



Kvalitetskontrol i molekylærbiologisk rutinediagnostik

Respirationsvejsvirus som model

Mette Høgh, cand. scient, ph.d.
Klinisk Mikrobiologisk Afdeling, Hvidovre Hospital
Mette.hoegh@hvh.regionh.dk

Oversigt

Introduktion til molekylærbiologisk rutine diagnostik

Kvalitetssikring – hvad skal der til?

Kriterier for kvalitet

Standardisering

Laboratorieprotokoller

Automatisering

Oprensning

Beregninger

Resultatevaluering

Kvalitetskontrol

Intern kontrol

Kontrol af analyseforløb

Værktøjskassen

Positive kontroller

Evaluering af reagensperformance

Ekstern kontrol

Organisationer

Laboratoriesamarbejde

Introduktion

Molekylærbiologisk rutinediagnostik

Amplifikation og detektion af nukleinsyrer.

Kun få kommercielle assays tilgængelige



Udvikling af in-house metoder

In-house metoder stiller særlige krav til kvalitetskontrol.

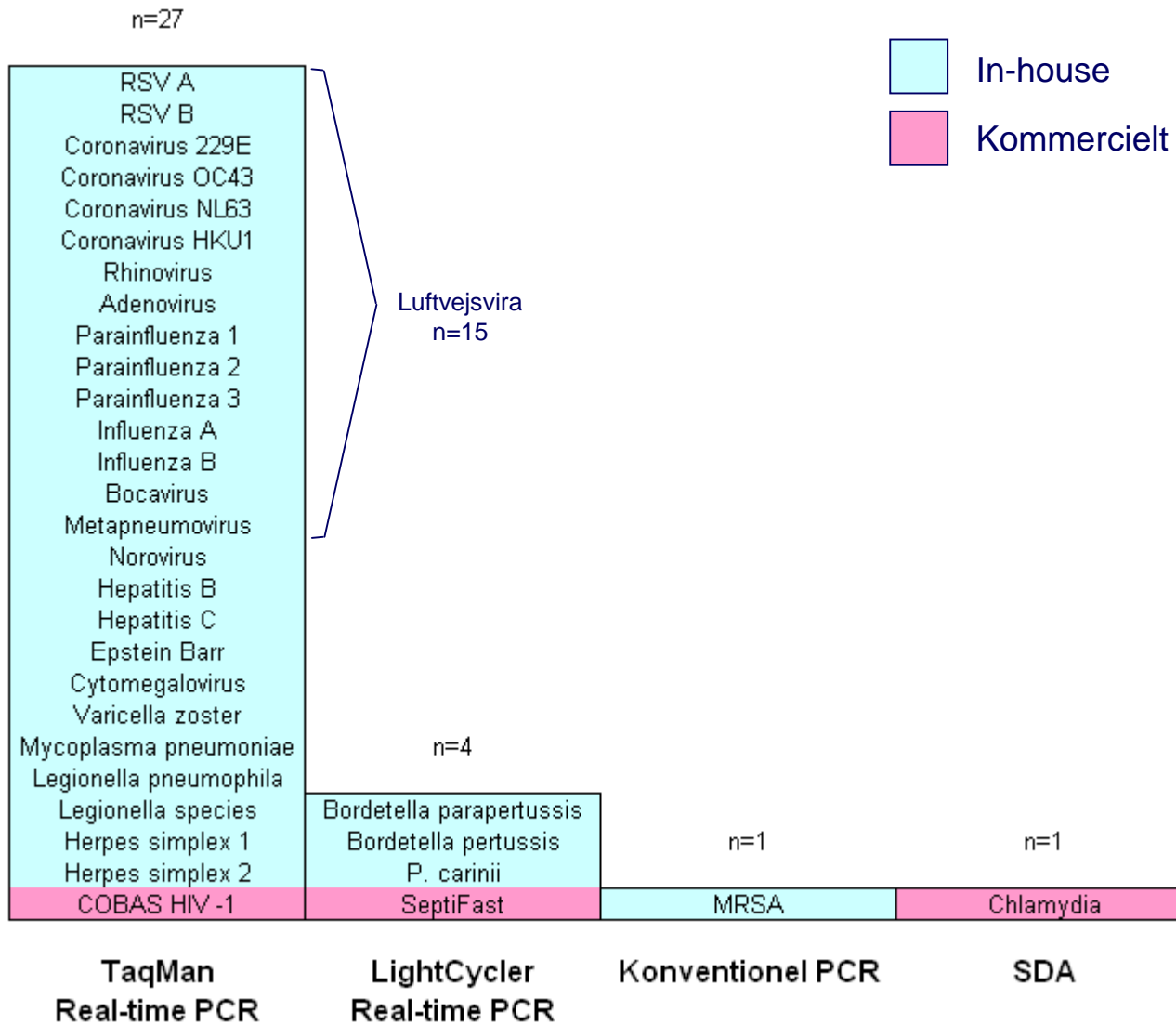
Real-time PCR er en populær metode på grund af dens hurtighed og specificitet.



In-house metoder stiller særligt høje krav til kvalitetskontrol.

Introduktion

Molekylærbiologiske analyser ved KMA Hvidovre fordelt på metode



Kvalitetssikring

Md/ghw#blj qh#r#
ehwrp w#
ixj chlq icxhq } d\$



Formålet med kvalitetssikring er at opnå pålidelige resultater.

En høj kvalitet sikres ved

- at fastlægge hvilke kriterier, der skal opfyldes, for at et resultat kan regnes for pålideligt.
- at beskrive kriterierne, så de er tilgængelige for alle implicerede parter og alle kan følge de samme retningslinier (standardisering).
- at kontrollere, at kriterierne for pålidelige resultater er opfyldt, inden resultaterne tages i brug.

Man kan ikke blot holde prøven op mod lyset og komme med et kvalificeret gæt.

Kriterier

Kriterier for real-time PCR analyser

Den enkelte analyse

- ✓ Oprensningen skal være forløbet tilfredsstillende
- ✓ Hæmning af PCR reaktionen skal kunne udelukkes
 - ✓ Assay skal kunne detektere target specifikt
 - ✓ Forurening skal kunne udelukkes
- ✓ Ved kvantitative bestemmelser skal resultatværdien ligge indenfor standardkurven

Generelt

- ✓ Performance af reagenser og kontroller valideres inden ibrugtagning

Standardisering

Standardisering

Laboratorieprotokoller: Skriv hvad du gør og gør hvad du skriver!

Personlig oplæring: Vær sikker på, at din kollega har forstået instrukserne.

Visse procedurer kan med fordel automatiseres

V w d q g d u g l v h u l q j # h w h u # h m i l q g l q j



Standardisering

Laboratorieprotokoller

For at sikre høj kvalitet gennem hele analysen bør alle væsentlige procedurer beskrives, herunder:

- Forberedelse af arbejdsområde
- Arbejdsgang omkring prøveanalyse
- Arbejdsgang omkring oprydning af arbejdsområde
 - Fortolkning af analysesvar
 - Troubleshooting

I øvrigt:

- Antallet af forskellige fremgangsmåder bør begrænses.
 - Prøvemateriale og kontroller behandles varsomt.
- Logbøger/filer føres over reagenser og reagensperformance.
 - In-house reagenser testes for performance.
 - Omhyggelig orden i skabe, fryser, mapper mv.



