

## VKGL kwaliteitscommissie\_Toelichtend document

**Titel:** LOD Richtlijn Validatie/verificatie nieuwe mutatie detectie methode/kit

**Doc. code:** VKGL\_T03

**Subspecialisme:** **Genoomdiagnostiek** / DNA diagnostiek

**Versie:** 01

**Ingangsdatum:** 27 juni 2013

**Protocolbeheerder:** Danielle Bodmer

**Beheer centrum:** ErasmusMC, DNA Diagnostiek

Vakspecifieke toelichting op normelement 7.2 uit de CCKL 4<sup>e</sup> PRL

### Doel van de veldnorm:

Doel van deze veldnorm is uniformiteit in de definities en de uitvoering van validatie/verificatie nieuwe methode binnen de DNA Diagnostiek/genoomdiagnostiek

### Bereik:

Dit document omvat een LOD richtlijnen, opgesteld door de LOD kwaliteitscommissie, voor de uitvoering van een validatie/verificatie van nieuwe mutatie detectie methodes/kits binnen de DNA diagnostiek. In dit document zijn deze richtlijnen voor de meest frequente mutatie detectie methoden binnen de DNA Diagnostiek uitgewerkt: MLPA en sequentie analyse van nieuwe genen m.b.v. Sanger methode.

### Definities:

- *Validatie:* Aantonen dat een nieuwe methode/kit geschikt is voor de beoogde toepassing, dat wil zeggen voldoet aan de prestatiekenmerken die er m.b.t. de toepassing aan gesteld worden
- *Verificatie:*
  1. Aantonen dat een aanpassing in een al gevalideerde methode/kit nog steeds geschikt is voor de beoogde toepassing, d.w.z. voldoet aan de prestatiekenmerken die er m.b.t. de toepassing aan gesteld worden
  2. Aantonen dat een reeds elders (leverancier of ander laboratorium) gevalideerde methode/kit geschikt is voor de beoogde toepassing, d.w.z. voldoet aan de prestatiekenmerken elders opgesteld en evt. eigen prestatiekenmerken m.b.t. de toepassing van de methode/kit
- *Diagnostische sensitiviteit:* Het percentage positieven dat correct is geïdentificeerd door de test (in vergelijking met het referentie resultaat/gouden standaard). Meetvermogen van test om positieven te detecteren
- *Diagnostische specificiteit:* Het percentage negatieven dat correct is geïdentificeerd door de test (in vergelijking met het referentie resultaat/gouden standaard). Meetvermogen van test om negatieven te detecteren
- *Positieve controles:* DNA monsters waar pathogene mutatie, UV of polymorfisme in voorkomt
- *Reproduceerbaarheid:* Mate van overeenstemming tussen de resultaten van metingen van dezelfde meetgrootte, die onder verschillende meetomstandigheden zijn verricht
- *Robuustheid:* Mate van stabiliteit van het meetresultaat/methode voor afwijkingen in uitvoering, omstandigheden en hoedanigheid van materialen zoals deze in de praktijk voorkomen
- *Kritische variabelen:* variabelen die direct invloed hebben op een prestatiekenmerk

**VKGL kwaliteitscommissie\_Toelichtend document****Titel:** LOD Richtlijn Validatie/verificatie nieuwe mutatie detectie methode/kit**Doc. code:** VKGL\_T03**Subspecialisme:** **Genoomdiagnostiek** / DNA diagnostiek**Versie:** 01**Ingangsdatum:** 27 juni 2013**Protocolbeheerder:** Danielle Bodmer**Beheer centrum:** ErasmusMC, DNA DiagnostiekVakspecifieke toelichting op normelement 7.2 uit de CCKL 4<sup>e</sup> PRL

## Afspraken

Voor de validatie/verificatie van een nieuwe mutatie detectie methode/kit **kunnen** de volgende **prestatiekenmerken** worden bepaald:

- Diagnostische sensitiviteit
- Diagnostische specificiteit
- Reproduceerbaarheid
- Robuustheid

Tijdens een validatie/verificatie is het de bedoeling om **kritische variabelen** te identificeren die direct invloed hebben op de kwaliteit (betrouwbaarheid van de meetresultaten) van een methode/kit.

