

Невизначеність кількісних вимірів в ПЛР



**World Health
Organization**
REGIONAL OFFICE FOR Europe

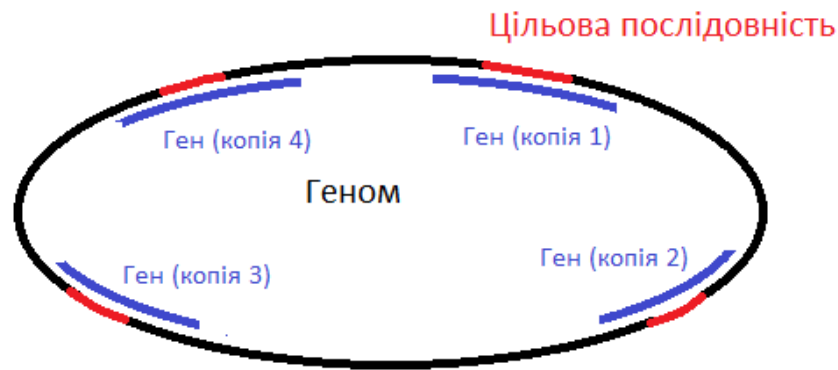
Лора Чернишова,
Лабораторний офіцер Бюро ВОЗ в Україні,
chernyshoval@who.int

Одиниці виміру в ПЛР

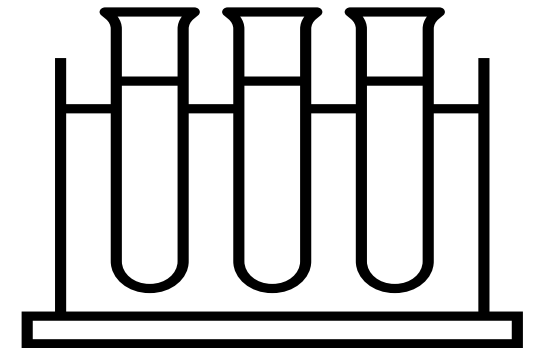
- Копії НК-мішені в одиниці об'єму (напр., **копій/мл**) — одиниця виміру кількості молекул ДНК, що містять певну послідовність.



- Геномні еквіваленти в одиниці об'єму (**ГЕ/мл**)



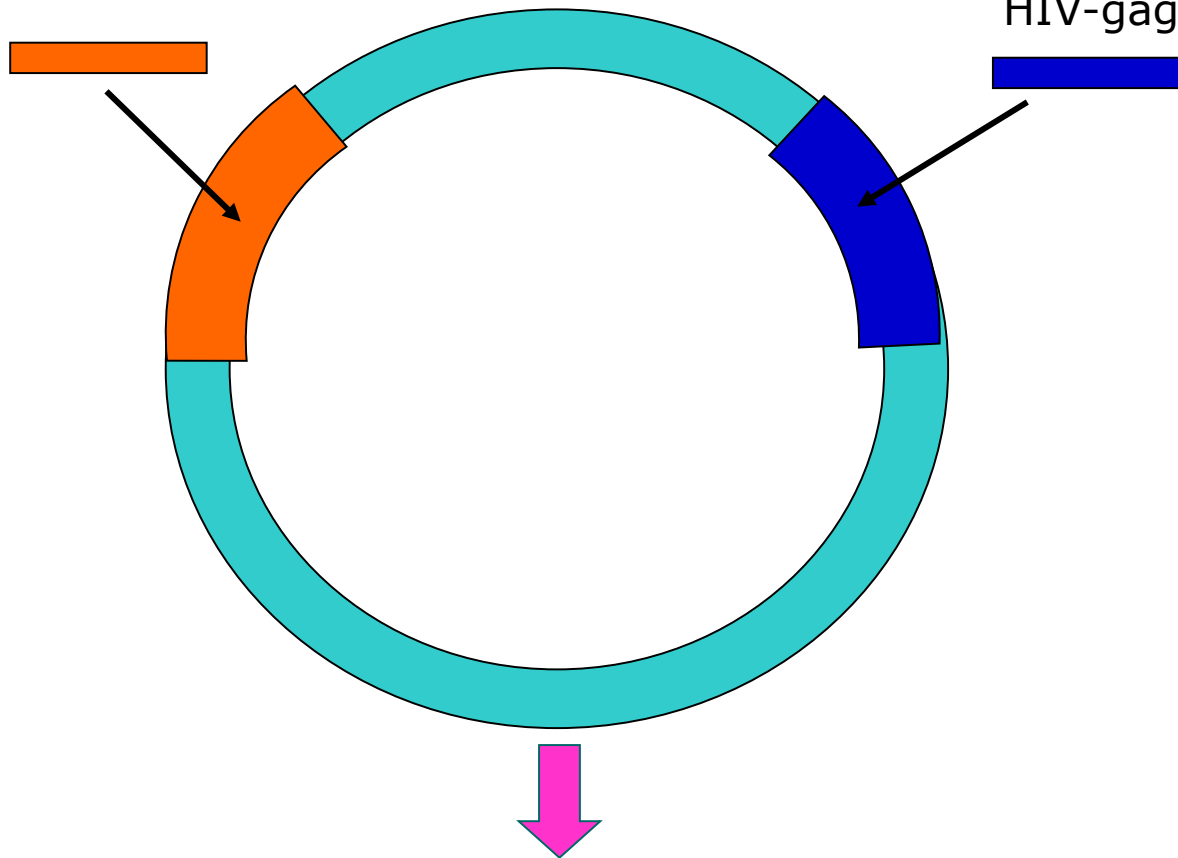
- Міжнародні одиниці (**МО/мл, IU/ml**)



