# Контроль якості в ПЛР-лабораторії

Чернишова Лора,
Лабораторний офіцер
Бюро ВОЗ в Україні

World Health Organization
REGIONAL OFFICE FOR Europe

# Условия получения качественных результатов анализа

# Условия получения качественных результатов анализа

# «Белые пятна» КК в ПЦР-лабораториях

- Документы, регламентирующие КК внутри ПЦР-лаборатории: содержат неполную информацию либо не понимаются (и не применяются) на уровне рядового лаборанта;
- Не налажен четкий алгоритм расследования и исправления внештатных ситуаций (включая когда формально результаты валидны, но качество исследований снижается, что в перспективе может привести к лабораторным ошибкам). Зацикленность на спорах об определении терминов «валидация» и «верификация» при неумении применить общие знания о КК к процессам в ПЦР-лаборатории.
- Недостаточность ресурсов для проведения КК: персонала, ответственного за КК, бюджета и времени.

# Валидация метода

Целью валидации методов клинических лабораторных исследований является:
1) установление пригодности метода для проведения исследований;
2) установление пригодности альтернативных методов, которые можно использовать в качестве официального контроля.

Задача валидации – определение пригодности метода и его точности при использовании в конкретной организации

# Валидация метода

Валидации подлежат:

- используемые методы исследований;
- ранее валидированные методы исследований при внесении изменений в методику, изменении производственных условий, замене оборудования, реактивов, расходных материалов и др.
- новые методы исследований;
- методы исследований используемые в качестве подтверждающих тестов.

Валидация проводится с использование оборудования имеющего регистрационные удостоверения. На средства измерения должны быть документы подтверждающие прохождение поверки.

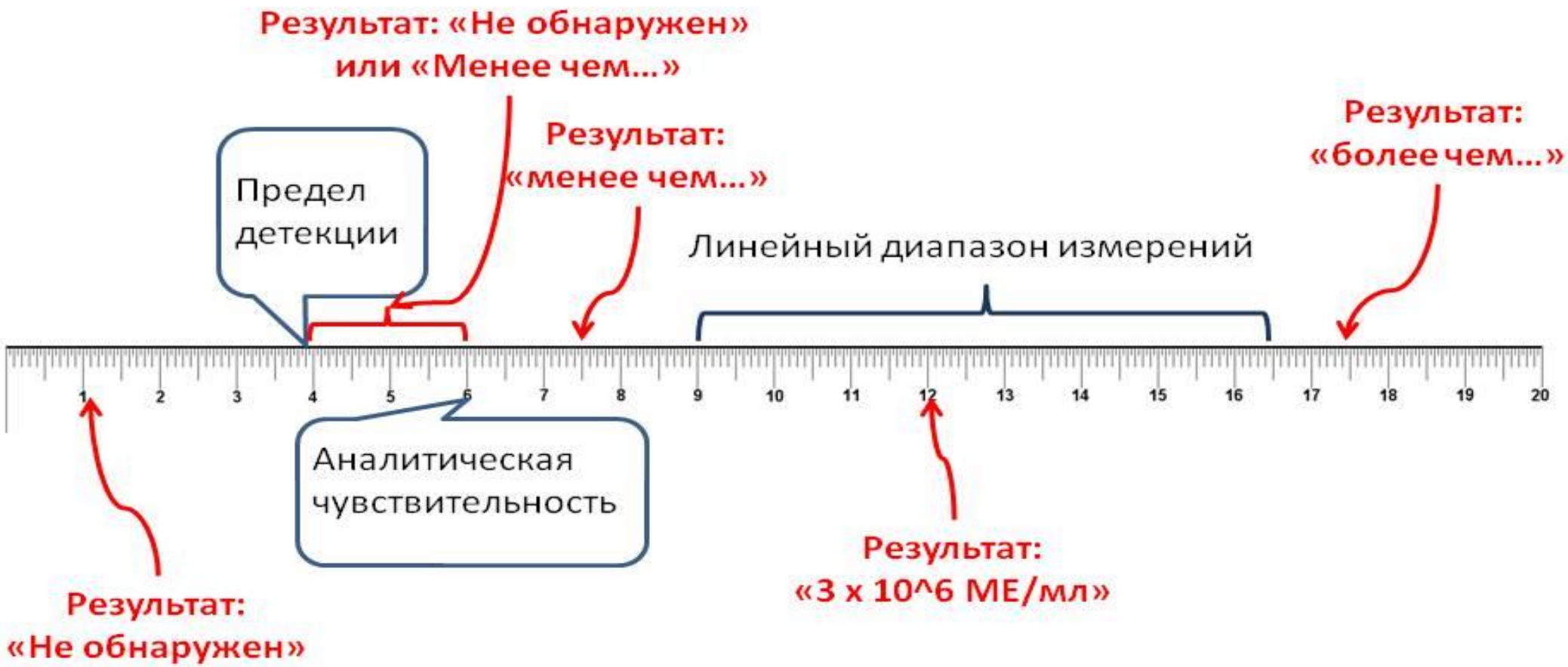
# Валидация метода

При валидации методов определяются параметры:
- характеристики (свойства) метода:
1) специфичность;
2) линейность;
3) предел обнаружения и предел количественного определения;
4) диапазон определяемых величин;
5) чувствительность
- показатели точности метода:
1) правильность;
2) прецизионность (повторяемость и воспроизводимость).

Выбор параметров валидации зависит от области применения и назначения метода.

# Аналитические характеристики

- *Аналитическая чувствительность / предел обнаружения (limit of detection)*
- *Аналитическая специфичность*
- *Линейный диапазон*
- *Воспроизводимость и повторяемость (прецизионность)*


Результат: «Не обнаружен» или «Менее чем…»
Результат: «менее чем…»
Результат: «более чем…»
Предел детекции
Линейный диапазон измерений
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
Аналитическая чувствительность
Результат: «3 x 10^6 МЕ/мл»
Результат: «Не обнаружен»

# Аналитические характеристики

- **Аналитическая чувствительность** или **предел обнаружения** – минимальное количество молекул ДНК/РНК, которое в состоянии выявить метод. Чаще используется концентрация аналита, которая выявляется с 95% вероятностью.
- **Аналитическая специфичность** – на сколько другие молекулы ДНК и РНК оказывают вклад в результат (ложный «+» или ошибка концентрации). Обычно характеризуется перечнем геномов, для которых метод доказано не дает перекрестных реакций и для которых такие реакции возможны.

# Аналитические характеристики количественных тестов

- **Линейный диапазон** – интервал значений концентрации, в котором данным измерения системы можно доверять

- **Прецизионность (воспроизводимость и повторяемость)** – величина, показывающая насколько второй результат исследования может отличаться от первого или диапазон значений, в которые попадает основная масса проведенных измерений данной точки. Обычно описывается стандартным отклонением или коэффициентом вариации (CV)

# Диагностические характеристики

- *Диагностическая чувствительность*
- *Диагностическая специфичность*
- *Положительная предиктивность (PPV)*
- *Отрицательная предиктивность (NPV)*

# Диагностические характеристики

- **Диагностическая чувствительность** – доля выявленных тестом лиц среди лиц с заболеванием*

  *Вероятность того, что больной будет квалифицирован как больной*

- **Положительная предиктивность** (PPV, positive predictive value, прогностическая ценность положительного результата) – доля лиц с заболеванием* среди выявленных тестом лиц

  *Вероятность заболевания у человека с положительным результатом теста*

** - наличие заболевания определяется методом «золотого стандарта» или «расширенного золотого стандарта»*

# Диагностические характеристики

- **Диагностическая специфичность** – доля лиц, для которых тест дал отрицательный результат среди лиц без заболевания*.

  *Вероятность того, что здоровый будет квалифицирован как здоровый*

- **Отрицательная предиктивность** (NPV – negative predictive value, прогностическая ценность отрицательного результата) - доля лиц без заболевания* среди лиц, для которых тест дал отрицательный результат

  *Вероятность отсутствия заболевания у человека с отрицательным результатом теста*

  * - *наличие заболевания определяется методом «золотого стандарта» или «расширенного золотого стандарта»*

# Соотношение диагностических характеристик

| | | Заболевание/состояние (определенное «Золотым стандартом") | | |
|---|---|---|---|---|
| | | ***Gold-POS*** | ***Gold-NEG*** | |
| **Рез-т теста** | ***Test POS*** | **Истинно-положительные (True-POS)** | **Ложно-положительные** (Ошибка типа1) | → **Положительная предиктивность (PPV)** = True-POS / Test-POS |
| | ***Test NEG*** | **Ложно-отрицательные** (Ошибка типа 2) | **Истинно-отрицательные (True-NEG)** | → **Отрицательная предиктивность (NPV)** = True-NEG / Test-NEG |
| | | ↓ **Диагностическая чувствительность** = True-POS / Gold-POS | ↓ **Диагностическая специфичность** = True-NEG / Gold-NEG | **Точность теста** (True-POS + True-NEG) / (Test-POS + Test-NEG) |

Задание 1. Определить диагностическую чувствительность \ диагностическу специфичность теста

| Тип образцов | Результаты применения набора реагентов «АмплиПрайм® Флороценоз-Кандиды» | | Результаты применения референтного метода | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | *C.albicans* | | *C.glabrata* | | *C.krusei* | | *C.parapsilosis*, *C.tropicalis* | |
| | | | положи-тельных | отрица-тельных | положи-тельных | отрица-тельных | положи-тельных | отрица-тельных | положи-тельных | отрица-тельных |
| Отделяемое слизистой оболочки влагалища | Всего исследовано 1000 образцов | положи-тельных | 480 | 5 | 180 | 0 | 101 | 0 | 103 | 45 |
| | | отрица-тельных | 14 | 520 | 8 | 820 | 0 | 899 | 0 | 897 |

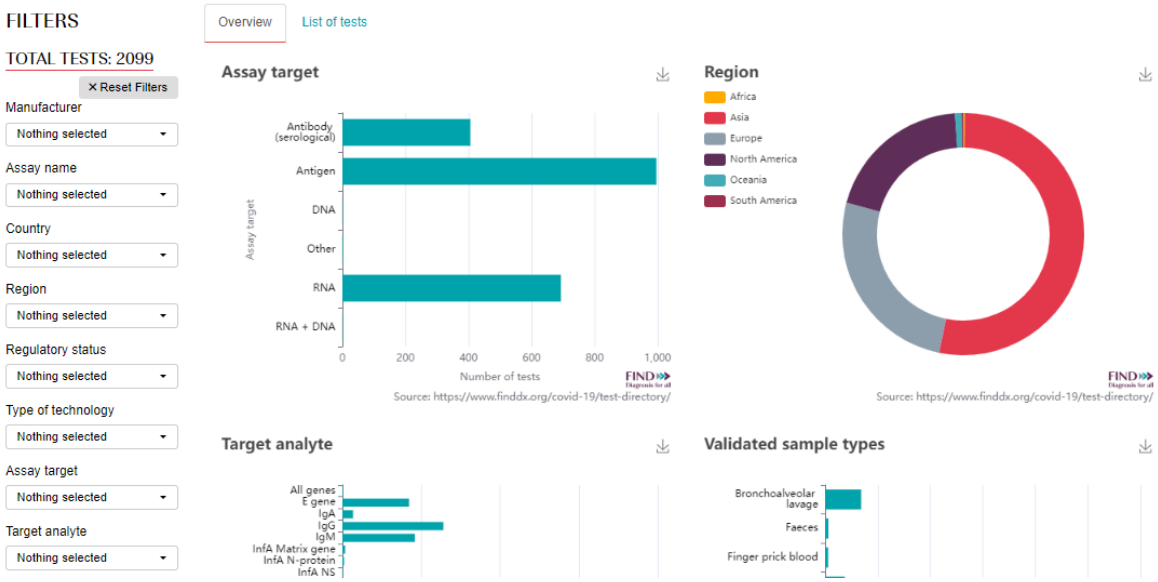
# Задание: предложите протокол валидации для станции экстракции KingFisher + наборы реагентов для экстракции Macherey Nagel

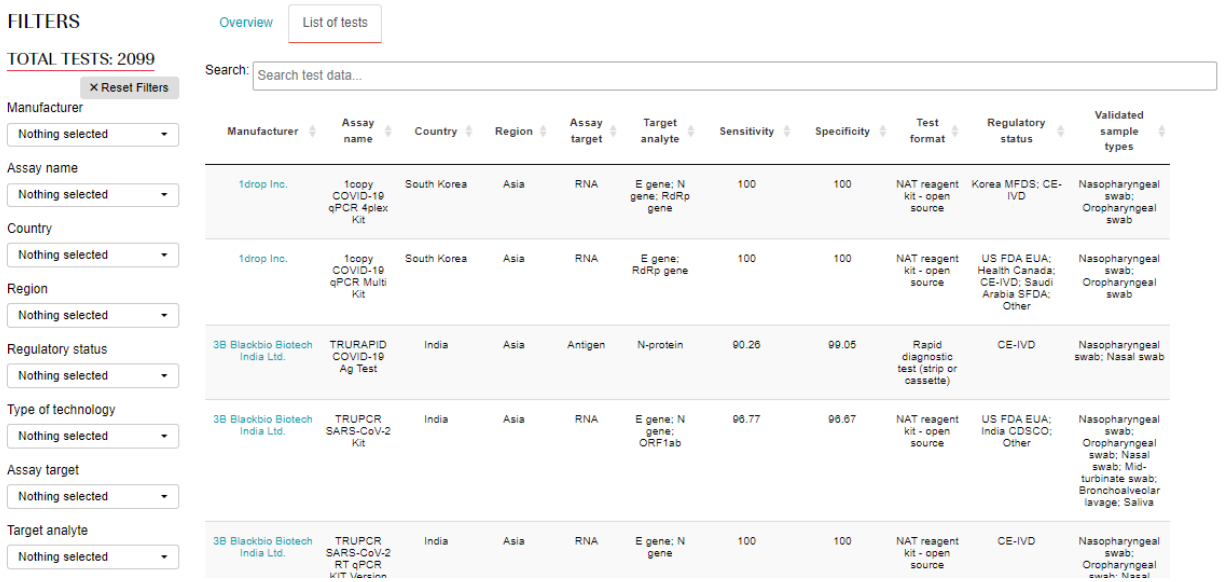
- Выбор референсной системы
- Образцы, биоматериал
- Методика валидации
- Параметры и критерии оценки
- Выводы: приемлемо\неприемлемо.

# Валидированная методология

- **Четкие правила для всех этапов работы**
  *Работа с «тонкими» местами анализа*
- **«Хорошие» тест-системы (реагенты)**
  *Соответствие а) международным стандартам б) диагностическим задачам лаборатории*
- **Диагностическое оборудование**
  *Соответствует используемым реагентам*
- **Документирование правил работы**
  *Стандартные операционные процедуры (больше, чем инструкции / руководства к приборам и тест-системам)*

- https://www.finddx.org/tools-and-resources/dxconnect/test-directories/covid-19-test-directory/




| Manufacturer | Assay name | Country | Region | Assay target | Target analyte | Sensitivity | Specificity | Test format | Regulatory status | Validated sample types |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1drop Inc. | 1copy COVID-19 qPCR 4plex Kit | South Korea | Asia | RNA | E gene; N gene; RdRp gene | 100 | 100 | NAT reagent kit - open source | Korea MFDS; CE-IVD | Nasopharyngeal swab; Oropharyngeal swab |
| 1drop Inc. | 1copy COVID-19 qPCR Multi Kit | South Korea | Asia | RNA | E gene; RdRp gene | 100 | 100 | NAT reagent kit - open source | US FDA EUA; Health Canada; CE-IVD; Saudi Arabia SFDA; Other | Nasopharyngeal swab; Oropharyngeal swab |
| 3B Blackbio Biotech India Ltd. | TRURAPID COVID-19 Ag Test | India | Asia | Antigen | N-protein | 90.26 | 99.05 | Rapid diagnostic test (strip or cassette) | CE-IVD | Nasopharyngeal swab; Nasal swab |
| 3B Blackbio Biotech India Ltd. | TRUPCR SARS-CoV-2 Kit | India | Asia | RNA | E gene; N gene; ORF1ab | 96.77 | 96.67 | NAT reagent kit - open source | US FDA EUA; India CDSCO; Other | Nasopharyngeal swab; Oropharyngeal swab; Nasal swab; Mid-turbinate swab; Bronchoalveolar lavage; Saliva |
| 3B Blackbio Biotech India Ltd. | TRUPCR SARS-CoV-2 RT qPCR KIT Version | India | Asia | RNA | E gene; N gene | 100 | 100 | NAT reagent kit - open source | CE-IVD | Nasopharyngeal swab; Oropharyngeal swab; Nasal |

# Тонкие места анализа: тест-системы *Со стороны потребителя (лаборатории):*

- *Следование инструкции к тест-системе (см. протоколы «недогрев\перегрев»!)*
- *Соблюдение условий транспортирования и хранения*
- *Соблюдение сроков годности реагентов*
- *Предотвращение комбинирования реагентов различных серий или замены реагентов*

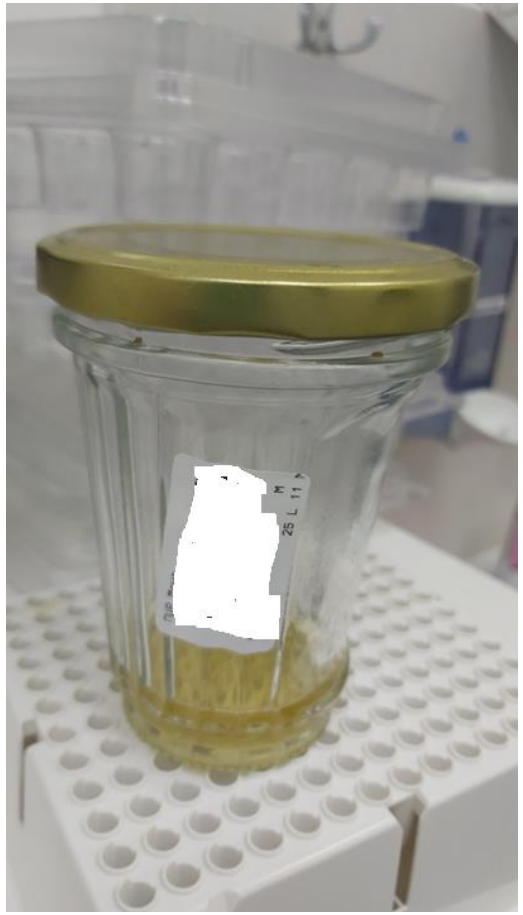
*налаживание входного контроля и учета реагентов и пластика, система электронного документирования*

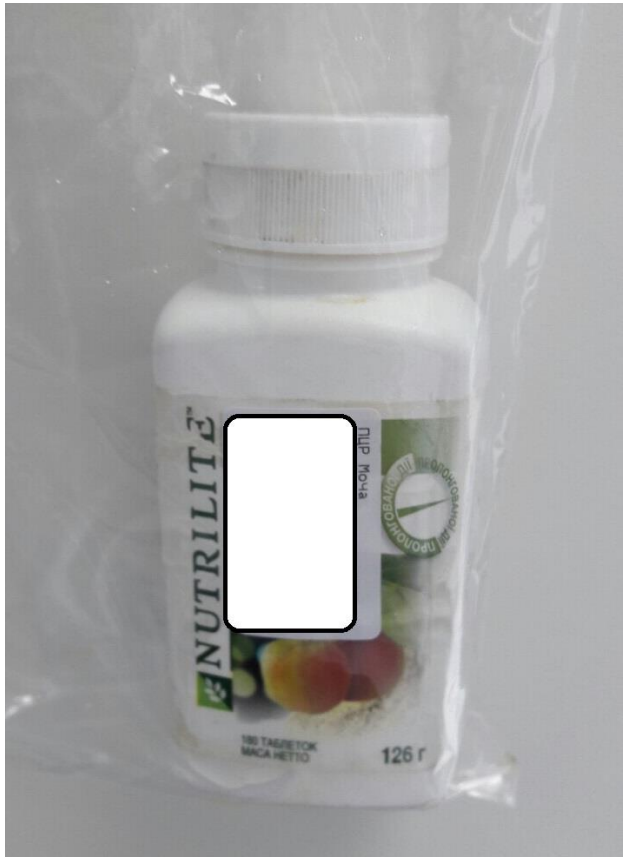
# Ошибки преаналитического этапа

- Взятие биоматериала
- Транспортировка
- Хранение

| Объект КК | Ошибка | Влияние на результаты | Способы контроля |
|---|---|---|---|
| **Преаналитический этап** | | | |
| **Взятия биоматериала** | Материал набран в несоответствующую пробирку | Ингибирование ПЦР, невалидные результаты | СОП «Критерии отказа лаборатории от биоматериала». Перезабор |
| | Разлитие образца | Контаминация образца | СОП «Критерии отказа лаборатории от биоматериала». Перезабор |
| | Примеси в образце: слизь, гной, кровь, остатки пищи в соскобах; гемолиз, хилёз, билирубин в плазме; сгустки в сыворотке и т.д. | Ингибирование ПЦР, невалидные результаты | СОП «Критерии отказа лаборатории от биоматериала». Перезабор. Удаление ингибиторов. |
| | Нарушение методики забора биоматериала | Недостаточное количество клеток человека в образце, ЛОР; гемолиз, невалидные результаты | Обучение персонала методикам взятия биоматериала. Перезабор. Использование эндогенного ВКО. |
| | Неверная локализация \ сроки взятия биоматериала | ЛОР. Сложность интерпретации результатов клиницистом | Взаимодействие лаборатории и клиницистов. |

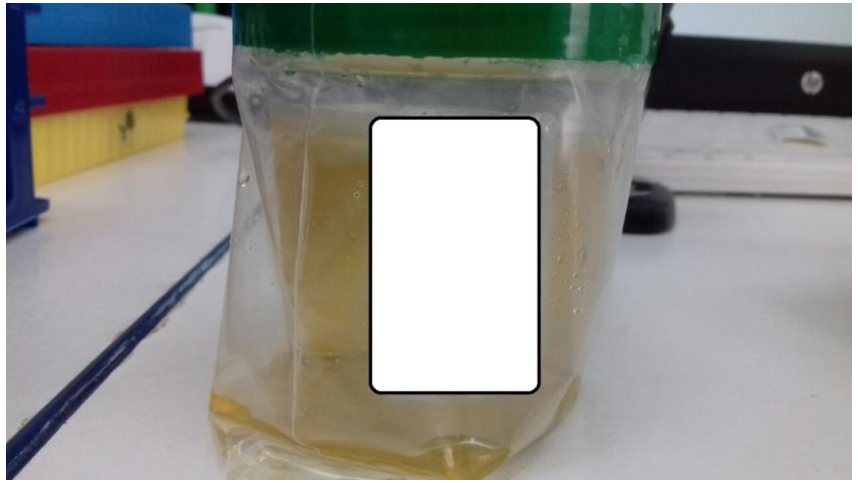
# Несоответствие тары

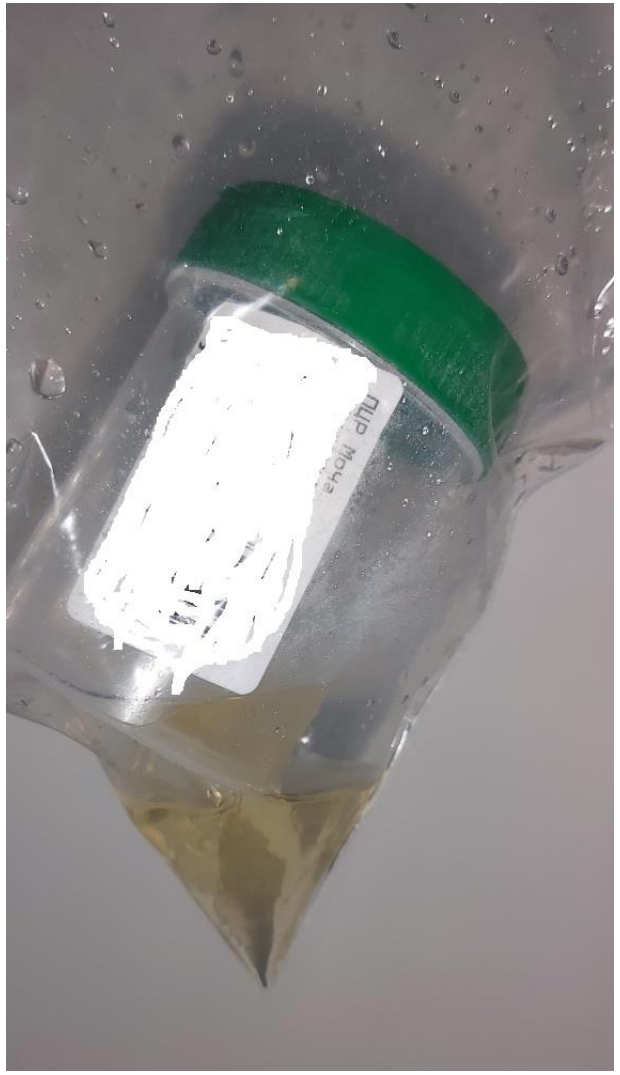




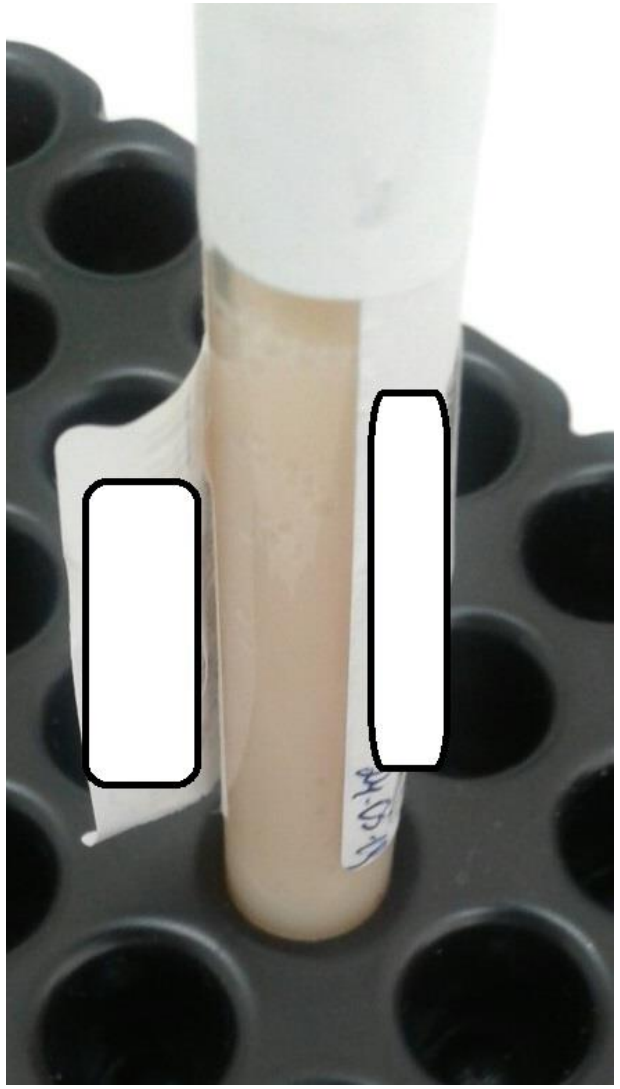
# Некорректный биоматериал. Ручка зонда не внутри пробирки