Vi har ikke kontrol over prøven gennem hele analyseforløbet

Standardisering

Automatiserede procedurer:

Oprensning



Beregning

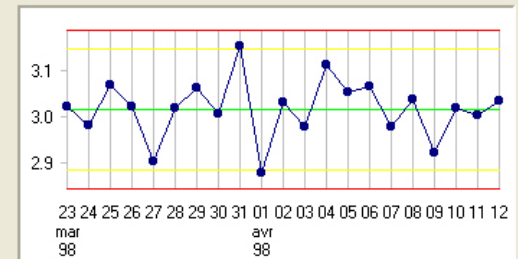


Microsoft
Office Excel
2003

Resultatevaluering

MedLabQC

Philippe Marquis - Biologiste des hôpitaux - Metz - France



**English version : Phillip Jordan
Royal Devon and Exeter Hospital - UK**

Standardisering

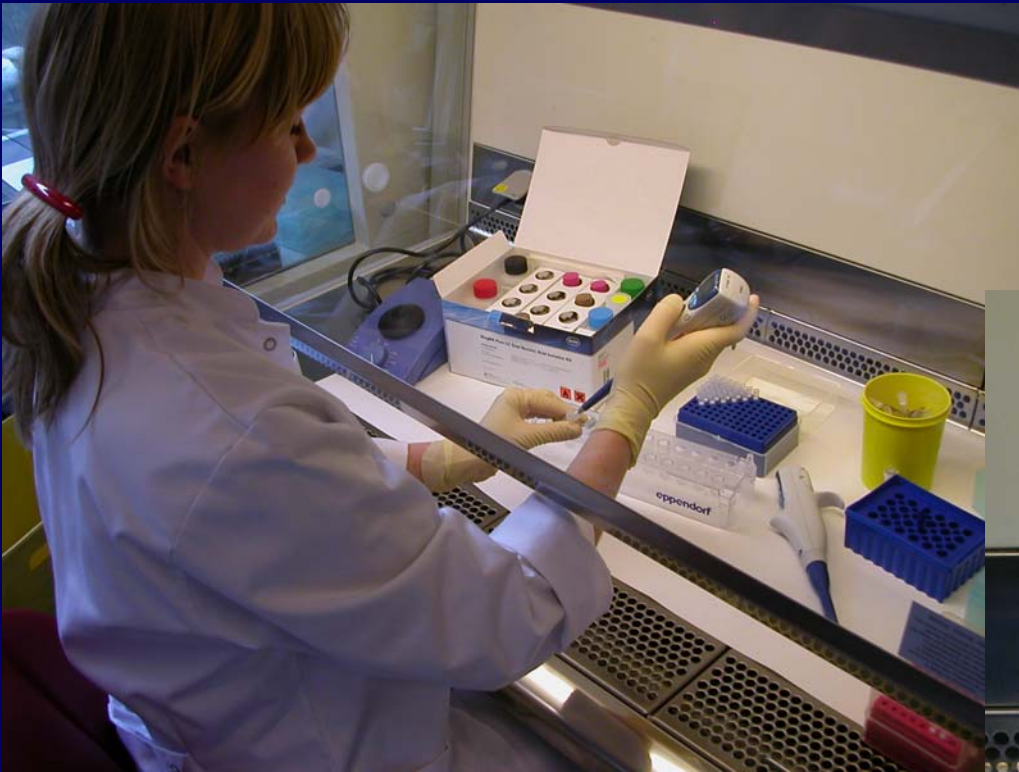
Automatisering: Oprensning



2 separate laboratorier med ens udstyr øger kapaciteten og fungerer som gensidig back-up. Analyser på RNA og DNA template er adskilt, hvilket formindsker risikoen for ombytning af reagenser.

Standardisering

Automatisering: Oprensning



MagNA Pure Total Nucleic Acid Isolation Kit



Standardisering

Automatisering: Beregning

Beregning af voluminer til PCR-opsætning sker i Office Excel. Dette forhindrer regnefejl og sikrer, at en passende mængde negativ kontrol oprenses. Det standardiserer det spildvolumen, der altid lægges til en reagensberegning og ved blanding af mere end et reaktionsmix sikrer det ensartede blandingsforhold for alle reaktionsmix. Dette sker ved at beregne voluminer til eet overordnet reaktionsmix, som herefter fordeles i rør, der tilsættes individuelle specifikke primere og prober. Arket har endvidere felter til at indføre reagens-lotnumre, så disse altid vil være tilknyttet opsætningen. Arket er skrivebeskyttet for at hindre utilsigtede ændringer.

Microsoft Excel - DNA Master Mix TaqMan.xls [Skrivebeskyttet]

1 DNA Master Mix - Super Master Mix Dato: Initialer:

2

3 NC til oprensning 1

4

5

6 Analyser Adeno virus Boca virus CMV (kvalitativ) EBV HBV (kvalitativ) HSV 1+2 Leg. spe/pneu Myc. Pneum. VZV PhHV

7 Antal prøver excl kontroller (udfyld) 1 Udfyldes ikke

12 Super Master Mix med TaqMan Universal PCR Master Mix ul/prøve Total (ul) Pipetter (ul) Reagens Lot (udfyld)

13

14 TaqMan Universal PCR Master Mix 25 577,5 578

15 Nuklease-frit vand 6 138,6 139

16 Total volumen 31 716,1 716

17 Individuelle Master Mix Adeno virus Boca virus CMV (kvalitativ) EBV HBV (kvalitativ) HSV 1+2 (i 2 rør) Leg. spe/pneu (i 2 rør) Myc. Pneum. VZV PhHV

18

19 3 reaktioner 0 reaktioner 0 reaktioner 0 reaktioner 0 reaktioner 4 reaktioner 0 reaktioner 0 reaktioner 0 reaktioner 6 reaktioner

20

21 Super Master Mix (ul) 124 0 0 0 0 155 0 0 0 217

22 Primer/probe (ul) 4,0 0,0 0,0 0,0 0,0 5,0 0,0 0,0 0,0 7,0

23 Volumen i alt (ul) 128 0 0 0 0 160 0 0 0 224

24

25 Primer/probe batch: (udfyld)

26

27

28

29 Mastermix fordeles i 96-brøndspladen á 32 ul per brønd. Til hver brønd tilsættes 18 ul template. Pladen analyseres på 7500 System.

30

31

Klar NUM

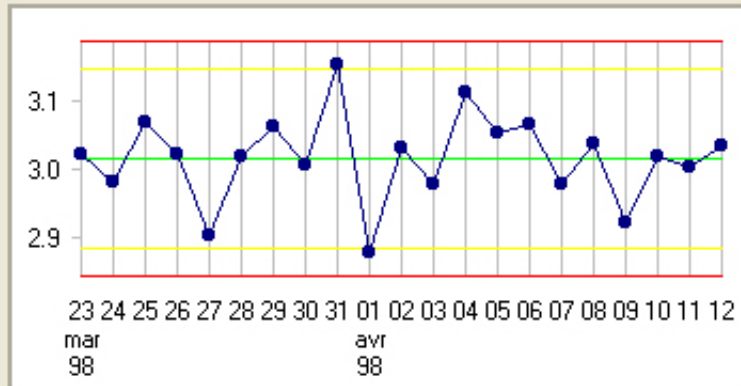
Standardisering

Automatisering: Resultatevaluering

Dele af resultatevalueringen sker automatisk i kvalitetskontrolprogrammet MedLab QC. MedLab QC evaluerer, om kvaliteten af en PCR-reaktion er tilfredsstillende. Hvis reaktionen ikke lever op til standarden gentages analysen inklusive oprensning. Evalueringen sker på baggrund af Ct-værdien for en intern kontrol.

