

מבדה מחזית
חיסה וגליל מטריב

אבלואציות בסרולוגיה-מדע או אומנות

ד"ר מירה ברק

אוקטובר 2009

אבלואציה בסרולוגיה

CLSI	I/LA21-A2	Clinical evaluation of qualitative systems
CLSI	I/LA23-A	Assessing the quality of qualitative systems
CLSI	EP19-R	A framework for qualitative test protocols
CLSI	EP 12-A2	User protocol for qualitative test protocols
NRL Australia	National Serology Reference laboratory	Evaluation of serology
WHO	National Standard method	Commercial and in house diagnostic tests: evaluations and validations

In God we trust, anyone else please bring data

חשבתי וחשבתי.....

ואן גוך

שינויים בערכות בשימוש.....

Virotech - System ELISA modification: new Igm conjugate EC 200809

Dear customers and users,

In order to provide better discrimination between positive and negative results we will be modifying all Virotech ELISAs to a new Igm conjugate from December 2007. The higher concentration Igm conjugate normally produces higher OD values and guarantees an even higher reproducibility of results with unchanged degrees.

For better recognition the new conjugate will temporarily be identified by means of a yellow label but please article number EC 200809.

Both the old and the new conjugate can be used without problem for all parameters.

Please note the following exceptions:

- Only the **NEW IGM CONJUGATE** may be used for:
 - HSV Screens (EC 108.00) from plate lot 118 and
 - all CSF Igm standards with yellow label
- Only the **OLD IGM CONJUGATE** may be used for the present with:
 - CMV (EC113.00) (the change over is in preparation) and
 - Candida (EC111.00) (the change over is in preparation)

Please notice!

Influenza B: Change of antigen starting with plate lot 196

Starting with plate lot 196 the Virotech ELISA plates are coated with an updated antigen. It is the virus strain B/Hisbane/3/2007 is an ingredient of the vaccine recommended by the WHO for the season 2008/2009.

In internal tests this new antigen shows some deviations to the previously used one. As a consequence we recommend to determine with a course of disease with the same label.

הגדרות

- אבלואציה (הערכה)-מונח המתאר באופן סיסטמטי את הבצועים של מערכת נבדקת ומשווה אותה למערכות אחרות עם תפקוד דומה/זהה. כאשר לשתי ערכות בצועים זהים, נבחר את הערכה הקלה ביותר לשימוש, הזולה, המהירה או המשתמשת בדגימה זמינה יותר.
- ולידציה (אשרור)-בדיקת יישום תהליך כולל על מנת להבטיח תוצאות "נכונות". לכל בדיקה מיושמת במעבדה צריך להיות תיעוד המראה על הולידציה שלה.

מה נעשה כשיש 5 ערכות כאלה? איפה הסטנדרטציה?

ערכות מסחריות וערכות in house

מושגי יסוד

Accuracy-דיוק
מידת הקרבה בין הערך הנמדד והערך האמיתי:
Gold standard

= a non specific term that indicates that a process or a material is the best available approximation of the truth (NCCLS)

- שיטת ומעבדת ייחוס
- ממוצע של מספר מעבדות

reproducibility-מדד ההישנות (between run CV)
repeatability-מדד ההדירות (within run CV)
היכולת לייצר אותה תוצאה ללא קשר ל:

- מספר אצוה
- כוח אדם
- מכשיר
- סביבה

סוגי הבדיקות בסרולוגיה

מטרת הבדיקה מבחינה קלינית:

- סקירה (screening)
- אבחנה
- אימות
- ניטור

- כמותיות/איכותיות/חצי כמותיות (תוצאות רציפות או בלתי רציפות)
- באם תוצאות איכותיות, הן תהינה:
- חיובי/שלילי
- נמצאו / לא נמצאו נוגדנים, אנטיגן....
- ראקטיבי / לא ראקטיבי

- אם יש gold standard רגישות, סגוליות וכו'
- אם אין gold standard מידת הסכמה בין שיטות (Agreement or concordance study)

מושגי יסוד

Sensitivity (SENS)- the test "positivity"
$$SENS = \frac{TP}{TP + FN} \times 100$$

% החולים הנותנים תוצאה חיובית בהתאם לערך הייחוס אשר נקבע

Specificity (SPEC)- the test "negativity"
$$SPEC = \frac{TN}{TN + FP} \times 100$$

% הבריאים הנותנים תוצאה שלילית בהתאם לערך הייחוס אשר נקבע

- רגישות השיטה מראה על הסיכוי שהתוצאה תהיה חיובית בנוכחות המחלה
- סגוליות השיטה מראה על הסיכוי שהתוצאה תהיה שלילית בהעדר מחלה
- ערך הניבוי של בדיקה מראה את הסיכוי שהבדיקה תאבחן נכון את הנבדק

מנסה להכניס את כל הידע הניסיון לקומפוזיציה אחת....

