

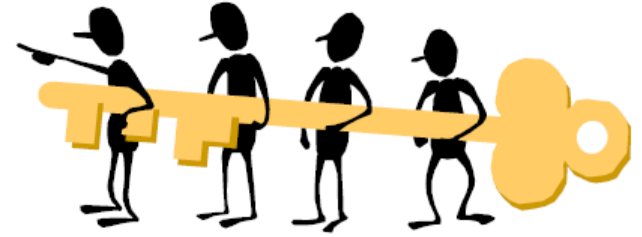


Moleküler Testlerde İç Kalite Kontrol

Dr. Aydan ÖZKÜTÜK

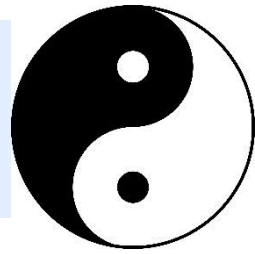
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Sunum planı



- ✓ Kalite kontrolün önemi, amacı
- ✓ Kalite kontrolü etkileyen faktörler
- ✓ İç kalite kontrol uygulamaları
- ✓ Kontrol sonuçlarının değerlendirilmesi
- ✓ Hata kaynakları
- ✓ Anahtar mesajlar

Laboratuvarlarda Kalite

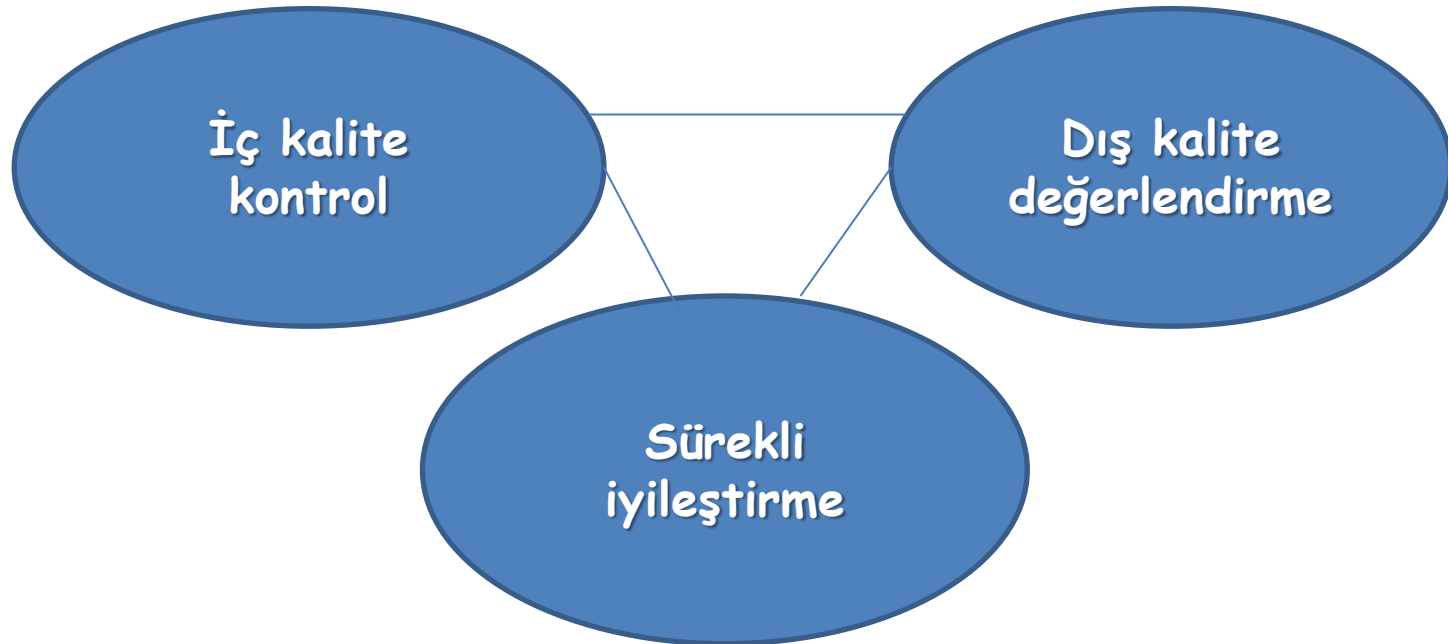


Standartlar doğrultusunda doğru, yinelenebilir ve zamanında sonuç vermektir

- ✓ Analiz öncesi
- ✓ Analiz
- ✓ Analiz sonrası

Tüm süreçlerin performansı sistematik olarak izlenmeli!..

Kalite Güvencesi



Kalite Kontrol



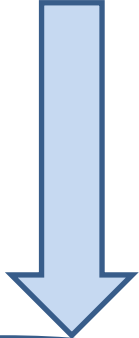
derekeasterby@aol.com

Analitik sürecin doğruluğunu
ve yinelenebilirliğini izlemek
üzere yapılan uygulamalardır