MedLabQC

Philippe Marquis - Biologiste des hôpitaux - Metz - France



English version : Phillip Jordan
Royal Devon and Exeter Hospital - UK

Kvalitetskontrol

Kontrol

Når man har beskrevet et sæt kriterier og protokoller til at opfylde kriterierne skal man kontrollere, om det rent faktisk også sker. Kontrollen finder sted internt i eget laboratorium og eksternt ved at organer udenfor laboratoriet kontrollerer kvaliteten.

Intern kontrol i eget laboratorium

- Kontrol af det enkelte analyseforløb og analysekvalitet over tid

- Kontrol ved skift af in-house reagenser

Ekstern kontrol

- Kvalitetssikringsprogrammer

Kvalitetskontrol

Positiv kontrol

Inkluderes for at kontrollere, at assayet er i stand til at detektere target. Denne kontrol skal have et positivt resultat for at opfylde kriteriet.

Sikrer også, at der ikke er byttet om på reaktionsmix.

Optimalt vil en positiv kontrol være af samme type som target, fx vildtype virus. Men det er også muligt at benytte klonede targetsekvenser i plasmider eller PCR produkt af target (ikke stabilt).

Negativ kontrol

Inkluderes for at kontrollere, at reagenser ikke er forurenede med target. Denne kontrol skal have et negativt resultat for at opfylde kriteriet.

Den negative kontrol vil oftest bestå af vand, buffer eller medie svarende til det, som prøvematerialet befinder sig i. Det er vigtigt, at den negative kontrol bliver inkluderet i oprensningen for at kontrollere for eventuel forurening på dette trin.

Kvalitetskontrol



Intern positiv kontrol (IPC)

PDV Phocine Distemper Virus (mæslinger)

PhHV Phocine Herpes Virus 1 (herpes)

I opsætningen repræsenterer de hhv. RNA (PDV) og DNA (herpes) vira.

En blanding af PhHV og PDV (internal positive control, IPC) sættes til samtlige prøver inden oprensning. En fast fortynding og et fast volumen benyttes. Eventuelt kan IPC'en sættes til lysisbufferen ved automatisk oprensning for at eliminere manuelle pipetteringstrin.

De interne kontroller inkluderes for at kontrollere, at oprensningen er forløbet tilfredsstillende og at PCR reaktionen ikke er hæmmet.

Alle oprensede prøver analyseres for intern kontrol; PDV hvis prøven skal analyseres for et RNA target, PhHV hvis prøven analyseres for et DNA target.

Kvalitetskontrol



Intern positiv kontrol

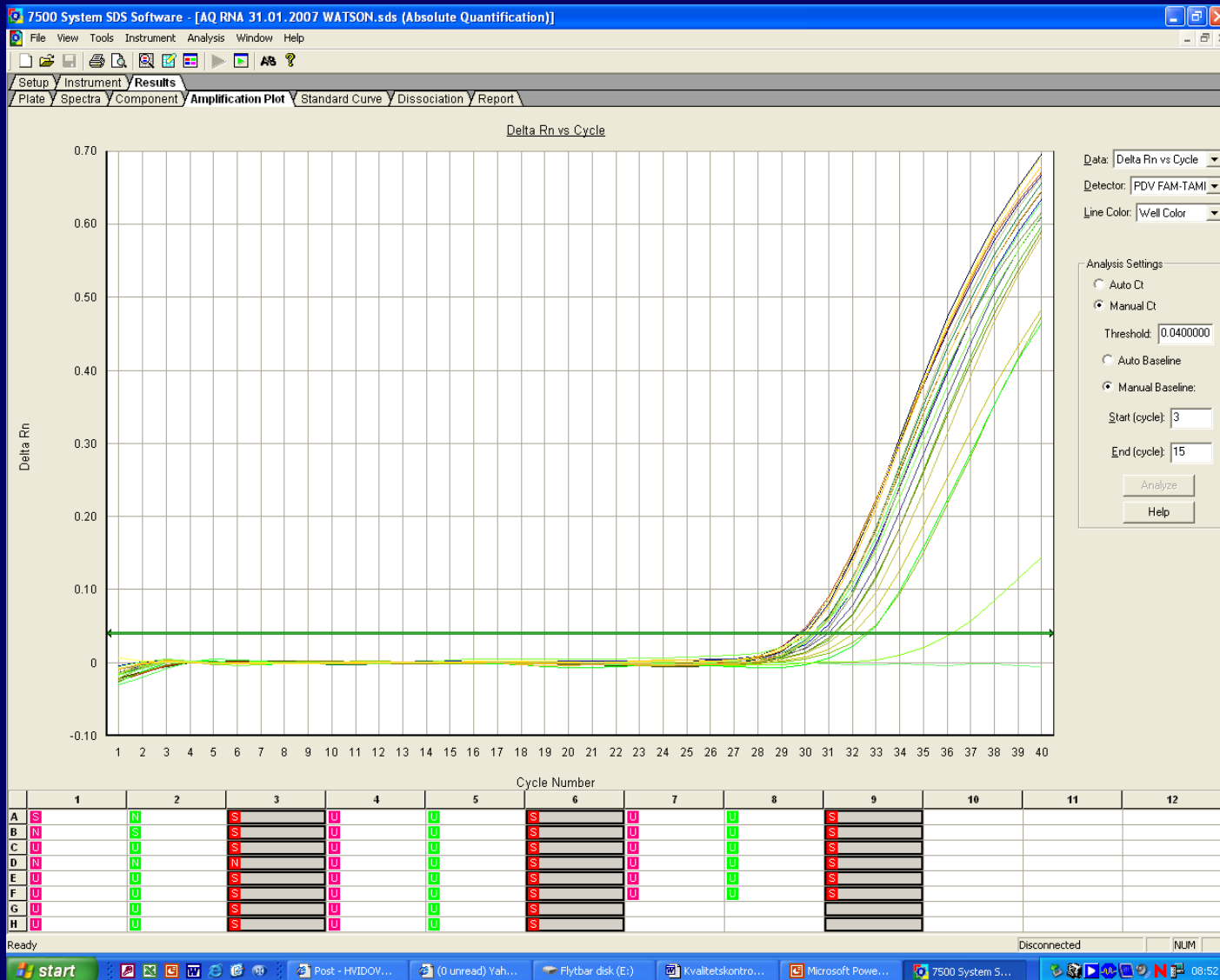
For at kvaliteten af PCR-reaktionen kan godkendes, skal den interne kontrol detekteres i prøven indenfor et forholdsvis snævert Ct-interval. Fortyndingen af den interne kontrol indstilles til at resultere i Ct ca. 32. Den acceptable variation omkring dette interval fastlægges ved at indtaste en række Ct-værdier for de interne kontroller i kvalitetskontrolprogrammet MedLab QC, som derefter beregner græseværdier baseret på standarddeviationer fra gennemsnitsværdien.

Det optimale vil være at detektere den interne kontrol i samme rør, som analysen, der skal kontrolleres, forløber i. I praksis kan dette betyde en nedsat sensitivitet for en eller begge af PCR-reaktionerne.

