible de ne pas être contaminé

Formule : $mB1 - mB3 / mH - mB3 \times 100 = 0,01\%$

Conclusion: pas de contamination significative

Conclusion : les résultats des performances évaluées (répéta, FI, variabilité inter opérateurs et contaminations inter-échantillons) sont conformes aux exigences et performances attendues. La partie « dosage » de l'extraction automatisée est considérée comme conforme.

Conclusion « sous processus » : l'extraction automatisée de l'ADN est conforme.

DETECTION DE LA MUTATION JAK2 V617F (1)

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 intensite fluorescence	Ecart type intensite 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

FIDELITE INTERMEDIAIRE "DETECTION DE LA MUTATION <i>JAK2 V617F</i> " : 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 <u>Wt</u>	12	4,24 / 0,55	0,14 / 0,02	3,36/ 3,59	Non muté	5%	CONFORME

DETECTION DE LA MUTATION JAK2 V617F (2)

- Variabilité inter operateur

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								
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

- Exactitude

- 32 EEQ depuis 2014 ,
 - ✓ 1NC pour CQ19,1JA (Lignée HEL)
Rendu absence / GBMHH : présence
Repassé avec les contrôles « Horizons » OK
 - ✓ 1NC pour un CQ20,1: problème de « nomenclature »
- les résultats de toutes les autres enquêtes depuis 2014 sont conformes, la méthode est considérée comme étant exacte

DETECTION DE LA MUTATION JAK2 V617F (3)

- **Sensibilité et spécificité analytique**

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

$$\text{Sensibilité diagnostique} = \frac{\text{Nombre de vrais positifs}}{\text{Nombre de vrais positifs} + \text{nombre de faux négatifs}} \times 100$$

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

$$\text{Spécificité diagnostique} = \frac{\text{Nombre de vrais négatifs}}{\text{Nombre de vrais négatifs} + \text{nombre de faux positifs}} \times 100$$

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

ANNEXE

$$\text{Sensibilité} = \frac{21}{21+1} \times 100 = 95.5\%$$

$$\text{Spécificité} = \frac{10}{10+0} \times 100 = 100\%$$

NB : Sensibilité : l'un des deux « faux négatif » n'en n'étant en réalité pas un, (problème de nomenclature), nous aurions eu une sensibilité » de 100%

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

• 1) Stabilité des sondes et amorces :

- Sondes depuis 2014 t : Mut-pr lot 590-20-1 Wt-pr lot 590-10-1
- Amorces depuis 2008 : Foward: 2050461 Reverse 2050462

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	23	433100	57386	13,20%	114772	318328 ↔ 547872
jak wt-PR VIC	23	374566	36649	9,78%	73298	301268 ↔ 447864

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

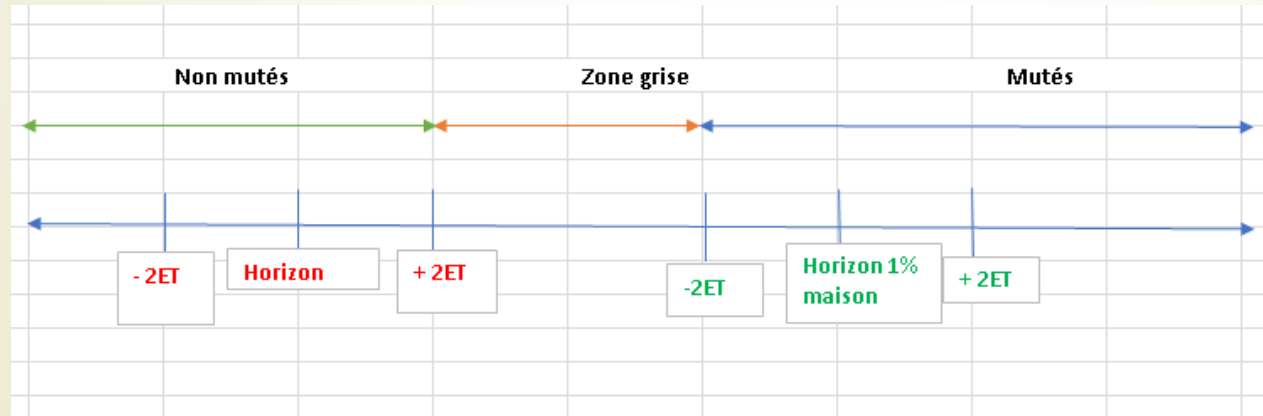
tableau 5: relevé de la fluorescence de base des fluorochromes "FAM" et "VIC" de la 1ère série de chaque année

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

AMELIORATIONS APPORTEES

- ❖ Harmonisation de la validation des résultats : sans chevauchement des écarts type des contrôles

	Ecart type "Horizon WT"	Ecart Type "Horizon 1% maison"	Zone Grise
Séries 1 à 12	0,55 +/- 0,02 2ET= (0,51;0,59)	0,66 +/- 0,02 2ET= (0,0,62;0,70)	0,60-0,61



- **Si absence d'un chevauchement des écarts types des 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 - 2ET du contrôle « Horizon 1% »
 - « Non muté » : tout résultat dont la valeur de l'intensité de fluorescence est inférieure à +2ET du contrôle « Horizon WT ».

AMELIORATIONS APPORTEES

- ❖ Harmonisation de la validation des résultats : avec chevauchement des écarts type des contrôles

	Écart type « Horizon WT »	Ecart type « Horizon 1% »	Zone grise
Série 13 à 23	0.55+ /- 0.03 2ET= (0.49 ; 0.61)	0.67 + /- 0.05 2ET = (0.57 ; 0.77)	(0.57 ; 0.61) Chevauchement des 2 contrôles



- **Si présence d'un chevauchement des écarts types des 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 ».

AMELIORATIONS APPORTEES

❖ Tableau de bord pour le suivi des EEQ

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
-----------	----------------------------	------------	--------	-------------	-----------------------------	----------------------	----------	-------------------------	--	--	------------------------------------	---	---