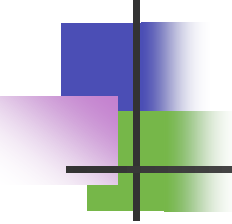




Moleküler Testlerde Yöntem Geçerliliğinin Sınanması

Dr. Arzu Sayiner
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji AD

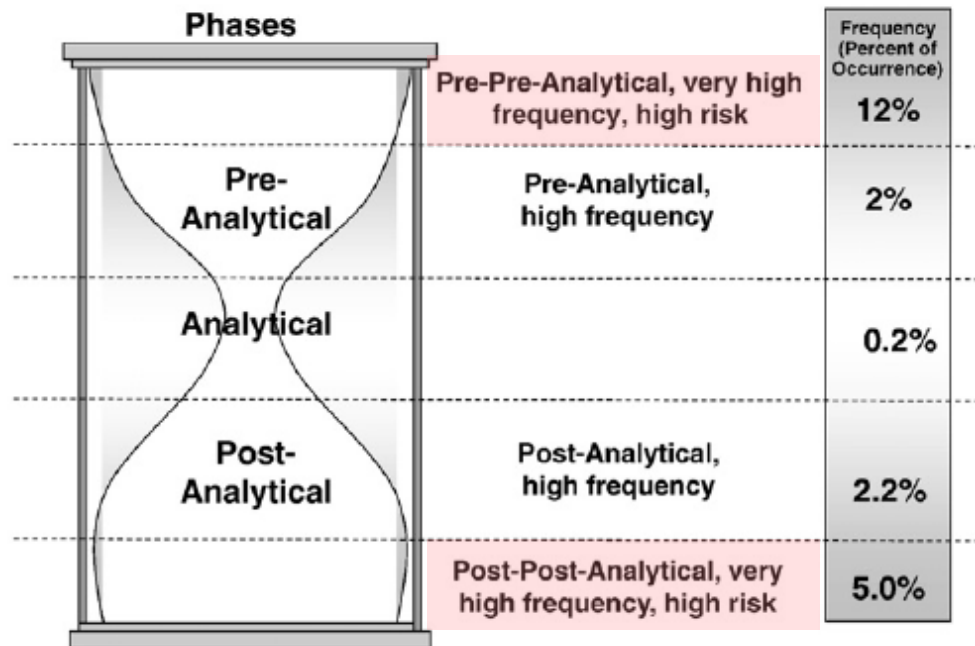


Laboratuvarda Kalite Güvencesi

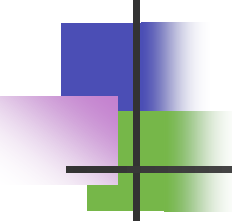
Kalite güvencesi, hasta ile başlar ve hasta ile biter.

- Test sonuçlarını ve hasta güvenliğini etkileyebilecek her tür değişkenin kontrolünü amaçlar.

Laboratuvar hataları



Hakan Abacioğlu'dan alınmıştır.



Kaliteyi etkileyen faktörler

- **Personel** (eğitim, deneyim, vb)
- **Çevresel faktörler** (elektrik, su, gürültü, vb)
- **Örnek** (test seçimi, zamanlaması, kalitesi, etiketlenmesi, transportu, saklaması, vb)
- **Laboratuvar malzemeleri** (reaktifler, kimyasallar, besiyerleri, boyalar, ...)
- **Test yöntemi**
- **Cihazlar**
- **Sonuçların** okunması, yorumlanması, raporlanması

Kalitenin sağlanması

■ Yeni bir test →

- Gereksinimin tanımlanması
- Yöntem – test seçimi
 - Lab yapımı / ticari, kalitatif / kantitatif
- Koşulların – cihazların sağlanması
- Personelin eğitimi
- Klinisyenin bilgilendirilmesi

■ Yöntem geçerliliğinin sınanması →

- Lab yapımı test - validasyon
- Ticari test - verifikasyon

■ İç ve dış kalite kontrolleri ile izlem ve iyileştirmeler

■ Testin izlenmesi →

- Klinik yarar
- İnsidans / prevalans değişiklikleri
- Yarar – maliyet analizi
- KK verilerinin izlemi
- Alternatiflerin değerlendirilmesi
- Otomatizasyon / çoklu test seçenekleri

