

# Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích

## Předmět validace v laboratoři

Validaci definuje mezinárodní metrologický slovník [5] jako ověřování, že specifikované požadavky jsou přiměřené pro zamýšlené použití.

Slovník managementu kvality [6] charakterizuje validaci jako potvrzení získané prostřednictvím poskytnutí objektivních důkazů, že požadavky na specifické zamýšlené použití nebo specifickou aplikaci byly splněny.

Validace potvrzuje, že měřicí postup/měřicí systém/výrobek IVD MD (In vitro diagnostic – medical device) je schopen plnit požadavky na ně kladené. Jinak řečeno, že úroveň měření je dostatečná, postupy měření korektní a s řádně provedenou kalibrací.

V klinické laboratoři se v naprosté většině používají již validované metody, produkované výrobcem in vitro diagnostik v souladu se Směrnicí IVD 98/79 EC (IVD). Proces validace se provádí pouze, pokud je v klinické laboratoři použit jiný typ metod, vypracovaných pracovníky laboratoře (home made), nebo dojde-li k modifikaci metod validovaných výrobcem. Klinická laboratoř nesmí používat jiné než validované metody.

## Předmět verifikace v laboratoři

Verifikace (ověření) je poskytnutí objektivního důkazu, že daná položka splňuje specifikované požadavky. Tedy potvrzení, že jsou dosaženy funkční vlastnosti nebo zákonné požadavky na měřicí systém, potvrzení prostřednictvím objektivních důkazů, že data o analytických znacích deklarovaná výrobcem, jinou laboratoří nebo referenční institucí jsou v dané laboratoři s použitím konkrétního měřicího systému dosažena. Pojem verifikace se používá v laboratořích pro proces ověřování, zda je laboratoř schopna dosáhnout při zavádění již validovaných metod deklarovanou výkonnost metody. Verifikace tedy nástroji obdobnými jako u validace prokazuje způsobilost personálu laboratoře a způsobilost zařízení a prostředí ve vztahu k provádění daného měřicího postupu.

Verifikaci pak rozumíme, že měřicí postup/systém/výrobek IVD MD je plně funkční v konkrétní laboratoři. V tomto doporučení budeme operovat s pojmem verifikace pouze v souvislosti s výrobky uvedenými na trh v souladu se zásadami Direktivy IVD 98/79 EC. V ostatních případech použijeme termínu validace.

V klinické laboratoři se verifikují všechny metody a postupy měření. Cílem verifikace je objektivní průkaz, že laboratoř je schopná dosáhnout výkonnostních parametrů (nejčastěji základních analytických znaků metod), které výrobce uvádí (nebo má uvádět) ve své dokumentaci. Laboratoř je povinna verifikovat i metody, u nichž provedla sama validaci.

### Mezilehlá preciznost

#### Varianta 1

Hodnota mezilehlé preciznosti se zjistí z výsledků vnitřní kontroly kvality. Doporučuje se období 3–6 mě-

Tab. 1. Výkonnostní parametry validace/verifikace analytického postupu

Validace	Verifikace
<ul style="list-style-type: none"><li>● opakovatelnost</li><li>● mezilehlá preciznost</li><li>● vychýlení (bias)</li><li>● pracovní rozsah</li><li>● mez detekce a mez stanovitelnosti (event. mez blanku)</li><li>● ostatní (matricové interference, srovnání s jinou metodou, srovnání pomocí výsledků EHK, robustnost, výtěžnost ...)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>● opakovatelnost</li><li>● mezilehlá preciznost</li><li>● vychýlení (bias)</li><li>● pracovní rozsah</li></ul>

síců při používání jedné šarže kalibrátoru/ů a kontrolních materiálů. Používají se 2–3 různé hodnoty (obsah, množství, koncentrace) analytů/složek. Do výpočtů se nezahrnují odlehlé výsledky. Odlehlost se detekuje např. Westgardovými pravidly. Je vhodné použít aspoň jedno pravidlo pro detekci náhodné chyby a aspoň jedno pravidlo k detekci systematické chyby.

#### Varianta 2

Použijí se 2–3 vzorky materiálů o různých hodnotách (fyziologické a patologické). Měří se 10 (minimum) až 20 (optimum) dní po sobě a je nutné získat alespoň 20 výsledků. Pokud je při měření v některém dni získán odlehlý nebo ne zcela důvěryhodný výsledek, je třeba dobu měření adekvátně prodloužit.

### Opakovatelnost a vychýlení (bias)

Stanoví se analýzou referenčních materiálů. Obecně přístupné referenční materiály jsou materiály již použité v některém z programů EHK. Jejich používání je metrology chemických měření oficiálně doporučováno.

Součástí referenčních materiálů jsou referenční hodnoty analytů a jejich nejistoty. Optimální je současné použití dvou referenčních materiálů o různých hodnotách analytů. Měření se provádí za podmínek opakovatelnosti (v sérii). Doporučovaný počet měření je deset.

Alternativně lze velikost vychýlení získat i z měření výtěžnosti, kdy se používají rutinní vzorky.

### Mez detekce – LoD (limit of detection)

Stanovuje se analýzou roztoku blanku za podmínek opakovatelnosti (v sérii). Minimální počet měření je deset. Hodnota LoD se vypočte jako trojnásobek hodnoty průměru blanku.

### Mez stanovitelnosti – LoQ (limit of quantification)

Teoretickou hodnotu meze stanovitelnosti lze vypočíst přibližně podle vztahu:

$$LoQ = 3 \cdot LoD$$

Experimentálně lze stanovit hodnotu LoQ měřením 1–3 silně naředěných vzorků a určením nejnižší hodnoty, při které je ještě dosaženo žádané hodnoty CV [%].

