



Problematika preimplantační diagnostiky v akreditaci normy ISO 15189

MUDr. Kateřina Veselá, Ph.D.

Sanatorium REPROMEDA Brno

Steering Committee ESHRE PGD Consortium

Accreditation Working Group

Annual Accreditation Questionnaire Survey 2011

- ESHRE PGD Consortium members Accreditation Survey 2011
 - Registered **114**
 - Sent in data collection 2009 **60**
 - Sent back questionnaires: **33 from 19 countries**

Annual Accreditation Questionnaire Survey 2011

- **Austria (1)** : Linz
- **Belgium (1)**: Leuven
- **Brazil (1)**: Sao Paolo
- **Czech Republic (2)**: Brno, Prague
- **Denmark (2)**: Arhus, Coopenhagen
- **France (1)**: Montpellier
- **Greece (3)**: Athens (3)
- **India (1)**: Visakapathnam
- **Israel (1)**: Petah Tikva
- **Italy (1)**: San't Agata Li Bathiati
- **Japan (3)**: Tokyo, Nagoya, Kitakyusyu
- **Netherlands (2)**: Groningen, Maastricht
- **Poland (1)**: Gdansk
- **Portugal (1)**: Porto
- **Spain (6)**: Valencia, Barcelona (2), Madrid (3)
- **Taiwan (1)**
- **UK (3)**: London, Oxford, Glasgow
- **Ukraine (1)**: Kiev
- **USA (2)**: New York, Norfolk

Annual Accreditation Questionnaire Survey 2011

- Total number of questionnaires 33
- Quality Manager 20/33 60%
- FISH EQA 18/33 54%
- PCR EQA 11/33 33%
- ISO 9001 certification 13/33 39%
- ISO 17025 accreditation 4/33 12%
- ISO 15189 accreditation PGD lab **2/33 6%**
- IVF, andr. 2/33 6%
- Planning 15189 accreditation PGD **12/31 38%**

Annual Accreditation Questionnaire Survey 2011 - Summary

- Unfortunately still only a few clinics/labs (2/33) have accredited ISO 15189 in PGD methods
- 2 centres are just in the process, other centres are preparing
- Totally 38% (12/31) of centres are planning ISO 15189 accreditation within next 2 years
- Further continual work towards accreditation is necessary
- Next workshop in **Athens (October 2011)** organized in cooperation of ESHRE and Eurogentest is recommended for those who are on the way or just start thinking.....
- Matters arising: **accreditation of array-CGH, array-CGH EQA**

Human Reproduction, Vol.25, No.4 pp. 1051–1065, 2010

Advanced Access publication on January 23, 2010 doi:10.1093/humrep/dep450

human
reproduction

REVIEW *Reproductive genetics*

Accreditation of the PGD laboratory

**J.C. Harper^{1,2,9}, S. SenGupta¹, K. Vesela³, A. Thornhill⁴,
E. Dequeker^{5,6}, E. Coonen⁷, and M.A. Morris^{6,8}**

¹UCL Centre for PG&D, Institute for Women's Health, University College London, 86-96 Chenies Mews, London WC1E 6HX, UK ²Centre for Reproductive and Genetic Health, Institute for Women's Health, University College London Hospital, London as well as UCL Centre for PG&D ³REPROMEDA, Centre for Reproductive Medicine and Preimplantation Diagnosis, Brno, Czech Republic ⁴London Bridge Fertility, Gynaecology and Genetics Centre, London, UK ⁵Department for Human Genetics, University of Leuven, Leuven, Belgium ⁶EuroGentest, Leuven, Belgium ⁷Department of Clinical Genetics, Maastricht University Medical Centre, Maastricht, The Netherlands ⁸Geneva University Hospitals, Service of Genetic Medicine, CMU, Geneva, Switzerland

⁹Correspondence address. E-mail: joyce.harper@ucl.ac.uk

Accreditation according to an internationally recognized standard is increasingly acknowledged as the single most effective route to comprehensive laboratory quality assurance, and many countries are progressively moving towards compulsory accreditation of medical testing laboratories. The ESHRE PGD Consortium and some regulatory bodies recommend that all PGD laboratories should be accredited or working actively towards accreditation, according to the internationally recognized standard ISO 15189, 'Medical laboratories—Particular requirements for quality and competence'. ISO 15189 requires comprehensive quality assurance. Detailed management and technical requirements are defined in the two major chapters. The management requirements address quality management including the quality policy and manual, document control, non-conformities and corrective actions, continual improvement, auditing, management review, con-

Downloaded from humrep.oxfordjournals.org/



Workshopy ve spolupráci s Eurogentestem

FLYER_athens.pdf - Adobe Reader
Soubor Úpravy Zobrazení Dokument Nástroje Okna Nápověda

Accreditation of a Preimplantation Genetic Diagnosis Laboratory

ESHRE Campus symposium
Athens, Greece
3-4 October 2011

Organised by the ESHRE Special Interest Group Reproductive Genetics in collaboration with Eurogentest

Venue
Crowne Plaza Hotel Athens
Michalakopoulou 50
11528 Athens
Greece

Scientific Committee
Gary L. Harton (USA)
Joanne Traeger-Synodinos (Greece)
Mike Morris (Switzerland)
Els Dequeker (Belgium)
Katerina Veselá (Czech Republic)

Faculty
Els Dequeker (Belgium)
Emmanuel Kanavakis (Greece)
Gary L. Harton (USA)
Mike Morris (Switzerland)
Joanne Traeger-Synodinos (Greece)
Maria Tzetzis (Greece)
Katerina Veselá (Czech Republic)
Christina Vrettou (Greece)

Language
The official language of the course is English

Registrations
Registrations are only possible online. Please visit our website www.eshre.eu, click 'Calendar' and then go to the pages of the course.

Registrations are limited to 40 participants. For availability of places, please check the ESHRE Calendar on <http://www.eshre.eu/brochure:brozura>