Yöntem geçerliliği

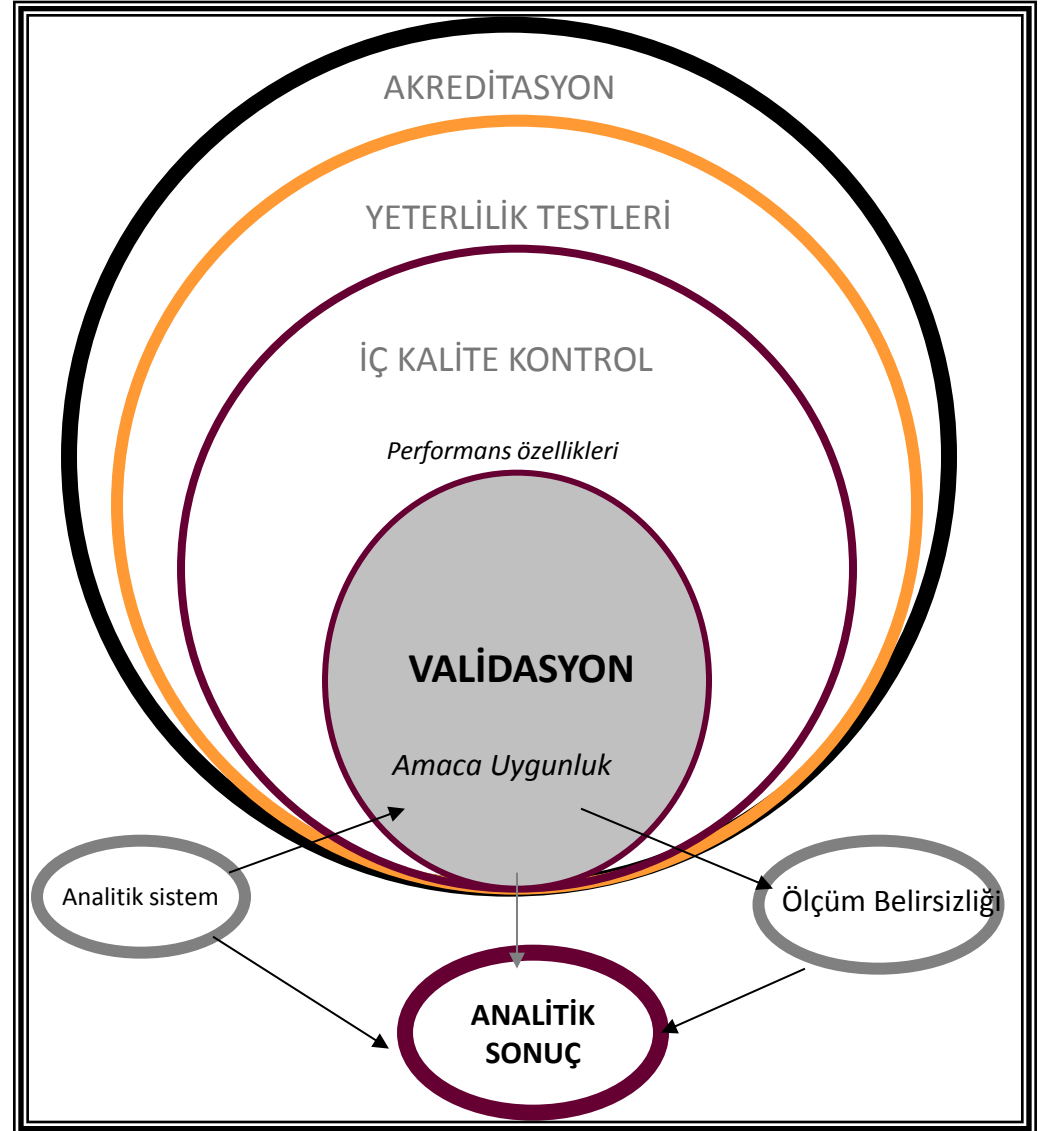


- Test, amaca uygun mu?
Testin kalitesini, güvenilirliğini ve tutarlılığını belirlemeye yarar.
 - Laboratuvar yapımı veya laboratuvar tarafından değiştirilmiş test için → performans özelliklerinin belirlenmesidir.
 - Ticari ve IVD-CE belgesi olan test için, testin performans özelliklerini üretici belirler. Laboratuvar, bu performansı kullanım sırasında sağlayabildiğini göstermelidir.

