

# Validace a verifikace molekulárně biologických metod založených na analýze extrahumánního genomu

Doplněk k doporučení výboru České společnosti klinické biochemie o validaci a verifikaci analytických metod v klinických laboratořích (z 16. 11. 2004).

Autoři: Bedřich Friedecký, Dalibor Novotný, Emil Pavlík, Lenka Plíšková, Petra Riedlová, Iva Subhanová, Tomáš Zima, Dalimil Žůrek

Recenzenti: Vladimír Bartoš, Radim Brdička, Marcela Draždáková, Vratislav Němeček

*Schváleno výborem ČSKB dne 13. 2. 2006.*

## Preambule

Molekulárně biologické metody představují specifickou, poměrně heterogenní skupinu analytických postupů, které jsou sdíleny různými obory laboratorní medicíny. V současné době jsou součástí běžných vyšetřovacích postupů určených pro diagnostické účely v lékařské genetice, hematologii, imunologii, klinické biochemii, klinické mikrobiologii, farmakologii i jinde. Zejména s nástupem kvantitativních metod využívaných především pro monitorování léčby pacientů vzniká potřeba sjednotit postupy u těchto metod tak, aby byla zajištěna mezilaboratorní porovnatelnost výsledků. Procesy standardizace a návaznosti měření však na tomto poli zaostávají za možnostmi a potřebami moderních vyšetřovacích postupů. V současné době proto není aktuální řešit intenzivně problémy pravdivosti měření. Z tohoto důvodu v Doplnku nejsou uvažovány bias a výtěžnost jako analytické znaky měření.

Předkládaný text má ambici v souladu s normami řízení kvality pomoci laboratořím provozujícím molekulárněbiologické metody založené na práci s extrahumánním genomem validovat a ověřovat analytické znaky a výkonnost jejich metod.

Obsah Doplnku je doporučující, nikoli zavazující. Podíleli se na něm odborníci z nejrůznějších oblastí laboratorní medicíny a formulace Doplnku shrnují jejich společné názory. Doplněk se nezabývá preanalytickými podmínkami vyšetření, ani interpretací výsledků.

Základní pojmy, názvosloví a související literární zdroje v Doplnku použité lze nalézt v publikacích:

- Validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích (Doporučení České společnosti klinické biochemie ČLS JEP, dostupné na [www.cskb.cz](http://www.cskb.cz)).
- Metrologická terminologie v analytické laboratoři. SEKK, 2003.

## 1. Cíl a účel doplnku

Hlavním cílem Doplnku k doporučení výboru ČSKB o validaci a verifikaci analytických metod v klinických

laboratořích (dále jen Doplnku) je vypracování osnovy pro validaci (verifikaci) komerčních souprav s CE značkou a tzv. in-house molekulárně biologických metod prováděných na bázi analýz extrahumánního genomu pro diagnostické účely, a to v souladu s požadavky norem ISO 17025 a ISO 15189.

Základním výchozím materiálem pro tento Doplněk, na který se v textu odkazujeme, je doporučení výboru České společnosti klinické biochemie: Validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích (dále jen Doporučení).

## 2. Validace (verifikace) molekulárně biologických metod na bázi extrahumánního genomu – kategorie podle rozsahu a obsahu validačních plánů

### I. Verifikace kvalitativních metod prováděných pomocí prostředků IVD vybavených značkou shody CE

U této skupiny metod by měly být dodržovány následující požadavky:

- a) Striktní dodržování pracovních postupů podle pokynů výrobce bez jakékoliv modifikace**, zejména s ohledem na: druh materiálu (vzorku), proces izolace nukleových kyselin (není-li izolace součástí soupravy, použití pouze doporučeného postupu), objem pipetovaných komponent a amplifikační profil.
- b) Používání diagnostické soupravy v přísném souladu se zamýšleným použitím**, které je výrobcem jasně deklarováno.
- c) Ustavení systému vnitřní kontroly kvality a jeho dodržování**. Podle znění Směrnice 98/79 ES i podle jejího českého ekvivalentu NV 453, 2004 má výrobce IVD doporučovat, dodávat a charakterizovat vhodné kontrolní materiály. Je žádoucí analyzovat jeden pozitivní a jeden negativní kontrolní vzorek, pokud výrobce nedoporučuje jinak. Navíc by měla být s každým klinickým vzorkem a uvedenými kontrolními vzorky prováděna tzv. interní kontrola izolace (a amplifikace, je-li tato prováděna), pokud je součástí diagnostické soupravy.