Obvykle se tyto předdefinované hodnoty CV pohybují v intervalu 10–20 %.

### Pracovní rozsah

Měří se pět vzorků v tripletech. První vzorek má mít hodnotu blízkou hodnotě LoQ, poslední vzorek hodnotu blízkou horní hranici pracovního rozsahu (linearity) bez použití ředění nebo autodiluce, vypočte se průměr výsledků měření a výtěžnost. Výsledky se zobrazí a vyhodnotí graficky metodou lineární regrese.

### Ostatní

- Interference (např. hemoglobin, bilirubin, lipidy, ...)
- Srovnání s referenční metodou
- Srovnání s výsledky EHK
- Robustnost

## Četnost provádění verifikací

Četnost verifikací si laboratoř stanoví ve svém validačním plánu. Doporučená minimální četnost verifikace metod je 1krát ročně. Může být považována za součást výročního prověřování systému řízení kvality laboratoře.

Verifikaci je vhodné provádět při výměně šarže kalibrátoru/ů a po provedení velkého servisního zásahu na měřicím přístroji.

Verifikace opakovatelnosti a bias se provádí u příslušného analytu při neshodě ve výsledcích EHK.

## Hodnocení výsledků verifikace

Hodnoty opakovatelnosti, mezilehlé preciznosti a pracovního rozsahu se srovnávají s daty uvedenými v pracovní dokumentaci výrobců nebo získanými v průběhu validace.

Podrobné informace přináší Výklad.

## Výklad

### Úvod

Náplní tohoto textu je podrobný výklad validace a verifikace měřicích postupů a systémů v klinických laboratořích.

Hlavním cílem validace je prostřednictvím experimentálního stanovení analytických a výkonnostních znaků metod (postupů) prokázat, že bylo dosaženo takové úrovně těchto znaků, která postačuje pro daný účel. V laboratorní medicíně to znamená, že výsledky měření jsou efektivním nástrojem diagnostiky, terapie a prevence.

Validace metod je v klinických laboratořích vyžadována normami managementu kvality (ISO 15189 [2]).

Procesy validace a verifikace jsou:

- Podkladem pro hodnocení klinické vhodnosti a použitelnosti metod.
- Součástí programů managementu kvality [3, 4].
- Podkladem pro vyhodnocení nejistot měření a podkladem demonstrace návaznosti a porovnatelnosti výsledků měření.

## Terminologie

V tomto dokumentu je použita terminologie vycházející z elektronicky publikovaného textu „Metrologická terminologie v klinické a analytické laboratoři“ (2. přepracované a doplněné vydání) SEKK 2009, který je volně dostupný na <http://www.eqa.cz/terminologie>. Tento dokument přejímá vybrané pojmy tak, jak jsou definovány ve třetím vydání mezinárodního metrologického slovníku VIM3 a jeho překladu do českého jazyka publikovaném jako TNI 01 0115:2009 [5] a volně dostupném ve svazku 21 „Terminologie z oblasti metrologie“ (2. vydání) Sborníků technické harmonizace dostupného na <http://www.unmz.cz/urad/sborniky-technicke-harmonizace>. Mimo jiné jsou v něm používány nové české ekvivalenty pro některé ze základních termínů nejistotního přístupu k měření: precision = preciznost, measurement trueness = pravdivost měření a measurement accuracy = přesnost měření.

## Pojem validace a verifikace

*Validaci* definuje mezinárodní metrologický slovník [5] jako ověřování, že specifikované požadavky jsou přiměřené pro zamýšlené použití.

Slovník managementu kvality [6] charakterizuje validaci jako potvrzení získané prostřednictvím poskytnutí objektivních důkazů, že požadavky na specifické zamýšlené použití nebo specifickou aplikaci byly splněny.

*Verifikace (ověření)* je poskytnutí objektivního důkazu, že daná položka splňuje specifikované požadavky. Tedy potvrzení, že jsou dosaženy funkční vlastnosti nebo zákonné požadavky na měřicí systém, potvrzení prostřednictvím objektivních důkazů, že data o analytických znacích deklarovaná výrobcem, jinou laboratoří, nebo referenční institucí jsou v dané laboratoři s použitím konkrétního měřicího systému dosažena. Pojem verifikace se používá v laboratořích pro proces ověřování, zda laboratoř je schopna dosáhnout při zavádění již validovaných metod deklarovanou výkonnost metody. Verifikace tedy nástroji obdobnými jako u validace prokazuje způsobilost personálu laboratoře a způsobilost zařízení a prostředí ve vztahu k provádění daného měřicího postupu. V mezinárodní analytické literatuře se však často takto striktně použití verifikace vůči validaci nevymezuje a validace se používá ve smyslu zahrnujícím i verifikaci.

Validace potvrzuje, že měřicí postup/měřicí systém/výrobek IVD MD (In vitro diagnostic – medical device) je schopen plnit požadavky na ně kladené. Jinak řečeno, že úroveň měření je dostatečná, postupy měření korektní a s řádně provedenou kalibrací.

Verifikací pak rozumíme, že měřicí postup/měřicí systém/výrobek IVD MD je plně funkční v konkrétní laboratoři. V tomto doporučení se operuje s pojmem verifikace pouze v souvislosti s výrobky uvedenými na trh v souladu se zásadami Direktivy IVD 98/79 EC. V ostatních případech se používá termínu validace.

Objektivními daty se rozumí jednak výsledky plánovaných laboratorních experimentů, jednak údaje z výrobní dokumentace, z výzkumných laboratořích, certifikačních procesů.

Analytické znaky, které jsou předmětem validace/verifikace, tvoří osnovu validačního/verifikačního plánu.

