



TRUNG TÂM KIỂM CHUẨN CHẤT LƯỢNG XÉT NGHIỆM Y HỌC - TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



www.qcc.edu.vn



XÁC NHẬN PHƯƠNG PHÁP XÉT NGHIỆM REALTIME RT-PCR CHẨN ĐOÁN SARS-COV-2

ThS. Vũ Đức Anh
CKI KTYH. Nguyễn Thuý Hà
ThS. Nguyễn Quý Linh



Nội dung

- ❖ Xác nhận phương pháp cho xét nghiệm
Realtime RT-PCR
- ❖ Thẩm định phương pháp cho gộp mẫu



Khái niệm

- ❖ **Thẩm định phương pháp (Validation):** là khẳng định bằng kiểm tra và cung cấp các bằng chứng khách quan cho thấy các yêu cầu cụ thể của một phương pháp định sử dụng có thể đáp ứng được.
- ❖ **Xác nhận phương pháp (Verification):** là khẳng định bằng kiểm tra các bằng chứng khách quan cho thấy các yêu cầu cụ thể của một phương pháp định sử dụng có thể đáp ứng được.

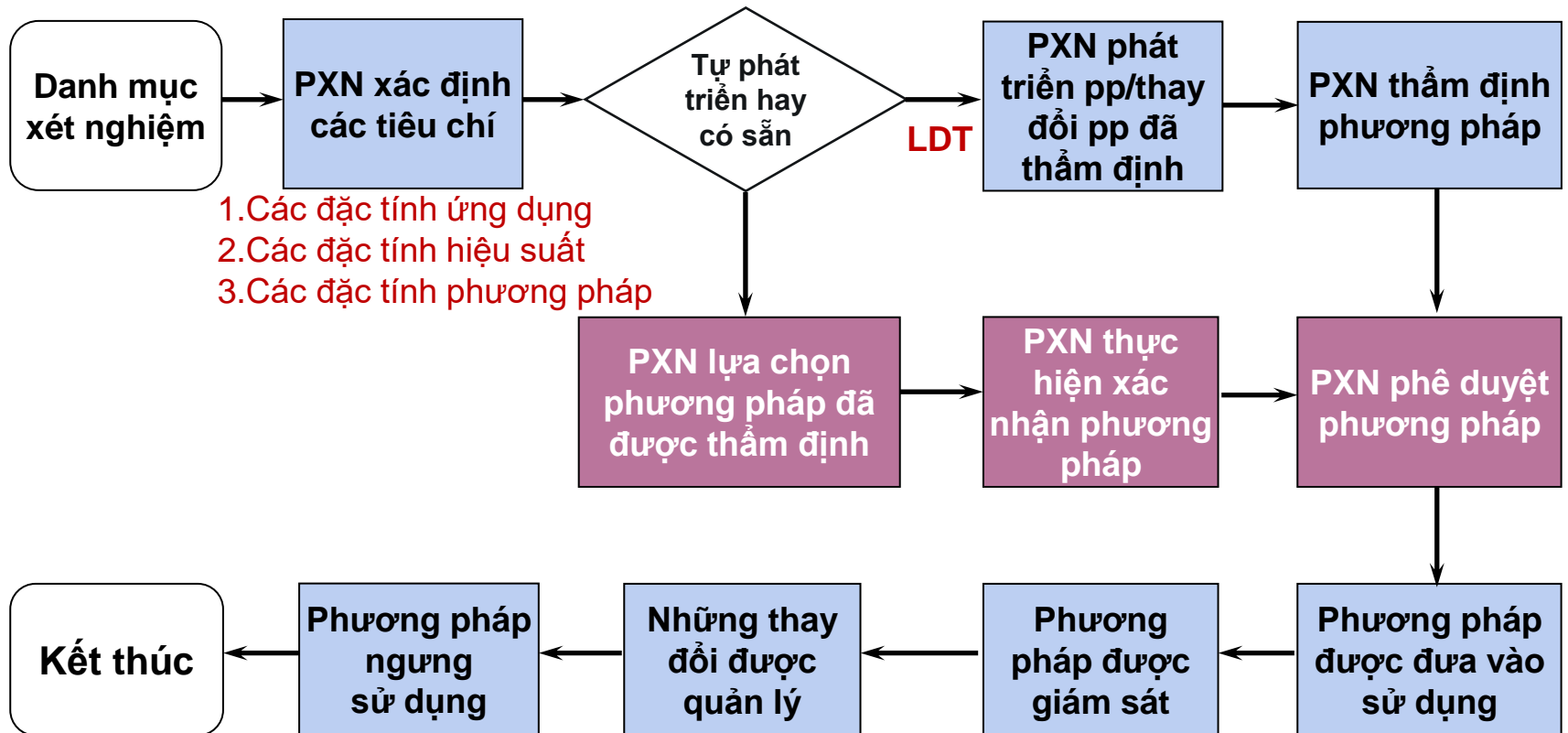
ISO 9000: 2015



Step #1 – Thẩm định hoặc xác nhận pp ban đầu

Step #2 – Xác nhận dài hạn

Các quy trình đo lường được lựa chọn để đáp ứng các yêu cầu y khoa.