- d) **Účast v programech mezilaboratorního porovnávání zkoušek (externí hodnocení kvality, EHK)**, jsou-li tyto zkoušky dostupné pro vyšetřovaný parametr – viz Příloha II: Systémy EHK v oblasti molekulárněbiologických metod analýzy extrahumánního genomu.

## II. Verifikace kvantitativních metod prováděných pomocí prostředků IVD vybavených značkou shody CE

- a) **Striktní dodržování pracovních postupů podle pokynů výrobce bez jakékoli modifikace** – viz bod I.
- b) **Používání diagnostické soupravy v přísném souladu se zamýšleným použitím**, které je výrobcem jasně deklarováno.
- c) **Ustavení systému vnitřní kontroly kvality a jeho dodržování** – viz bod I.
- d) **Určení parametrů přesnosti** (opakovatelnosti, reprodukovatelnosti) měření. Jako výchozí materiál doporučujeme použít nativní vzorek nebo plasmid s vloženou cílovou sekvencí. Pro kvantifikaci náhodné chyby měření lze využít následující postup:
- **Počet vzorků:** Pro stanovení opakovatelnosti provést minimálně 10 měření na třech koncentračních hladinách, přičemž jeden vzorek by měl mít koncentraci v oblasti meze stanovitelnosti metody, další v oblasti odpovídající střední koncentraci rozsahu kalibrační závislosti a další v oblasti nejvyššího bodu kalibrace (nejvyšší koncentrace kalibrátoru). Měření reprodukovatelnosti provést v 10 po sobě následujících pracovních dnech, lze akceptovat i 10 po sobě následujících stanovení provedených v různých dnech.
  - **Statistické vyhodnocení:** Vypočítat průměr, směrodatné odchytky opakovatelnosti a reprodukovatelnosti, variační koeficienty opakovatelnosti a reprodukovatelnosti – postup je popsán v Doporučení, kap. 9. 1.
- e) **Ověření meze stanovitelnosti** – postup je popsán v Doporučení, kap. 9. 5.
- f) **Účast v programech mezilaboratorního porovnávání zkoušek (externí hodnocení kvality, EHK)** – viz bod I.

Vzhledem k prozatím neuspokojivé standardizaci měření a nedostupnosti referenčních materiálů a postupů s návazností na metrologické standardy (a z toho pramenící obtížné mezilaboratorní porovnatelnosti výsledků) v oblasti kvantitativních molekulárněbiologických metod není v této kategorii striktně vyžadováno ustavení minimálního validačního plánu, který kromě vyhodnocení přesnosti vyžaduje také určení výtežnosti jako kvantifikace hodnoty bias. Z tohoto důvodu ani nelze vyčíslit systematickou složku kombinované nejistoty výsledků měření, popř. celkovou kombinovanou nejistotu.

## III. Verifikace kvalitativních a kvantitativních metod prováděných pomocí prostředků IVD vybavených značkou shody CE, s modifikovaným postupem

V případě jakékoli změny či modifikace výrobků IVD MD je nezbytné provést tzv. křížovou verifikaci, pro-

střednictvím které je třeba doložit, že modifikací nedošlo k významnému zhoršení analytických znaků metody. V oblasti metod molekulární biologie jde nejčastěji o použití soupravy pro jiný typ výchozího materiálu, změnu izolační procedury, změnu objemu pipetovaných komponent, změnu amplifikačního profilu metody apod.