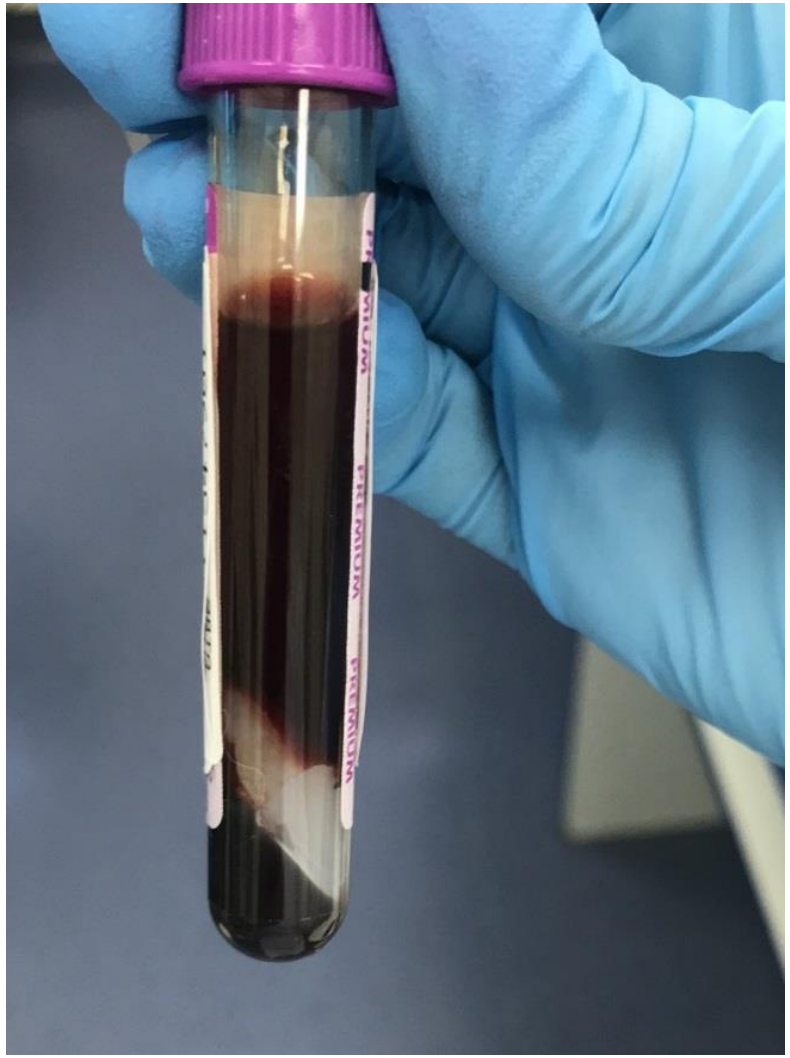
# Разлитие образца





# Примеси в образце





# Ингибиторы ПЦР

## Лабильные

Эффект ингибирования нейтрализуется нагреванием, замораживанием-размораживанием, хранением при +4С

## Стабильные

Эффект ингибирования нейтрализуется разведением образцов или удалением ингибиторов

# Описанные ингибиторы ОТ и ПЦР

Wilson IG., 1997., AEM., vol.63., p.3741

- Гемоглобин
- Гепарин
- Иммуноглобулины
- Биллирубин и желчные кислоты
- Слизь (мукополисахариды)
- Высокомолекулярная геномная ДНК
- Гормоны
- Ферменты
- Ионы металлов ($Ca^{2+}$, $Fe^{3+}$)
- Соли
- Продукты жизнедеятельности микрофлоры

| Объект КК | Ошибка | Влияние на результаты | Способы контроля |
|---|---|---|---|
| **Преаналитический этап** | | | |
| **Транспортировка и хранение образца** | Транспортная среда содержит лизирующий буфер | Возможно разрушение РНК возбудителя во время транспортировки, ЛОР | Валидация транспортной среды |
| | Несоблюдение условий транспортировки и хранения. Многократная заморозка\разморозка образцов | ЛОР | Обучение персонала. Использование эндогенного ВКО. Налаживание логистики биоматериала. Использование термоконтейнеров с логгерами. Использование вакуумных систем с гелем |
| **Предобработка биоматериала** | Моча не «осаждается» перед этапом экстракции | Недостаточное количество эпителиальных клеток в материале. Невалидные результаты. ЛОР | Использование эндогенного ВКО. Использование вакуумных систем для сбора мочи. |
| **Маркировка, регистрация образцов** | Ошибки из-за «человеческого фактора» | Выдача некорректных результатов | Штрихкодирование образцов \ плашек на всех этапах анализа |

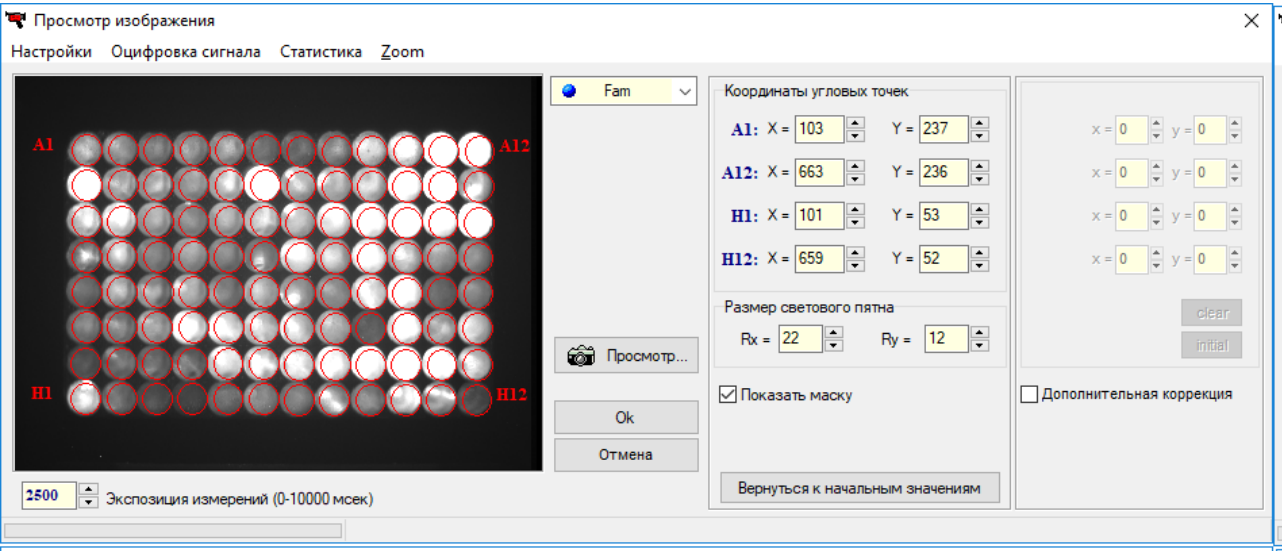
VACUETTE
VACUETTE

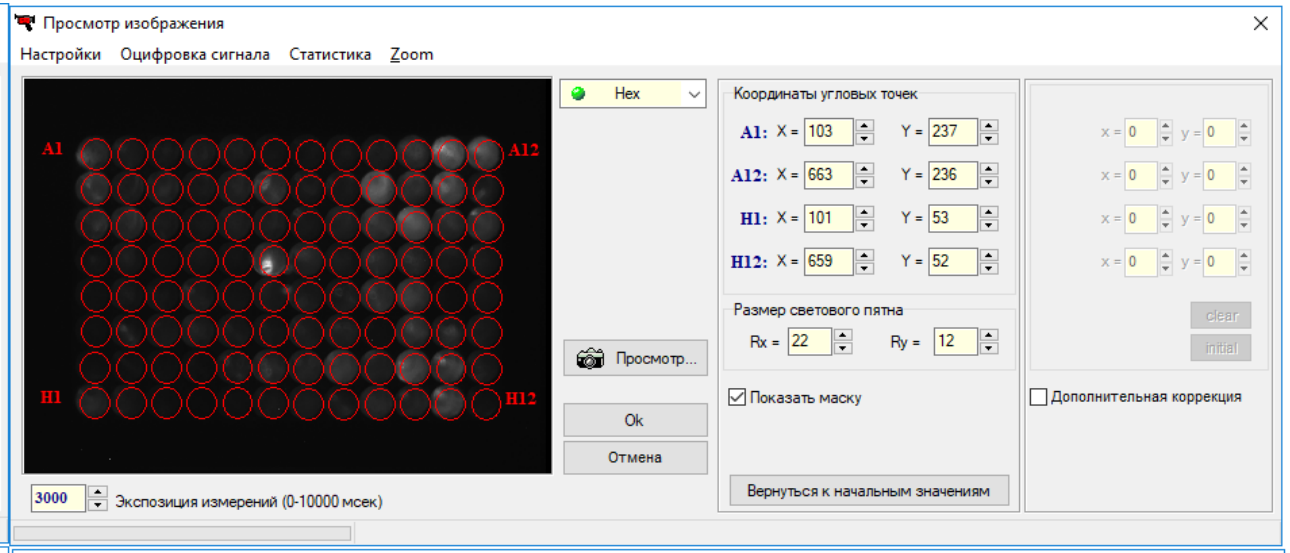
# Ошибки аналитического этапа

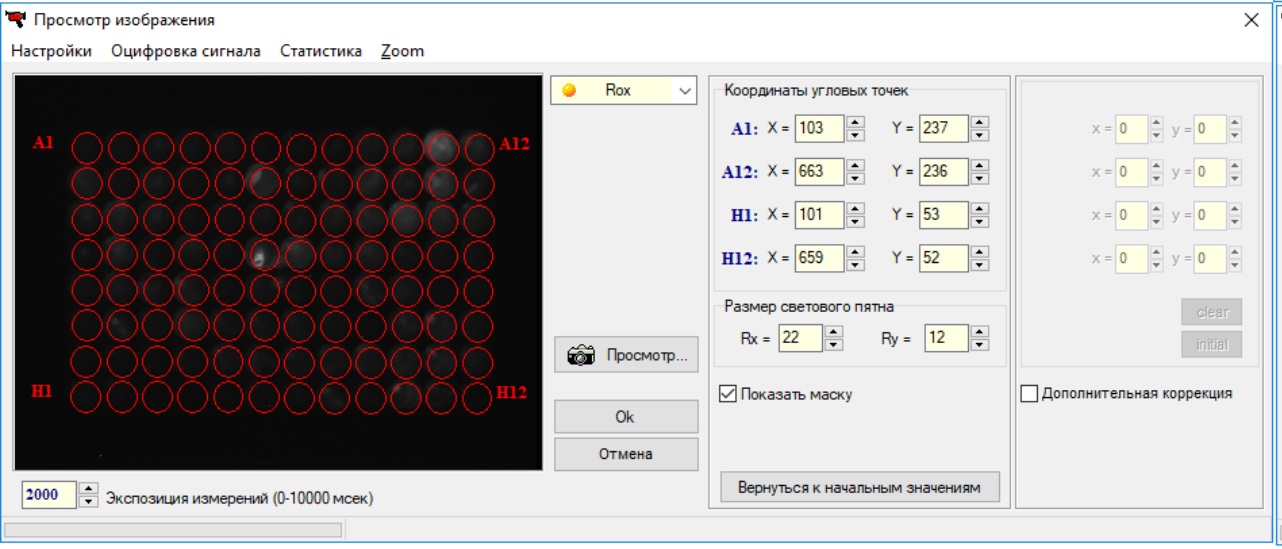
- Оборудование
- Реагенты
- Расходные материалы
- Программное обеспечение
- Лабораторный персонал

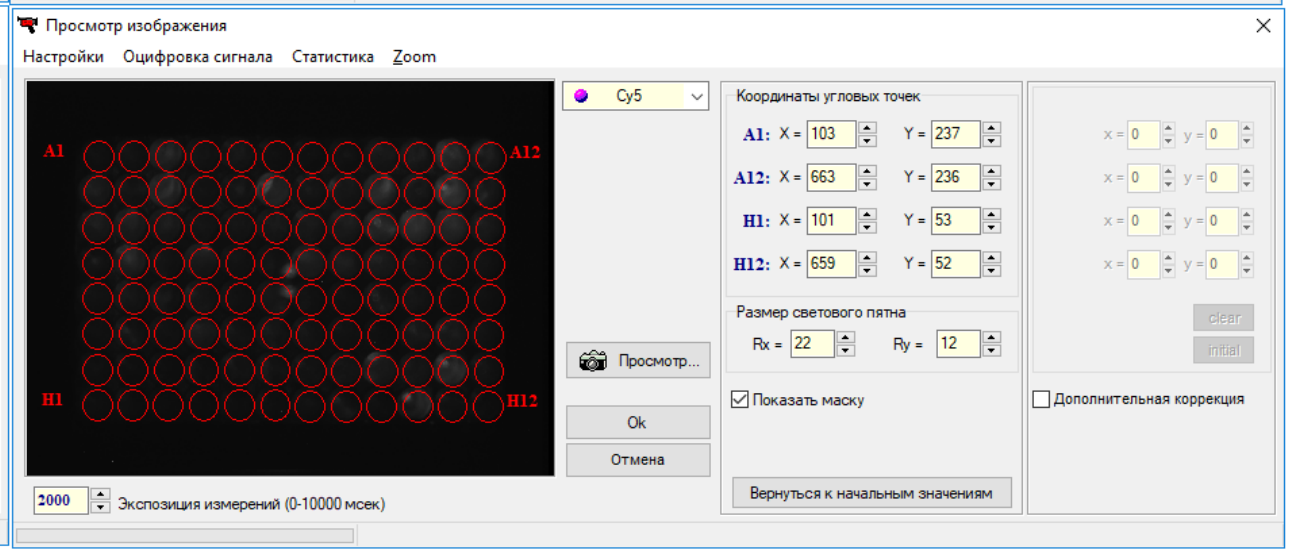
| Объект КК | Ошибка | Влияние на результаты | Способы контроля |
|---|---|---|---|
| **Аналитический этап** | | | |
| **Лабораторное оборудование** | | | |
| **Амплификатор** | Несоответствие температуры термоблока заданной. Причина: поломка нагревательных элементов (Пельтье), термодатчиков. Грязь. | Снижение эффективность ПЦР. Снижение разгорания, сдвиг СТ вправо, невалидные рез-ты. Воспроизводимая ошибка в отдельных лунках, части термоблока или во всей плашке | Включение рандомно расположенных положительных контролей амплификации или заведомо положительных обрацов в постановку. Отслеживание среднего значения СТ ВКО (экзогенного!) одной серии за период времени. Оценка среднего значения СТ ВКО, стандартного отклонения  СТ ВКО в пределах постановки. Оценка стандартного отклонения от заданного значения для контрольных образцов (для количественных тест-систем) |
| | Отсутствие \ несвоевременность калибровки (если требуется) | Разнообразные ошибки в отображении результатов. Невалидные результаты. Засветка по каналам. Ослабление сигнала по каналу, снижение разгорания. | Проведение своевременной периодической калибровки |

# Грязь в лунках амплификатора

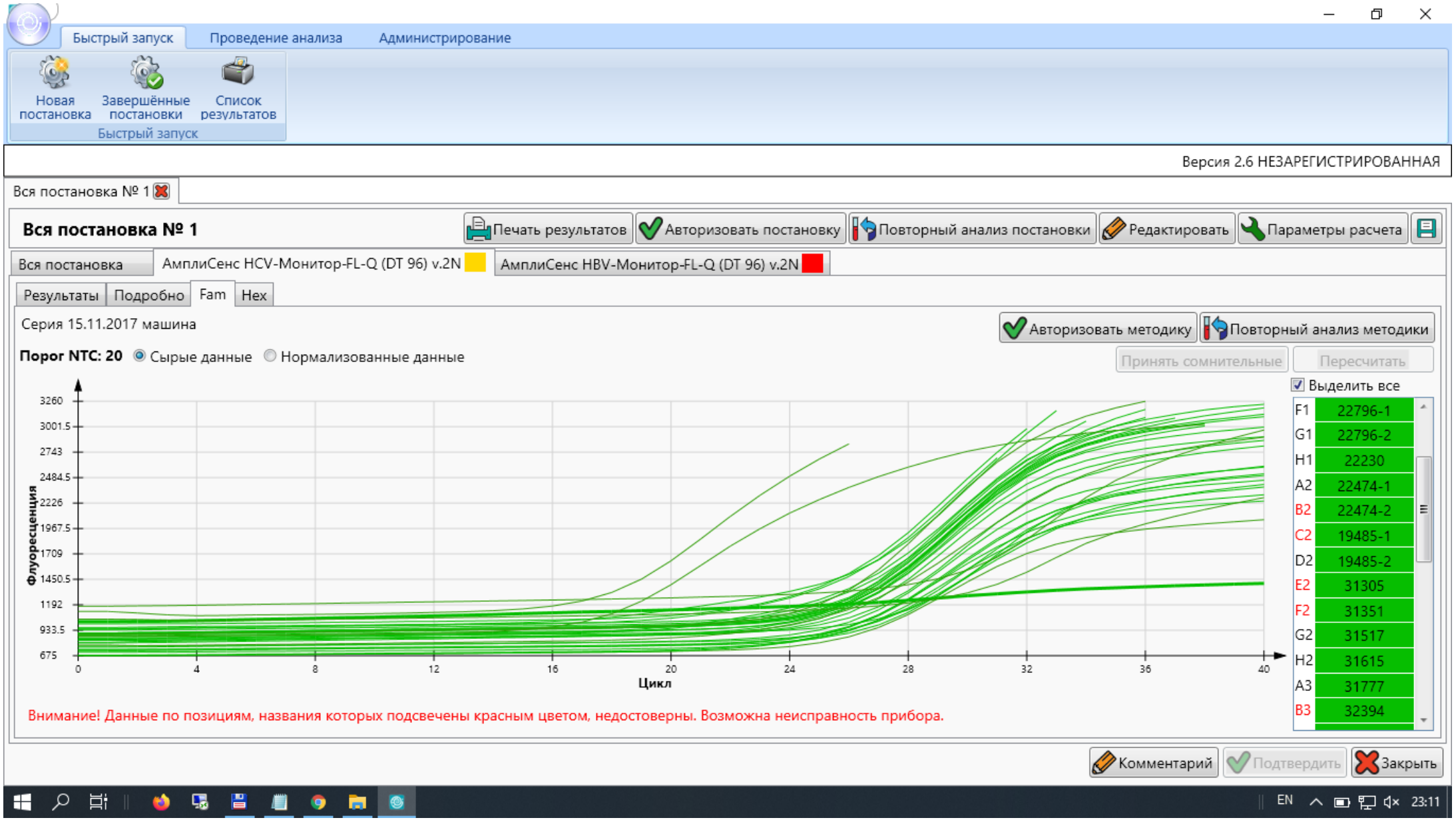


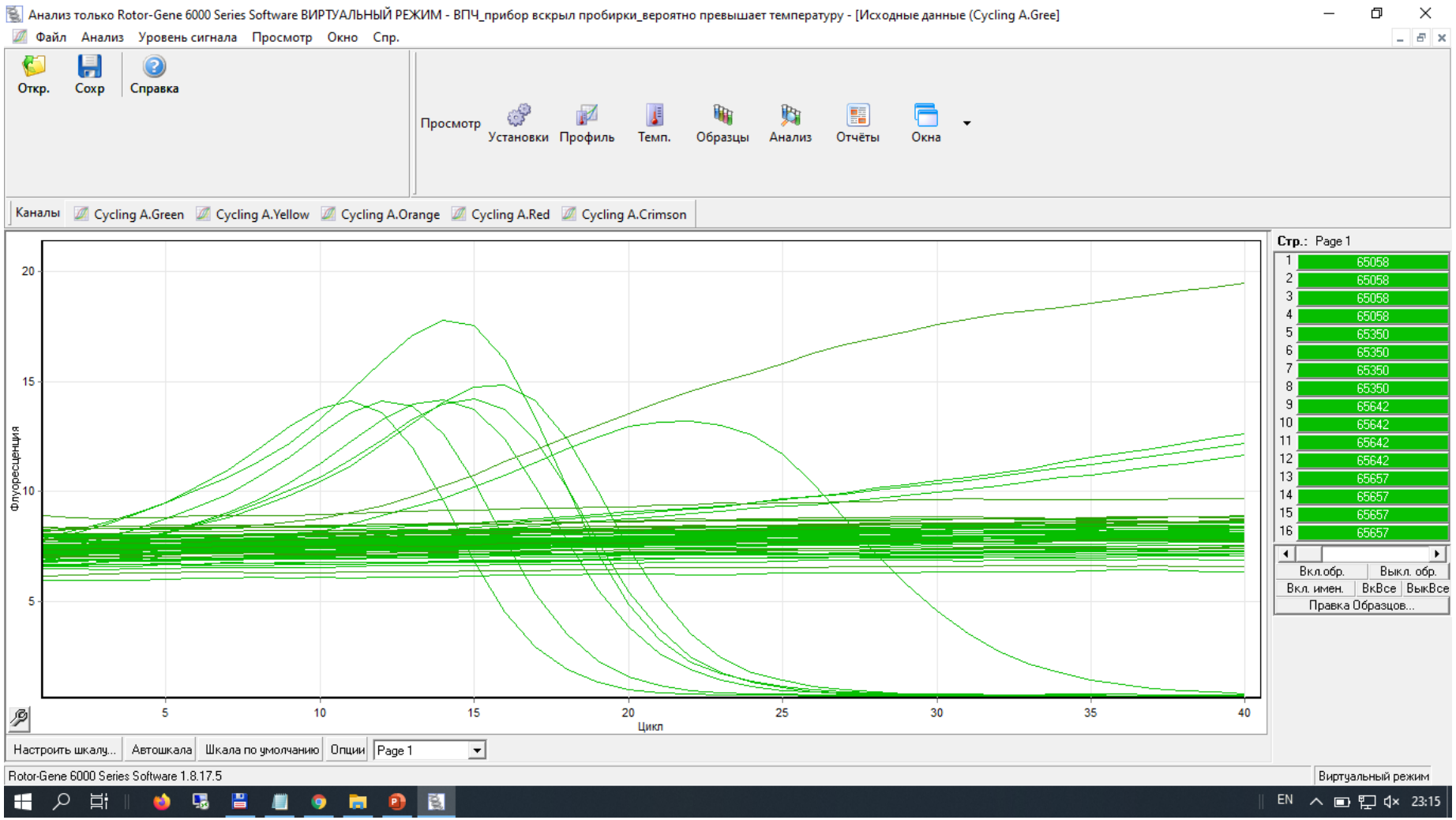



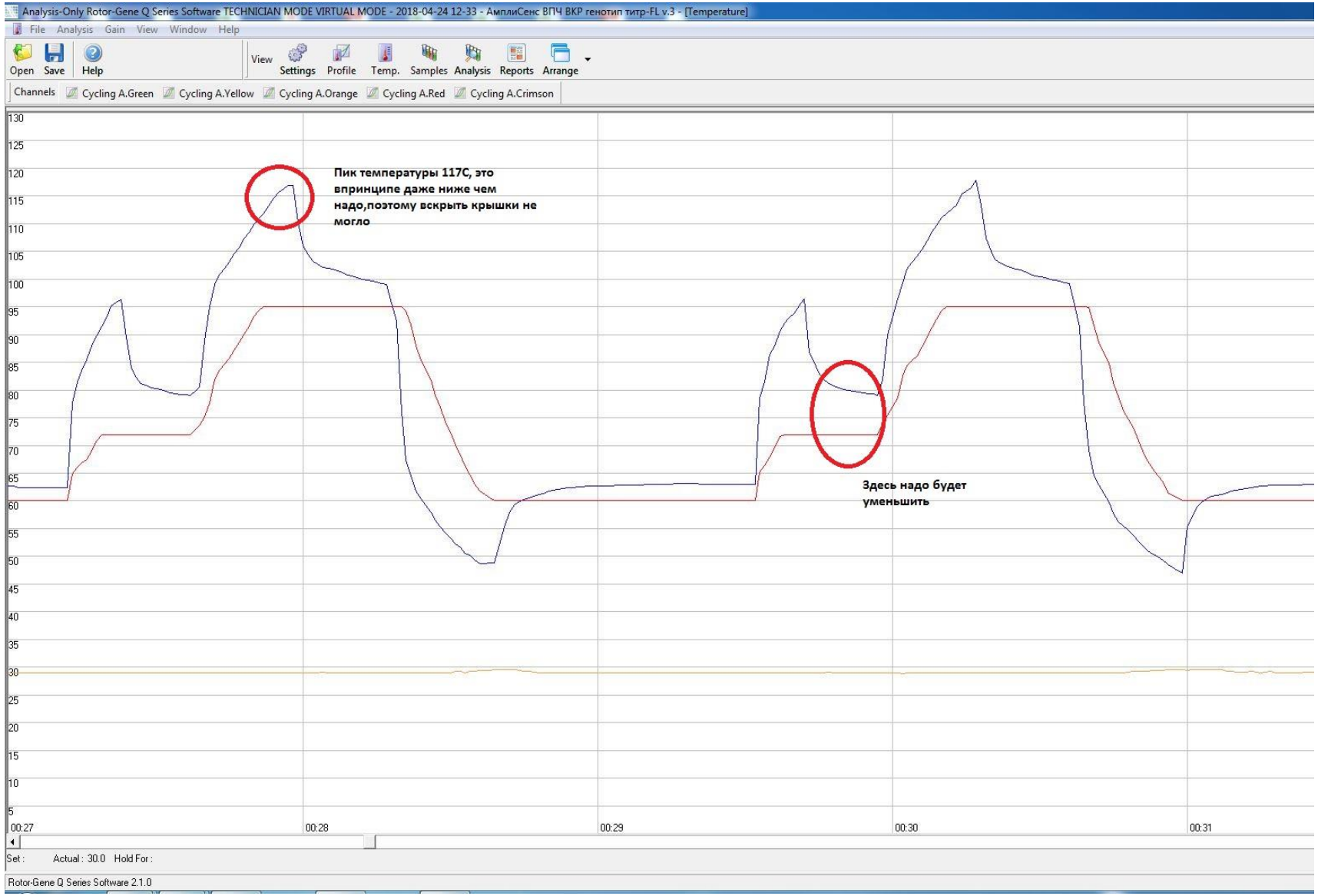
# Грязь в лунках прибора. Покрывной материал - пленка



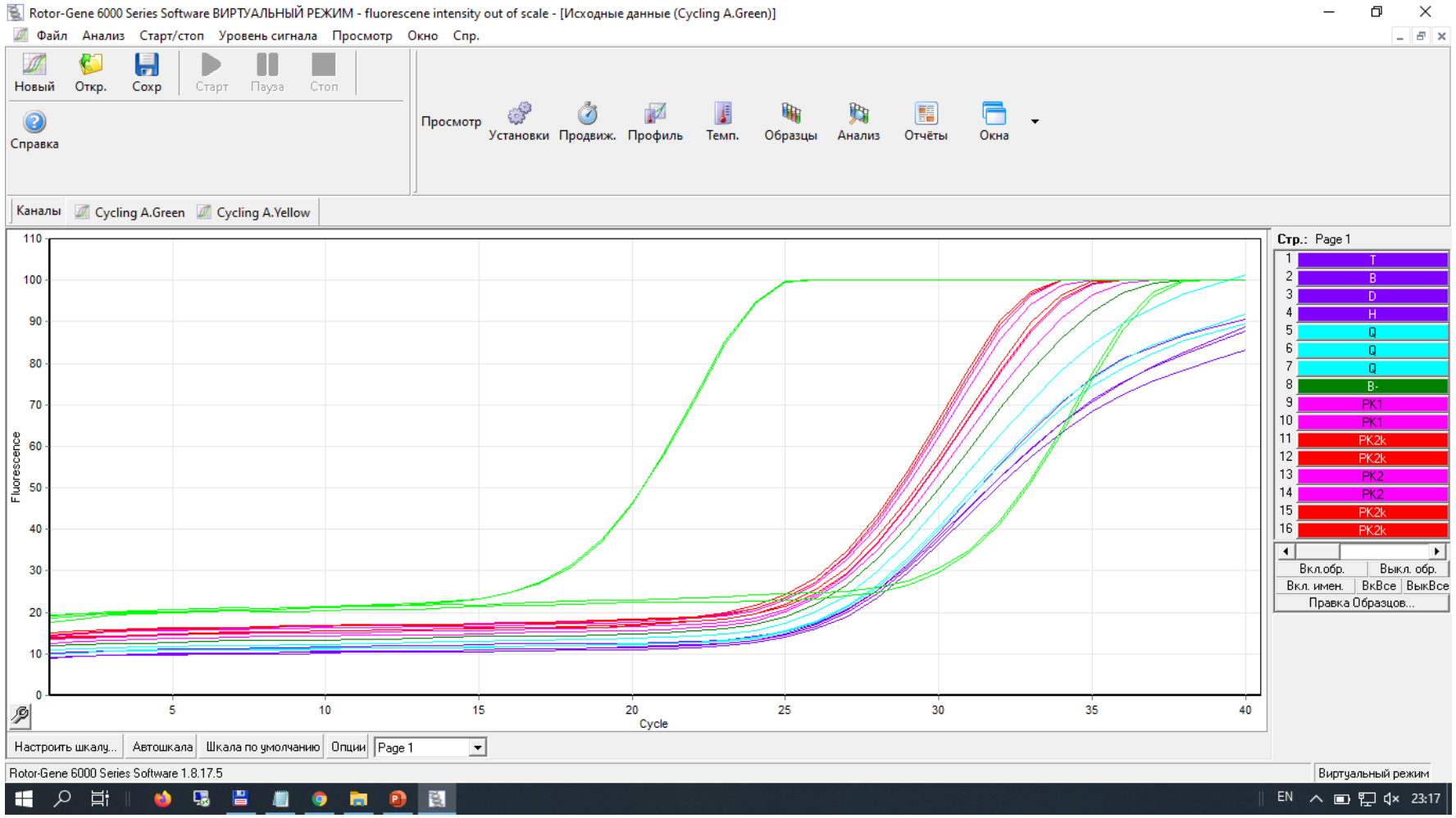
# Перегрев прибора. Вскрылись пробирки.