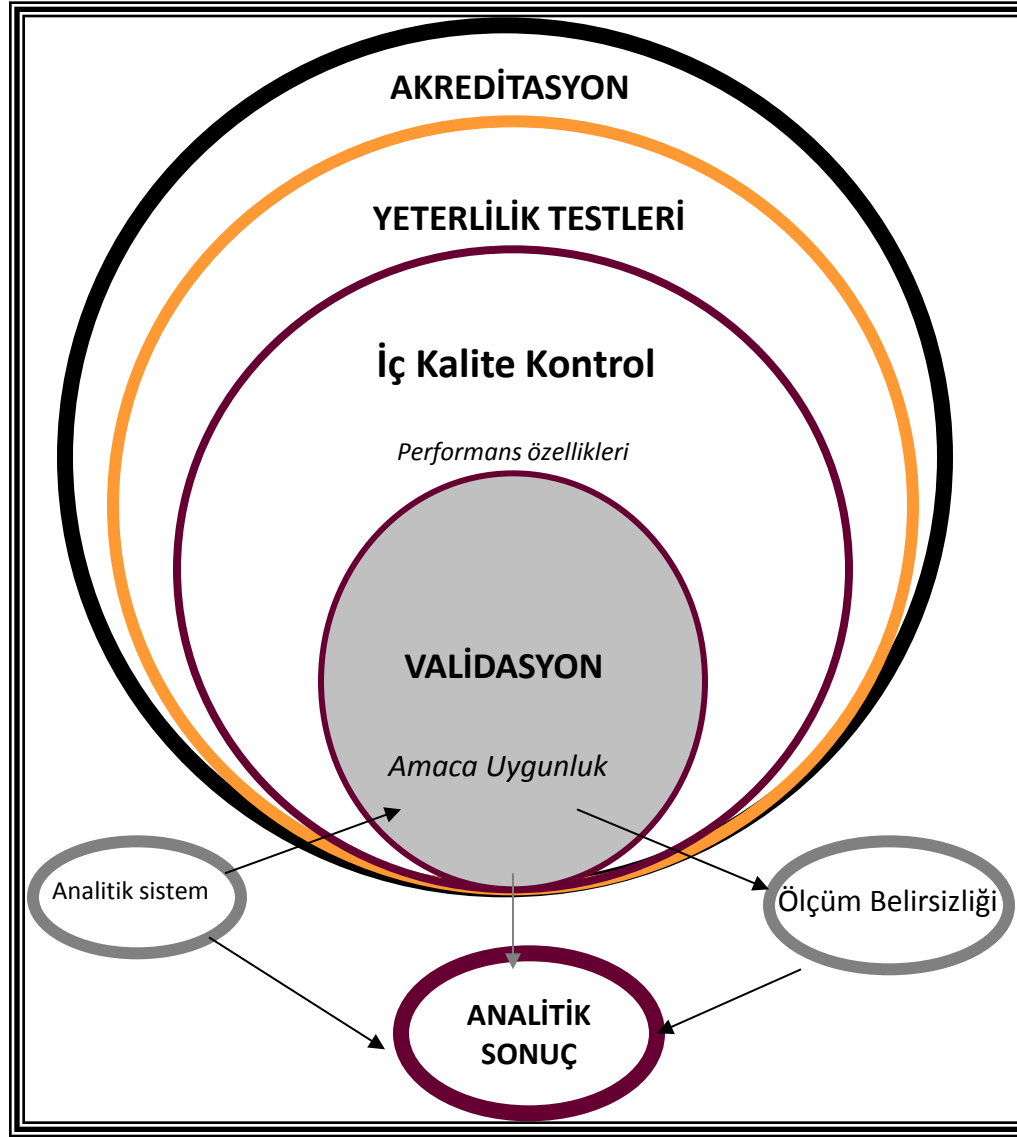
Kalite Kontrol Çalışmalarında Amaç

Hastanın sonuçları rapor edilmeden önce;

- Test sistemindeki başarısızlığa
- Çevresel koşullara
- Teknisyen performansına bağlı

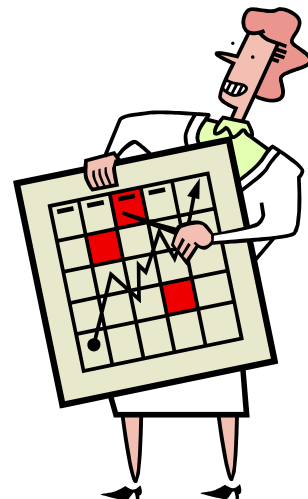


Hatayı bulmak,
ölçmek,
düzeltmek



İç Kalite Kontrol çalışmalarında iş akışı;

- ✓Yönergeler hazırlamak,
- ✓Personeli eğitmek,
- ✓Kalite kontrol verilerinin düzenli kontrolü,
- ✓Düzeltilici/önleyici faaliyetler ve kayıt



İKK uygulamasını etkileyen faktörler



- ✓ Klinik örneğe ait özellikler,
- ✓ Kontrol materyalinin özellikleri,
- ✓ Laboratuvar suyunun kalitesi,
- ✓ PZT tüplerinde kullanılan plastiğin kalitesi,
- ✓ Pipet/cihaz/ekipman kalibrasyon ve kontrolleri,
- ✓ Yöntem geçerliliği kanıtlanmış testlerin uygulanması,
- ✓ Personel yetkinliği

Örnek kalitesi;

- ✓ Örneğin alındığı yer,
- ✓ Örnek hacmi,
- ✓ Alınma yöntemi,
- ✓ Örneğin taşınması ve saklanma koşulları,
- ✓ Alınan örneklerin ayrılmadan uzun süre bekletilmesi,
- ✓ Örneğin tekrarlayan dondurulup çözündürülmesi



Örnek işlenmesi sırasında sorun;

- ✓ Nükleik asit izolasyonu kaynaklı,
- ✓ İnhibitör varlığı,
- ✓ Küçük hacimler ile çalışma

İnhibitör sorunu

- ✓ Analitik duyarlılığı etkiler ve yalancı negatif sonuçlara neden olurlar
- ✓ Örneklerin içerisinde veya işleme esnasında bulaşırlar
 - ✓ Bilirubin,
 - ✓ Hematin, hemoglobin,
 - ✓ Heparin,
 - ✓ Yağlar,
 - ✓ İlaçlar
 - ✓ Çeşitli metaller

iç amplifikasyon kontrol (İAK)
örnekleri kullanılır

İdeal İAK

- ✓ Hedef dizi ile aynı primer bağlanma bölgesine sahip,
- ✓ Benzer uzunluk ve baz kompozisyonu içeren,
- ✓ Prob bağlanma bölgesi ayrı olan,
- ✓ Tam kantifiye edilmiş ve test saptama sınırından 4-5 kat yüksek konsantrasyonda,
- ✓ DNA veya RNA

