

Příloha č. 2 - Připomínky

POSTUP PRO VALIDACI/VERIFIKACI METODY⁸

Před zavedením nové analytické metody do rutinního laboratorního provozu je třeba prověřit, že její charakteristiky splňují požadavky na něj kladené a validovat je. Validaci výrobků s CE značkou (Proč FDA???) provádí výrobce testovacích souprav a měřicích systémů (diagnostik), laboratoř metody pouze verifikuje. Metody „home made/in house“, komerční metody postrádající CE značku a metody s CE značkou, kde byla zavedena výrazná změna v analytickém postupu, je třeba validovat přímo v dané laboratoři. Před zavedením validované metody do nabídky rutinních metod poskytovaných laboratoři a dále je nutné v pravidelných (optimálně ročních) intervalech ověřit, že daný analytický měřicí postup je v klinické laboratoři plně funkční pomocí verifikace.

1. Validace

Validace metody má vždy klinický a analytický aspekt. Prvním a základním aspektem je, že metoda splňuje potřeby uživatelů laboratorních služeb (klinický aspekt). U metod s CE značkou nebo to dokládá výrobce. (TO nějak nesouvisí, zbytečně 2 věty) . U „home made/in house“ metod je tento způsob nezbytný. Druhým aspektem je validace vlastního analytického postupu (základní znaky analytické metody)

Z hlediska způsobu a formy vydávání výsledků lze metody dělit na

- kvantitativní (kontinuální stupnice hodnot vydávaných výsledků měření),
- kvalitativní (dvě a více kategorií hodnot výsledků měření).

Pojem „semikvantitativní“ (kategoriální hodnocení výsledků, např. titry) není doporučen.

O konkrétním obsahu a rozsahu validace resp. verifikace pro jednotlivá vyšetření a analýzy vždy rozhoduje management laboratoře s uvedením důvodů, proč se v daném rozsahu tyto úkony pro konkrétní analýzy či vyšetření provádí .

1.1. Postup validace pro kvantitativní metodu⁹:

- **Stanovení opakovatelnosti** (dříve používané termíny „v sérii“, „intraassay“) – je třeba použít minimálně 2 vzorky (kontrolní nebo pacientské) o různých hodnotách (jeden vzorek v dolní polovině rozsahu/intervalu měřitelných hodnot a jeden v horní polovině intervalu měřitelných hodnot, resp. v blízkosti klinicky rozhodujících hladin) a každý testovat v minimálně 20-ti replikacích během jedné analýzy - pro každý vzorek vypočítat aritmetický průměr (AM), směrodatnou odchylku (SD) a variační koeficient (CV) při vyloučení odlehlých hodnot. Při použití vhodného referenčního materiálu, je-li dostupný, s hodnotami typu RMP či AV (popř. kontrolního vzorku s ověřenou hodnotou obsahu analytu či hodnotou parametru) lze současně se stanovením opakovatelnosti určit vychýlení/bias.¹⁰

⁸ Tento dokument vychází z doporučení **Validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích, autoři:** Bedřich Friedecký, Luděk Šprongl, Josef Kratochvíla, vydáno: 16.11.2004, dostupné na webové adrese: <http://www.cskb.cz>, který byl upraven a doplněn pro potřeby odbornosti 222, 801, 802, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818 a 823 pracovní skupinou při Radě pro akreditaci dne 13.5.2009.

⁹ Kvantitativní metodou se pro účely tohoto materiálu rozumí metoda, kde se měřením získává spojitý charakter výsledků. Vedení laboratoře klasifikuje prováděné metody z tohoto hlediska na kvantitativní nebo kvalitativní.

¹⁰ V odbornosti 812 se u stanovení opakovatelnosti vyžadují minimálně 3 různé hodnoty obsahu.

- **Stanovení mezilehlé přesnosti** (intermediate precision, dříve používané pojmy „mezi sériemi“, „interassay“, nově mezilehlá preciznost) – je třeba použít minimálně 2 vzorky (kontrolní nebo patientské) o různých hodnotách (jeden vzorek v dolní polovině rozsahu/intervalu měřitelných hodnot a jeden v horní polovině pracovního rozsahu/intervalu měřitelných hodnot, resp. v blízkosti klinicky rozhodujících hladin) a každý analyzovat v 20-ti různých analýzách (sériích/běžích) realizovaných v různých dnech - pro každý vzorek vypočítat základní statistické parametry AM, SD a CV při vyloučení odlehklých hodnot.¹¹
- **Vychýlení (bias) metody**: odhad systematické chyby měření pomocí analýzy referenčního nebo kontrolního materiálu s ověřenou hodnotou složky, pokud existuje. Ideální jsou maticové referenční materiály, s vysokým stupněm komutability, které disponují cílovými hodnotami analytů a parametrů získanými referenčními postupy měření. Je třeba změřit minimálně 10 replikátů vzorku za podmínek opakovatelnosti, vypočítat hodnoty AM, SD a CV a z nich bias, resp. výtěžnost.