V rámci této kategorie testů se doporučuje provést zejména následující:

- a) **Ustavení systému vnitřní kontroly kvality a jeho dodržování** – viz bod I.
- b) **Určení parametrů přesnosti** měření (jen v případě kvantitativních metod) – viz bod II.
- c) **Ověření meze stanovitelnosti** (jen v případě kvantitativních metod) – nutno ověřit vhodným postupem popsáním v Doporučení, kap. 9. 5.
- d) **Ověření meze detekce** (jen v případě kvalitativních metod) – nutno ověřit vhodným postupem popsáním v Doporučení, kap. 9. 5.
- e) **Účast v programech mezilaboratorního porovnávání zkoušek (externí hodnocení kvality, EHK)** – viz bod I.

## IV. Verifikace rozlišovacích (typizačních) kvalitativních metod prováděných pomocí prostředků IVD vybavených značkou shody CE

Jde o skupinu metod, jejichž cílem je identifikovat, popř. rozlišit, různé subtypy či genotypy vyšetřovaného patogenu (genotypizace HCV, typizace HSV1/2 apod.). U této skupiny metod lze postupovat podobně jako v bodě I, avšak s modifikací vnitřní kontroly kvality.

- a) **Striktní dodržování pracovních postupů podle pokynů výrobce bez jakékoli modifikace** – viz bod I.
- b) **Používání diagnostické soupravy v přísném souladu se zamýšleným použitím**, které je výrobcem jasně deklarováno.
- c) **Ustavení systému vnitřní kontroly kvality a jeho dodržování** – je žádoucí analyzovat jeden pozitivní a jeden negativní kontrolní vzorek. Navíc by měla být s každým klinickým vzorkem a uvedenými kontrolními vzorky prováděna tzv. interní kontrola izolace (a amplifikace, je-li tato prováděna). Jako kontrolní materiály lze doporučit nativní vzorek nebo plasmid s vloženou cílovou sekvencí, popř. buněčnou kulturu s vyšetřovaným patogenem, které *jednoznačně identifikují* určovaný subtyp (genotyp).
- d) **Účast v programech mezilaboratorního porovnávání zkoušek (externí hodnocení kvality, EHK)** – viz bod I.

## V. Validace kvantitativních metod prováděných pomocí tzv. in-house postupů (bez CE značky)

Jde o kategorii metod, které byly vyvinuty v laboratoři nebo byly přejaté z jiné laboratoře, popř. o metody prováděné soupravami určenými pouze pro vědecké účely, bez CE značky. Pro tyto metody je nutné stanovit komplexnější validační plán, který zahrnuje tyto parametry:

- a) **Určení parametrů přesnosti** metody – viz bod II.
- b) **Ověření linearity (pracovního rozsahu)** – k tomuto účelu je možno použít např. modifikované postu-

py z Doporučení, kap. 9. 4, kde je uvedeno též jejich vyhodnocení. Jako kontrolní materiál lze použít nativní vzorky se známými koncentracemi měřené- ho parametru, nejsou-li dostupné, lze použít plasmidy s vhodným insertem cílové sekvence.

- c) **Ověření meze stanovitelnosti** – postup je popsán v Doporučení, kap. 9. 5.
- d) **Účast v programech mezilaboratorního porovnávání zkoušek (externí hodnocení kvality, EHK)** – viz bod I.
- e) **Ustavení systému vnitřní kontroly kvality a jeho dodržování** – je žádoucí analyzovat jeden pozitivní a jeden negativní kontrolní vzorek. Navíc by měla být s každým klinickým vzorkem a uvedenými kontrolními vzorky prováděna tzv. interní kontrola izolace (a amplifikace, je-li tato prováděna).

Jako kontrolní materiály lze doporučit nativní vzorek, plasmid s vloženou cílovou sekvencí, popř. buněčnou kulturu s vyšetřovaným patogenem.

U běžnějších analytických postupů se vyžaduje také porovnání s jinou metodou, ověření specifčnosti měření, určení vlivu interferencí apod. (viz Doporučení). Necháváme laboratořím k posouzení, zda tyto parametry validovat.

#### **VI. Validace kvalitativních metod prováděných pomocí tzv. in-house postupů (bez CE značky)**

Jde o kategorii metod, které byly vyvinuty v laboratoři nebo byly přejeté z jiné laboratoře, popř. o metody prováděné soupravami určenými pouze pro vědecké účely, bez CE značky. Za zásadní považujeme níže uvedené ověření způsobilosti a použitelnosti metody. Poslední uvedený bod d) je komentován v Příloze III.