İAK uygulaması

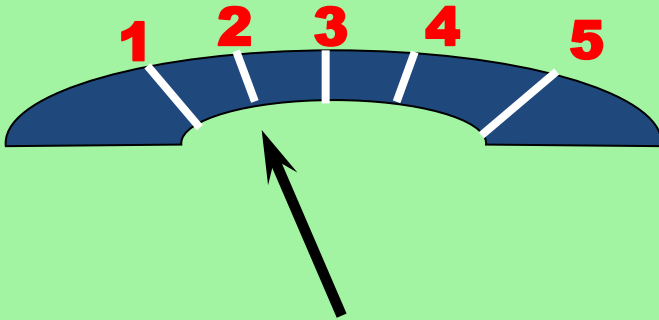
- ✓ Kontrol izolasyon aşamasından önce örneğe eklenmeli
- ✓ Testlerde kullanılan kontrol konsantrasyonu ile hedef konsantrasyonu uygun olmalı
 - ✓ Hedef miktarının yoğun olduğu durumlarda İAK ü inhibe olabilir
- ✓ Hedefle aynı ya da benzer izolasyon ve amplifikasyon verimliliğine sahip olması
- ✓ Hedef mikroorganizmaya benzemesi önemli

Kalibratör/Standartlar

Cihazları kalibre etmek için kullanılan tanımlanmış belli bir konsantrasyondaki maddedir

Kontrol olarak kullanılamaz

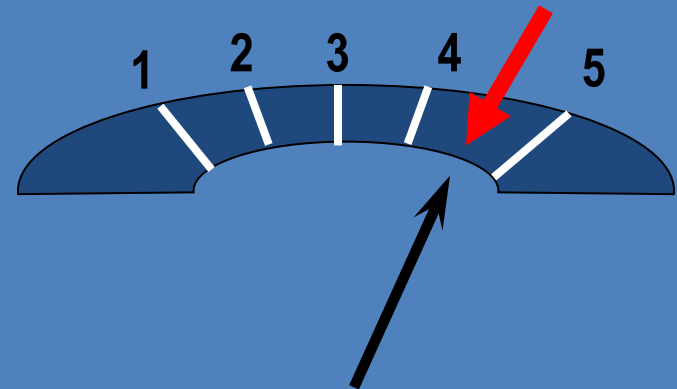
Bir skaladaki ölçüm noktalarını kurmak (kalibre etmek) için kullanılırlar.



Kontroller

Hasta numunelerine benzer ve belli bir konsantrasyondaki maddedir

Kontroller, prosedürün düzgün çalışmasını sağlamak için kullanılır



Bağımsız kontroller ("run control")

- ✓ Testin doğruluğu ve/veya kesinliğine yönelik bilgi verir
- ✓ Ticari /lab. yapımı olabilir
- ✓ Analit miktarı iyi tanımlanmıştır
- ✓ Klinik olarak anlamlı sınırlar içindedirler
- ✓ Hasta örneğine benzer (aynı matriks), stabil ve homojendir

Kontrol Materyallerinin Hazırlanması ve Saklanması

- ✓ Ticari ise aynı lot numaralı ürün kullanımı
- ✓ Üretici talimatlarına uyum
- ✓ Küçük alikotlarda ve uygun ısıda saklama
- ✓ Dondurucu /soğutucuların sıcaklık takibi



Bağımsız kontroller

- ✓ Analit miktarı belirlenmiş - ticari
 - ✓ Kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır
- ✓ Analit miktarı belirlenmemiş - lab yapımı
 - ✓ Kullanıcı tarafından belirlenir