### Proč je nutná validace/verifikace

Výsledky analytických měření mají mimořádně silný dopad v praxi. V klinické laboratoři mohou rozhodným a někdy i fatálním způsobem ovlivnit zdraví, kvalitu života a někdy i samotný život pacienta.

Provádět měření o dostatečné kvalitě je profesionální povinností analytika. Validace/verifikace je činnost, kterou si laboratoř zajišťuje kvalitu dat při rutinním provozu. Je to činnost, která, je-li správně provedena, se laboratoři při rutinním používání validovaného postupu vyplácí.

Validace/verifikace poskytuje potřebná data pro odhad nejistoty měření (respektive intervalu spolehlivosti výsledků měření).

Akreditace, neboli formální potvrzení odborné způsobilosti laboratoře, vyžaduje používání řádně validovaných a verifikovaných metod (měřících systémů).

### Kdo provádí validace/verifikace

#### *Výrobci diagnostik*

Podle direktivy IVD 98/79 EC musí výrobce uvádět na trh Evropské unie pouze validované měřicí systémy. Postup a rozsah validace IVD MD je dán normou ČSN EN 13612 [7].

Pro výrobce uvádějící své produkty na trh v USA rovněž platí, že tyto jsou validované v rozsahu daném dokumentem Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation [8], vytvořeném následujícími institucemi:

- US department of Health and Human Services,
- Food and Drug Administration,
- Center for Drug Evaluation.

#### *Profesionální organizace analytiků*

AOAC – Association of Official Analytical Chemists má za cíl přispět k celosvětové důvěryhodnosti analytických výsledků (a tím i analytické chemie a analytických chemiků). Tato asociace má vyvinutu řadu validačních, verifikačních a certifikačních programů a spolupracuje s institucemi typu FDA, takže zasahuje také přímo do laboratorní medicíny.

Webová adresa: <http://www.aoac.org>

#### *Laboratoře*

Konečnou odpovědnost za adekvátní validaci nebo verifikaci postupu měření však nese samotná laboratoř. Míra úsilí, které musí vlastní laboratoř při validaci vyvinout, se výrazně liší podle toho, zda předmětem validace je nová metoda vyvinutá v laboratoři či metoda standardní nebo oficiální, která prošla i plnou mezilaboratorní validací a běžně se v oboru používá. Podrobně se validací z pozice jednotlivé laboratoře zabývá IUPAC Technical Report Harmonized Guidelines for Single-laboratory Validation of Methods of Analysis [9] a rozpracovává přístup laboratoře v mnoha variantách.

Jestliže validační údaje pocházejí z dokumentace výrobců a jsou podloženy experimenty v laboratořích výrobců, profesionálních organizací a v kalibračních/re-

ferenčních laboratořích, pak laboratoř musí tato data neustále doplňovat a verifikovat. Hlavními nástroji, kterými toho lze docílit jsou:

- Dodržování standardních operačních postupů výrobků splňujících požadavky Direktivy IVD 98/79 EC.
- Provádění pravidelné kontroly kvality (vnitřní i mezilaboratorní porovnávání).
- Vypracování a revize SOP, při které se rozhodující důraz klade na hodnocení výsledků mezilaboratorních porovnávání a studií.
- Průběžné a soustavné vzdělávání pracovníků.
- Průběžné sledování dokumentů a informací poskytovaných referenčními institucemi a organizacemi typu JCTML (Join Committee for Traceability in Laboratory Medicine viz <http://www.bipm.org/en/committees/jc/jctlm/>), LGC, AOAC.

**Trend moderního analytického měření je jasný. Používat validované kity a validované měřicí systémy a přenést hlavní pozornost laboratoři na odhady nejistot měření, kontrolu kvality, edukaci, soustavné sledování informací, implementaci nových poznatků do praxe laboratorní činnosti.**

### Kdy se provádí validace/verifikace

- Před zavedením nové metody.
- Před aplikací nového analytického měřicího systému do laboratoře.
- Před zavedením nového (jiného) diagnostického kitu.
- Pokud rozšíříme použití stávající metody o další účel (např. rozšíříme měření o další druh biologického materiálu).
- Ukazuje-li kontrola kvality přetrvávající problém.
- Při převzetí metody (typu in house) z jiné laboratoře nebo z publikace.
- Významná změna instrumentace.
- Podle validačního plánu.

### Rozsah a intenzita validace a verifikace

Rozsah a hloubka validace musí vždy odpovídat potřebě získat dostatek údajů k rozhodnutí, zda metoda je skutečně vhodná pro zamýšlený účel [2, 16, 17]. Validací/verifikační plány jsou dány charakterem validované/verifikované metody. Validace/verifikace kvalitativní metody vyžaduje významně menší úsilí než validace/verifikace metody kvantitativní. Metody validované výrobcem – výrobky IVD MD disponující značením CE a postupy prověřené mezilaboratorní validační studií vyžadují nižší rozsah validace než metody vyvinuté samotnou laboratoří (tj. typu in house) nebo laboratoří modifikované, či z jiné laboratoře přejaté.

Rozsah a hloubka validace/verifikace se stanovují ve validačním plánu.

Z hlediska validace/verifikace a jejího potřebného rozsahu lze klinické zkoušky rozdělit do čtyř skupin:

1. Kvalitativní zkoušky prováděné pomocí výrobků IVD vybavených značkou shody CE.
2. Kvantitativní zkoušky prováděné pomocí výrobků IVD vybavených značkou shody CE.

3. Kvantitativní zkoušky prováděné pomocí výrobků IVD vybavených značkou CE, ale s použitím modifikovaného postupu.

4. Kvantitativní zkoušky vyvinuté laboratoří (in-house).

Validace a verifikace pro výše uvedené skupiny metod jsou odlišné a jsou podrobněji popsány v následujících odstavcích. Validace musí být tak rozsáhlá, jak je to nezbytné pro rozhodnutí o použitelnosti dané metody.

