

cobas[®] DPX TYRIMO SU cobas[®] 6800 Systems
PATIKRINIMO PLANAS

Organizacijos pavadinimas ir adresas:

VIEŠOJI ĮSTAIGA NACIONALINIS KRAUJO CENTRAS
ŽOLYNO G. 34, VILNIUS

Patikrinimo planą parengė:

UAB "Roche Lietuva"

VšĮ Nacionalinis kraujo centras

(pareigos, vardas, pavardė, parašas, data)

(pareigos, vardas, pavardė, parašas, data)

Suderino:

UAB "Roche Lietuva"

VšĮ Nacionalinis kraujo centras

(pareigos, vardas, pavardė, parašas, data)

(pareigos, vardas, pavardė, parašas, data)

Patvirtino:

(pareigos, vardas, pavardė, parašas, data)

INFORMACIJA APIE DOKUMENTĄ

Prieš pradėdant naudoti rutiniame darbe cobas[®] DPX tyrimas patikrinamas vadovaujantis šiame dokumente nurodytu tyrimo metodo patikrinimo planu. Tyrimo metodo patikrinimo metu bus tikrinama ar atliekant tyrimus su turima įranga, turimomis sąlygomis, dirbant skirtingiems darbuotojams įmanoma pasiekti reagentų gamintojo instrukcijoje nurodytas funkcionalumo charakteristikas.

cobas[®]DPX tyrimo metodo patikrinimas atliekamas su cobas[®]6800 System. cobas[®]DPX yra sudėtinis kokybinis hepatito A viruso (HAV) ir kiekybinis parvoviruso B19 nukleorūgščių tyrimas.

DOKUMENTACIJA

Ruošiant tyrimo metodo patikrinimo protokolą remtasi European Pharmacopoeia 7.0 (07/2010:20621) 2.6.21 skyriaus *Nucleic Acid Amplification Techniques* rekomendacijomis.

ĮRANGA

- cobas[®] 6800 sistema (kat. nr. 05524245001), serijos numeris 1149;
- cobas p680 instrumentas (kat. nr. 06570577001), serijos numeris 7924;
- SW cobas[®] 6800/8800 v1.3.8 (kat. nr. 05412722001, 05524245001, 06301037001, 06349595001, 06570577001);
- SW cobas[®] MPX ASAP v11.0.0 (kat. nr. 08420432001);
- SW cobas[®] DPX ASAP v11.0.0 (kat. nr. 08420513001).

MEDŽIAGOS

- Parvovirus B19 referentinė medžiaga NAT tyrimams, NIBSC code: 12/208, koncentracija $1,41 \times 10^6$ TV/ml (Žr. Parvo B19 12-208).
- Referentinis hepatito A RNR standartas, skirtas NAT tyrimams, NIBSC code 15/276. Darbinė koncentracija $2,63 \times 10^5$ TV/ml (Žr. HAV 15-276).
- Šviežiai šaldytos žmogaus plazmos kaupiniai, 10 kartų ištirti cobas[®] DPX tyrimu ir patvirtinti kaip nereaktyvūs dėl HCV RNR, HIV RNR, HBV DNR, HAV DNR ir parvoviruso B19 DNR (National Centre for the Control and Evaluation of Medicines (CNCF)).
- AcroMetrix[™] EDTA Plasma Dilution Matrix (ThermoFisher), nereaktyvi visiems kraujo patogenams, virusų nukleorūgštims ir serologiniams markeriams (Žr. Acrometrix.pdf).