Udover at kontrollere den enkelte PCR-reaktion kan den interne kontrol også benyttes til at sammenligne effektiviteten af oprensning fra forskellige prøvematerialer og fungere som en kvalitetskontrol for reagenser og utensilier brugt i forbindelse med oprensning og PCR-opsætning.

Kvalitetskontrol

Reproducerbarhed af IPC



Kvalitetskontrol

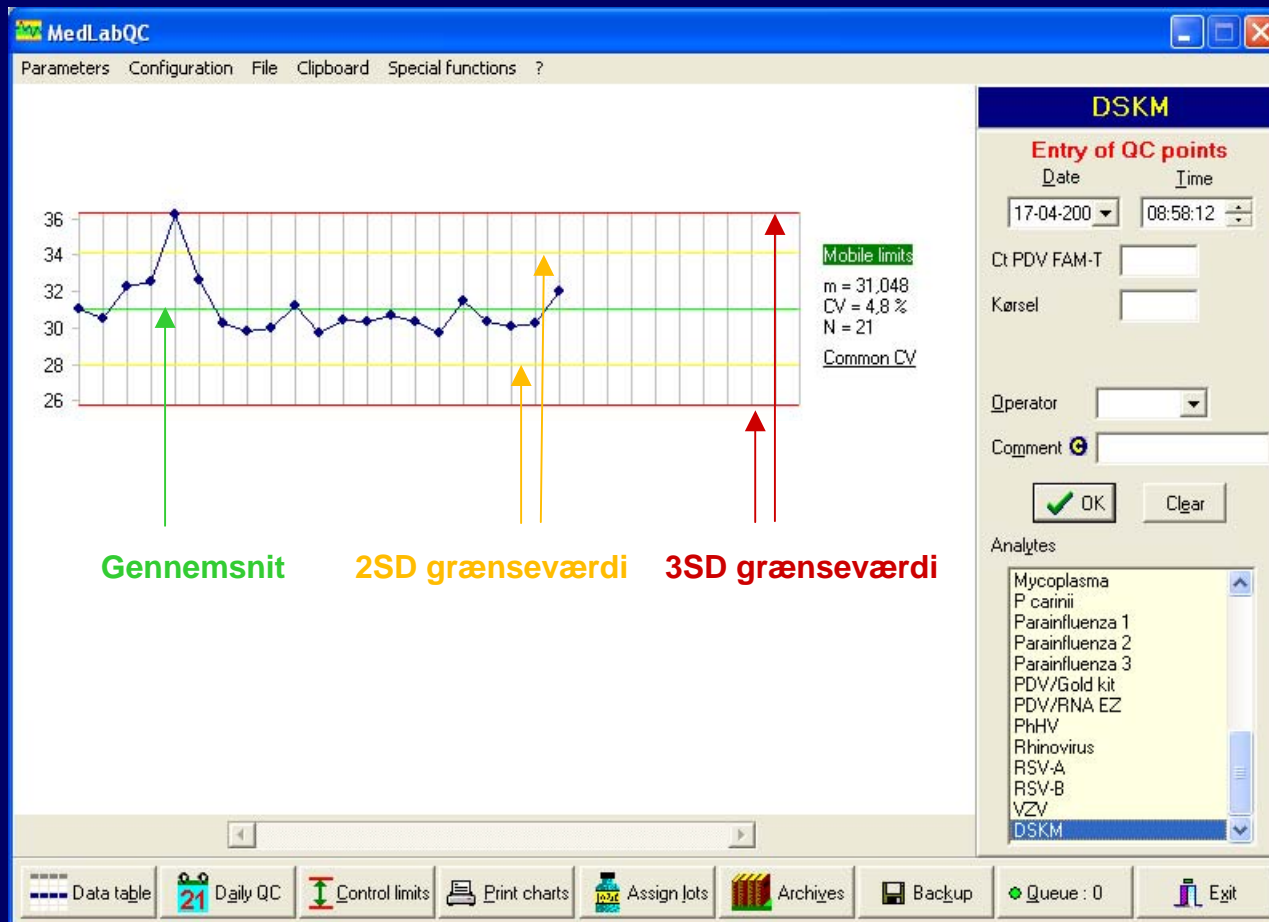


Værktøjskassen

Kvalitetskontrol

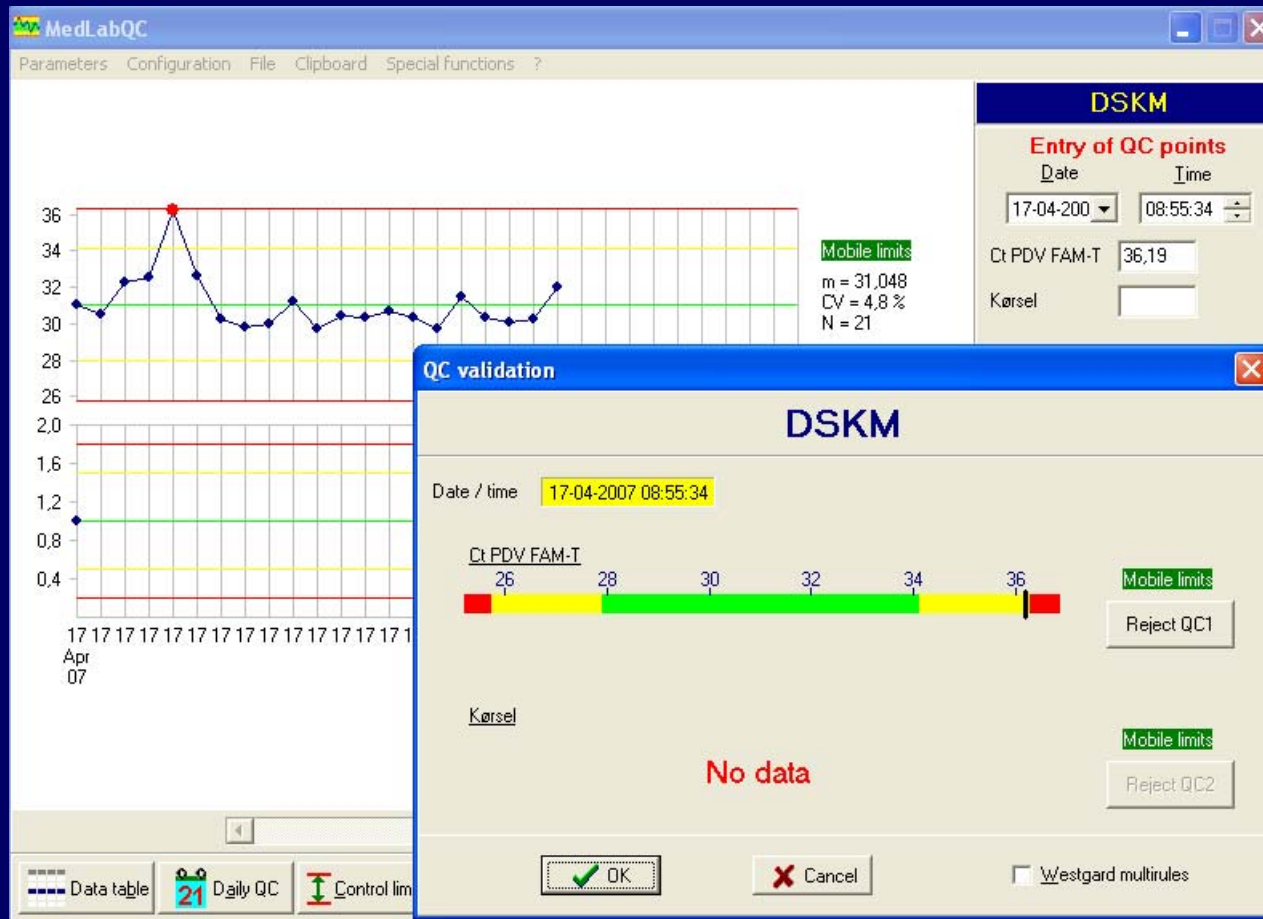
Monitorering af Ct for IPC og positive kontroller med MedLab QC

MedLab QC bruges til at evaluere værdierne for den interne kontrol for PCR analyserne og til at monitorere performance af de positive kontroller. Hvis værdierne for en positiv kontrol falder udenfor det acceptable område kan det være tegn på en fejl i reagensmixet. Nedbrydning af den positive kontrol over tid vil også kunne detekteres idet kurven udvise en svagt stigende tendens.