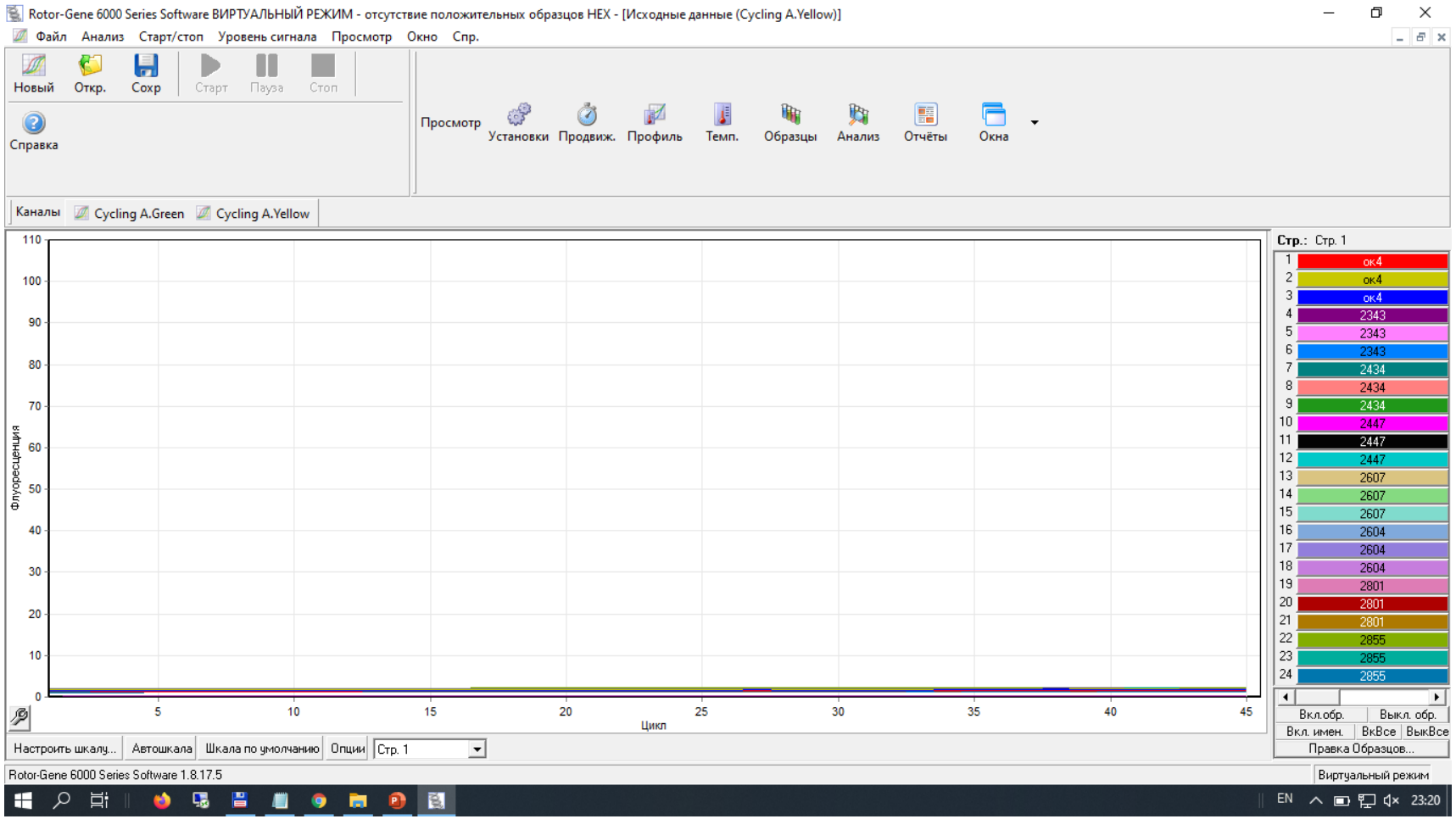
# Ошибки аналитического этапа: оборудование



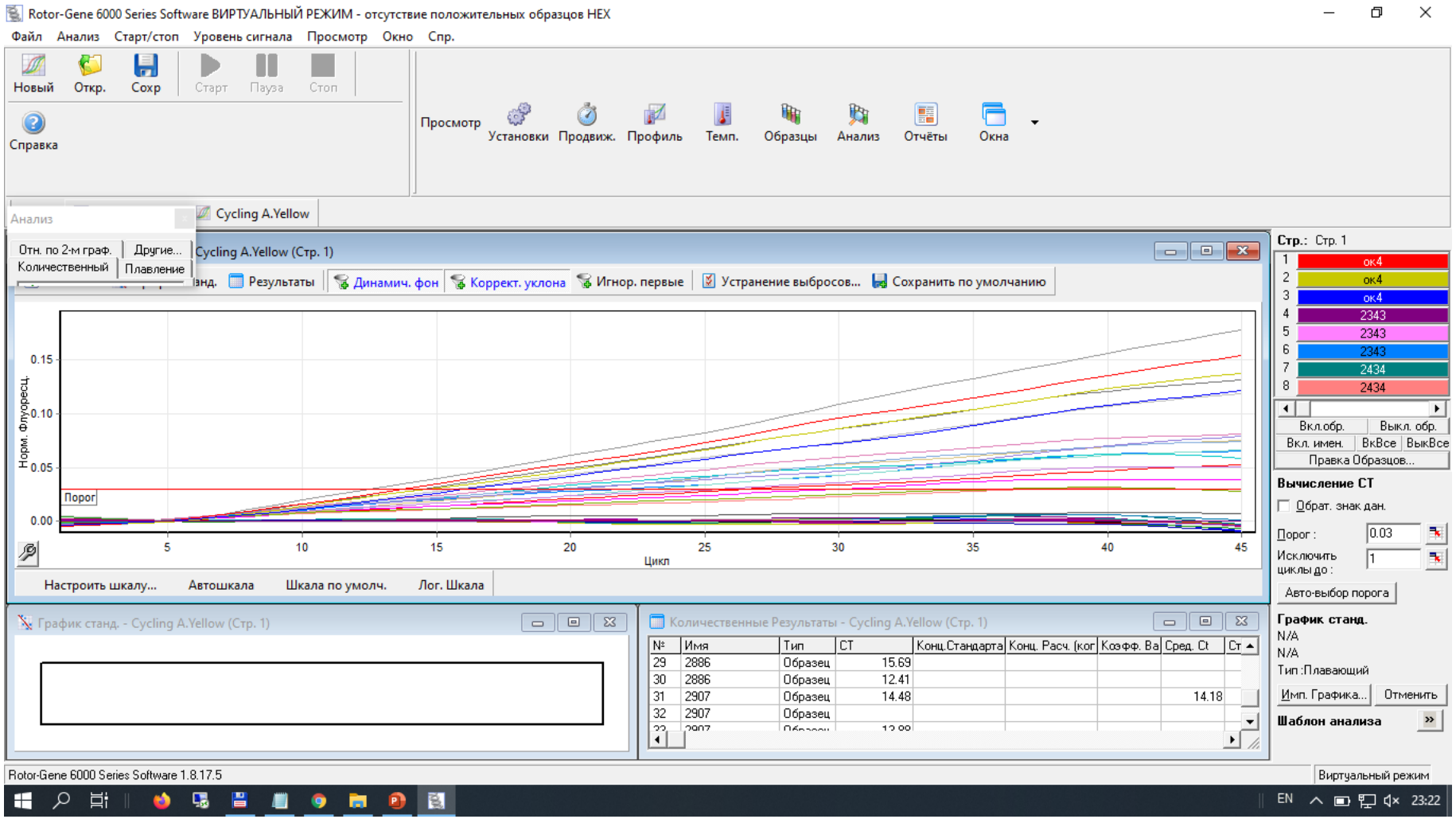
# Уровень сигнала за пределами шкалы



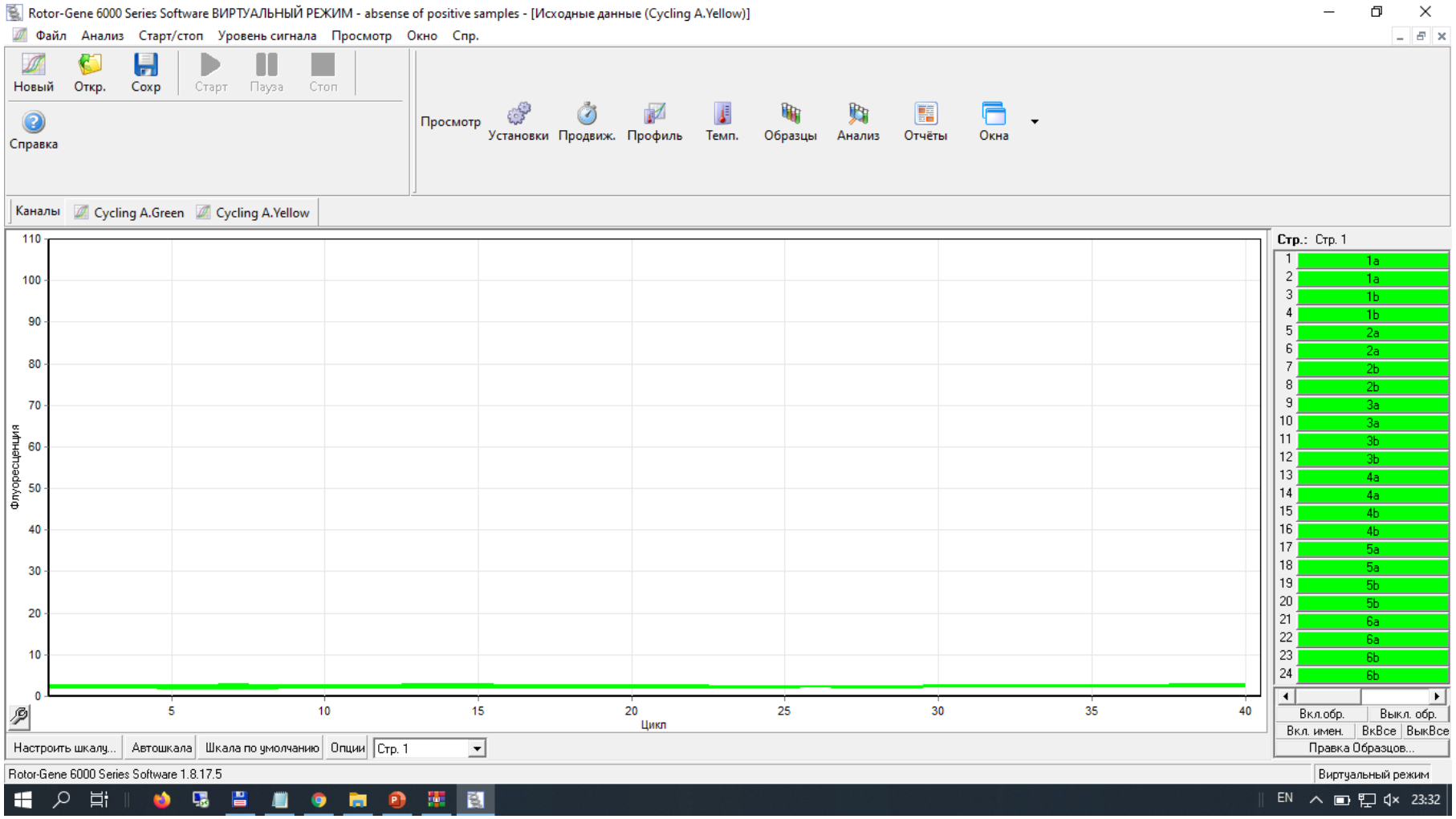
# Ошибка нормализации данных. Отсутствие положительных образцов. Необработанные данные



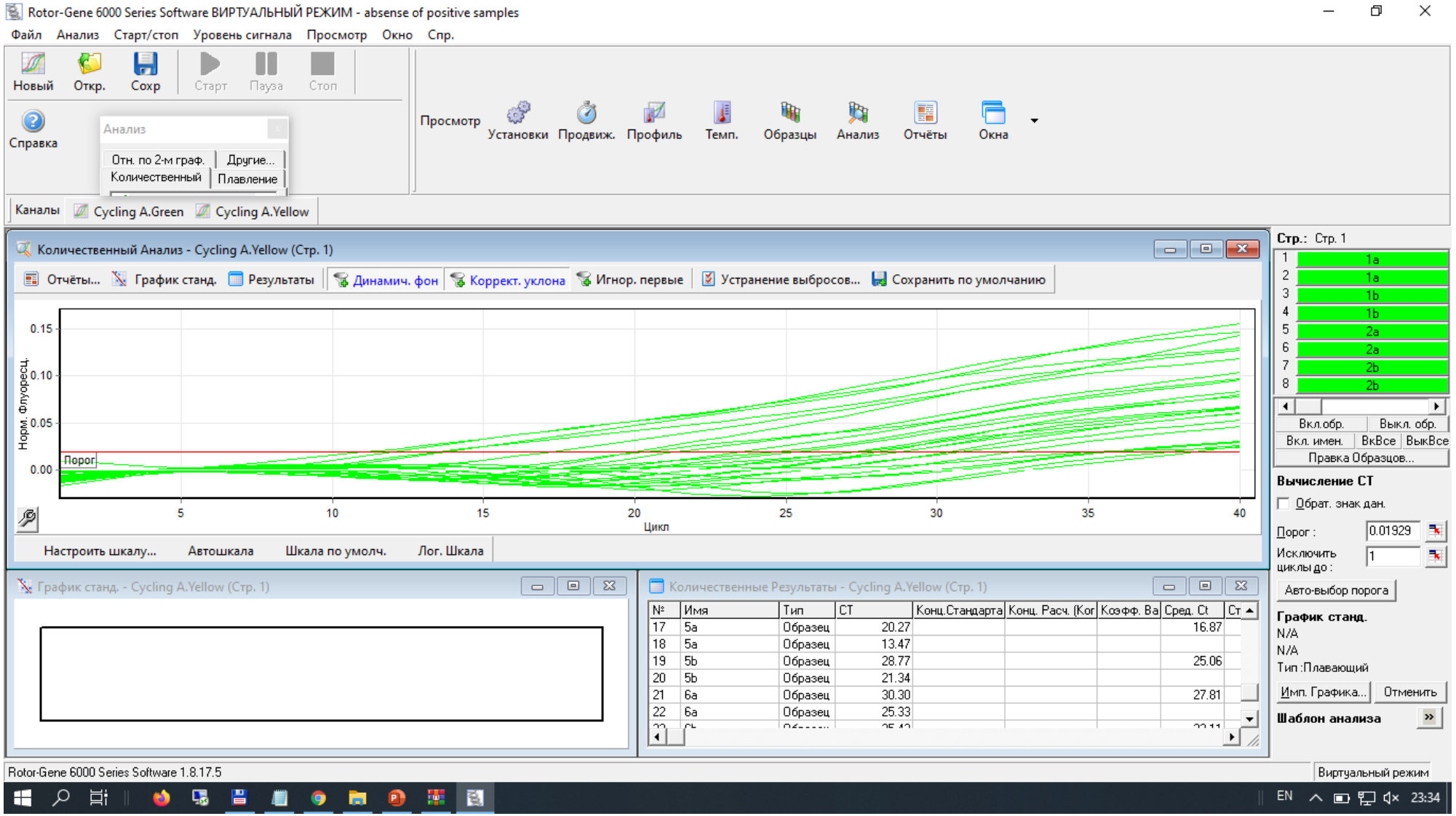
# Обработанные данные



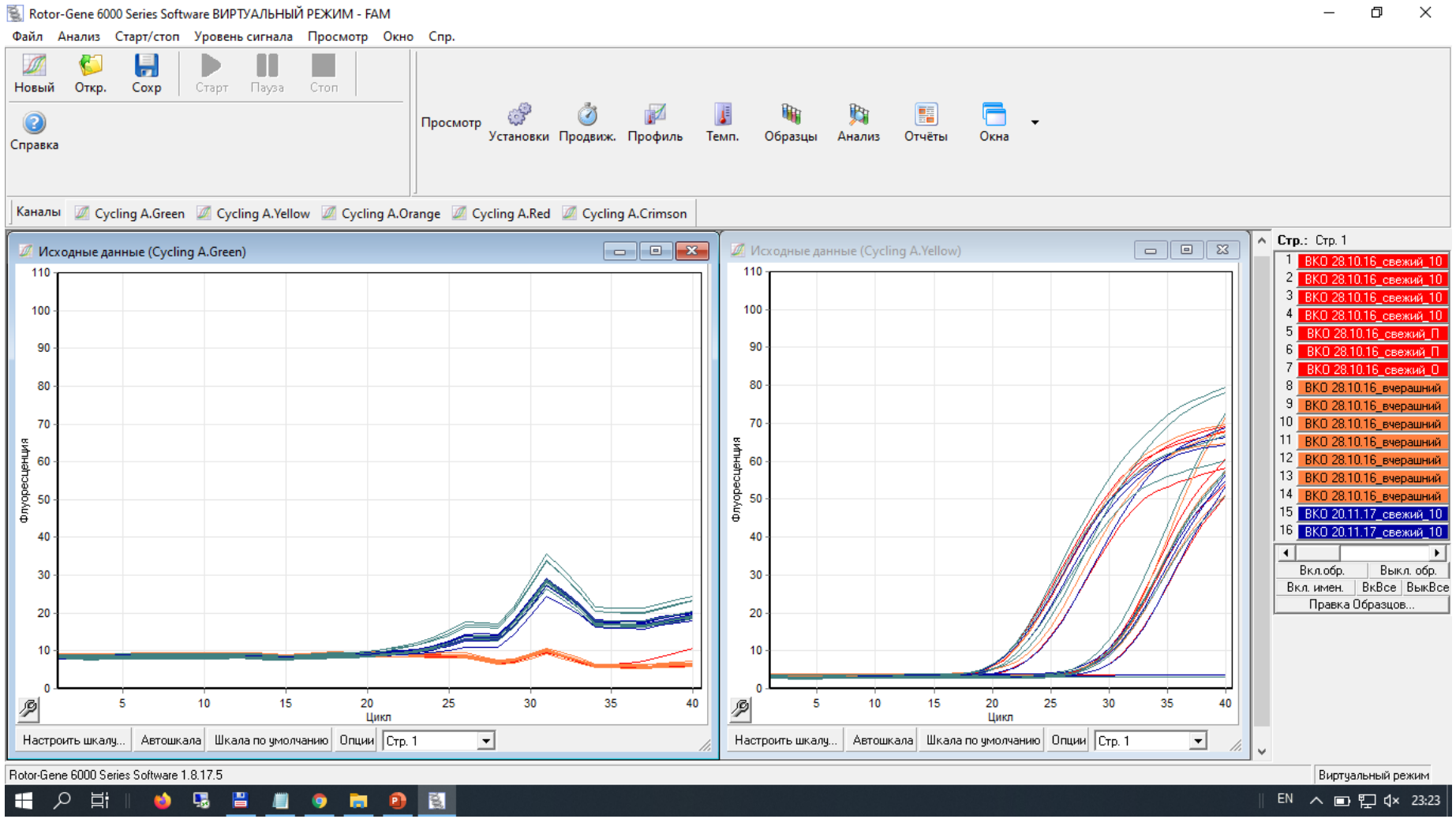
# Ошибка нормализации. Отсутствие положительных образцов. Необработанные данные



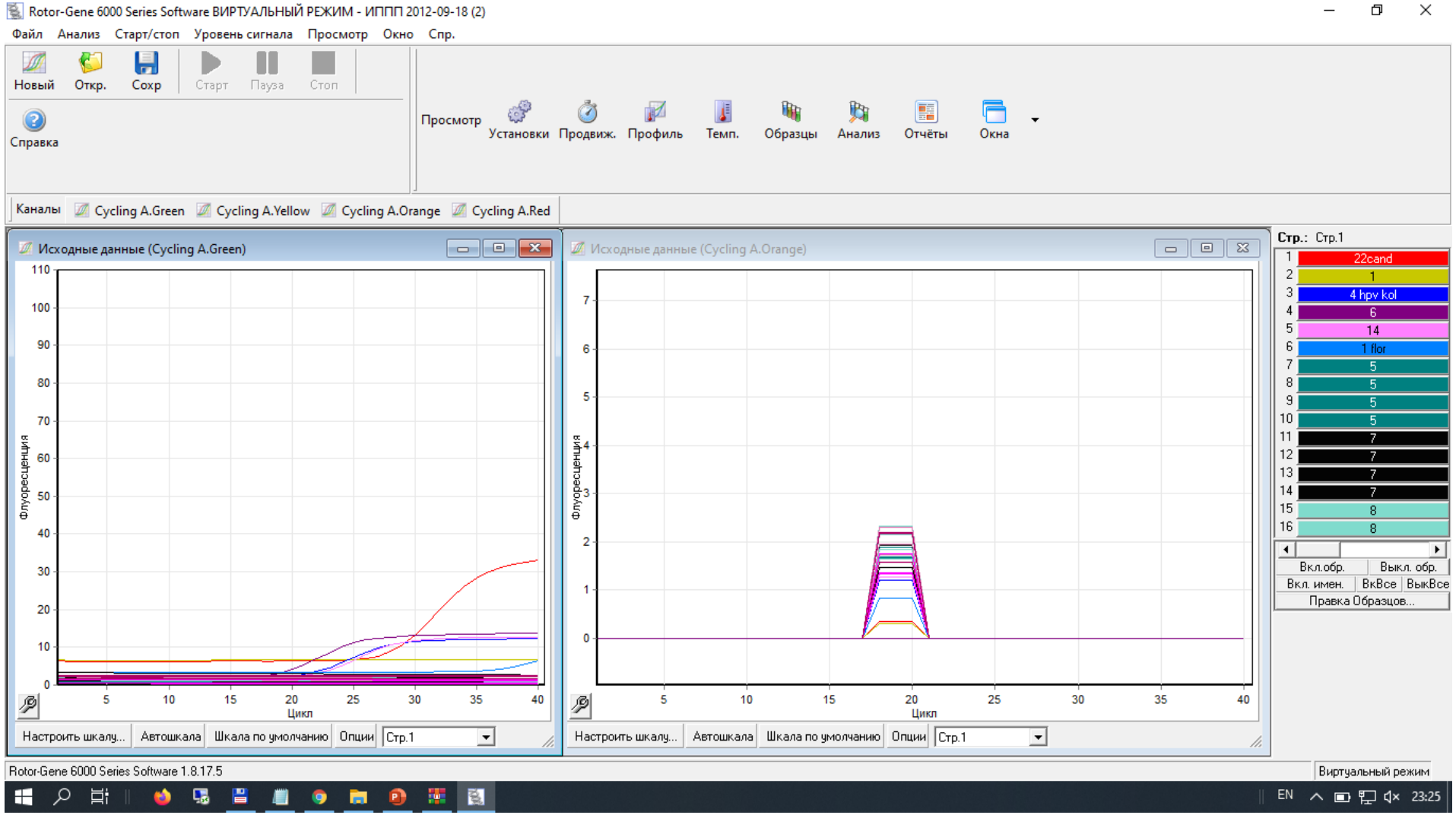
# Обработанные данные



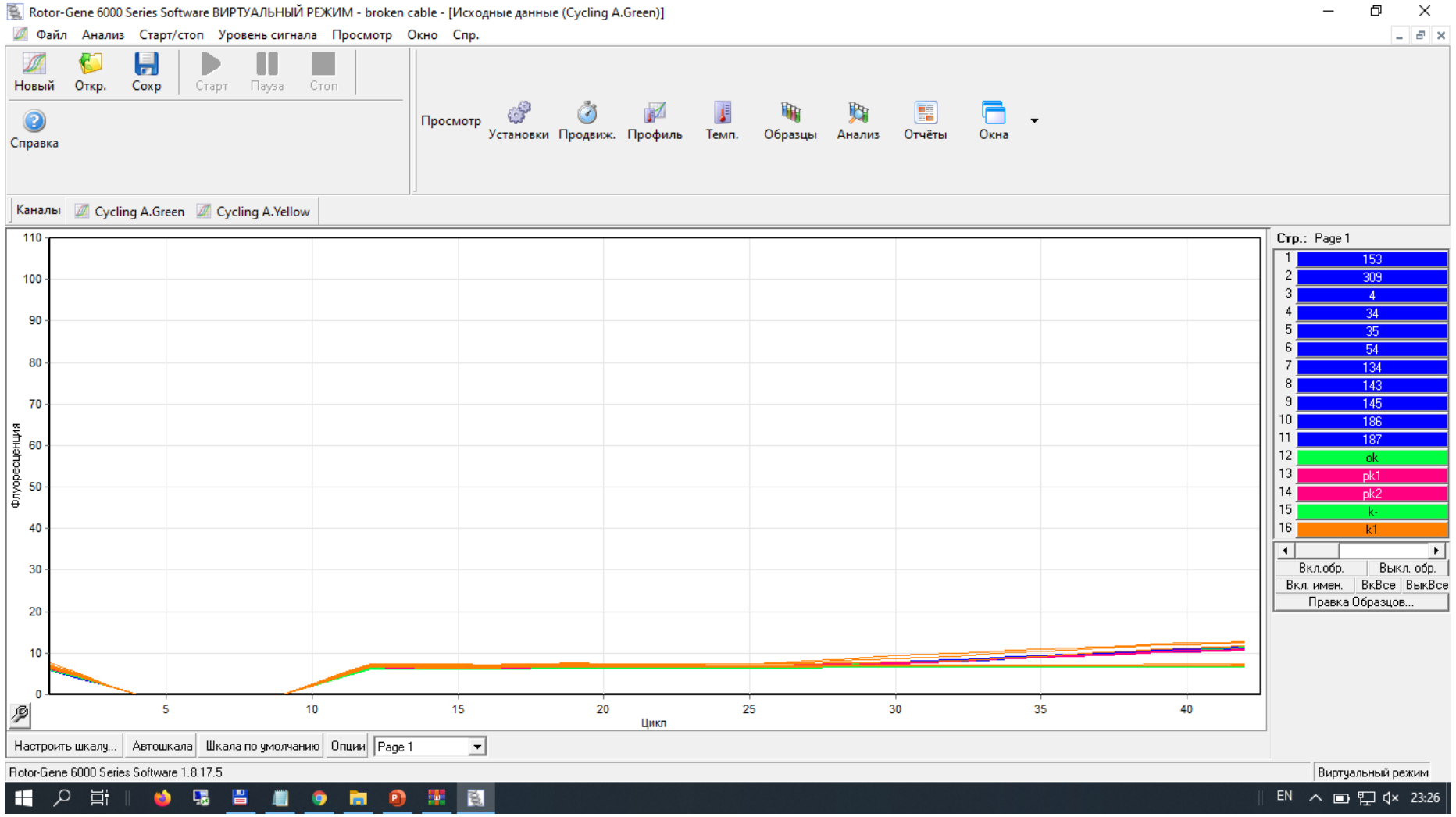
# Поломка кабеля оптической системы по каналу FAM