PRIEMONĖS

cobas[®] 6800 Systems reagentai ir priemonės

1 lentelė

Katalogo numeris	Pavadinimas	Partijos numeris	Galiojimo laikas
6997511190	cobas omni Specimen Diluent		
6997538190	cobas omni Lysis Reagent		
6997503190	cobas omni Wash Reagent		
6997546190	cobas omni MGP Reagent		
5534925001	cobas omni Pipette Tips		
5534917001	cobas omni Processing Plate		
5534941001	cobas omni Amplification Plate		
7002238190	cobas [®] Buffer Negative Control Kit		
7001126190	cobas [®] DPX Control Kit		
7001088190	cobas [®] DPX		
6438776001	Secondary tubes		

cobas p680 Instrument priemonės

2 lentelė

Katalogo numeris	Pavadinimas	Partijos numeris	Galiojimo laikas
4639642001	TIP CORE TIPS with Filter, 1 mL		
4639642001	Plate Deepwell 2.2 mL w.BC-Label		

Papildomos priemonės

- X500 MICROTUBE NATURAL 5 ml (kat. nr. 11926955, Fisher Scientific) arba ekvivalentas;
- X500 Centrifuge Tube, 15 ml (kat. nr. 11765075, Fisher Scientific) arba ekvivalentas;
- Kintamo tūrio pipetė „Hirschmann labopette“, Nr. 15504817, matavimo ribos 100 ÷ 1000 µl arba ekvivalentas;
- Automatinės pipetės antgaliai ZAP Premier LTS Tips, 100 ÷ 1200 µl (sterilūs, be DNAzių ir RNAzių) arba ekvivalentas.

Visos patikrinimui naudotos medžiagos ir priemonės buvo laikomos ir transportuojamos laikantis jų gamintojo naudojimo instrukcijose nurodytų laikymo ir transportavimo reikalavimų.

HAV RNR nustatymo naudojant cobas®DPX tyrimą patikrinimo planas

Žinomos koncentracijos tirpalų paruošimas

Žinomos koncentracijos tirpalai paruošiami atliekant serijinius hepatito A RNR referentinio standarto (Referentinis hepatito A RNR standartas, skirtas NAT tyrimams, NIBSC code 15-276; darbinė koncentracija 4×10^3 TV/ml) skiedimus nereaktyvia žmogaus plazma (AcroMetrix™ EDTA Plasma Dilution Matrix (ThermoFisher)).

cobas® DPX tyrimo metodo patikrinimas HAV nustatymui

cobas®DPX tyrimo metodo patikrinimo metu vertinamos šios tyrimo metodo funkcionalumo charakteristikos:

1. Glaudumas (angl. *Precision*);
2. Tikslumas (angl. *Accuracy*): diagnostinis specifiškumas, diagnostinis jautrumas, teigiama prognostinė vertė, neigiama prognostinė vertė, aptikimo riba;
3. Patikimumas (angl. *Robustness*);
4. Kryžminis užterštumas (angl. *Cross-contamination*).

Patikrinimas atliekamas naudojant cobas®DPX sudėtinį hepatito A viruso (HAV) ir parvoviruso B19 nukleorūgščių tyrimą. Tai kokybinis HAV RNR tyrimo metodas.

1. Glaudumas (angl. *precision*) yra atkuriamumas – tai yra atsitiktinės klaidos diapazono nustatymo procesas. Glaudumas išreiškiamas variacijos koeficientu (CV).

cobas®DPX tyrimo metodo gamintojo nurodomas glaudumas (atkartojamumas) įvertinamas panaudojant 3 koncentracijų mėginius $0,5 \times \text{LoD} - 2,1 \text{ CV\%}$; $1,0 \times \text{LoD} - 2,1 \text{ CV\%}$; $3,0 \times \text{LoD} - 2,0 \text{ CV\%}$.

KLIS Molekulinės biologijos laboratorijoje glaudumui nustatyti naudojami HAV RNR 3 koncentracijų mėginiai: 3 TV/mL; 1,5 TV/mL ir 0,75 TV/mL. Kiekvienos koncentracijos mėginiai tiriami 3 dienas iš eilės po 8 kartus, tyrimą atliekant trims skirtingiems operatoriams. Iš viso gaunami 24 kiekvienos koncentracijos mėginio rezultatai. Naudojant mėginių, kuriems gautas teigiamas HAV rezultatas, nustatytas Ct reikšmės, apskaičiuojamas variacijos koeficientas CV %.

