

BIO-RAD

НЕЗАВИСИМЫЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА В МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ: ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Андрей Кулаковский

*Старший специалист по направлению «контроль качества» Био-Рад лаборатории
Специалист по контролю качества, Централизованная Лабораторно-
диагностическая службы Клинического центра Сеченовского университета*

Иркутск. Август, 2024

Необходимость использования молекулярных контролей в рутинной практике лаборатории. Обзор нормативных требований (ISO 15198, приказ 464н, ...)

Как выглядит?



Зачем используется контроль качества (КК)?

- Для измерения **воспроизводимости** и **правильности**
- В связи со **сбоями системы**
- В связи с требованиями **производителя**
- И иногда, потому что это **обязательно?**

Да, для всех этих целей ...



=> но сначала и прежде всего, чтобы **удостовериться в надежности результатов пациентов.**

Результаты лабораторных тестов используются для постановки диагноза, в планировании и мониторинге лечения.

Нормативные документы

- ПРИКАЗ от 18 мая 2021 года N 464н Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований (с 1 сентября 2021г.)



1. Настоящие Правила устанавливают порядок организации и проведения клинических лабораторных исследований.

*4. Клинические лабораторные исследования включают в себя следующие виды: химико-микроскопические, гематологические, цитологические, биохимические, коагулологические, иммунологические, **молекулярно-генетические**, химико-токсикологические.*

*“Лаборатория должна иметь **систему управления качеством** клинических и микробиологических лабораторных исследований, разработанную **в соответствии с требованиями национальных и отраслевых стандартов**, внутрилабораторный контроль качества исследований и регулярное участие в программах межлабораторных сравнительных (сличительных) испытаний”*

Национальные и отраслевые стандарты

- ГОСТ Р ИСО 15189-2015 «Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности»
- ГОСТ Р 53133-2008 «Контроль качества клинических лабораторных исследований»
- Приказ МЗ РФ от 26 мая 2003 г. №220 (ОСТ 91500.13.0001-2003)
- Приказ МЗ РФ от 7 февраля 2000 г. №45



Замечание 2:** Необходимо проанализировать возможность использования **независимых контрольных материалов третьей стороны вместо или в дополнение к любым контрольным материалам, поставляемым изготовителем реагентов или оборудования.

–ГОСТ Р ИСО 15189-2015 , подпункт 5.6.2.2

*«При использовании реактивов и калибраторов одного производителя **рекомендуется применять контрольные материалы другого производителя**»*

- Приказ 220, пункт 6.1.3. Требования к контрольным материалам

BIO-RAD

Инструменты для системы внутреннего контроля качества

"Лаборатория должна разработать **систему внутреннего контроля качества**, которая проверяет достижение намеченного качества результатов".

- ГОСТ Р ИСО 15189-2015 подпункт 5.6.2.1

2 условия, необходимые для подтверждения надежности результатов исследования пациентов:

Наличие хорошего контрольного материала



Правильное использование и управление данными



Требования к контрольным материалам

*«При использовании реактивов и калибраторов одного производителя рекомендуется применять **контрольные материалы другого производителя**»*

- Приказ 220, пункт 6.1.3. Требования к контрольным материалам



***Замечание 2:** Необходимо проанализировать возможность использования **независимых** контрольных материалов третьей стороны вместо или в дополнение к любым контрольным материалам, поставляемым изготовителем реактивов или оборудования.*

– ГОСТ Р ИСО 15189-2015 , подпункт 5.6.2.2



*«... **материалы для контроля качества** должны отличаться от материалов калибратора, чтобы **обеспечить независимую оценку показателей работы** диагностического оборудования в рамках процедуры контроля качества...».*

– CLSI C24-A3, Статистический контроль качества для количественных методик



BIO-RAD

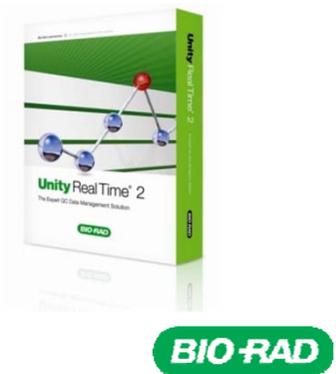
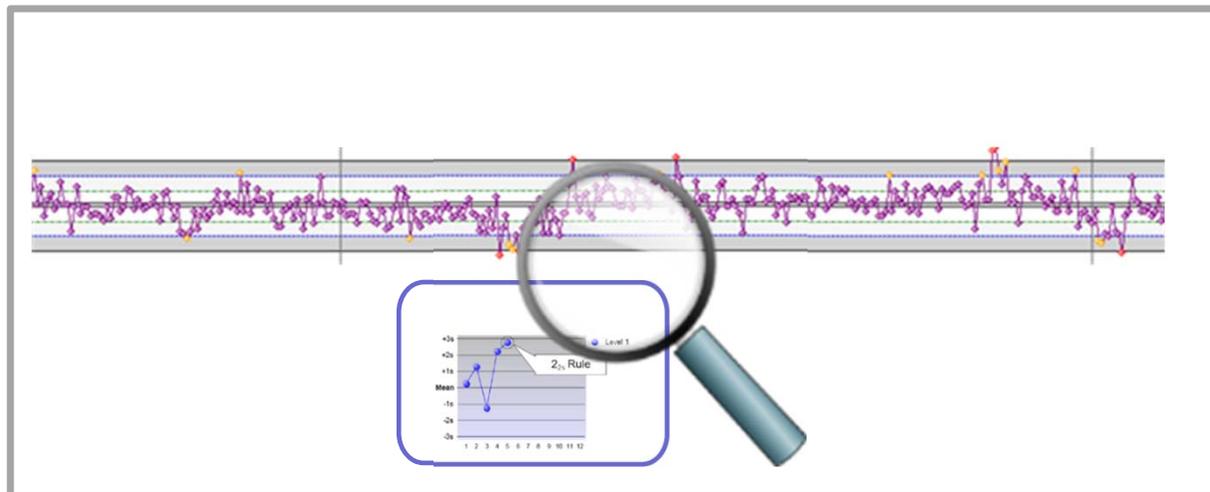
Характеристика	«Родной» контроль в наборе реагентов	Независимый контроль	Преимущество
Нормативные документы	Используется по умолчанию согласно инструкции производителя	Рекомендации использования ИСО15189, приказ 220	Соответствие нормативным документам, уверенность в получаемых результатах
Контроль этапов исследования	Только отдельные этапы, контроля всех этапов нет	Полный цикл исследования	Контроль качества всего процесса молекулярного анализа, включая этапы экстракции, амплификации и детекции
Тип целевых компонентов	Плазмиды РНК-транскрипты	Целые, неповрежденные инактивированные вирусы или рекомбинанты	Состав приближен к пробе пациента, контроль ведет себя в анализе аналогично, уверенность в получаемых результатах.
Тип матрикса	Трис-ЭДТА (TE) буфер Среда для культивирования тканей Транспортная среда для вирусов	Человеческая плазма с ЭДТА	
Срок годности и возможность входного контроля лотов	Входит в набор реагентов, срок годности привязан к реагенту	Длительный срок годности (2-3 года)	Возможность контролировать межлотовую вариацию реагентов

Ведение внутрилабораторного контроля качества

Данные КК должны пересматриваться через регулярные интервалы времени, чтобы обнаружить тенденции в выполнении исследований, которые могут указывать на наличие проблем в системе. В случае, если такие тенденции отмечены, должны быть предприняты и зарегистрированы предупреждающие действия.

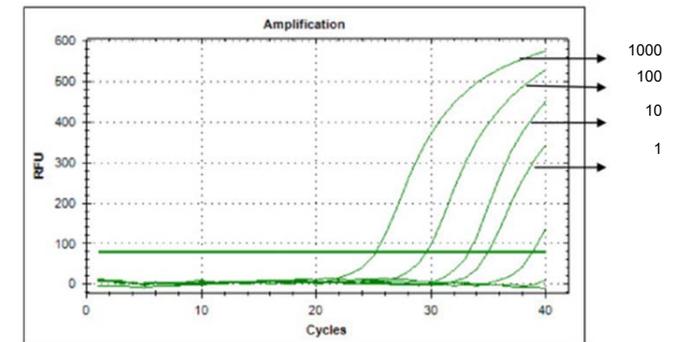
Прим: Должны быть использованы статистические и нестатистические технологии для процесса контроля, чтобы была возможность постоянно отслеживать качество выполнения системы исследования.

- ГОСТ Р ИСО 15189-2015, подпункт 5.6.2.3 Данные контроля качества



Количественные и качественные данные

- Количественные результаты пациентов : Вирусная нагрузка
- Качественные результаты пациентов : положительные/отрицательные на основе порогового значения
- Для большинства качественных результатов **количественные данные** доступны из прибора => в этом случае данные КК могут управляться с помощью того же подхода, как и для количественных тестов.



5.2.7 Концентрации контроля качества для количественных измерений, представленных как качественные значения

Когда количественные измерения преобразуются в качественные результаты на основе порогового значения, определяющего отрицательный или положительный ответ, применимы аналогичные подходы к контролю качества. В этой ситуации необходимы две концентрации КК: одна ниже и одна выше порогового значения. Величину отливий от порогового значения следует выбирать таким образом, чтобы значения КК контролировали показатели в ограниченном интервале измерения около порогового значения. Количественный сигнал или результат концентрации используется в качестве значения КК, и его приемлемость оценивается с использованием тех же правил оценки, что и для количественного сообщаемого значения.