- a) **Ustavení systému vnitřní kontroly kvality a jeho dodržování** – viz bod V.
- b) **Účast v programech mezilaboratorního porovnávání zkoušek (externí hodnocení kvality, EHK)** – viz bod I.
- c) **Ověření meze detekce** – podle Doporučení, kap. 9. 5.
- d) **Ověření specifčnosti metody provedením porovnávací studie proti „zlatému standardu“** – viz Příloha III.

#### **VII. Validace rozlišovacích (typizačních) kvalitativních metod prováděných pomocí tzv. in-house postupů (bez CE značky)**

Jde o skupinu metod, jejichž cílem je identifikovat, popř. rozlišit různé subtypy či genotypy vyšetřovaného patogenu. V takovém případě se ve srovnání s běžnými kvalitativními testy mění provádění vnitřní kontroly kvality co do povahy kontrolního materiálu, a není striktně vyžadováno ověření meze detekce.

- a) **Ustavení systému vnitřní kontroly kvality a jeho dodržování** – viz bod IV c.
- b) **Účast v programech mezilaboratorního porovnávání zkoušek (externí hodnocení kvality, EHK)** – viz bod I.
- c) **Ověření specifčnosti metody provedením porovnávací studie proti „zlatému standardu“** – viz Příloha III.

### **3. Izolace nukleových kyselin**

Proces izolace nukleových kyselin je – stejně jako detekce produktů – nedílnou součástí vyšetřovacího postupu, pokud je v něm použit. **Z tohoto důvodu není potřeba posuzovat jej zvlášť, ale v rámci konkrétní metody.** V každém případě by měl existovat SOP pro použitou izolační proceduru, ať se jedná o komerční soupravu nebo tzv. in-house metodu. Pokud jde o použití souprav s certifikátem shody CE nebo i bez něj, je nezbytně nutné striktně dodržovat pracovní postup podle pokynů výrobce a používat soupravu v přísném souladu se zamýšleným použitím. Izolační metody typu in-house by měly být podloženy mimo SOP také dokumentací o kvalitě (čistotě, výtěžnosti) získaných nukleových kyselin.

### **4. Praktické provádění validace (verifikace)**

Validační (verifikační) studie by měla být provedena v následujících případech:

- před zavedením nové metody do praxe;
- při změně diagnostické soupravy nebo změně přístrojové techniky;
- při rozšíření aplikace metody pro další účely (např. pro další typy materiálů), tedy v případě rozšíření rozsahu zamýšleného použití;
- při přetrvávajících problémech;
- po uplynutí určité doby (revalidace/reverifikace), např. po jednom roce.

### **5. Přílohy**

Součástí tohoto Doplnku jsou tři přílohy. První z nich je vzorový analytický standardní operační postup (SOP), který je adaptován pro metody molekulární biologie prováděné na extrahumánním genomu a dává laboratořím osnovu při koncipování jejich vlastních SOP. Druhou přílohou je soupis některých – v současnosti dostupných – systémů externího hodnocení kvality v oblasti molekulárněbiologických metod prováděných na extrahumánním genomu. Třetí příloha odkazuje na provedení tzv. porovnávací (evaluační) studie pro validaci kvalitativních metod typu in-house.

Soupis příloh:

- Příloha I: *Standardní operační postup analytický pro molekulárněbiologické metody prováděné na extrahumánním genomu – vzor.*
- Příloha II: *Systémy EHK v oblasti molekulárněbiologických metod na extrahumánním genomu.*
- Příloha III: *Ověření specifčnosti metody provedením porovnávací studie proti „zlatému standardu“.*

## PŘÍLOHA I:

### Standardní operační postup analytický pro molekulárně biologické metody prováděné na extrahovaném genomu – vzor

Číslo SOP: ... /molbiol/patogeny

### Standardní operační postup (SOP) pro průkaz DNA ..... v biologickém materiálu molekulárně biologickými metodami

#### Název a adresa pracoviště:

Místo a rok vydání:

Autor: (jméno/datum/podpis)