Priimtino kriterijai: Gauta CV reikšmė yra palyginama su gamintojo pateikta glaudumo verte. Laboratorijoje gauta CV vertė turi būti mažesnė arba lygi gamintojo nurodytai CV vertei ($\leq 2,0$). Jeigu tyrimo rezultatai neatitinka numatytų kriterijų, KLIS vedėjas kartu su KUS vedėju priima sprendimą dėl tyrimo metodo priimtumo.

2. Tikslumas (angl. *Accuracy*) yra tikrosios vertės nustatymas tiriamajai medžiagai. Tikslumo patvirtinimas užtikrina, kad tyrimo rezultatai yra teisingi ir patikimi. Tyrimo metodo tikslumą apibrėžia jo jautrumas, specifiškumas, teigiama prognostinė vertė, neigiama prognostinė vertė ir aptikimo riba.

KLIS Molekulinės biologijos laboratorijoje cobas®DPX tyrimo metodo HAV diagnostinio jautrumo, specifiškumo, neigiamos prognostinės vertės ir teigiamos prognostinės vertės įvertinimui tiriama 103 HAV RNR nereaktyvios žmogaus plazmos kaupinių mėginių ir 82 skirtingos, už LoD didesnės (400 TV/ml – 10 mėg.; 3,3 TV/ml – 20 mėg.; 3,0 TV/ml – 24 mėg.; 1,5 TV/ml – 28 mėg.), koncentracijos HAV teigiamų mėginių.

cobas®DPX tyrimo metodo diagnostinis jautrumas HAV įvertinamas apskaičiuojant teisingai teigiamų rezultatų dažnį.

cobas®DPX tyrimo metodo diagnostinis specifiškumas HAV įvertinamas apskaičiuojant teisingai neigiamų rezultatų dažnį.

Įvertinama cobas®DPX tyrimo metodo teigiama prognostinė vertė HAV ir neigiama prognostinė vertė HAV.

cobas®DPX tyrimo metodo aptikimo ribos įvertinimui naudojamos 3 HAV žinomos koncentracijos mėginių skiedimų serijos (3 TV/mL; 1,5 TV/mL ir 0,75 TV/mL). Kiekvienos koncentracijos mėginiai tiriami 3 dienas iš eilės po 8 kartus, tyrimą atliekant trims skirtingiems operatoriams, taip gaunant po 24 tyrimų rezultatus kiekvienam tiriamam HAV koncentracijos mėginiui. cobas®DPX tyrimo metodo aptikimo riba (95% patikimumo intervalui) apskaičiuojama naudojant statistinį įvertinimo metodą pagrįstą atsako ir tiesės krypties koeficiento standartiniu nuokrypiu (angl. *based on SD of the response and the slope*).

Priimtino kriterijai: Nustatyta aptikimo riba (mažiausia HAV koncentracija, kuri aptinkama 95% tiriamų mėginių) turi būti žemesnė arba lygi gamintojo nurodytai vertei (HAV LoD - 1,1 TV/ml). Nereaktyvios žmogaus plazmos kaupiniuose neturi būti aptikta HAV RNR (diagnostinis specifiškumas lygus 100%). Jeigu tyrimo rezultatai neatitinka numatytų kriterijų, KLIS vedėjas kartu su KUS vedėju priima sprendimą dėl tyrimo metodo priimtino.

3. Patikimumas (angl. *Robustness*) nusako analitinio tyrimo procedūros gebėjimą likti nepakitusia nepaisant smulkių metodo parametrų svyravimų ir nurodo tyrimo metodo patikimumą jį naudojant įprastinėmis laboratorijos sąlygomis.

cobas®DPX tyrimo metodo patikimumas įvertintas remiantis Eur. Ph. Versija 7.0. 2.6.21. skyriuje nurodytais reikalavimais kokybinių tyrimų patikimumo patikrinimui, tiriant 20 3x LoD koncentracijos (3,3 TV/mL) HAV mėginių.