Kvalitetskontrol

Efter indtastning af Ct værdi vælges OK og en evalueringsboks popper op. En skala i boksen er inddelt i et rødt, gult og grønt område. Grønt område angiver intervallet, hvor værdierne befinder sig mindre end 2 standard deviation (SD) fra gennemsnittet af alle værdierne. Gult område er mellem 2 og 3 SD og rødt område er værdier, der ligger mere end 3 SD fra gennemsnittet. Den netop indtastede Ct værdi vises også på skalaen. En Ct værdi i grønt område kan udendvidere accepteres, en værdi i gult område er tvivlsom, mens en værdi i rødt område bør føre til, at PCR reaktionen køres om.



Kvalitetskontrol

D g r o l j r l v o n h d e r { # r i # k r f r o d w h B

\ r x # q h y h # q r z # z k d w # r x u h # j r q q d # j h w i i i B



Analyse af Ct ved skift af reagens

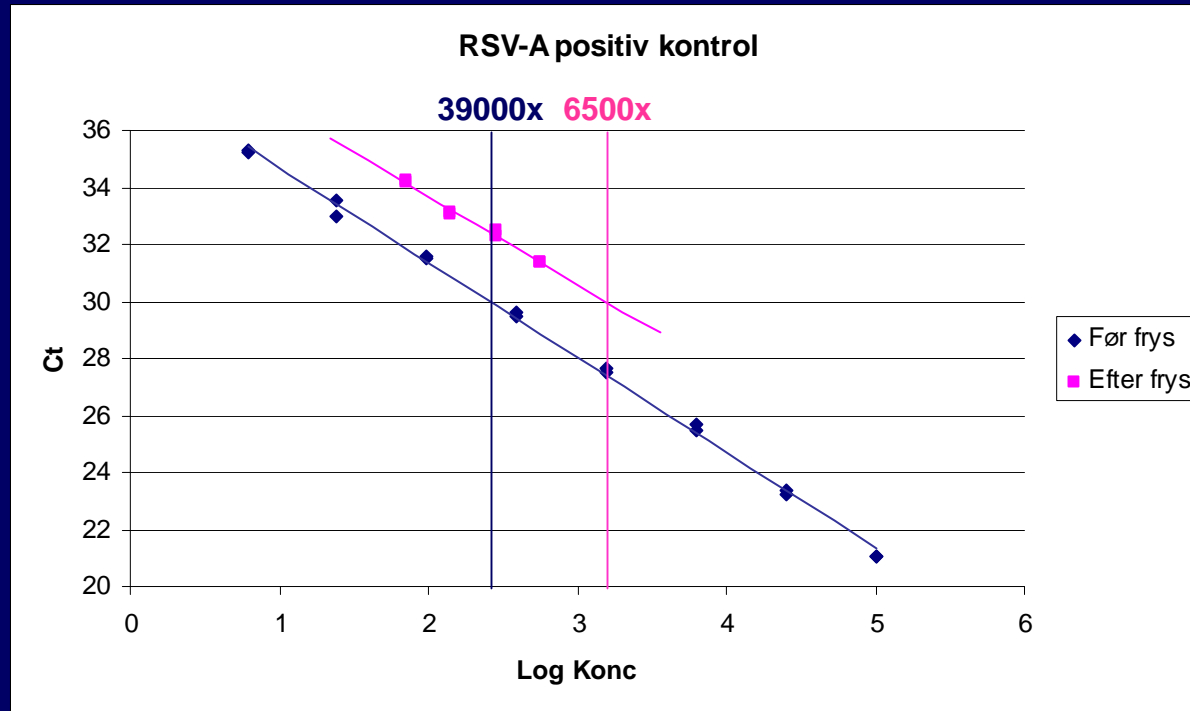
Ved udskiftning af in-house reagenser er det vigtigt at kontrollere performance før ibrugtagning. Det kan dreje sig om fx primere, prober og kontroller.

Da koncentrationen af alle disse har indflydelse på Ct-værdien og da det ydermere er denne værdi, kvalitetskontrollerne baserer sig på, evalueres disse reagensers indflydelse på Ct.

Kvalitetskontrol

Analyse af Ct ved skift af reagens

Frysning af positive kontroller medfører en ændring i Ct. Hvordan indstilles en kontrol til at give den korrekte Ct inden ibrugtagning?



En firefolds fortyndingsrække i området 100-1.638.400x analyseres. Udfra den resulterende kurve beregnes hvilken en fortynding, der bør resultere i Ct ~30. Herefter opsættes ny tofolds fortyndingsrække, der centrerer om denne fortynding. Fortyndingsrækken fryses O/N inden oprensning og analyse. Udfra den nye fortyndingsrække beregnes hvilken fortynding, der skal benyttes for at give Ct ~30 efter frysning.