Rabenau HF et al, J Clin Virol 2007
Burd EM, Clin Microbiol Rev 2010

Dikkat !

- Testler ve cihazlar laboratuvara alınmadan önce detaylı olarak incelenmeli ve değerlendirilmelidir.
- Kontroller, sorunlu bir testin veya cihazın performansını iyileştiremez.



Yöntem geçerliliği (minimum)

Onaylı test (Verifikasyon)	Laboratuvar yapımı test (Validasyon)
Doğruluk Kesinlik (intra-,inter-assay) Doğrusallık (kantitatif ise)	Doğruluk Kesinlik (intra-,inter-assay) Doğrusallık (kantitatif ise) Duyarlılık Özgüllük

Rabenau HF et al, J Clin Virol 2007

Burd EM, Clin Microbiol Rev 2010

Yöntem geçerliliği (minimum)

Onaylı test (Verifikasyon)	Laboratuvar yapımı test (Validasyon)
Doğruluk Kesinlik (intra-,inter-assay) Doğrusallık (kantitatif ise) Analitik duyarlılık CAP için (kantitatif ise)	Doğruluk Kesinlik (intra-,inter-assay) Doğrusallık (kantitatif ise) Duyarlılık Özgüllük

Rabenau HF et al, J Clin Virol 2007

Burd EM, Clin Microbiol Rev 2010

Diğer kriterler

- Klinik (tanısal) validasyon
 - Duyarlılık, özgünlük, doğruluk
- Kantitasyon aralığı
- Eşik değer
- Raf ömrü
-





IVD/CE ONAYLI NAT

Değerlendirme kriteri	Referans materyal	Örnek sayısı	
		Kalitatif	Kantitatif
Doğruluk	Pozitif	3	3
	Düşük pozitif	3	3
	Negatif	3	3
Kesinlik - çalışma içi (3 tekrar)	Pozitif	1	3
	Düşük pozitif	1	3
Kesinlik- çalışmalar arası (3 ayrı çalışma)	Pozitif	1	1
	Düşük pozitif	1	1
Doğrusallık (2 tekrar)	Pozitif	-	1 ³

Rabenau HF, 2009 ESCV

Rabenau HF et al, J Clin Virol 2007

LABORATUVARDA GELİŞTİRİLMİŞ NAT

Değerlendirme kriteri	Referans materyal	Örnek sayısı	
		Kalitatif	Kantitatif
Duyarlılık	Pozitif	10	10
	Düşük pozitif	10	10
Özgüllük	Negatif	20	20
Doğruluk	Pozitif	3	3
	Düşük pozitif	3	3
	Negatif	3	3
Kesinlik - çalışma içi (3 kez tekrar)	Pozitif	1	6
	Düşük pozitif	1	3
Kesinlik - çalışmalar arası (3 ayrı çalışmada)	Pozitif	1	2
	Düşük pozitif	1	1
Doğrusallık (2'şer tekrar 2 çalışmada)	Pozitif	-	2 ⁴

Rabenau HF, 2009 ESCV

Rabenau HF et al, J Clin Virol 2007

Analitik Duyarlılık, Saptama Sınırı ("Limit of detection", LOD)

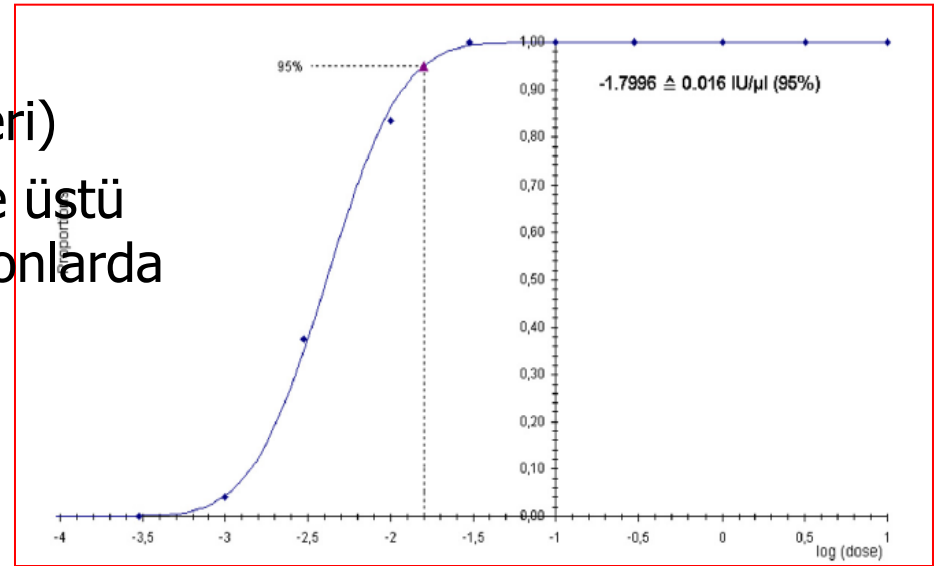
- Test ile belli bir güven aralığında (%95) saptanabilen en düşük analit miktarı