Priimtino kriterijai: Visi 20 ištirtų 3x LoD koncentracijos (3,3 TV/mL) HAV mėginių turi turėti teigiamą HAV rezultatą. Jeigu tyrimo rezultatai neatitinka numatytų kriterijų, KLIS vedėjas kartu su KUS vedėju priima sprendimą dėl tyrimo metodo priimtino.

4. Kryžminis užterštumas (angl. *cross-contamination*) nurodo tikimybę, kad tyrimo atlikimo metu tiriamoji analizė iš vieno mėginio gali patekti į kitą mėginį ir būti jame identifikuota.

cobas[®]DPX tyrimo metodo kryžminio užterštumo įvertinimui vieno sistemos paleidimo metu tiriama 30 HAV neigiamų nereaktyvios žmogaus plazmos kaupinių mėginių ir 10 aukštos HAV koncentracijos (400 TV/mL; 10^2 kartų didesnė nei HAV RNR aptikimo riba) mėginių, mėginius į sistemą įkeliant šachmatų principu (teigiami mėginiai išsidėstę greta neigiamų).

Priimtino kriterijai: Visi 30 ištirtų HAV neigiamų nereaktyvios žmogaus plazmos kaupinių mėginių turi turėti neigiamą HAV rezultatą. Jeigu tyrimo rezultatai neatitinka numatytų kriterijų, KLIS vedėjas kartu su KUS vedėju priima sprendimą dėl tyrimo metodo priimtino.

Parvoviruso B19 DNR nustatymo naudojant cobas®DPX tyrimą patikrinimo planas

Žinomos koncentracijos tirpalų paruošimas

Žinomos koncentracijos tirpalai paruošiami atliekant serijinius parvoviruso B19 referentinio standarto (Parvovirus B19 referentinė medžiaga NAT tyrimams, NIBSC code:12-208; Darbinė koncentracija 4×10^4 TV/ml, 1 priedas) skiedimus nereaktyvia žmogaus plazma (AcroMetrix™ EDTA Plasma Dilution Matrix (ThermoFisher)).

cobas® DPX tyrimo metodo patikrinimas parvoviruso B19 nustatymui

cobas®DPX tyrimo metodo patikrinimo metu vertinamos šios tyrimo funkcionalumo charakteristikos:

1. Glaudumas (angl. *Precision*);
2. Tikslumas (angl. *Accuracy*);
3. Specifiškumas (angl. *Specificity*);
4. Linijškumas (angl. *Linearity*);
5. Patikimumas (angl. *Robustness*);
6. Kryžminis užterštumas (angl. *Cross-contamination*).

Patikrinimas atliekamas naudojant cobas®DPX sudėtinį hepatito A viruso (HAV) ir parvoviruso B19 nukleorūgščių tyrimą. Tai kiekybinis parvoviruso B19 DNR tyrimo metodas.

1. Glaudumas (angl. *precision*) yra atkuriamumas – tai yra atsitiktinės klaidos diapazono nustatymo procesas. Glaudumas išreiškiamas variacijos koeficientu (CV). Kiekybinio tyrimo glaudumas vertinamas dvejais lygiais - atkartojamumas (angl. *repeatability*) ir pereinamasis glaudumas (angl. *intermediate precision*).

cobas®DPX tyrimo metodo atkartojamumas įvertinamas vieno sistemos paleidimo metu tiriant mažiausiai po tris 3 skirtingų koncentracijų (40 TV/mL, 1000 TV/mL ir 10 000 TV/mL), apimančių žemutinę gamintojo nurodytą tiesinio kiekybinio įvertinimo intervalo sritį, mėginius. Naudojant nustatytas parvoviruso B19 titro reikšmes apskaičiuojamas variacijos koeficientas CV %.