Schválil: (jméno/datum/podpis)

Verze dokumentu:

Platnost dokumentu od:

Výtisk č.: 0 manažer jakosti

1 laborať

Důvěrnost: interní

Revize:

Změny:

#### Obsah:

1. Název vyšetření
  2. Diagnostika popisovaného mikroorganismu
  3. Princip vyšetření
  4. Odběr a uchování biologického materiálu
  5. Průkaz DNA ..... v biologickém materiálu – pracovní postup
    5. 1. Izolace DNA
    5. 2. Amplifikace metodou polymerázové řetězové reakce (PCR)
    5. 3. Detekce
  6. Validace metody
    6. 1. Citlivost metody – mez detekce
    6. 2. Specificita metody
  7. Vydávání výsledků
  8. Kontrola kvality
    8. 1. Vnitřní kontrola kvality
    8. 2. Externí hodnocení kvality
  9. Přílohy
- Žádanka (název pracoviště), úsek molekulární biologie  
Pracovní protokol „Průkaz ..... metodou PCR“  
Izolace č ...  
Amplifikace č ...  
Gelová elektroforéza nukleových kyselin
10. Literární zdroje

#### 1. Název vyšetření

#### Průkaz DNA ..... metodou PCR

Na centrálním příjmu ..... je materiál přijat k vyšetření – zapsán do Laboratorního informačního systému (LIS).

Číslo metody v lokálním číselníku LIS: ....

Název metody ..... v lokálním číselníku: Přímý průkaz DNA ..... metodou PCR

Název a číslo metody v globálním číselníku LIS: .....

Kód vyšetření podle Seznamu zdravotních výkonů č. ...., odbornost ....., název: Průkaz DNA mikroorganismu v klinickém materiálu hybridizační sondou s amplifikací.

#### 2. Diagnostika popisovaného mikroorganismu

Onemocnění:

Epidemiologie:

Výskyt:

Klinika:

Laboratorní diagnostika:

1. přímý průkaz

2. nepřímý průkaz

#### 3. Princip vyšetření

K průkazu izolované DNA/RNA ..... se používá metoda polymerázové řetězové reakce (PCR).

Detekce je prováděna elektroforeticky na agarózovém gelu barveném ethidium bromidem. (Uvést princip konkrétní používané metody.)

#### 4. Odběr a uchování biologického materiálu

Vyšetření se provádí z ..... (vyjmenovat konkrétní biol. materiály).

K vyšetření je nutno zaslat ..... ml nesrážlivé krve, .... ml likvoru, .....

Preanalytická fáze:

Příprava pacienta (je-li nutné ji uvést):

Typ odběrové soupravy (zkumavky):

Podmínky odběru (je-li nutné je uvést):

Transport materiálu do laboratoře (způsob a časový interval pro dodání do laboratoře).

Každý materiál musí být doprovázen kompletně vyplněnou originální žádankou.

Uchování a stabilita materiálu v laboratoři:

Materiál je nutno uchovávat při 4 °C po dobu.... Pokud není materiál zpracován do .... hod, je nutno ho uchovávat při -20 °C (-70 °C), při této teplotě je stabilní po dobu.... Před zamražením je nutno z plné krve separovat leukocyty, ty pak zamrazit.

#### 5. Průkaz DNA ..... v biologickém materiálu – pracovní postup

Před izolací DNA je nutno vyplnit pracovní protokol s názvem Průkaz DNA ..... Po vydání výsledku je pracovní protokol uložen do Laboratorního deníku pro dané vyšetření.

##### 5.1. Izolace DNA

Izolace DNA ..... z ..... (konkrétní biologický materiál) se provádí podle izolačního protokolu ..... v místnosti č. ....

Izolovaná DNA je skladována do provedení PCR a výdeje výsledku v lednici v místnosti č. ... ve štítku ozna-



čených 1,5 ml zkumavkách. Na štítku musí být uvedeno jméno, materiál a datum odběru.

Archivace DNA: Po výdeji výsledku je DNA skladována v označené krabici (.....) při -20 °C (-70 °C) po dobu .....