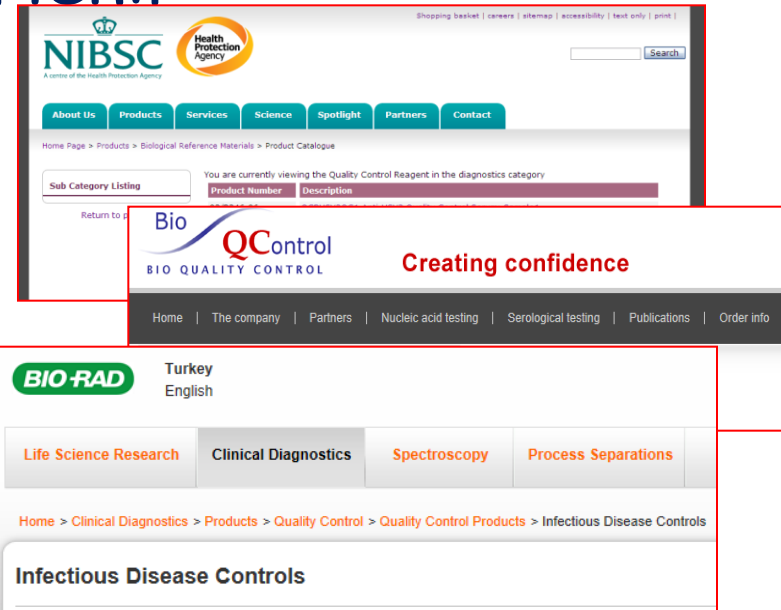
Ticari kaynaklarlar

www.nibsc.ac.uk

www.biocontrol.com

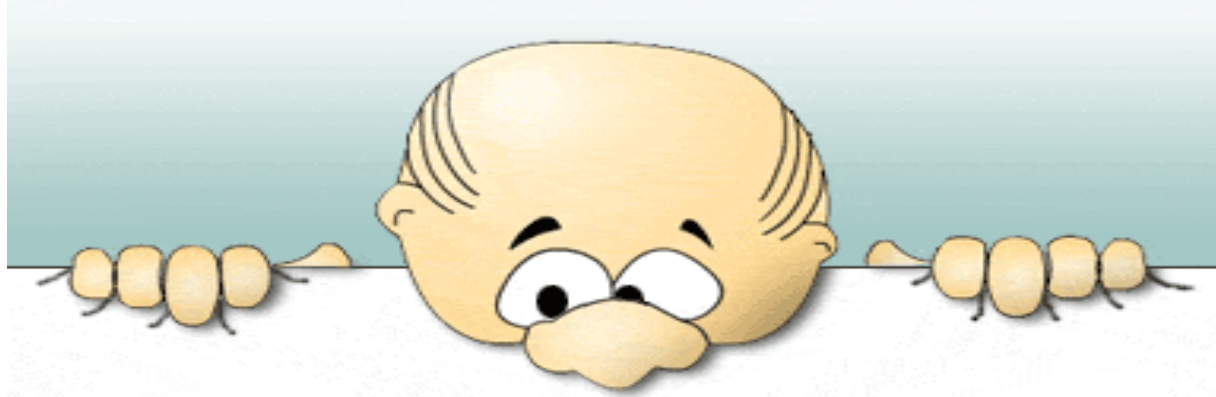
www.bio-rad.com

www.qnostics.com



Lab. yapımı bağımsız kontrol

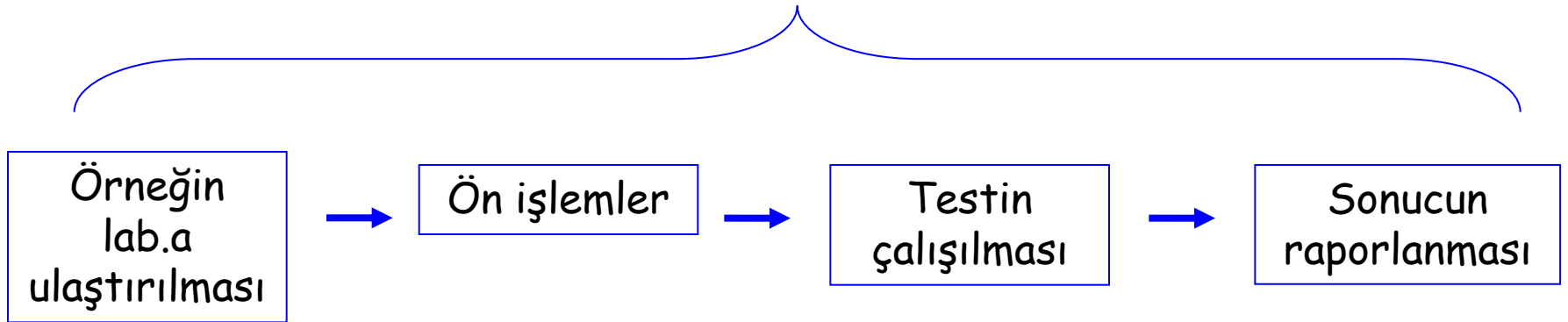
- ✓ Kontrolün düşük pozitif olması uygundur
 - ✓ Genellikle 2x eşik değer düzeyinde analit içermeli
 - ✓ Değişkenliğin izlenebildiği aralıkta olmalı
- ✓ Kantitatif testlerde iki adet pozitif kontrol (düşük ve orta düzey) kullanılması önerilir
- ✓ Kontroller pozitif bir örneğin dilüsyonu ile hazırlanabilir
 - ✓ Dilüent olarak analit içermeyen matriks (plazma/serum) seçilmelidir



İç Kalite kontrol nasıl uygulanır?

1. İç kontrol

Tüm basamakların kontrolü



- ## 2. İç kontrol
- Kit kontrolü
 - Bağımsız kontrol

İç Kalite kontrol uygulamaları-1

"Tüm basamakların kontrolü"

- ✓ Klinik örneklerin ikiye bölünmesi veya eski ve uygun koşullarda saklanmış örneklerin yeniden test edilmesi şeklinde yapılabilir
- ✓ Hasta örneği ikiye bölünür ve biri hasta örneği, diğeri bir İKK numarası verilerek çalışılır ve test sonuçları karşılaştırılır
- ✓ Örnek sayısının %0,5-1'nin tekrarı önerilir

- ✓ Sonuçlar aylık olarak tüm laboratuvar çalışanları ile birlikte gözden geçirilir
- ✓ Farklı çıkan sonuçlar değerlendirilir
- ✓ Sorun kaynakları tartışılmalı ve çözüm üretilmelidir
- ✓ Bu yöntemin dezavantajı testte sistematik bir hata varsa her iki sonuç aynı olsa da sonucun doğru olmayabilmesidir

İç Kalite kontrol uygulamaları-2

"Test kontrolü"

- ✓ İKK materyali yalnız test çalışılırken kullanılır ("run control")
 - ✓ Bağımsız kontrol- tercih edilir
 - ✓ Kite ait kontroller
 - ✓ Kitle birlikte üretici tarafından sağlanır
 - ✓ Genellikle test / lot spesifiktir
- ✓ Her çalışmada kullanılmalıdır