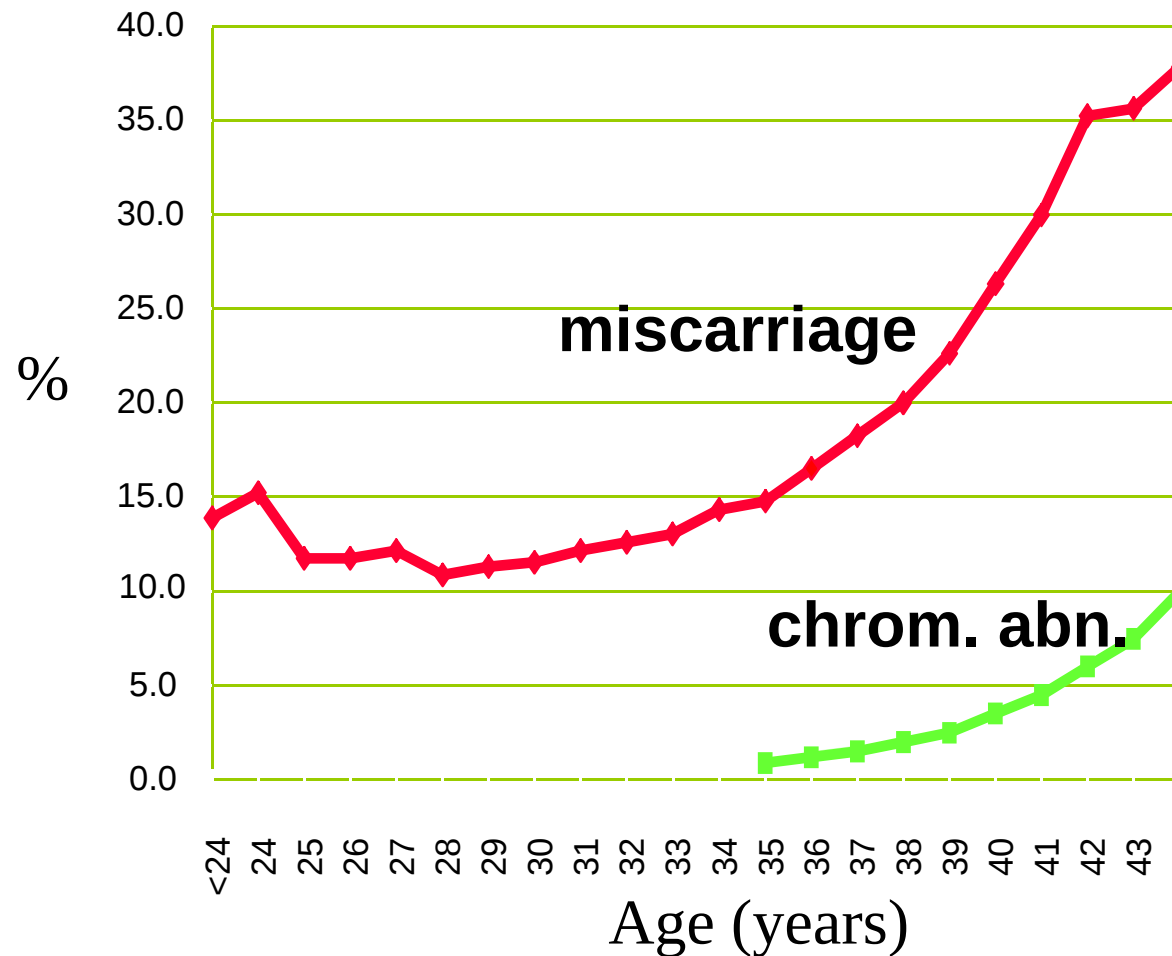
The following fees apply (exclusive VAT):

1. Members of ESHRE = 200 Euro
2. Non-members of ESHRE = 300 Euro
3. Student members of ESHRE = 150 Euro
4. Student non-members of ESHRE* = 200 Euro

* "Student" applies to undergraduate, graduate and medical students, residents and post-doctoral research trainees