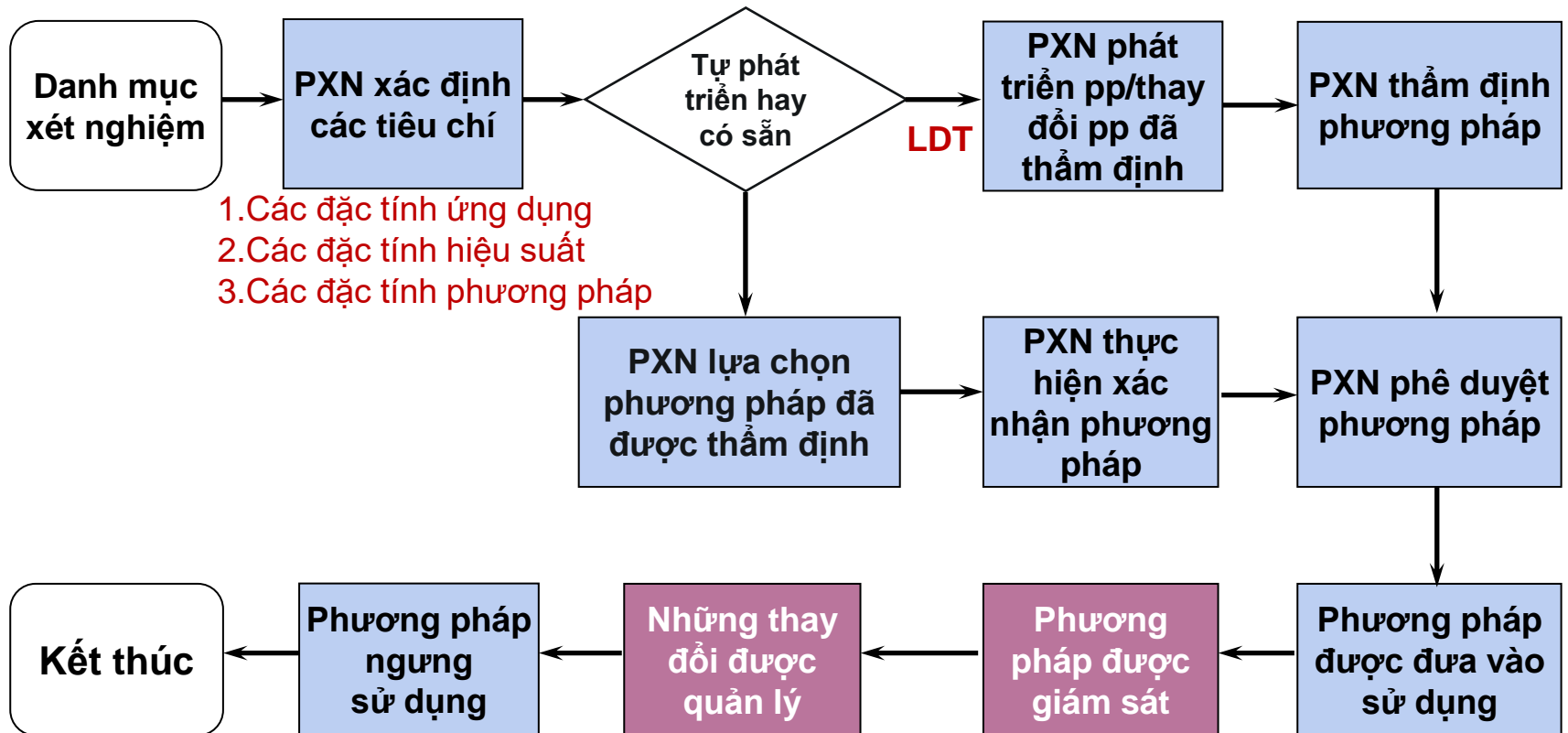




Step #1 – Thẩm định hoặc xác nhận pp ban đầu

Step #2 – Xác nhận dài hạn

Các quy trình đo lường được lựa chọn để đáp ứng các yêu cầu y khoa.





Thẩm định và xác nhận phương pháp

	Thẩm định phương pháp (Validation)	Xác nhận phương pháp (Verification)
TCVN ISO 15189:2014	Xác nhận giá trị sử dụng	Kiểm tra xác nhận
WHEN	<ul style="list-style-type: none"> - Phương pháp mới - Phương pháp tiêu chuẩn có chỉnh sửa hoặc ngoài phạm vi áp dụng 	<ul style="list-style-type: none"> - Phương pháp tiêu chuẩn đã được thẩm định
WHO	<ul style="list-style-type: none"> - Nhà sản xuất - Phòng xét nghiệm 	Phòng xét nghiệm
WHAT HOW	Tùy đặc tính từng loại xét nghiệm: <ul style="list-style-type: none"> - Định tính - Định lượng - Bán định lượng 	



Thẩm định và xác nhận phương pháp

	Thẩm định phương pháp (*)	Xác nhận phương pháp
WHAT Xét nghiệm SARS-CoV-2	<ol style="list-style-type: none"> 1. Giới hạn phát hiện (LOD) 2. Đánh giá lâm sàng (Clinical Evaluation) 3. Độ đồng nhất (analytical reactivity/ Inclusivity) 4. Phản ứng chéo (Cross-reactivity/ Exclusivity) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Độ chính xác (Accuracy): PPA, NPA 2. Độ chụm (Precision)

(*): Policy for Coronavirus Disease-2019 Tests During the Public Health Emergency (Revised), 11.05.2020, <https://www.fda.gov/media/135659/download>



Thẩm định/Xác nhận phương pháp

Trước

- Trang thiết bị: bảo dưỡng, hiệu chuẩn, hiệu chỉnh
- Sinh phẩm/ hoá chất/ vật tư: kiểm soát chất lượng
- Quy trình xét nghiệm
- Quy trình thẩm định, xác nhận phương pháp, kế hoạch thực hiện
- Đào tạo, tập huấn cho nhân viên

Trong

- Thực hiện thẩm định/ xác nhận phương pháp
- Phê duyệt phương pháp

Sau

- Kiểm soát chất lượng: nội kiểm, ngoại kiểm
- Quản lý sự thay đổi
- Thực hiện thẩm định/xác nhận lại khi có thay đổi lớn



XÁC NHẬN PHƯƠNG PHÁP REALTIME RT-PCR CHẨN ĐOÁN SARS-COV-2 (VERIFICATION)

EUA: Emergency Use Authorization



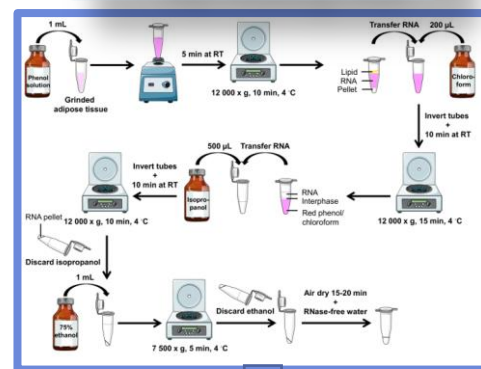
Các hệ thống thực hiện xét nghiệm Realtime RT-PCR