(Probit analizi)

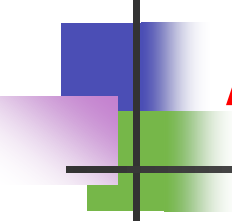
CLSI → 5 örnek x 12 çalışma (60 veri)

Örnekler saptama alt sınırının altı ve üstü olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda analit içermelidir.

%95 olasılıkla saptanan en düşük konsantrasyon, saptama alt sınırı olarak seçilir.

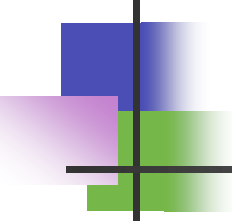


Miktarı belli örnek
Kopya, IU, TCID50



Analitik Özgüllük (1)

- Hedef ajanın çeşitli varyantları
- Çapraz reaksiyon
 - Benzer genetik yapıya sahip mo
 - Örnekte bulunması olası flora üyeleri
 - Benzer hastalık yapan mo
 - Hedef NA dizisine benzer diziye sahip mo (GenBank – BLAST ile tarama)
- İnterferans
 - Hb
 - Lipid
 - Bilirubin
 - İlaçlar, antikoagülanlar,...

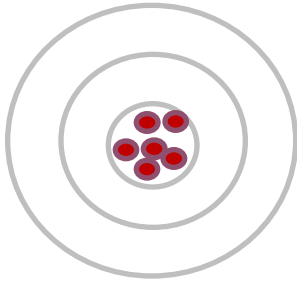


Analitik Özgüllük (2)

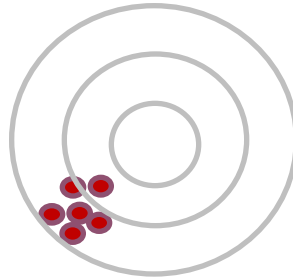
- Çapraz reaksiyon verme riski olan mikroorganizma içeren örneklerin çalışılması
 - Yüksek konsantrasyonda (10^5 kopya/ml) olmalıdır.
- İnterferans yaratabilecek maddeyi içeren, hedefi içeren ve içermeyen örneklerin eş zamanlı çalışılması

Tanımlar

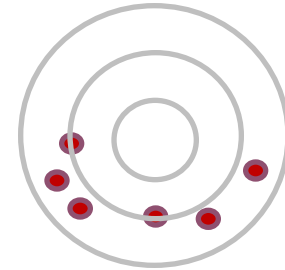
Doğruluk	Ölçümlerin gerçek değere yakınlığı
Kesinlik	Ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığını gösterir.
Sapma (bias)	Test sonucu ile referans değer arasındaki fark <i>(Ne kadar AZSA testin DOĞRULUĞU o kadar YÜKSEKTir)</i>



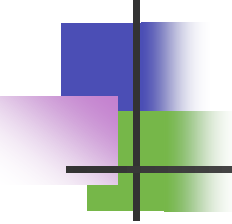
DOĞRU ve KESİN



KESİN *ama*
DOĞRU DEĞİL

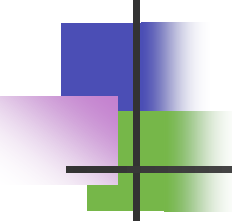


Hem KESİN *DEĞİL*
hem de DOĞRU DEĞİL



Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)