CS ? 22:47 31.3.2012

Maternal age specific risks

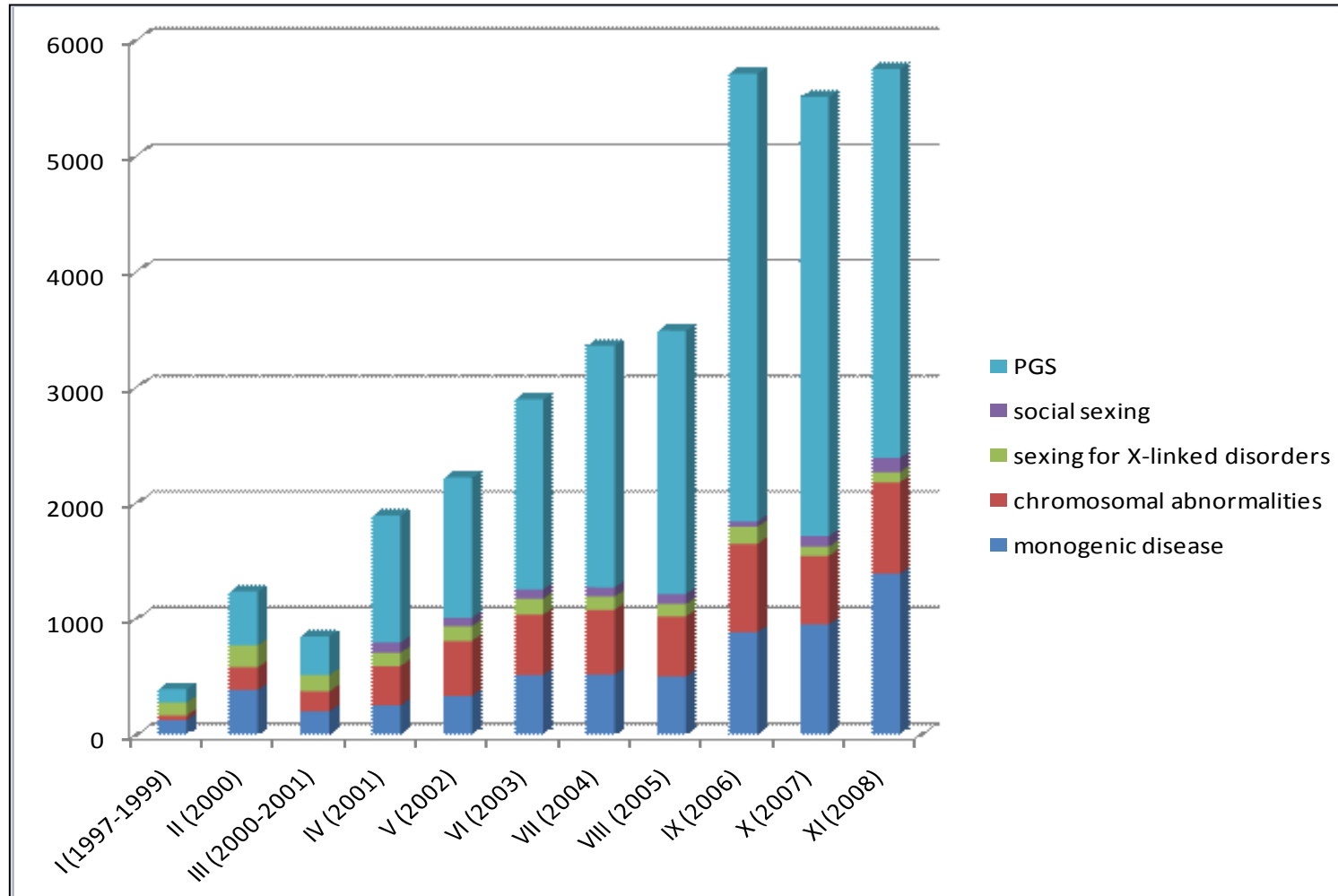


**Gardner &
Sutherland, 1996**

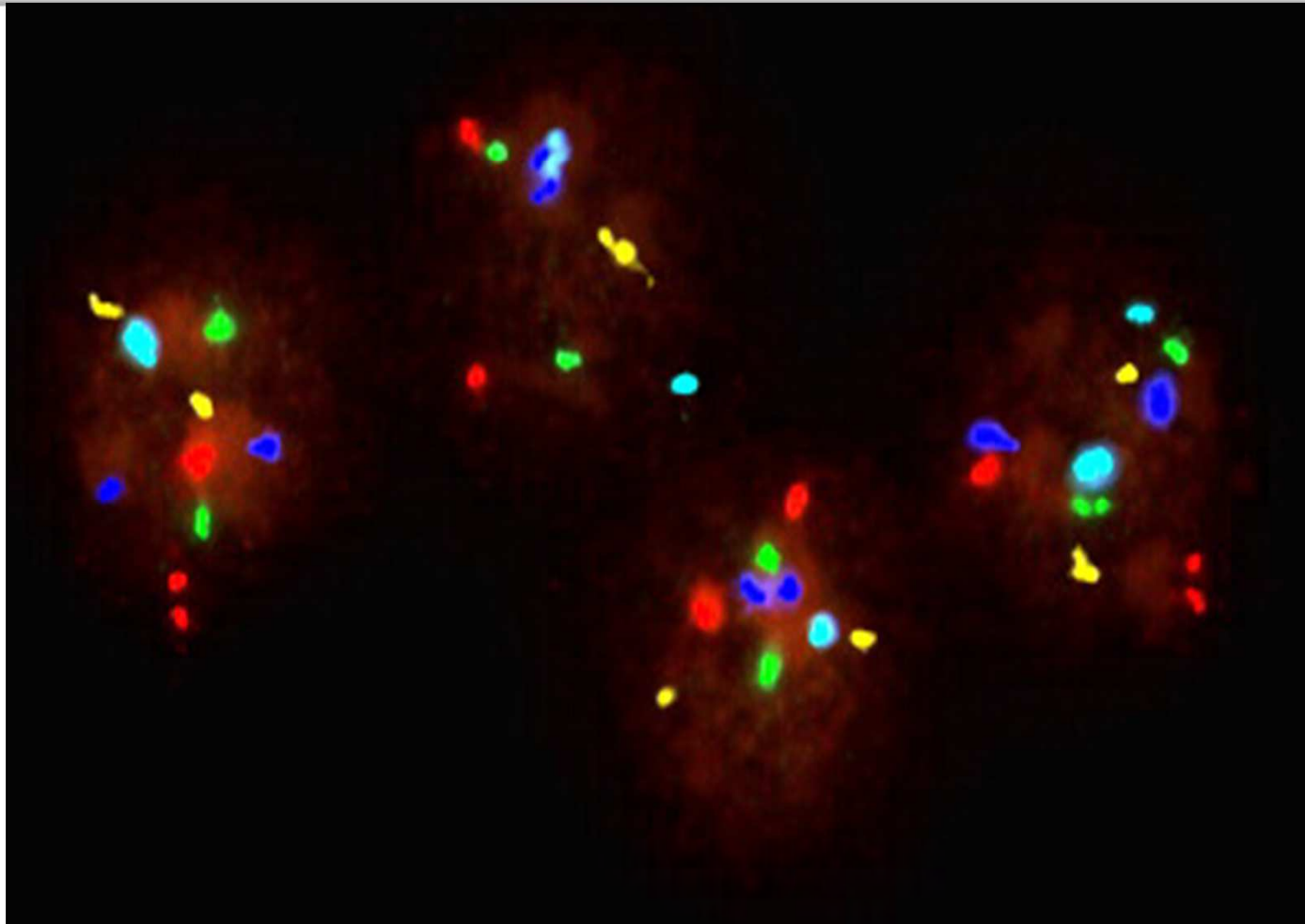
Indikace ke screeningu aneuploidií (PGS)

- Chromosomální abnormality u potenciálních rodičů (mozaiky, aj.)
- Vyšší věk (matky i otce)
- Opakované potrácení (nutno vyloučit i další možné příčiny)
- Opakované neúspěšné IVF cykly (transfery TOPQE)
- Těžký andrologický faktor (OATS gravis)
- Další genetická rizika – st. p. chemo-, radioterapii
- Zvýšení úspěšnosti při transferu jednoho embrya
- Jiné