Hệ thống đóng

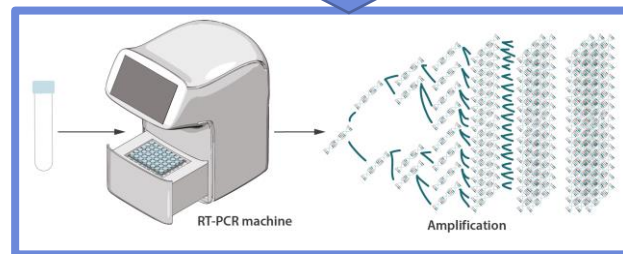


- Khép kín, tự động toàn bộ tách chiết và khuếch đại rRT-PCR
- Chỉ áp dụng sinh phẩm tương thích với hệ thống

Hệ thống mở



Tách chiết



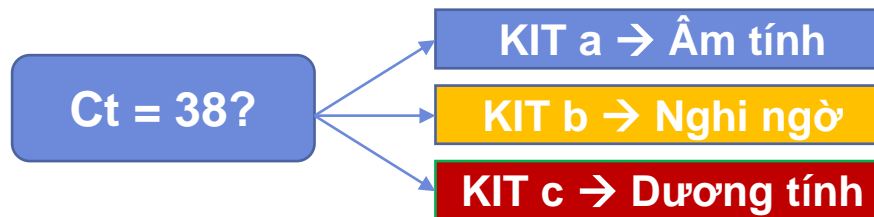
Khuếch đại PCR

Có thể sử dụng nhiều loại sinh phẩm khác nhau



Realtime RT-PCR SARS-CoV2 là XN định tính???

- ❖ Do sự cho phép khẩn cấp của FDA: xét nghiệm Realtime RT-PCR cho SARS-CoV-2 là XN định tính dựa trên các bằng chứng tốt nhất hiện có (EUA list)
- ❖ Chưa có tiêu chuẩn, nồng độ chuẩn truy nguyên nguồn gốc: mới được thử nghiệm bởi các NSX, không phải các đơn vị, tổ chức quốc gia, quốc tế...
- ❖ Các sinh phẩm khác nhau không giống nhau về chu kỳ ngưỡng Ct



- ❖ Các thử nghiệm khác nhau sử dụng các vùng gene đích theo các chiến lược khác nhau.

What are the Ct value cutoffs for the 6 SARS CoV-2 tests offered at YNNH?

Test	Method	Cycle threshold cutoffs	Lab can access in EPIC Beaker	SARS CoV-2 Gene targets
CDC- lab developed	Real-time RT-PCR	<40	Yes	N1, N2
Simplexa (Diasorin)	Real-time RT-PCR	<40	No	ORF1ab, S
BD Max (Becton Dickinson)	Real-time RT-PCR	<40	No	N1, N2
GeneXpert (Cepheid)	Real-time RT-PCR	<45	Yes	N2, E
TaqPath (ThermoFisher)	Real-time RT-PCR	<37	Soon	ORF1ab, N, S
Panther TMA (Hologic)	Transcription mediated amplification	N/A	No	Two regions ORF1ab



Thông tin cung cấp từ NSX sinh phẩm

VD: Hướng dẫn phiên giải kết quả: (+)/ (-)/ Không xác định

Giá trị Ct < 40 là dương tính

STT	Tín hiệu kênh màu			Độc kết quả
	JOE/VIC/HEX (N2)	TEX/ ROX (N1)	Cy5 (IC)	
1	+	+	+/-	Dương tính
2	+	-	+/-	Không xác định
3	-	+	+/-	Không xác định
4	-	-	+	Âm tính
5	-	-	-	Không đạt

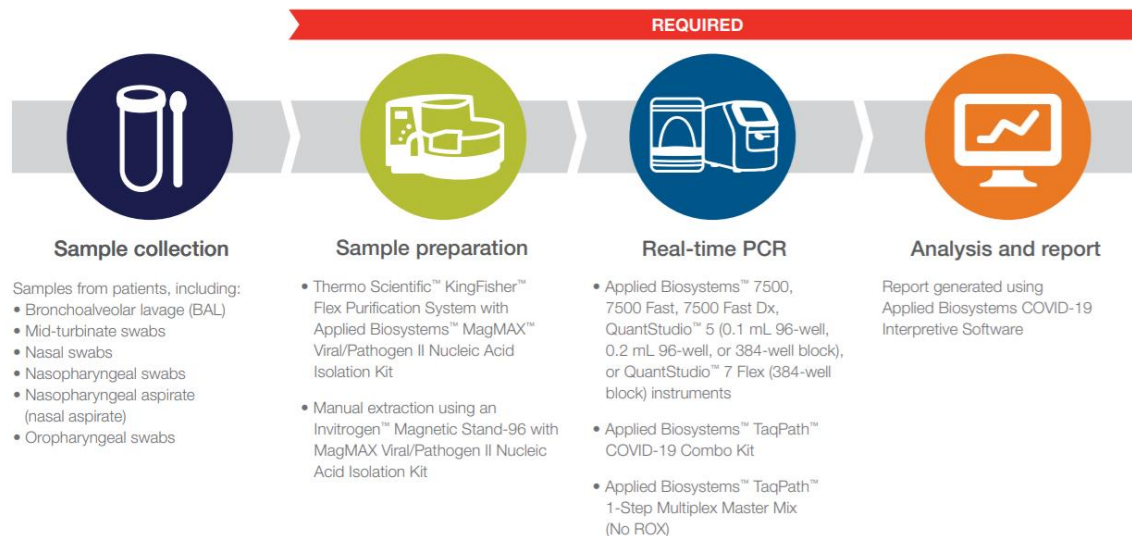


Thông tin cung cấp từ NSX sinh phẩm

1. Các hóa chất vật tư có sẵn trong bộ sinh phẩm
2. Các hóa chất vật tư cần thiết, nhưng không cung cấp cùng bộ sinh phẩm.