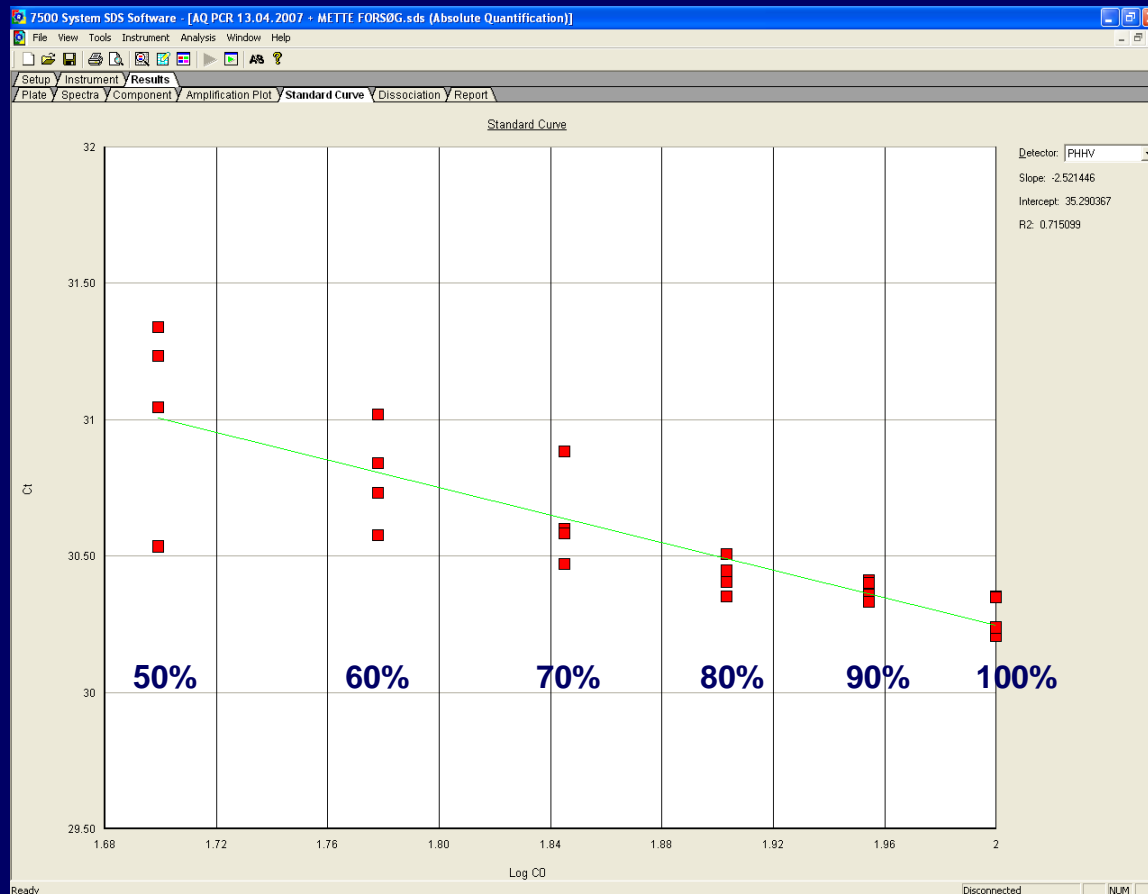
Ikke alle kontroller lider under frysning og hver kontrol må derfor vurderes individuelt.

Kvalitetskontrol

Analyse af Ct ved skift af reagens

En fortyndingsrække af primer/probe-mix i området 50% - 100% koncentration med fastholdt templatekoncentration illustrerer hvordan en suboptimal primer/probe blanding kan påvirke Ct. På samme måde som lav templatekoncentration medfører større spredning i replikate Ct ses det også ved lavere primer/probe-koncentrationer.

Hvordan detekteres signifikante ændringer?



Kvalitetskontrol



D g d o | w n h u #
. #
V w d w i w n

Analyse af Ct ved skift af reagens

Reagenset kan evalueres på

- Hvor godt reagenset er til at opnå en på forhånd givet Ct (fx den gennemsnitlige Ct for en positiv kontrol)?

Gennemsnitlig Ct og spredning er kendt for den positive kontrol gennem registrering af analysekørsler over længere tid (måske uger eller måneder). For at evaluere, om et nyt reagens kan opnå samme Ct må evalueringen også nødvendigvis strække sig over længere tid for at eliminere eventuelle faktorer, som kan præge kørsler på individuelle dage og dermed introducere systematiske fejl. En one-sample t-test samt beregning af værdiernes standarddeviation vil kunne evaluere om reagenset opfylder kravene. Denne metode er ikke ideel, hvis det gerne skal gå lidt hurtigt!

- Hvor godt er reagenset i forhold til et kendt reagens?

Ved sammenligning mellem to reagenser er det ikke den absolutte Ct-værdi, der opnås, der har betydning, men snarere forskellen i opnået Ct mellem de to reagenser. Et antal analyser køres under samme forhold med hvert sit reagens og de resulterende Ct kan herefter sammenlignes med en two-sample t-test.

Kvalitetskontrol

Sammenligning af to reagenser overfor hinanden

Spørgsmål til selv:

- Hvor stor en forskel i Ct mellem de to reagenser vil jeg kunne detektere?

Hvor stor må forskellen i Ct være før det får betydning for rutineanalysen?

- Hvor præcist kan jeg pipettere → Hvordan skal mit opsæt være for at minimere pipetteringsusikkerhed?

Test et antal replikater inden evalueringen. Det er svært at detektere en forskel mellem to reagenser, der er mindre end pipetteringsusikkerheden.

Statistisk styrke af opsætning:

De statistiske parametre af en evaluering kan undersøges før og efter analysen. Programmet "SP Sample Size and Power Calculation" kan benyttes til at få en idé om, hvor solid ens analyse er.

Kvalitetskontrol

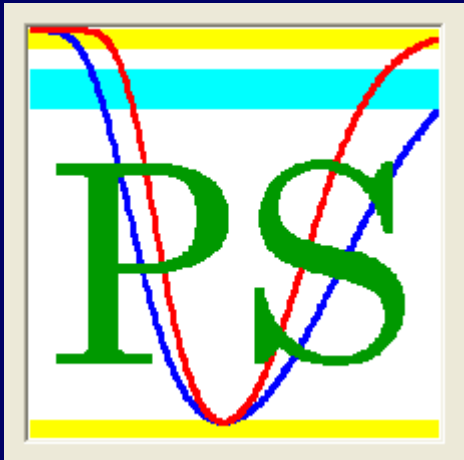
Sammenligning af to reagenser overfor hinanden

16 forskellige oprensninger af positiv kontrol er analyseret parvis med primer/probe mix (100% koncentreret) samt primer/probe mix (95% koncentreret). Den resulterende forskel på 0,15 Ct kunne detekteres med $p=0,017$.

	PPmix100 1. Replik	PPmix100 2. Replik	PPmix100 3. Replik	PPmix100 Middel	PPmix95 Middel	PPmix95 1. Replik	PPmix95 2. Replik	PPmix95 3. Replik
Template 1	32,26	32,03	32,43	32,24	32,76	32,67	32,97	32,63
Template 2	32,05	31,81	31,89	31,92	32,06	32,37	31,71	32,10
Template 3	32,24	32,29	32,19	32,24	32,18	32,03	32,35	32,17
Template 4	31,98	31,95	32,02	31,98	32,36	32,32	32,39	32,37
Template 5	32,01	32,02	32,14	32,06	32,14	32,25	32,17	31,99
Template 6	32,19	32,12	32,36	32,22	32,10	32,23	32,02	32,04
Template 7	32,33	32,33	32,14	32,27	32,12	32,27	31,94	32,15
Template 8	32,36	32,42	31,98	32,25	32,51	32,64	32,09	32,80
Template 9	31,64	32,16	32,20	32,00	32,22	32,16	32,33	32,17
Template 10	32,12	31,73	31,77	31,87	32,23	32,15	32,24	32,30
Template 11	32,33	32,38	32,03	32,25	32,20	32,29	32,20	32,12
Template 12	31,95	32,10	32,23	32,09	32,45	32,73	32,13	32,48
Template 13	32,09	32,00	32,13	32,07	32,37	32,51	32,13	32,46
Template 14	32,18	32,42	32,01	32,20	32,54	32,73	32,61	32,27
Template 15	32,78	32,38	32,23	32,46	32,29	32,46	32,28	32,14
Template 16	32,41	31,95	32,32	32,23	32,20	32,2	32,21	32,19
Middelværdi				32,15	32,30	Forskæl= 0.15 Ct		
SD				0,16	0,19			
				F test, $p= 0,44$				
				T test, $p= 0,017$				

Kvalitetskontrol

Beregning af statistisk power og sample size



PS programmet er freeware. Det beskriver effekten på power eller sample size af parametrene:

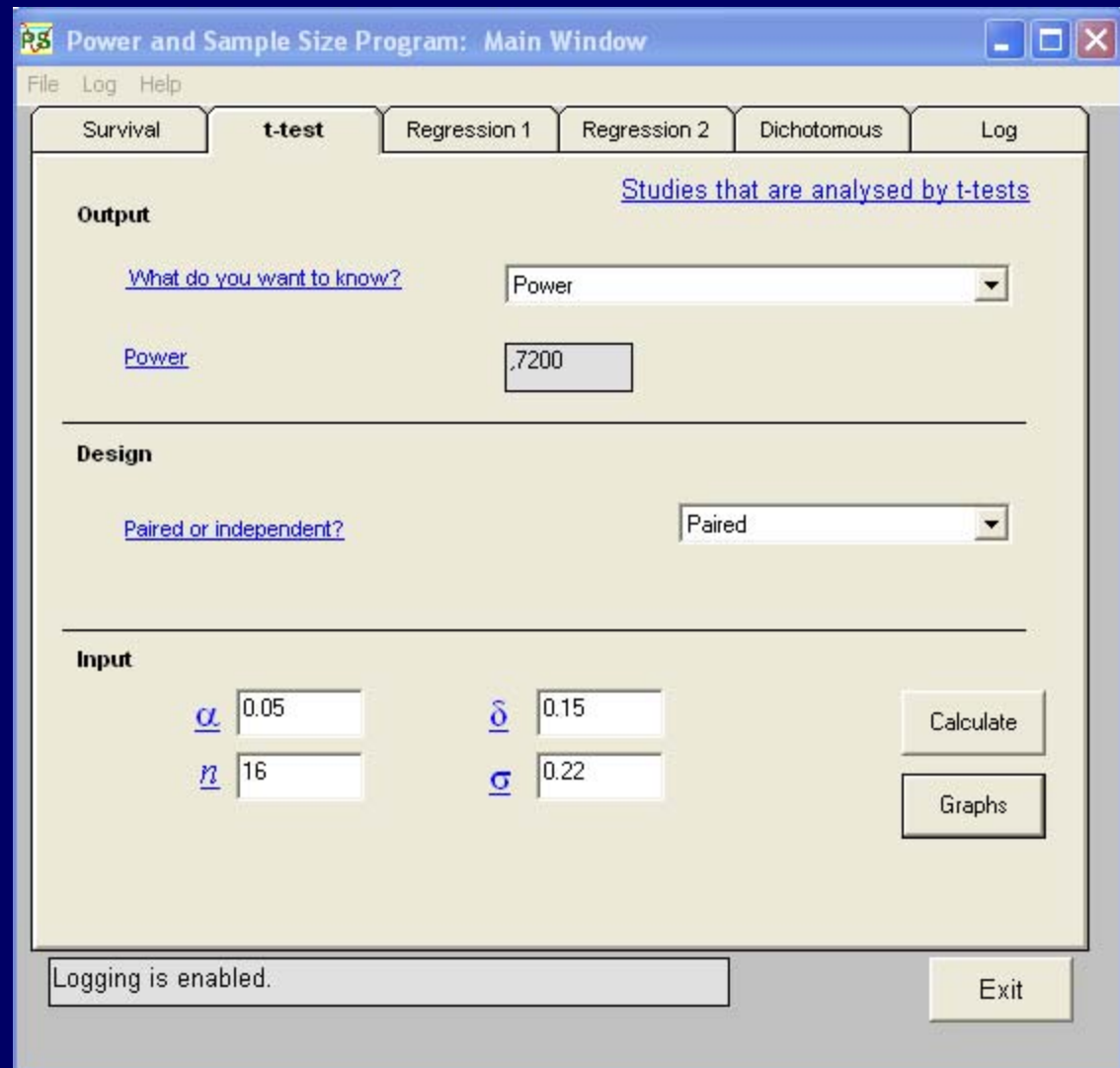
statistisk signifikans (α)

detektionsgrænse (δ)

sample size (n)

varians af måleværdierne (σ)

power



Power and Sample Size Program: Main Window

File Log Help

Survival **t-test** Regression 1 Regression 2 Dichotomous Log

[Studies that are analysed by t-tests](#)

Output

[What do you want to know?](#) Power

[Power](#) .7200

Design

[Paired or independent?](#) Paired

Input

α 0.05 δ 0.15 Calculate

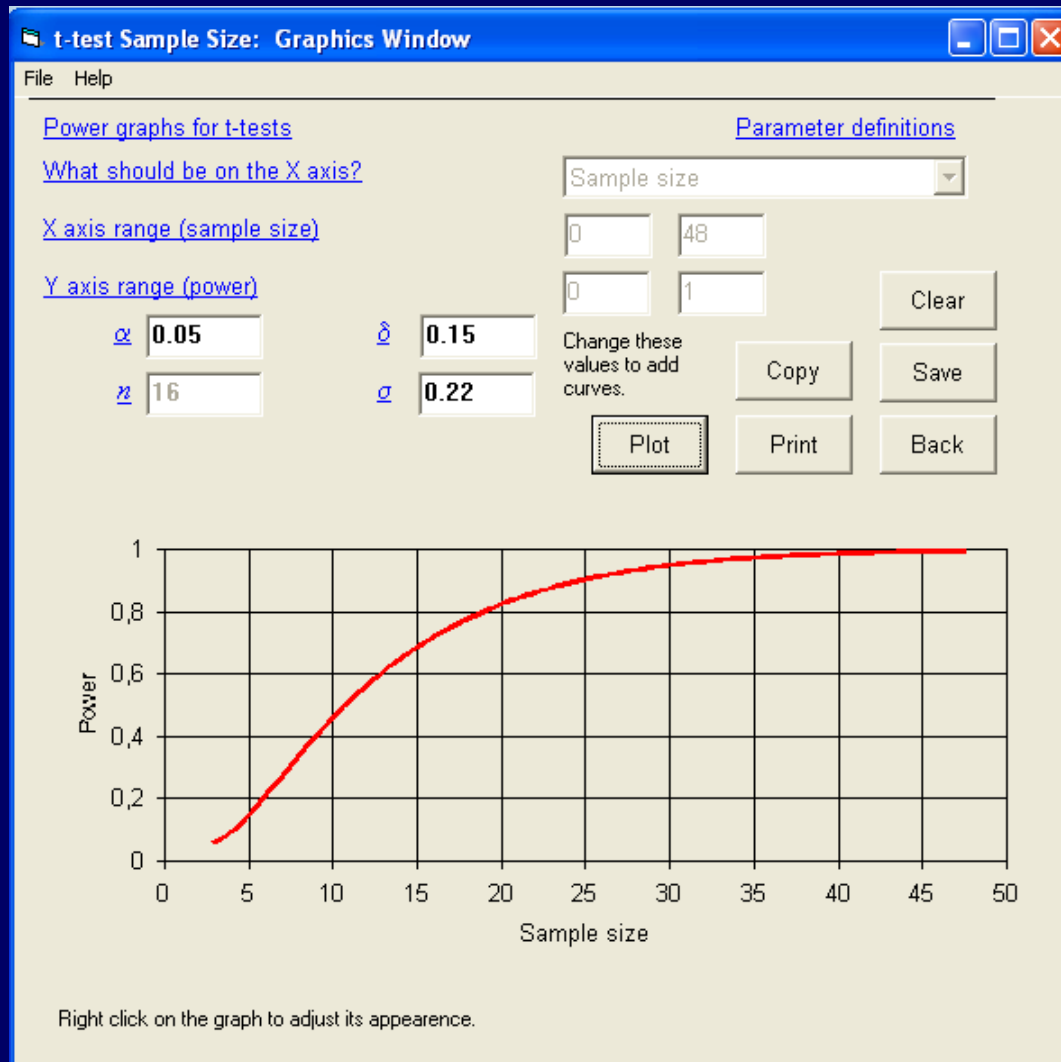
n 16 σ 0.22 Graphs

Logging is enabled. Exit

Kvalitetskontrol

Beregning af statistisk power og sample size

PS programmet kan plotte sammenhængen mellem sample size og power for et givet sæt parametre.

