

## **Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP**

### **Doporučený postup pro verifikaci metod v odbornosti 818**

**Zpracoval:** M. Mikešová, Z. Tokár, S. Vytisková

**Recenzent:** -

**Schváleno Laboratorní sekcí ČHS ČLS JEP:** 16.9.2024

**Schváleno výborem ČHS ČLS JEP:** 26.11.2024

**Verze:** 1

**Platnost od:** 1.1.2025

**Přechodné období (platí i nahrazovaný dokument) do:** 31.3.2025

## Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

### Obsah

1. ÚVOD.....	2
2. DEFINICE VERIFIKACE.....	3
3. OBECNÉ PRINCIPY, FREKVENCE.....	3
3.1 Verifikace kvantitativních metod.....	3
3.1.1 Stanovení opakovatelnosti.....	3
3.1.3 Bias metody (vychýlení, míra pravdivosti) metody.....	5
3.1.4 Odhad nejistoty.....	6
3.1.5 Pracovní rozsah.....	6
3.1.6 Kontrola údajů o referenčních intervalech.....	6
3.1.7 Porovnání nové metody s původní.....	6
3.2 Verifikace semikvantitativních/kvalitativních a morfologických metod.....	6
3.2.1 Ověření pracovního postupu.....	7
3.2.2 Ověření shody odečítání u semikvantitativních/kvalitativních metod.....	7
4. FREKVENCE VERIFIKACE:.....	7
5. ŘEŠENÍ VÝJIMEČNÝCH SITUACÍ.....	7
6. DOKUMENTACE.....	8
7. POUŽITÉ ZKRATKY A POJMY.....	8
8. LITERATURA.....	8

### 1. Úvod

Cílem tohoto doporučení je laboratorním pracovníkům poskytnout praktický návod pro verifikaci metod odbornosti 818. Verifikace metod sdílených od jiných společností se řídí doporučením vydaným mateřskou společností.

Návod by měl zajistit nutné minimum činností a racionální přístup k verifikaci hematologických metod a neměl by zvyšovat náklady laboratoří. Je v souladu s platnou legislativou, která klade velký důraz na kvalitu laboratorních vyšetření. Toto doporučení se týká jak testů s CE-IVD, tak i verifikace testů vyvinutých přímo v laboratoři (tzv. in-house metody, či LDT laboratory developed tests dále testy s IH-IVD), které už byly danou laboratoří validovány.

Preference používání testů s CE-IVD (jsou-li dostupné) vychází z nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2017/746 ze dne 5. dubna 2017 o diagnostických zdravotnických prostředcích in vitro, které bylo přijato v roce 2017 a je platné od 26. 5. 2022.

Toto doporučení nepojednává o validaci metod.

#### Doporučený postup pro validaci a verifikaci metod v odbornosti 818

## 2. Definice verifikace

Verifikace (ověření) je poskytnutí objektivního důkazu, že daná položka splňuje specifikované požadavky (ČSN EN ISO 15189 v aktuální verzi).

Cílem verifikace je objektivní experimentální průkaz, že je laboratoř schopná dosáhnout výkonnostních parametrů (nejčastěji základních analytických charakteristik metod) již validované metody, a tím prokázat způsobilost personálu laboratoře, zařízení a prostředí k provádění daného měřicího postupu. Výkonnostní parametry u prostředků s CE-IVD uvádí výrobce ve své dokumentaci; u LDT je má laboratoř k dispozici z vlastní validace.

Ověřované charakteristiky metody jsou shrnuty do verifikačního protokolu.

**Verifikace metody je vždy vázaná na měřicí systém, proceduru, veličinu, výrobek.**

Definice jednotlivých charakteristik viz <https://www.sekk.cz/terminologie/index.php>

## 3. Obecné principy, frekvence

### 3.1 Verifikace kvantitativních metod

Kontrolované parametry metody by měly umožnit odhad hodnoty nejistoty měření, která je konečným výstupem verifikace viz [https://www.sekk.cz/eqa/2021\\_nejistoty\\_doporuceni.pdf](https://www.sekk.cz/eqa/2021_nejistoty_doporuceni.pdf)

Verifikace stejně tak jako validace se provádí s ohledem na klinicky významné rozhodovací hladiny.

Verifikační protokol kvantitativních metod by měl minimálně obsahovat:

- Preciznost (opakovatelnost, mezilehlá preciznost).
- Bias (vychýlení, míra pravdivosti) (*pokud lze stanovit*) - *minimálně při zavádění metody by mělo být ověřeno, zda je bias signifikantní*
- Odhad nejistoty

Laboratoř může dle specifikace výrobce či vlastní potřeby verifikovat i další analytické charakteristiky metody.