Evolution of cycle data



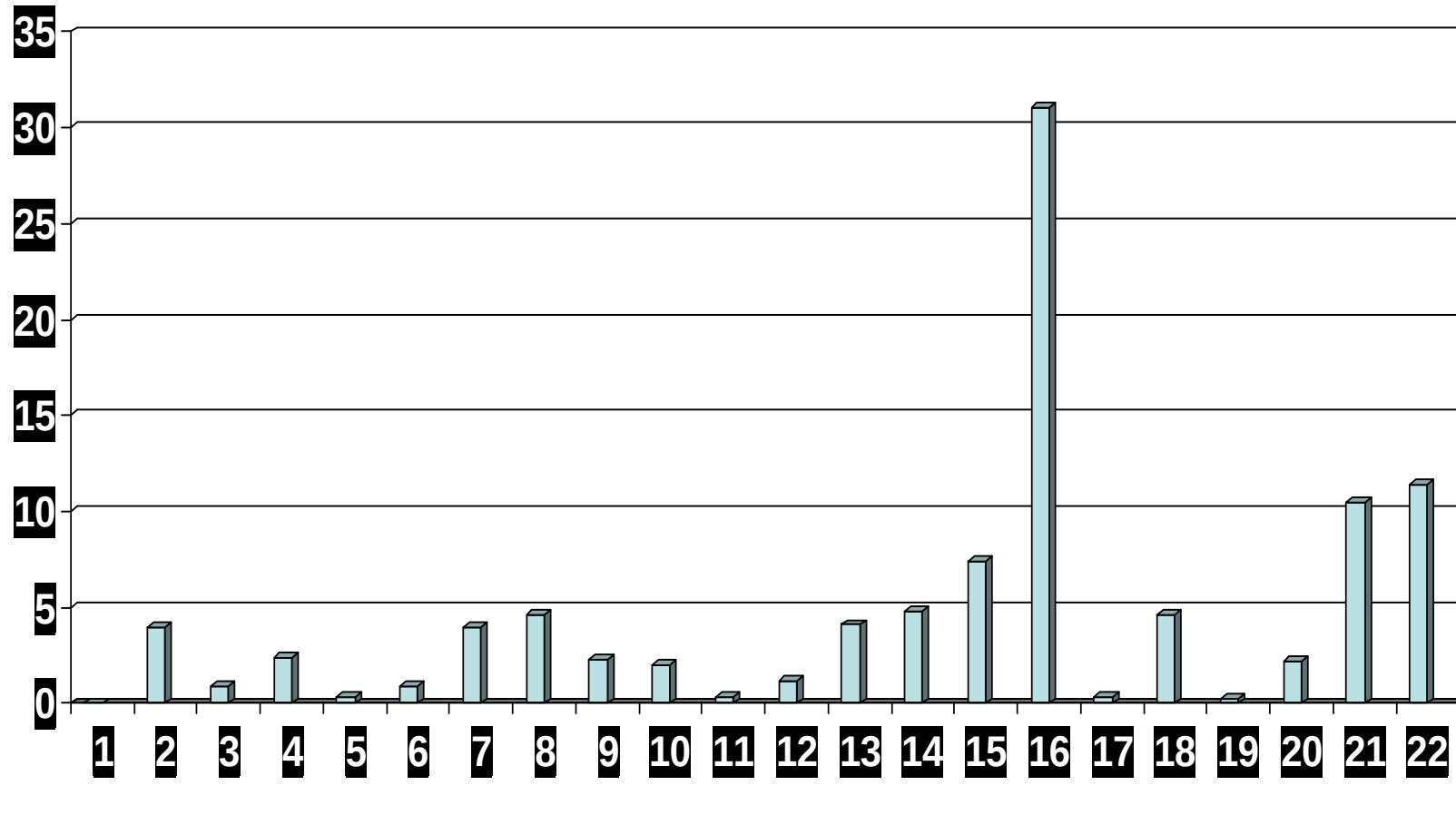
FISH



Probes for chromosomes 13, 16, 18, 21 and 22

Distribution of trisomies

Simpson, 1986

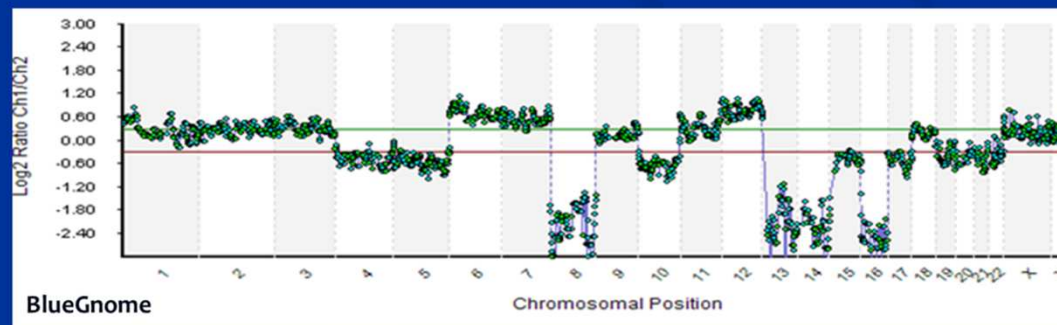
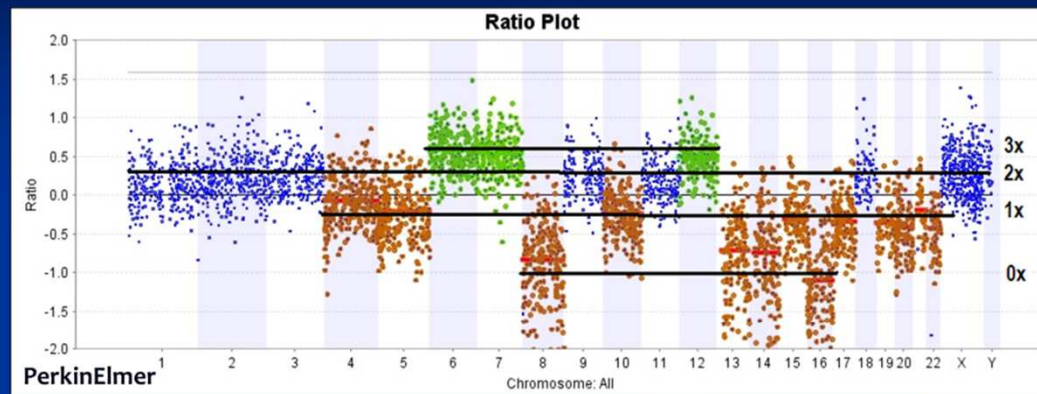