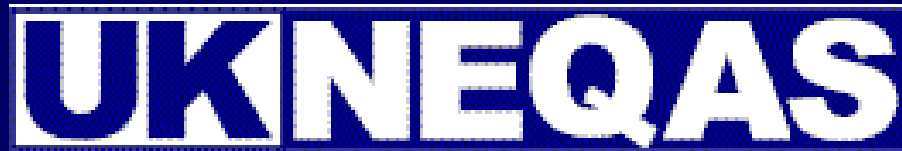


Kvalitetskontrol

Ekstern kvalitetskontrol

- Detekterer svage punkter i analyseperformance.
- Øger pålideligheden af analyseresultater.
- Giver mulighed for at sammenligne sig selv med andre laboratorier.
- Giver en referenceramme i mangel af internationale standarder.
- Er kun relevant hvis kontrollen sker med samme prøvemateriale, som normalt bruges

Kvalitetskontrol



Ekstern kontrol

Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD) (<http://www.qcmd.org/Index2.htm>)

United Kingdom National External Quality Assessment Service (UK NEQAS) (<http://www.ukneqas.org.uk/>)

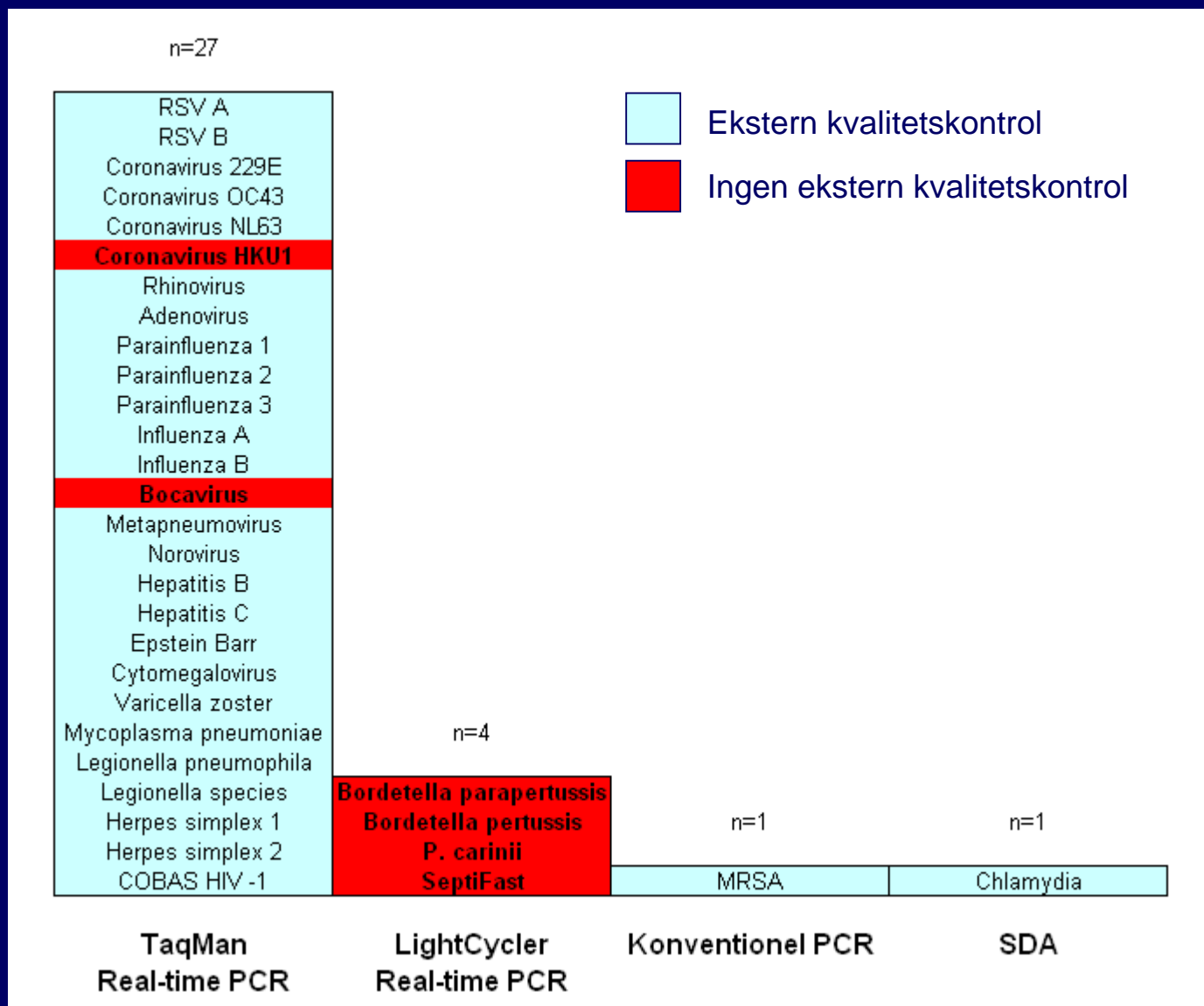
External Quality Assurance in Laboratory Medicine in Sweden (EQUALIS) (www.equalis.se)

Organisationerne er specialiseret i standardisering og kvalitetskontrol for molekylærbiologisk diagnostik og udbyder kvalitetskontrolprogrammer, som man kan melde sig til.

Årligt udsendes testpaneler af prøver til deltagende laboratorier. Laboratorierne blindtester prøverne og rapporterer resultaterne til organisationen, som samler og evaluerer resultaterne for alle deltagere i et givet program. Evalueringen meddeles derefter til laboratorierne, som derved har et mål for kvaliteten af deres analyse.

Kvalitetskontrol

Tilgængelig ekstern kvalitetskontrol til molekylærbiologiske analyser ved KMA Hvidovre



Kvalitetskontrol

Samarbejde om kvalitetssikring mellem danske klinisk mikrobiologiske laboratorier

Mange forskellige in-house metoder kan give betydelig heterogenitet i analyse-sensitivitet mellem laboratorier.

Hvor god er din metode??

Et samarbejde mellem danske klinisk mikrobiologiske afdelinger med fokus på kvalitetssikring af molekylærbiologiske diagnostiske analyser vil være et stort skridt på vejen.

Fastlæggelse af kvalitetskriterier indenfor følgende områder:

- Design af nye analyser (targetområde - et eller flere, multiplexe assays)
- Validering af analyser (hvornår er en analyse tilstrækkeligt valideret mhp specificitet og sensitivitet mm)
- Løbende kvalitetskontrol (performance af kontroller og reagenser, prøveudveksling mellem laboratorier)

Er du interesseret?

Henvendelse til

Mette Høgh

**Klinisk Mikrobiologisk Afdeling 445
Hvidovre Hospital**

mette.hoegh@hvh.regionh.dk

3632 2429 (sekretariat)