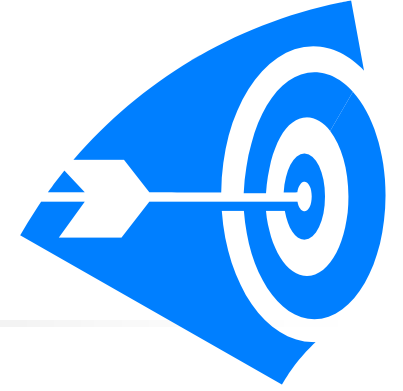
- Tekrarlanan çalışmalardan elde edilen değerler birbirlerinden ne kadar farklı ?
 - SD veya varyasyon katsayısı (SD/ortalama)



Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)

- Çalışma içi ve çalışmalar arası
 - Örnek:
 - 3 P örnek + 3 DP örnek → aynı çalışmada 3er kez
 - 1 P örnek + 1 DP örnek → 3 ayrı günde birer kez çalışılır.
- Değerlendirme
 - SD ve %CV hesaplanır. Kabul edilebilir değer?
 - Üreticinin sonuçları ile karşılaştırılır.
 - Laboratuvar yapımı test için:
 - $CV \leq \%15$, kantitasyon alt sınırı için $\%20$
 - Farklı konsantrasyonlar için ayrı hesaplanarak konsantrasyon – kesinlik ilişkisi belirlenebilir.

Doğruluk ("accuracy")

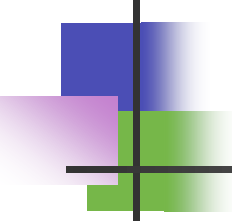


- Saptanan değer gerçek değer mi?
 - Referans materyal kullanımı
 - DSÖ → HIV, HBV, HCV, HAV, ParvoB19,
 - NIBSC, ticari kuruluşlar
 - Kültür izolatları
 - Hasta örnekleri

The screenshot shows the NIBSC website interface. At the top, there are logos for NIBSC and the Health Protection Agency. Below the logos is a navigation bar with links: About Us, Products, Services, Science, Spotlight, Partners, and Contact. A search bar is located on the right. The main content area displays a table of quality control reagents under the heading 'You are currently viewing the Quality Control Reagent in the diagnostics category'.

Product Number	Description
03/B346-06	QCRH5V2QC1-Anti-HSV2 Quality Control Serum: Sample1 Quality Control Reagent
03/B377-09	QCRH5V1QC1-Anti-HSV1 Quality Control Serum: Sample1 Quality Control Reagent
05/B433-06	QCRTOXQC1-Anti-Toxoplasma Quality Control Serum: Sample 1 Quality Control Reagent
06/B461-04	QCRH5V1QC3-Anti-H5N1 Quality Control Serum: Sample5 Quality Control Reagent

- Sonuçların referans yöntem ile karşılaştırılması
- Sonuçların akredite bir laboratuvar ile karşılaştırılması



Doğruluk

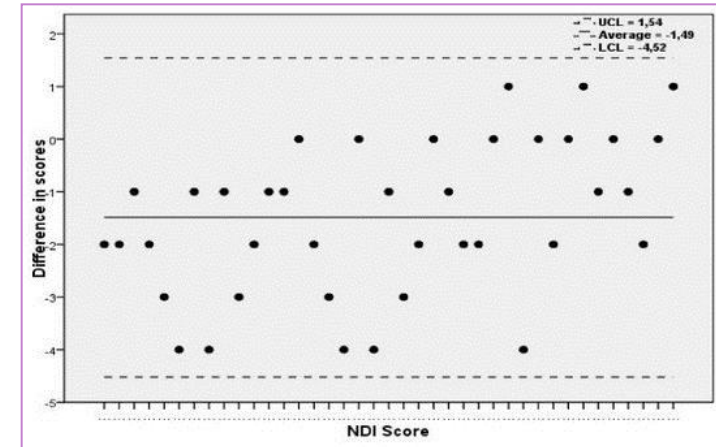
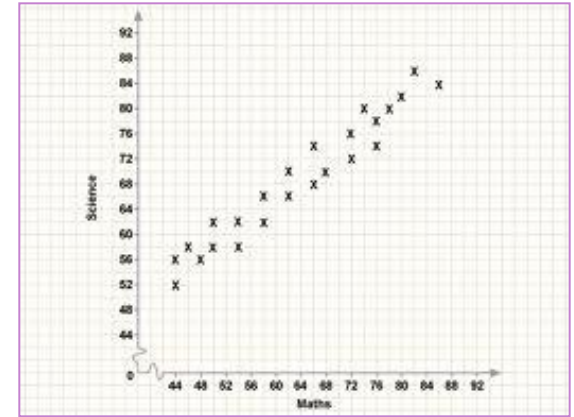
- Örnekler
 - Gerçek hasta popülasyonunu temsil etmeli
 - Farklı genotipleri içermeli
 - Negatif ve farklı konsantrasyonlarda pozitif örnekler içermeli
 - Farklı matrisler kullanılacaksa, her biri ayrı ayrı değerlendirilmeli
- Örnek sayısı ?
 - ≥ 20 olmalı. LYT için 50 pozitif, 100 negatif örnek
 - Rabenau: 3 YP, 3 DP, 3 negatif