Lưu ý khuyến cáo của hãng:

- Bộ sinh phẩm tách chiết RNA
- Thiết bị thực hiện Realtime PCR
- Loại ống mix PCR



Intended use of the products mentioned in this workflow graphic vary. For specific intended use statements, please refer to the instructions for use.

Figure 1. End-to-end workflow for the *in vitro* diagnosis of 94 specimens in under 3 hours, or 382 specimens in under 6.5 hours, using a combination of a single KingFisher purification system and an Applied Biosystems real-time PCR system.



Các hướng dẫn xác nhận phương pháp đối với các bộ sinh phẩm thuộc danh mục EUA

ASM

- 10 mẫu dương tính
(5 +++, 5 +)
- 10 mẫu âm tính

- Độ chụm (Precision)
+ Ngắn hạn
+ Dài hạn
- Độ chính xác
(Accuracy)
- LoD (Analytical
sensitivity) (\pm)

IFCC

- Ít nhất 20 mẫu
- 10 mẫu dương tính
(5 +++, 5 +)
- 10 mẫu âm tính

- Độ chụm: mẫu (+), (-) chạy 5 lần 1 ngày/ 5 ngày
- Độ chính xác > 95%
- Độ đặc hiệu phân tích Analytical specificity (\pm) tối thiểu 4 chủng corona
- LoD (\pm) 5 mẫu gần LoD x 8-12 lần/5 ngày ($\geq 95\%$)
- Khoảng báo cáo (\pm) (5-7 mẫu trong dải x2-3 lần) bias < sai số cho phép

* CLSI MM17 Validation and Verification of Multiplex Nucleic Acid Assays,

* FDA Molecular Diagnostic Template for Laboratories



GIẢI THÍCH THUẬT NGỮ

- ❖ **Limit of detection (LoD)** là giá trị đại lượng đo được bằng quy trình đo đã được thiết lập, trong đó nồng độ thấp nhất của đại lượng đo có thể phát hiện được một cách nhất quán ($\geq 95\%$ mẫu thử nghiệm trong điều kiện của PXN).



GIẢI THÍCH THUẬT NGỮ

- ❖ **Độ chính xác (Accuracy):** mức độ gần nhau giữa kết quả một phép đo và giá trị đúng của phép đo.
- ❖ **Độ chụm (Precision):** sự thống nhất gần nhau giữa các kết quả đạt được từ một loạt phép đo lặp lại trên cùng một đối tượng hoặc các đối tượng tương tự trong điều kiện quy định; Được thể hiện dưới dạng độ lệch chuẩn (SD) và hệ số biến thiên (CV).



Độ chụm (Precision)

1. Độ lặp lại/ độ chụm ngắn hạn (Repeatability/ Within-run/ Intra-precision):

- Đo liên tiếp trong cùng một điều kiện vận hành
- Đánh giá sự thay đổi trong một khoảng phân tích (analytical run).

2. Độ tái lặp/ độ chụm dài hạn (Reproducibility/ Between-run/ Inter-precision):

- Đo liên tiếp qua các khoảng phân tích khác nhau (thường là các ngày khác nhau)
- Đánh giá các sai số ngẫu nhiên của phương pháp: như người phân tích, sinh phẩm, điều kiện môi trường.