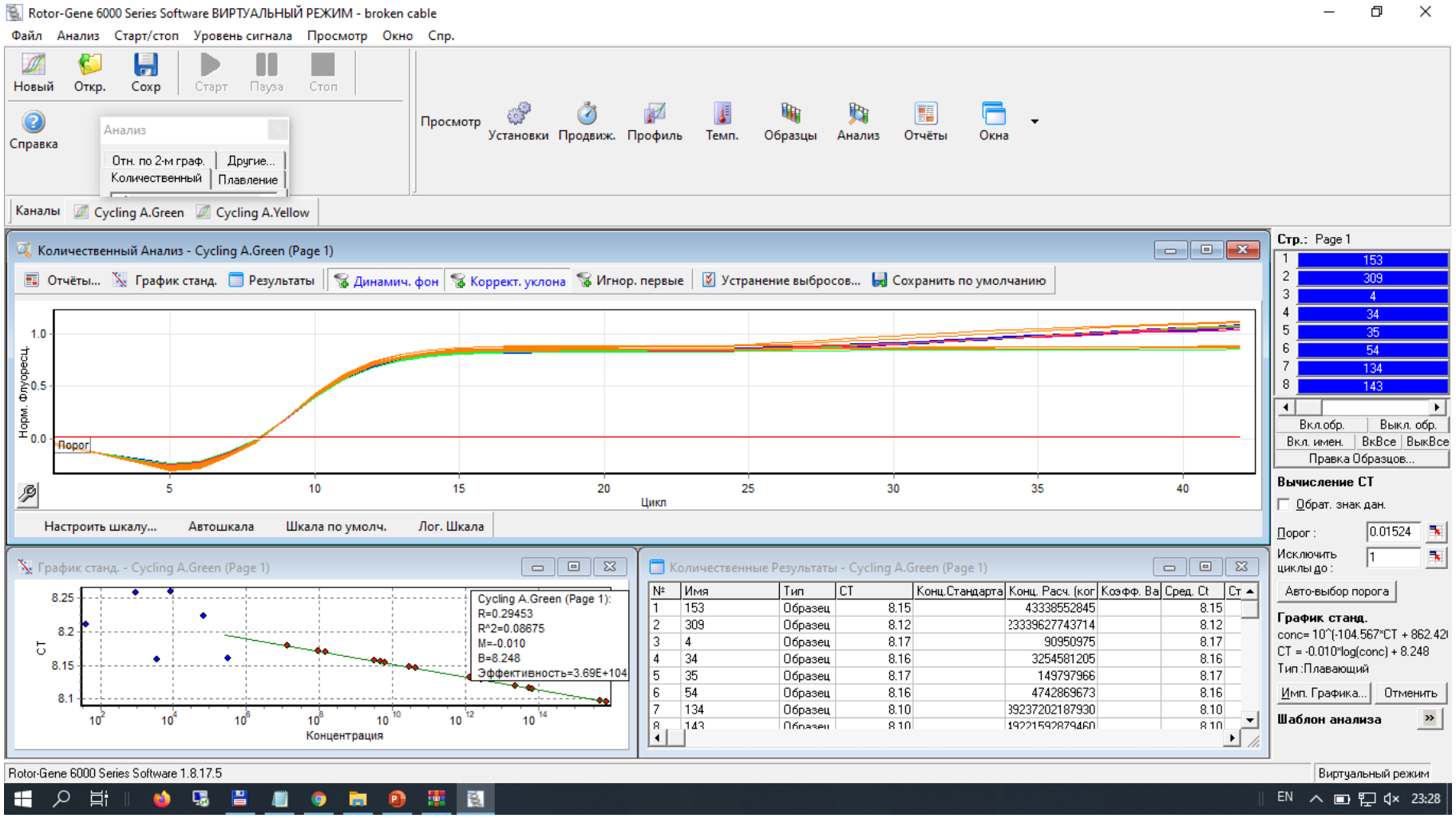
# По каналу Orange



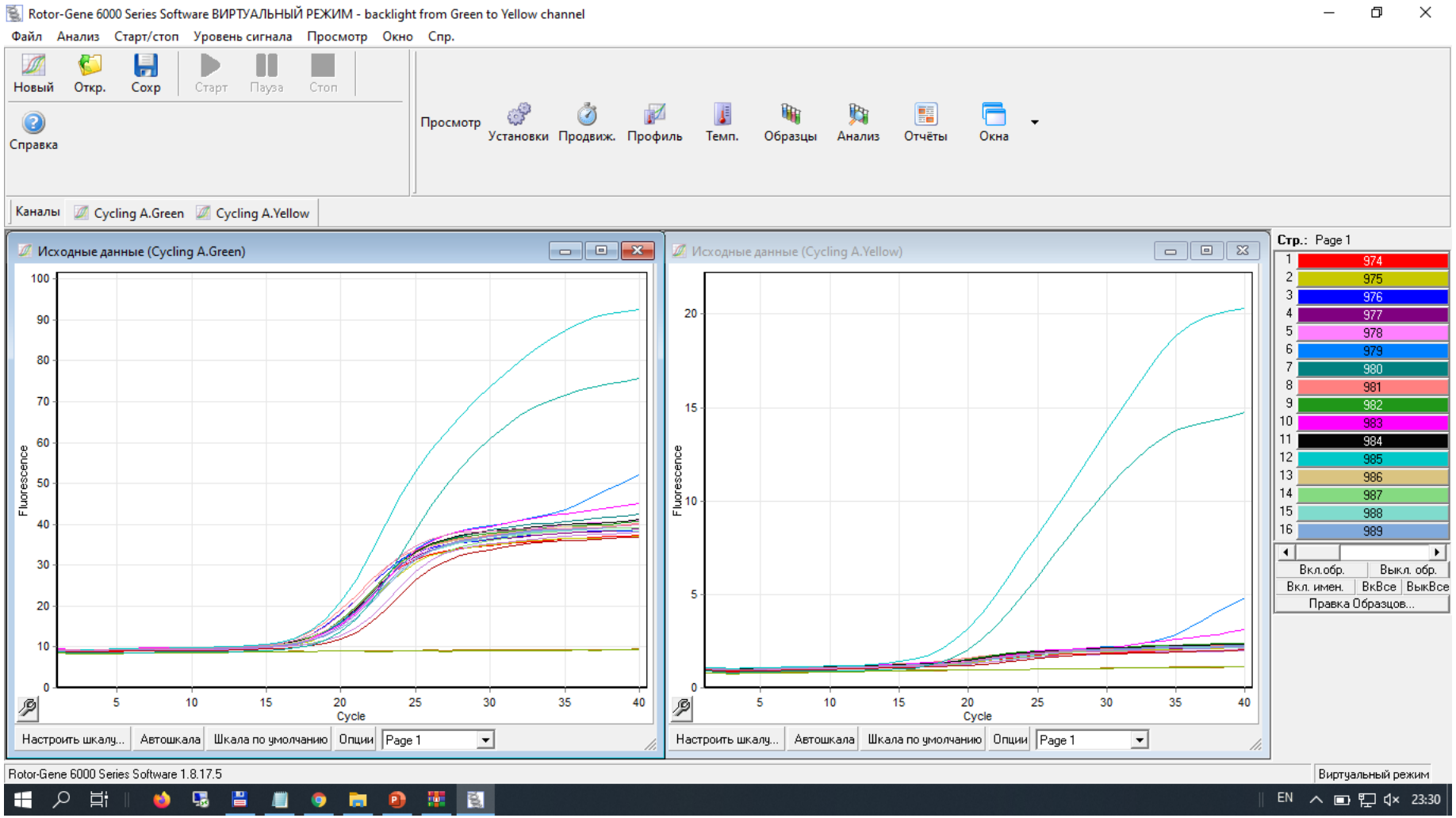
# Поломка кабеля оптической системы, канал FAM, необработанные данные



# Обработанные данные



# Засветка с канала Green на Yellow

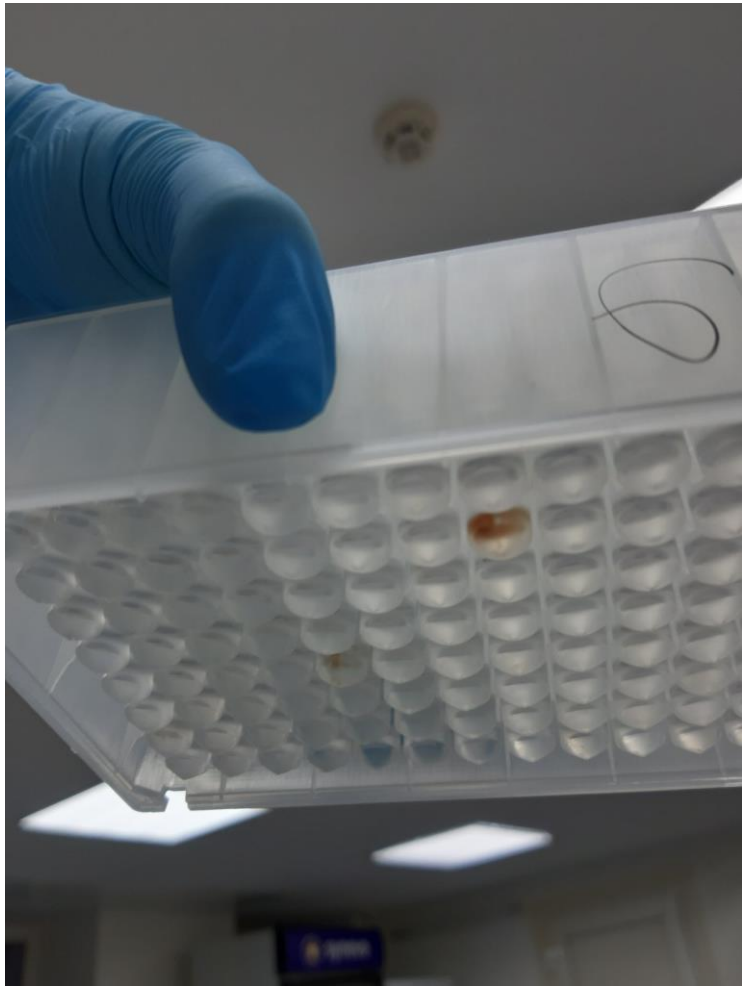


| Объект КК | Ошибка | Влияние на результаты | Способы контроля |
|---|---|---|---|
| **Аналитический этап** | | | |
| **Лабораторное оборудование** | | | |
| **Станция экстракции** | Контаминация, кросс-контаминация | Ложно-положительные результаты для образцов даже при чистых ОКО. Чаще рандомная ошибка, если уровень контаминации небольшой (особенно для станций типа KingFisher). Может быть воспроизводимой ошибкой для определенных моделей станций (оснащенных пипетирующими «пальцами» и каналами для промывки, напр. Xiril, Hamilton, Roche Magna Pure) в случае внутренней контаминации каналов и подвижной «руки». | Обязательная постановка ОКО! Включение рандомно расположенных дополнительных ОКО в плашку. Периодические смывы с рабочих поверхностей. Правильная эксплуатация и уборка станции. Перестановки «низкокопийных» образцов |
| | Не валидированный производителем реагентов\оборудования протокол экстракции. Может быть не отвалидирован под конкретный биоматериал. | Снижение эффективности экстракции. Сдвиг СТ ВКО и ПКО вправо. Невалидные результаты. Воспроизводимая ошибка. | Валидация в сравнении с референсной системой на биологических и контрольных образцах. Расчет ДЧ и ДС. Сравнение среднего значения СТ, коэффициента вариации и стандартного отклонения для ВКО и ПКО. |
| | Поломка термоблока станции | См. выше. Воспроизводимая ошибка (может быть сложно отследить при наличии нескольких станций экстракции в лаборатории) | См. выше<br>Строгая фиксация, из какой станции вышла плашка. |

# Ошибки аналитического этапа: оборудование

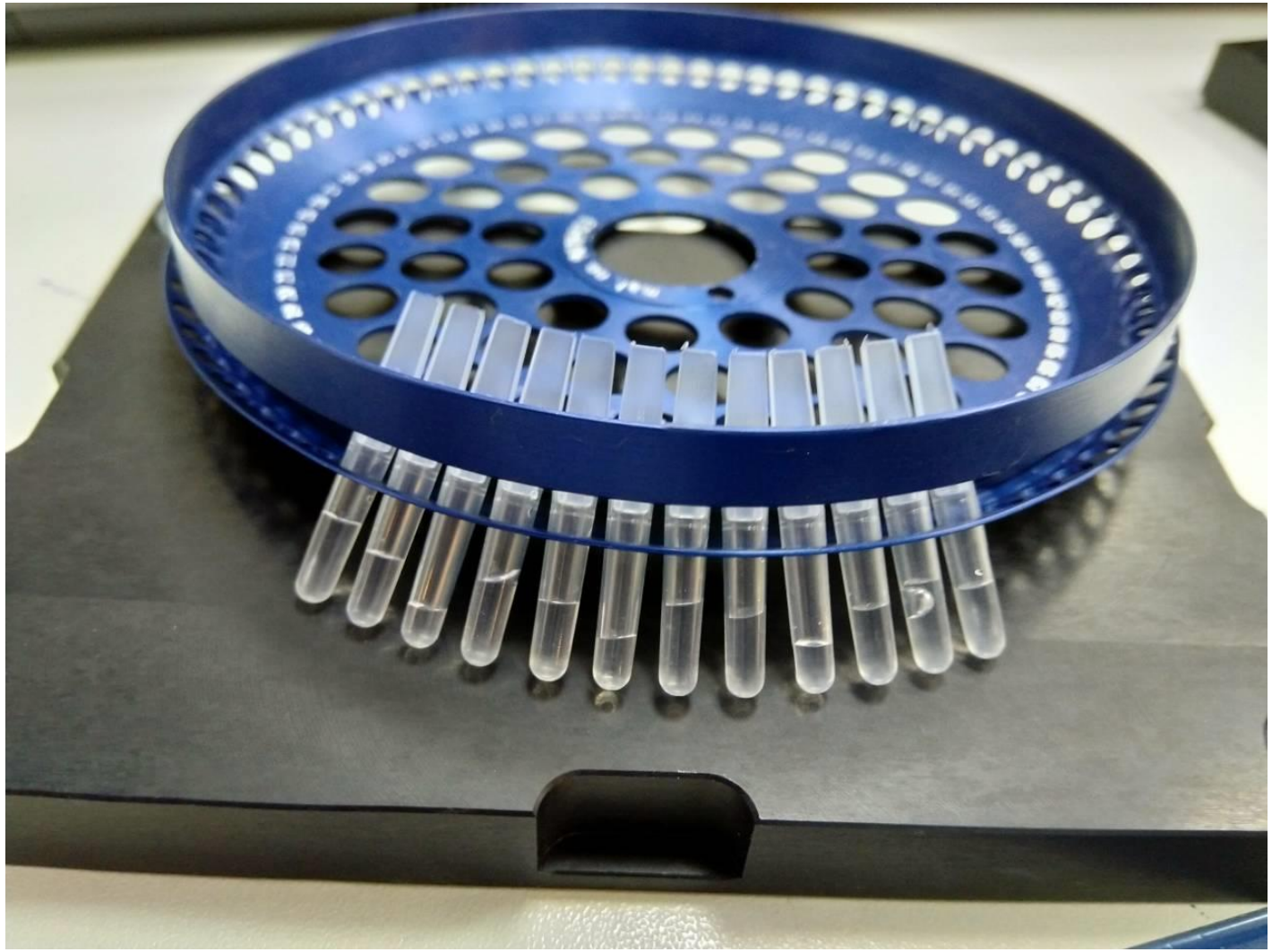
| HBV - 20.07.16 | | 01.09.2017 | HBV - 05.09.17 | | 27.09.2017 | | HCV - 29.08.16 | | 01.09.2017 | 12.09.2017 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Выделение | | Xiril / 1000 | Выделение | | Гамильтон / 1000 | Ксирил / 1000 | Выделение | | Xiril / 1000 | Xiril / 1000 |
| Объем элюции, мкл | | 100 | Объем элюции, | | 100 | 100 | Объем элюции, | | 100 | 100 |
| ВКО / контроли | | ? | ВКО / контроли | | ? | ? | ВКО / контроли | | ? | ? |
| Амплификатор | | RG | Амплификатор | | ДТ | ДТ | Амплификатор | | RG | ДТ |
| | 10*6 | 0,83 | | 10*6 | 0,53 | 0,21 | | 10*6 | 2,21 | 2,18 |
| | 10*5 | 0,61 | | 10*5 | 0,13 | -0,08 | | 10*5 | 0,48 | -0,80 |
| Δlg КП | 10*4 / 10*3 | 0,66 | Δlg КП | 10*4 / 10*3 | -0,68 | -1,29 | Δlg КП | 10*4 / 10*3 | 0,12 | 0,00 |
| | №1 | 0,48 | | №1 | 0,80 | 0,10 | | №1 | | |
| Δlg АЧ | №2 | | Δlg АЧ | №2 | 0,88 | 0,44 | Δlg АЧ | №2 | | |
| | ПК1 | 1,49% | | ПК1 | 0,55% | | | ПК1 | 1,75% | 7,87% |
| | ПК2 | 1,47% | | ПК2 | 0,93% | 1,74% | | ПК2 | 1,05% | 21,73% |
| | К1 | 1,17% | КОЭФВАР | К1 | 8,74% | 1,27% | КОЭФВАР | К1 | 2,48% | 7,66% |
| КОЭФВАР | К2 | 0,98% | | К2 | 0,78% | 1,61% | | К2 | 10,89% | 1,29% |
| R^2 | | 0,99941 | R^2 | | 0,9449 | 0,998 | R^2 | | 0,96975 | 0,9497 |
| E | | 0,99 | E | | 1,12 | 0,91 | E | | 1,03 | 1,02 |
| | Сред. СТ | 21,50 | | Сред. СТ | 20,43 | 20,86 | | Сред. СТ | 30,27 | 27,47 |
| ВКО | Разгорание | 2,55 | ВКО | Разгорание | 1,89 | 1,89 | ВКО | Разгорание | 1,60 | 1,70 |

# Сорбент на дне лунки – приборная ошибка



| Объект КК | Ошибка | Влияние на результаты | Способы контроля |
|---|---|---|---|
| **Аналитический этап** | | | |
| **Лабораторное оборудование** | | | |
| **Пипетирующая станция** | Контаминация, кросс-контаминация | Ложно-положительные результаты для образцов даже при чистых отрицательных контролях. В зависимости от массивности и локализации контаминации в станции может быть как рандомной, так и воспроизводимой ошибкой. | Включение рандомно расположенных дополнительных К- в плашку. Периодические смывы с рабочих поверхностей. Правильная эксплуатация и уборка станции. |
| | Погрешность пипетирования. Неверно выставленные коэффициенты вязкости жидкости. Сбой калибровки позиции наконечника и высоты пробирки. Пенная пленка на поверхности реакционной пробирки. Загрязнение и закупорка пипетирующего канала. | Ошибка расчета количественных результатов. Ложно-отрицательные или невалидные результаты. Воспроизводимая ошибка, может встречаться в определенной позиции плашки. | Визуальная оценка равномерности пипетирования. Для количественных тест-систем: оценка концентрации ПКО (должен укладываться в заданный диапазон значений) и калибраторов. Тестирование контрольных образцов с известной концентрацией (при наличии). Осаждение пробирок с реагентами на вортексе перед загрузкой на борт. |

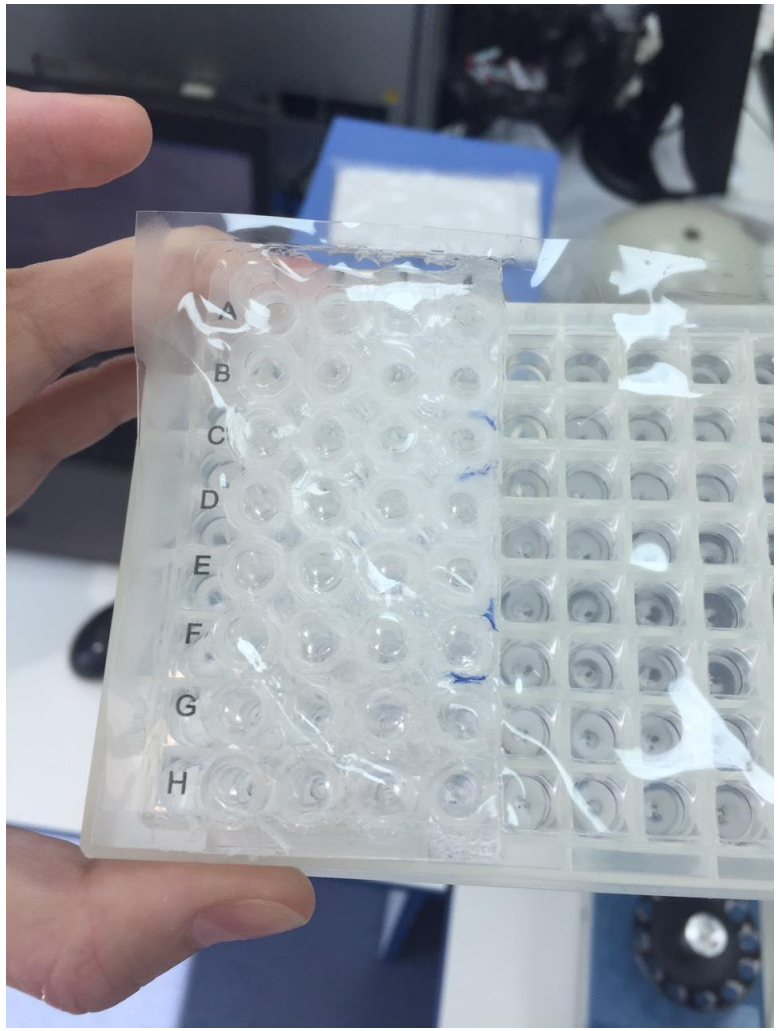
# Неравномерное пипетирование автоматической станции

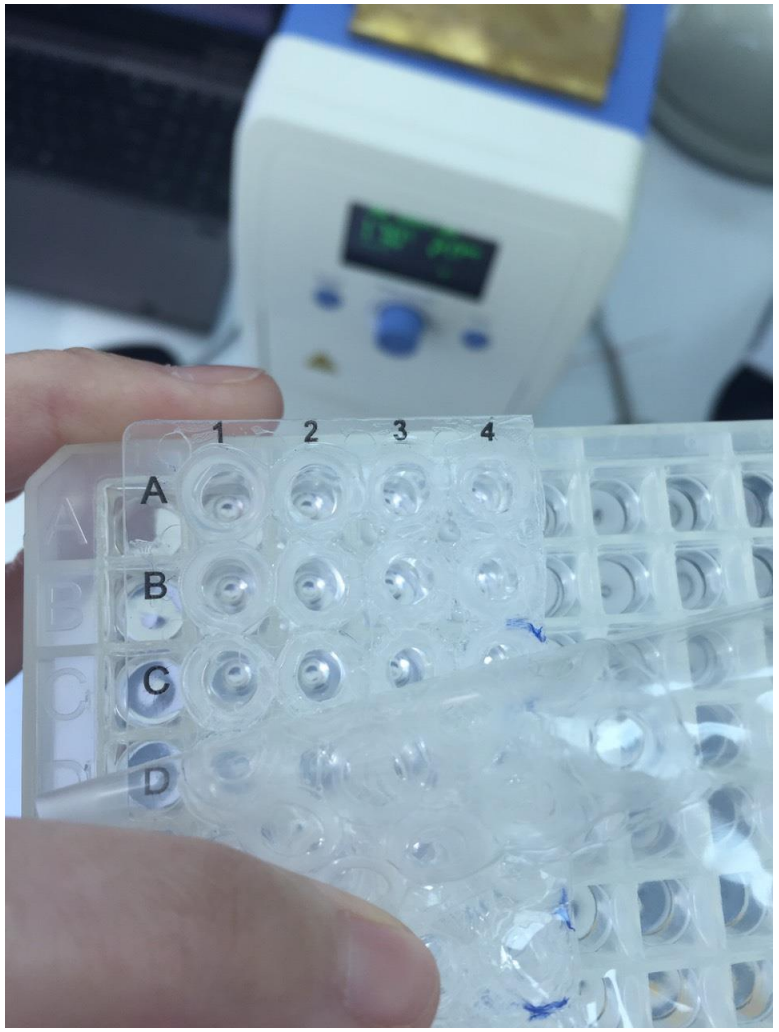


# Сбой калибровки пипетирующей станции по высоте пробирки

| Объект КК | Ошибка | Влияние на результаты | Способы контроля |
|---|---|---|---|
| **Аналитический этап** | | | |
| **Лабораторное оборудование** | | | |
| **Запаиватель ПЦР-планшет** | Несоответствие температуры запаивания и свойств пленки и ПЦР-плашек | Слишком высокая температура: оплавление краев лунок плашек. Оплавление пленки. Слишком низкая температура: неплотное приваривание пленки к поверхности лунок. Контаминация | Валидация оборудования и подбор температуры запаивания. Визуальное определение равномерности уровня жидкости после амплификации. Периодический контроль уровня контаминации (взятие смывов) |
| **Холодильники** | Выключение и разморозка в результате перебоев энергоснабжения | Нарушение температурного режима хранения реагентов, снижение их качества (особенно критично для ферментов). Сдвиг среднего СТ ВКО и ПКО в постановке вправо, невалидные результаты. | Заполнение температурных листов (реальное!). Использование логгеров с функцией фиксации температуры в режиме реального времени. Использования датчиков энергопотребления с фиксацией в режиме реального времени. |

