

Walidacja czasu przechowywania próbki zakażonej parwowirusem B19

Dane prezentowane podczas seminarium „Postępy w badaniach
przeglądowych dawców krwi” (Warszawa, 5–6 października 2015 r.)

Parvovirus B19 infected sample — validation of storage time.
Data presented at the seminar “Advances in blood donor screening”
(Warsaw, 5–6 October 2015)

Rajmund Michalski

Instytut Podstaw Inżynierii Środowiska PAN w Zabrze

J. Transf. Med. 2016; 9: 18–20

Wstęp

W laboratoriach, nie tylko medycznych, codzienne wykonuje się miliony analiz różnego rodzaju substancji. Postęp w analityce diagnostycznej oraz rozwój i powstawanie nowych metod pomiarowych przyczyniają się do gwałtownego zwiększenia zakresu jakościowego i ilościowego wykonywanych analiz. Wyniki przeprowadzonych badań mogą mieć bardzo poważne konsekwencje, szczególnie jeśli dotyczą zdrowia. W związku z powyższym jakość i miarodajność pomiarów ma niezwykle istotne znaczenie [1]. Wymagania formalne i rynkowe wymuszają na laboratoriach potwierdzenia wysokiej jakości świadczonych usług, dlatego laboratoria podlegają akredytacji. Akredytacja polega na wykazaniu przez jednostkę certyfikującą kompetencji laboratorium do wykonywania określonych badań. W tym celu laboratoria badawcze i medyczne muszą spełnić różne wymagania zawarte odpowiednio w normach ISO/IEC 17025 [2] oraz PN-EN ISO 15189 [3]. Norma PN-EN ISO/IEC 17025 przeznaczona jest dla wszystkich rodzajów laboratoriów, w tym jednostek przeprowadzających badania kliniczne i medyczne. Składa się ona z dwóch części: 1) wymagań dotyczących zarządzania oraz 2) wy-

magań technicznych [4]. Z kolei norma PN-EN ISO 15189 zawiera wymagania dotyczące kompetencji oraz jakości dla laboratoriów medycznych.

Zasadniczym elementem akredytacji jest walidacja metodyki badawczej, to jest potwierdzenie przez zbadanie oraz przedstawienie obiektywnego dowodu, że zostały spełnione szczególne wymagania dotyczące zamierzonego zastosowania. Zakres walidacji metodyki zazwyczaj dotyczy określenia: dokładności, granic wykrywalności i oznaczalności, specyficzności, liniowości, powtarzalności, od-twarzalności, odporności na czynniki zewnętrzne i wrażliwości na wpływy wewnętrzne. Walidacja może też dotyczyć tylko jednego specyficznego parametru, na przykład czasu przechowywania próbek zakażonych parwowirusem B19. To właśnie jest przedmiotem niniejszej pracy.

Oznaczanie parwowirusa B19 w próbkach osocza

Zakażenie parwowirusem B19 występuje na całym świecie i jest szczególnie niebezpieczne dla dzieci, młodzieży oraz kobiet w ciąży [5]. Zgodnie z wymaganiami określonymi w ustawie o wyrobach medycznych, w diagnostyce medycznej *in vitro* na-

Adres do korespondencji: dr hab. Rajmund Michalski, prof. IPIŚ PAN, Instytut Podstaw Inżynierii Środowiska PAN w Zabrze, ul. M. Skłodowskiej-Curie 34, 41-819 Zabrze, tel.: 32 271 64 81 wew. 112, faks: 32 271 74 70, e-mail: rajmund.michalski@ipis.zabrze.pl

leży stosować wyroby medyczne spełniające określone wymagania. Aparatura i odczynniki muszą posiadać deklarację zgodności z dyrektywą 98/79/EC [6]. Certyfikat taki potwierdza również jakość produktu stosowanego w laboratoryjnych badaniach markerów zakażenia parwowirusem B19V [7].