– CLSI EP24-A2 Assessment Of The Diagnostic Accuracy Of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristic Curves

Аудит лаборатории, ГОСТ ИСО 15189-202?

Вопросы и ответы:

- Как вы верифицируете стабильность ваших КМ? (ГОСТ ИСО 15189)
 - Контроли EDX прошли верификацию стабильности в реальном времени
- Как вы обеспечиваете запас на 2 года? (ГОСТ ИСО 15189)
 - Разница между разными лотами контролей EDX не превышает $0,3\log$ относительно внутреннего стандарта, минимальная вариация между лотами КМ!
- Как сертифицированы ваши КМ? (ГОСТ ИСО 15189)
 - Контроли EDX произведены на сертифицированном по ISO 13485 производстве
- Есть ли у ваших КМ прослеживаемость относительно международных стандартов?
 - Контроли EDX имеют прослеживаемость относительно стандартов ВОЗ

Практики использования молекулярных контролей
в ПЦР лаборатории. Примеры из практики.

Ошибки при ПЦР-исследовании

- нарушение правил взятия, хранения и транспортировки клинического материала.
- неправильный выбор системы пробоподготовки.
- контаминация образцов, кросс-контаминация
- риск внести в пробу ингибиторы



- **Повышенный риск ложноположительных результатов из-за высокой чувствительности**

Что контролируем?

- Каждый планшет?
- Каждый амплификатор?
- Одно измерение контроля в день?
- Раз в неделю?



Как часто?

- Чем чаще - тем лучше. (каждый планшет)
- Почему?
- Сбор статистики быстрее, статистика надежнее. Больше вероятность найти ошибку. От частоты постановки количество ошибок не поменяется.
- Чем чаще ставим контроли, тем с большей вероятностью мы обнаружим ошибки!

Зачем использовать независимые контроли?

- Оценка воспроизводимости
- Аккуратность работы оператора
- Межлотовая вариация!!!
- Чистота лаборатории
- Сравнение различных тест-систем

Какие концентрации выбрать. На примере ВИЧ-1.

Virologic Response Definitions

The following definitions are used in this section to describe the different levels of virologic response to ART.

- **Virologic suppression:** A confirmed HIV-RNA level below the **LLOD** of available assays.
- **Virologic failure:** The inability to achieve or maintain suppression of viral replication to HIV-RNA level **<200 copies/mL**.
- **Incomplete virologic response:** Two consecutive plasma HIV-RNA levels **≥ 200 copies/mL** after 24 weeks on an ARV regimen in a patient who has not yet had documented virologic suppression on that regimen. A patient's baseline HIV-RNA level may affect the time course of response, and some regimens may take longer than others to suppress HIV-RNA levels.
- **Virologic rebound:** After virologic suppression, confirmed HIV-RNA level **≥ 200 copies/mL**.
- **Virologic blip:** After virologic suppression, an isolated detectable HIV-RNA level that is followed by a return to virologic suppression.
- **Low-level viremia:** Confirmed detectable HIV-RNA level **<200 copies/mL**.



Какие концентрации выбрать. На примере ВИЧ-1.



МИНИСТЕРСТВО
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Клинические рекомендации

ВИЧ-инфекция у взрослых

Неопределяемый уровень ВН – уровень вирусной нагрузки ВИЧ ниже порога определения тест-системы (рекомендуется использовать тест-системы с порогом чувствительности 50 копий/мл).

«Низкоуровневая вирусемия» – повторяющиеся значения вирусной нагрузки в интервале 50 – 1000 копий / мл (low level viremia). «Низкоуровневая вирусемия» является предиктором развития лекарственной устойчивости ВИЧ.

Определяемый уровень ВН – уровень вирусной нагрузки ВИЧ выше порога определения тест-системы (рекомендуется использовать тест-системы с порогом чувствительности 50 копий/мл).

- **Рекомендуется** врачам, ответственным за наблюдение ВИЧ-инфицированных, различать вирусологические критерии неудачи АРТ [3,4,37,148,149] (5С).
- у начинающих лечение снижение ВН менее чем на 1 lg (в 10 раз) через 1 мес после начала терапии и не достигших вирусологической супрессии менее 200 копий/мл через 6 мес у пациентов, ранее не получавших АРТ;
- у пациентов, получавших АРТ и имевших неопределяемую ВН появление ВН выше 200 копий/мл в 2-х повторных анализах, выполненных с интервалом 3 нед или более

Комментарии: Всплески вирусемии (blip) следует отличать от низкоуровневой вирусемии (low level viremia) с помощью повторного определения ВН через 3-4 нед.

BIO-RAD

Какие концентрации выбрать. На примере ВИЧ-1.

Чувствительность анализа: не более 200 копий на 1,0 мл плазмы.

Линейный диапазон концентраций РНК ВИЧ, определяемых детектирующим амплификатором, составляет $5,0 \times 10^2$ – $1,0 \times 10^8$ копий/мл образца.

Коэффициент вариаций результатов определений – не более 7%.

2. Калибровочные образцы:

- ВИЧ-РНК-СТ1 (1×10^6 копий/мл) – 5 пробирок (по 0,3 мл);
- ВИЧ-РНК-СТ2 (3×10^3 копий/мл) – 5 пробирок (по 0,3 мл).

Технические характеристики

Специфичность	100% РНК ВИЧ-1
Диапазон измерений	50–10 000 000 копий/мл для 1,0 мл образца 250–100 000 000 копий/мл для 0,2 мл образца 500–100 000 000 копий/мл для 0,1 мл образца

The test can quantitate HIV-1 RNA over the range of 48 - 10,000,000 copies/mL. One copy of HIV-1 RNA is equivalent to 1.7 ± 0.1 International Units (IU) based on the WHO 1st International Standard for HIV-1 RNA for Nucleic Acid-Based Techniques (NAT) (NIBSC 97/656).

Какие концентрации выбрать

Низкоположительный контрольный материал:

- Содержание РНК\ДНК > LoD\LoQ
- Содержание РНК\ДНК близко к пределу принятия клинического решения (200 к/мл? 1000к/мл?)
- Не сильно больше LoQ, нам интересно посмотреть, как тест-система себя ведет на «критических» режимах

EXACT **EDX**
DIAGNOSTICS

Certificate of Analysis
HIVL101 HIV-1 Low Run Control

PRODUCT INFORMATION

Product SKU	HIVL101
Product Name	HIV-1 Low Run Control
Kit Lot Number	21083005
Source Material	Inactivated HIV-1
Date of Expiration	2024-08-31
Base Matrix	True EDTA Plasma
Preservative	ProClin® 300
Fill Volume	1.0 mL
Storage Temperature	-20°C or Below
Regulatory Status	CE-IVD
Traceability	3 rd WHO International Standard (10/152)
Testing Platform	In-House HIV-1 Assay

This is an unassayed control and does not have assigned analyte values. The end user is responsible for determining the value of the control. This quality control material should be used in accordance with local, state, and/or federal regulations or accreditation requirements.

As with all materials of biological origin, this preparation should be regarded as potentially hazardous to health. It should be used and discarded according to your own laboratory's safety procedures. Such safety procedures should include the wearing of protective gloves and avoiding the generation of aerosols.

TESTING DATA

Lot Number	Product Description	Target Concentration	Testing Results (Comparison of Target Value Against Reference Standard)	Quantity
21083005	HIV-1 Low Run Control	200 cp/mL	Pass	5 Vials

Какие концентрации выбрать

Высокоположительный контрольный материал:

- Содержание РНК\ДНК близко к калибратору
- Содержание РНК\ДНК близко к верхнему пределу линейности
- Сильно отличается от низкоположительного



Certificate of Analysis
HIVH102 HIV-1 High Run Control

PRODUCT INFORMATION

Product SKU	HIVH102
Product Name	HIV-1 High Run Control
Kit Lot Number	21083004
Source Material	Inactivated HIV-1
Date of Expiration	2024-08-31
Base Matrix	True EDTA Plasma
Preservative	ProClin® 300
Fill Volume	1.0 mL
Storage Temperature	-20°C or Below
Regulatory Status	CE-IVD
Traceability	3 rd WHO International Standard (10/152)
Testing Platform	In-House HIV-1 Assay