Tijdens de validatie/verificatie wordt vastgesteld welke controles/controlestappen in de werkwijze van de nieuwe methode/kit uitgevoerd moeten worden om de kritische variabelen te borgen.

Positieve controles voor validatie van nieuwe mutatie detectie methoden in genen zijn binnen de DNA Diagnostiek beperkt beschikbaar, en zeker niet voor elk amplicon (nucleotide?) van een gen. Indien positieve controles beschikbaar zijn, **mogen** die ook dienen als negatieve controles. Deze samples zijn een positieve controle voor een één DNA verandering en dus tevens een negatieve controle voor alle andere DNA veranderingen van het te valideren gen.

## Klinische validaties:

Klinische validatie is niet verplicht.

**VKGL kwaliteitscommissie\_Toelichtend document****Titel:** LOD Richtlijn Validatie/verificatie nieuwe mutatie detectie methode/kit**Doc. code:** VKGL\_T03**Subspecialisme:** **Genoomdiagnostiek** / DNA diagnostiek**Versie:** 01**Ingangsdatum:** 27 juni 2013**Protocolbeheerder:** Danielle Bodmer**Beheer centrum:** ErasmusMC, DNA DiagnostiekVakspecifieke toelichting op normelement 7.2 uit de CCKL 4<sup>e</sup> PRL**Verificatie van Sequentie analyse van een nieuw gen m.b.v. Sanger methode**

Sequentie analyse m.b.v. de Sanger methode is binnen de DNA Diagnostiek een reeds gevalideerde generieke mutatie detectie methode waar veel laboratoria ruimschoots ervaring mee hebben. Indien een nieuw gen gesequenced moet worden, dient dan ook niet de methode (het Sanger sequencing) gevalideerd te worden, maar alleen de toepassing, en dat is het primer- en amplicon design van de PCR voorafgaande aan de sequentie analyse. Qua omvang is er sprake van een verificatie i.p.v. validatie.

De volgende prestatiekenmerken dienen te worden vastgesteld:

- Specificiteit: primers moeten specifiek zijn voor het te analyseren gebied/gen (referentiesequentie)<sup>1</sup>
- Sensitiviteit: primers moeten beide allelen amplificeren, d.w.z. er mogen **bij voorkeur** geen SNPs voorkomen onder de bindingsgebieden van de primers<sup>2</sup>
- Reproduceerbaar/robuust: kwaliteit van de sequentie data moet over hele te analyseren gebied voldoende zijn en bij herhaling dezelfde kwaliteit behouden<sup>3</sup>
- Diagnostische specificiteit/sensitiviteit: positieve controles moeten gedetecteerd worden, negatieve controles moeten negatief zijn<sup>4</sup>

Uitvoering:

- <sup>1</sup>BLASTen van primers en sequentie controleren met referentiesequentie
- <sup>2</sup>SNP check van primers
- <sup>3</sup> Er zijn meerdere kwaliteitsparameters die gebruikt **kunnen** worden voor het bepalen van de kwaliteit van sequenties. Voorbeelden zijn Phred score, signaal/ruis verhouding, Quality Read Length (QRL) en Quality Read Overlap (QRO) (zie voor laatste twee parameters de EMQN site: <http://www.emqn.org/emqn/>)
- Het is **niet verplicht** reproduceerbaarheid en robuustheid te bepalen tijdens deze verificatie, omdat er veel verschillende kritische variabelen zijn die variëren per experiment die deze parameters beïnvloeden (vallen onder de normale variabiliteit binnen het experiment). Indien de primers niet goed zijn ontworpen is dat in de meeste gevallen direct zichtbaar in de kwaliteit van de sequenties (Phred score) tijdens de verificatie. Indien primers niet optimaal zijn ontworpen is dat pas na een aantal experimenten zichtbaar.
- <sup>4</sup>Sequentie analyse is een generieke methode en er is veel ervaring met primer en amplicon design binnen de DNA Diagnostische laboratoria. Daarom is het is **niet verplicht** om positieve