V případě nové metody je nutné doplnit:

- Pracovní rozsah (*měřicí rozsah metody z příbalového letáku, či ověřený pracovní rozsah z validace LDT metody*).
- Porovnání nové metody s původní
- Kontrola údajů o referenčních intervalech

Verifikace je prováděná pouze u přímo měřených parametrů, výpočtové parametry se neverifikují.

#### 3.1.1 Stanovení opakovatelnosti

## Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

<b>Specifikace a počet použitých vzorků</b>	<p>Počet vzorků, resp. hladin materiálu pro měření opakovatelnosti volit dle dokumentace dodané výrobcem, popřípadě vycházet z údajů validační studie.</p> <p>Pozn: Pokud výrobce uvádí jednu hodnotu CV pro celý měřicí interval, postačí nám ověření opakovatelnosti na jedné hladině. Pokud je v dokumentaci uvedená rozdílná hodnota CV pro různé hladiny, je potřeba provést ověření pro další hladiny.</p>
<b>Doporučený postup</b>	<p>Minimální počet replikací testování vzorku během jedné analýzy v podmínkách opakovatelnosti je u rutinních metod 10, u speciálních 5.</p> <p>Pro každý vzorek z naměřených dat vypočítat základní statistické parametry:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>X_{lab}</math></li> <li>• SD</li> <li>• CV</li> </ul> <p>Výsledky by měly odpovídat údajům stanoveným při validaci metody (od výrobce, vlastní).</p>
<b>Poznámka</b>	<p>Opakovatelnost lze stanovit i na vyšetřených vzorcích pacientů (výběr hladiny viz výše). Pokud je pro stanovení opakovatelnosti vybrán vhodný referenční materiál se známými hodnotami typu RMP či AV (popř. kontrolní vzorek s ověřenou koncentrací analytu), lze současně se stanovením opakovatelnosti určit i bias.</p>

### 3.1.2 Stanovení mezilehlé preciznosti

<b>Specifikace a počet použitých vzorků</b>	<p>Minimálně 2 vzorky jsou-li dostupné (kontrolní nebo patientské) o 2 různých hodnotách (jeden v oblasti referenčního intervalu, popřípadě rozhodovací cut-off hodnoty, druhý v oblasti patologických hodnot).</p> <p><i>Pozn.: přímo měřené parametry KO je vhodné vyhodnotit na 3 hladinách</i></p>
<b>Doporučený postup</b>	<p>Pro rutinní metody se doporučuje vyhodnotit alespoň 20 měření v různých sériích v rozsahu minimálně 10 dnů.</p> <p>Pro speciální metody se doporučuje vyhodnotit 10 měření v různých sériích v rozsahu minimálně 5 dnů.</p>

#### Doporučený postup pro validaci a verifikaci metod v odbornosti 818

## Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

	<p>Pro každý vzorek vypočítat základní statistické parametry:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• <math>X_{lab}</math></li><li>• SD</li><li>• CV po vyloučení odlehlých hodnot.</li></ul> <p>Vzhledem k nízké stabilitě patientských vzorků lze s výhodou využít analýzu kontrolních materiálů v rámci IKK.</p> <p>Výsledky by měly odpovídat údajům stanoveným při validaci metody (od výrobce, vlastní).</p>
--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### 3.1.3 Bias metody (vychýlení, míra pravdivosti) metody

<b>Specifikace a počet použitých vzorků</b>	Referenční nebo kontrolní materiály s ověřenou hodnotou složky, pokud existují. Ideální jsou matricové referenční materiály s vysokým stupněm komutability, které disponují cílovými hodnotami analytů a parametrů získanými referenčními postupy měření.
<b>Doporučený postup</b>	<p>U rutinních metod se doporučuje změřit minimálně 10 (u speciálních minimálně 5) replikátů vzorku za podmínek opakovatelnosti, vypočítat <math>X_{lab}-X_{ref}</math> a bias</p> <p>Kritérium pro rozhodnutí o tom, zda je bias signifikantní viz <a href="https://www.sekk.cz/">https://www.sekk.cz/</a> - menu Infoservis – článek <i>Doporučení k vyjadřování nejistot kvantitativních výsledků měření ve zdravotnických laboratořích - kap. 14.</i></p> <p>SD a CV z těchto měření lze použít zároveň pro vyhodnocení opakovatelnosti.</p>
<b>Poznámka</b>	<p>Je-li problém s referenčním materiálem, lze použít materiál z EHK, nebo akceptovat použití kontrol z IKK, pokud pro ně existují „referenční“ údaje (deklarovaná hodnota a/nebo výsledky komerčně poskytovaného mezilaboratorního porovnávání). Jako referenční materiál je považován i materiál, který má hodnoty verifikovaného parametru stanovené referenční metodou.</p> <p>Není-li bias při vstupní verifikaci signifikantní a metoda nevykazuje žádné známky zhoršených výkonnostních charakteristik, není při opakovaných verifikacích vyžadován.</p>