## 5. 2. Amplifikace metodou PCR

Pro průkaz DNA ..... se používá amplifikace ..... (uvést oblast genu, event. genomu).

Sekvence použitých primerů:

.... 5' - ..... - 3'

.... 5' - ..... - 3'

Rozpis amplifikační směsi („master mix“) – v příloze. Amplifikační směs se připravuje v laminárním boxu v místnosti ....

Chemikálie a jejich uchování:

1. Taq DNA Polymeráza (rekombinantní, koncentrace 5 U/μl), PCR pufr (10krát koncentrovaný), uchování: -20 °C, krabice s chemikáliemi, mrazák v místnosti č. ... , výrobce: .., dodavatel: ...

2. 50 mmol/l MgCl<sub>2</sub> , uchování: -20 °C, krabice s chemikáliemi, mrazák v místnosti č. ...., výrobce: ....., dodavatel: ...

3. Směs dNTPs (2,5 mmol/l každý nukleotid): uchování: -20 °C, krabice s chemikáliemi, mrazák v místnosti č. ..., výrobce: ... dodavatel: ...

4. Voda: Aqua pro injectione, 10 ml, uchování: při laboratorní teplotě, výrobce: ...., dodavatel: ...

5. Primery: Syntézu oligonukleotidů podle požadované sekvence zajišťuje firma .... Primery jsou dodávány v lyofilizované formě s průvodními informacemi o jejich koncentraci a čistotě, uchování těchto primerů je při pokojové teplotě. Základní ředění primerů provádíme na koncentraci 100 pmol/μl (0,1 mmol/l) vodou (Aqua pro injectione). Tyto zásobní roztoky primerů jsou uchovávány při teplotě -20 °C. Ze zásobních roztoků následně připravujeme pracovní roztoky primerů o koncentraci 10 pmol/μl (0,01 mmol/l) uchovávané rovněž při teplotě -20 °C. Primery jsou uloženy v krabici označené ..... v mrazícím boxu v místnosti č. ....

Amplifikace probíhá v termocyklérech značky .... od firmy ....

Název programu: ...

Teplotní profil:

Úvodní denaturace 94 °C 3 min.

PCR – denaturace 94 °C 30 s

annealing 60 °C 30 s

extenze 72 °C 30 s

denaturace, annealing, extenze 40krát

Závěrečná extenze 72 °C 7 min.

Chlazení 10 °C

## 5. 3. Detekce

Produkt amplifikace oblasti ... genu o velikosti .... bp je vizualizován na ....% agarozovém gelu barveném ethidium bromidem. K určení délky fragmentů se po-

užívá vhodný velikostní marker. Elektroforetická detekce je prováděna v místnosti č. .... Agarozové gely jsou připravovány podle návodu Elektroforetická detekce (příloha).

Fotodokumentace gelů je prováděna systémem ....

Záznamy jsou přikládány k pracovním protokolům a ukládány do Laboratorního deníku pro dané vyšetření v místnosti .....

## 6. Validace metody

Metoda je validována podle Doplnku k doporučení o validaci a verifikaci analytických metod v klinických laboratořích ze dne ... Validují se níže uvedené parametry:

6. 1. Citlivost metody (mez detekce)

6. 2. Specificita metody

(popř. další validační parametry)

## 7. Vydávání výsledků

Hodnotí VŠ pracovník zodpovědný za výdej a interpretaci výsledků.

## 8. Kontrola kvality

### 8. 1. Interní kontrola kvality

Každá analytická série musí obsahovat uvedené kontroly:

a) pozitivní kontrola amplifikace (nutno uvést konkrétní materiál),

b) negativní kontrola (nutno uvést konkrétní materiál),

c) inhibiční kontrola (nutno uvést konkrétní materiál).

### 8. 2. Externí hodnocení kvality

Laboratoř se účastní mezilaboratorního porovnávání zkoušek v rámci dostupných systémů EHK (např. QCMD – kontrola kvality v molekulární diagnostice), a to jedenkrát ročně.

Certifikáty o účasti v externím hodnocení kvality a Certifikáty externího hodnocení kvality jsou uloženy v místnosti ....ve složce „Kontrola kvality“.

