

Vzdělávání v oblasti forenzní genetiky reg. č. CZ.1.07/2.3.00/09.0080

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Mezinárodní doporučení pro provádění validací ve forenzně genetických laboratořích

□ Zpracoval: Vlastimil Stenzl

Definice validace z ISO normy

- Validace je potvrzení přezkoušením a poskytnutím objektivního důkazu, že jsou jednotlivé požadavky na specifické zamýšlené použití splněny

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Filozofie validace

- Validace by měla být založena na objektivních kritériích, které eliminují subjektivní rozhodnutí

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Je validace potřebná?

- Bez validace nevíte, nakolik správné výsledky vydáváte (a možná děláte chyby)
- Progresivní forenzní laboratoř
- Nové metody (multiplexy, software, extrakce), stále je co validovat
- Vědecké přístupy-nastavení limitů
- Konkurenční tlak
- Národní DNA databáze jako sbírka pouze „validních“ DNA profilů

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Předpoklady pro provádění validací

- Aplikace je prováděna na vhodném zařízení, které je dobře udržované a kalibrované
- Personál je kompetentní
- V laboratoři nejsou zaznamenávány odchylky ani žádné rušivé vlivy
- Vzorčky použité k validaci jsou přiměřeně stabilní

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Jednotlivé typy validace

- Vývojová (developmental) validace – nové metody; jak se metoda chová?
- Interní validace (verifikace), dodavatel kitu již zvalidoval; chová se metoda tak, jak je deklarováno?

Převzato – Butler -STRbase

Jaký rozsah interní validace je adekvátní?

- John Butler: 50 cílených amplifikací

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Požadavky na validovanou metodu

- Robustní metoda – úspěšné výsledky jsou získané ve většině případů bez nutnosti opakování
- Spolehlivá metoda – získané výsledky jsou přesné a odráží skutečnou realitu
- Reproducibilní metoda – stejné nebo podobné výsledky jsou získány při každém testování (reprodukovatelnost a opakovatelnost)

Kroky interní validace


- Instalace zařízení nebo softwaru a nákup reagentů
- Studium metody
- Validace z pohledu rozsahu a spolehlivosti
- Vytvoření SOP a interpretací vycházejících z interní validace
- Školení dalšího personálu
- Kvalifikační testy personálu
- Proficienční testy dle schváleného plánu

Kroky interní validace

- Interní validace je prováděna v každé laboratoři s cílem prokázat spolehlivost a limitace metody
- Inter. validace musí být dostatečně dokumentována a sumarizována.
- Inter. validace musí nastavit parametry kvality a interpretační návody
- Regionální laboratoře musí vytvořit vlastní validační protokoly nezávislé na hlavní laboratoři
- Základní validační data (populační) mohou být sdíleny
- Kompletní změna komerčního kitu vyžaduje novou interní validaci






Co má smysl interně validovat

- Validuje se vždy celá akreditovaná metoda








Co má smysl interně validovat

- Izolační metody
- Kvantifikační metody
- *Test matrice, cykléry (souvisí s kalibrací přístrojů a zásadními opravami)*
- Citlivost detekce (analytický threshold, dynamický rozsah, stochastický threshold, analýza směsí)
- *Statistické vyhodnocení (software)*





Validace izolačních metod

- Stanovení základní izolační metody (robustnost)
- Efektivita izolace porovnávána pomocí pozitivní kontroly
- Validovaná metoda má nízké riziko křížové kontaminace (negativní kontrola)
- Automatizace zjednodušuje validaci a zavádí nové přístupy k validaci

Validace extrakčních metod

- Použití extrakčních kitů
- Odchytky od protokolů výrobce v SOP
- Reprodukovatelnost výsledků – využití homogenních vzorků (krev) v každé extrakční sérii – pozitivní kontrola
- Homogenní vzorek musí poskytovat vždy srovnatelné hodnoty výtěžku DNA
- Kontrola kontaminace – 1 blank na extrakční sérii – kontrola přes kvantifikaci








Validace kvantifikace DNA

- Spolehlivost výsledků při nízkých koncentracích – zavedení spodního eliminačního limitu (30-100 pg)
- Návaznost na výsledky amplifikace STR lokusů (obdobná délka ampliconů při qPCR a při STR PCR)
- Oblast linearity výsledků
- Návaznost měření (certifikovaný standard, např. NIST)
- Spolehlivost hodnoty C_T - reproducibilita výsledků (počet paralelních měření)












Validace kvantifikace





- Rozhodnutí, zda kvantifikace v případě negativního výsledku bude ukončovat další kroky
- Alespoň 2 replikáty
- Nalezení minimální hodnoty koncentrace pro „negativní“ výsledky (počty alel pro jednotlivé body ředící řady)
- Napojení kvantifikace na proficienční testy

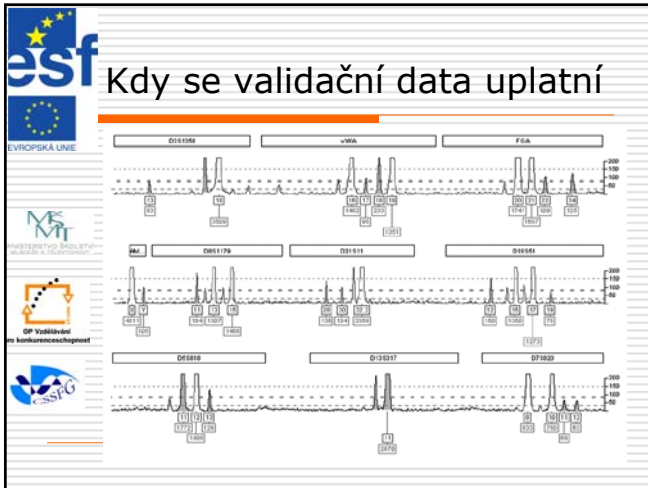






Lze validovat LCN/LTDNA?