פיקסו

ROC Curves (Receiver Operating Characteristic)

AUC=Area under the curve
.9-1= excellent
.8-.9=good
.7-.8= fair
.6-.7=poor
.5-.6=fail

יעקומת ROC מציגה את שיעור החיוביים האמיתיים (TP) לעומת שיעור החיוביים השגויים (FP) בערכי ייחוס שונים.
יזו הצורה הגראפית השקולת יחדיו את הרגישות והסגוליות.

היעקומה משמשת לבחינת הערך הקליני של בדיקה.
היעקומה משמשת להשוואה בין ערכות שונות.
היעקומה משמשת למציאת ערך ייחוס מיטבי מבחינת הרגישות והסגוליות.

מושגי יסוד

$$Efficiency = \frac{TP + TN}{TP + FP + FN + TN} \times 100$$

נוסחת היעילות הכוללת נועדה להחלטה בין ערכות כאשר הרגישות והסגוליות חשובים באותה מידה.

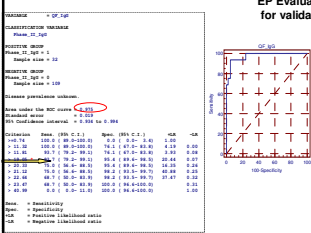
- לרב הבדיקות הסרולוגיות שנועדו לזיהוי ראשוני של מחלה - דרישה לרגישות מרבית, לבחינת seroprevalence הסגוליות חשובה. ערכה עם יעילות פחותה מ-80% לא תהיה בשימוש.

Cut-off

נקבע ע"י אנליזת ROC או ע"י היצרון.
המרחק בין ערך הסף באנליזת ROC לבין הצהרת היצרון יכול לתת רמז על מידת **החוסן (robustness)** של הערכה.
 • מקובל להשתמש בערך סף שנקבע בערך של 95% סגוליות = 5% מהבריאים ימצאו חולים ע"י הבדיקה.
 • אפשר לקבוע $C_{50}-C_{95}$ רווח בר סמך כאשר התוצאות מתחת לו הן שליליות תמיד ומעל חיוביות = **grey zone=border line** ויש להחליט מראש איך מתנהגים עם הגוונים המתקבלים בטווח זה.
 • בבדיקה איכותית של מחלה זיהומית, **the cutoff=limit of the blank or negative control**
 • בבדיקות איכותיות רבות ערך הסף משתנה מאצווה לאצווה וניתן ע"י היצרון.
 • בחלק מהבדיקות האיכותיות ה OD של הבקר החיובי צריך להגיע לרמה מסוימת על מנת שההרצה תהיה תקפה.
 • בבדיקות סמי כמותיות יכולות להיות דרישות כנ"ל לגבי קליברטור.

תוכנת מדף EP evaluator (Rhoads)=

EP Evaluator meets all CLIA '88 and CAP Requirements for validating and evaluating methods



Validate ...	CLIA '88	CAP	EP Evaluator
Accuracy	R	R	<input checked="" type="checkbox"/>
Linearity		R	<input checked="" type="checkbox"/>
Reportable Range	R	R	<input checked="" type="checkbox"/>
Precision	R	R	<input checked="" type="checkbox"/>
Reference Interval	R	R	<input checked="" type="checkbox"/>
Method Comparison		R	<input checked="" type="checkbox"/>
Sensitivity	C	R	<input checked="" type="checkbox"/>
Specificity	C	O	<input checked="" type="checkbox"/>
Carryover		R	<input checked="" type="checkbox"/>