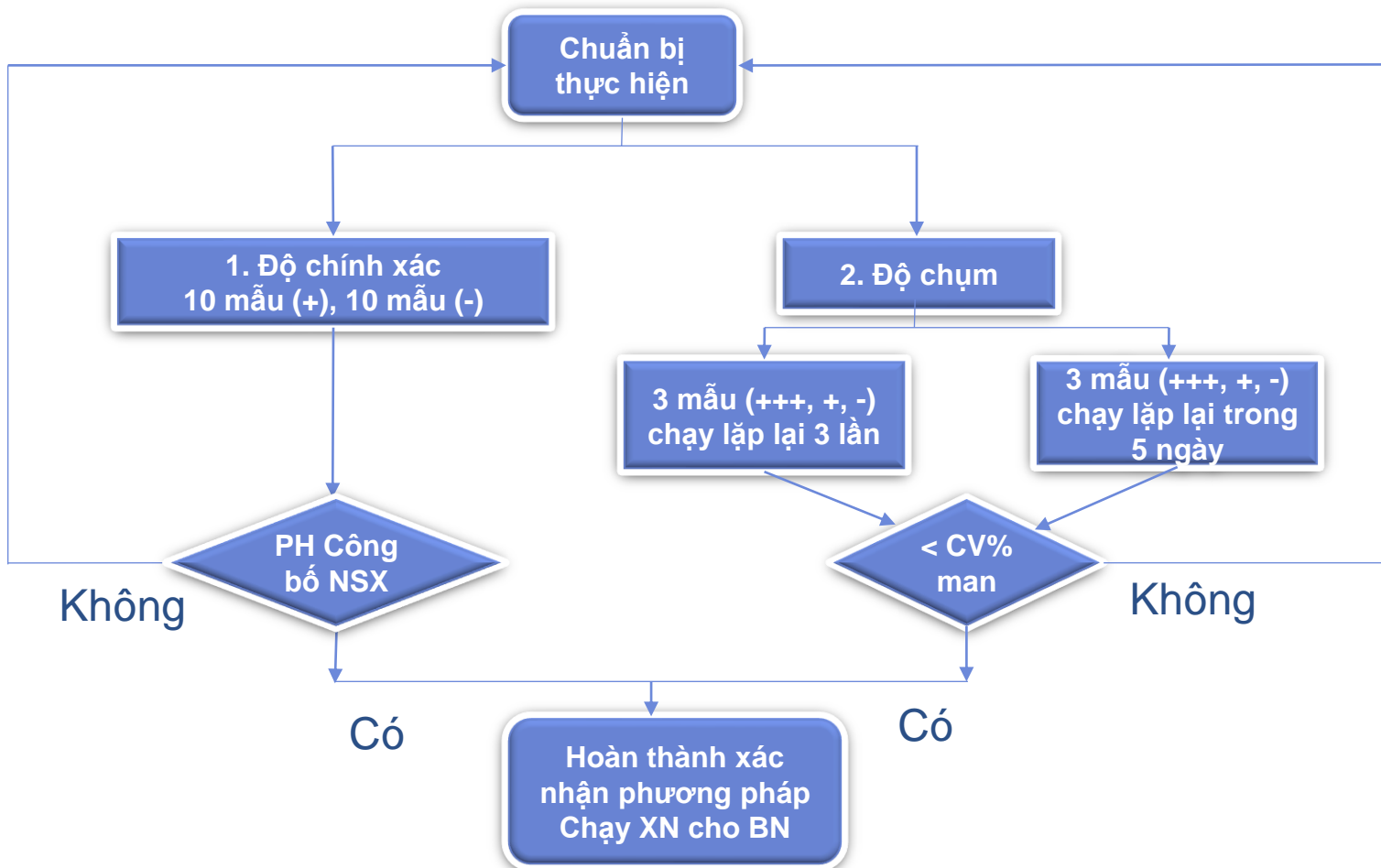
HƯỚNG DẪN CỦA HIỆP HỘI VI SINH HOA KỲ

American Society for Microbiology Clinical and Public Health Microbiology Committee)

- ❖ Đánh giá tối thiểu 2 thông số:
 - Độ chính xác (accuracy) → PPA, NPA, OPA
 - Độ chụm (precision) → repeatability, reproducibility
- ❖ Không bắt buộc đánh giá LoD với các KIT trong danh mục đã có của UEA (FDA)
- ❖ Đảm bảo thực hiện kiểm soát các điều kiện trước khi thực hiện (lưu ý: chia nhỏ các mẫu thử nghiệm, bảo quản đúng cách)



Hướng dẫn thực hiện ASM





Lựa chọn mẫu xác nhận

❖ Độ chính xác (Accuracy)

- Mẫu dương giả định bệnh nhân đã biết trước tải lượng virus.
- Tối thiểu 10 mẫu gồm: 5 mẫu pha loãng 1:2 tạo mẫu dương tính mạnh. 5 mẫu 1:10 mẫu dương tính TB



10 mẫu âm tính bệnh nhân

Lựa chọn 1

- Ít nhất 10 mẫu BN dương (mẫu độc lập hoặc pha loãng từ mẫu BN dương tính mạnh)
- Dựa Ct pp được so sánh: chọn 5 mẫu dương tính mạnh, 5 mẫu dương tính TB



10 mẫu âm tính bệnh nhân

Lựa chọn 2(*)

* Lựa chọn ưu tiên thực hiện, khả thi trong điều kiện thực tại



Lựa chọn mẫu xác nhận

❖ Độ chụm (Precision)

Chọn tối thiểu 3 mẫu với 3 nồng độ khác nhau
(Dương tính mạnh, trung bình và âm tính)

1. Độ lặp lại: chạy lặp lại 3 lần tại các thời điểm khác nhau trong một ngày.
2. Độ tái lặp: chạy lặp lại 5 ngày khác nhau



Xử lý dữ liệu

❖ Độ chính xác (với 10 dương, 10 âm)

PP được so sánh

PP thực hiện		Mẫu dương (+++ , +)	Mẫu âm
	Mẫu dương	a	b
	Mẫu âm	c	d
		10	10

$$a + c = 10, b + d = 10$$

$$PPA = a/(a+c) = a/10$$

$$NPA = d/(b+d) = d/10$$

$$OPA = a+d/20$$

Tiêu chuẩn chấp nhận: PPA, NPA, OPA \geq 95%

PPA: positive predictive agreement - độ đồng thuận dương tính

NPA: negative predictive agreement - độ đồng thuận âm tính

OPA: overall predictive agreement - độ đồng thuận tổng số



Xử lý dữ liệu

❖ Độ chụm:

Tính Mean, SD, CV% theo giá trị Ct

$$CV (\%) = \left(\frac{\text{Standard deviation}}{\text{Mean}} \right) \times 100$$

Tính CV% tất cả giá trị Ct của các gene đích trong KIT

- Độ lặp lại: CV% cao nhất
- Độ tái lặp: tính trung bình toàn bộ CV% bộ số liệu

Tiêu chuẩn chấp nhận: CV% tính toán < CV% man (nhà sản xuất)



VD: KẾT QUẢ XNPP BẰNG KIT REALTIME RT-PCR



Thiết kế xác nhận phương pháp

❖ Độ chính xác:

- 10 mẫu dương, 10 mẫu âm
- Tiêu chuẩn: NSX - PPA, NPA 100%

❖ Độ chụm:

- Độ lặp lại: 5 mẫu (1 dương mạnh, 2 dương TB, 2 âm tính) chạy lặp lại 3 lần trong cùng 1 ngày.
- Độ tái lặp: 5 mẫu (1 dương mạnh, 2 dương TB, 2 âm tính) chạy lặp lại trong 5 ngày.
- Tiêu chuẩn:
 - CV% lớn nhất độ lặp lại < 1.72%
 - CV% độ tái lặp < 1.65%



Lựa chọn mẫu dương tính bằng pp được so sánh

1. Mẫu dương tính trung bình, mạnh dựa theo khuyến cáo giá trị Ct của pp được ss

Mã ID	Giá trị Ct	Mức độ
8754	34.11	Trung bình
9000	34.77	Trung bình
9001	36.12	Trung bình
CoV1	33.62	Trung bình
CoV3	33.87	Trung bình
9002	30.12	Mạnh
TA1	25.96	Mạnh
TA3	24.82	Mạnh
TA5	27.06	Mạnh
1775	12.0	Mạnh

2. Lựa chọn 10 mẫu âm tính bệnh nhân



KẾT QUẢ

❖ Độ chính xác (accuracy)

PP được so sánh

KIT thực hiện	PP được so sánh		
	Mẫu dương (+++ , +)	Mẫu âm	
Mẫu dương	10	0	PPA = 100%
Mẫu âm	0	10	NPA = 100%
	10	10	OPA = 100%