Pozn.: Lze to dělat i jinými postupy

- **Ověření meze detekce (LoD) a meze stanovitelnosti (LoQ)**. Výrobce by měl poskytovat uživateli tyto hodnoty stanovené podle protokolu EP17-A (CLSI USA).
 - **Úsporný postup stanovení hodnoty meze detekce LoD** (Limit of detection)
Změřit 10 vzorků blanku v sérii, vypočítat hodnotu 3 SD blanku (někdy se uvádí i hodnota 6 SD). Stanovit hodnotu LoD jako hodnotu složky, odpovídající hodnotě 3 SD blanku (pomocí rutinně používané kalibrace dané laboratorní metody)
U separačních technik lze mez detekce definovat jako koncentrace analytu, jehož výška píku odpovídá třinásovkou výšky šumu základní linie zjištěné analýzou 5 – 10 vzorků blanku
 - **Postup stanovení hodnoty meze stanovitelnosti LoQ** (Limit of quantification)
Vypočítat mez stanovitelnosti podle vztahu $LoQ = 3 * LoD$. U několika (doporučuje se u deseti) vzorků o sestupně hodnotě obsahu se stanoví mezilehlá přesnost měřením v deseti různých dnech. Nejnižší dosaženou hodnotu složky vzorku, u něhož docílíme lepší než požadované mezilehlé přesnosti, ztotožníme s hodnotou meze stanovitelnosti. Hodnota požadované mezilehlé přesnosti bývá v klinické laboratoři $CV = 20 \%$. **Nejasně popsáno, proč nepoužít jednodušší postup???**
U separačních technik je mez stanovitelnosti definována jako koncentrace analytu, jehož výška píku odpovídá desetinásobku výšky šumu základní linie. Možné je také experimentální stanovení nejnižší koncentrace dle postupu uvedeného výše.
- **Srovnání s referenční metodou** - min. 40 vzorků o koncentracích v celém rozsahu kalibrace /Popis vzorků – 24 uvnitř referenčních hodnot 8+8 patologických/ (pracovní rozsah, minimálně však 75 % možného rozsahu hodnot) - analyzovaných oběma metodami. Tento experiment lze spojit s určením klinické citlivosti a specifčnosti tam (JAK???), kde je to vyžadováno. Výsledek porovnání s referenční metodou lze znázornit pomocí grafu a korelační analýzy (určení korelačního koeficientu, příp. sestavení přepočítávací rovnice). K tomuto lze využít:
 - **Blandův-Altmanův rozdílový diagram**, kdy se na osu x umístí průměry obou metod a na osu y difference obou metod (s výhodou vyjádřená v %).
 - **Graf regresní závislosti**, kdy na ose x je opět lokalizovaná hodnota srovnávací metody.
 - **Passingovy-Bablokovy neparametrické regrese** před lineární regrese (OLR).
 - **Demingovy vážené regrese**

V případě špatně korelujících analytů (autoprotilátky) se doporučuje porovnat shodu klinického hodnocení výsledků měření vzhledem k referenčním intervalům resp. cut-off hodnotám.

- **Ověření kalibrační funkce a pracovního rozsahu**
 - linearita (POPSAT)
 - výtěžnost při ředění
 - recovery
 - kalibrace (CO SE TÍM MYSLÍ??)
 - „hook“ efekt a efekt prozóny

¹¹ V odbornosti 812 se u stanovení opakovatelnosti vyžadují minimálně 3 různé hodnoty obsahu.

- „carryover“ (JAKÝ – vzorkový, reagenční...)
- resp. další

Tyto znaky je nutné stanovit s ohledem na uznávané postupy a v případech, je-li to možné.

- **Interferenci (ve vhodných situacích)**

Analyzují se vzorky matrice o nulovém obsahu interferentů a vzorky matrice s možnými interferenty.