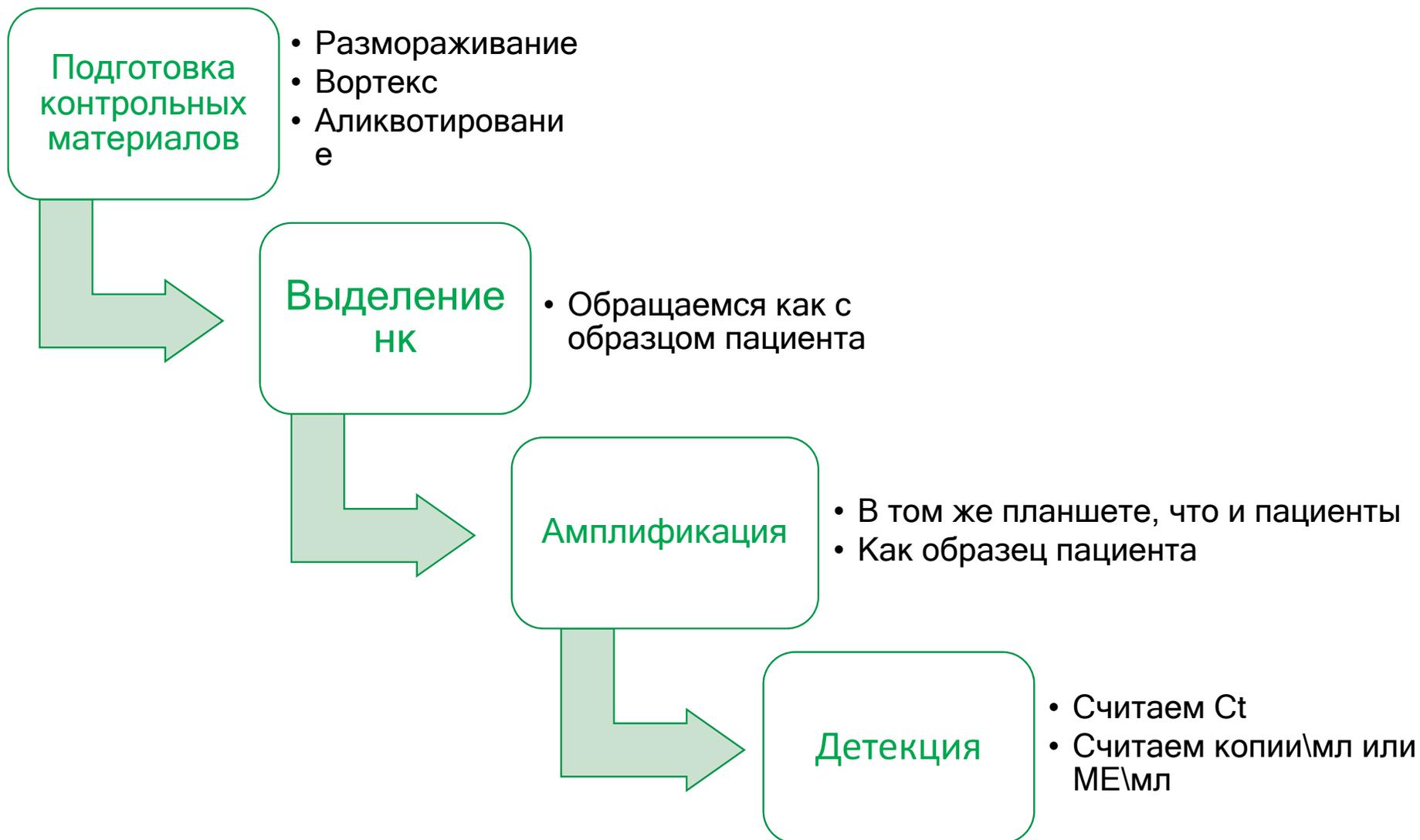
This is an unassayed control and does not have assigned analyte values. The end user is responsible for determining the value of the control. This quality control material should be used in accordance with local, state, and/or federal regulations or accreditation requirements.

As with all materials of biological origin, this preparation should be regarded as potentially hazardous to health. It should be used and discarded according to your own laboratory's safety procedures. Such safety procedures should include the wearing of protective gloves and avoiding the generation of aerosols.

TESTING DATA

Lot Number	Product Description	Target Concentration	Testing Results (Comparison of Target Value Against Reference Standard)	Quantity
21083004	HIV-1 High Run Control	1,000,000 cp/mL	Pass	5 Vials

Какая процедура работы с контрольным материалом?



Как оцениваем результаты контроля?

ВКО прошел

Контрольный образец
положительный (или
отриц. для
отрицательного
контроля)

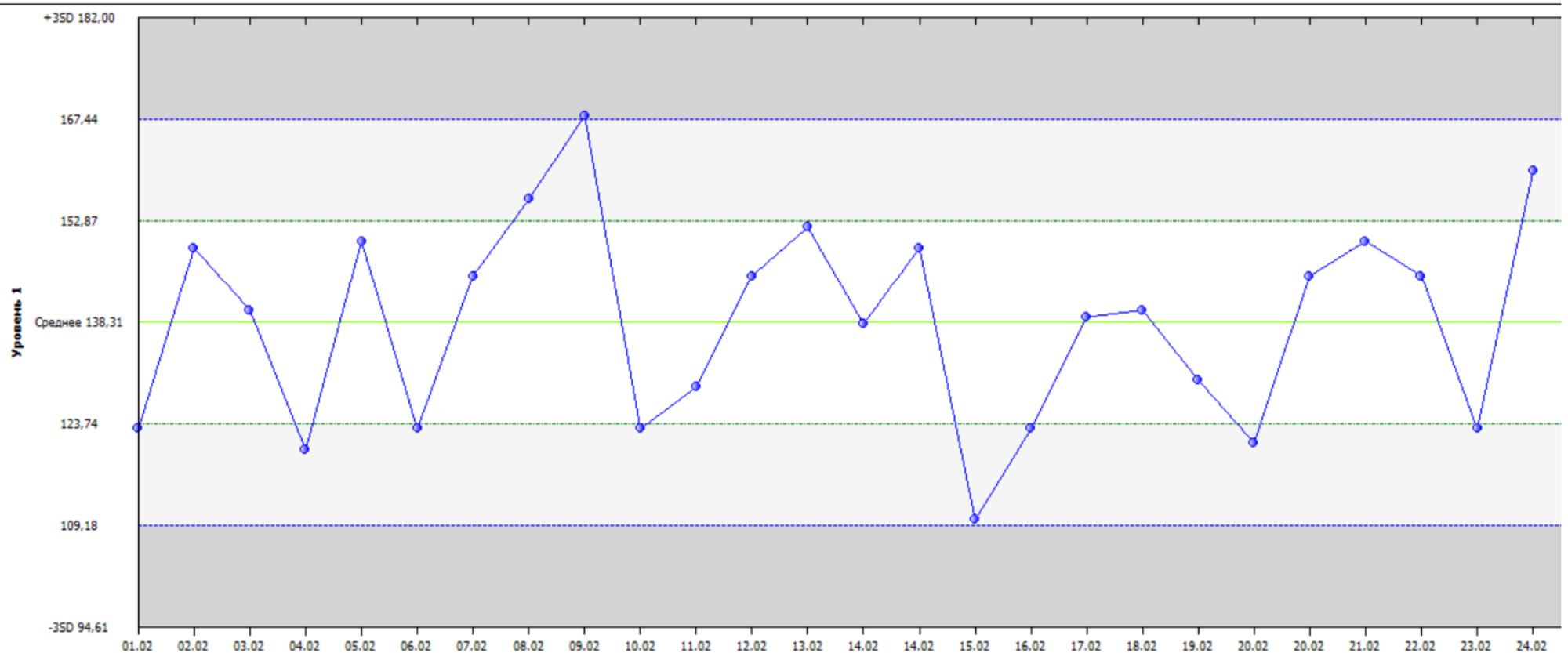
Ct или cp/ml(IU/ml) в
контрольных пределах

Первый шаг в определении пределов принятия решений



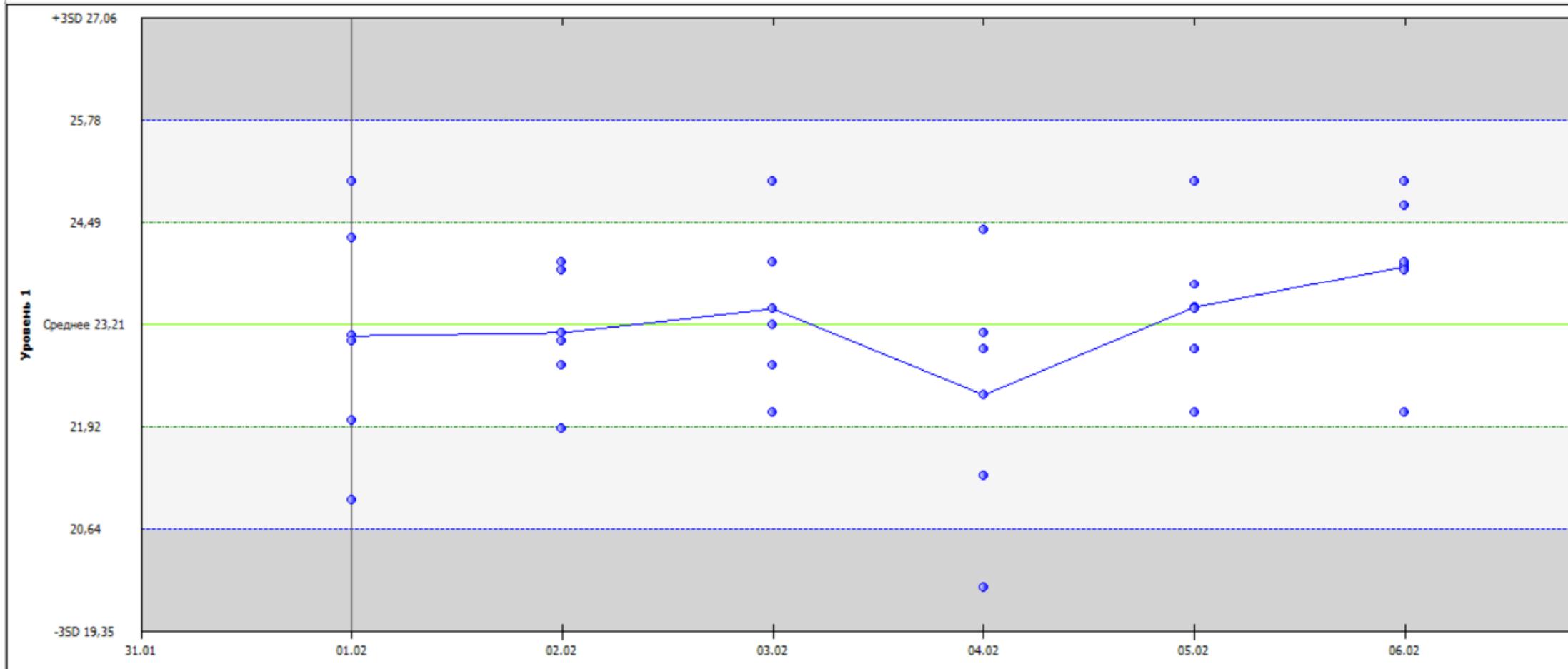
Как контролируем процесс? Одна постановка в сутки