Kết luận: phù hợp với yêu cầu của NSX về độ chính xác



KẾT QUẢ

❖ Độ chụm (precision)

- Độ tái lập

	9000	9001	9002	9000	9001	9002	9000	9001	9002
	N1			N2			Cy5		
Ngày 1	30.76	32.34	27.45	30.66	32.20	27.41	24.98	27.19	23.90
Ngày 2	31.07	32.55	27.23	30.36	31.74	26.88	24.90	27.20	23.65
Ngày 3	31.08	32.68	27.35	30.74	32.37	27.17	24.42	26.46	23.69
Ngày 4	31.47	32.70	27.69	31.07	32.38	27.21	24.60	26.61	23.46
Ngày 5	30.90	32.31	27.00	30.67	32.13	27.50	24.45	26.28	23.57
Mean	31.06	32.52	27.34	30.70	32.16	27.23	24.67	26.75	23.65
SD	0.27	0.18	0.26	0.25	0.26	0.24	0.26	0.42	0.16
%CV	0.86	0.57	0.94	0.83	0.81	0.88	1.04	1.59	0.69

Kết quả: %CV trung bình giữa các lần chạy, và giữa N1, N2, Cy5 = 0.91 < 1.65% (CV% man)

→ Kết luận: phù hợp với yêu cầu độ tái lập của NSX

- Độ lặp lại

Kết quả: %CV lớn nhất giữa các lần chạy, và giữa N1, N2, Cy5 là: 1.59 % (CV% man 1.72%)

→ Kết luận: phù hợp với yêu cầu độ lặp lại của NSX



KẾT LUẬN

1. Xác nhận phương pháp phù hợp với tuyên bố của nhà sản xuất.
2. Đủ điều kiện để thực hiện kết quả BN



Thẩm định phương pháp gộp mẫu

Theo hướng dẫn của FDA:

[Molecular Diagnostic Template for Laboratories](#)

(cập nhật 28.07. 2020)



Phương pháp gộp mẫu

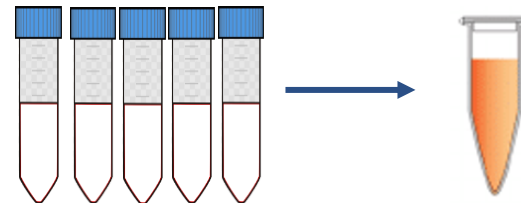
❖ Gộp que:

- Không bị ảnh hưởng bởi việc pha loãng mẫu
- Khi mẫu gộp dương tính, phải lấy lại mẫu đơn lẻ



❖ Gộp bệnh phẩm:

- Có thể không phát hiện được mẫu dương tính yếu
- Khi mẫu gộp dương có thể thực hiện XN lại các mẫu lẻ ngay