Міжнародний стандарт

РНК-мішень

Маркерна послідовність
HIV-gag



Вимірювання концентрації ділянки gag за допомогою тест-системи Amplicor HIV-1 Monitor

Кількість gag = кількість цільової РНК

Підтвердження в стандартизованих тестах по цільовій послідовності

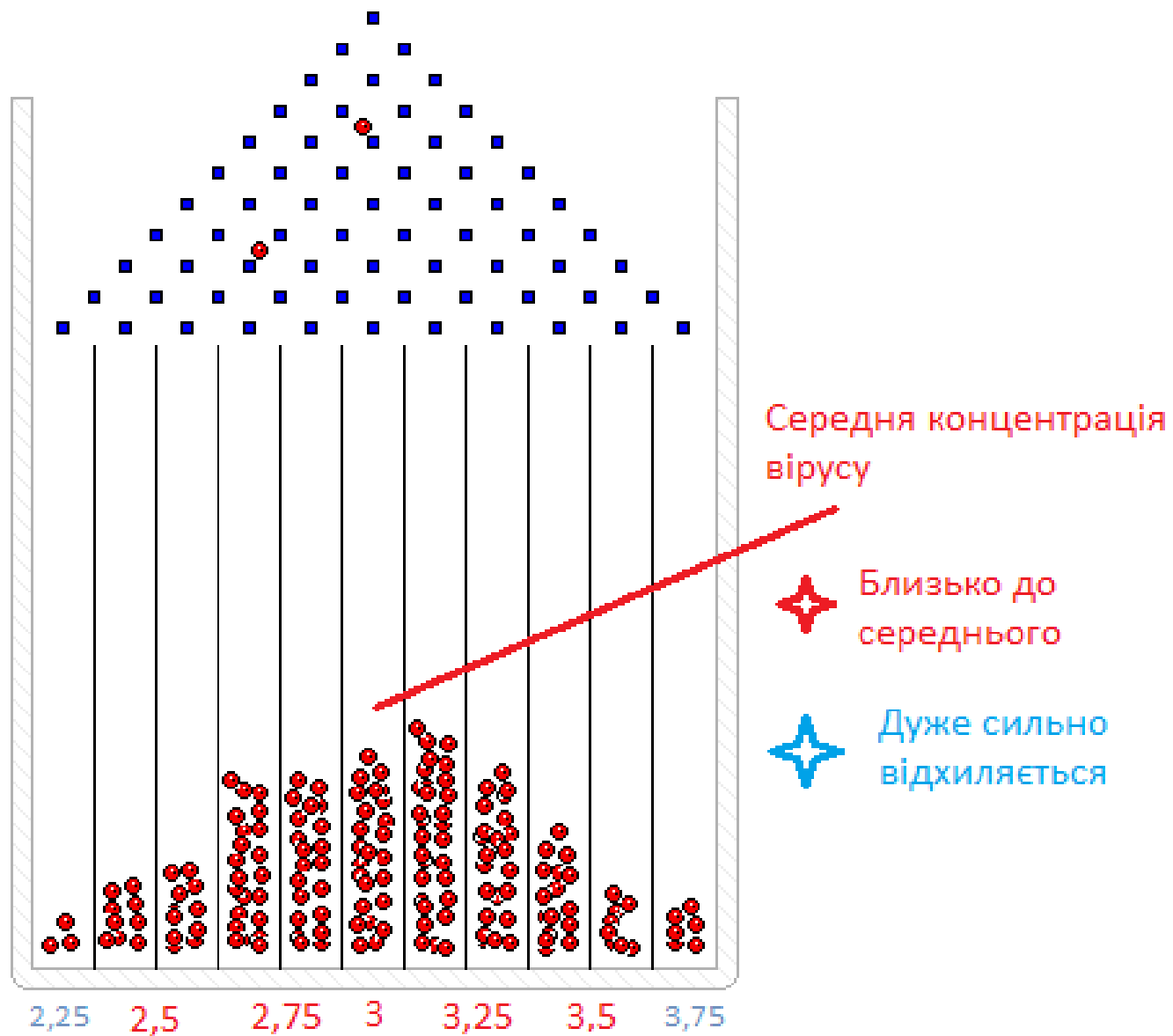