Doğruluk değerlendirme

- Saçılma grafiği "Scatter diagram"
 - Korelasyon / Regresyon analizi
 - Eğim ve korelasyon katsayısı ile uyum belirlenir. Eğimin 1'e yakın olması, korelasyon katsayısının $r^2 \geq 0.95$ olması önerilir.
 - Dışarıda kalanlar incelenmelidir.
- Farklılık grafiği (Blant-Altman grafiği)

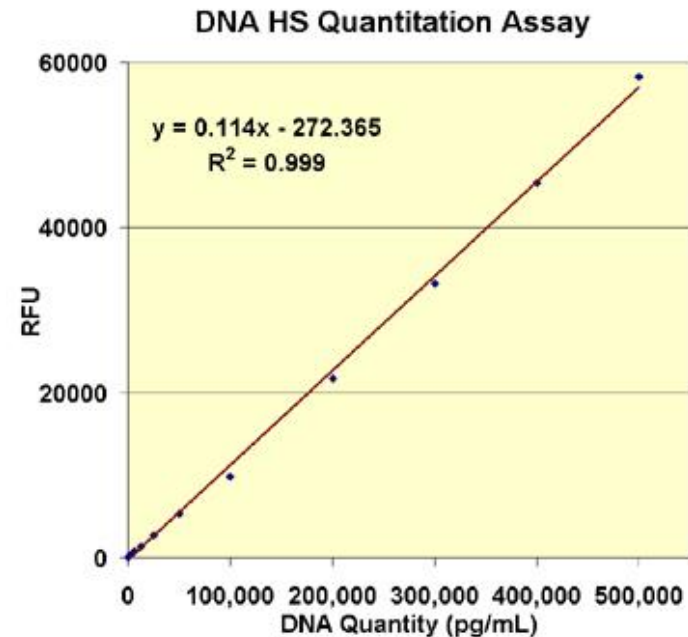
Ölçülen sapmanın, kabul edilebilir aralık ile olan ilişkisi incelenir.

Referans testi doğru olarak kabul ettiği için yeni testin üstün olduğu durumlarda sorun olabilir.
- Klinik verilere göre doğruluk belirleme
 - 2x2 tablo ile değerlendirilir.
 - Kappa değeri >0.80 önerilir.



Doğrusallık ("Linearity")

- Sadece kantitatif test için
- Testin kantitasyon yapabildiği aralığın belirlenmesi
- Test sonuçlarının analit miktarı ile korelasyonu
- Testin verimliliğinin belirlenmesi
 - 10 katlık dilüsyonlar – en az 4 basamak ($C_t < 12$ ile > 35 arası)
 - Her dilüsyon ikili veya üçlü çalışılır.
 - Matriks önemlidir; plazma, su, SF olabilir.



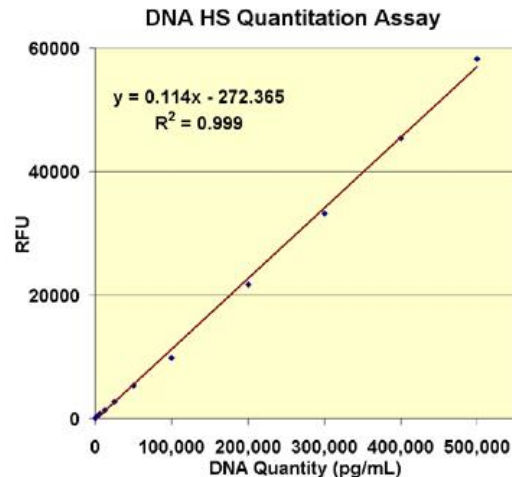
Doğrusallık

- Değerlendirme

- Beklenen değer (x) ile bulunan değerler (y) **regresyon analizi** ile değerlendirilir.