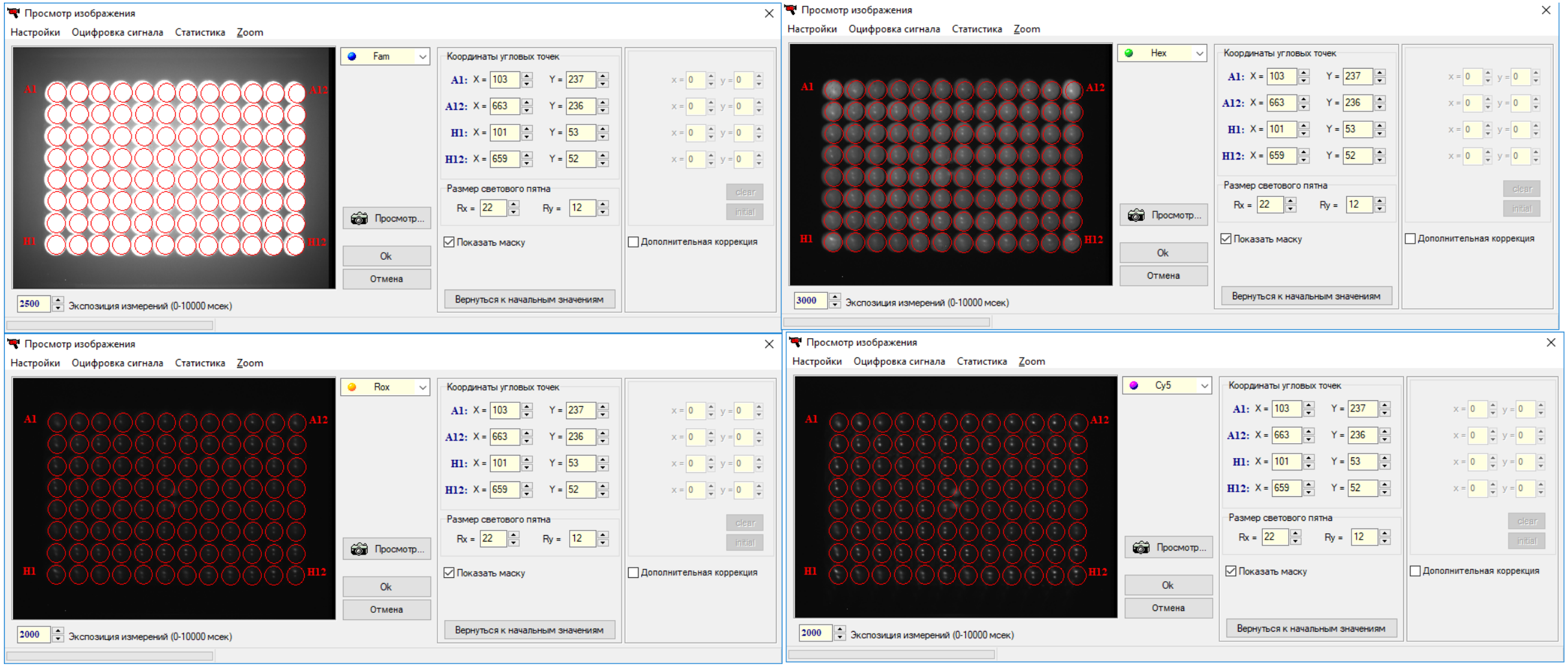
# Неверно подобранная температура запаивателя – оплывание края лунок



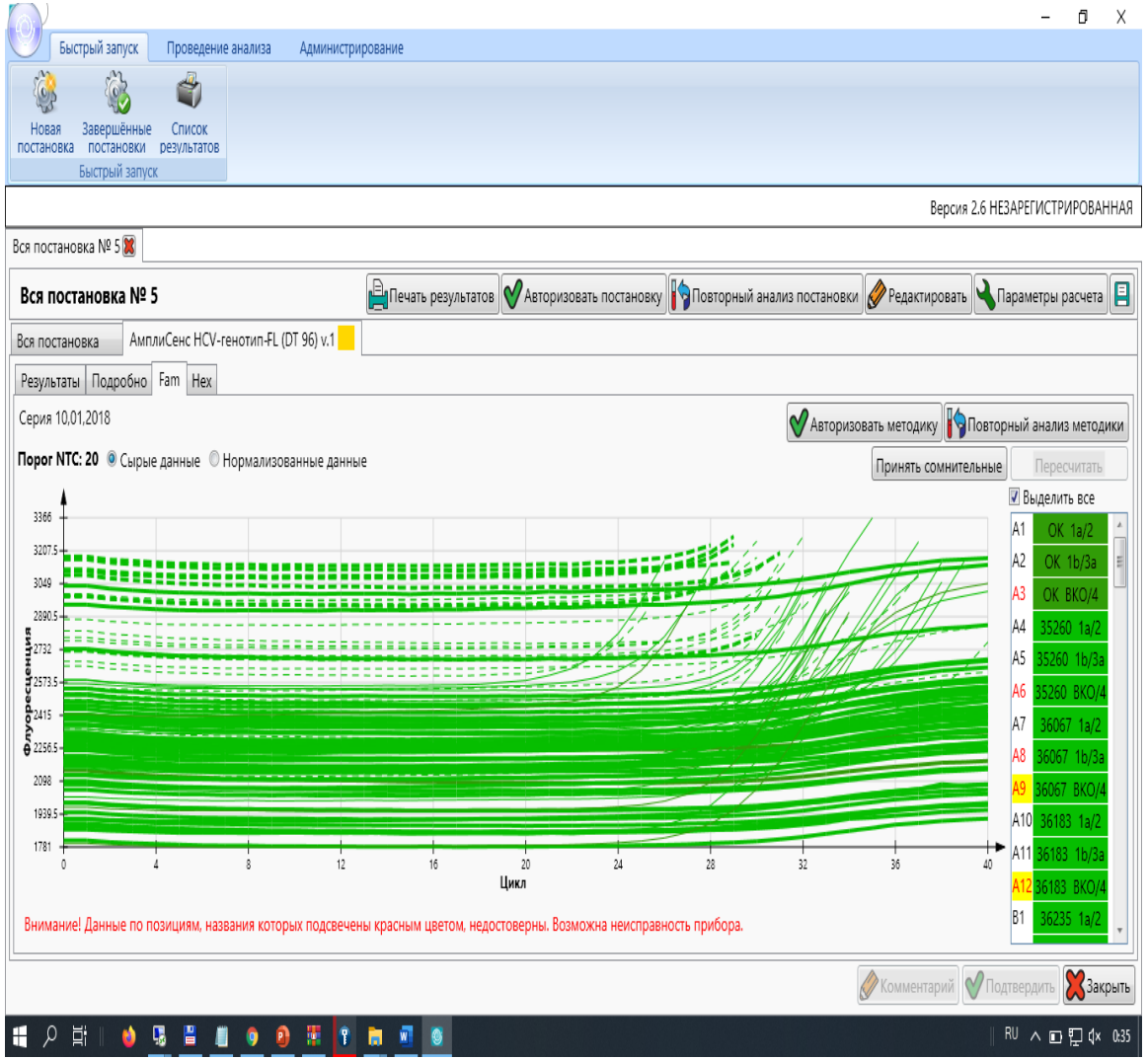



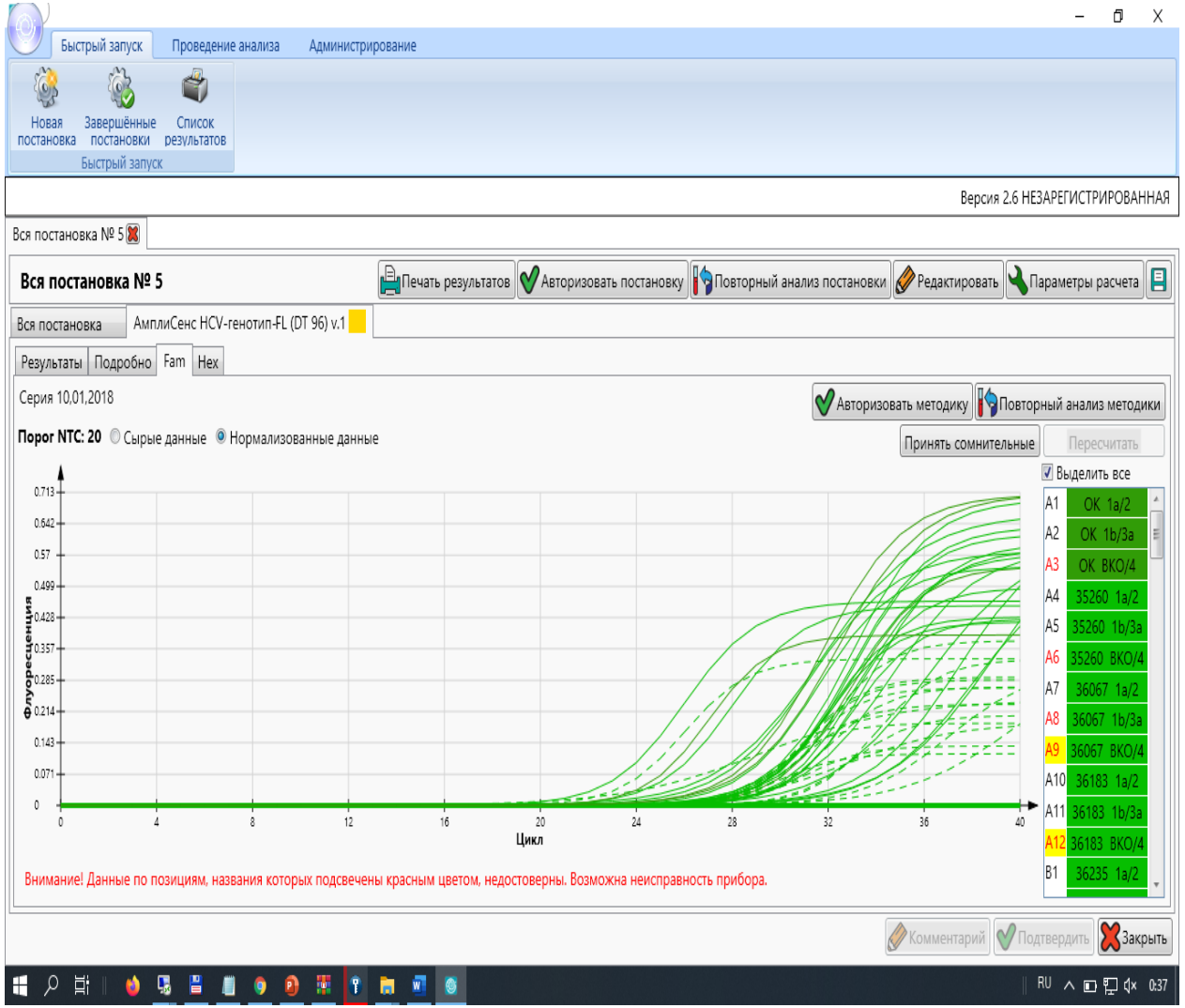
| Объект КК | Ошибка | Влияние на результаты | Способы контроля |
|---|---|---|---|
| **Аналитический этап** | | | |
| **Расходные материалы** | | | |
| **ПЦР-пробирки \ плашки** | Наличие примесей в пластике, увеличивающих фоновую флуоресценцию | Высокий уровень «фона», маскирующий положительные сигналы, невалидные результаты. Воспроизводимая ошибка, может встречаться только по одному каналу детекции. | Проведение входного контроля пластика. Постановка ПЦР на положительных и отрицательных контролях амплификации, «пустых» смесях, в сравнении с пустыми лунками. Снятие «маски» прибора (если есть опция амплификатора) |
| | Несоответствие типа ПЦР-пробирок амплификатору. Использование ПЦР-пробирок с оптически непрозрачной крышкой в амплификаторах планшетного типа | Невалидные результаты во всем протоколе постановок | Проведение входного контроля пластика. Четкое описание спецификаций расходных материалов перед стартом закупок. |
| **Наконечники дозаторов** | Несоответствие наконечника дозатору | Перерасход реагентов. Ошибки пипетирования. Невалидные результаты. Погрешность количественных измерений. Ошибка чаще невоспроизводима. | Проведение входного контроля пластика. Четкое описание спецификаций расходных материалов перед стартом закупок. Обязательная постановка положительных контролей всех этапов анализа. |

# Белые ПЦР-плашки с засветкой по FAM

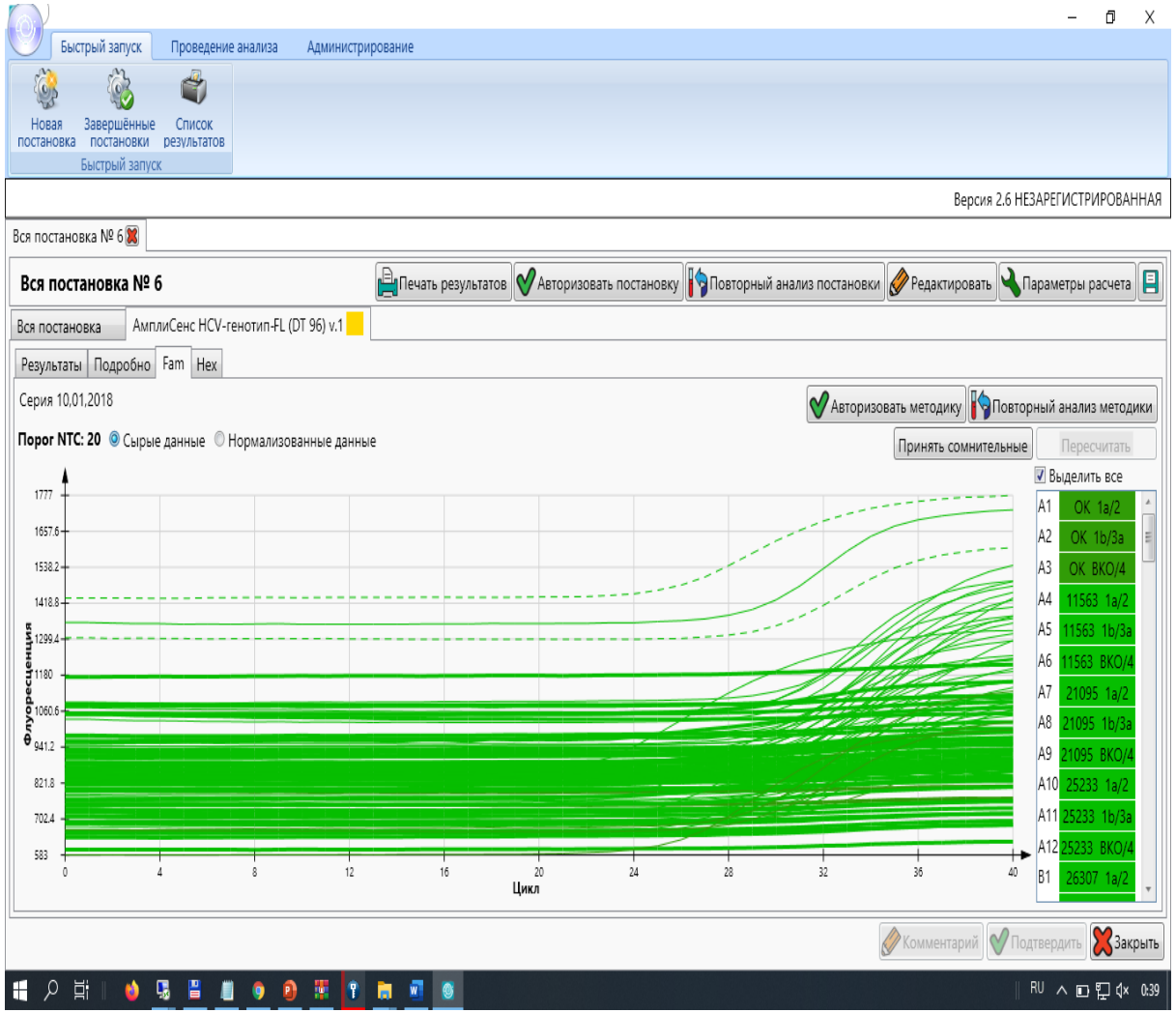


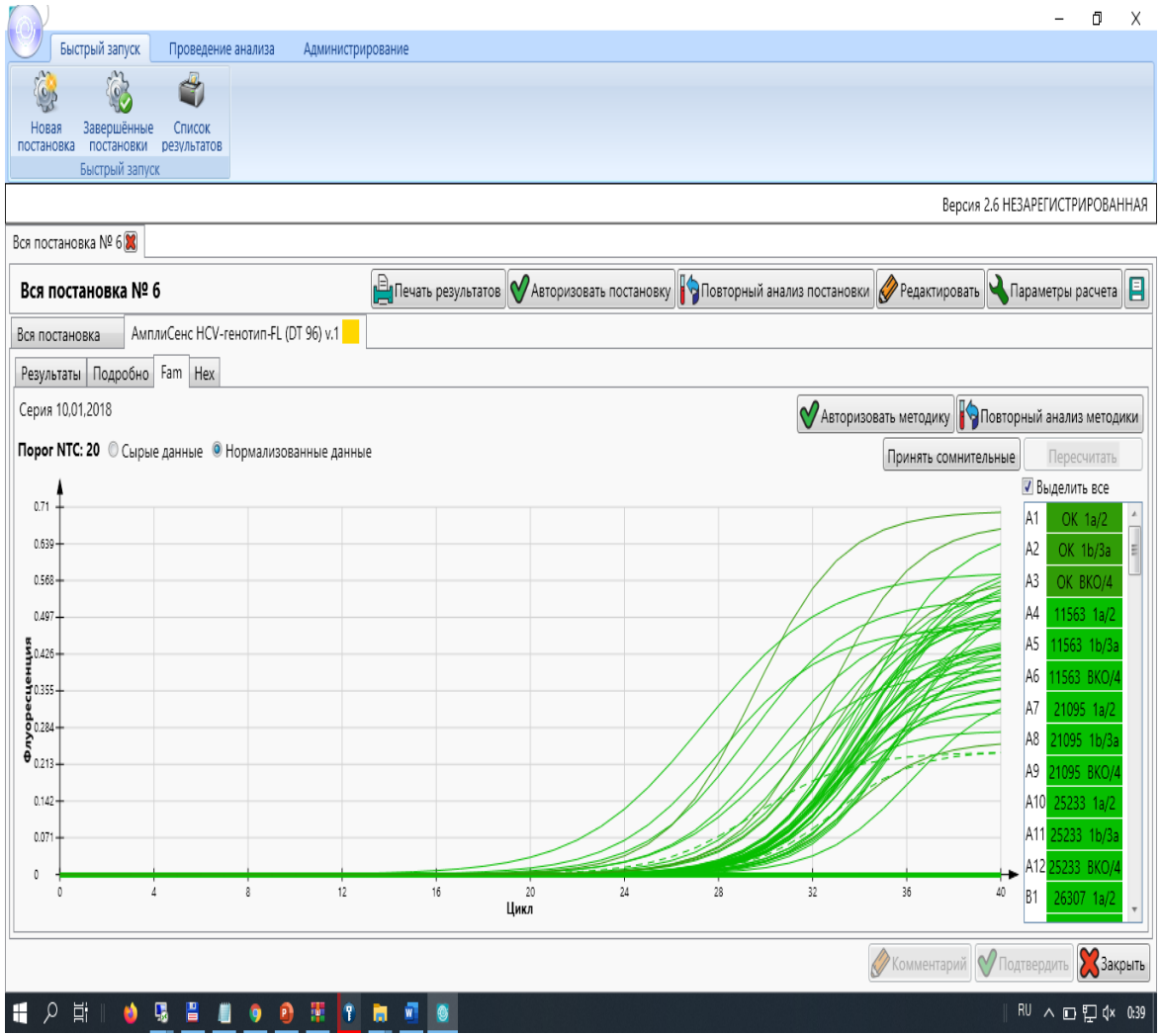
# Белый пластик с засветкой по FAM, ПО-интерпретатор, необработанные данные