#### *Verifikace validovaných kvalitativních zkoušek*

U této skupiny metod je jediným požadavkem striktní dodržování pracovních postupů výrobců (CLIA 88 – Final CLIA Rules Part V, dostupné na <http://www.westgard.com> a v knize [10]). I tento typ metod by měl mít vytvořený program vnitřní kontroly kvality. Kontrolní materiály má podle znění Direktivy 98/79 EC doporučovat, dodávat a charakterizovat výrobce IVD podle normy ISO 15198 [4].

#### *Verifikace validovaných kvantitativních zkoušek*

Jde o metody, které používají prostředky splňujících požadavky Direktivy IVD 98/79 EC a opatřené značkou CE. Tam se laboratoř omezí na verifikaci základních předem validovaných parametrů.

Do této kategorie patří většina laboratorních zkoušek. Značení CE u výrobků IVD znamená potvrzení shody jejich vlastností s požadovanými, to znamená, že před uvedením na trh bylo shledáno, že vyhovují požadavkům Evropské direktivy 98/79 EC. Výrobce IVD má tedy ustanoven systém řízení kvality podle normy ISO 13485 [11] a jeho výrobky byly validovány postupy požadovanými normou EN 13612 [7]. Z faktu, že laboratoř používá výrobky vyhovující Direktivě IVD 98/79 EC vyplývají pro ni následující povinnosti, umožňující požadovat odpovědnost výrobce za kvalitu výrobku IVD MD:

- Výrobek se musí používat v souladu s jeho zamýšleným použitím, které je výrobcem deklarováno.
- Uživatel musí dodržet postup výrobcem uvedený (nesmí v žádném případě a jakkoliv tento postup modifikovat).
- Uživatel provádí namísto rozsáhlé validace základní verifikaci vlastností těchto výrobků s použitím jednoduchého verifikačního plánu.

Účelem verifikace metod IVD je potvrzení, že získané hodnoty analytických a výkonnostních znaků jsou ve shodě s hodnotami deklarovanými výrobcem a že jich lze v konkrétní laboratoři docílit za běžných podmínek rutinní činnosti.

Předmětem verifikace není tedy samotný výrobek IVD, ale schopnost realizovat měřicí proces v konkrétní laboratoři v daném čase a prostoru.

Rozhodujícím výstupem verifikace by měla být seriózně odhadnutá hodnota nejistoty měření.

Verifikační plán výrobků IVD MD (minimum):

- Preciznost (opakovatelnost, mezilehlá preciznost).
- Vychýlení (bias) kvantifikované jako výtěžnost (recovery).
- Pracovní rozsah.

Tyto znaky jsou nezbytné pro základní odhad nejistoty výsledků měření. Laboratoř může v případě potřeby verifikovat i další analytické znaky.

#### *Validace provedených modifikací původně validované metody*

Ekvivalentem této situace je použití kitu/systému IVD MD, u něhož byl nějakým způsobem modifikován postup. Takto modifikovaný kit by měl být podroben „křížové“ validaci. Ta se provádí (podle [8]) srovnáním výsledků validace původní a modifikované metody. Cílem je dokumentovat, že modifikací nedošlo k porušení shody vlastností s požadavky specifikovanými pro dané použití

#### *Validace kvantitativní zkoušky vyvinuté laboratoří (in-house)*

Taková metoda musí být validována v plném rozsahu. Do této kategorie patří metody vyvinuté laboratoří (in house) nebo metody přejaté z jiné laboratoře. V tomto případě je nezbytné používat podstatně širší a komplexnější validační plán a zkoumat:

- Preciznost (opakovatelnost, mezilehlá preciznost t).
- Vychýlení (bias), výtěžnost.
- Linearitu, pracovní rozsah měření.
- Mez detekce a stanovitelnosti.
- Interference.
- Porovnání s jinou metodou.
- Referenční intervaly.

#### **Obecný postup validace a verifikace**

- Formulovat požadavky, kterých má být pro daný účel použití dosaženo (u výrobků IVD MD jsou tyto požadavky součástí pracovní dokumentace dodané výrobcem a laboratoř pouze verifikuje jejich platnost).
- Určit rozsah validace/verifikace, tj. výběr validačních parametrů – základním kritériem je získat dostatek údajů, aby bylo možno posoudit, zda metoda je vhodná pro zamýšlený účel, vypracovat plán.
- Provéřit, zda použitá instrumentace má kvalifikaci pro daný účel, tj. že její technické parametry jsou postačující pro daný účel, že byla řádně kalibrována apod.
- Vybrat vzorky, na kterých se experimenty realizují.
- Provést příslušné experimenty.
- Vyhodnotit výsledky.
- Pokud je nutné, provést opatření k tomu, aby byly specifikované požadavky splněny.
- Vytvořit dokumentaci validace/verifikace ve formě validační zprávy.

#### **Hlediska úzce související s validací/verifikací**

- Účel měření.
- Definice analytu.
- Vzorkování, transport a zacházení se vzorkem.
- Souhrn minimálních požadavků na kvalitu měřicího přístroje.
- Návaznost hodnot měřicích standardů (kalibrátorů).
- Kalibrace měření.
- Preciznost.
- Vychýlení (bias), eventuálně výtěžnost.
- Ověření platnosti použitých výpočtů.
- Citlivost, linearita, měřicí rozsah, mez detekce, mez stanovitelnosti.
- Robustnost.

