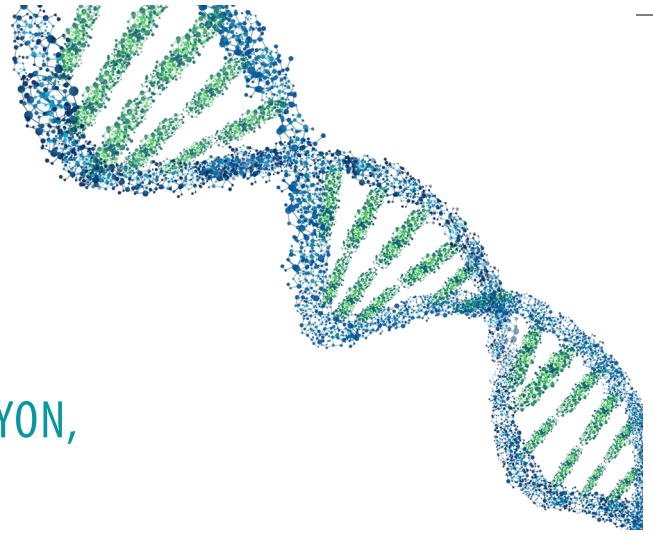


BÖLÜM 48

MOLEKÜLER YÖNTEMLERDE OPTİMİZASYON, VALİDASYON, VERİFİKASYON



Ayça Arzu SAYINER¹

Moleküler testler olarak da adlandırılan nükleik asit testleri, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında öncelikle hepatit virusları ve “human immunodeficiency virüs” (HIV) için kullanılmaya başlanmış, “coronavirus disease 2019” (COVID-19) pandemisi döneminde de görüldüğü gibi mikrobiyolojik tanı da ve tedaviyi yönlendirmede vazgeçilmez olmuşlardır. Günümüzde hızlı sendromik testler, yeni nesil dizileme, metagenomik analizler ve mikrobiyom çalışmaları ile nükleik asit testlerinin kapsamı ve teknikleri genişlemektedir ¹.

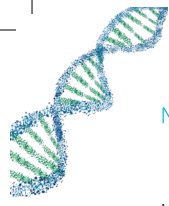
Mikrobiyolojik tanı laboratuvarlarında kalitatif/kantitatif nükleik asit saptama amacıyla en sık kullanılan yöntem, polimeraz zincir reaksiyonu [*polymerase chain reaction* (PCR)] dur. Florofor ile işaretli problemlerin kullanılması ile birlikte her döngüde sinyalin izlenebildiği gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu [real-time PCR (Rt-PCR)] geliştirilmiştir ². Rt-PCR teknolojisi, duyarlılığın yanı sıra 8-9 log₁₀'a varan bir aralıkta kantitasyona olanak sağlaması, tekrarlanabilirliğinin iyi olması, kapalı sistem olması, kontaminasyon riskinin az olması, hızlı sonuç vermesi sayesinde tıbbi tanı laboratu-

varlarında sık kullanılan yöntemler arasına girmiştir ³. Nükleik asit miktarı belirlemedeki başarısı nedeniyle kantitatif PCR (qPCR) olarak da isimlendirilmektedir.

Tıbbi laboratuvarlarda genellikle ticari ve onaylı (CE ve/veya FDA) testler kullanılmakla birlikte, bu seçeneğin bulunmadığı durumlarda veya özel gereksinimler nedeniyle laboratuvar yapımı testler geliştirilmekte veya onaylı testler modifiye edilerek kullanılmaktadır. A.B.D’de 2003 yılından bu yana, kalite yönetim sisteminin bir parçası olarak, tıbbi laboratuvarların yöntem geçerli kılma ve doğrulama analizlerini yapmaları istenmektedir ⁴. Benzer şekilde diğer kurumlar ve rehberler de [ISO 15189, Sağlıkta Kalite Standartları (SKS), vb] bu uygulamayı zorunlu kılmakta, akreditasyonun gereklerinden biri olarak kabul etmektedir ⁵⁻⁷.

Bu bölümde, ağırlıklı olarak PCR testleri için optimizasyon, validasyon ve verifikasyon esaslarının aktarılması hedeflenmiştir. Dizileme, dijital PCR gibi diğer moleküler yöntemler için tekniklere özel hazırlanmış rehberlerden yararlanmak mümkündür ⁸⁻¹².

¹ Prof. Dr., Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.D., Tıbbi Viroloji B.D. arzu.sayiner@deu.edu.tr



kaynaklardan temin edilmesi önemlidir. Her yeni lot enzim veya primer/probun performansı kullanım öncesinde, eskisi ile karşılaştırılarak değerlendirilmelidir. Bu tür karşılaştırmalarda en az bir negatif kontrol, testin analitik duyarlılığına yakın bir pozitif kontrol ve kantitatif testler için farklı miktarlarda nükleik asit içeren kontrollerin çalışılması önerilir ²².