## 9. Přílohy

Žádanka (název pracoviště), úsek molekulární biologie  
Pracovní protokol „Průkaz ...metodou PCR“

Izolace č. ...

Amplifikace č. ...

Gelová elektroforéza nukleových kyselin

## 10. Literární zdroje

## PŘÍLOHA II:

### Systémy EHK v oblasti molekulárně biologických metod na extrahumánním genomu (údaje aktualizovány pro rok 2005)

#### I. Externí hodnocení kvality molekulárně biologických metod:

##### A) Česká republika:

##### Národní referenční laboratoř (NRL) pro hepatitidy, SZÚ Praha

Hepatitis B (HBV DNA), Hepatitis C (HCV RNA). Proběhla pilotní studie, od roku 2006 bude probíhat oficiálně jako systém mezilaboratorního porovnávání zkoušek. Kontakt: [www.szu.cz](http://www.szu.cz)

##### B) Evropská unie:

##### Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD)

Nezávislá nezisková organizace se sídlem v Glasgow, vznikla v roce 2001 s cílem pokračovat v kontrole kvality molekulárně biologických technik, zahájené z iniciativy ESVD a ESCMID po schválení komisí EU v květnu 1998 v rámci Quality Control Concerted Action. Je jednou z největších organizací tohoto druhu ve světě a její produkty a služby využívají ve více než 60 zemích. Do programu externího hodnocení se může přihlásit kterákoliv diagnostická laboratoř, ale i vědecké instituce, krevní banky, výrobci diagnostik aj. Účast v programech je zpoplatněna – pro účastníky z EU 300 euro za program + náklady na poštovné, pro účastníky mimo EU 600 euro.

Programy: HSV 1/2, VZV, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, HIV, Hepatitis B, Hepatitis C, Hepatitis C genotypizace, Cytomegalovirus, EBV, Enterovirus, *Mycobacterium tuberculosis* komplex

Pilotní studie k programům: *Toxoplasma gondii*, JC/BK virus, West Nile virus, RSV, *Legionella pneumophila*, *Bordetella pertusis*, Noroviry

Kontakt: [www.qcmd.org](http://www.qcmd.org)

##### Instand e. V., (Institut für Standardisierung und Dokumentation im medizinischen Laboratorium) Düsseldorf

Poskytuje externí kontrolu na základě uzavřené smlouvy.

V oblasti molekulární diagnostiky jde o tato agens: HSV 1/2, CMV, VZV, Parvovirus B19, Influenzavirus A/B, adenoviry, enteroviry, Human Papillomavirus, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Bordetella pertusis*, *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Salmonella enterica*, *Listeria sp.*, *Chlamydia pneumoniae*, Hepatitis B, Hepatitis C, HIV-1.

Vzorky lze hodnotit kvalitativně i kvantitativně.

Bakteriální genom – v setu jsou dodány 4 lyofilizované vzorky (0,3 ml) – 133 euro/set.

Virový genom – v setu jsou dodány 2 x 4 lyofilizované vzorky, (0,5–1 ml) – 139,60–146,20 euro/set.

Kontakt: [www.instand-ev.de](http://www.instand-ev.de)

##### VQC (Viral Quality Control)

Organizována při holandském Červeném kříži, poskytuje kontrolní materiály také pro sérologii, validační panely, zkoušky způsobilosti apod.

Kontakt: [www.vqc.nl](http://www.vqc.nl)

#### II. Validační panely a vzorky pro interní kontrolu kvality:

##### QCMD

Poskytuje pro tento účel validační panely z proběhlých studií do vyčerpání zásob.

##### Instand e. V.

Nabídka: HBV, HCV genotyp 1b, HCV genotyp 2a/2c, HIV1 subtyp B, Parvovirus B19, Cytomegalovirus, HSV1, HSV2, VZV, adenoviry, enteroviry, lidské papillomaviry, viry chřipky A a B.

##### ABI (Advanced Biotechnologies Inc)

Má nejširší nabídku kontrol a v USA největší podíl na trhu v tomto oboru, zastoupení má také v 7 zemích EU. Kontroly jsou kvantifikovány na  $10^4$ – $10^5$  kopií DNA v 1  $\mu$ l.