- Nejistota měření.
- Ustanovení limitních parametrů kontroly kvality.
- Zápisy výsledků validačních studií.
- Dokumentace validace/verifikace, laboratoř musí zaznamenat získané výsledky, postup a prohlášení, zda metoda vyhovuje zamýšlenému použití.
- Vyjádření o schopnosti metody vyhovět specifikovaným požadavkům.
- Kompletní dokumentace kontroly kvality.

Všechny uvedené položky musí tvořit v laboratoři integrovaný, kontinuálně řešený a monitorovaný celek. Řešení dílčích problémů bez vazby na ostatní je irelevantní.

## **Experimentální a statistické postupy validace a verifikace**

### **Opakovatelnost, mezilehlá preciznost**

Cíl: Kvantifikace náhodné chyby měření.

Počet vzorků, replikátů, rozsah hodnot:

- 20 výsledků měření dvou vzorků o dvou různých hodnotách (jeden vzorek uvnitř referenčního intervalu, druhý nad hodnotou horní hranice referenčního intervalu nebo rozhodovacího limitu, případně pod hodnotou dolní hranice referenčního intervalu).
- Může být použito alternativně jak vzorků materiálů pacientů, tak i kontrolních/referenčních materiálů. Ke stanovení opakovatelnosti a mezilehlé preciznosti mohou být použity totožné vzorky.
- Stanovuje se hodnota směrodatné odchylky opakovatelnosti (v sérii 20 měření) a mezilehlé preciznosti (vnitřilaboratorní) – každý z obou vzorků je měřen 20 dní po sobě v singletu nebo 10 dní po sobě, každý den ve dvou sériích. Pozn.: Při verifikaci lze alternativně využít hodnoty z VKK.

### *Statistické hodnocení*

- Průměr.
- Směrodatné odchylky opakovatelnosti a mezilehlé preciznosti.
- Variační koeficienty opakovatelnosti a mezilehlé preciznosti.

### **Vychýlení (bias) metody**

Cíl: Odhad systematické chyby měření pomocí analýzy referenčního nebo vhodného kontrolního materiálu. K provedení tohoto odhadu musí být minimalizovaná náhodná chyba měření použitím dostatečného počtu (alespoň 10) opakovaných měření.

Hodnota vychýlení (bias):

- dokumentuje stav návaznosti měření v laboratoři,
- vyčísluje systematickou složku celkové chyby výsledků měření.

### *Vzorky*

Ideálními vzorky pro stanovení vychýlení (bias) měření jsou matricové certifikované referenční materiály, které disponují hodnotami obsahu analytů získanými referenčními postupy měření. Takové vzorky jsou pro rutinní laboratoř často nedostupné. V praxi je nezbytné volit postup, kdy laboratoř porovnává své výsledky s výsledky ostatních laboratoř používajících stejné kontrolní materiály. Toto srovnání lze realizovat pomocí

kontrolních materiálů použitých předtím v programech externího hodnocení kvality. Hodnota vychýlení (bias) získaná za podmínek opakovatelnosti je vhodná pro zpracování do odhadu nejistoty měření.

### *Měření:*

- měří se za podmínek opakovatelnosti (v jedné sérii),
- 10 měření, 2 referenční (kontrolní) materiály o dvou různých hodnotách. Doporučuje se jedna hodnota uvnitř referenčního intervalu, druhá nad jeho horní, případně pod dolní hranicí.

### *Referenční hodnoty*

Podle stavu návaznosti měření a s ohledem na možné ovlivnění výsledků měření matricovými vlivy se používají:

- a) Referenční hodnoty získané referenční metodou v externí referenční/kalibrační/expertní laboratoři.
- b) Průměry všech výsledků účastníků mezilaboratorních porovnávání (po vyloučení odlehlých hodnot).
- c) Průměry výsledků měření účastníků používajících stejnou metodu měření v případech, kdy jsou závislé na použitém měřicím postupu/systému. V tomto případě lze hodnotit bias pouze tam, kde je v příslušné skupině nejméně 10 účastníků.

### *Postup a výpočet [3, 13]:*

- Změříme deset replikátů vzorku za podmínek opakovatelnosti.
- Získáme soubor výsledků  $x_i$  ( $i = 1$  až 10).
- Vypočteme hodnotu aritmetického průměru AM.
- Vypočteme hodnotu opakovatelnosti jako výběrovou směrodatnou odchylku SD a CV (%).
- Vypočteme hodnotu vychýlení – bias jako výtěžnost R:

$$R = AM/\mu$$

nebo

$$R = 100 \cdot (AM/\mu) \quad [\%],$$

kde  $\mu$  je referenční hodnota (jedna z výše uvedených možných).

### **Porovnatelnost metod**

Cíl: Vyhodnotit vychýlení (bias), typ systematické chyby a korelaci porovnáním validované metody s metodou srovnávací.

Ideální srovnávací metodou je referenční měřicí postup. V rutinní praxi je obvykle nedostupný. Postupuje se proto tak, že se nová rutinní metoda/postup/analytický systém srovnává s jinou rutinní metodou/postupem/ analytickým systémem, která byla předem validovaná. Pokud validujeme POCT metodu/analytický systém, pak používáme rutinní laboratorní metody jako metody srovnávací.

### *Výrobky IVD-MD*

Výrobce je povinen poskytnout laboratoři data o návaznosti a porovnatelnosti své metody (ISO 17511 [13], ISO 18153 [14]). Porovnatelnost musí výrobce dokumentovat grafem a numerickým vyhodnocením regresní závislosti nebo pomocí Bland-Altmanova diagramu. Tato povinnost je uvedena v normách (EN 375 [15], ISO 18112 [1]).