**VKGL kwaliteitscommissie\_Toelichtend document****Titel:** LOD Richtlijn Validatie/verificatie nieuwe mutatie detectie methode/kit**Doc. code:** VKGL\_T03**Subspecialisme:** **Genoomdiagnostiek** / DNA diagnostiek**Versie:** 01**Ingangsdatum:** 27 juni 2013**Protocolbeheerder:** Danielle Bodmer**Beheer centrum:** ErasmusMC, DNA DiagnostiekVakspecifieke toelichting op normelement 7.2 uit de CCKL 4<sup>e</sup> PRL

controles te testen tijdens deze verificatie. Voor het verifiëren van de bovengenoemde prestatiekenmerken is één sample voldoende. Dit sample is **bij voorkeur** een CEPH DNA sample. Indien deze niet beschikbaar is **mag** ook een diagnostisch sample gebruikt worden, maar dan moet dit wel **bij voorkeur** een sample zijn dat voor de indicatie is binnengekomen waarvoor de test geverifieerd wordt. Zie hiervoor ook code “Nader gebruik lichaamsmateriaal” (Federa) en de regels vastgesteld binnen het laboratorium.

Criteria:

- <sup>1</sup>PCR primers moeten **bij voorkeur** 100% homologie tonen met de referentiesequentie e.a. beargumenteren in verificatierapport
- <sup>2</sup>Er mogen **bij voorkeur** geen SNPs voorkomen onder de primers e.a. beargumenteren waarom wel in verificatierapport
- <sup>3</sup>Volgens internationale richtlijnen (zie *CMGS best practise guidelines voor Sanger sequencing*, [http://www.cmgs.org/BPGs/Best\\_Practice\\_Guidelines.htm](http://www.cmgs.org/BPGs/Best_Practice_Guidelines.htm)) is de kwaliteit van een enkelstrengs sequentie goed als de Phred score minimaal 30 is. Bij dubbelstrengs sequenties (forward en reverse of twee keer forward of twee keer reverse) is de kwaliteit voldoende als de Phred score minimaal 20 is.
- <sup>3</sup>Het is **niet verplicht** de Phred score als kwaliteitsparameter te gebruiken voor sequenties
- <sup>3</sup>Er zijn geen minimale kwaliteitseisen voor de andere kwaliteitsparameters voor sequenties
- <sup>4</sup>De sequenties van het controle sample moeten overeen komen met de referentiesequentie

**VKGL kwaliteitscommissie\_Toelichtend document****Titel:** LOD Richtlijn Validatie/verificatie nieuwe mutatie detectie methode/kit**Doc. code:** VKGL\_T03**Subspecialisme:** **Genoomdiagnostiek / DNA diagnostiek****Versie:** 01**Ingangsdatum:** 27 juni 2013**Protocolbeheerder:** Danielle Bodmer**Beheer centrum:** ErasmusMC, DNA DiagnostiekVakspecifieke toelichting op normelement 7.2 uit de CCKL 4<sup>e</sup> PRL**Verificatie van nieuwe MLPA kits**

Binnen de DNA Diagnostiek wordt gebruik gemaakt van MLPA kits geleverd door de firma MRC Holland en zelf gemaakte MLPA kits (zogenaamde synthetische probes). De MLPA methode is een reeds gevalideerde generieke methode waar veel laboratoria ruimschoots ervaring mee hebben. Indien een nieuwe kit in gebruik moet worden genomen, dient ook niet de methode gevalideerd te worden, alleen de kwaliteit van de probes, en bij de zelfgemaakte kits, het ontwerp van deze probes. Qua omvang van het aantal samples dat moet worden meegenomen is er sprake van een verificatie i.p.v. validatie.

Verificaties zijn niet verplicht bij in gebruik nemen van een nieuw lotnummer van een reeds geverifieerde MLPA kit.