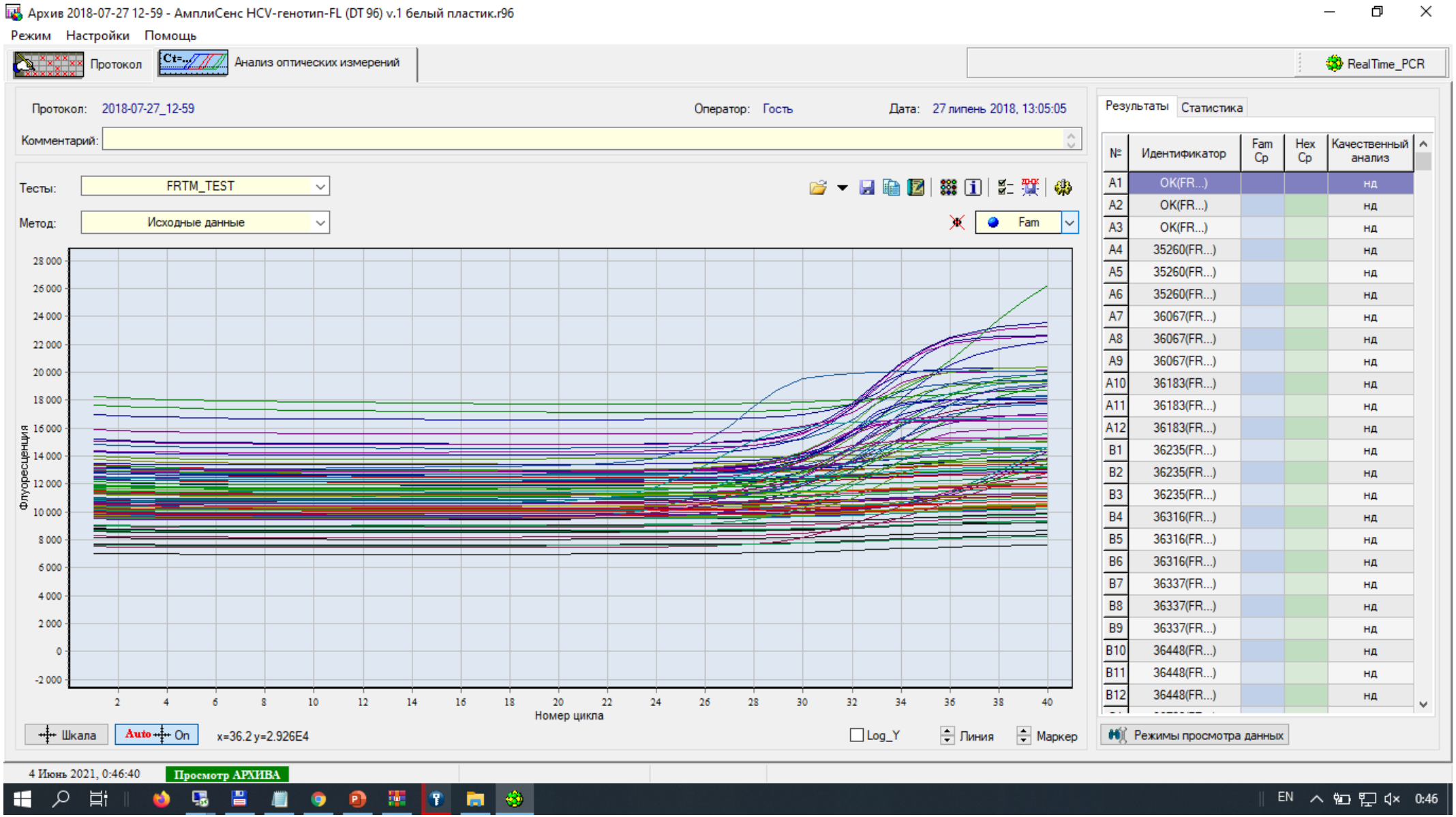



# Стандартный  пластик на том же приборе, те же реагенты

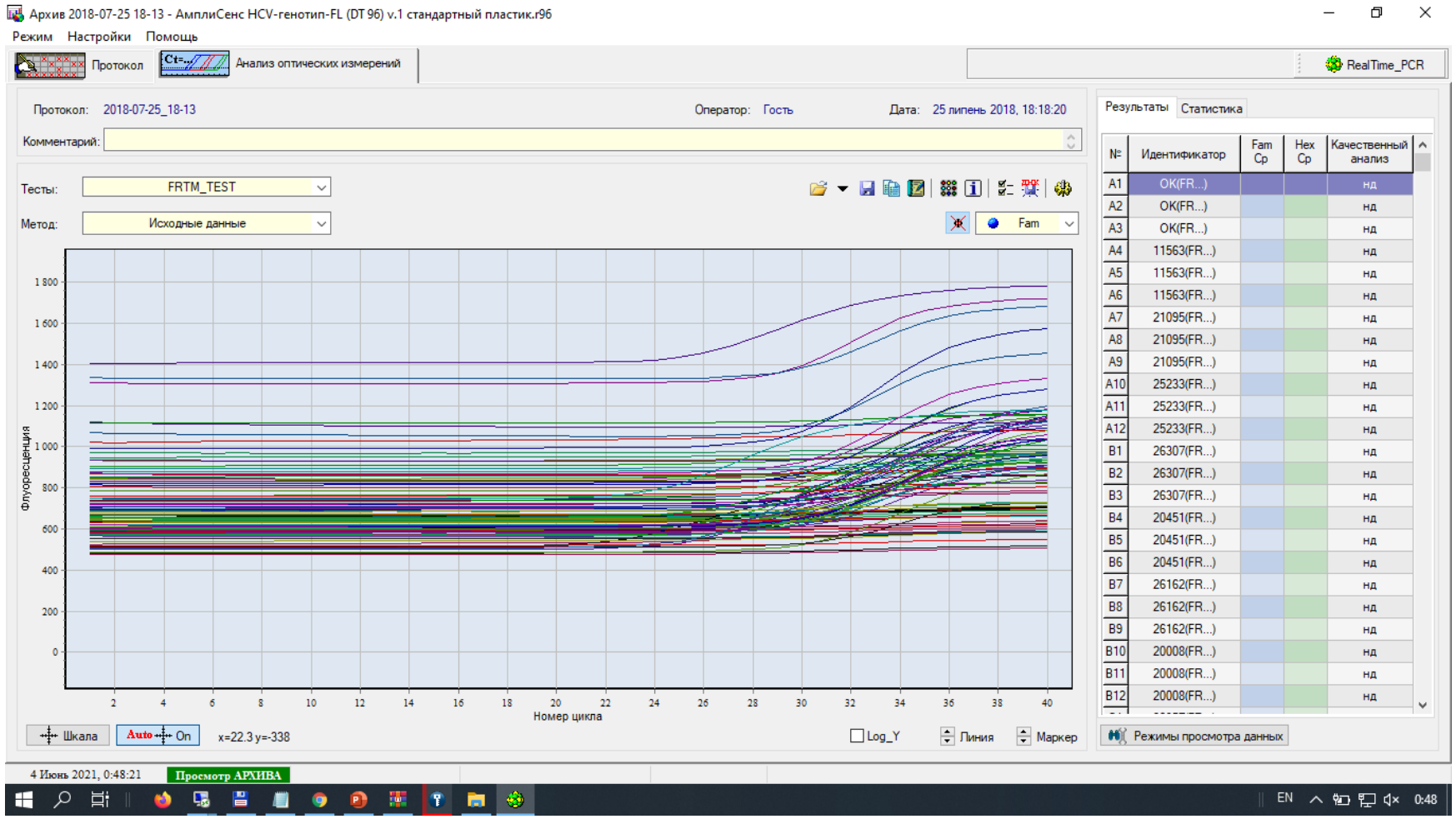


# Белый пластик с засветкой по FAM, сырые данные

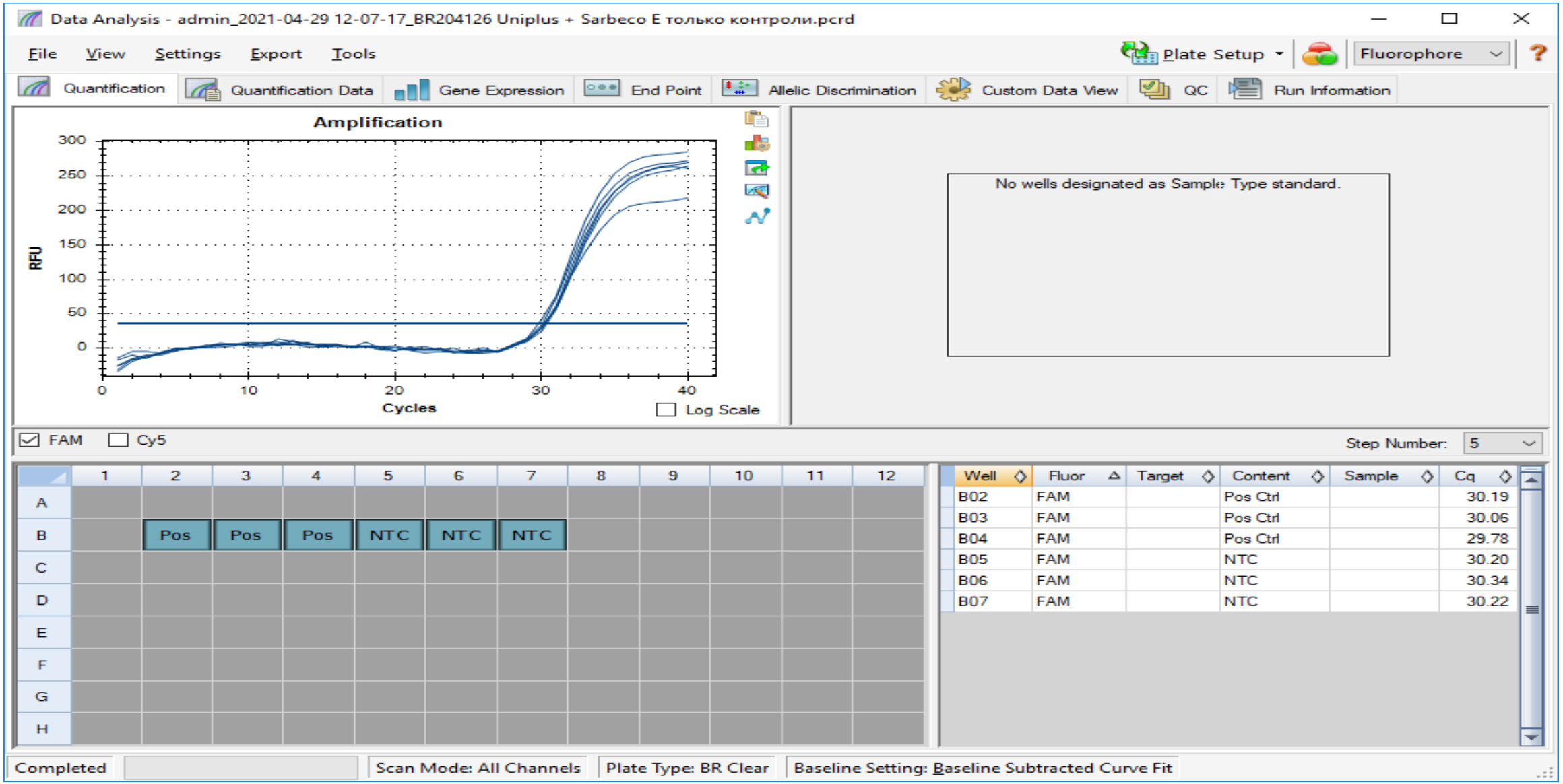


# Стандартный пластик на том же приборе, те же реагенты



| Объект КК | Ошибка | Влияние на результаты | Способы контроля |
|---|---|---|---|
| **Реагенты** | | | |
| **Наборы реагентов для проведения РТ-ПЦР и ОТ** | АЧ не соответствует указанной в инструкции | Ложноотрицательные результаты | При наличии контрольных образцов с известной концентрацией – приготовить разведения до концентрации, равной АЧ, протестировать в нескольких повторах. Оценить минимальную концентрацию разведений контрольных образцов, которую тест-система определяет воспроизводимо. |
| | Низкая ДЧ, ДС | Ложноотрицательные, ложноположительные результаты | Валидация в сравнении с референсной тест-системой на положительных и отрицательных биологических образцах |
| | Контаминация реагентов на производстве | Тотальные ложноположительные результаты. Воспроизводимая ошибка для серии реагентов | Исключить контаминацию лаборатории (смывы)! Проверить в сравнении с «чистой» серией. Каждый компонент реакционной смеси контаминированной серии скапывается и тестируется, как образец. Таким же образом проверяются все дополнительные реагенты, используемые в ПЦР (напр., вода для молекулярной биологии). |
| | Отсутствие адаптации набора реагентов под амплификатор, используемый в лаборатории | Программа амплификации, указанная в инструкции, не апробирована на амплификаторе, температурные полки неоптимальны. Снижение эффективности ПЦР. Снижение эффективности ПЦР. Снижение разгорания, сдвиг среднего значения СТ ВКО и ПКО вправо, невалидные рез-ты. | Не использовать не адаптированные под Ваш амплификатор тест-системы. Проведение валидации, постановка контрольных и биологических образцов в параллели в сравнении с теми же образцами на адаптированном под эту систему амплификаторе. Подбор оптимальных параметров амплификации путем изменения продолжительности и температуры шагов программы амплификации. Изменение каждого из параметров тестируется в параллельных постановках. |
| | Снижение качества всего набора, его отдельных компонентов или контролей в результате нарушений условий транспортировки и хранения, многократной заморозки\разморозки | Снижение эффективности ПЦР. Снижение разгорания, сдвиг среднего значения СТ ВКО и ПКО вправо, невалидные рез-ты. Воспроизводимая ошибка для одного или нескольких наборов реагентов, хранившихся вместе или полученных от одного поставщика. | Проведение входного контроля серии наборов реагентов (тестирование контрольных образцов в нескольких повторах на одном наборе из партии одной серии, поступающей в лабораторию). Оформление рекламации и возврат поставщику всей серии не надлежащего качества. Если подозревается нарушение эксплуатации или хранения набора в лаборатории (а не у поставщика) – параллельное тестирование двух наборов одной серии на контрольных образцах + разведений до граничной концентрации, сравнение значений СТ, разгорания, аналитической чувствительности. |

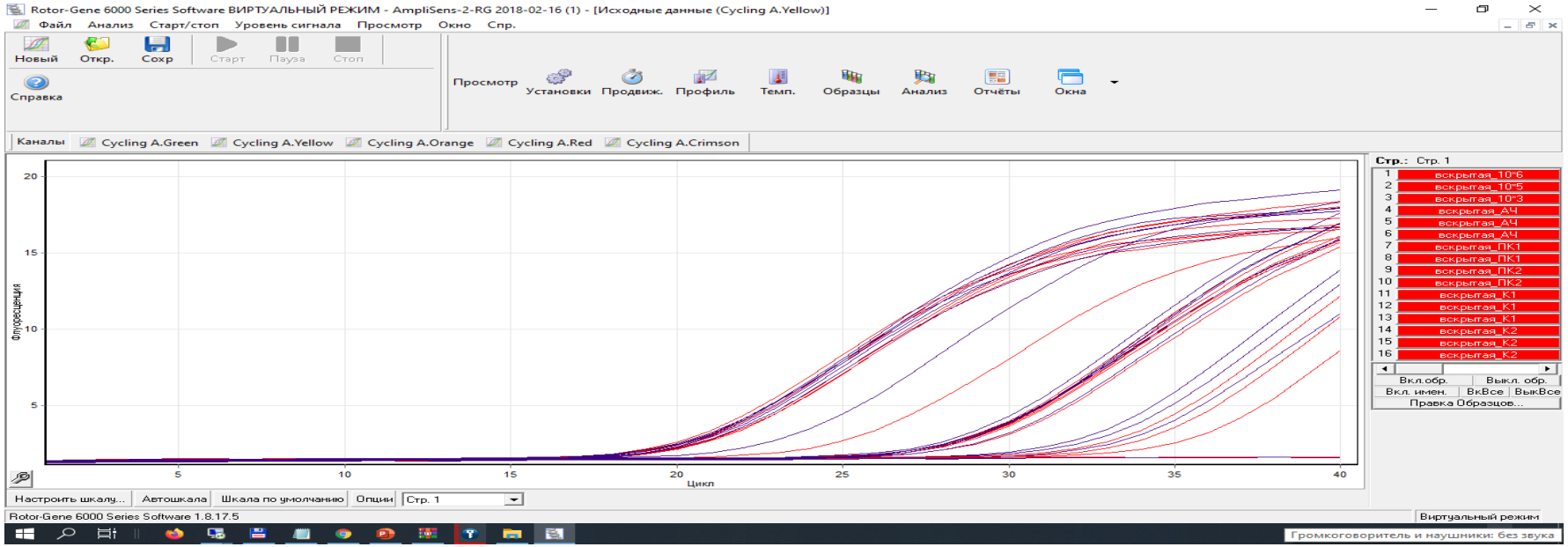
# Контаминация компонентов ПЦР-набора на производстве



| Объект КК | Ошибка | Влияние на результаты | Способы контроля |
|---|---|---|---|
| **Реагенты** | | | |
| **Наборы реагентов для экстракции** | Несоответствие аналитических характеристик инструкции. | Малый выход НК, снижение эффективности экстракции. Сдвиг среднего СТ ВКО и ПКО вправо, невалидные результаты | Тестирование положительных контролей экстракции, предварительно охарактеризованных положительных образцов в сравнении с референтной системой, расчет ДЧ и ДС. При наличии контрольных образцов с известной концентрацией – готовим разведения до границы АЧ набора и тестируем в нескольких повторах. |
| | Замена поставщика компонентов набора на производстве | Снижение качества работы набора | Проведение входного контроля серий реагентов. Постановка контролей экстракции. |
| | Нарушение условий хранения и эксплуатации набора реагентов. Неполное восстановление лиофилизированных компонентов. Многократная заморозка\разморозка. | Снижение качества реагентов и эффективности экстракции. Сдвиг среднего СТ ВКО и ПКО вправо, невалидные результаты | Тестирование компонентов набора в сравнении с другой (качественно работающей или новой) серией. Обязательная постановка контролей этапа экстракции. |

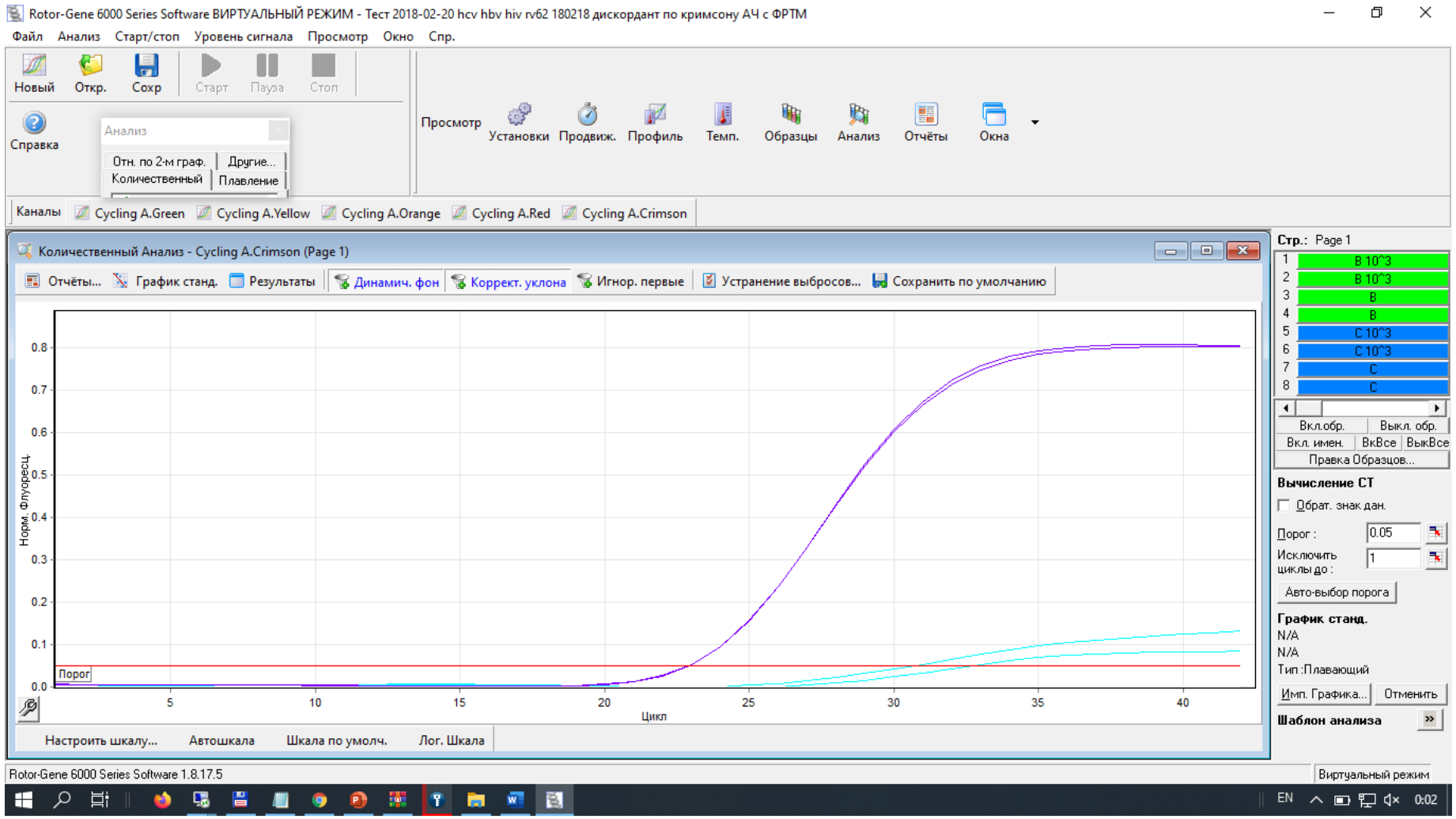
# Лиофилизированный ВКО: растворимость при восстановлении

| Раствори тель | Образец | Ct FAM | | | | | | | | Ct HEX | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Дата восстановления ВКО | | | | | | | | Дата восстановления ВКО | | | |
| | | 14.фев | ВКО медиана | 15.фев | ВКО медиана | 16.02 (утро) | ВКО медиана | 16.02 (вечер) | ВКО медиана | 14.фев | 15.фев | 16.02 (утро) | 16.02 (вечер) |
| Плазма | 10*4 | 21,8 | 22,1 | 21,9 | 22,1 | 25,1 | 25,1 | 25,6 | 26 | 26,8 | 27 | 27 | 27,2 |
| | 10*3 | 22,4 | | 22,1 | | 25,3 | | 26,5 | | 31,7 | 30,6 | 30,5 | 31,2 |
| | 10*3 | 22,1 | | 22,1 | | 24,7 | | 26 | | 30,1 | 31,1 | 30,2 | 31,6 |
| ОКО | ОКО | 20,1 | 20,2 | 20,3 | 20,3 | 23,6 | 23,85 | 23,5 | 23,5 | | | | |
| | ПКО1 | 20,3 | | | | 24,1 | | 23,5 | | 21,7 | | 22,2 | 21,7 |
| | ПКО2 | | | | | | | 23,9 | | | | | 31,7 |
| | К1 | | | | | | | 23,4 | | | | | 21,8 |
| | К2 | | | | | | | ~~31,4~~ | | | | | |

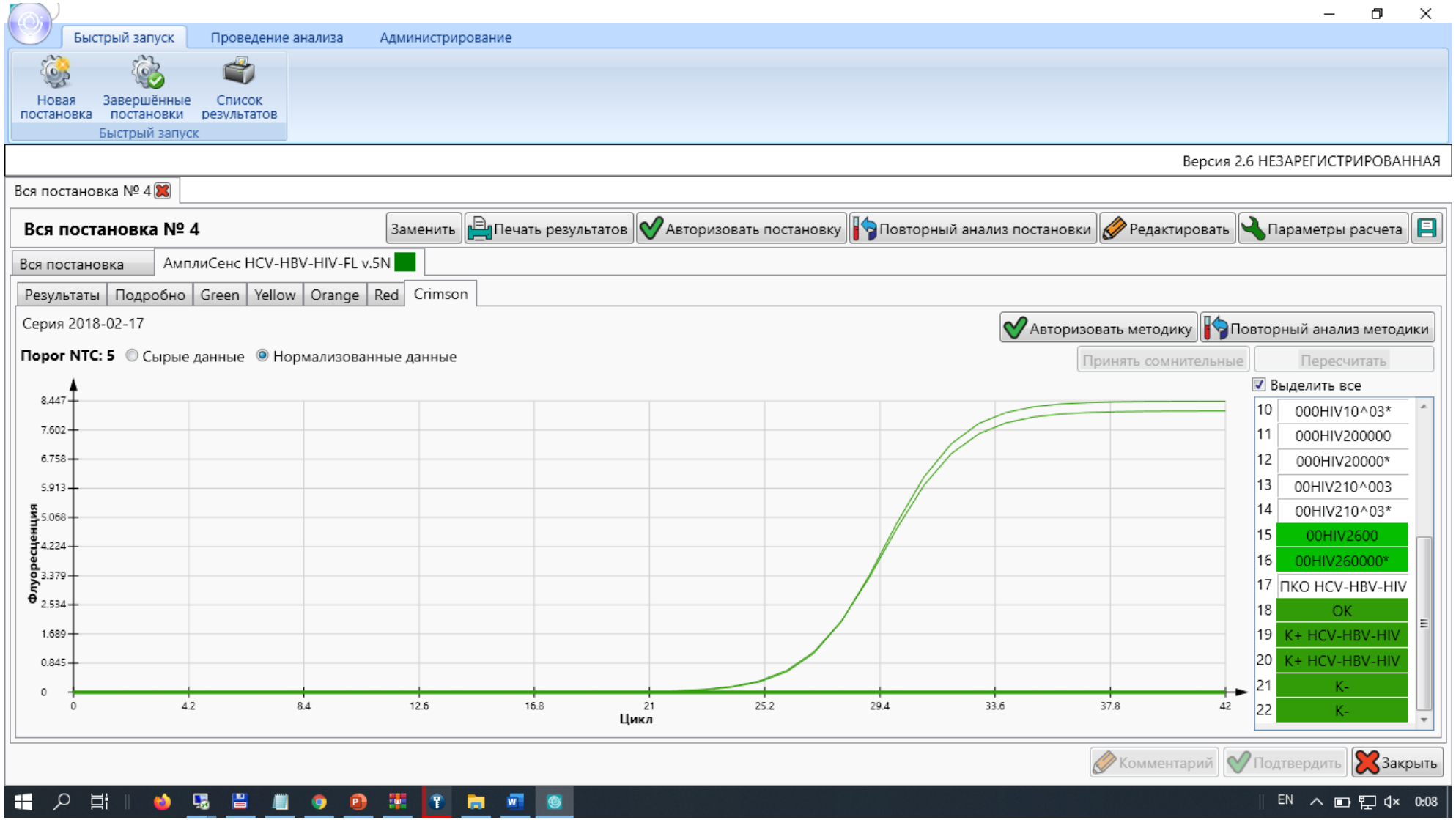


| Объект КК | Ошибка | Влияние на результаты | Способы контроля |
|---|---|---|---|
| **Программное обеспечение** | | | |
| **Программы-интерпретаторы** | Различие параметров интерпретации результатов и настроек в разных версиях ПО | Дискордантные результаты | Импортировать протоколы постановок с низкокопийными образцами, проблемные протоколы (засветка, слабое разгорание) в ПО-интерпретатор и сравнить результаты. Перестановка сомнительных и дискордантных образцов |
| | Различные алгоритмы учета результатов собственным ПО прибора и программой-интерпретатором | Дискордантные результаты для образцов и контролей. Может быть воспроизводимой ошибкой в некоторых случаях | Перестановка сомнительных и дискордантных результатов. Входной контроль реагентов |

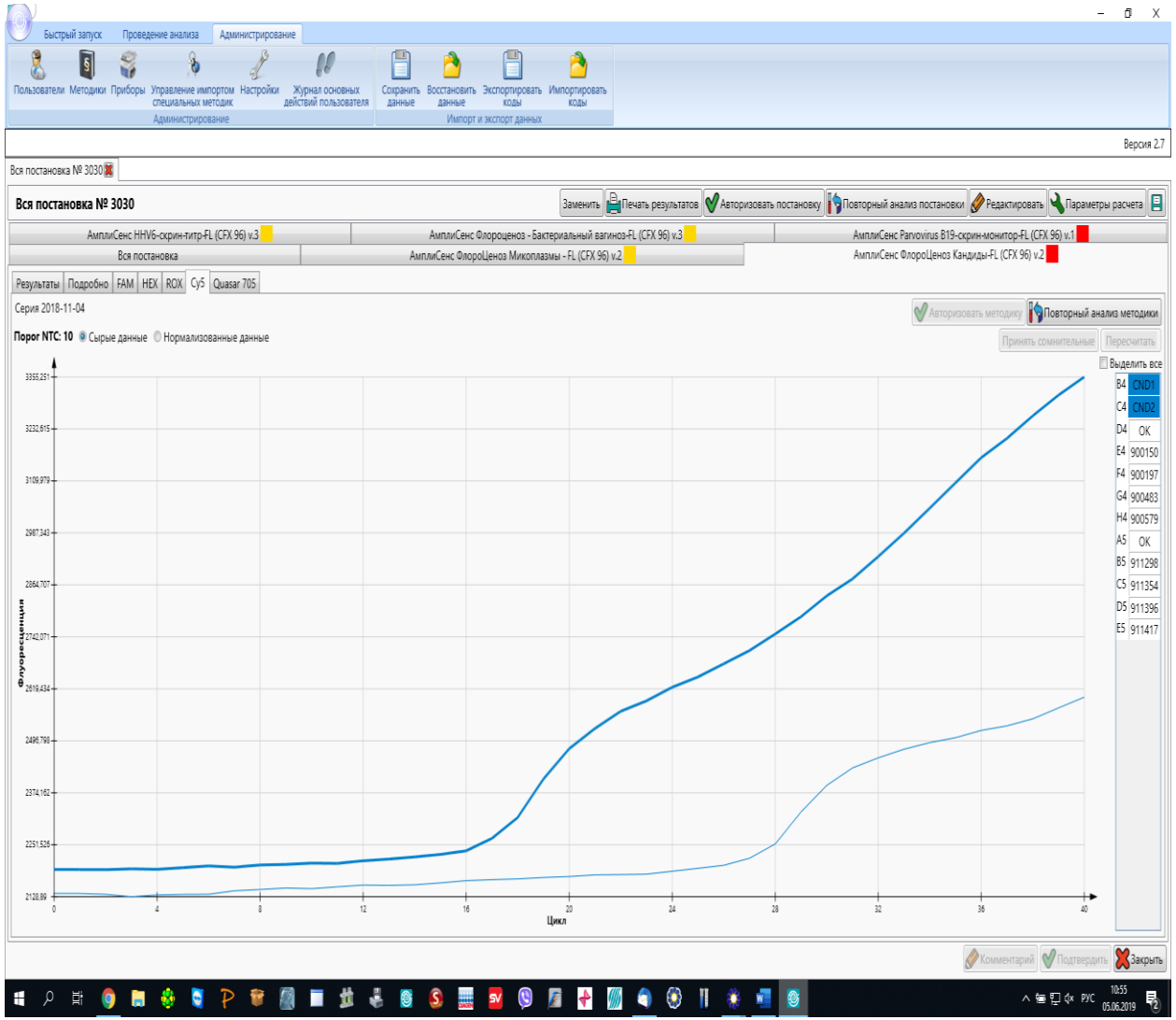
# Разные алгоритмы ПО (интерпретатор и софт прибора)