#### Doporučený postup pro validaci a verifikaci metod v odbornosti 818

## Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

### 3.1.4 Odhad nejistoty

<https://www.sekk.cz/> - menu Infoservis – článek:

*Doporučení k vyjadřování nejistot kvantitativních výsledků měření ve zdravotnických laboratořích Verze 2, datum vydání: 10.3.2021*

### 3.1.5 Pracovní rozsah

Spočívá v prostudování dokumentace o validaci metody a přezkoumání, zda je měřicí rozsah použitelný i v podmínkách dané laboratoře a vyhovuje požadavkům kliniků. Provádí se pouze při vstupní verifikaci metody.

### 3.1.6 Kontrola údajů o referenčních intervalech

Zahrnuje kontrolu shody údajů o referenčních intervalech a rozhodovacích limitech uváděných ve validačních dokumentech, interní dokumentaci, v informacích poskytovaných klientům laboratoře. Může obsahovat i porovnání s údaji literárními nebo doporučenými odbornými společnostmi. Součástí kontroly je i vyjádření ke konzistenci používaných jednotek měření se soustavou SI jednotek.

Pokud výrobce referenční intervaly doporučuje ověřit a pro danou metodu/ technologii/ pracovní postup nejsou k dispozici jiné zdroje, doporučuje se provedení **experimentálního ověření referenčních intervalů s použitím 20 vzorků** od zdravých probandů (z hlediska testovaného vyšetření) případně ověřených předcházející, resp. nemodifikovanou metodou, není-li v doporučení nebo v pokynech výrobce pro dané vyšetření uvedeno jinak. 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

### 3.1.7 Porovnání nové metody s původní

Pokud je v laboratoři verifikována nová metoda (je-li to možné), provede se porovnání výsledků stávající a nové metody na vzorcích pacientů.

U rutinních metod se doporučuje výběr minimálně 20 vzorků, při výběru je nutné zohlednit celý měřicí rozsah metody. Vyhodnocení se provádí vhodnou statistickou metodou (např. regresní analýzou Passing-Bablok, párový t-test, rozdílový graf). U finančně náročných nerutinních metod je možné počet vzorků zredukovat tak, aby vyhodnocení porovnatelnosti bylo statisticky vyhodnotitelné.

*Podrobný návod viz článek Klin. Biochem. Metab., 30 (51), 2022, No. 2, p. 37–47 Srovnatelnost výsledků vyšetření – možné postupy Ambrožová J.*

## 3.2 Verifikace semikvantitativních/kvalitativních a morfologických metod

V hematologické laboratoři existuje řada metod, které je nutné verifikovat specifickým způsobem, některé nelze verifikovat vůbec. U těchto metod je nutné se zaměřit na provedení

**Doporučený postup pro validaci a verifikaci metod v odbornosti 818**

## Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

pracovního postupu stanoveným výrobcem nebo při validaci, a na vlastní výpočet/hodnocení.

### 3.2.1 Ověření pracovního postupu

Pracovní postup kvalitativní metody se považuje za verifikovaný v případě, že se striktně dodržuje pracovní postup ověřený validací (od výrobce či vlastní), který vychází z mezinárodních doporučení, a laboratoř má nastavenou interní kontrolu kvality v souladu s doporučeními ČHS JEP.

### 3.2.2 Ověření shody odečítání u semikvantitativních/kvalitativních metod

Ověřuje se shoda výpočtu/hodnocení všech pracovníků, kteří dané vyšetření vyhodnocují. Doporučuje se použít vzorky zaslané v rámci EHK, nebo jiné vhodně zvolené vzorky v rámci mezilaboratorního porovnání. Posuzuje se shoda mezi hodnocením jednotlivých pracovníků. Při vyhodnocování shody se posuzuje odchylka, která způsobí klinicky významnou změnu výsledků.

U morfologických metod se doporučuje ověřování pracovníků provádějících vyšetření minimálně 1× ročně (frekvence si nastaví laboratoř sama dle počtu vyšetření za rok).

U ostatních metod se postupuje dle pokynů výrobce (či údajů ve validačním protokolu, či údajů v příbalovém letáku).

## 4. Frekvence verifikace:

- Před zahájením rutinního používání nové, ale již validované metody.
- Před zahájením rutinního používání nového měřicího systému (analyzátoru).
- Jsou-li odborným garantem zaznamenány problémy v IKK.
- Jsou-li zaznamenány problémy při vyhodnocení EHK (bez odhalení příčiny), případně pokud laboratoř v EHK neuspěje 2× po sobě.
- Podle plánu verifikací dané laboratoře. Plán verifikací je sestaven s ohledem na nastavený systém kontroly kvality, na druhu metody a na měřicí systém.