Bij nieuwe versies van reeds geverifieerde MLPA kit hangt het wel/niet uitvoeren van een verificatie af van de omvang aan wijzigingen die zijn doorgevoerd in de nieuwe versie van de kit. Indien de probe samenstelling is veranderd in de kit, moet een nieuwe verificatie worden uitgevoerd. Bij overige wijzigingen is een verificatie niet verplicht.

De volgende prestatiekenmerken dienen te worden vastgesteld:

- Specificiteit: probes moeten specifiek zijn voor het te analyseren gebied/gen (referentiesequentie)<sup>1</sup>
- Sensitiviteit: probes moeten goed binding aangaan met de te analyseren sequenties, d.w.z. er mogen **bij voorkeur** geen SNPs voorkomen in hybridiserende sequenties van probes<sup>2</sup>
- Reproduceerbaar/robust: kwaliteit van de MLPA data moet voldoende zijn en bij herhaling dezelfde kwaliteit behouden<sup>3</sup>
- Diagnostische specificiteit/sensitiviteit: positieve controles moeten gedetecteerd worden, negatieve controles moeten negatief zijn<sup>4</sup>

Uitvoering:

- <sup>1</sup>BLASTen van probes en sequentie controleren met referentiesequentie\*
- <sup>2</sup>SNP check van probes\*
- <sup>3</sup>Het is **niet verplicht** reproduceerbaarheid en robuustheid te bepalen tijdens deze verificatie, omdat er veel verschillende kritische variabelen zijn die variëren per experiment die deze parameters beïnvloeden (vallen onder de normale variabiliteit binnen het experiment).

**VKGL kwaliteitscommissie\_Toelichtend document****Titel:** LOD Richtlijn Validatie/verificatie nieuwe mutatie detectie methode/kit**Doc. code:** VKGL\_T03**Subspecialisme:** **Genoomdiagnostiek** / DNA diagnostiek**Versie:** 01**Ingangsdatum:** 27 juni 2013**Protocolbeheerder:** Danielle Bodmer**Beheer centrum:** ErasmusMC, DNA DiagnostiekVakspecifieke toelichting op normelement 7.2 uit de CCKL 4<sup>e</sup> PRL

Indien de probes niet goed zijn ontworpen is dat in de meeste gevallen direct zichtbaar in de kwaliteit van de MLPA resultaten. Indien probes niet optimaal zijn ontworpen is dat pas na een aantal experimenten zichtbaar.

- <sup>3</sup>Er is geen generieke kwaliteitsparameter voor MLPAs, met name omdat de analyse methode (software) van de genescan resultaten varieert tussen de verschillende laboratoria.
- <sup>4</sup>Positieve controles moeten **bij voorkeur** gedetecteerd zijn met een andere methode of andere reeds geverifieerde MLPA probes/kit.
- <sup>4</sup>Het minimaal aantal controlesamples is het aantal samples waarbij een betrouwbare normalisatie van de pieken kan worden uitgevoerd\*\*.
- <sup>4</sup>Indien er positieve controles aanwezig zijn **is het wenselijk** deze mee te nemen in deze verificatie.
- <sup>4</sup> Indien MLPA moet worden uitgevoerd op DNA geïsoleerd uit andere monsters dan EDTA bloed, **is het wenselijk** DNA geïsoleerd uit deze samples als controles mee te nemen in deze verificatie.

*\*De met \* gemarkeerde punten gelden alleen voor zelf ontworpen synthetische probes en kits, niet voor de MRC Holland geleverde kits*

*\*\* Dit geldt voor laboratoria die gebruik maken van normalisatie software*

Criteria:

- <sup>1</sup>MLPA probes moeten **bij voorkeur** 100% homologie tonen met de referentiesequentie e.a. beargumenteren in validatierapport\*
- <sup>2</sup>Er mogen **bij voorkeur** geen SNPs voorkomen onder de MLPA probes e.a. beargumenteren waarom wel in validatierapport\*
- <sup>3</sup> Algemeen wordt gesteld dat de kwaliteit van de MLPA voldoende is als deleties/duplicaties detecteerbaar zijn (zie <sup>4</sup>).
- <sup>4</sup>Diagnostische specificiteit en sensitiviteit streven naar 100%