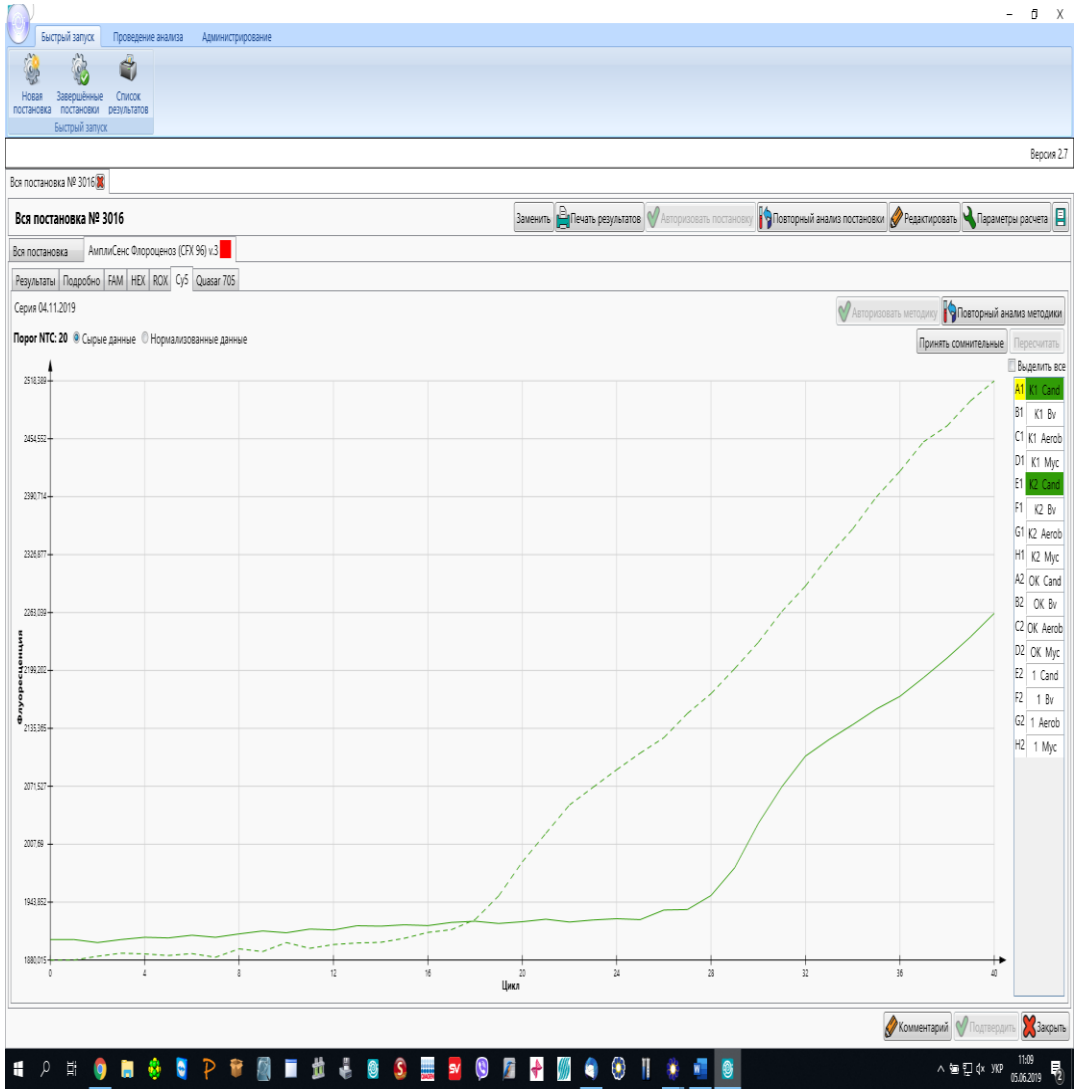


# Те же образцы – ПО-интерпретатор

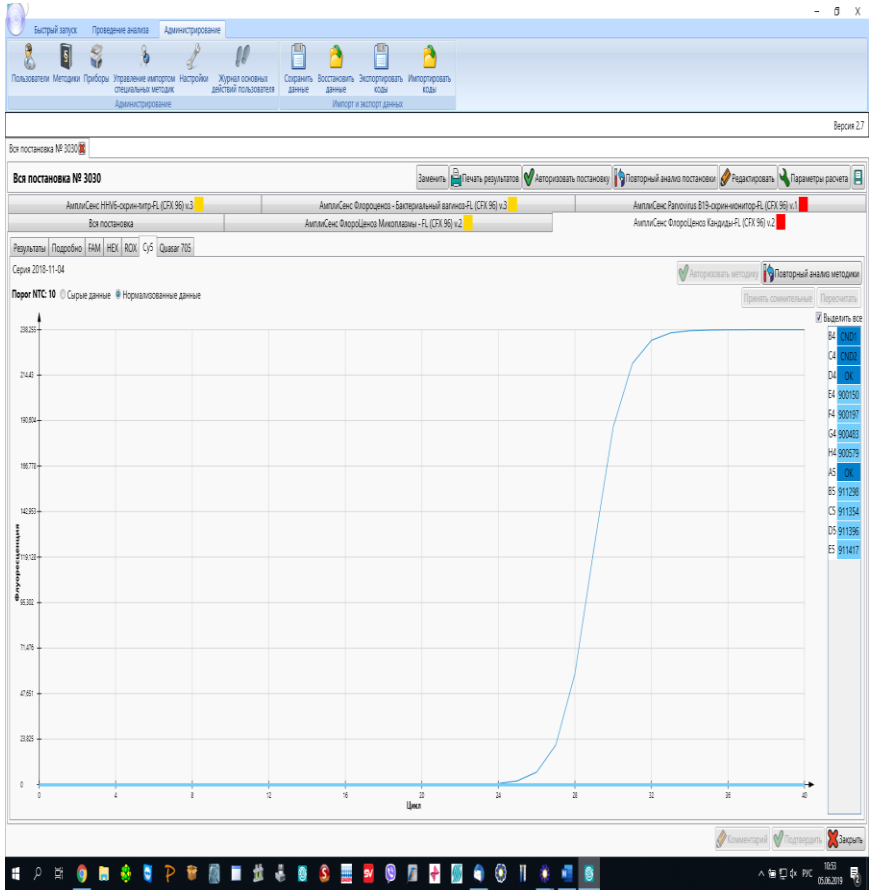


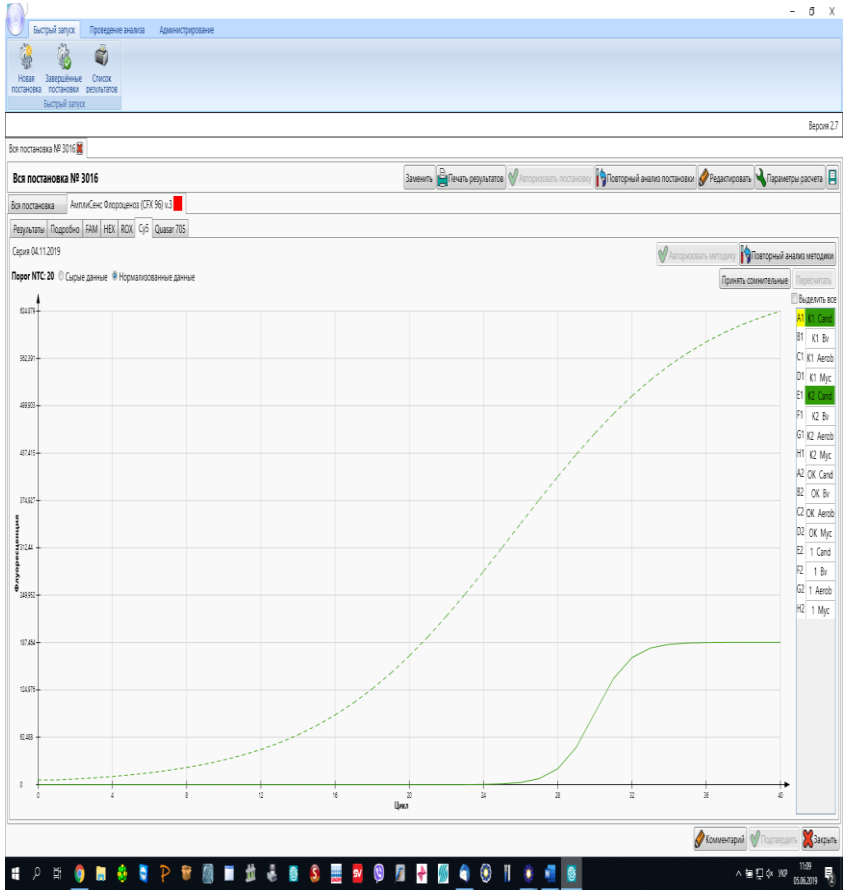
# Ошибка учета калибраторов. ПО-интерпретатор. Необработанные данные