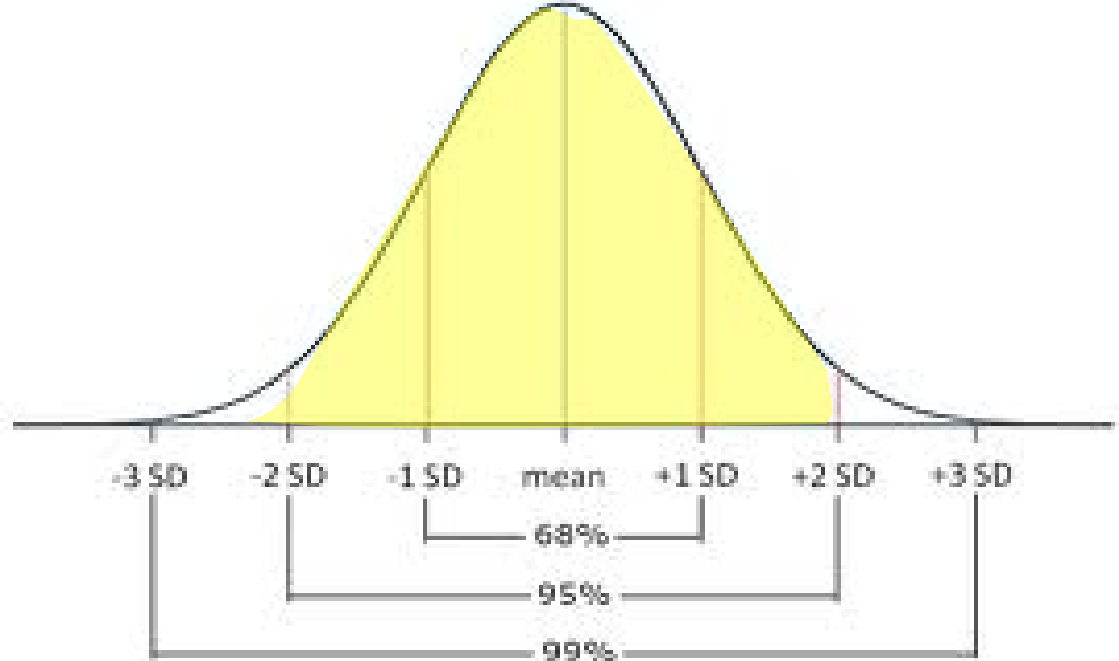
Bağımsız kontrol hazırlığı

- ✓ Kontrol örneği seçilir
- ✓ Kontrol örneği, değişkenler eşliğinde en az 20 kez çalışılarak ortalama değer ve standart sapma belirlenir
- ✓ İzlem grafikleri hazırlanır
 - $\pm 1SD, \pm 2SD, \pm 3SD$
 - "Levey-Jennings" grafikleri
- ✓ Kontrol örneği her çalışmaya eklenir, alınan sonuç grafiğe işlenerek değerlendirilir