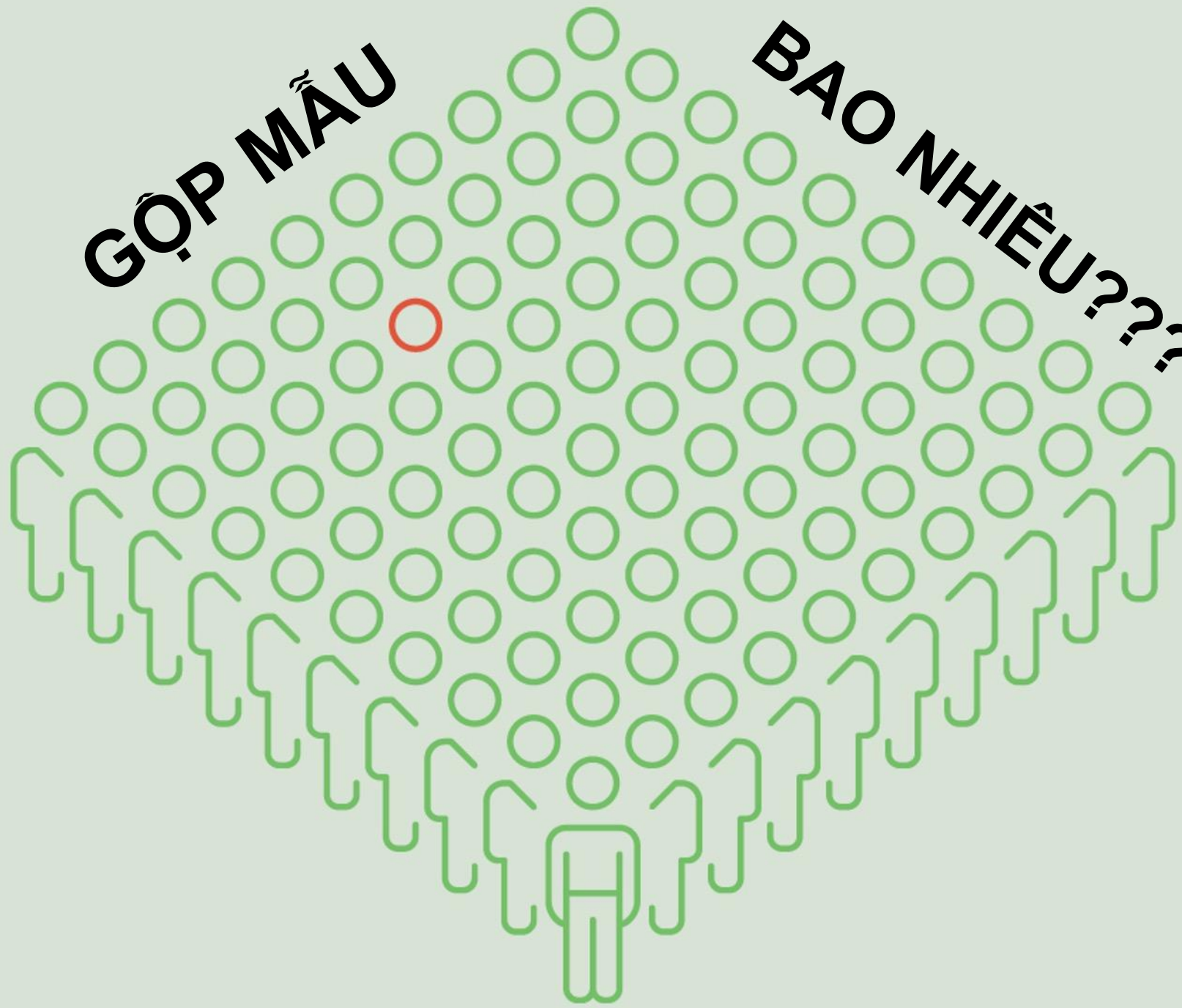


Hướng dẫn của Bộ Y tế về gộp mẫu

- ❖ Quyết định 1817/QĐ-BYT ngày 07/04/2021:
Hướng dẫn tạm thời việc gộp mẫu xét nghiệm SARS-CoV-2
 - Gộp dung dịch mẫu bệnh phẩm
 - Gộp que mẫu bệnh phẩm
 - Gộp 5 – 10 mẫu
 - Điều kiện bảo quản mẫu gộp

GỘP MẪU

BAO NHIÊU???





Số lượng mẫu gộp???

- ❖ Tỷ lệ mẫu dương tính trong cộng đồng → đánh giá dữ liệu quần thể đang được xét nghiệm 7-10 ngày
- ❖ Tỷ lệ mẫu dương tính yếu → dữ liệu 100 mẫu dương tính (nếu có thể)
- ❖ Độ nhạy phương pháp xét nghiệm



Phòng xét nghiệm thực hiện thẩm định cho phương pháp gộp mẫu



Số lượng mẫu gộp?

❖ Cỡ mẫu gộp được tính toán như bảng sau

Tỷ lệ nhiễm (%)	Cỡ mẫu gộp tối ưu*	Giá trị Ct thay đổi lý thuyết theo $\log_2(n)$ **	Số xét nghiệm giảm (%)
1	11	3.46	80
3	6	2.58	67
5	5	2.32	57
7	4	2.00	50
10	4	2.00	41
15	3	1.58	28

* Dựa trên Phương pháp có độ nhạy 95%, độ đặc hiệu 100%, và chiến lược xét nghiệm gộp mẫu (Dorfman approach)

** Ct (giá trị ngưỡng) là số chu kỳ được tạo ra. Giá trị Ct thay đổi về mặt lý thuyết theo $\text{Log}_2(n)$ $n =$ số mẫu gộp, có thể được ước tính cho hầu hết các kỹ thuật real-time RT-PCR



Cỡ mẫu cho thẩm định

Phương pháp XN đã được thẩm định

- 20 mẫu gộp dương tính: từ 20 mẫu đơn dương tính và 80 mẫu đơn âm tính
- 20 mẫu gộp âm tính: từ 100 mẫu đơn âm tính

- Ít nhất 25% nên nằm trong khoảng 2-3 Ct so với ngưỡng và không quá 2-4 Ct

Phương pháp XN chưa được thẩm định

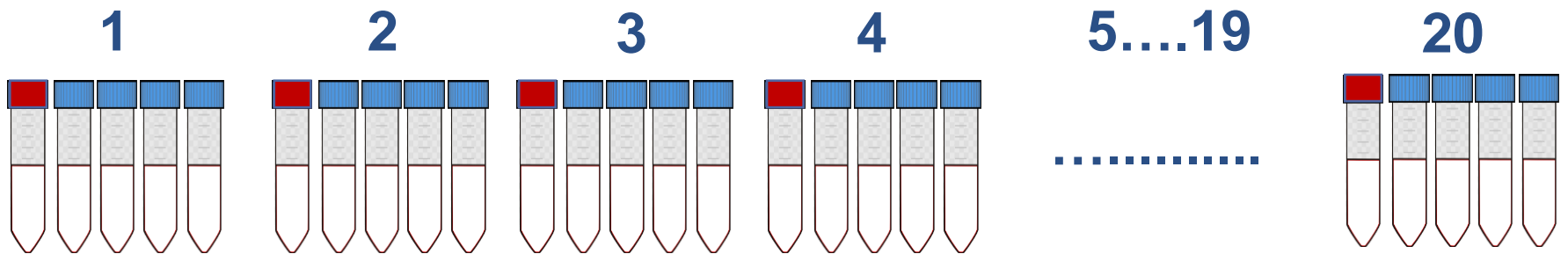
- 30 mẫu gộp dương tính: từ 30 mẫu đơn dương tính và 120 mẫu đơn âm tính
- 30 mẫu gộp âm tính: từ 150 mẫu đơn âm tính

- Ít nhất 25% nên nằm trong khoảng 2-3 Ct so với ngưỡng và không quá 2-4 Ct

(*) Dữ liệu ví dụ cho chiến lược gộp 5



Cỡ mẫu cho thẩm định (tiếp)



20 mẫu
dương

80 mẫu âm
($20(n-1)$)

n là số mẫu gộp



Phân tích dữ liệu

- ❖ Tính tỷ lệ đồng thuận dương (PPA) và tỷ lệ đồng thuận âm (NPA)
- ❖ PPA trong khoảng 85-90%: chấp nhận được phụ thuộc hiệu quả gộp mẫu và các yếu tố khác
- ❖ Số mẫu gộp cho phép: $PPA \geq 85\%$



Phân tích dữ liệu

Thống kê dữ liệu đồng thuận: theo phân tầng giá trị Ct

Mẫu gộp 5	Mẫu đơn với $37 < Ct \leq 40$	
	Dương tính	Âm tính
Dương tính		
Âm tính		
Mẫu đơn với $34 < Ct \leq 37$		
Dương tính		
Âm tính		
Mẫu đơn với $Ct < 34$		
Dương tính		
Âm tính		
Tất cả mẫu đơn		
Dương tính		
Âm tính		