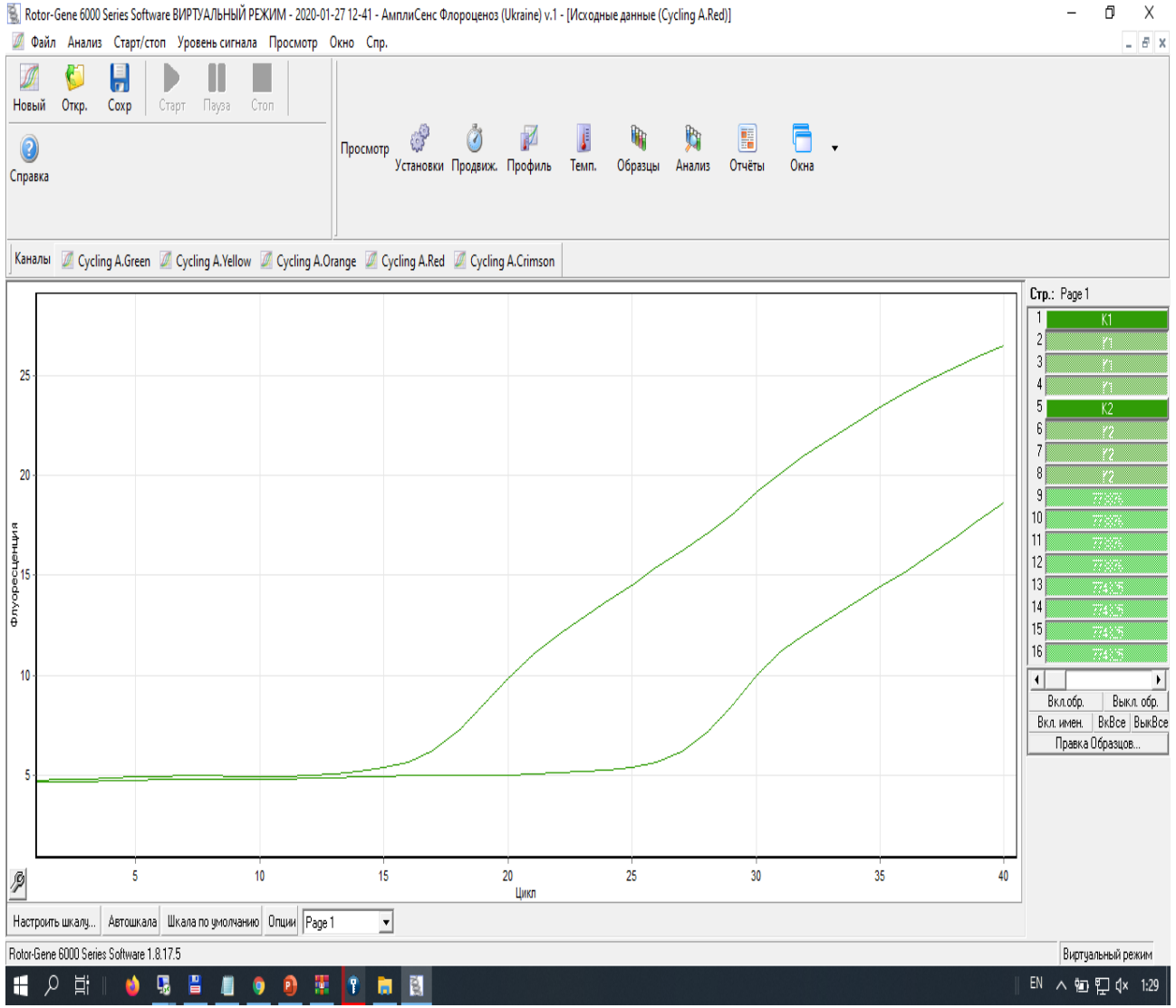



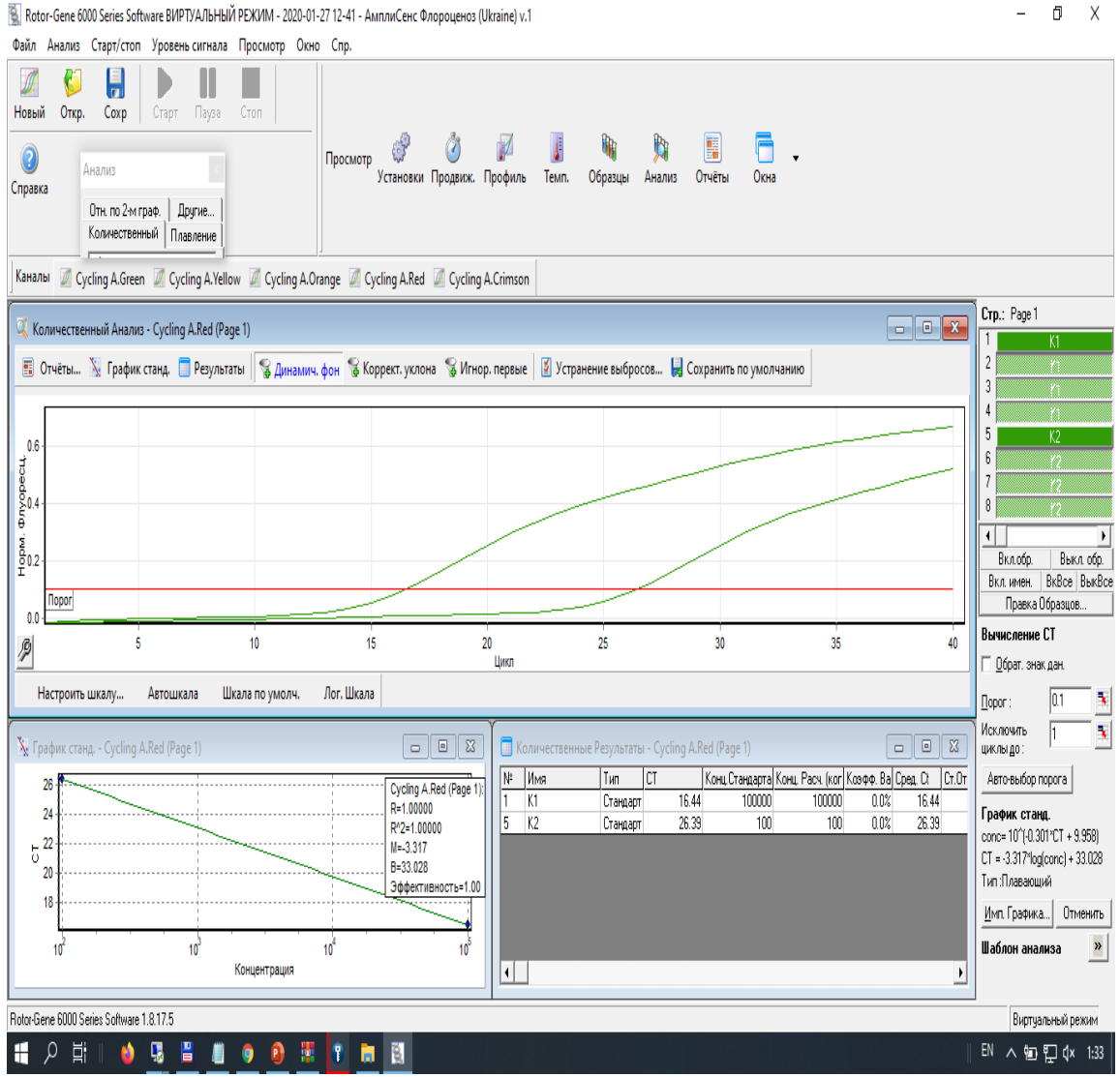
# Обработанные данные. ПО-интерпретатор



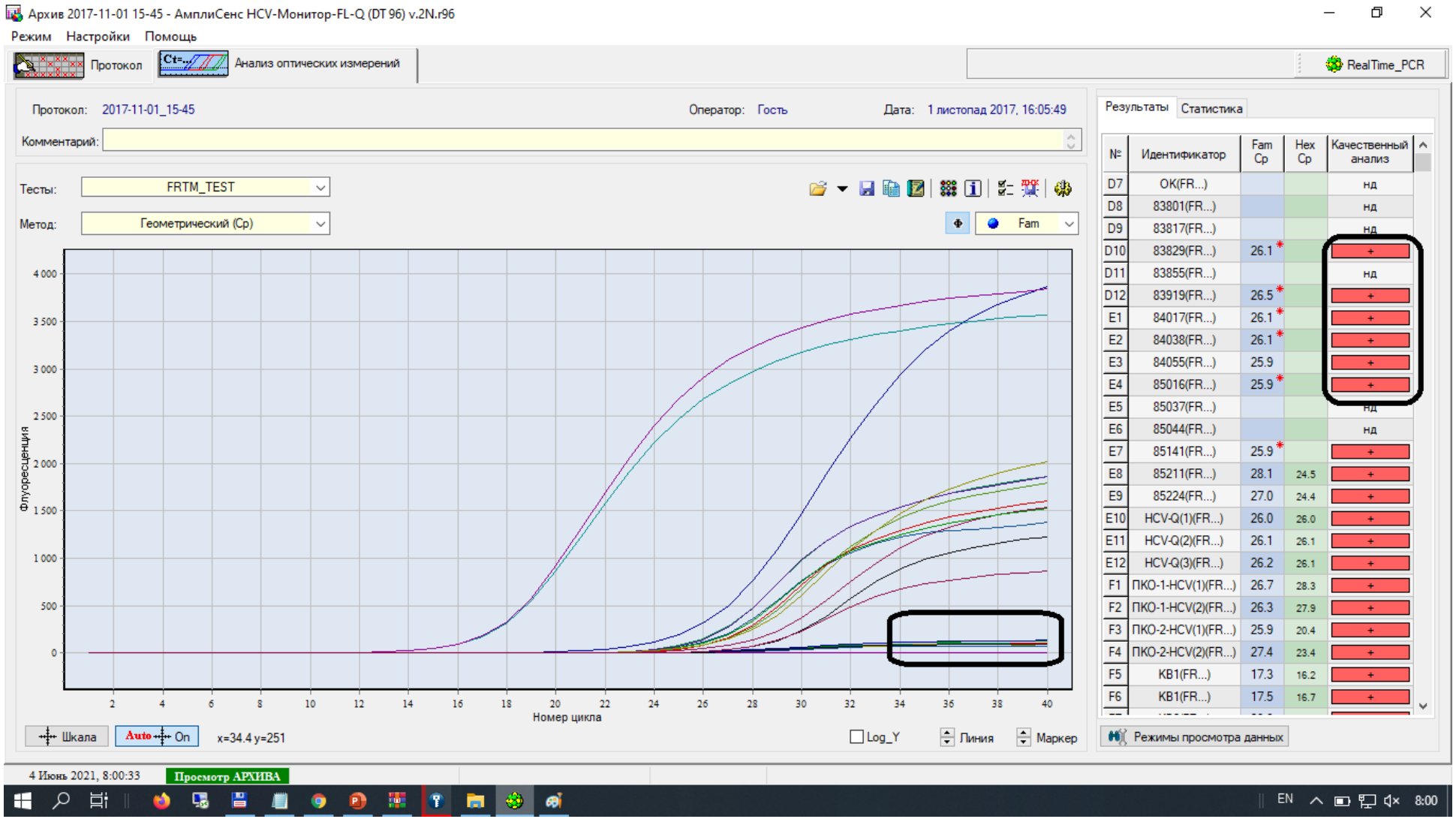



# Те же калибраторы, софт прибора. «Сырые» (слева) и обработанные (справа) данные

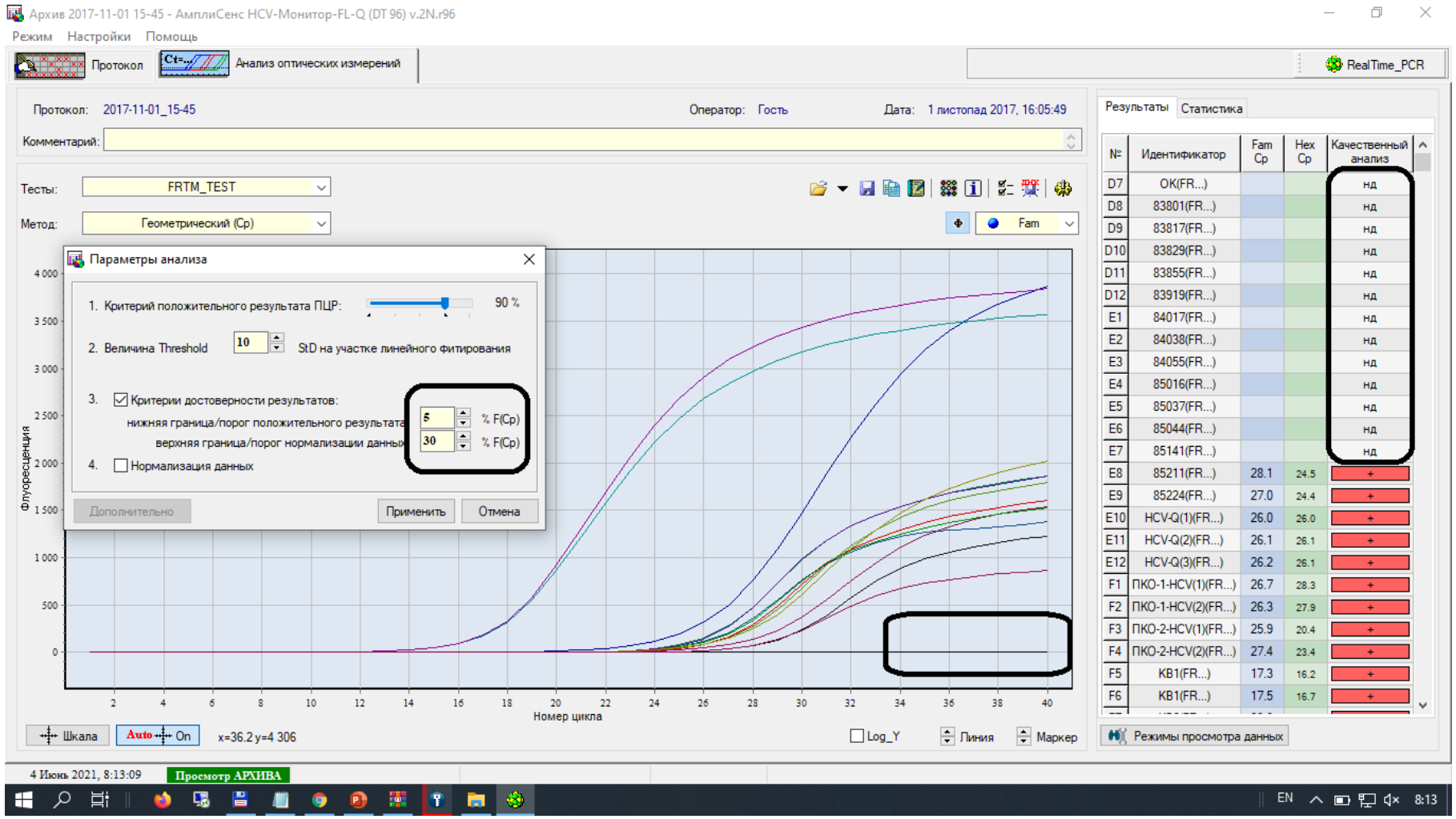


# Настройки ПО – использование параметров по умолчанию

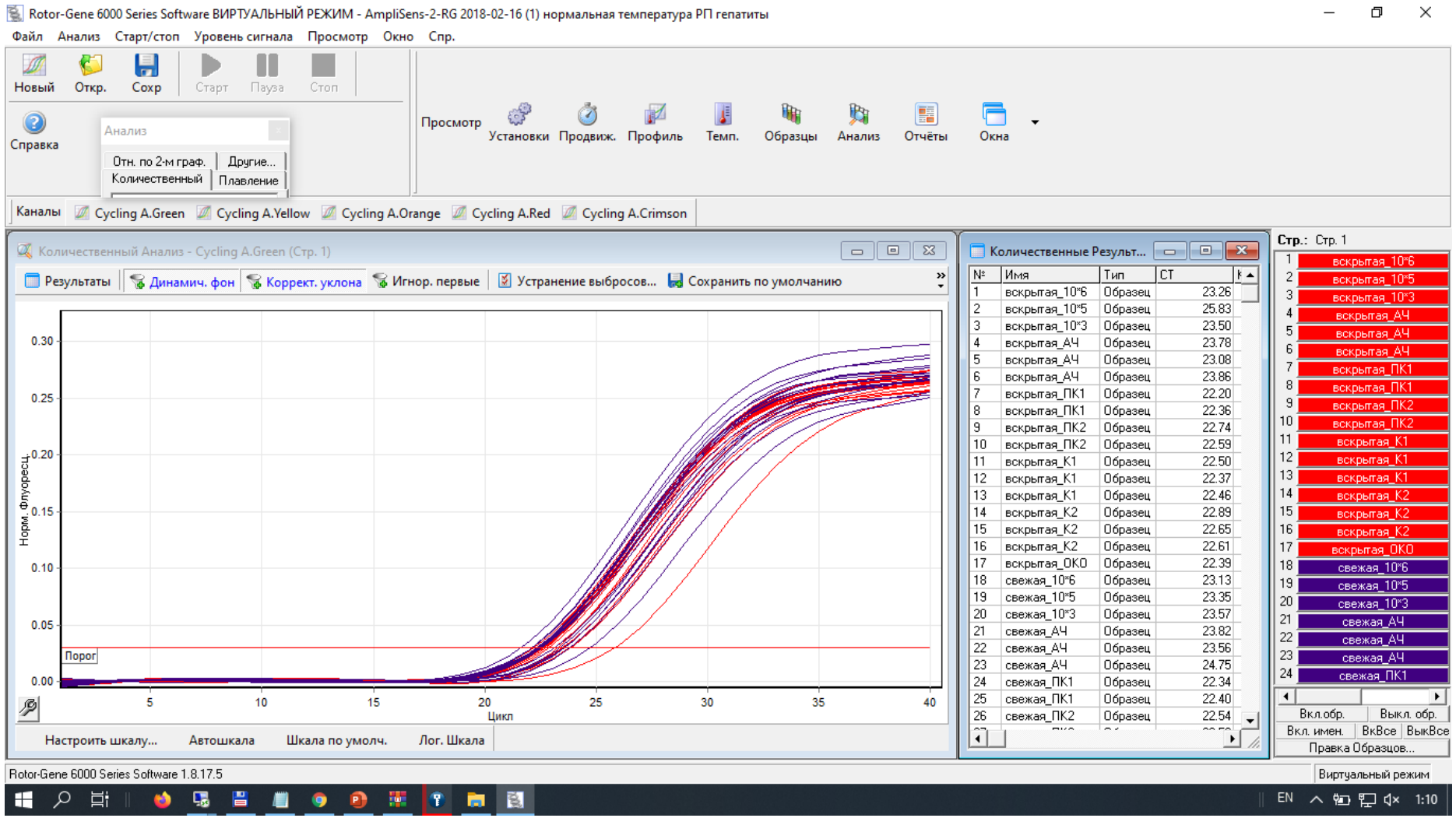


# Настройки параметров ПО – рекомендуемые параметры

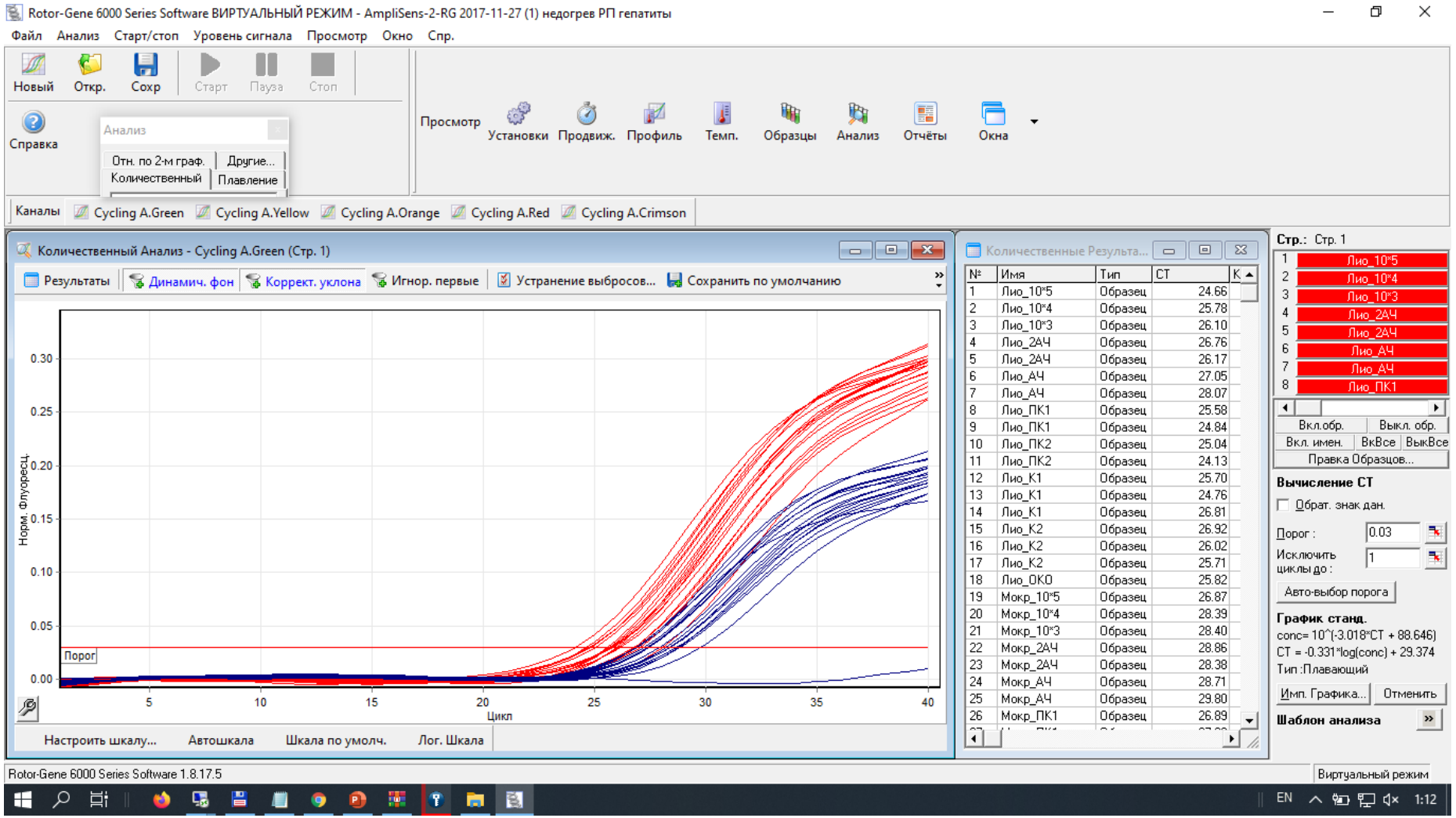


| Объект КК | Ошибка | Влияние на результаты | Способы контроля |
|---|---|---|---|
| **Лабораторный персонал** | | | |
| **Нарушения методики исследования на различных этапах анализа** | Комбинирование реагентов различных серий | Снижение эффективности ПЦР. Погрешности количественных измерений | Постановка контролей всех этапов анализа. Периодическое «слепое» тестирование лабораторным персоналом зашифрованных образцов. Автоматизация учета расхода реагентов. |
| | Нарушение методик ручной экстракции:<br>• не соблюдение временных и температурных режимов лизиса, сушки и элюции. Недосушивание \ пересушивание сорбента во время элюции.<br>• Неверная концентрация при приготовлении растворов.<br>• Пропуск этапов экстракции.<br>• Неправильный объем реагентов, вносимых в пробирки \ лунки плашки (в том числе из-за неправильного выбора объема наконечника).<br>• Захват и попадание сорбента в амплификационную смесь<br>• Неправильная постановка контрольных образцов (напр., положительного контроля экстракции на этапе амплификации)<br>• Неверная техника пипетирования<br>• Приготовление смеси «лизирующий раствор + сорбент + ВКО» заранее и длительное хранение смеси | Снижение качества экстракции отдельных образцов или постановки в целом. Появление ЛОР, невалидных результатов. Сдвиг среднего СТ ВКО вправо. Разброс значений ВКО. Невалидный положительный контроль экстракции. Кросс-контаминация на этапе экстракции. Наличие «грязи» в отрицательном контролей экстракции. | Постоянное обучение персонала. Постановка контролей всех этапов анализа. Периодическое «слепое» тестирование лабораторным персоналом зашифрованных образцов. Автоматизация этапа экстракции. |
| | Ошибки на этапе амплификации:<br>• Неверное приготовление реакционной смеси<br>• Нарушение условий хранения и эксплуатации реагентов. Хранение компонентов реакционной смеси при комнатной температуре в течение дня. Многократная заморозка/разморозка реагентов<br>• Ошибки программирования амплификатора | Снижение эффективности ПЦР. Появление невалидных результатов. | Постоянное обучение персонала. Постановка контролей всех этапов анализа. Периодическое «слепое» тестирование лабораторным персоналом зашифрованных образцов. Автоматизация этапа амплификации. |
| **Ошибки при маркировке образцов на различных этапах.** | Ошибки при аликвотировании и внесении аликвоты образца или очищенной НК в пробирки \ плашки. Перепутывание пробирок \ ориентации плашки при расстановке образцов в амплификатор. Ошибки нумерации образцов при создании протокола экстракции \ амплификации. | Выдача некорректных результатов | Автоматизация регистрации образцов, создания протоколов постановок. Создание системы отслеживания образцов на различных этапах, баркодирование пробирок \ плашек. |

# Влияние температуры экстракции на результаты. Температура экстракции согласно инструкции (65*С)



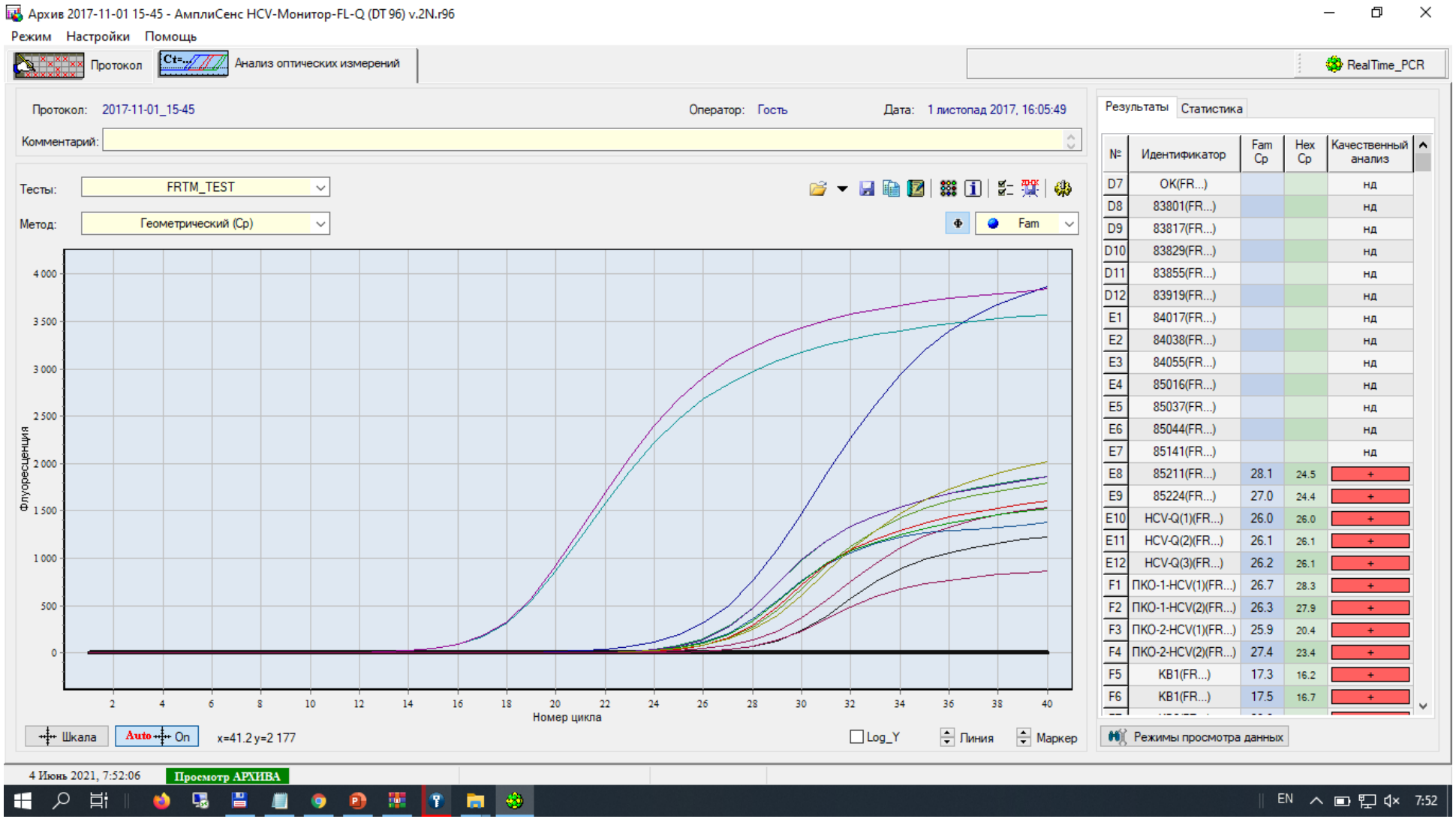
# Недогрев. Температура лизиса и элюции 60*С



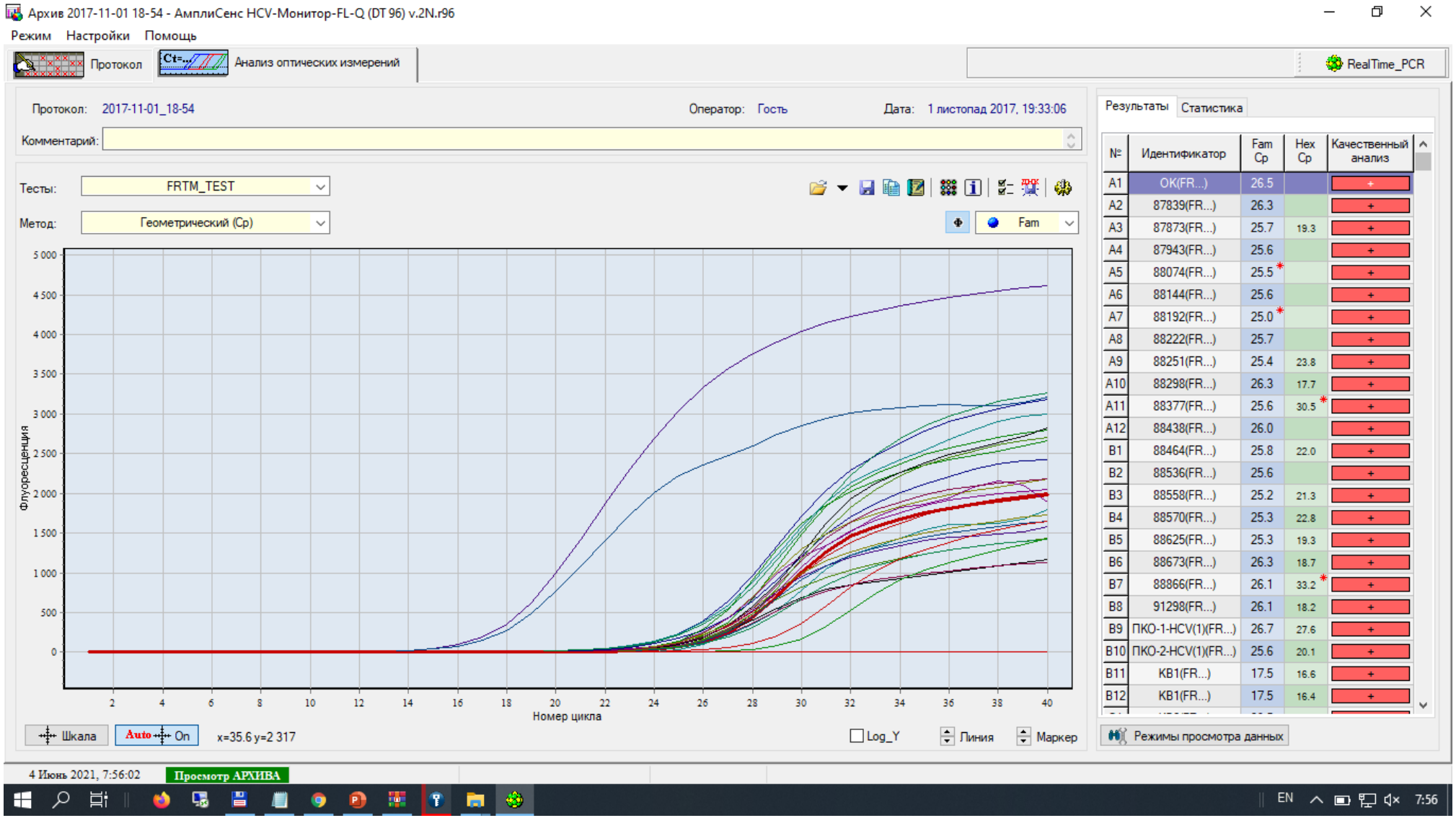
# Влияние комбинирования реагентов различных серий

| Концентрация в тест-системе сравнения, Lg | Использовался другой метод выделения | Скомбинированы реагенты 2х серий | Оригинальная тест-система |
|---|---|---|---|
| 2,86 | 3,31 | 3,94 | 3,01 |
| 4,88 | 5,09 | 5,82 | 4,93 |
| 4,02 | 4,72 | 4,93 | 3,91 |
| 3,50 | 3,89 | 4,34 | 3,55 |
| 5,13 | 5,69 | 5,74 | 5,29 |
| Средний сдвиг концентрации | **0,46 (!)** | **0,88 (!)** | **0,06** |

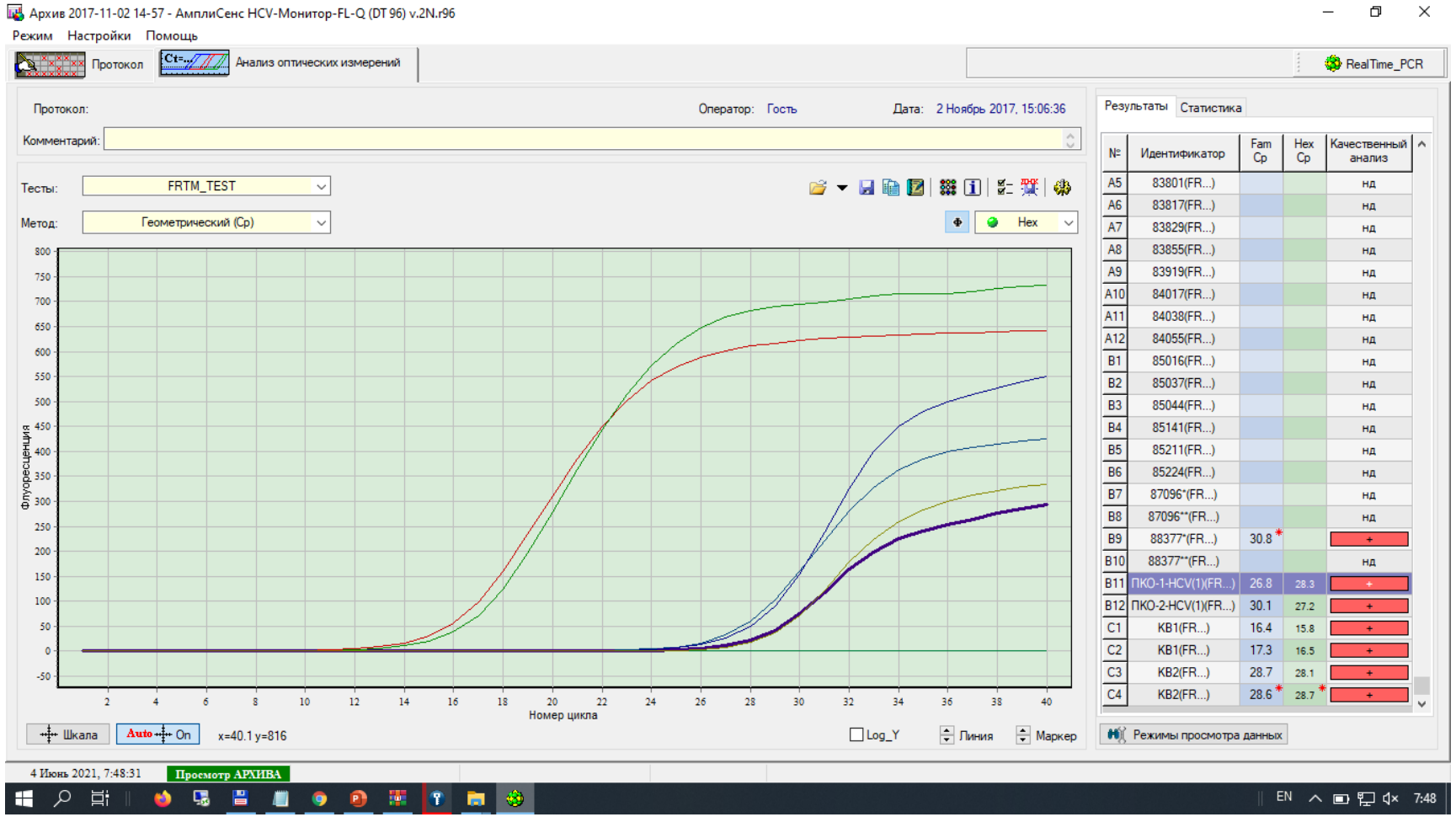
# Постановка 1 ноября 16:05



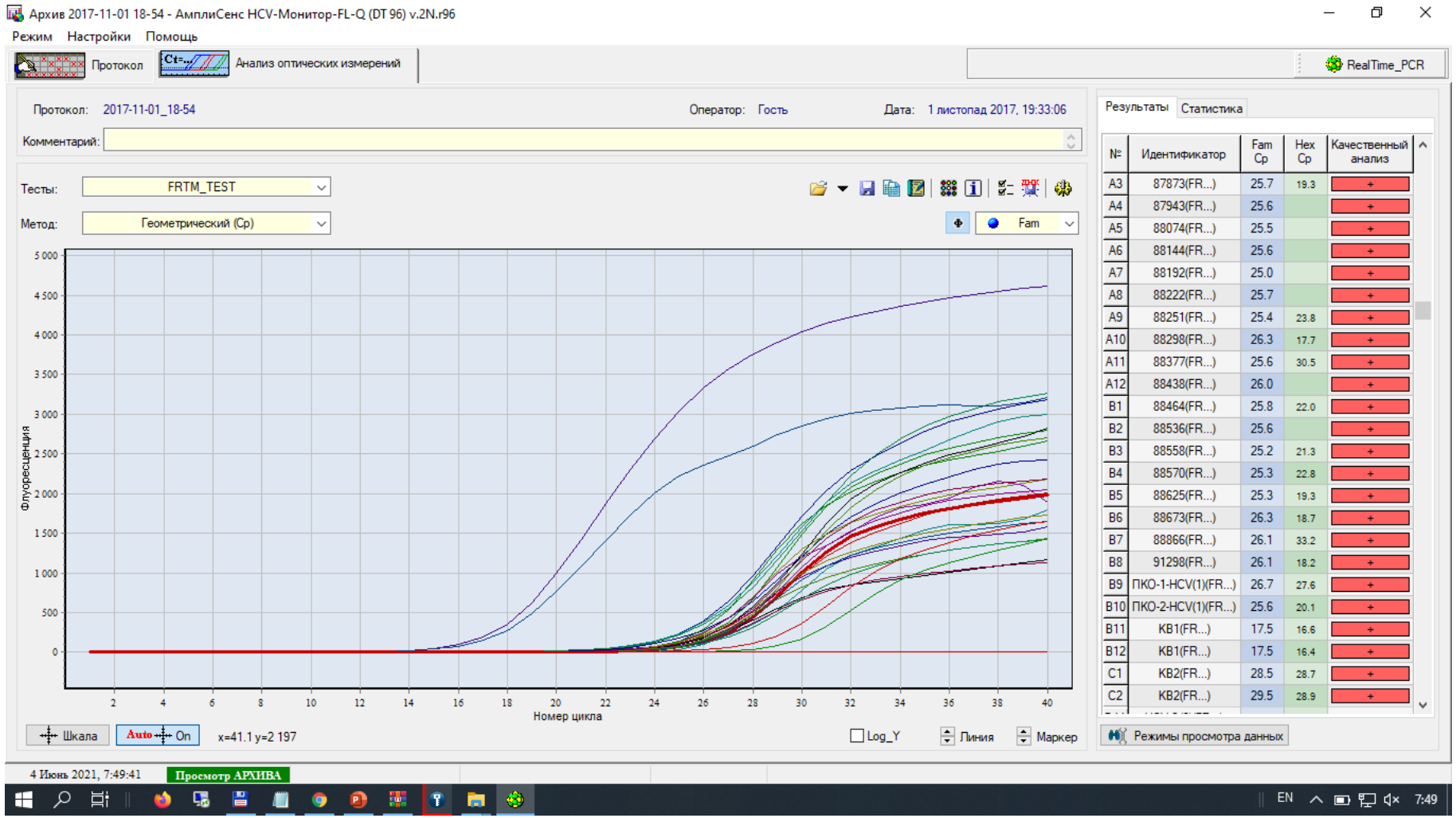
# Постановка 1 ноября 19:33



# Постановка 2 ноября 15:06



# Постановка 1 ноября 19:33



# Документация: для чего нужны СОП?

НААУ

| Реєстраційний номер заявки | 30016 |
|---|---|

**Дані про оцінювання методу досліджень**

| Параметри відстеження | Дані оцінювання |
|---|---|
| Позначення та назва методу досліджень | ПЛР метод |
| Назва досліджень та (або) характеристик (параметрів), що визначаються відповідно до сфери акредитації | ПЛР. Neisseria gonorrhoeae (у/г зішкріб, сперма, секрет простати, сеча, якісне визначення) |
| Стандартизований (офіційний) метод чи розроблений МЛ | Офіційний метод |
| Робоча інструкція по виконанню (за наявності, позначення, назва, дата затвердження) | SOP-R-Kv-P-004 «Одночасне виявлення ДНК N. Gonorrhoeae, C. Trachomatis, M. Genitalium, и T. Vaginalis. Методом ПЛР з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією»<br>Останні зміни 15.03.2016, SOP актуалізований.<br>SOP-R-Kv-P-036 «Передпідготовка біологічного матеріалу сперма, слина, сеча для подальшої екстракції ДНК» |

# Документация: для чего нужны СОПы ?

**Стандартные Операционные Процедуры (СОПы)** - описывают в деталях все рутинные операции вашей лаборатории. Они необходимы в качестве дополнения к инструкции, если вы хотите, чтобы результаты исследований воспроизводились.

В большинстве случаев СОПы содержат ответы на следующие вопросы:

- Кто выполняет анализ?
- Какой анализ выполняется?
- При каких условия анализ может быть выполнен?
- Где выполняется анализ?
- Как анализ должен быть выполнен?

# Условия получения качественных результатов анализа

# Основные принципы организации ПЦР-лаборатории

- **Разделение лаборатории на 4 рабочих зоны:**
  - I. Прием, маркировка, регистрация материала, первичная подготовка, аликвотирование
  - II. Очистка нуклеиновых кислот
  - III .Подготовка смесей
  - IV. Проведение ОТ и амплификации. Детекция

1. **Ограничение физического сообщения между зонами**
2. **Активные мероприятия, направленные на выявление контаминации и ее устранение.**

# План лаборатории молекулярной диагностики использующей МАНК с флуоресцентной детекцией

## Мероприятия, направленные на выявление контаминации – смывы в лаборатории (п. 8.10)

- Позволяют выявить факт контаминации лаборатории до появления ложно-положительных результатов, провести контроль деконтаминации
- Периодичность: 1-4 раза в месяц, после деконтаминации
- Случаи контаминации регистрируют в спец. журнале
- *Правила:*
  - смоченный в ТЕ-буфере ватный зонд проводится по рабочим поверхностям лаборатории (10-15 секунд)
  - Зонд погружается в 400 мкл ТЕ-буфера, отжимается и выбрасывается, суспензию центрифугируют
  - Полученный раствор исследуют методом ПЦР с внутренним контролем

**Задание:** предложите план действий при возникновении аварийной ситуации (контаминация лаборатории)

# Условия получения качественных результатов анализа

# Условия получения качественных результатов анализа

# Система контроля качества (a quality control system)

# Этапы внутреннего контроля ПЦР-лаборатории

1. Выборочный экспертный пересмотр *кривых флуоресценции* (Real-time PCR)
2. Слежение за качеством прохождения контрольных точек
3. Регулярное использование шифрованных аттестованных образцов (контрольных панелей) – не реже 1 раза в квартал
4. Входной контроль расходных материалов и реагентов
5. Внутрилабораторные смывы на контаминацию

## Мероприятия, направленные на выявление контаминации – смывы в лаборатории (п. 8.10)

- Позволяют выявить факт контаминации лаборатории до появления ложно-положительных результатов, провести контроль деконтаминации
- Периодичность: 1-4 раза в месяц, после деконтаминации
- Случаи контаминации регистрируют в спец. журнале
- *Правила:*
  - смоченный в ТЕ-буфере ватный зонд проводится по рабочим поверхностям лаборатории (10-15 секунд)
  - Зонд погружается в 400 мкл ТЕ-буфера, отжимается и выбрасывается, суспензию центрифугируют
  - Полученный раствор исследуют методом ПЦР.

# BIOLOGICAL CONTROL OF QUALITY PCR
# ЖУРНАЛ ВНУТРИЛАБОРАТОРНОГО КОНТРОЛЯ МЕТОДОМ СМЫВОВ

valid from
действительно с

Дата_____ ФИО исполнителя _____

| № п/п | Место взятия смыва | Chlamydia | Ureaplasma spp. | Mycoplasma | Mycoplasma | Gardnerella | Trichomonas | ВПЧ ВКР скрин 16-67 | HSV 1, 2 | EBV/CMV/HHV-скрин-FL | EBV | Toxoplasma gondii | Candida albicans | Neisseria | HCV | HBV |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Комната сортировки материала | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | Бокс (рабочая поверхность, штатив) | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | Стол для сортировки материала | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | Дверные ручки | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | Передаточное окно | | | | | | | | | | | | | | | |
| Комната выделения НК №1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | Бокс №1 (рабочая поверхность, штатив) | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | Бокс №2 (рабочая поверхность, штатив) | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | Бокс №3 (рабочая поверхность, штатив) | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | Автоматическая система для выделения нуклеиновых кислот King Fisher Flex 96 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 11 | Дверные ручки | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | Передаточное окно | | | | | | | | | | | | | | | |
| Комната выделения НК №2 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 13 | Бокс №1 (рабочая поверхность, штатив) | | | | | | | | | | | | | | | |
| 14 | Бокс №2 (рабочая поверхность, штатив) | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | Бокс №3 (рабочая поверхность, штатив) | | | | | | | | | | | | | | | |
| 16 | Бокс №4 (рабочая поверхность, штатив) | | | | | | | | | | | | | | | |
| 17 | Бокс №5 (рабочая поверхность, штатив) | | | | | | | | | | | | | | | |
| 18 | Автоматическая система для выделения нуклеиновых кислот King Fisher Flex 96 (1) | | | | | | | | | | | | | | | |
| 19 | Автоматическая система для выделения нуклеиновых кислот King Fisher Flex 96 (2) | | | | | | | | | | | | | | | |
| 21 | Дверные ручки | | | | | | | | | | | | | | | |
| 22 | Передаточное окно | | | | | | | | | | | | | | | |
| Комната амплификации | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 23 | Бокс №1 (рабочая поверхность, штатив) | | | | | | | | | | | | | | | |
| 24 | Бокс №2 (рабочая поверхность, штатив) | | | | | | | | | | | | | | | |
| 25 | Рабочее место №1 (поверхность стола, ДТ) | | | | | | | | | | | | | | | |
| 26 | Рабочее место №2 (поверхность стола, ТагМан) | | | | | | | | | | | | | | | |

# Задание

Привести протокол действий лабораторного персонала в случае подозрения на контаминацию

Спасибо за внимание