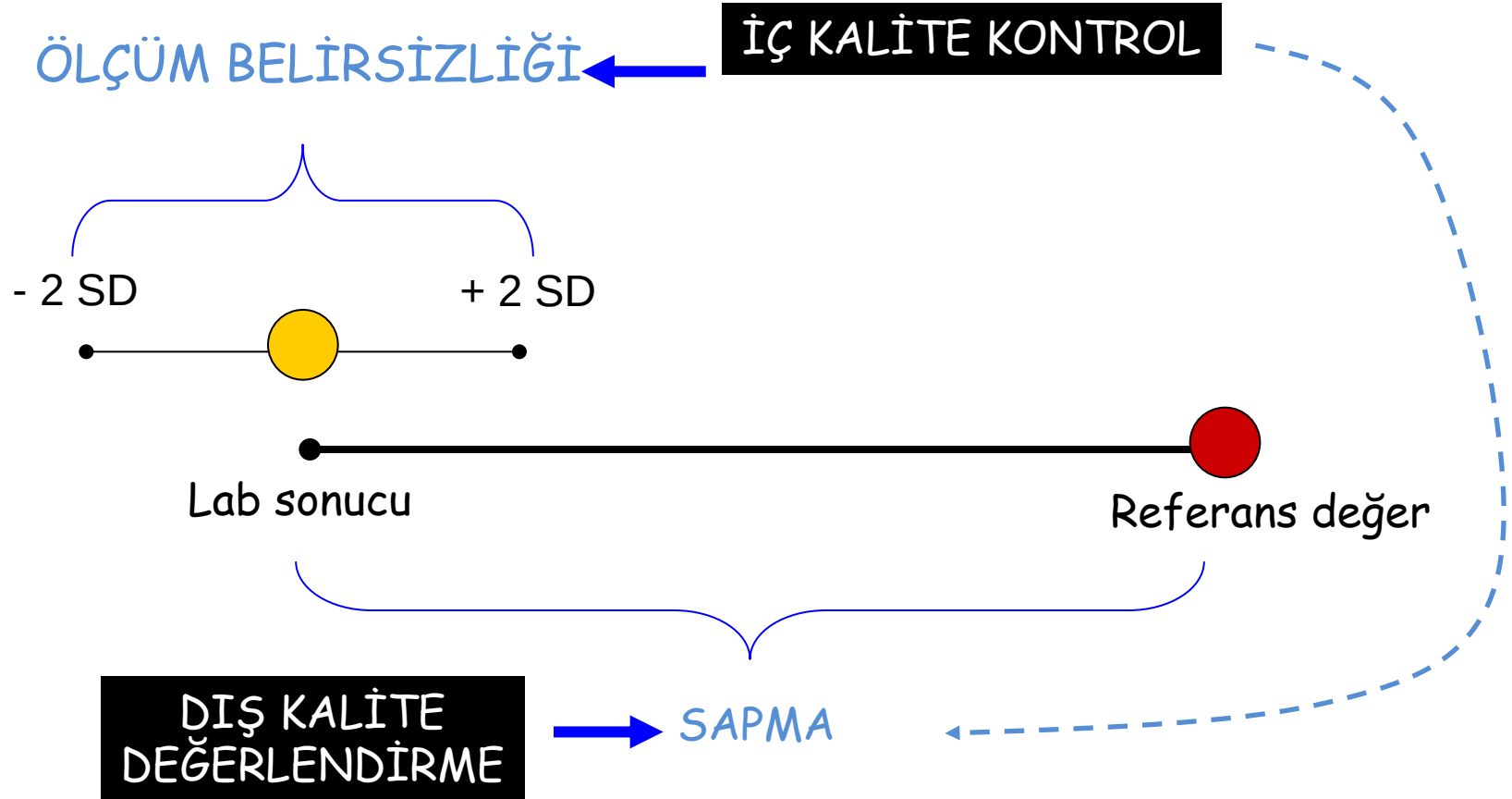
Levey-Jennings Grafiđi

- ✓ Test sonuçlarında her zaman doğal bir varyasyon görülür. Bu varyasyon $\pm$ SD'lar olarak tanımlanır
- ✓ İdeal olarak kontrole ait sonuçlar ± 2 SD içinde kalmalıdır (%95.5 olasılıkla ölçüm doğrudur)

Sonuç %4.5 olasılıkla, şansa ama daha büyük olasılıkla hataya bağlı olarak bu aralığın dışındadır



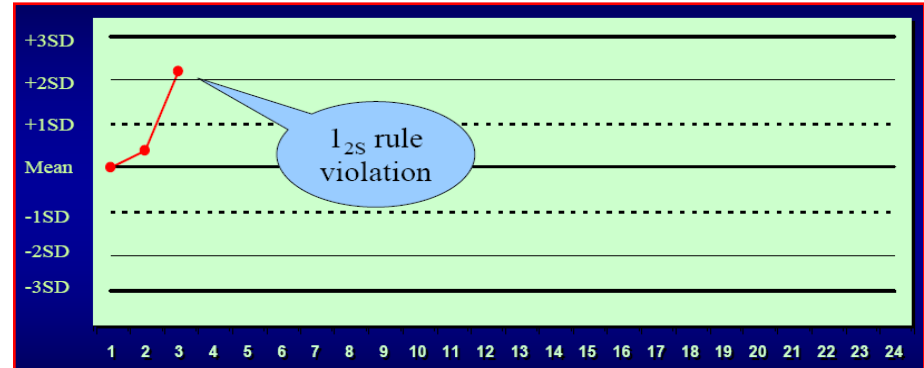
Kalite kontrol çalışmaları



Westgard kuralları - 1 (DİKKAT)

1_{2SD} kuralı

1 kez 2SD dışına çıkmak

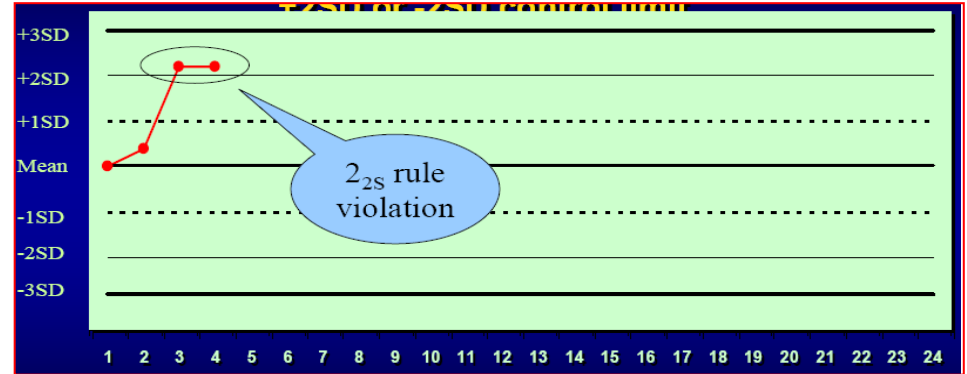


2_{2SD} kuralı

2 kez peş peşe 2SD dışına çıkmak

Aynı yönde

Sistemik hata



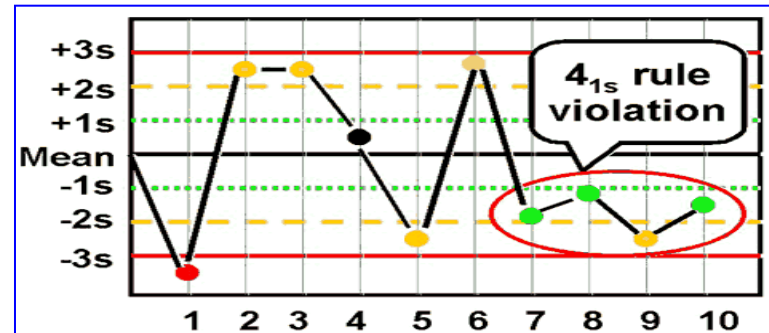
4_{1SD} kuralı

4 kez peş peşe 1SD dışına çıkmak

Aynı yönde

Sistemik hata

Kalibrasyon veya alet kontrolü yap.