cobas®DPX tyrimo metodo pereinamasis glaudumas įvertinamas trimis skirtingomis dienomis, trims skirtingiems operatoriams tiriant 3 skirtingų koncentracijų (40 TV/mL, 1000 TV/mL ir 10 000 TV/mL), apimančių žemutinę gamintojo nurodytą tiesinio kiekybinio įvertinimo intervalo sritį, mėginius. Palyginant priskirtas ir nustatytas parvoviruso B19 titro reikšmes apskaičiuojamas variacijos koeficientas CV %.

Priimtino kriterijai: Gamintojas nenurodo tyrimo metodo variacijos koeficiento vertės, todėl priimtino kriterijus variacijos koeficiento vertei buvo parinktas pagal mokslinėje literatūroje nurodytą vertę, t.y. CV vertė negali viršyti 15 proc.

2. Tikslumas (angl. *accuracy*) yra tikrosios vertės nustatymas tiriamajai medžiagai. Tikslumo patvirtinimas užtikrina, kad tyrimo rezultatai yra teisingi ir patikimi. Kiekybinio tyrimo metodo tikslumas vertinamas jam nustatytos ribinės vertės (angl. *cut off*) srityje.

KLIS Molekulinės biologijos laboratorijoje cobas®DPX tyrimo metodo parvoviruso B19 tikslumo įvertinimui tirama po tris 5 parvoviruso B19 koncentracijų (skiedimo faktorius 0,5 log) mėginių pakartojimus. Tiriamų mėginių koncentracijos: 316 TV/ml, 1000 TV/ml, 3162 TV/ml, 10 000 TV/ml ir 31 622 TV/ml. Pasirinktos mėginių koncentracijos apima tyrimui nustatytos ribinės vertės (10 000 TV/ml) sritį.

Priimtino kriterijai: Nustatyti kiekybiniai tyrimų rezultatai turi atitikti žinomą tiriamųjų mėginių parvoviruso B19 DNR koncentraciją visose penkiose koncentracijų grupėse. Skirtumas tarp žinomų ir laboratorijoje gautų rezultatų turi būti statistiškai nereikšmingas. Jeigu tyrimo rezultatai neatitinka numatytų kriterijų, KLIS vedėjas kartu su KUS vedėju priima sprendimą dėl tyrimo metodo priimtino.

3. Specifiškumas (angl. *specificity*) yra tyrimo geba nustatyti tiriamasias nukleorūgštis mėginyje esant kitoms sudėtinėms jo dalims, kurios gali turėti įtaką tyrimo rezultatams.

KLIS Molekulinės biologijos laboratorijoje cobas®DPX tyrimo metodo parvoviruso B19 specifiškumo įvertinimui tiriami 30 nereaktyvios žmogaus plazmos kaupinių mėginių. Tyrimo metodo specifiškumas įvertinamas apskaičiavus mėginių, kuriems gautas neigiamas parvoviruso B19 rezultatas, kiekį, išreikštą procentais.

Priimtino kriterijai: Nereaktyvios žmogaus plazmos kaupiniuose neturi būti aptikta parvoviruso B19 DNR (specifiškumas lygus 100%). Jeigu tyrimo rezultatai neatitinka numatytų kriterijų, KLIS vedėjas kartu su KUS vedėju priima sprendimą dėl tyrimo metodo priimtino.