Шкали вимірювання концентрації

Всі молекулярні методи виконують вимірювання в логарифмічній шкалі (вимірюють порядки, а не абсолютні значення)

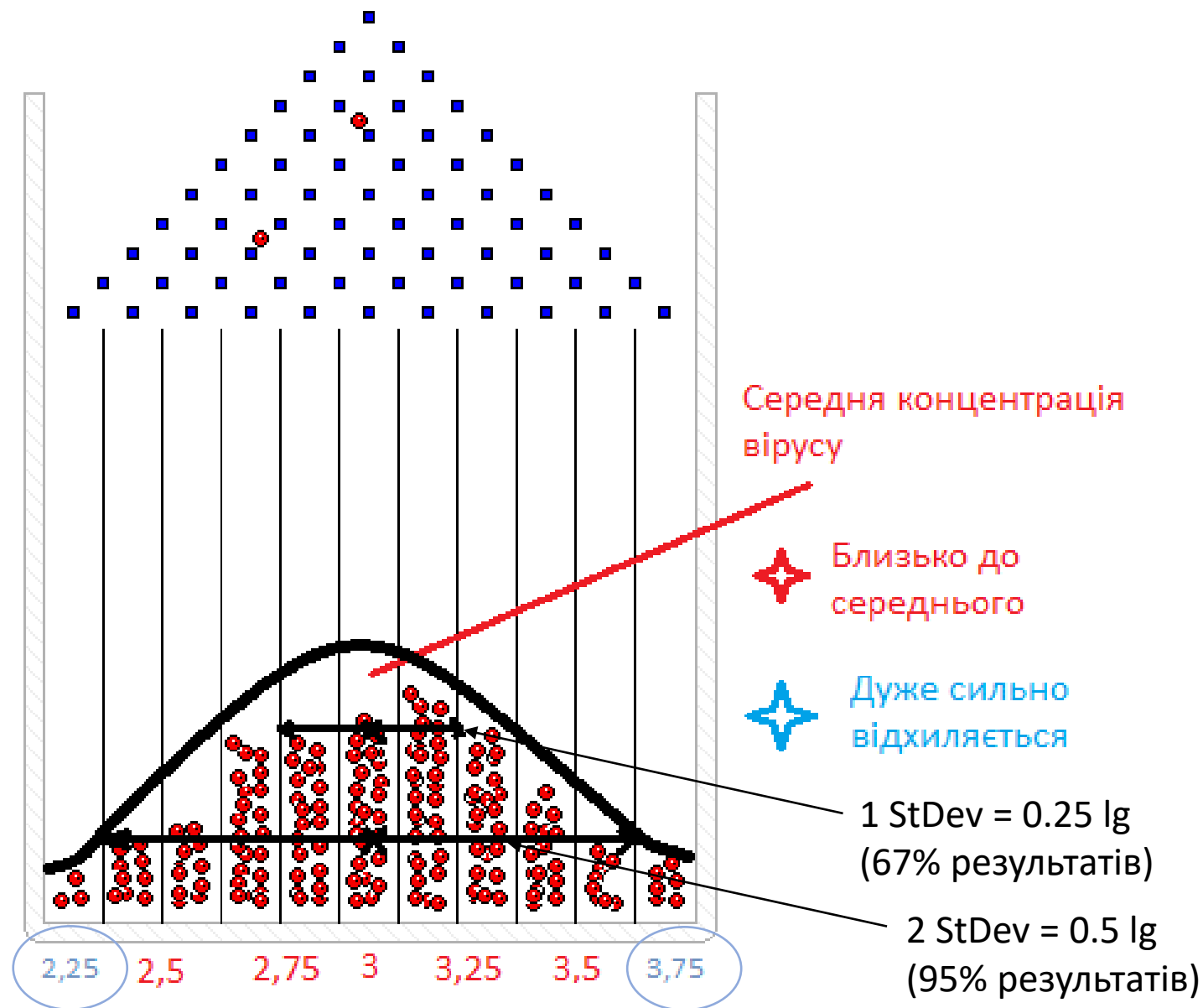
Розрахунки концентрації мішені проводяться строго в логарифмах, і лише після цього перераховуються в абсолютні значення