Лот: 21083005, EDX HIV-1 Low Run Control, Plasma, Bio-Rad Laboratories, 31.08.2024
HIV-1 Virus, Nucleic Acid Test, Roche cobas AmpliPrep / TaqMan System, Dedicated Reagent, Copies/mL, No Temperature
Сумм. Среднее/SD/CV: [1] 138,31/14,57/10,53
Суммарная Статистика для 26.12.2023 к 24.02.2024 Среднее/SD/CV/Точек: [1] 138,31/14,57/10,53/26
График относительно: Ваша лаборатория, Текущий анализатор, Установочное Среднее/SD, Среднее/SD/CV: [1] 138,31/14,57/10,53



Как контролируем процесс? Каждый планшет, неск. в день.

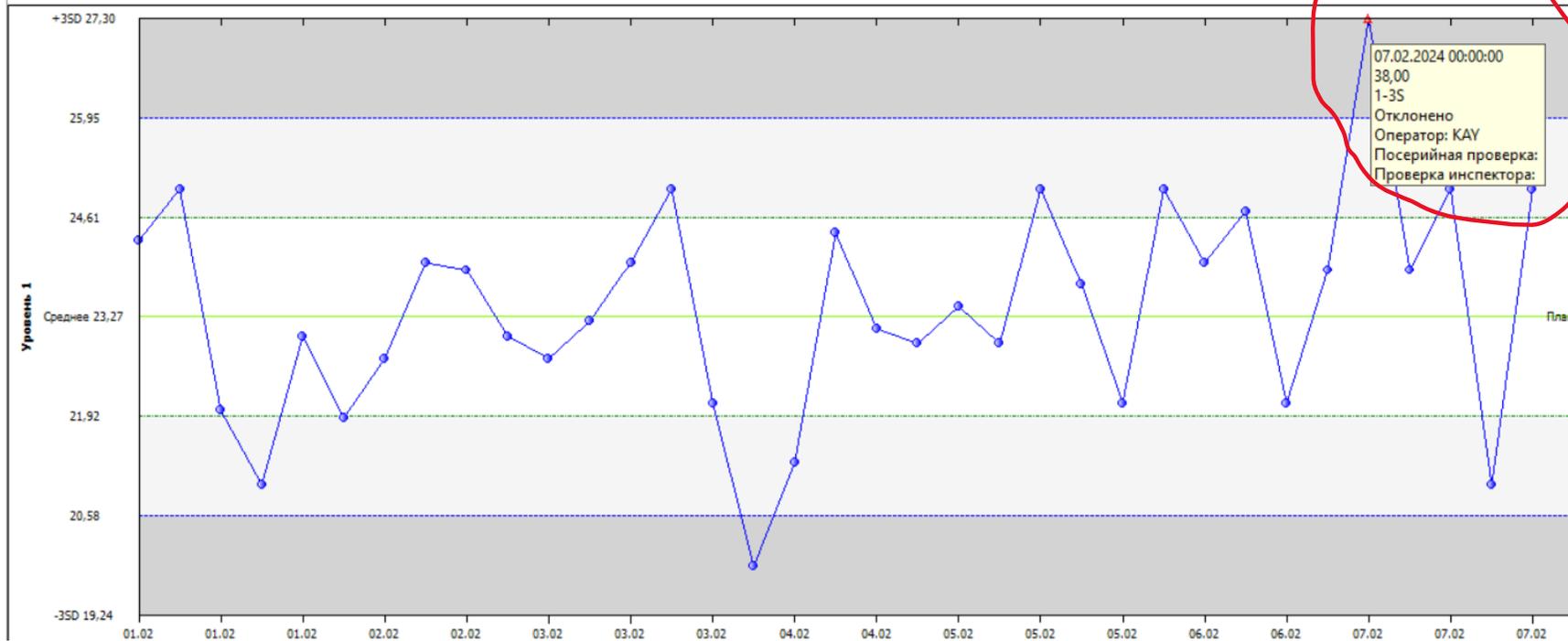
Лот: 21083005, EDX HIV-1 Low Run Control, Plasma, Bio-Rad Laboratories, 31.08.2024
HIV-1 Virus, Nucleic Acid Test, Bio-Rad CFX RT PCR System, Dedicated Reagent, Ct (Cycle threshold), No Temperature
Сумм. Среднее/SD/CV: [1] 23,21/1,29/5,54
Суммарная Статистика для 31.01.2024 к 06.02.2024 Среднее/SD/CV/Точек: [1] 23,21/1,29/5,54/30
График относительно: Ваша лаборатория, Текущий анализатор, Установочное Среднее/SD, Среднее/SD/CV: [1] 23,21/1,29/5,54



Что может пойти не так?

Отрицательный результат для положительного образца:

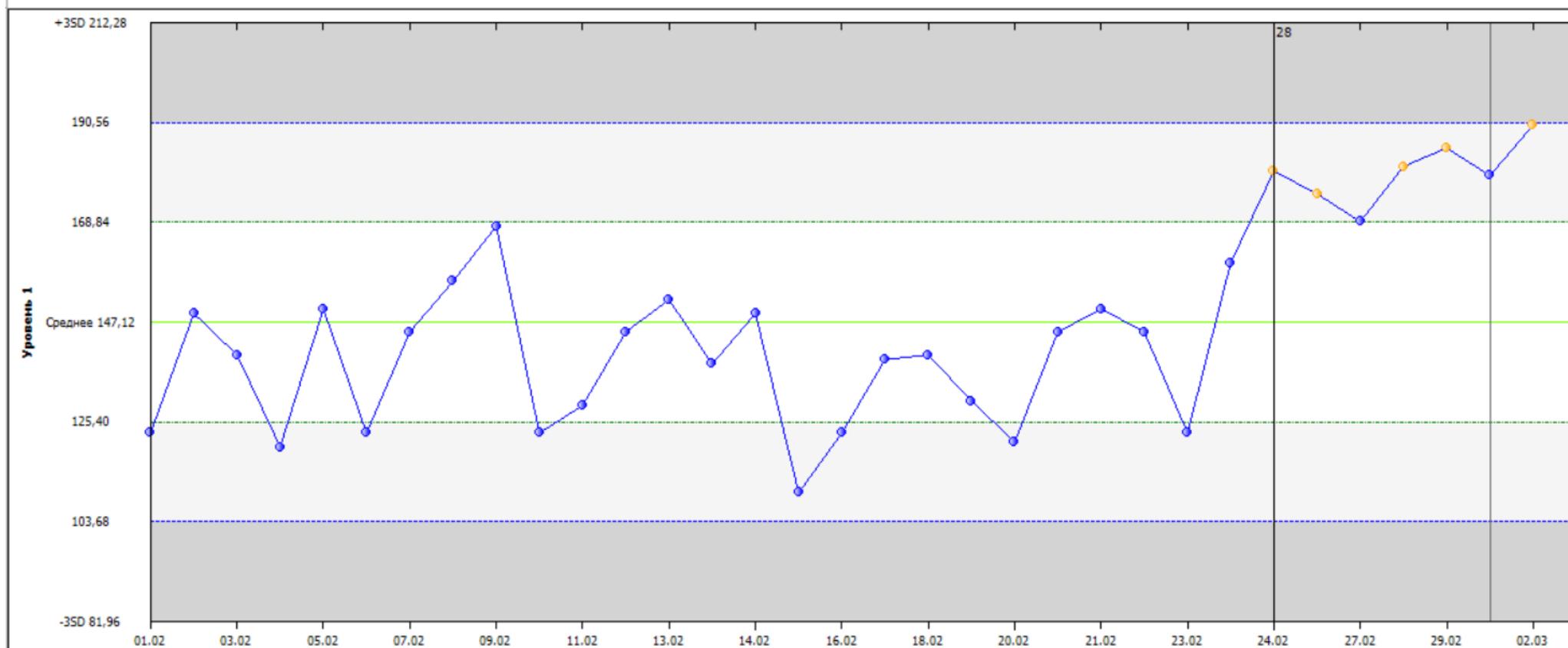
Лот: 21083005, EDX HIV-1 Low Run Control, Plasma, Bio-Rad Laboratories, 31.08.2024
HIV-1 Virus, Nucleic Acid Test, Bio-Rad CFX RT PCR System, Dedicated Reagent, Ct (Cycle threshold), No Temperature
Сумм. Среднее/SD/CV: [1] 23,27/1,34/5,77
Суммарная Статистика для 09.12.2023 к 07.02.2024 Среднее/SD/CV/Точек: [1] 23,27/1,34/5,77/34
График относительно: Ваша лаборатория, Текущий анализатор, Установочное Среднее/SD, Среднее/SD/CV: [1] 23,27/1,34/5,77