Kaynaklar

1. Graf EH, Pancholi P. Appropriate use and future directions of molecular diagnostic testing. *Curr Infect Dis Rep* 2020;22(2): 5.
2. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006;27(2-3): 95-125.
3. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006;19(1): 165-256.
4. Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 2010;23: 550-576.
5. T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlıkta Kalite Standartları (sürüm 6.1), 2020 <https://shgmkalitedb.saglik.gov.tr/Eklen-ti/41258/0/skshastane-seti-s-61--09082021pdf.pdf> (erişim 30.05.2022)
6. ISO 15189:2012 Medical laboratories- Requirements for quality and competence, 2012 <https://www.iso.org/standard/56115.html> (erişim 30.05.2022)
7. Ieven M, Finch R, van Belkum A. European quality clearance of new microbiological diagnostics. *Clin Microbiol Infect* 2013;19(1): 29-38.
8. Aziz N, Zhao Q, Bry L, Driscoll DK, Funke B, Gibson JS, et al. College of American Pathologists' laboratory standards for next-generation sequencing clinical tests. *Arch Pathol Lab Med* 2015;139(4): 481-93.
9. NCCLS. Verification and validation of multiplex nucleic acid assays; approved guideline. MM17-A. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
10. dMIQE Group, Huggett JF. The Digital MIQE guidelines update: Minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments for 2020. *Clin Chem* 2020;1;66(8): 1012-1029.
11. López-Labrador FX, Brown JR, Fischer N, Harvala H, Van Boheemen S, Cinek O, et al. Recommendations for the introduction of metagenomic high-throughput sequencing in clinical virology, part I: Wet lab procedure. *J Clin Virol* 2021;134: 104691.
12. de Vries JJC, Brown JR, Couto N, Beer M, Le Mercier P, Sidorov I, et al. Recommendations for the introduction of metagenomic next-generation sequencing in clinical virology, part II: bioinformatic analysis and reporting. *J Clin Virol* 2021;138: 104812.
13. Raymaekers M, Smets R, Maes B, Cartuyvels R. Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. *J Clin Lab Anal* 2009;23(3): 145-151.
14. Burger F, Angioni M, Russo G, Schad M, Kallarackal J. PC-Rdrive: the largest qPCR assay archive to date and endless potential for lab workflow revitalization. *BMC Bioinformatics* 2018;19: 447.
15. Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2004;10: 190-212.
16. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55(4): 611-22.
17. Apte A, Daniel S. PCR primer design. *Cold Spring Harb Protoc* 2009;2009(3): pdb.ip65.
18. Park, M., Won, J., Choi, B.Y. et al. Optimization of primer sets and detection protocols for SARS-CoV-2 of coronavirus disease 2019 (COVID-19) using PCR and real-time PCR. *Exp Mol Med* 2020;52: 963-977.
19. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006;27(2-3): 95-125.
20. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 2005;39: 75-85.
21. Parker J, Fowler N, Walmsley ML, Schmidt T, Scharrer J, Kowaleski J, et al. Analytical sensitivity comparison between singleplex real-time PCR and a multiplex PCR platform for detecting respiratory viruses. *PLoS ONE* 2015;10(11): e0143164.
22. Sloan LM. Real-time PCR in clinical microbiology: Verification, validation, and contamination control. *Clin Mic News* 2007;29(12): 87-95.
23. Rabenau HF et al. Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. *J Clin Virol* 2007;40: 93-98.
24. Clark RB, Lewinski MA, Loeffelholz MJ, Tibbetts RJ. 2009. Cumitech 31A, Verification and Validation of Procedures in the Clinical Microbiology Laboratory. Coordinating ed., S. E. Sharp. ASM Press, Washington, DC.
25. Public Health England. (2017). Evaluations, validations and verifications of diagnostic tests. UK Standards for Microbiology Investigations. Q 1 Issue 5.
26. Stites EC, Wilen CB. The interpretation of SARS-CoV-2 diagnostic tests. *Med (N Y)* 2020;18;1(1): 78-89.
27. CLSI/NCCLS. 2004. Protocols for determination for limits of detection and limits of quantitation. Approved guideline. CLSI document EP17-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
28. Johnson, R. Assessment of bias with emphasis on medical comparison. *Clin Biochem Rev* 2008;29: S37-S42.
29. Çolak D, Sağlık İ, Can Sarınoğlu R, Mutlu D, Peker BO, Erman Daloğlu A, et al. Dünya Sağlık Örgütü uluslararası sitomegalovirüs (CMV) standardı ile kalibre edilmiş iki ticari kantitatif CMV polimeraz zincir reaksiyonu testinin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2020;54(2): 257-265.
30. Arbyn M, Dhillon SK, Martinelli M, Simoens C, Cuyppers L, Bode J, et al. VALCOR: a protocol for the validation of SARS-corona virus-2 assays. *Arch Public Health* 2022;29;80(1): 98.