Логарифм концентрації – показник ступеня, до якого необхідно піднести 10, щоб отримати значення концентрації
 $\lg(1000) = 3$ тобто $10^3 = 1000$, $10^{0,5} = 3,2$

Стандартне відхилення



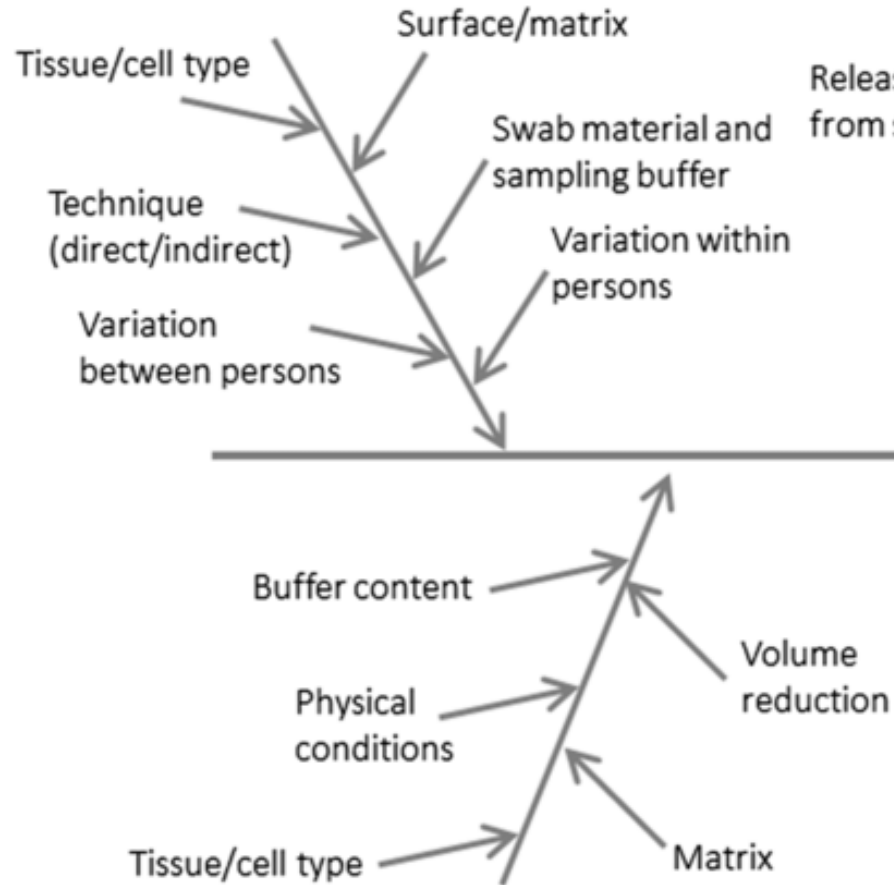
Стандартне відхилення



Відтворюваність кількісних результатів ПЛР

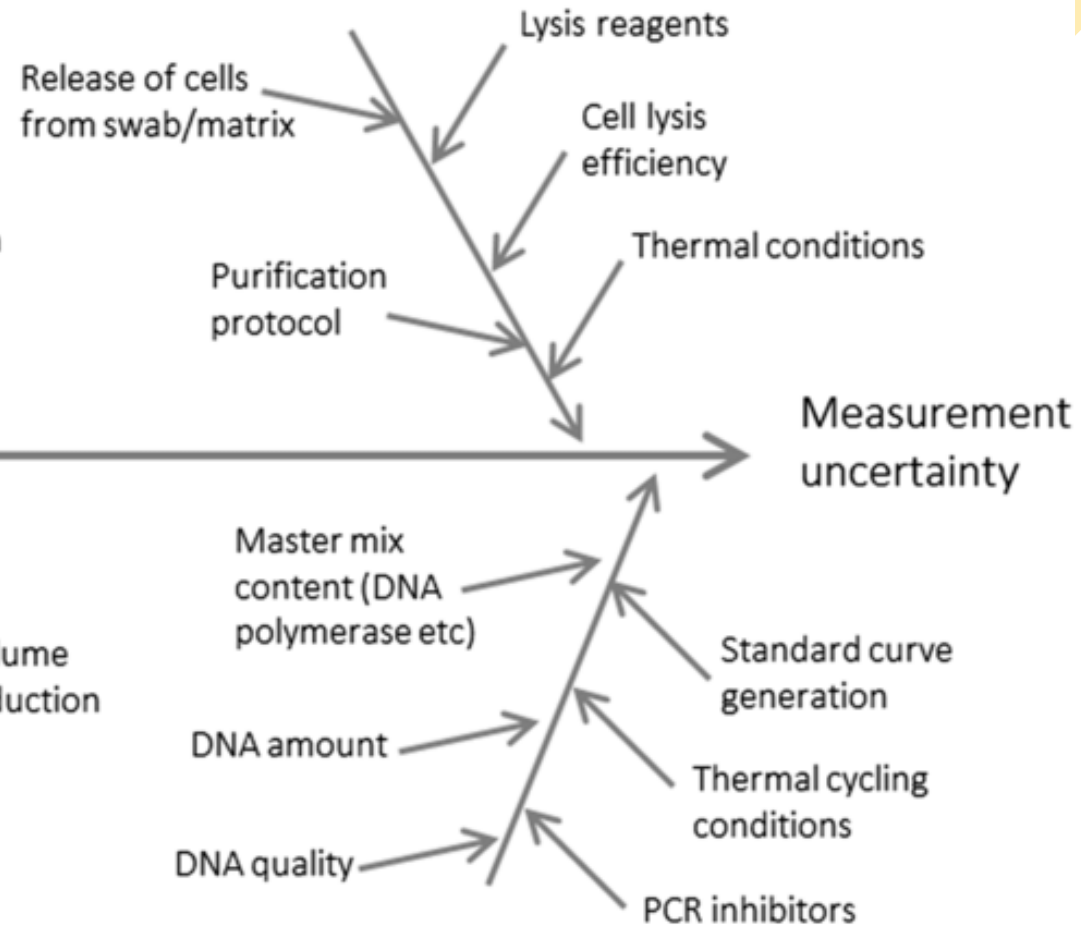
- Для більшості кількісних тестів відповідно до інструкції величина 1 стандартного відхилення знаходиться в діапазоні 0,2–0,3 Lg:
- **Для 95% результатів** різниця логарифмів двох послідовних вимірів буде знаходитись в діапазоні 0,4–0,6 Lg (тобто кількісні результати можуть розрізнятись **в 3-4 рази!**)
- Відмінність виміряної величини від істинної для 95% зразків не більше ніж на +/- 0,5 lg, або в 3,2 рази **вважається задовільним.**
- 5% результатів будуть відрязнятись більше ніж на 0,4–0,6Lg