Sleduje se zejména vliv interferentů uvedených v dokumentaci výrobce IVD (hemoglobin, bilirubin, lipidy, léky), případně dostupných látek podle požadavků uživatele (například s molekulou podobnou stanovovanému analytu).

- **Robustnost (ve vhodných situacích)**

Robustnost je schopnost metody poskytovat přijatelné výsledky měření i v případě, že dojde k malým odchylkám od měřicího postupu či složení vzorku. Udává její spolehlivost při běžném používání. Zjišťuje se v rutinním provozu (např. vliv stárnutí kolony).

ODSTRANIT!!!

- **Odhad nejistoty výsledků vyšetření**

Pro stanovení odhadu nejistoty měření lze aplikovat postup uvedený v doporučení „[Určení odhadů nejistot výsledků měření klinických testů v klinických laboratořích](#)“, dostupné na <http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni--odhad-nejistot-vysledku-mereni>“.

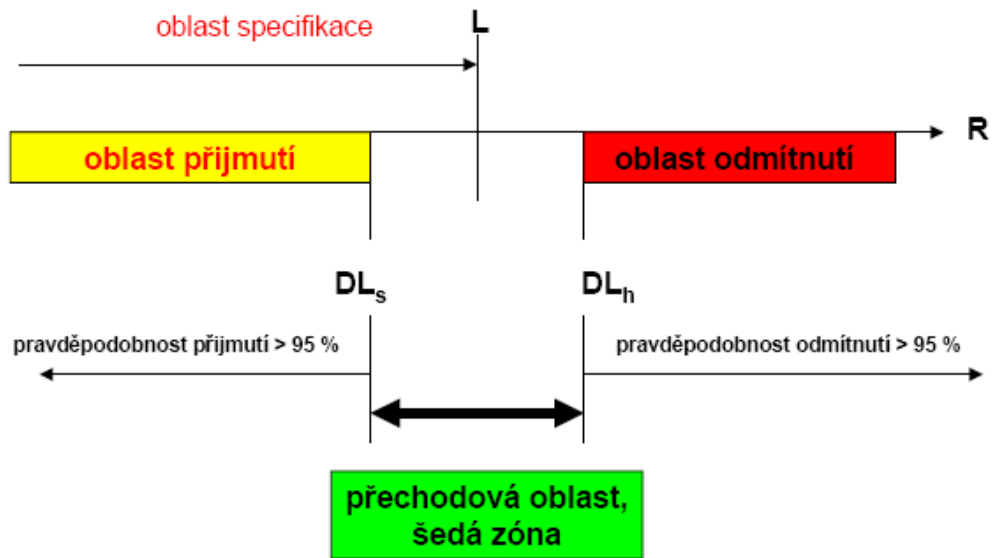
Pokud nelze jinak, je zapotřebí určit odhad alespoň formou reprodukovatelnosti (odhad standardní nejistoty).