- Değerler log10 olarak girilir.

- Linear regresyon analizinde ideal değer $\rightarrow r^2:1$
Linear olmayan eğri varlığında uygun istatistik yöntemin kullanılması gerekir.



Need a better
performance?



Appendix 6 - A Guide to the Level of Revalidation Considered Acceptable For a Range of Changes to the Protocol

Revalidation activity	Protocol change					
	primers/ probes	reaction mix components (ex – primers/ probes)	extraction method	control material	instrument or conditions	analysis
Analytical sensitivity	yes	yes	yes	no	yes	yes
Diagnostic sensitivity	yes	*	yes	no	*	*
Analytical specificity	yes	*	limited\$	limited	limited	limited
Diagnostic specificity	yes	*	*	no	*	*
Efficiency (quantitative assays)	yes	yes	no	no	yes	yes
Linearity (quantitative)	yes	*	yes	no	*	*

HPA. Guidance on the Development and Validation of Diagnostic Tests
that Depend on Nucleic Acid Amplification and Detection, 2013



Anahtar Mesaj

- Yöntem geçerliliğinin kanıtlanması kalite kontrol programlarının vazgeçilmez bir parçasıdır.
- Kurallar belirlenmeli ve yazılı prosedür olmalıdır.
- Bir test laboratuvarında kullanıma girmeden önce ve her değişiklikte
 - Yöntem geçerliliği değerlendirilmeli ve belgelendirilmelidir.
- Değerlendirilecek özellikler
 - Testin onaylı-ticari ve laboratuvar yapımı olmasına göre değişir.

Kaynaklar

- Rabenau HF et al. *Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology*. Journal of Clinical Virology 2007;40:93-98.
- Burd EM. *Validation of laboratory-developed molecular assay for infectious diseases*. Clinical Microbiology Reviews 2010;23:550-576.
- Bustin SA et al. *The MIQE Guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clinical Chemistry 2009;55:611-622.



GIG
CYMRU
NHS
WALES

Iechyd Cyhoeddus
Cymru
Public Health
Wales



UK Standards for Microbiology Investigations

Guidance on the Development and Validation of Diagnostic Tests that Depend on Nucleic Acid Amplification and Detection

National
Measurement
System



Good practice guide
for the application of
quantitative PCR (qPCR)

MM3-A2
Vol. 26 No. 8
Replaces MM3-P2
Vol. 25 No. 11

Molecular Diagnostic Methods for
Infectious Diseases; Approved Guideline—
Second Edition

MM06-A2
Vol. 30 No. 22
Replaces MM06-A
Vol. 23 No. 28

Quantitative Molecular Methods for
Infectious Diseases; Approved Guideline—
Second Edition



Teşekkür ederim.

Test rehberi

- Test/Yöntem adı
- Amaç ve prensip
- Örnek tipi, alınması/saklanması
- Gerekli ekipman ve malzemeler
- Testin yapılış basamakları
- Sonuç raporlama ve klinik yorum
- Kalite kontrol
- Güvenlik önlemleri
- Kaynaklar



ADENOVİRUS-DNA PCR TEST REHBERİ

Belge No	MLTR.505.0
Yayın Tarihi	15.04.2008
Güncelleme No	00
Güncelleme Tarihi	
Sayfa No	1/4

TEST: ADENOVİRUS-DNA PCR (KANTİTATİF)

Marka ve Katalog no: Adenovirus R-Gene (Argene, 69-010)

Test amacı ve prensibi: Örnekte adenovirus DNA'sının varlığını kantitatif olarak araştırmak. TaqMan probu kullanan realtime PCR prensibine dayalıdır. Hedef hekzon geninin 138 bp'lik bir bölgesidir.

Örnek tipi, alınması ve saklanması: Kantitasyonun yararlı olduğu plazma / serum, BOS örneklerinden çalışılır. Testin özellikle immüsuprese hastalarda plazma ile çalışılması uygundur. Solunum yolu örnekleri, göz şürüntüsü, dışkı, biyopsi gibi materyal ile de çalışılabilir ancak sonuç kantitatif olarak verilmelidir. Kan, EDTA'lı tüpte, BOS ve diğer sıvı örnekler, steril ve kapaklı bir tüp