Sampling



Sample treatment

DNA extraction/purification



qPCR measurement

Правильність

- Правильність (англ. *trueness*) – ступінь близькості середнього значення, отриманого на основі багатьох досліджень стандартного зразка, до прийнятого опорного значення
- Характеристикою правильності є величина систематичної похибки (англ. *Bias*):
 - Дослідити аналітичний матеріал (напр., не менше 20 повторів ПКЗ чи стандарту з відомою концентрацією)
 - Розрахувати середнє арифметичне
 - Зсув отриманого значення має бути не більше $\pm 25\%$ від опорного значення
- Якщо стандарт з відомою концентрацією відсутній, використати методи абсолютного (а не відносного) підрахунку концентрації аналіту
 - Digital PCR
 - Електронна мікроскопія тощо

Прецизійність

Прецизійність – це ступіть близькості один до одного **незалежних** результатів, отриманих в конкретних, регламентованих умовах

Повторюваність (прецизійність незалежних результатів в ідентичних умовах)

Відтворюваність (прецизійність незалежних вимірів в різних умовах)

Проміжна прецизійність (дослідження виконується водній лабораторії, умови частково відрізняються, що дозволяє охарактеризувати вплив кожного фактору на прецизійність)

Внутрішньосерійна

Міжсерійна

Прецизійність

Мірою прецизійності \ непрецизійності є:

- **Стандартне відхилення.** Недолік: залежить від копійності зразка. Чим вище копійність, тим більше величина стандартного відхилення
- **Коефіцієнт варіації** – виражається в відсотках. Є відношенням стандартного відхилення до середнього арифметичного сукупності результатів вимірів (**увага:** використовуємо середнє арифметичне власних вимірів, а не значення концентрації стандарту чи ПКЗ з інструкції чи паспорту на препарат!).
- Для розрахунку достатньо 20 вимірів.
- Прийнятними величинами повторюваності та відтворюваності вважають $CV \leq 15-25\%$, проте єдиної думки немає.

Запитання	Відповіді
Як часто оцінювати правильність та прецизійність?	<p>Обов'язково: при верифікації нової методики чи верифікації після внесення змін в існуючу методику.</p> <p>Періодично: правильність перевіряється включенням позитивних контролів (зазвичай кількісно охарактеризованих) в кожну постановку</p> <p>Бажано: перевіряти періодично для оцінки якості роботи обладнання, реагентів та персоналу. Періодичність та об'єм визначається лабораторією (СОП)</p>
Чи потрібно перевіряти правильність \ прецизійність на всіх приладах?	Бажано, особливо за умови відсутності періодичного сервісного обслуговування, оскільки це дозволяє вчасно зафіксувати проблеми в роботі обладнання
Від чого залежить допустима величина прецизійності?	Від серій реагентів, ступеню автоматизації дослідження, методики екстракції тощо. В ході верифікації визначається допустима величина прецизійності для кожної методики.
Чи можливо розрахувати прецизійність для якісних тестів?	Можна використовувати значення Ст екзогенного ВКЗ замість значень концентрації.
Що робити, якщо при верифікації методики коефіцієнт варіації при оцінці прецизійності перевищує прийняте лабораторією граничне значення?	<p>Можливі причини непрецизійності: 1. Вихід з ладу температурної частини ампліфікатора, 2. Невідповідність пластика типу ампліфікатора, 3. недотримання температурних умов зберігання реагентів, їх багаторазове заморожування \ розморожування або недотримання часу відновлення ліофілізату, 4. Помилки піпетування, невідкалібровані дозатори, невідповідність наконечників дозатору, 5. Методика екстракції \ попередньої обробки зразка не відповідає виду біоматеріалу, 6. Поломки станції екстракції, невідвалідований протокол екстракції.</p>

Дякую за увагу