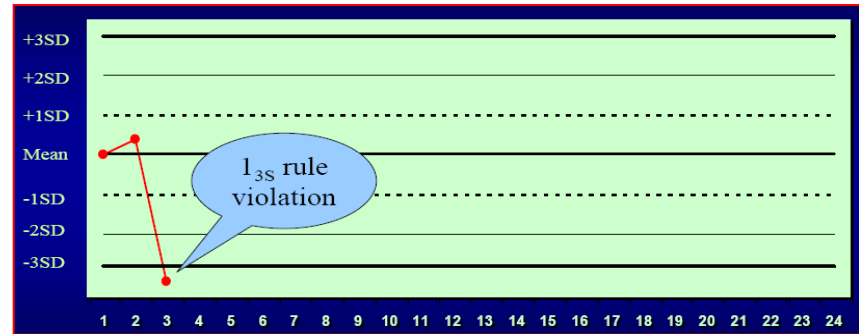


Westgard kuralları - 2 (TEST TEKRARI)

1_{3SD} kuralı

1 kez 3SD dışına çıkmak

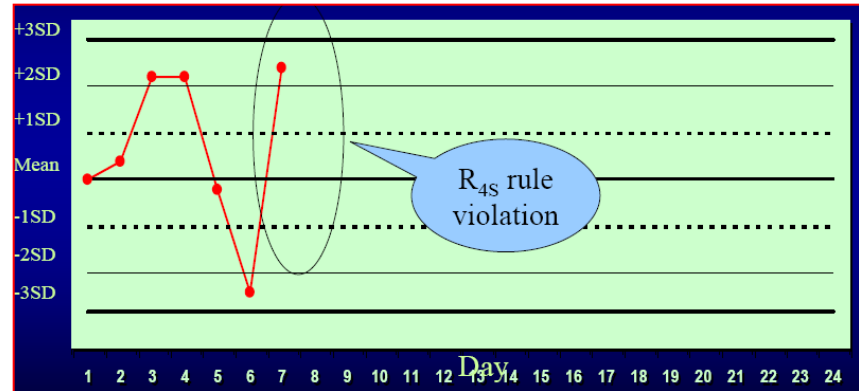
Rastgele hata



R_{4SD} kuralı

İki kontrol arası farkın 4SD'ü aşması

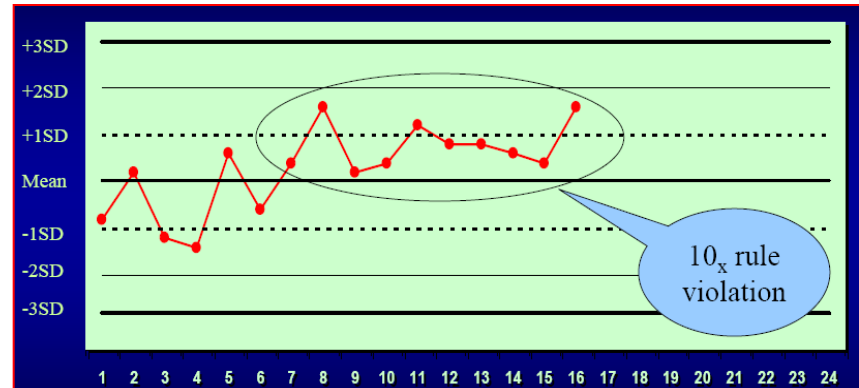
Rastgele hata



10_x kuralı

10 kez ortalamanın dışında ve aynı tarafta olmak

Sistemik hata



Hata nedenleri

Rastgele

- Ölçüm yinelendikçe rastgele ortaya çıkar
- Çok sayıda ölçümün ortalaması alınarak etkisi azaltılabilir



- ✓ Çevresel koşullarda değişiklik
 - ✓ Sıcaklık,
 - ✓ Nem,
 - ✓ Havadaki partikül sayısı
- ✓ Analist hataları