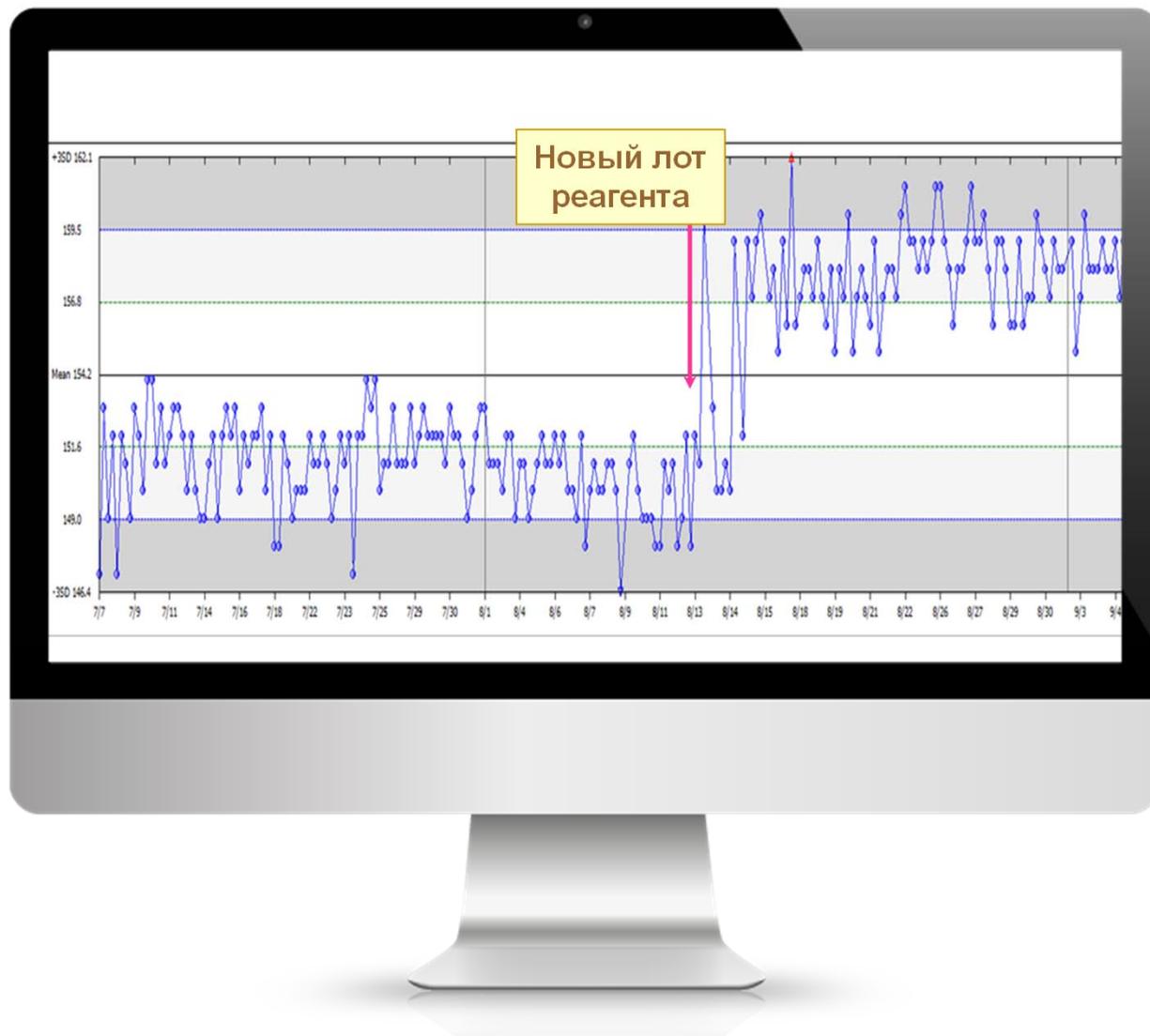
Что может пойти не так?

Смена лота реагентов

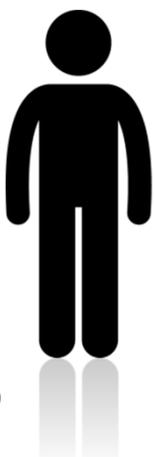
Лот: 21083005, EDX HIV-1 Low Run Control, Plasma, Bio-Rad Laboratories, 31.08.2024
HIV-1 Virus, Nucleic Acid Test, Roche cobas AmpliPrep / TaqMan System, Dedicated Reagent, Copies/mL, No Temperature
Сумм. Среднее/SD/CV: [1] 147,12/21,72/14,76
Суммарная Статистика для 02.01.2024 к 02.03.2024 Среднее/SD/CV/Точек: [1] 147,12/21,72/14,76/33
График относительно: Ваша лаборатория, Текущий анализатор, Установочное Среднее/SD, Среднее/SD/CV: [1] 147,12/21,72/14,76
✓ 28. Замена реагента



Аналитические цели



?



Аналитические цели

Общая допустимая ошибка помогает оценить влияние новых реагентов и событий КК на результаты пациентов



Аналитические цели

Пример аналитической цели :

+/- 0,5 log₁₀ от целевого значения

Допустимое отклонение, данное Rili-BÄK для количественного молекулярного тестирования:
Таблица В3-1а (CMV-/HBV-ДНК, HCV-/HIV-1-РНК):

Tabelle B 3-1a – Interne Qualitätssicherung bei der Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration in Blut/Plasma/Serum

1 Lfd. Nr.	2 Analyt	3 Zulässige absolute Abweichung des logarithmierten (Basis 10) Einzelwertes vom logarithmierten Sollwert ⁶	4 Gültigkeitsbereich der Spalte 3			5 Häufigkeit der Kontrolluntersuchung
			von	bis	Einheit	
1	CMV DNA	-0,5 bis +0,5	5 000	5 000 000	IU/mL	bei jeder Verwendung
2	HBV DNA	-0,5 bis +0,5	500	5 000 000	IU/mL	bei jeder Verwendung
3	HCV RNA	-0,5 bis +0,5	500	5 000 000	IU/mL	bei jeder Verwendung
4	HIV-1 RNA	-0,5 bis +0,5	500	5 000 000	Kopien/mL	bei jeder Verwendung

⁶ Alternativ kann eine Kontrolle mit einem ausgewiesenen Zielbereich mit maximaler Spannweite von einer log₁₀-Stufe eingesetzt werden.

Analytical Goals

Lab: 999991: Infectious disease lab Lot: 20021302: EDX CMV Low Run Control 31/01/2023

Display Analyte Method Instrument Reagent Unit Temperature

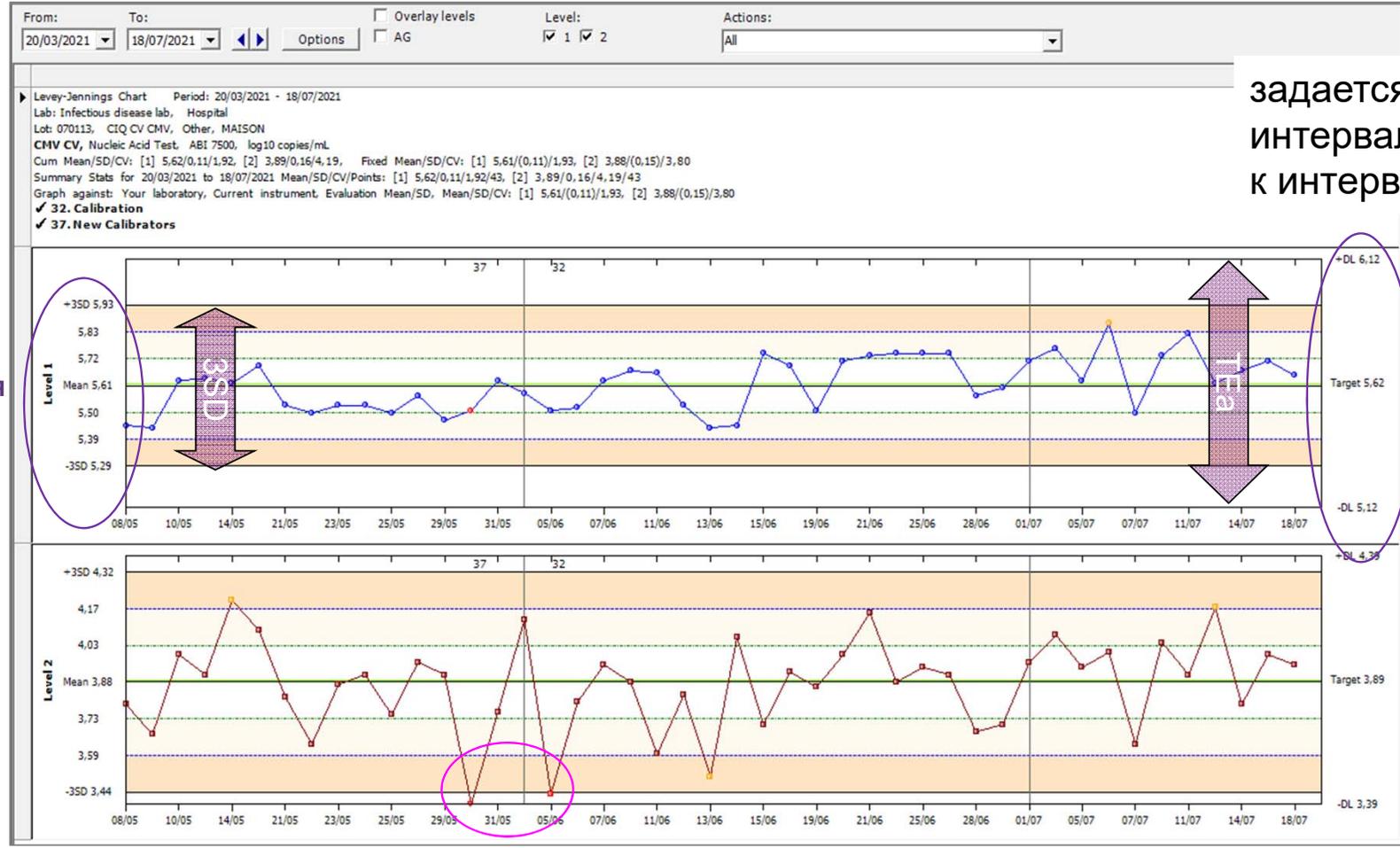
Imprecision-BV | Total Error-BV | Medical Relevance | State of the Art