## Vzorky

Pro in-house metody se doporučuje použít aspoň 40 vzorků nativních biologických materiálů pacientů. Vzorky musí být pečlivě vybrány tak, aby rovnoměrně pokrývaly celý pracovní rozsah měření [10]. Pečlivý výběr vzorků z hlediska počtu vhodných hodnot je pokládán za podstatnější než zvyšování jejich počtu.

## Replikáty

Doporučuje se měření jednotlivých vzorků v duplikátech. Experiment může být proveden v jediném dni, doporučuje se však 5 dní po osmi vzorcích denně.

## Záznam výsledků

Doporučuje se zápis naměřených dat do tabulky. V případě vnesení do grafu se výsledky srovnávací metody vždy uvádějí na ose x, výsledky validované metody na ose y.

## Grafický záznam dat

Bland-Altmanův diagram, kdy se na osu x umístí průměry výsledků obou metod a na osu y diference výsledků obou metod (s výhodou vyjádřené v %).

Graf regresní závislosti, kdy na ose x je opět lokalizovaná hodnota srovnávací metody.

Posouzení systematické difference validované metody od srovnávací metody

Doporučuje se používat neparametrické regrese (např. Passing-Bablok, Deming).

## Pracovní rozsah měření

Cíl: Ověřit, případně určit pracovní rozsah měření v podmínkách konkrétní laboratoře. Tento rozsah vymezuje interval, v němž lze bezpečně očekávat, že platí výrobcem/laboratoří deklarované a validačními experimenty ověřené hodnoty preciznosti a vychýlení metody.

## Systémy IVD-MD

Podle IVD (98/79 EC) a v souladu s normami EN 375 [15] a ISO 18112 [1] je výrobce povinen poskytnout laboratoři validovaná data o linearitě a pracovním rozsahu měření. U výrobků IVD určených pro imunoanalytická měření je pracovní rozsah charakterizován daty získanými ředicím (dilučním) pokusem a číselně vyjádřenými hodnotami výtěžnosti (R %)

## Materiál

S výhodou mohou být použity komerčně dostupné sady referenčních materiálů určené přímo k tomuto účelu.

Pro analyty, u nichž není takový materiál k dispozici, se doporučuje ověřovat pracovní rozsah (případně linearitu) měření sadou směsí lidských sér. V případě verifikace pracovního rozsahu měření neposkytujícího lineární vztah mezi analytickým signálem a hodnotou se používá ředicího (dilučního) experimentu.

Příprava sady vzorků pro validaci/verifikaci pracovního rozsahu [10]:

- Připraví se směs (pool) vzorků pacientů (H) o extrémně vysoké hodnotě analytu, která se blíží výrobcem deklarované horní hranici linearitu/pracovního rozsahu, ale nepřekročí ji.

- Připraví se směs (pool) vzorků pacientů (L) o extrémně nízké hodnotě analytu, která se blíží mezi stanovitelnosti. Je-li dostupný „nulový“ kalibrátor, použije se jako vzorek L.
- Smícháním obou poolů se připraví podle tabulky 2 další tři vzorky.

Tab. 2. Příprava vzorků

Vzorek 1	L
Vzorek 2	3L + 1H
Vzorek 3	2L + 2H
Vzorek 4	1L + 3H
Vzorek 5	H

Preciznost a pravdivost odměřování objemů jsou kritickým bodem tohoto postupu.

## Příprava vzorků pro diluční pokus

Z biologického materiálu o hodnotě blízké horní hranici pracovního rozsahu se připraví naředěním pět (nebo více) vzorků s klesajícími hodnotami analytu (tab. 3). Volbou více vzorků o vhodných počátečních hodnotách lze docílit pokrytí celého pracovního rozsahu měření (nebo aspoň jeho klinicky nejdůležitější části).

Tab. 3. Příklad (měření koncentrace TSH v krevním séru)

Ředění	Naměřená hodnota – průměr	Teoretická hodnota	R (%)
1	19,2	20	96
3	7,1	6,7	106
5	3,88	4,0	97
9	2,25	2,2	102
17	1,27	1,18	108

## Replikáty

Každý vzorek se měří v triplicátu. Pořadí měření jednotlivých vzorků by mělo být náhodné.

## Hodnocení

Při validaci linearity se vyhodnotí závislost průměrů změřených hodnot (osa y) na teoretických známých (osa x). K hodnocení se použije metody lineární regrese.

Při validaci pomocí dilučního pokusu se vyhodnotí výtěžnosti, dosažené u jednotlivých vzorků (R v %), které se vypočítají podle vztahu:

$$R = 100 \cdot (\text{výsledek měření} / \text{teoretická hodnota}) \quad [\%]$$

## Dokumentace

- Graf závislosti změřených hodnot (osa y) a hodnot teoretických (osa x)
- Hodnoty směrnice, úseku a korelačního koeficientu
- Výtěžnosti (R v %)

## Mez detekce a mez stanovitelnosti

### Materiál

Vzorkový blank (sample blank) nebo „nulový“ kalibrátor.

### Systémy IVD-MD

Výrobce poskytuje uživateli hodnotu meze detekce. Hodnota meze stanovitelnosti nebývá vždy poskyto-

vána. Pokud jsou data meze stanovitelnosti u výrobků IVD-MD k dispozici, bývají často označena (nevhodným) termínem funkční citlivost (functional sensitivity).

Postup stanovení hodnoty meze detekce (LoD, limit of detection):

- Změřit 10 vzorků blanku v sérii (pomocí rutinně používané kalibrace).
- Vypočítat hodnotu výběrové směrodatné odchylky ( $SD_{blank}$ ).
- Vypočítat hodnotu meze detekce:

$$LoD = 3 \cdot SD_{blank}$$

Mez detekce patří mezi klíčové analytické znaky kvalitativních metod používajících nominálních a/nebo ordinálních měřicích stupnic.