Nabídka zahrnuje tato agens: *Adenovirus 2*, *Adenovirus 5*, BK virus, *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* LGV typ II, CMV, EBV, *H. pylori*, HCV typ 1a, HHV-6 B z 29, HHV 7 h7-4, HHV 7 ji, HHV 8 ks1, HSV 1, GHSV 2, HTLV I, HTLV II, JC virus, *Mycoplasma pneumoniae*, *N. gonorrhoeae*, SV-40, *Toxoplasma gondii*, *Vaccinia virus*, VZV. Kromě toho je v nabídce i spektrum purifikovaných virů a virových lyzátů.

Kontakt: [www.abionline.com](http://www.abionline.com)

##### BBI/SeraCare Diagnostics

Má v nabídce jak spektrum kontrol Accurun, tak validační panely pro kvalitativní stanovení, genotypizaci i kvantifikaci.

Genotypizační panely: HCV RNA typy 1–6, HBV DNA typy A–F, HIV RNA skupina M typy A–H PRD 201 a PRD 202, HIV1 skupina O typ O PRD 301.

Kvalitativní panely: HIV-1 RNA, HBV DNA, HCV RNA, West Nile virus RNA, HIV-1 a HCV kombinovaný, *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, Parvovirus B19, Hepatitis A virus, West Nile virus.

Kvantifikační panely: HIV, HBV, HCV, CMV.

Kontakt: [www.seracare.com](http://www.seracare.com)

## PŘÍLOHA III:

### Ověření specifčnosti metody provedením porovnávací studie proti „zlatému standardu“

V případech validace kvalitativních metod a/nebo rozlišovacích kvalitativních metod prováděných pomocí tzv. in-house postupů je doporučeno ověřit specifčnost metody provedením vyhodnocovací (evaluační) studie.

Evaluace metod detekujících DNA/RNA infekčního agens – kategorie studií:

- Evaluace v případě, kdy je k dispozici metoda přímého průkazu infekčního agens, považovaná za tzv. zlatý diagnostický standard.
- Evaluace v případě, kdy je k dispozici více alternativních metod, z nichž však žádnou nelze považovat za tzv. zlatý diagnostický standard.
- Evaluace v případě neexistence spolehlivé alternativní metody přímého průkazu infekčního agens.

Popisy provádění jednotlivých kategorií evaluačních studií nejsou předmětem Doplnku, jejich vlastní realizace je však považována za zásadní podmínku validace.

Při praktickém provádění těchto studií doporučujeme využít postup používaný v SRN, viz předpis MiQ 1 (Německá společnost pro hygienu a mikrobiologii).


*Pozn.: Specifičnost metody je zásadní charakteristikou použité zkoušky. Z informací týkajících se specifičnosti musí být možno odvodit, do jaké míry umožňuje metoda provedení v daných podmínkách. Shoda mezi výsledky získanými in-house metodou a technikou považovanou za „zlatý standard“ musí být jednoznačná. Pro realizaci těchto srovnání je vhodné používat referenční materiál.*


**Jan Mach a kolektiv**

# ZDRAVOTNICTVÍ A PRÁVO

**komentované předpisy**


II. vydání





**- LexisNexis CZ s. r. o.**  
nakladatel řady Orac

Publikace vycházející v druhém, upraveném a rozšířeném vydání, obsahuje komentovaný přehled současné legislativy ve zdravotnictví, který je určen především širokému spektru jeho pracovníků (soukromí lékaři, manažeři nemocnic, distributoři léčiv a podobně), jistě bude ale vhodná i pro advokáty, zabývající se touto oblastí, pracovníky příslušných komor a odborových svazů a další. Novinkou v tomto vydání jsou dva v roce 2004 přijaté zákony o způsobilosti k výkonu zdravotnického povolání.



**LexisNexis CZ s. r. o.**

**LexisNexis CZ s. r. o.,**  
 Limuzská 2110/8  
 100 00 Praha 10  
 tel.: 274 013 268  
 fax: 274 013 256  
 e-mail: obchod@lexisnexus.cz  
 www.lexisnexus.cz