Single cell array CGH - REPRROMEDA

2a

+6,+7,+12,-4,-5,-8,-10,-13,
-14,-16,-17,-20,-21,-22

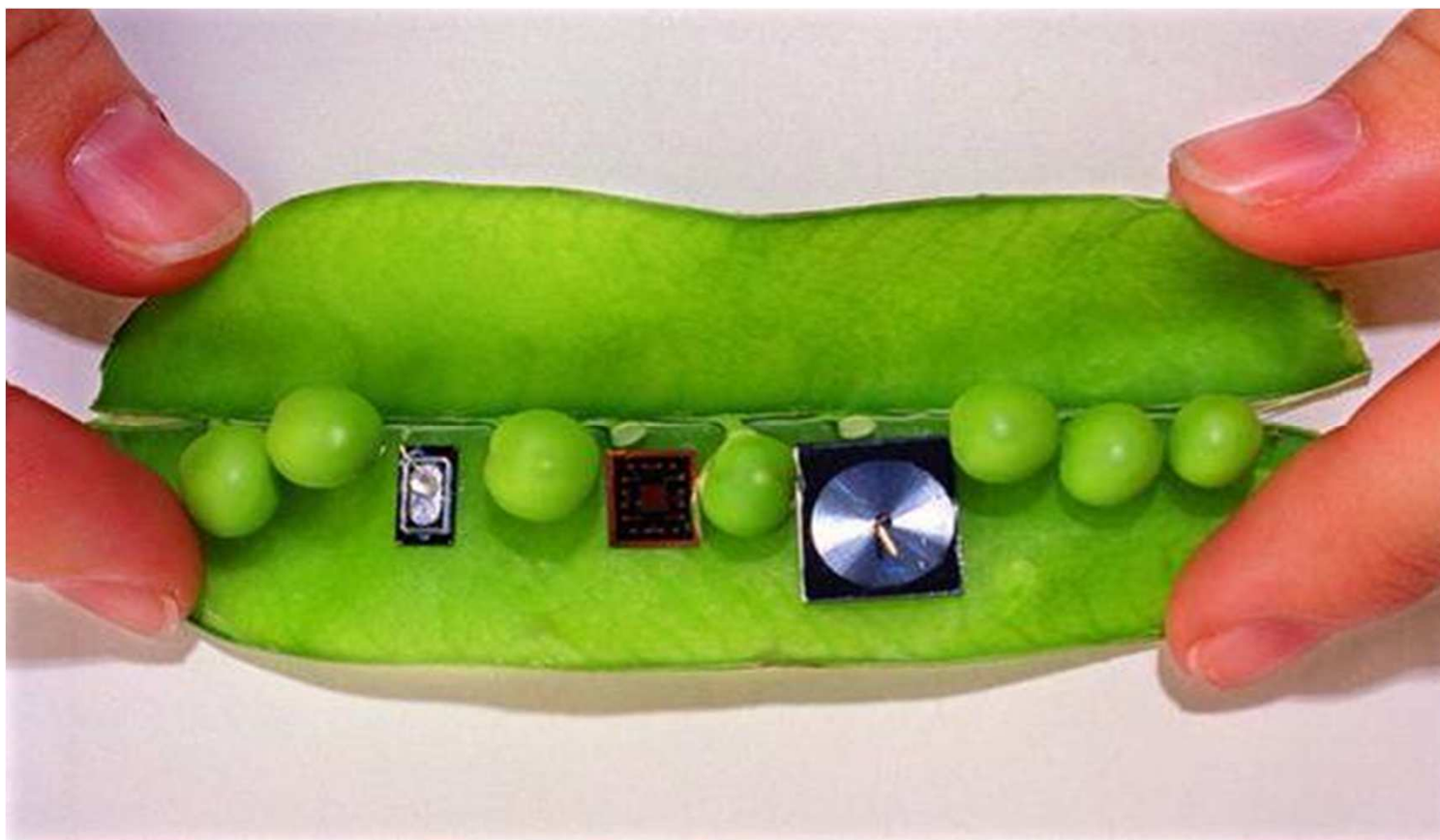
XY



ISO 15189

- **Povinnost akreditace stanovena zákonem 373/2011
Sb. O specifických zdravotních službách**

Žijeme v éře mikročipu



Mikročipy versus FISH

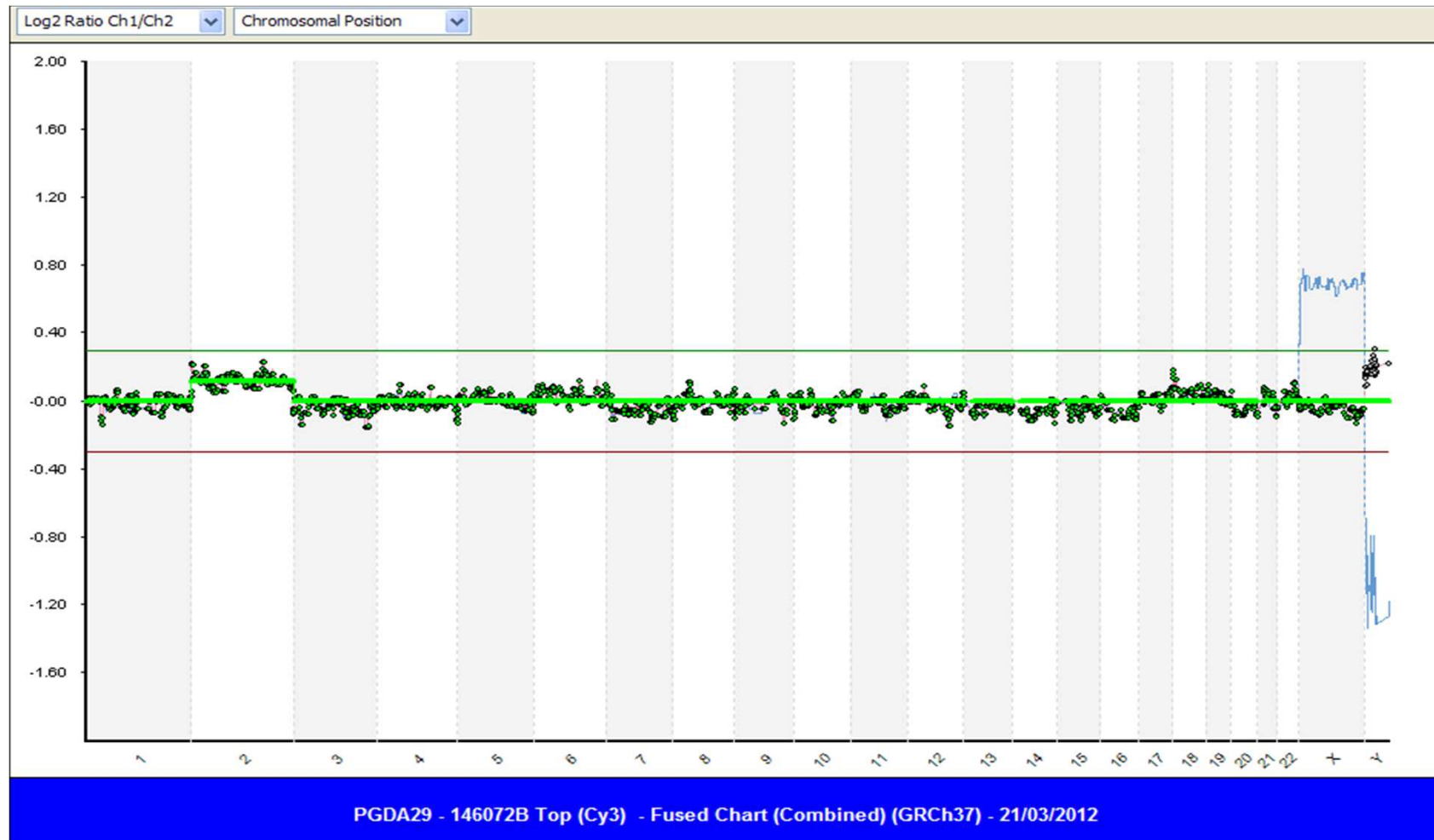
- Diagnostikujeme o 43% více patologií !!!
- 93 cyklů/57 ET
- 39,5% embryí euploidních, 60,5 % aneuploidních
- 16% párů nemá ET – nejsou euploidní embrya
- Průměrná CPR 42,1%, u blastocyst 50%
- Podíl potratů 12,5 % odpovídá běžné frekvenci v populaci

Alternatives

- **Blastomere biopsy (day 3)**
 - Advantages: both maternal and paternal abnormalities can be studied, time enough for analysis
 - Disadvantages: Mosaicism, more cells biopsy could decrease the implantation potential
- **Trophectoderm biopsy (day 5-6)**
 - Advantages: both maternal and paternal abnormalities can be detected and it does not involve the future embryo development. Disadvantage: limited time available for the analysis, vitrification need, trophoctoderm might not be representative for the inner cell mass.
- **Polar body biopsy:**
 - Advantages: No mosaicism. Does not involve the future embryo. Allowed in Germany, Austria and Switzerland.
 - Disadvantage: Only maternal abnormalities.

Trofectoderm array CGH – mosaicismus chr. 2

Genoma, Řím



Jaké jsou PGD laboratoře

- Nejedná se o začínající laboratoře, vždy předchází zkušenost s mol.gen. metodami na periferní krvi, povětšinou dlouholetá
- Umějí pracovat s DNA na úrovni single cell, polocyty, skupiny buněk trofektodermu
- Progresivní odborníci
- Publikace, granty
- Umějí se vyrovnat s velmi obtížnou organizační stránkou věci – přizpůsobení logistice IVF a termínu embryotransferu

Důvody, proč nejsou PGD laboratoře v Evropě akreditovány ???