הכנות לאבלואציה

הגדרת מטרה (הכנסת שיטה או ערכה חדשה למכשיר קיים או גם מכשיר חדש, החלפת ערכה קיימת בערכה חדשה, שינוי רכיב של ערכה או אפליקציה.
 • הגדרת מקום הבדיקה (המעבדה, זמינות הדגימות, הסכמים לשת"פ הצידוד, מקום פיזי).
 • אישורים לבצור (מו"ד, הליסינקי, החברות המסחריות המעורבות...)
 • זמינות ומימון כ"א באם ש"סור אוביקטיביות-תוצאות תלויות כ"א).
 • הגדרת לו"ז והתאמות לו"ז
 • יעלויות
 • הגדרת בדיקת הייחוס ושיטות לקונפירמציה ו לו"ז גא: שנויות במחלוקת
 • יצירת ניתוח התוצאות
 • יתיעוד האבלואציה ופרסום התוצאות

גם תפילה לא ממש עוזרת לעשות סדר.....



שאגל

האבלואציה: השוואת הרכב הערכות

- שיטת המדידה
- סוג הנוגדנים ומקורם
- סוג הקליברטור והתאמה לסטנדרטים בינלאומיים
- טווח המדידה
- ערכי הייחוס
- גבול הדטקציה (רגישות אנליטית-באם יש לו משמעות קלינית)
- מורכבות השיטה וזמן בצוע
- תוצאה כמותית/איכותית

הכנות לאבלואציה: מידע חומר הרקע

קריאת ההנחיות של הספק גם האותיות הקטנות...

- עיקרון השיטה
- אופן המדידה
- סוג הדגימה
- נפח הדגימה
- תנאים פרא אנליטיים
- תנאי אחסנה
- אישורים בינלאומיים (FDA, CE)
- בדיקת ההתאמה למחשוב הקיים
- בדיקת השתתפות בתוכניות בקרת איכות חיצוניות וביצועי הערכה הנבדקת בתוכניות אלה

השוואת דגימות

לאבולוציה רצוי 119 דגימות נבדקים כתלות בסוג הבדיקה.
אין להקפיד ולהפשיר דגימות אלא לעבוד ב-aliquots.

- לוליציה לפחות 20 דגימות.
- בחירת הדגימות תכסה את טווח היצרן.
- דגימות ידועות כחיוביות, שליליות ובעייתיות-הכרחיות.
- מחצית מהדגימות תהינה בטווח הקליני הבעייתי- ערכי סף, תוצאות המוכיחות מחלה אקוטית (IGM חיובי) או מוכיחות חיסון (IGG חיובי)-הכל לפי סוג הבדיקה.
- באם התוצאות כמותיות - משאות רגרסיה וקובע קורלציה לכל הטווח או לערכים משמעותיים מתוך הטווח.
- Seroconversion panel דגימות של מטופל במהלך מחלה על מנת להשוות את הקינטיקה של ביצועי הערכת.

Toxoplasma IgG

	A	B
1 st reagent	Toxo ag from cell culture	Toxo (RH strain) sonicated and detergent extracted trophozoites
2 nd reagent	Mono anti human IgG	Poly anti human IgG
Calibrator	WHO Int. Stand. For anti toxoplasma serum (2 nd Int. Stand.)	WHO 3 rd Int. Stand. 1994
Positive result IU/ml	>6AU	>8IU
Negative result IU/ml	<6AU	<6IU
Sensitivity%	100	99.35
Specificity%	100	99.68

מטריצת התאמה

	B			
	-	+/-	+	Vidas+
A -	68 71.6%	0	2 2.1%	1
A +/-	1 1%	0	0	0
A +	1 1% Vidas-	1 1% Vidas+/-	22 23.2%	23

Consent 90/95=94.7%
Partial consent 1/95=1%

מיכלאנג'לו היה גאון אני.....






התאמה לבדיקות אחרות או היסטוריה Toxoplasma IgG avidity

Assay Range Units Brdr. Va	B Toxo		A Toxo		קליניקה ידועה	Vidas IgG avidity
	IgM	IgG	IgM	IgG		
15 17499	5.8	77.9	38.9	18.2	23.5	0.2-0.3
33 18115	6.2	169	24.3	125.5	62.1	0.2-0.3
63 18656	> 160	> 500	< 0.1	571	> 300	0.478
65 521928	14.3	> 500	15.4	161.5	> 300	0.422
56 15141	9.9	> 500	54.1	150	17.0	0.025
69 15144	> 160	> 500	14.1	500	> 300	0.428
75 15150	> 160	> 500	15.3	510	> 300	0.428
77 15152	13.4	> 500	68.5	5.4	275	0.428
78 15153	> 160	237	9.8	530	202	0.428
79 15154	< 0.1	> 500	52	NEG	243	0.428
80 15155	< 0.1	> 500	55.9	NEG	243	0.428
81 15156	20.2	> 500	61.7	274	172	0.428
82 15157	< 0.1	> 500	82.7	NEG	252.2	0.428
83 15158	> 160	> 500	21.6	560	> 300	0.428
85 15160	5.2	263	89.6	99	91.7	0.428