<input checked="" type="checkbox"/>	Test	Data Range	Mlab	Decision Limit	%	TEa Range in use	W <input checked="" type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	Cytomegalovirus (CMV), Nucleic Acid Test, log ₁₀ IU/mL	Cumulative	3,53	0,5	<input type="checkbox"/> 1	3,03 - 4,03	<input checked="" type="checkbox"/>

30-day rolling
6-month rolling
Cumulative
Manual

Аналитические цели

Вирусная нагрузка CMV



задается новый интервал в дополнение к интервалу 3 SD

Статистическая оценка

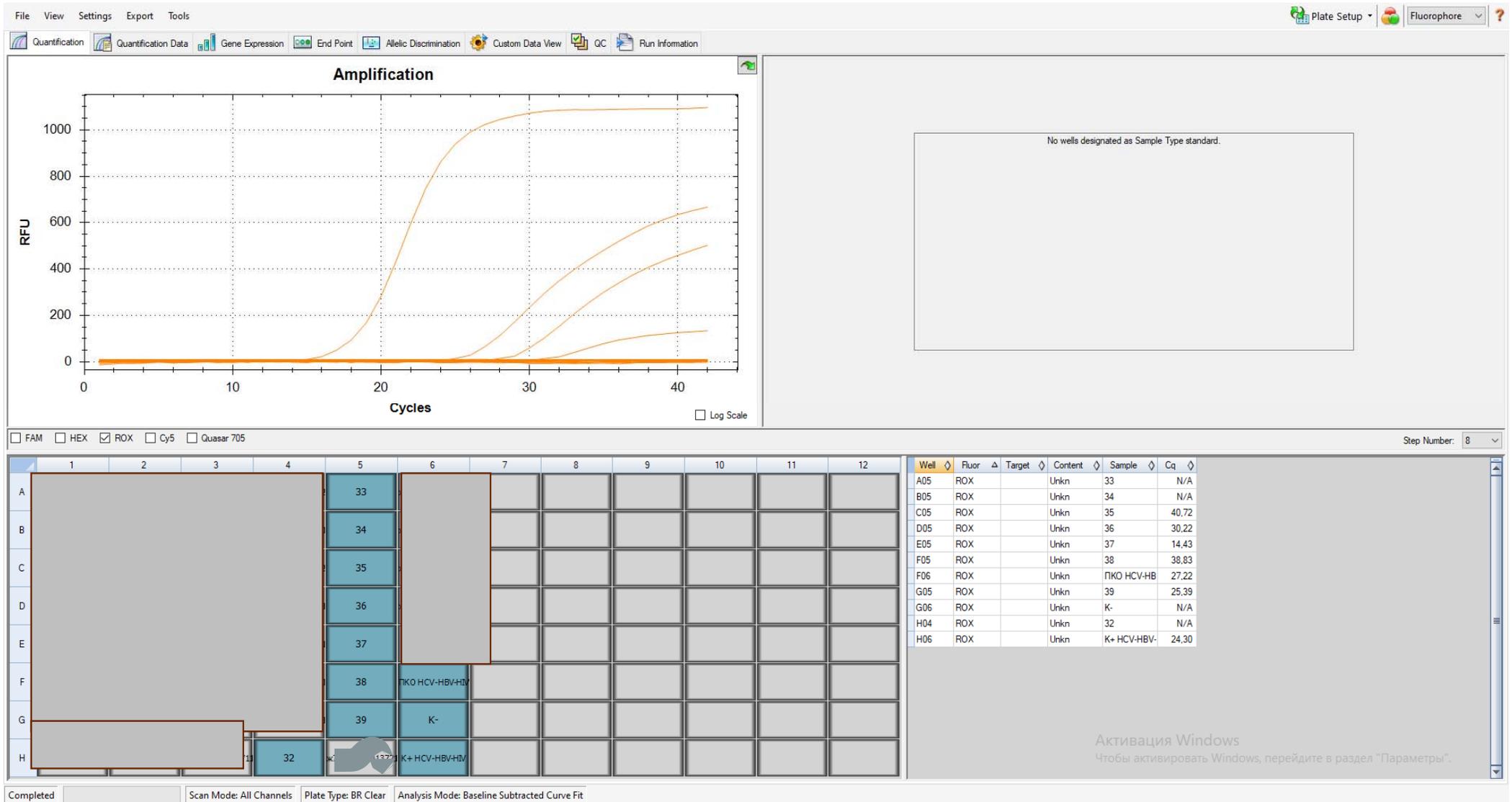
Аналитическая цель



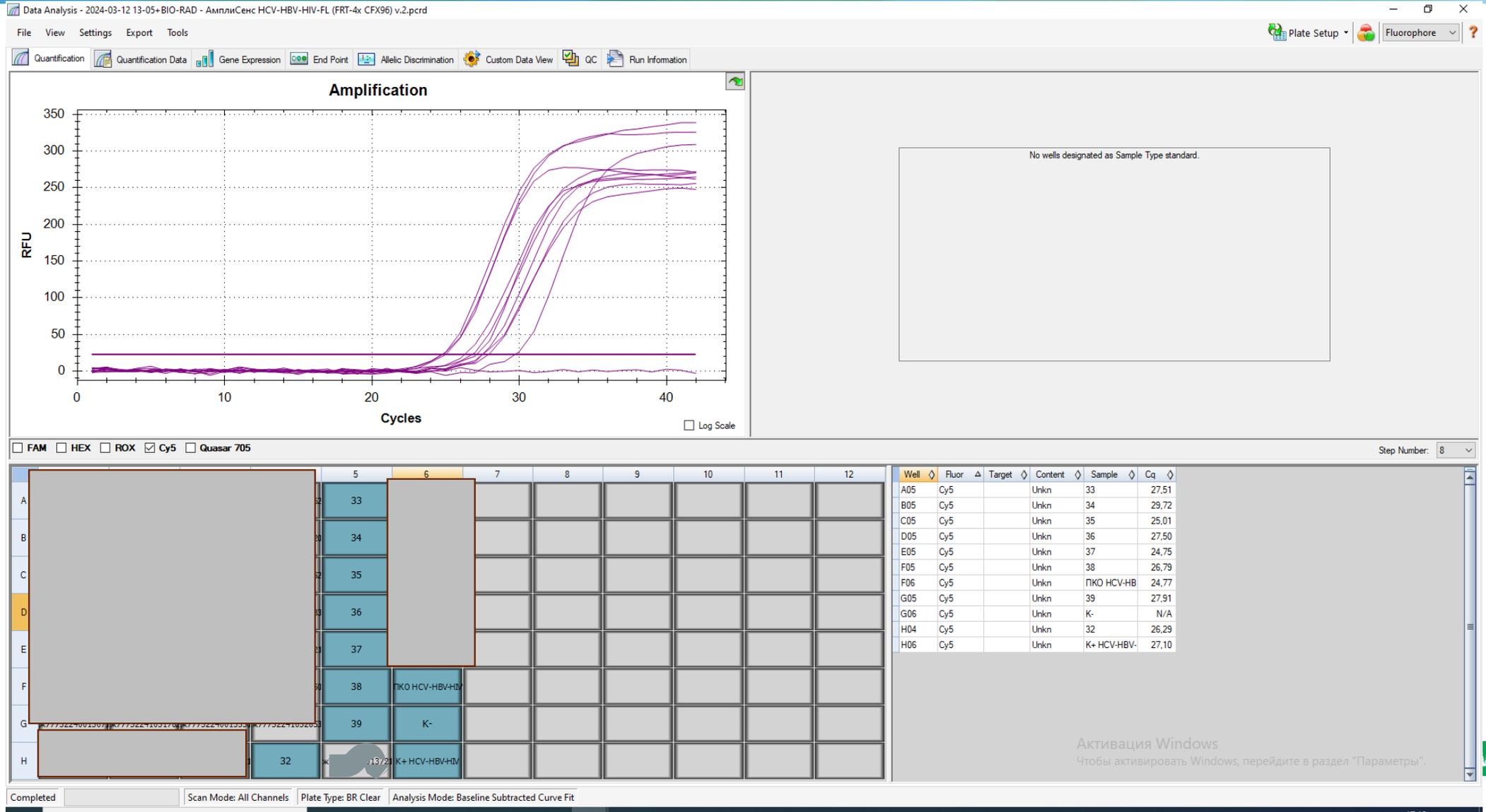
Результаты измерения. Закрытая тест-система