FISH je nahrazována array CGH technikou pro nesporné výhody

- Vyšetřovací kity a software RUO, nemají CE známku (IVDD)
- Producenti nemají zájem o certifikaci CE známky
 - Zvýšení ceny kitu
 - Zmražení vývoje (cokoliv je změněno, zlepšeno, vyžaduje novou certifikaci CE)
- Pokud není CE, je vyžadována analytická validace
 - Není shoda v tom, o jaký typ testu se jedná
 - Není srovnatelná metoda, pomocí které validovat
 - FISH pouze max. 8 – 10 chromosomů, nelze udělat full chromosome screening – nepracuje s izolovanou DNA
 - Single cell CGH na prakticky totožném principu
 - Díky vysoké ceně kitu znamená náklady na provedení validace v řádech milionů Kč

Důvody, proč nejsou PGD laboratoře akreditovány ???

Molekulárně genetická diagnostika

- Vysoce individuální přístup
- Jedná se o různé mutace různých chorob, včetně vzácných
- Ani dva případy stejné choroby nemusejí být v postupech stejné
- Vyšetřování vzácných chorob – četnost neumožňuje dostatečnou opakovatelnost vyšetření na jednom pracovišti
- Laboratoř nedělá prakticky nikdy nic stejně, jako v minulém případě, vše je originál
- Společný je určitý kmen používaných postupů a algoritmů

Problém provedení analytické validace

- Na rozdíl od molekulárně genetických metod prováděných na jiném materiálu, který není tak unikátní a specifický, je u embryí praktický univerzální problém s „opakovatelností testu“
- Embryo je vysoce specifický a vždy unikátní materiál, jak geneticky, tak i morálně a eticky
 - Cílem PGD je selekce geneticky nepostiženého embrya a jeho transfer
 - Embrya nelze dle bioetických zákonů „vyrábět“ pro účely vědeckého zkoumání
 - Mosaicismus
 - Lze zkoumat pouze netransferovaná embrya, u kterých je „problém“ – byla geneticky defektní nebo morfologicky nekvalitní
 - degradace DNA
 - ve stadiu blastocysty již nelze izolovat jednu blastomeru
 - aj.

Summary: categories of tests

Type		Description	Examples	Se	Sp	Acc	True	Prec	LoD	Prob
A	Quantitative	Truly quantitative: the result can have any value between two limits (including decimals).	Determination of methylation load (%), Heteroplasmy of mitochondrial variation.				++	++	++	
B	Categorical	Semi-quantitative: the quantitative signal is placed into one of a series of [essentially] undefined categories to give the final result.	Determination of triplet repeat size			+	++	++	++	+
C		Semi-quantitative: the quantitative signal is placed into one of a limited series of predefined categories to give the final result.	Determination of copy number Inc. exon & gene deletions, duplications			+	To establish correction factors and/or cut-offs			++
D	Qualitative	Qualitative: the true quantitative signal can have one of many possible values, but the result can only have one of two possible values.	Mutation scanning for unknown mutations e.g. by sequencing, HRM, CSCE.	++	++	+	To establish correction factors and/or cut-offs		++	
E		Qualitative (binary): the true quantitative signal can only have one of two possible values	Genotyping for a specific mutation e.g. F508del in <i>CFTR</i> , C282Y in <i>HFE</i>	++	++	+	To establish correction factors and/or cut-offs		++	+

Kategorie testu a princip validace

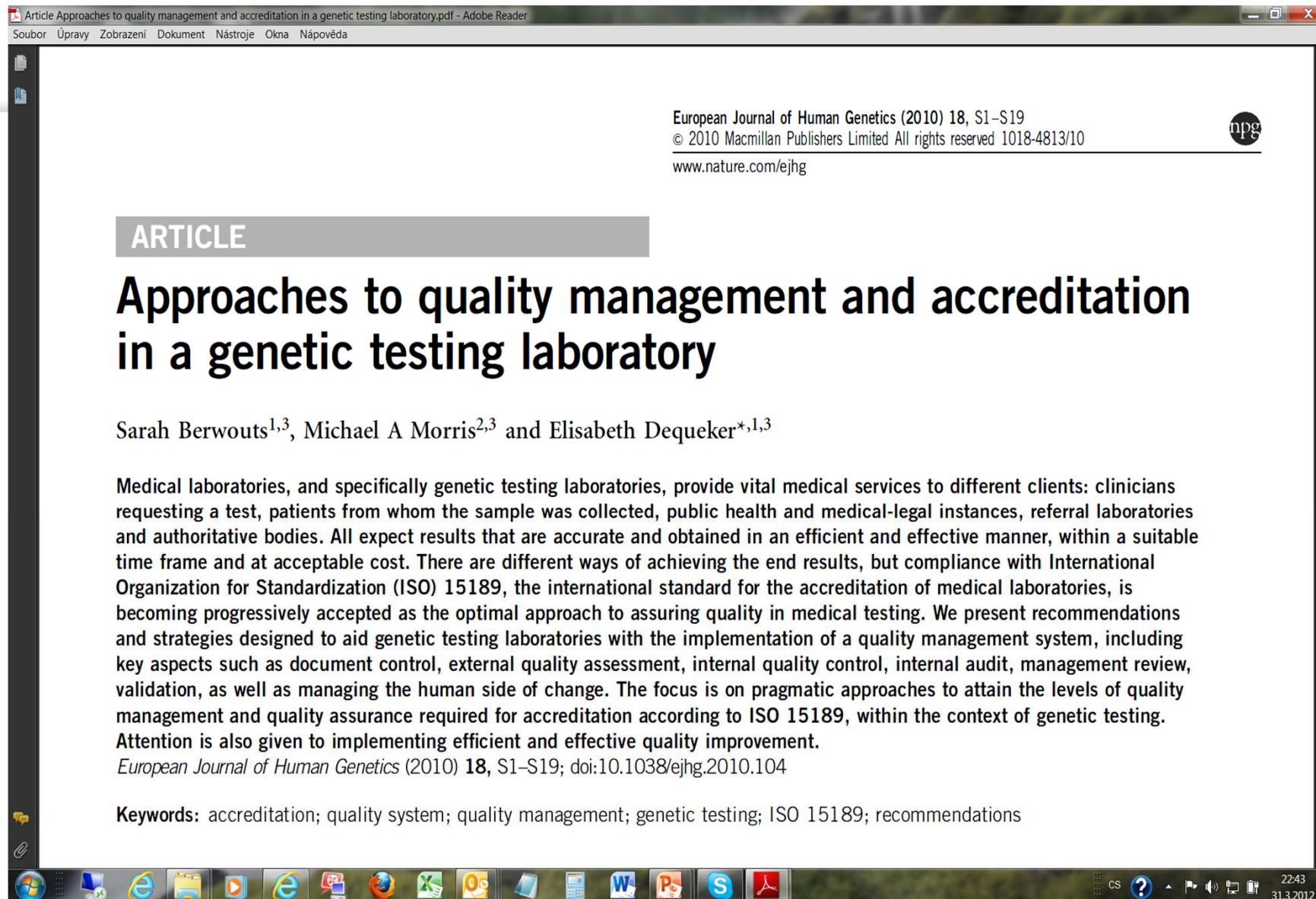
- Array CGH
- Test kategorický, semikvantitativní, typ C ???
 - Interval spolehlivosti (probability > 95%), přesnost (accuracy)