התאמה למכשיר יחוס Consent with Vidas results

	Consent	Consent with Vidas	Detailing of cases with no consent		
			B	A	Vidas
Toxo IgG	96/97	1/1 A	B	N	N
Toxo IgM	90/95	3/5 B 2/5?	P	N	P
			B	P	B
			P	N	?
			N	B	?
			N	P	N

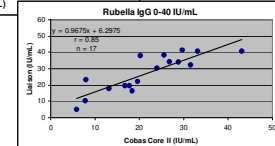
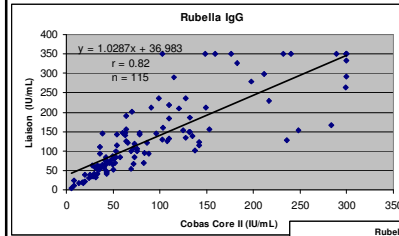
P=POSITIVE
B=BORDER
N=NEGATIVE

רגישות, סגוליות, ערך ניבוי

Kit	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	AUC
IMMCO - new	0.946	0.881	0.875	0.949	0.983
IMMCO - new2	0.703	0.929	0.897	0.780	0.934

Kit	Sensitivity	Specificity	Sensitivity (95% spec)	PPV	NPV	AUC
AESKU	1	0.902	86.5	0.905	1	0.986
Phadia	1	0.927	97.5	0.950	1	0.988
INOVA	1	0.927	86.5	0.905	1	0.983

גרף קורלציה



SCORING

Parameter	Centaur		Liaison	
	Value	Score	Value	Score
r	0.984	10	0.984	10
שיפוע	1.02	10	1.19	8
הסכמה לגבי קליניקה %	94.2	8	91.2	8
Sum.		28		26

ROBUSTNESS

Kit	Insert CO (U/ml)	ROC CO (U/ml)	AUC
AESKU	20	14.21	0.986
Phadia	5	2.43	0.988
INOVA	20	11.90	0.983
INOVA - screen	20	22.90	0.985
EUROIMMUN	25	4.70	0.958
IMMCO	20	16.30	0.968
Diasorin (LIAISON)	8	5.38	0.989

SCORING

	FN (40%)	FP (15%)	Sens (95% spec) (10%)	ROC CO (10%)	FDA (5%)	external QC - participa (5%) nts	external QC - mistake n results (5%)	CV (10%)	Score
AESKU	20	7.5		5	5				37.5
Phadia		15	10		5	2.5		10	42.5
INOVA	20	15		5	5		2.5	10	57.5
INOVA screen	40	7.5		10	5			10	72.5
EUROIMMUN		7.5			5		2.5	10	25
IMMCO		7.5		10	5		2.5	5	30
Diasorin (LIAISON)	20	15	10	5	5		5	10	70
IMMCO - new	20	7.5	5	10					42.5

אשר הבלתי אפשרי



תודה רבה

אני לא מאטיס....

סכום האבלואציה

- תיעוד שלבי האבלואציה וסכום התוצאות
- מסקנות
- המלצות
- הסתייגויות ופניה לספקים
- ניטור תוצאות נבדקים לאורך הביצועים (בקרת איכות ברמת הייצור)

מסקנות

מסקנות	ביצועים דיאגנוסטיים טובים:
Toxo IgG	בוצעו דו"שים
Toxo IgM	בוצעו שני דו"שים
Toxo avidity	בוצעו דו"שים
Rubella IgM	בוצעו שני דו"שים
Rubella IgG	בוצעו שני דו"שים
CMV IgM	בוצעו דו"שים
CMV IgG	בוצעו דו"שים
CMV avidity	בוצעו דו"שים
EBV IgM	בוצעו דו"שים
EBV IgG	בוצעו דו"שים
EBNA	בוצעו דו"שים
HSV-2 IgG	בוצעו דו"שים