Klinické aspekty validace kvantitativních metod

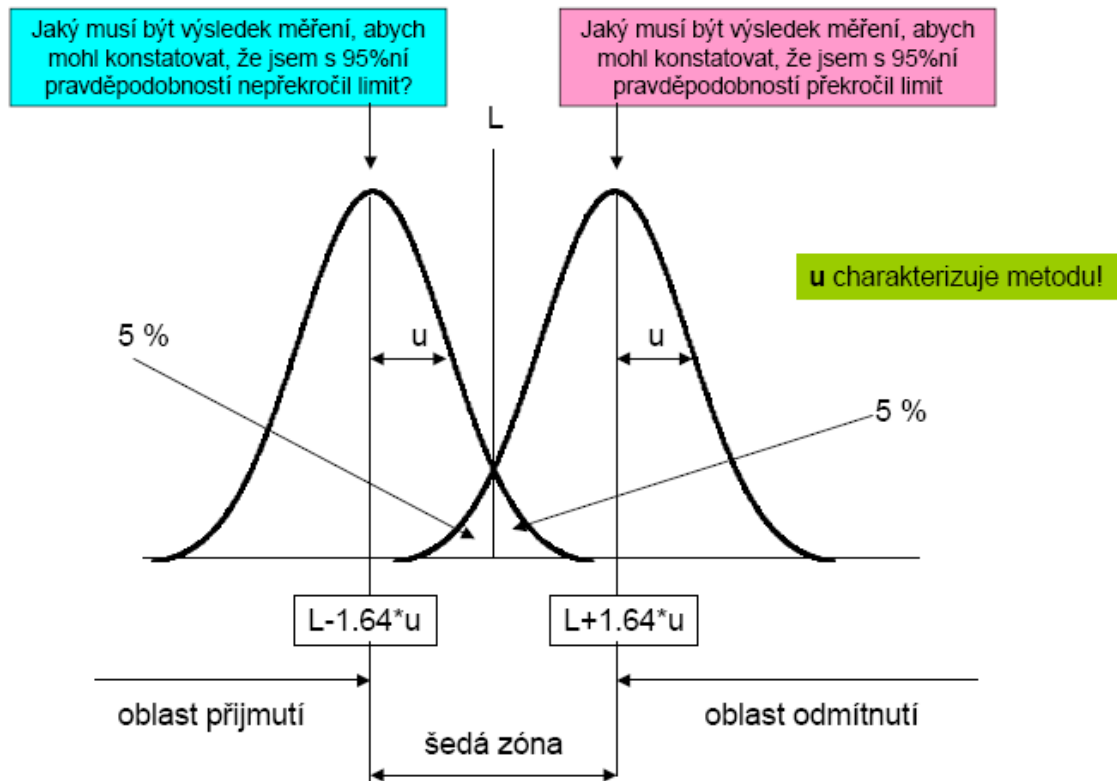
- **Určení referenčního intervalu** - provádí se bude doplněno podle C28-A3
- **Klinická citlivost a specifická** - minimálně 20 pozitivních vzorků (patologických) a 20 negativních vzorků (referenčních jedinců) - výsledek vyjádřit v procentech. Je nutno uvést podrobně kritéria, jak byli vybráni a definováni dárči pozitivních a negativních vzorků. K vyhodnocení je vhodné použít např. kontingenční tabulky.

1.2. Postup validace pro kvalitativní metodu:

Kvalitativní metodou se rozumí metoda, která poskytuje výsledky v kategoriích. Klasické kvalitativní metody používají dvě kategorie (negativní, pozitivní) v závislosti na hodnotě limitu (L – diskrétní hodnota), event. ve tři kategorie negativní, v oblasti mezi referenčního intervalu (přechodová šedá zóna/hraniční hodnota – výsledek zkoušky je neprůkazný) a pozitivní. Přitom oblast pod přechodovou zónou značí, že s 95% pravděpodobností je výsledek měření/zkoušky negativní (oblast přijmutí - DL_s) a naopak výsledek měření/zkoušky nad přechodovou zónou značí, že výsledek zkoušky je s 95% pravděpodobností pozitivní (oblast odmítnutí – DL_h). Obr. 1 uvádí výše uvedené v grafické podobě. Negativním výsledkem přitom je „oblast specifikace“ do hodnoty rozhodovacího limitu/meze.



Přítom obr. 2 charakterizuje přechodovou (šedou) zónu určenou odhady nejistot výsledků měření (u) v této oblasti, matematicky pak určuje přechodovou zónu rozmezí dle vztahu $L \pm 1,64u$ ($L \pm k_\alpha \cdot u$), kde u = odhad nejistoty výsledků měření (lze použít standardní nejistotu, tedy SD) a $k_\alpha = 1,64$ je koeficient pro interval spolehlivosti 95% ($\alpha = 0,05$ (5%)).



Interval spolehlivosti referenční meze (a tedy i zónu s neprůkaznými výsledky zkoušky) přitom definuje/uvádí povolený (**ještě klinicky použitelný**) odhad nejistoty měření v této oblasti od hodnoty referenční meze/limitu. Meze/limity volí uživatel sám, či dle doporučení výrobce tak, aby byl splněn účel zamýšleného použití.

Citace: ILAC G8 (1996); ISO 10576-1 (2003).