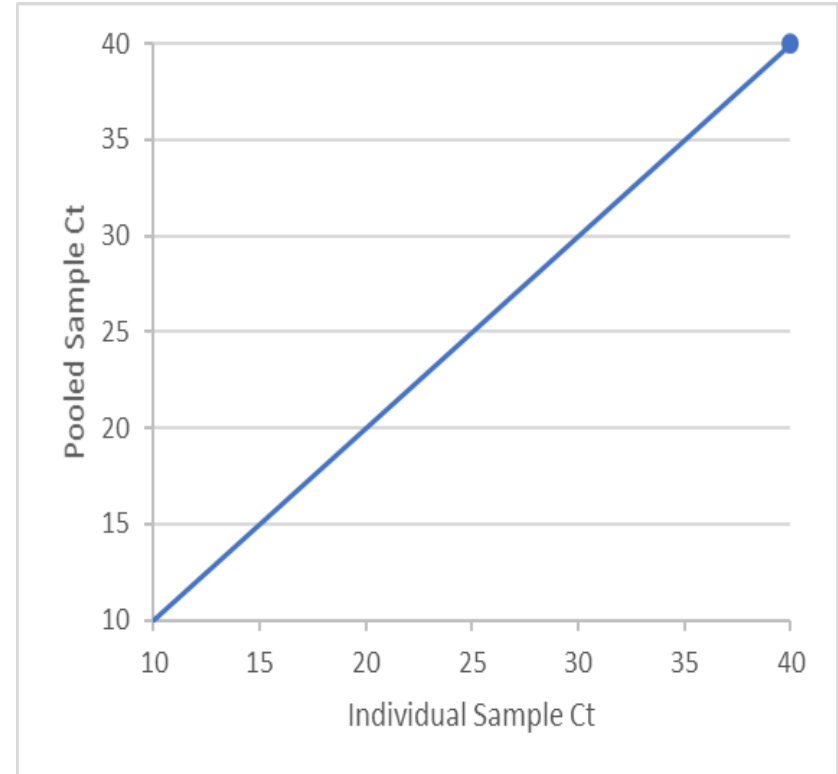
Ví dụ cho mẫu gộp 5 và giá trị Ct ngưỡng là 40



Phân tích dữ liệu

❖ Đánh giá tương quan giữa Ct mẫu dương đơn và mẫu dương gộp

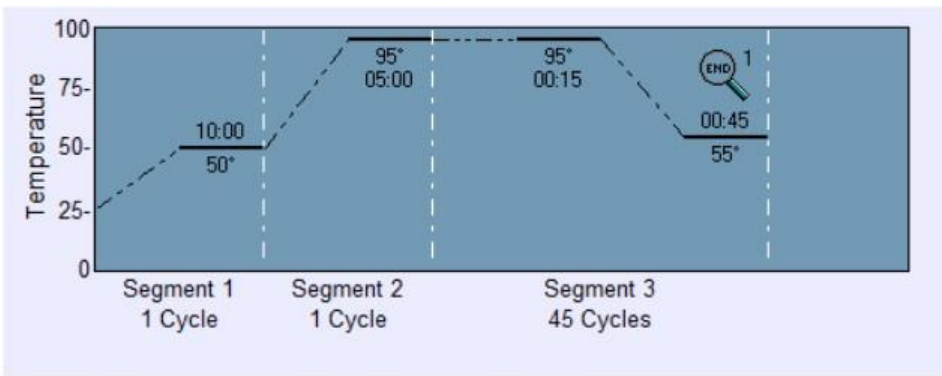
- Xây dựng đường tuyến tính $y = ax + b$ với $a = 1$, $b=0$
- Lượng giá mức độ dịch chuyển giá trị Ct cho các mẫu dương gộp so với mẫu dương đơn



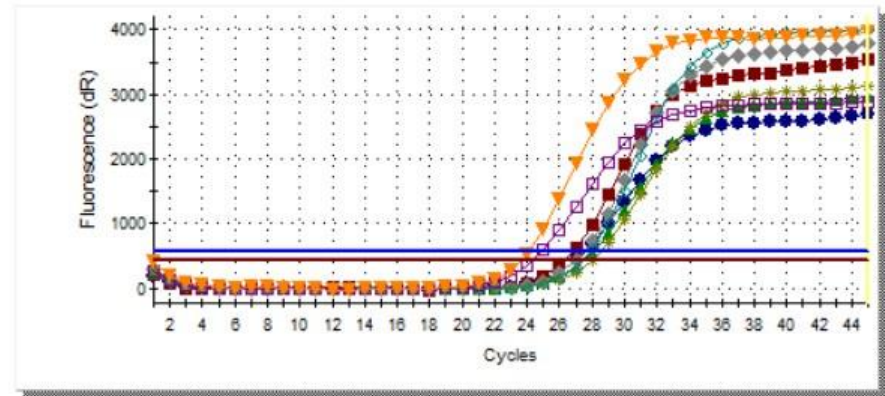


Kết quả gộp mẫu XN

Thermal Profile
(Estimated Run Time: 01:40:21)



Amplification Plots



Well	Well Name	Dye	Well Type	Threshold (dR)	Ct (dR)
C8	TEST 4.1	ROX	Unknown	427.940	27.04
C8	TEST 4.1	FAM	Unknown	577.396	26.85
C9	7.1	ROX	Unknown	427.940	27.58
C9	7.1	FAM	Unknown	577.396	27.58
C10	9.1	ROX	Unknown	427.940	28.00
C10	9.1	FAM	Unknown	577.396	27.89
D3	POS	ROX	Unknown	427.940	24.35
D3	POS	FAM	Unknown	577.396	24.20



Một số lưu ý về gộp mẫu

- ❖ Không khuyến khích gộp mẫu khi PNXN không gặp các áp lực về nguồn lực (hoá chất, sinh phẩm, trang thiết bị, nhân sự, thời gian...)
- ❖ Theo dõi sự thay đổi tỷ lệ dương tính và hiệu suất phương pháp với mẫu gộp



TRUNG TÂM KIỂM CHUẨN CHẤT LƯỢNG XÉT NGHIỆM Y HỌC



Thank You !

www.qcc.edu.vn