Postup stanovení hodnoty meze stanovitelnosti (LoQ, limit of quantification)

Lze zvolit jeden z následujících postupů:

- Vypočíst mez stanovitelnosti podle vztahu:  
 $LoQ = 3 \cdot LoD$
- U několika vzorků (doporučuje se u 10) se stanoví mezilehlá preciznost měřením v deseti různých dnech. Nejnižší dosaženou hodnotu obsahu u vzorku, u něhož ještě docílíme lepší než požadovanou mezilehlou preciznost, ztotožníme s hodnotou meze stanovitelnosti. Hodnota požadované mezilehlé preciznosti bývá v klinické laboratoři CV = 20 %.

Mez stanovitelnosti patří mezi klíčové analytické znaky kvantitativních metod měření. Někdy bývá nesprávně označována jako funkční citlivost.

### Výtěžnost

Cíl: Hodnoty výtěžnosti měření dosažené přidáním měřeného analytu ke vzorku měřeného materiálu kvantifikují vychýlení (bias) měření (viz výše).

Hodnoty výtěžnosti měření zjištěné po přidavku interferentu ke vzorku měřeného biologického materiálu poskytují informace o analytické selektivitě validované metody vyhodnocením přítomnosti nebo nepřítomnosti signifikantní proporcionalní systematické chyby měření [12]. U separačních metod je pak výtěžnost měření základní informací o účinnosti izolace složky z matrice vzorku. Zde se zjišťuje výtěžnost přidavkem vhodného množství analytu do vzorku biologického materiálu.

### Postup a výpočet výtěžnosti

Nejjednodušším postupem je změření (certifikovaného) referenčního materiálu nebo kontrolního materiálu validovaného v programu EHK. Doporučuje se 10 měření za podmínek opakovatelnosti a dva referenční (kontrolní) materiály na dvou různých, klinicky významných hladinách. Popis postupu a vyhodnocení hodnoty výtěžnosti R byl popsán výše v odstavci o vychýlení (bias) měření.

Pokud není při validaci k dispozici komutabilní certifikovaný referenční materiál (což je zcela běžný případ), hraje jeho roli přidavek analytu do nativního materiálu pacientů. Pokud je cílem experimentu vyhodnocení analytické selektivity měření a stupně interference, pak použijeme metody přidavku hodnoceného interferentu.

### Počet vzorků pacientů

Ve většině případů se vystačí s několika (cca 5) vzorky.

### Přídavek analytu

Doporučuje se přídavek nematricového referenčního materiálu, obvykle jeho vodného roztoku, a to přidáním jeho malého objemu přímo do vzorků biologických materiálů (např. patientských vzorků).

Hodnoty ve vzorcích pacientů a hodnoty přidaného analytu nutno volit tak, aby výsledná hodnota v měřených vzorcích byla:

- uvnitř intervalu linearity/pracovního rozsahu,
- podle možnosti v oblasti klinických rozhodovacích mezí.

### Příprava vzorků k měření výtěžnosti

Ke každému vzorku pacienta vybranému k experimentu připravíme dílčí vzorek s přidavkem (vzorek A: 9 dílů původního vzorku + 1 díl přidavku) a dílčí vzorek s ředěním (vzorek B: 9 dílů původního vzorku + 1 díl fyziologického roztoku nebo nulového kalibrátoru). Vzorky A, B měříme v duplikátech.

### Výpočet

- Stanovíme koncentrace přidavku do patientského vzorku podle vztahu:

$$K = (\text{koncentrace přidavku} \cdot \text{objem přidavku}) / (\text{objem přidavku} + \text{objem vzorku})$$

- Vypočteme průměry duplikátů měření vzorků A a B.
- Vypočteme rozdíly mezi A a B a stanovíme průměr jejich duplikátů D.
- Vypočte se výtěžnost jako poměr D/K.
- Vyjádříme výtěžnost v procentech:

$$R = 100 \cdot D/K \quad [\%]$$

### Dokumentace

Číselné hodnoty výtěžnosti.

### Interference a analytická selektivita

Cíl: Plné prokázání analytické selektivity je obvykle mimo možnosti běžné klinické laboratoře, a proto se v dalším textu omezujeme pouze na problematiku matricových interferencí.

### Přídavek interferentu

Provádí se podle zásad uvedených při stanovení výtěžnosti. Namísto analytu se přidává interferent. Základními testovanými interferenty jsou:

- Hemoglobin (přidaný jako standardní roztok hemoglobinu nebo hemolyzát erytrocytů).
- Bilirubin (přidaný ve formě standardního roztoku).
- Triacylglyceroly (přidané jako komerčně dostupné lipidové suspenze).

### Objem vzorku přidaného analytu – interferentu

Musí být co nejmenší, aby nedošlo k významnému naředění matrice vzorků pacientů (lze doporučit smíchání 9 dílů vzorku pacienta s jedním dílem vzorku přidaného analytu). Základní roztok přidaného analytu musí být patřičně koncentrovaný (v uvedeném přípa-

dě desetinasobek přídatku) a musí být zaručena velmi vysoká přesnost měření objemů. K vážení substancí a k měření objemu musí být použito vah a objemových měřidel návazných na referenci.

#### Dokumentace

Graf závislosti teoretických hodnot koncentrací na hodnotách naměřených. Výskyt interferencí lze dobře detekovat porušením linearitu vztahu, tj. změnou směrnice grafu, která indikuje přítomnost proporcionální systematické chyby způsobené interferentem.