4. Linijiškumas (angl. *linearity*) (AMR – Analytical Measurement Range) yra tyrimo parametras, nurodantis gebėjimą gauti tyrimo rezultatus pagal tiesinę priklausomybę nuo nukleorūgščių koncentracijos.

cobas®DPX tyrimo metodo linijiškumo įvertinimui tiriami skirtingų žinomų parvoviruso B19 koncentracijų, apimančių gamintojo nurodytą tyrimo tiesinio kiekybinio įvertinimo intervalą (40 TV/mL – 10⁹ TV/mL), mėginiai. Naudojamo parvoviruso B19 referentinio standarto koncentracija riboja didžiausią galimą paruošti mėginio koncentraciją. Dėl šios priežasties tyrimo metodo linijiškumo įvertinimui naudojama po 3 penkių žemutinę kiekybinio įvertinimo intervalo sritį apimančių koncentracijų (40 TV/mL, 316 TV/mL, 1000 TV/mL, 3162 TV/mL, 10 000 TV/mL, 31 622 TV/mL) parvoviruso B19 DNR mėginių. Įvertinama žemutinė parvoviruso B19 linijiškumo intervalo sritis, apimanti tyrimui nustatytą ribinę vertę, kurioje tyrimo rezultatų kiekybinis titras turi tiesinę priklausomybę nuo nukleorūgščių koncentracijos.

Priimtino kriterijai: Nustatytas parvoviruso B19 linijiškumo intervalas atitinka cobas®DPX tyrimo gamintojo nurodyto tiesinio kiekybinio įvertinimo intervalo žemutinę sritį

(40 TV/mL – 10 000 TV/mL). KLIS ištirtų mėginių rezultatai turi būti tiesiogiai proporcingi žinomai tiriamų mėginių koncentracijai (t.y. tiesi linija gali būti naudojama norint apibūdinti santykį tarp išmatuotų rezultatų ir analitės koncentracijos nustatytame verčių diapozone). Jeigu tyrimo rezultatai neatitinka numatytų kriterijų, KLIS vedėjas kartu su KUS vedėju priima sprendimą dėl tyrimo metodo priimtumo.

5. Patikimumas (angl. *robustness*) nusako analitinio tyrimo procedūros gebėjimą likti nepakitusia nepaisant smulkių metodo parametrų svyravimų ir nurodo tyrimo metodo patikimumą jį naudojant įprastinėmis laboratorijos sąlygomis.

cobas®DPX tyrimo metodo patikimumui įvertinti tiriama 20 parvoviruso B19 DNR mėginių, turinčių tyrimui nustatytą ribinę (angl. *cut off*) koncentraciją (10 000 TV/mL).

Priimtumo kriterijai: Visi 20 ištirtų ribinės koncentracijos parvoviruso B19 mėginių turi aptikti parvoviruso B19 nukleorūgštį visuose tirtuose mėginiuose. Gauta nukleorūgšties koncentracija negali statistiškai reikšmingai skirtis nuo žinomos koncentracijos. Jeigu tyrimo rezultatai neatitinka numatytų kriterijų, KLIS vedėjas kartu su KUS vedėju priima sprendimą dėl tyrimo metodo priimtumo.

6. Kryžminis užterštumas (angl. *cross-contamination*) nurodo tikimybę, kad tyrimo atlikimo metu tiriamoji analizė iš vieno mėginio gali patekti į kitą mėginį ir būti jame identifikuota.

cobas®DPX tyrimo metodo kryžminio užterštumo įvertinimui vieno sistemos paleidimo metu tiriama 30 parvovirusui B19 neigiamų nereaktyvios žmogaus plazmos kaupinių mėginių ir 9 skirtingų aukštos parvoviruso B19 DNR koncentracijų (trys 31 622 TV/mL, trys 10 000 TV/mL, trys 3 162 TV/mL) mėginiai, mėginius į sistemą įkeliant šachmatų principu (teigiami mėginiai išsidėstę greta neigiamų).

Priimtumo kriterijai: Visi 30 ištirtų parvovirusui B19 neigiamų nereaktyvios žmogaus plazmos kaupinių mėginių turi turėti neigiamą parvovirusui B19 rezultatą. Jeigu tyrimo rezultatai neatitinka numatytų kriterijų, KLIS vedėjas kartu su KUS vedėju priima sprendimą dėl tyrimo metodo priimtumo.