- **Stanovení opakovatelnosti (v sérii - intraassay)** – je třeba použít minimálně 2 vzorky: vždy negativní a pozitivní a každý testovat v minimálně 20-ti replikacích během jedné série měření a vyhodnotit v procentech shodu. Je-li vyhodnocení prováděno pomocí měření, je nutné, aby negativní a pozitivní vzorek poskytoval měřitelné hodnoty. Pracovní skupina nedošla ke shodě o významu stanovení v oblasti neprůkazného výsledku zkoušky (výsledek zkoušky nelze určit / hraniční).
- **Stanovení reprodukovatelnosti (mezi sériemi - interassay)** – je třeba použít minimálně 2 vzorky: vždy negativní a pozitivní a každý testovat v minimálně 20-ti různých analýzách (běžích) prováděných v různých dnech a vyhodnotit v procentech shodu. Je-li vyhodnocení prováděno pomocí měření, je nutné, aby negativní a pozitivní vzorek poskytoval měřitelné hodnoty. Pracovní skupina nedošla ke shodě o významu stanovení v oblasti neprůkazného výsledku zkoušky (výsledek zkoušky nelze určit / hraniční).
- **Klinická citlivost a specifčnost** - min. 20 pozitivních (patologických) a 20 negativních (fyziologických) vzorků - výsledek vyjádřit v procentech. Je nutno uvést podrobně kritéria, jak byly vybráni a definováni dárci pozitivních a negativních vzorků. K vyhodnocení je vhodné použít např. kontingenční tabulky.
- **Srovnání se srovnávací metodou** (pokud existuje) - minimálně 20 pozitivních (patologických) a 20 negativních (fyziologických) vzorků (pokud možno v celém pásmu možných výsledků) - analyzovaných oběma metodami a vyhodnotit graficky) nebo srovnáním relativních četností, Chi - kvadrátem apod. (v toxikologii platí pro imunochemickou metodu ?? *zde tomu nerozumím*).

Pojem semikvantitativní, kterým jsou často označovány např. titrační metody klasické sérologie, vyhodnocování koncentrací spec. IgE v RAST třídách apod., metrologie nezná. Tyto metody se řadí mezi kvalitativní metody vyhodnocující výsledky ve více kategoriích. Platí pro ně pravidla uvedená výše.

2. Verifikace

I pro verifikaci platí, že je zapotřebí analytickou metodu verifikovat jak klinicky tak analyticky. Klinická verifikace by měla probíhat v pravidelných intervalech a lze pro ni využít výsledky nezávislých studií publikovaných v odborných časopisech nebo v mezinárodních či národních směrnících, dále výsledky vlastních studií nebo údaje získané v rámci zpětné vazby od žadatelů zkoušek/analýz/vyšetření – lékařů. [Co to je klinická verifikace???](#)

Při verifikaci se ověřují základní funkční charakteristiky analytické metody realizované v konkrétních podmínkách laboratoře, tedy na konkrétním analytickém měřicím systému. Při ověření je posuzována shoda zjištěných hodnot vybraných charakteristik s údaji uváděných výrobcem nebo zjištěných při validaci. Nejsou-li tyto k dispozici, určuje si kritéria pro verifikaci laboratoř sama. [Kritéria musí být](#)

Frekvence verifikací

Doporučovaná frekvence pro provádění periodických verifikací je 1 x ročně. Mimořádné verifikace musí laboratoř provést při zásadních inovacích téhož výrobku IVD, resp. při opakovaných neshodách týkajících se konkrétního vyšetření (neúspěch v EHK případně VKK, stížnosti klientů apod.).

Obsah verifikací

O konkrétním obsahu a rozsahu verifikace pro jednotlivá vyšetření vždy rozhoduje management laboratoře s ohledem na důvody, proč se verifikace provádí a specifika konkrétního vyšetření.

Doporučenými charakteristikami ověřovanými v rámci verifikace jsou předmětem následujících postupů.