- Požadavek relevantnosti a spolehlivosti důkazu
 - Je prováděno empirické testování?
 - Je metoda publikována a recenzována?
 - Je známa chybovost (četnost chyb)?
 - Je metoda a teorie všeobecně přijímána vědeckou komunitou?

americké soudy: Frye, Kelly-Frye a Daubert standard



Detekční limit

- Detekční limit (LOD) – nejnižší koncentrace analytu, která může být změřena s přiměřenou jistotou
 - Průměr výšky píků baseline + 3x standardní odchylka nebo 2x nejvyšší pík baseline – 5 vzorků negativní kontroly v 5 různých amplifikačních runs.
- Limit kvantitativního měření (LOQ) - nejnižší koncentrace analytu, která může být stanovena s akceptovatelnou přesností za daných podmínek testu
 - Jak nízko je možné jít

Detekční limit (LOD)

- LOD – nejnižší koncentrace analytu, která může být změřena s přiměřenou jistotou
 - Průměr výšky píků baseline + 3x standardní odchylka ($LOD = \mu_b + 3\sigma_p$) nebo 2x nejvyšší pík baseline z 5 vzorků negativní kontroly v 5 různých amplifikačních runs.

Limit kvantitativního měření - (LOQ)


- LOQ - nejnižší koncentrace analytu, která může být stanovena s akceptovatelnou přesností za daných podmínek testu ($LOQ = \mu_b + 10\sigma_p$)

Nastavení LOD, LOQ, LOS

LOD, LOQ může být určeno na základě negativních kontrol
 LOS je určeno ze samostatné validace
 Jakýkoliv pík pod LOS musí být ověřen následnou amplifikací
 Jakýkoliv pík pod LOQ musí být ověřen následnými 2 amplifikacemi






Analytický threshold (senzitivita), dynamický rozsah, stochastický threshold

- Ředící amplifikační řada (2ng, 1ng, 0.5ng, 0.25ng, 0.1ng, 0.05ng nebo 0.03ng) á 5 replikátů – známý profil, vysoká heterozygotita
- Stanovení limitu detekce a limitu linearity








Stanovení meze citlivosti

- Nejnižší hodnota koncentrace, při které je zachycen opakovaně ještě celý profil s výškami píků nad limitem detekce (LOD)
- Střední výška píků u nejhůře detekovatelného lokusu bude po odečtení trojnásobku směrodat. odchylky nad limitem detekce






Stanovení stochastického thresholdu

- Výška píků nebo koncentrace templátu, při kterém dochází k porušení peak height ratio kvůli nízké kvantitě DNA v nevybalancované PCR – stanoveno z ředící řady
- Souvisí s pipetovací chybou
- Pozor na subjektivitu






Další faktory

- Vliv kvantifikace DNA – nepřesná na úrovni LCN/LTDNA
- Větší nerovnováha píků při amplifikaci malého množství DNA
- Výskyt drop-in při výšce píků kolem stochastického limitu






Stanovení stochastického thresholdu

- Peak height ratio stanovit u optimální koncentrace pro amplifikaci – např. 0,5 ng (81%)
- „Nižší“ hladinu nastavit na hodnotu o 3 směrodatné odchylky (9%) nižší tj. např. 62%
- Pokud je peak height ratio pod touto hodnotou, je nutné vytvořit vlastní interpretace
- Vše je závislé také na injekci při CE a přístroji – hodnoty je nutné nastavovat vždy při výměně laseru
- Nastavení stochastického thresholdu pomocí koncentrace není závislé na injekci a přístroji, vyžaduje však konzistentní kalibrátor





Přesnost a reprodukovatelnost






- Využití vzorků z ředící řady (i laddery) – 5-10 vzorků
- Různé běhy (různá plata)
- Maximální odchylka v délkách alel by měla být menší než 0,5 bp
- Použitelnost reprodukovatelnosti pro stanovení peak height ratio
- Využití pozitivní kontroly z kitů

Validace směsí






- Testování meze, kdy je možné ve směsi zachytit úplný profil minoritní složky
- Řadící řada - 1:0,19:1,9:1,4:1,1:1,1:4,1:9,1:1 19,0:1 – ve 2 paralelách



Kvalifikační test, nedůkazní testování

- ❑ Testování profilu předem známého vzorku
- ❑ Je součástí proficienčního testování
- ❑ Nedůkazní (nonprobative) testování by mělo zahrnovat testování interpretací
- ❑ Dizkuze, zda je třeba provádět samostatně



Validační zpráva

- ❑ Co má obsahovat
- ❑ Rozsah
- ❑ Jednotlivé grafy
- ❑ Komerční řešení – např. VALID software (ABI)