Контроль	Количество	T	Q
HBV Low	171 IU/ml	33,2	28
HBV High	483 585 IU/ml	20,8	26,3
HCV Low	330 IU/ml	33,7	32
HCV High	2 152 238 IU/ml	21,2	30,5
HIV low	123 cp/ml	32,1	27,6
HIV high	439 683 cp/ml	18,8	25,4
Neg	--	--	--

Результаты измерения. Открытая тест-система



Результаты измерения. Открытая тест-система

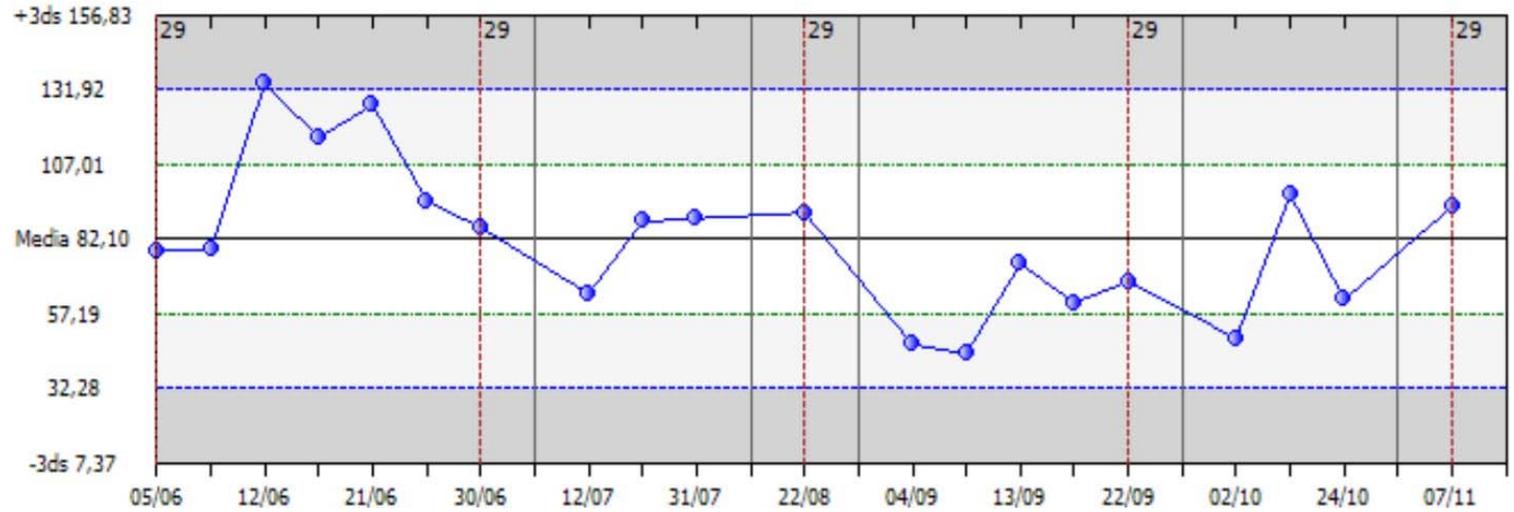


Результаты измерения. Открытая тест-система

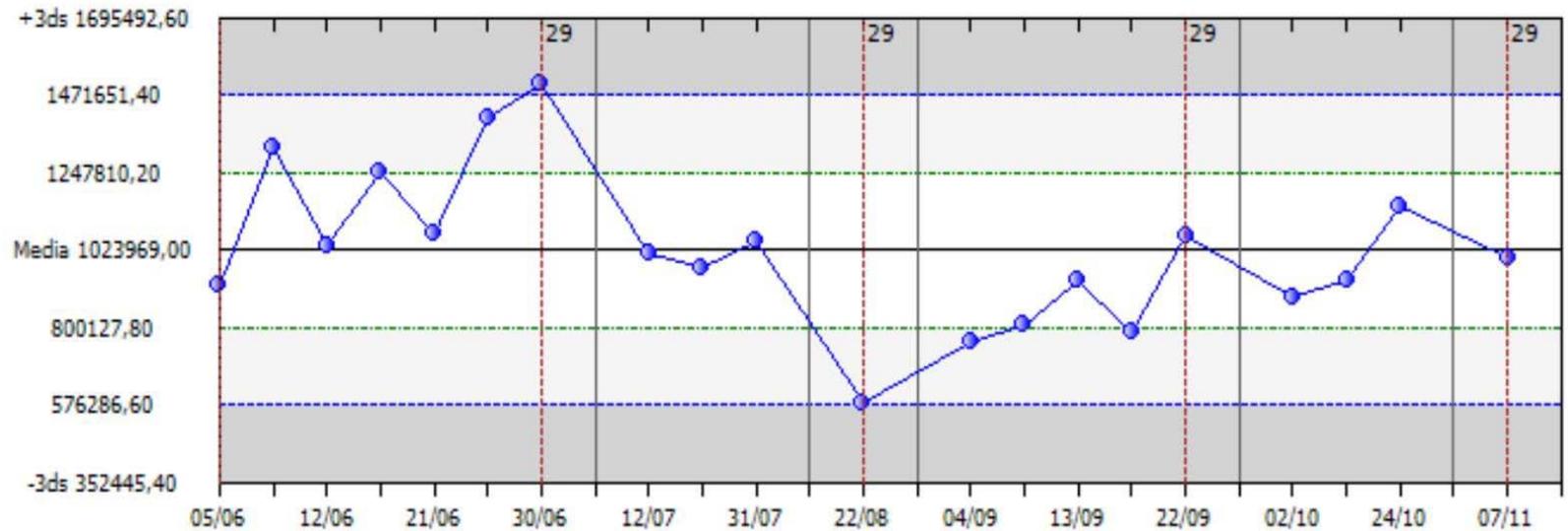
Контроль	Ct	ВКО	Мультиплекс
HBV Low	30,95	26,22	
HBV High	15,24	23,67	
HCV Low	34,76	25,46	
HCV High	24,25	26,81	
HIV low	--	28,85	
HIV high	26,96	26,96	HCV!!!
Neg	--	25,75	

Результаты постановки контрольных материалов. ВИЧ-1

Низкоуровневый
контрольный
материал.