#### Validace programů kontroly kvality měření

Podle normy ISO 15198 [4] je výrobce IVD-MD povinen poskytnout uživateli výrobku (analytického měřicího systému) tato data potřebná k realizaci kontroly kvality:

- Specifikaci typu chyb, které je schopen program kontroly kvality vůbec detekovat.
- Explicitní doporučení, které kontrolní materiály by měly být použity.
- Doporučení, jaké koncentrace analytů by měly být používány.
- Doporučené hodnoty kontrolních limitů.
- Specifikovat omezení procesu kontroly kvality.

Kontrolu kvality je nezbytné považovat za pokračování procesu validace/verifikace. Výsledky experimentů validace/verifikace, zejména přesnost, bias měření a kritéria vhodnosti k zamýšlenému použití (kontrolní limity) jsou data, na kterých je program kontroly kvality založen.

V normě ISO 15198 [4] se pojednává pouze o validaci programů vnitřní kontroly kvality.

Direktivy IVD 98/79 EC se nevztahují na kontrolní materiály používané v programech externího hodnocení kvality.

#### Shrnutí zásad validace a verifikace

- Určete a dokumentujte validační parametry a analytické znaky (údaje výrobců o analytických znacích metody/měřicího systému).
- Stanovte a dokumentujte příslušná kritéria (hodnoty analytických znaků specifikujících požadavky na to, aby měřicí systém vyhovoval zamýšlenému použití).
- Naplánujte validační/verifikační experimenty.
- Před započítáním experimentů proveďte dostatečné seznámení s přístrojem a metodou, podrobnou instrukcí personálu, prověření přístrojové a výpočetní techniky včetně statistických programů.
- Proveďte experimenty.
- V případě potřeby přehodnoťte kritéria a opakujte experimenty.
- Shrňte a vyhodnoťte výsledky formou validační zprávy.
- Navrhněte způsob řízení kvality.
- Vypracujte příslušné SOP.
- Určete kritéria a vypracujte plán revalidace.

#### Další doporučené zdroje informací

Odborné materiály organizace Clinical Laboratory Standard Institute (USA):  
<http://www.clsi.org>

C28-A3	Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline - Third Edition, 2010
C54-A	Verification of Comparability of Patient Results Within One Health Care System; Approved Guideline, 2010
EP05-A2	Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline-Second Edition, 2004
EP06-A	Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline, 2003
EP07-A2	Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline- Second Edition, 2005
EP09-A2-IR	Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline - Second Edition (Interim Revision), 2010
EP10-A3	Preliminary Evaluation of Quantitative Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline - Third Edition, 2006
EP12-A2	User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline - Second Edition, 2008
EP14-A2	Evaluation of Matrix Effects; Approved Guideline-Second Edition, 2005
EP15-A2	User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline - Second Edition, 2006
EP17-A	Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline, 2004
EP21-A	Estimation of Total Analytical Error for Clinical Laboratory Methods; Approved Guideline, 2003
EP25-A	Evaluation of Stability of In Vitro Diagnostic Reagents; Approved Guideline, 2009

#### Literatura

1. *ISO/TR 18112:2006*. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems. In vitro diagnostic medical devices for professional use. Summary of regulatory requirements for information supplied by the manufacturer.
2. *ČSN EN ISO 15 189:2007*. Zdravotnické laboratoře – Zvláštní požadavky na kvalitu a způsobilost.
3. Vhodnost analytických metod pro daný účel. Laboratorní příručka pro validaci metod a související činnosti. Překlad anglického originálu *The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. Kvalimetrie 9. M. Suchánek (Ed.), EURACHEM-ČR, Praha, 1999.
4. *ISO 15198:2004*. Clinical laboratory medicine – In vitro diagnostic medical devices – Validation of user quality control procedures by the manufacturer.
5. *TNI 01 0115:2009*. Mezinárodní metrologický slovník. Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny (VIM).
6. *ČSN EN ISO 9000:2006*. Systémy managementu kvality. Základy, zásady, slovník.
7. *ČSN EN 13612:2002*. Hodnocení funkce zdravotnických prostředků pro diagnostiku in vitro.



8. *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. FDA 2001. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>
9. IUPAC Technical Report Harmonized Guidelines for Single-laboratory Validation of Methods of Analysis. *Pure Appl. Chem.*, 2002, 74, p. 835–855.
10. **Westgard, J. O. et al.** *Basic Method Validation. Third Edition*. Westgard QC: Madison, 2008. ISBN: 1-886958-25-4.
11. ČSN EN ISO 13485:2003. Zdravotnické prostředky – Systémy managementu jakosti– Požadavky pro účely předpisů.
12. IUPAC. Harmonised guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. *Pure and Appl. Chem.*, 1999, 71, p. 337–348. <http://www.eurachem.org/guides/pdf/recovery.pdf>
13. ČSN EN ISO 17511:2004. Diagnostické zdravotnické prostředky in vitro – Měření veličin v biologických vzorcích – Metrologická návaznost hodnot přiřazených kalibrátorům a kontrolním materiálům.
14. ČSN EN ISO 18153:2004. Diagnostické zdravotnické prostředky in vitro – Měření veličin v biologických vzorcích – Metrologická návaznost hodnot katalytické koncentrace enzymů přiřazených kalibrátorům a kontrolní materiálům.
15. ČSN EN 375:2010. Informace předávané výrobcem s diagnostickými činidly in vitro pro odborné použití.
16. **Funk, W., Dammann, V., Donnewert, G.** *Qualitätsicherung in der Analytischen Chemie*. Wiley-Interscience 2005.
17. **Chung, Chow Chan, Lam, H., Lee, Y. C., Xue-Ming, Zhang** *Analytical method validation and instrument performance verification*. Wiley-Interscience 2004.

Autorský kolektiv:  
Bedřich Friedecký,  
Luděk Šprongl,  
Josef Kratochvíla  
a Zbyněk Plzák

*Schváleno 11. 1. 2011.*