Testy diagnostyczne opracowane przez laboratoria diagnostyczne można stosować po uprzednim przeprowadzeniu ich pełnej walidacji, ze szczególnym uwzględnieniem czułości i swoistości [8, 9]. Ponieważ wymagania dotyczące testów wykrywających DNA parwowirusa B19 są bardzo restrykcyjne, w powszechnym użyciu znajdują się testy renomowanych producentów światowych. Zaleca się stosowanie metody ilościowej, ponieważ ten rodzaj badania umożliwia odróżnienie przewlekłego zakażenia stosunkowo częstego w populacji (zazwyczaj charakteryzującego się niską DNA-emią $< 10^4$ IU/ml i niezwiązanego z objawami klinicznymi) od zakażenia w ostrej fazie z wysoką DNA-emią (z objawami chorobowymi) [10]. Czułość analityczna stosowanego testu oraz wynik badania powinny być wyrażane w jednostkach międzynarodowych na mililitr (IU/ml), dzięki czemu można porównywać testy i ich wyniki uzyskiwane różnymi metodami w poszczególnych medycznych laboratoriach diagnostycznych [11]. Test do wykrywania DNA B19V musi umożliwić wykrywanie wszystkich jego znanych genotypów z taką samą czułością, co musi być potwierdzone przez producenta testu odpowiednimi dokumentami. Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia [12] wyniki badania muszą być autoryzowane przez diagnostę laboratoryjnego posiadającego odpowiednią specjalizację i/lub co najmniej dwuletnie doświadczenie w danej dziedzinie diagnostyki.

Walidacja czasu przechowywania próbki zakażonej parwowirusem B19

Przedmiotem niniejszych rozważań jest sytuacja, kiedy stosuje się powszechnie znane testy do wykrywania parwowirusa B19, ale chce się rozszerzyć zakres ich stosowania poza ramy czasowe gwarantowane przez producenta, to jest wydłużyć czas przechowywania próbki z 12 do na przykład 18 miesięcy. Pytanie jest następujące: Czy dłuższe przechowywanie w stanie zamrożenia próbek i pojemników osocza przeznaczonych do frakcjonowania zawierających parwowirusa B19 może prowadzić do spadku stężenia tego wirusa? Przyjmując, że stężenie wirusa w badanej próbce spada z czasem jej przechowywania, można założyć, że prawdopodobnie zmniejsza się również w pojemniku z oso-

czem, ponieważ próbka i osocze przechowywane są w takich samych warunkach.

Należy także rozważyć, czy wielokrotne zamrażanie i rozmrażanie próbek może powodować spadek stężenia wirusa. Jeden z głównych producentów testów przeznaczonych do wykrywania parwowirusa B19 informuje, że osocze z EDTA, CPD, CPD-A, CP2D, ACD-A lub 4% cytrynianem sodu można przechowywać do 12 miesięcy w temperaturze $\leq -18^\circ\text{C}$ i do 15 dni w temperaturze $2-8^\circ\text{C}$. W swojej ulotce producent informuje ponadto, że ujemnego wpływu na skuteczność testu nie obserwowano także, gdy próbki osocza poddawano 3 cyklom zamrażania i rozmrażania. Producent jednocześnie dodaje, że użytkownik testu sam musi zweryfikować inne warunki pobierania i przechowywania. Tego typu zapisy dają użytkownikowi możliwość zweryfikowania założonej hipotezy i zwalidowania czasu przechowywania próbki zakażonej parwowirusem B19, w tym przypadku wydłużenia tego czasu o 6 miesięcy lub dłużej.

Celem badania ilościowego parwowirusa B19 jest oznaczenie i odrzucenie osocza, którego wiremia spowoduje, że w badanej puli przekroczy ona wartości 10^4 IU/ml. Teoretycznie niebezpieczny byłby wzrost stężenia wirusa, ale w trakcie przechowywania wiremia próbki spada, co jest zjawiskiem korzystnym. Pozostaje uzasadnić, że wiremia w badanej próbce zachowuje się identycznie, jak w pojemniku z osoczem. Należy wykluczyć ryzyko, że spada w badanej próbce, a nie zmienia się lub spada wolniej w pojemniku z osoczem. Niebezpieczna byłaby istotna różnica między wiremią w badanej próbce i w pojemniku z osoczem. W związku z tym należy sprawdzić, czy wiremia w badanej próbce zachowuje się podobnie jak w pojemniku z osoczem. W celu przeprowadzenia walidacji czasu przechowywania próbek zakażonych parwowirusem B19 należy zbadać próbkę krwi i osocza w punkcie „0”, a następnie w określonych odstępach czasu (np. co miesiąc lub co trzy miesiące) aż do pokazania się trwałych zmian.