Očekávaný princip validace:

- Ke každému výsledku arraye by bylo nutno přiřadit konkrétní hodnotu pravděpodobnosti (spolehlivosti) získání správného výsledku
 - z materiálu blastomer nelze získat data izolovaně pro všechny chromosomy
 - lze snad potenciálně uvažovat o vyšetření buněk s chromosomem 21 – nejmenší a nejméně BAC klonů ???
 - možno vyšetřovat aberantní buněčné linie, nikoliv materiál z embryí
 - vlastnosti DNA jsou jiné, nežli u blastomer, nebo trofektodermu

International working group on validation

- 14 institutions
 - 8 countries
 - Public, private
 - Geneticists
 - Accreditation experts
 - Metrologists
 - Statistician
 - 5 years
- Chris Mattocks (National Genetics Reference Laboratory, Salisbury, **UK**)
 - Michael Morris & Isabelle Moix (Molecular Diagnostic Laboratory, Geneva, **Switzerland**)
 - Gert Matthijs, Elfriede Swinnen, Anniek Corveleyn, Els Dequeker, Sarah Berwouts, Tom Janssens & Ivo Salden (Centre for Human Genetics, Leuven, **Belgium**)
 - Andrew Wallace (National Genetics Reference Laboratory, Manchester, **UK**)
 - Clemens R. Müller (Dept. of Human Genetics, Würzburg, **Germany**)
 - Jana Camajova, Petra Křenková, Patricia Norambuena, Alexandra Stambergova & Milan Macek (Department of Biology and Medical Genetics; Prague, **Czech Republic**)
 - Els Voorhoeve & Bert Bakker (Dept. Of Human and Clinical Genetics, Leiden, **Netherlands**)
 - Trudi McDevitt & David Barton (National Centre for Medical Genetics, Dublin, **Ireland**)
 - Hans Scheffer (University Medical Centre Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands)
 - Victoria Pratt (Quest Diagnostics Nichols Institute, Chantilly, **USA**)
 - Mike Zoccoli (Celera, Alameda, **USA**)
 - Jean Amos-Wilson (Sequenom, San Diego, **USA**),
 - Patrick M. Bossuyt (Clinical Epidemiology, Biostats & Bioinformatics, Amsterdam, **Netherlands**)
 - Ian Mann (Swiss Accreditation Service, Lausanne, **Switzerland**).



Validace a verifikace mol.- gen. testů



The screenshot shows a web browser window displaying the article page for the European Journal of Human Genetics. The browser's address bar shows the URL: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3002854_toolpubmed.pdf. The page features the PubMed Central logo and the journal title "European Journal of Human Genetics". The article title is "A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests". The authors listed are Christopher J Mattocks, Michael A Morris, Gert Matthijs, Elfriede Swinnen, Aniek Corveleyn, Els Dequeker, Clemens R Müller, Victoria Pratt, and Andrew Wallace, representing the EuroGentest Validation Group. The page also includes footnotes for each author's affiliation, the date of receipt and acceptance, and a Creative Commons license notice.

Journal List > Eur J Hum Genet > v.18(12); Dec 2010

Eur J Hum Genet. 2010 December; 18(12): 1276–1288. PMID: PMC3002854
Published online 2010 July 28. doi: 10.1038/ejhg.2010.101

Copyright© 2010 Macmillan Publishers Limited

A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests

Christopher J Mattocks,^{1,7*} Michael A Morris,^{2,7} Gert Matthijs,^{3,7} Elfriede Swinnen,³ Aniek Corveleyn,³ Els Dequeker,³ Clemens R Müller,⁴ Victoria Pratt,⁵ and Andrew Wallace⁶, for the EuroGentest Validation Group⁸

¹National Genetics Reference Laboratory (Wessex), Salisbury District Hospital, Salisbury, UK
²Molecular Diagnostic Laboratory, Service of Genetic Medicine, CMU, Geneva, Switzerland
³Centre for Human Genetics (EuroGentest), campus Gasthuisberg, Leuven, Belgium
⁴Department of Human Genetics, University of Würzburg, Biozentrum, Würzburg, Germany
⁵Quest Diagnostics Nichols Institute, Chantilly, VA, USA
⁶National Genetics Reference Laboratory (Manchester), St Mary's Hospital, Manchester, UK
⁷National Genetics Reference Laboratory (Wessex), Salisbury District Hospital, Odstock Road, Salisbury SP2 8BJ, UK. Tel: ; Fax: +44 1722 338095; E-mail: chris.mattocks@salisbury.nhs.uk
⁸Chief editors.
⁸See the appendix for a list of members of the 'EuroGentest (Unit 1) working group'.

Received February 11, 2010; Revised May 26, 2010; Accepted June 1, 2010.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Validace, verifikace

Mattocks *et al*:

- Unfortunately, definitive guidelines defining specific sample sizes cannot be realistically given, as the requirement is so dependent on a wide range of factors, including the nature and performance of the test, the critical parameters, the way in which the test will be used in practice and the confidence level required for clinical use.
- Above all, we seek to promote a pragmatic approach; although validation and verification must be carefully considered, test implementation must also be achievable and not overburdening.