1.1. Postup verifikace pro kvantitativní metodu¹²:

- **Stanovení opakovatelnosti** (dříve používané termíny „v sérii“, „intraassay“) – je třeba použít minimálně 1 vzorek (kontrolní nebo patientský) a testovat jej v minimálně 10-ti (Obvyklé bývá 20) replikacích během jedné analýzy - pro každý vzorek vypočítat aritmetický průměr (AM), směrodatnou odchylku (SD) a variační koeficient (CV) při vyloučení odlehlých hodnot. Při použití vhodného referenčního materiálu s hodnotami typu RMP či AV (popř. kontrolní vzorek s ověřenou koncentrací analytu) lze současně se stanovením opakovatelnosti určit vychýlení/bias.¹³
- **Stanovení mezilehlé přesnosti (intermediate precision, dříve používané pojmy „mezi sériemi“, „interassay“, nově mezilehlá preciznost)** – je třeba použít minimálně 2 vzorky (kontrolní nebo patientské) o 2 různých hodnotách (jeden vzorek v dolní polovině rozsahu/intervalu měřitelných hodnot a jeden v horní polovině pracovního rozsahu/intervalu měřitelných hodnot, resp. v blízkosti klinicky rozhodujících hladin) a každý analyzovat (Proč opět jen 10??) různých analýzách (sériích/běžích) realizovaných v různých dnech - pro každý vzorek vypočítat základní statistické parametry AM, SD a CV při vyloučení odlehlých hodnot. Variantně lze mezilehlou přesnost ověřit na základě dat pořízených v rámci operativního řízení kvality, tj. vyhodnocením minimálně 10 výsledků pro 2 hodnoty obsahu kontrolních vzorků.
- **Vychýlení (bias) metody:** odhad systematické chyby měření pomocí analýzy referenčního nebo kontrolního materiálu s ověřenou hodnotou složky, pokud existuje. Ideální jsou maticové referenční materiály, s vysokým stupněm komutability, které disponují cílovými hodnotami analytů a parametrů získanými referenčními postupy měření. Doporučuje se třeba změřit minimálně 10 replikátů vzorku za podmínek opakovatelnosti, vypočítat hodnoty AM, SD a CV a z nich bias, resp. výtěžnost.¹⁴
- **Verifikace referenčních intervalů**
Ověření referenčních mezí lze realizovat na dvou úrovních:
 - a)
 - b) Experimentální ověření referenčních intervalů
Provádí se pouze při zavedení nové měřicí metody, změně diagnostik nebo při modifikacích postupů výrobce IVDD. Postupuje se podle dokumentu C28-A3. Vyšetří se 20 vzorků od zdravých probandů (z hlediska testovaného vyšetření) případně ověřených předcházející resp. nemodifikovanou metodou.
Referenční interval se považuje za ověřený pokud:
 - hodnoty alespoň 19 výsledků leží uvnitř referenčního intervalu
 - hodnoty 18 výsledků leží uvnitř referenčního intervalu a při opakovaném experimentu s novými 20 vzorky je splněno předchozí kritérium.

2.2. Postup verifikace pro kvalitativní metodu:

- Stanovení **opakovatelnosti** (intraassay) – minimálně 1 vzorek (**kontrolní nebo patientský**) je třeba testovat v min. 10-ti replikacích během jedné analýzy a vyhodnotit v procentech shody s deklarovanou hodnotou.

¹² Kvantitativní metodou se pro účely tohoto materiálu rozumí metoda, kde se měřením získává spojitý charakter výsledků. Vedení laboratoře klasifikuje prováděné metody z tohoto hlediska mezi kvantitativní nebo kvalitativní.

¹³ V odbornosti 812 se u stanovení opakovatelnosti vyžadují minimálně 2 koncentrace.

¹⁴ Nižší počet replikátů lze připustit pouze v případě, že to umožňuje opakovatelnost metody – pro tento postup ale nemá pracovní skupina v současné době racionální zdůvodnění. V krajním případě lze využít výsledky externího hodnocení kvality.

- Stanovení **reprodukovatelnosti** (interassay) – minimálně 1 vzorek, ideálně 2 o různých hodnotách testovat v min. 5-ti různých analýzách (běžích) a vyhodnotit v procentech shodu s deklarovanou hodnotou v čase.
- **Klinická citlivost a specifčnost** - minimálně 10 pozitivních vzorků (od probandů, kde byla referenční metodou prokázána pozitivita, pokud takováto metoda neexistuje, pak od probandů, u nichž je doloženo, že pozitivní hodnotu lze s vysokou pravděpodobností očekávat) a 10 negativních vzorků (referenčních jedinců, u nichž prokazatelně nelze pozitivní hodnotu očekávat, nebo byl negativní výsledek dosažen referenční metodou) - výsledek vyjádřit v procentech. Je nutné zodpovědně zvolit pozitivní a negativní vzorky s ohledem na nejistotu limitní hodnoty. Je nutno uvést podrobně kritéria, jak byli vybráni a definováni dárce pozitivních a negativních vzorků. Počet pozitivních vzorků může být nižší u metod se vzácným výskytem pozitivit.

3. Literatura

B. Friedecký, L. Šprongl, J. Kratochvíla, Validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích, doporučení ČSKB, 16.11.2004

Reviewer of Guidance. Validation of Chromatographic Methods. Center of Drug Evaluation and Research (CDER), CMC 3, 1994.

Guidance for Industry. Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), 1996.

Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. Biopharmaceutics – Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CMV) and the Food and Drug Administration (FDA), 2001.

Cerioti, F., Hinzmann, R., Panteghini, M.: Reference intervals: the way forward. Ann. Clin. Biochem., 46, 2009, s. 8 – 17.