Można przyjąć, że trwałe zmiany zachodzą, gdy średnia z 3 powtórzeń dla próbki i osocza przez kolejne pomiary w ciągu 6 miesięcy przekracza na przykład 25%. Przyjęcie wartości dużo niższej (np. 5%) może okazać się zbyt optymistyczne, a innej skrajnej wartości (np. 80%) — zostać zakwestionowane przez audytora. Uwzględniając doświadczenie laboratorium oraz realia takich pomiarów, wartość 25% wydaje się optymalna. Należy następnie obliczyć parametry statystyczne, takie jak: średnia, odchylenie standardowe i współczynnik zmienności dla każdej badanej próbki i osocza. W zależności od wyników oraz dostępności innej próbki zakażonej

parwovirusem B19 można dopuścić możliwość przeprowadzenia dodatkowej serii badań.

Każde laboratorium powinno mieć opracowane i stosować procedury szacowania niepewności pomiaru. Niepewność to parametr związany z wynikiem pomiaru, określający przedział wokół wartości przyjętej (najczęściej obliczanej jako wartość średnia), w którym na danym poziomie prawdopodobieństwa można spodziewać się wystąpienia wartości oczekiwanej. Niepewności pomiaru nie należy mylić z błędem pomiaru, który jest różnicą między wartością oznaczaną pojedynczego pomiaru a wartością oczekiwaną. Najpełniejszą i najbardziej szczegółową formą oszacowania niepewności jest budżet niepewności, który dotyczy zsumowania najważniejszych źródeł niepewności.

Podsumowanie

Zakres walidacji jest zawsze kompromisem między kosztami, ryzykiem i możliwościami technicznymi. Istnieje wiele przypadków, dla których zakres może być podany tylko w sposób uproszczony. Proponowany wyżej sposób postępowania pozwala stwierdzić, jak zmienia się zawartość parwovirusa B19 w próbce w określonym czasie (np. 18 miesięcy), jaka jest tendencja tych zmian oraz po jakim czasie przekroczone zostaną założone wartości graniczne (np. zmiany o 25% wobec wartości początkowej). W ten sposób można zwalidować czas przechowywania próbek i stosowania odpowiednich testów do wykrywania parwovirusa B19 po upływie czasu gwarantowanego przez producenta testu.

Konflikt interesów

Praca powstała na podstawie wykładu wygłoszonego podczas seminarium „Postępy w bada-

niach przeglądowych dawców krwi” (Warszawa, 5–6 października 2015 r.), organizowanego przez Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o. pod nadzorem merytorycznym Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie.

Piśmiennictwo

1. Bulska E., Konieczka P., Kremer E. i wsp. Ocena i kontrola jakości wyników pomiarów analitycznych. WN-T, Warszawa 2007.
2. PN-EN ISO/IEC 17025:2005. Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących.
3. PN-EN ISO 15189:2013 Laboratoria medyczne Szczególne wymagania dotyczące jakości i kompetencji.
4. Michalski R., Mytych J. Akredytacja laboratoriów badawczych wg normy PN-EN ISO/IEC 17025 — przewodnik. Elamed, Katowice 2008.
5. De Jong E.P., Walther F.J., Kroes A.C.M., Oepkes D. Parvovirus B19 infection in pregnancy: new insights and management. *Pre-nat. Diagn.* 2011; 31: 419–425.
6. Dyrektywa 98/79/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 27 października 1998 r. w sprawie wyrobów medycznych używanych do diagnozy in vitro.
7. Brojer E., Grabarczyk P., Kalińska A. Molekularne metody diagnostyki zakażenia parwovirusem B19 u ciężarnych. *Perinatol. Neonatol. Ginekol.* 2009; 2: 212–214.
8. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 23 marca 2006 r. w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych.
9. Ustawa z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych.
10. Baylis S.A., Shah N., Minor P.D. Evaluation of different assays for the detection of parvovirus B19 DNA in human plasma. *J. Virol. Method.* 2004; 121: 7–16.
11. M. Łętowska (red.). *Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi*. Wyd. 3. Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa 2014.
12. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 11 grudnia 2012 r. w sprawie wykazu specjalizacji uprawniających lekarza do samodzielnego wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej w medycznym laboratorium diagnostycznym. Warszawa, dnia 18 grudnia 2012 r., poz. 1420.