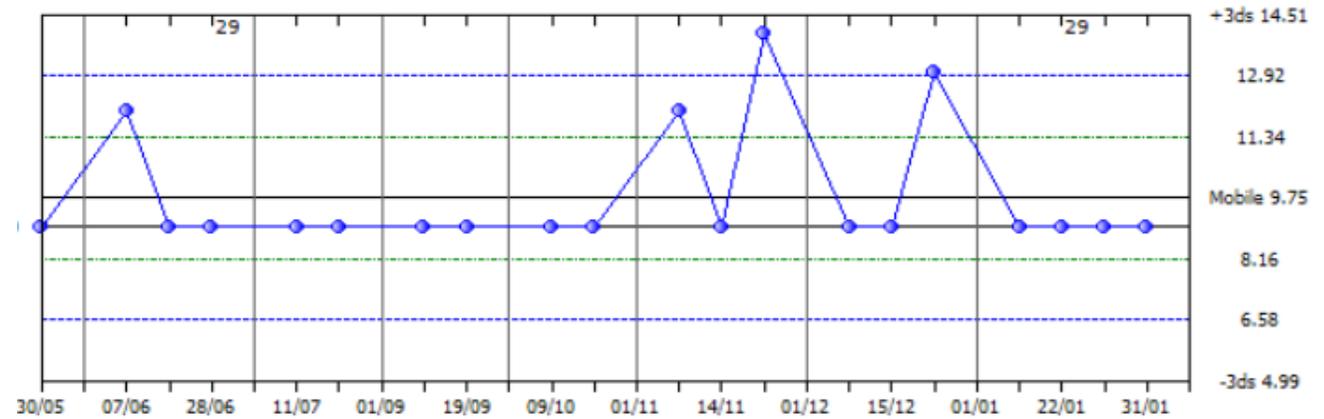


Высокоуровневый
контрольный
материал

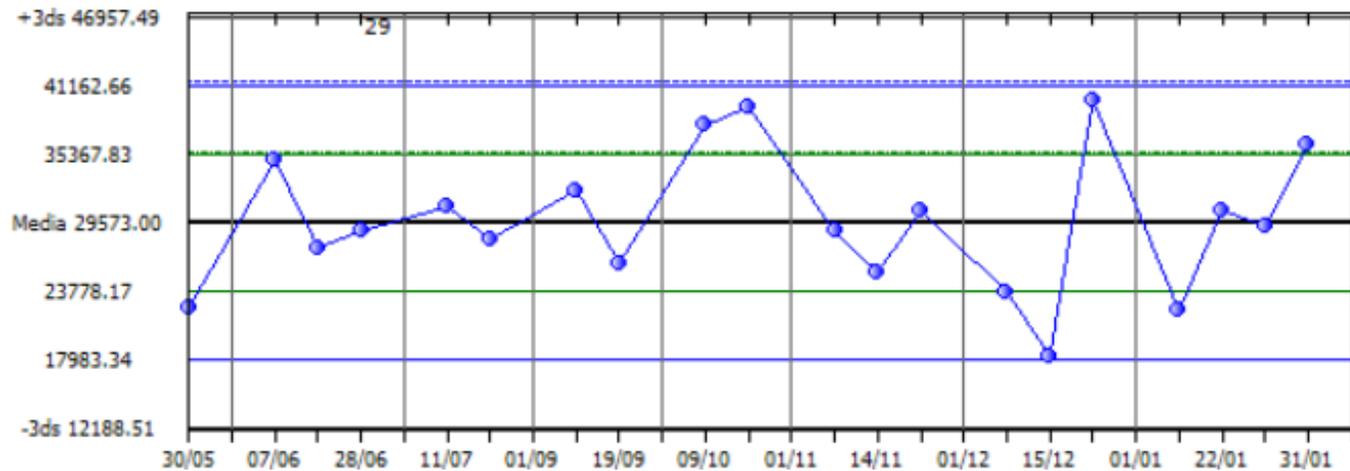


Результаты постановки контрольных материалов. HCV

Низкоуровневый
контрольный
материал

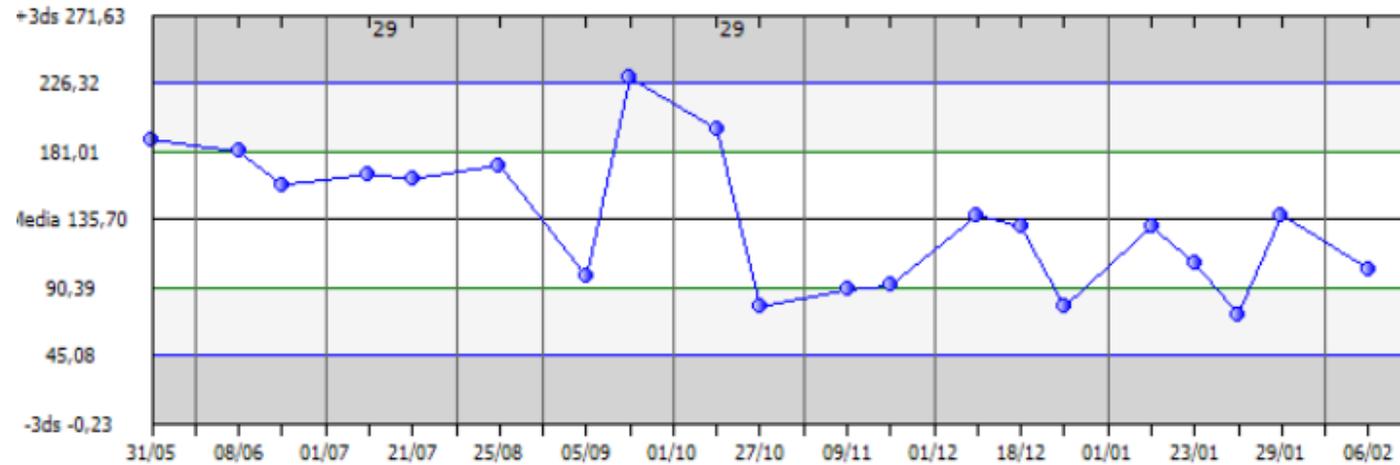


Высокоуровневый
контрольный
материал

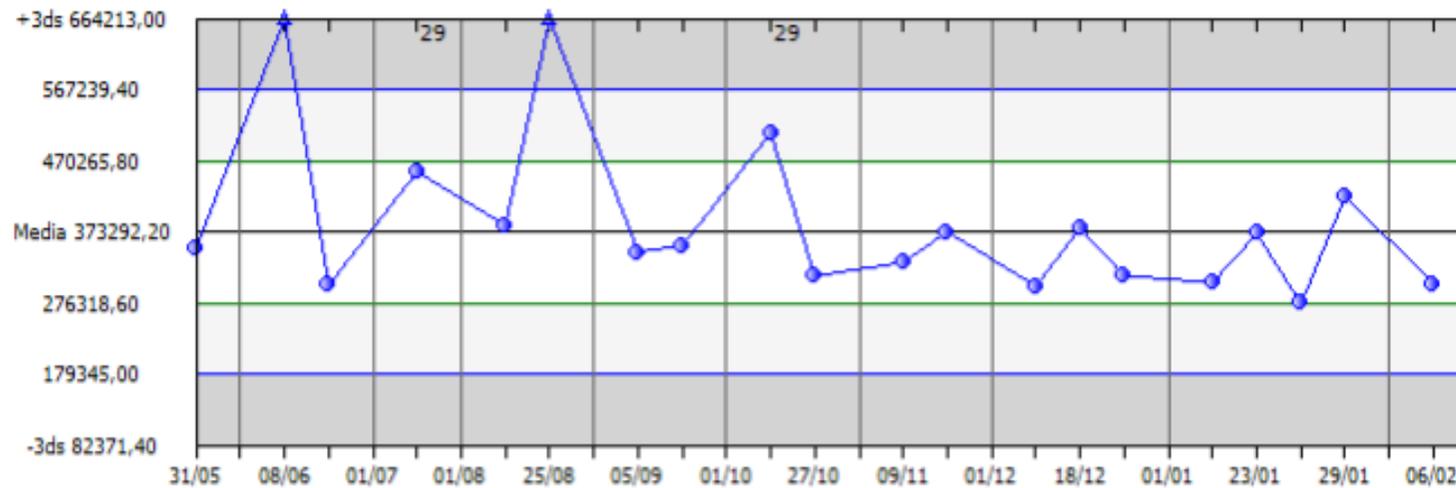


Результаты постановки контрольных материалов. HBV

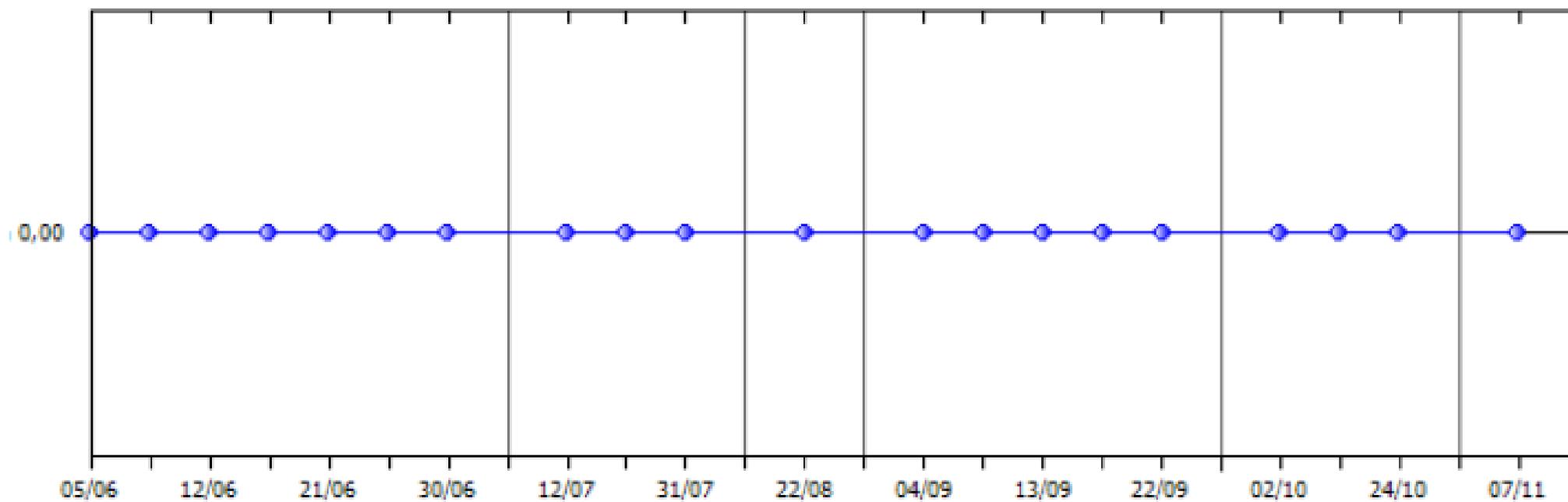
Низкоуровневый
контрольный
материал



Высокоуровневый
контрольный
материал



Отрицательный контрольный материал.



Выводы по результатам измерений

«В большинстве случаев, в худшем случае, 95% значений попадали в пределы двух стандартных отклонений от среднего значения, за исключением низкого контроля для HCV (90%) и высокого контроля для HBV (94,73% на 19 определений). Для высокого контроля HBV было включено 19 определений в анализ, исключая один выброс, который, вероятно, был вызван случайной ошибкой. Изменение партии реагентов не оказало существенного влияния на производительность контролей. Ни один отрицательный контроль никогда не был амплифицирован.»

Performance of Bio-Rad EDX molecular controls for HIV-1, HBV and HCV on the Hologic Panther® System

Lucio Romano, Simona Marchetti, Maurizio Sanguinetti and Rosalba Ricci

*Dipartimento di Scienze di Laboratorio e Infettivologiche,
Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli IRCCS, Roma,
Italia;*



UNIVERSITÀ
CATTOLICA
del Sacro Cuore

Gemelli



Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli IRCCS
Università Cattolica del Sacro Cuore

BIO-RAD

Выводы

- Независимый контрольный материал имитирует образец пациента, с постоянной концентрацией вируса (одинаковая вирусная нагрузка)
- Есть изменения в результатах измерения контролей - могут быть проблемы с мониторингом вирусной нагрузки у пациентов.
- Независимый контрольный материал критически важен для обеспечения достоверности результата и поиска проблем в лаборатории

Спасибо!
Вопросы?