Validace a verifikace mol.- gen. testů

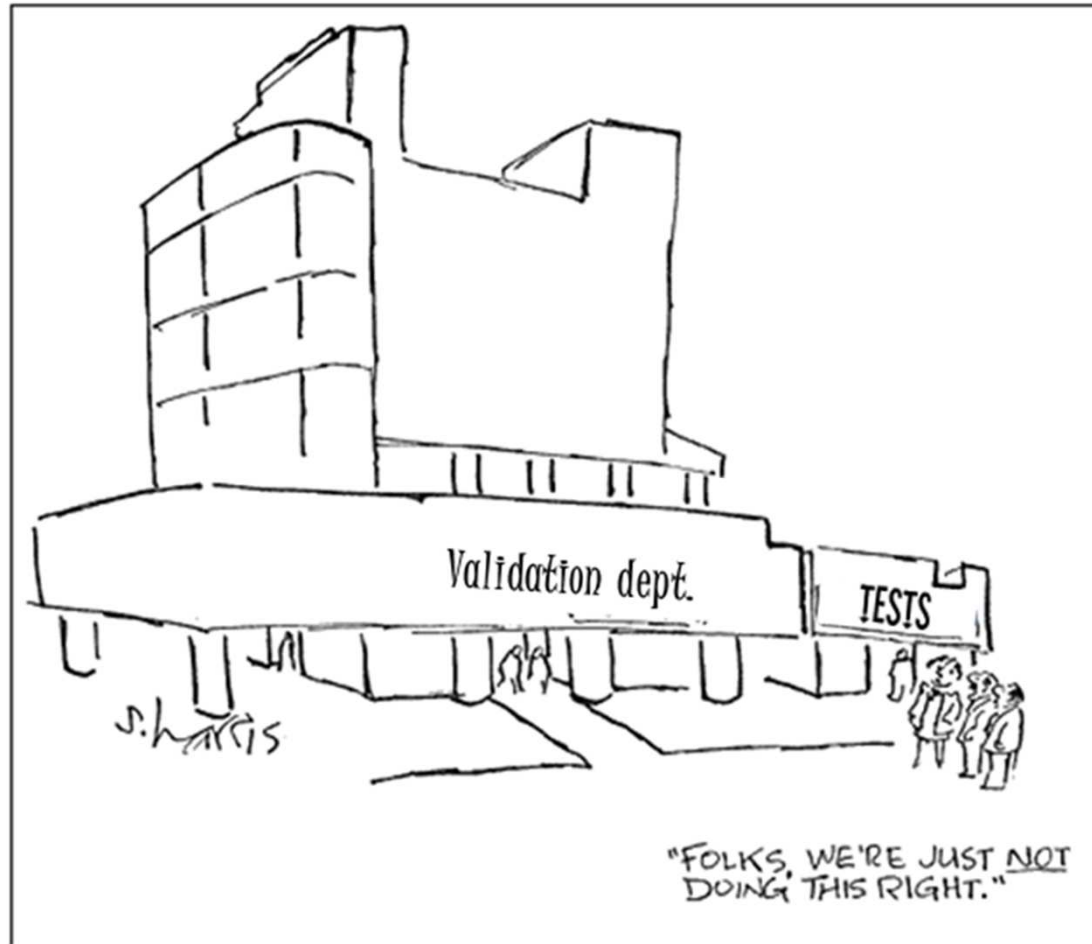
Jennings *et al*:

'Although supporting evidence is essential to scientific understanding, it must be recognised that statistically significant data may not be available for every aspect of every validation study.

There is simply not enough patient material, financial support, or scientist/technologist time to support such rigorous data collection.

Therefore, medical judgement in the context of in-laboratory data and the larger health-care system is essential to deciding when a test is ready to be introduced for patient care.'

Validation must be practical !



Co říká norma 15189 ?

5.5. Postupy vyšetření

POZNÁMKA Některé z následujících bodů nemusí být použitelné ve všech oborech laboratorní medicíny

5.5.1. Laboratoř musí používat takové postupy vyšetření, včetně postupů pro výběr/odběr částí vzorku, které splňují potřeby uživatelů laboratorních služeb a které jsou vhodné pro dané vyšetření. Přednost mají postupy, které byly publikovány v zavedených renomovaných učebnicích, v odborníky redigovaných pracích nebo časopisech, nebo v mezinárodních, národních nebo regionálních směrnicích. Jestliže se používají místní postupy, musí být pro zamýšlené použití odpovídajícím způsobem validovány a plně dokumentovány.

Co říká norma 15189 ?

5.5.2. K potvrzení toho, že postupy vyšetření jsou vhodné pro daný účel, musí laboratoř používat pouze validované postupy. Validace musí mít rozsah nutný k tomu, aby odpovídaly požadavkům při daném použití nebo oblasti použití. Laboratoř musí zaznamenávat získané výsledky a použité postupy validace.

Metody a postupy, které byly vybrány pro použití, musí být před nasazením pro klinické vyšetřování vyhodnoceny a musí být potvrzeno, že poskytují uspokojivé výsledky. Přezkoumání postupů musí provádět ředitel laboratoře nebo pověřená osoba na začátku a potom ve stanovených intervalech. Takové přezkoumání se běžně provádějí jednou ročně. Tato přezkoumání musí být dokumentována.

Zabezpečení kvality postupů vyšetření

5.6.4. Laboratoř se musí účastnit mezilaboratorních porovnávání, jako jsou ta, která organizují systémy externího hodnocení kvality. Vedení laboratoře musí sledovat výsledky externího hodnocení kvality a nejsou-li kontrolní kritéria splněna, musí se podílet na zavádění opatření k nápravě. Programy mezilaboratorního porovnávání musí být v zásadním souladu s ISO/IEC Guide 43-1.

5.6.5. Jestliže formální program mezilaboratorního srovnávání není k dispozici, musí laboratoř vyvinout mechanismus rozhodování o přijatelnosti jinak nehodnocených postupů. Při tomto způsobu se musí, kdykoliv je to možné, používat zkušební materiály získané externě. Např. výměnou vzorků s jinými laboratořemi. Vedení laboratoře musí sledovat výsledky tohoto způsobu mezilaboratorního porovnávání a účastnit se zavádění a dokumentace opatření k nápravě.

 Tweet { 0

13:15 – 13:45 Auditing (internal – external) – part 2 interactive presentation – *Elis*
Demuyssche (Belgium), Comptroller (USA)

Doporučení pro akreditaci metod PGD

ARRAY CGH

- Analytická validace se statistickým vyhodnocením intervalu spolehlivosti u array CGH na jedné buňce objektivně není proveditelná
- Je nutno hledat jiné možnosti, jak racionálně obhájit klinickou aplikaci těchto metod a to za pomoci menších validačních studií na adekvátním počtu vzorků, srovnáním výsledků prováděných pomocí starších metod (FISH) a to pomocí klinických výsledků a výsledků dovyšetřování netransferovaných embryí, apod.

Doporučení pro akreditaci metod PGD

MOLEKULÁRNÍ PGD

- V případě akreditace vyšetřování molekulárně dědičných chorob je akreditován společný kmen postupů, který může být univerzálně popsateľný
- work – up pro jednotlivé metody jen nutno vypracovat a posuzovat jakožto annexy

Acknowledgement

- Prof. MUDr. Pavel Trávník, DrSc.
- RNDr. Miroslav Horňák, Ph.D.
- RNDr. Jakub Horák, Ph.D.
- Mgr. Kristina Beránková, PhD.
- MUDr. Jan Veselý, CSc.
- MUDr. Lenka Hromadová
- RNDr. Eva Oráčová, Ph.D.
- Prof. MVDr. Jiří Rubeš, CSc.
- Prof. Gary Harton
- Dr. Francesco Fiorentino
- Prof. Alan Handyside

Děkuji za pozornost !