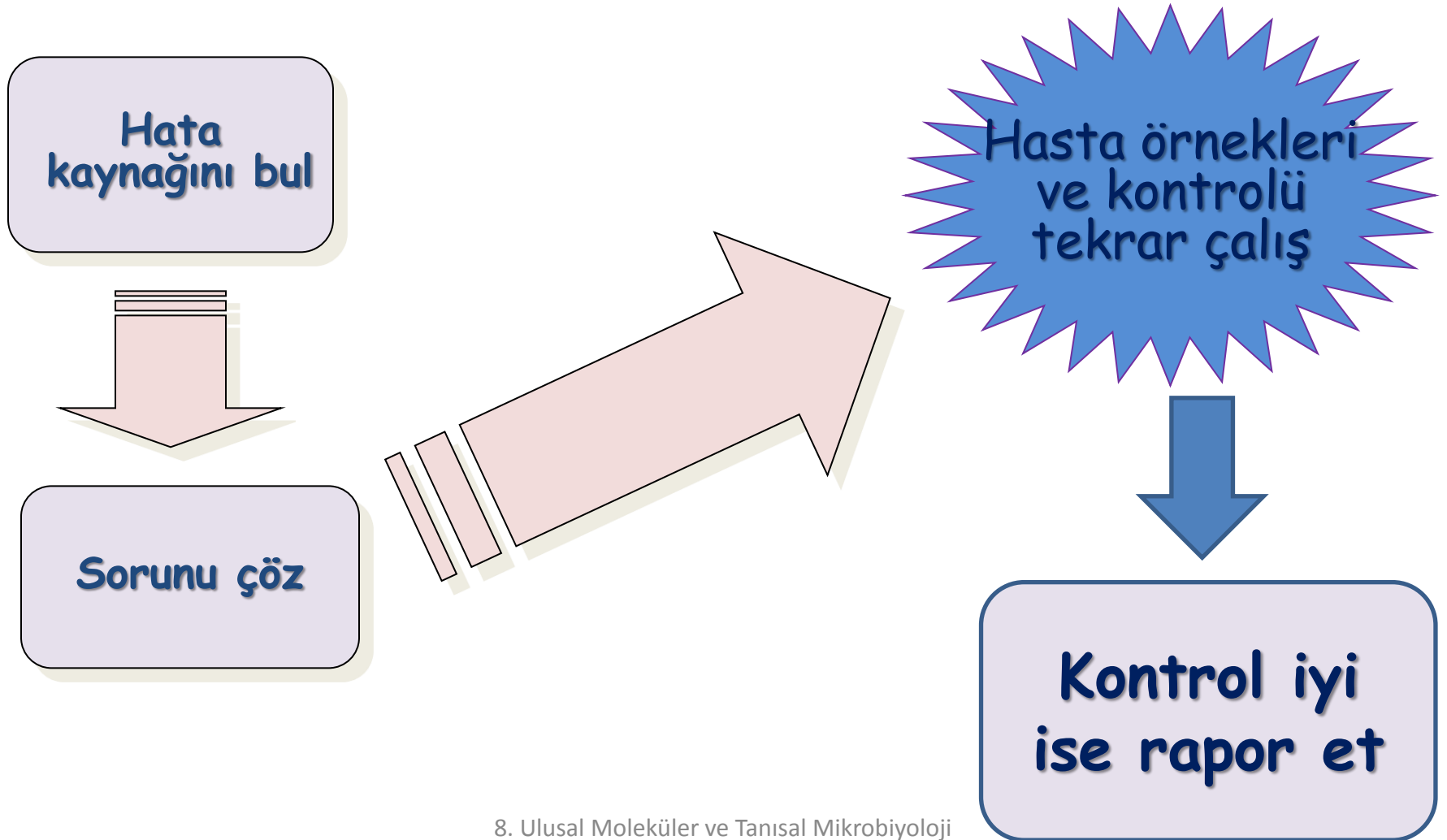
Sistematik

- Tüm ölçümleri etkiler
- Ortalama alınarak düzeltilemez



- ✓ Ölçüm aygıtı
- ✓ Ölçülen madde (stabilite)
- ✓ Kalibrasyon hataları
- ✓ Çalışan hataları
- ✓ Örneklem hataları
- ✓ Oda sıcaklığını bir ısı kaynağına yakın yerden ölçmek

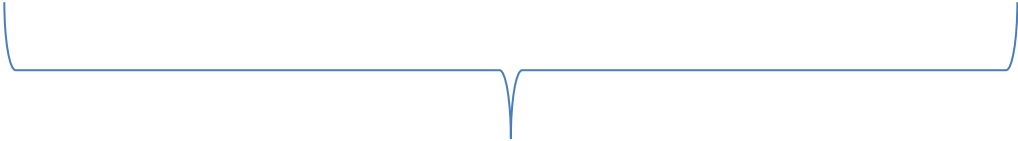
İKK sonucu uygunsuz ise





Kalite kontrol
çalışması yapmak
yeterli mi acaba?

- ✓ Etkin kaynak yönetimi (insan ve malzeme),
- ✓ Yerleşim ve ortam koşullarını düzenleyen yapı,
- ✓ Bilgi yönetim sistemi,
- ✓ Denetim mekanizmaları,
- ✓ Olayları yönetecek ve bu doğrultuda düzeltici, önleyici etkinlikler düzenleyebilecek dinamik bir yapı



Laboratuvar kalite yönetim sistemine gereksinim duyar!..



Anahtar Mesajlar

- ✓ Moleküler testlerde iç kalite kontrol çalışmaları düzenli olarak yapılmalıdır
- ✓ Tüm kalite kontrol çalışmaları yazılı politikalar ve prosedürlere göre uygulanmalıdır
- ✓ Ticari ürünlerde üretici talimatları dikkate alınmalıdır
- ✓ Hata çıktığında yapılacaklar/gözden geçirilecekler önceden belirlenmiş olmalıdır



Anahtar Mesajlar

- ✓ Personel yetkinliği düzenli kontrol edilmelidir
- ✓ Klinik bulgularla korelasyon çalışmaları moleküler testlerde sürekli iyileştirmeye olanak sağlar

Kaynaklar

1. Kessler H, Raggam RB. Quality assurance and quality control in the routine molecular diagnostic laboratory for infectious diseases. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50(7): 1153-9.
2. Huisman W. European medical laboratory accreditation. Present situation and steps to harmonisation. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50(7): 1147-52.
3. Rosenstraus M, Wang Z, Chang SY, Debonville D, Spadaro JP. An Internal Control for Routine Diagnostic PCR: Design, Properties, and Effect on Clinical Performance. *J Clin Microbiol* 1998; 36(1): 191-7.
4. Madej RM, Davis J, Holden MJ, Kwang S, Labourier E, Schneider GJ. International standards and reference materials for quantitative molecular infectious disease testing. *J Mol Diagn* 2010; 12: 133-43.
5. Payne DA, Mamotte CD, Gancberg D, Pazzagli M, van Schaik RH, Schimmel H, et al., on behalf of the IFCC Committee for Molecular Diagnostics (C-MD). Nucleic acid reference materials (NARMs): definitions and issues. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48: 1531-5.
6. ISO 15189: 2007. Medical laboratories-Particular requirements for quality and competence. International Organization for Standardization, Geneva.
7. Clark RB, Lewinski MA, Loeffelholz MJ, Tibbetts RJ. Cumitech 31A: Verification and validation of procedures in the clinical microbiology laboratory. SE Sharp Coordinating ed. 2009; ASM Press Washington DC.
8. Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA): CLIA-related publications from the Federal Register & Code of Federal Regulations. <http://wwwn.cdc.gov/clia/chronol.aspx>
9. Dubois DB, Brown JT. Laboratory Controls and Standards. In: Molecular microbiology: diagnostic principles and practice. Persing DH, Tenover FC, Versalovic J et al. (eds.), 1 st ed. Washington DC: ASM Press; 2004.
10. WHO. Laboratory assesment tool. 2012; WHO/HSE/GCR/LYO/2012.

Teşekkürler...