V případě, že laboratoř nevykazuje problémy při hodnocení IKK, EHK a nedošlo k výměně měřicího systému, principu, změnách kitu/reagencií, které mají vliv na výsledky metody (na základě upozornění výrobce), tak si laboratoř může u kvantitativních metod vystačit pouze s úvodní verifikací (u LDT metod validací).

Laboratoř musí 1× ročně posoudit a uvést (např. do zprávy o přezkoumání) nutnost opakované verifikace a navrhnout plán verifikací.

## 5. Řešení výjimečných situací

V praxi se můžeme setkat s nestandardními situacemi, kdy dojde například z důvodu náhlé poruchy analyzátoru k jeho výměně, případně může dojít k výpadku dodávek reagentů, diagnostických kitů apod. V těchto případech, kdy není možné vyčkávat s uvolněním do

**Doporučený postup pro validaci a verifikaci metod v odbornosti 818**

## Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

rutinního provozu, než se provede verifikace metody v plném rozsahu, laboratoři postačuje interní kontrola kvality nastavená dle doporučení ČHS JEP, popřípadě výrobcem; je-li dostupný validovaný kontrolní materiál z EHK doložit výsledky analýzy, a ověření opakovatelnosti. Verifikaci v plném rozsahu je laboratoř povinná provést v co nejkratším možném termínu.

## 6. Dokumentace

Veškeré procesy související s verifikací je nutné dokumentovat.

Pro všechny metody používané v laboratoři by měl být dostupný:

- dokument popisující provádění **postup provádění verifikací**
- **plán verifikací**, který je sestaven na každý rok, přičemž každá metoda používaná v laboratoři musí být vstupně verifikována
- **zpráva o verifikaci**, která musí být zkontrolována a schválena pracovníkem na odpovídající odborné úrovni. Výsledky a zprávu je třeba uchovávat minimálně po dobu používání daného postupu laboratorního vyšetření. Verifikační protokol musí obsahovat jednoznačnou identifikaci metody a analyzátoru, ke kterému se protokol vztahuje.
- **primární data** získaných výsledků, které je nutné doložit ke zprávě o verifikaci.
- **zdroj kritérií pro schválení verifikace**, na základě, kterých byly získané výsledky vyhodnoceny

## 7. Použité zkratky a pojmy

IVDR	In Vitro Diagnostic Regulation, In Vitro Diagnostic Regulation, nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2017/746
LDT	Laboratory development tests, testy vyvinuté v laboratoři, in-house metody
IKK	Interní kontrola kvality
EHK	Externí hodnocení kvality
SD	Standard deviation, směrodatná (standardní) odchylka
CV	Coefficient of variation, variační koeficient
$X_{lab}$	Průměr hodnot stanovených v laboratoři
RMP	Reference Measurement Procedure. Referenční hodnota měření obsahu (množství) analytu či parametru stanovená referenční metodou (dříve RMV).
AV	Assigned Value (vztažná hodnota)

## 8. Literatura

1. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2017/746
2. ČSN EN ISO/IEC 17043: Posuzování shody – Všeobecné požadavky na zkoušení způsobilosti
3. ČSN EN ISO/IEC 15189: Zdravotnické laboratoře – Požadavky na kvalitu a způsobilost

**Doporučený postup pro validaci a verifikaci metod v odbornosti 818**



## Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

4. Doporučení LS ČHS ČLS JEP: Vnitřní kontrola kvality měření krevních obrazů s diferenciálním počtem leukocytů a retikulocytů na hematologických analyzátoch
5. Doporučení LS ČHS ČLS JEP: Doporučení pro vnitřní kontrolu kvality koagulačních vyšetření
6. Doporučení LS ČHS ČLS JEP: Preanalytika v hematologické laboratoři
7. Postup pro validaci a verifikaci NASKL <http://www.naskl.cz/mezioborove-prispevky/> (20.3.2010 + příloha 23.4.2018)
8. Klin. Biochem. Metab., 22 (43), 2014, No. 3, p. 153–154: Doporučení: Systém externího hodnocení kvality (EHK)
9. Doporučení ČSKB: Doporučení k vyjadřování nejistot kvantitativních výsledků měření ve zdravotnických laboratořích (2021)
10. Klin. Biochem. Metab., 30 (51), 2022, No. 2, p. 37–47 Srovnatelnost výsledků vyšetření – možné postupy Ambrožová J.

**Doporučený postup pro validaci a verifikaci metod v odbornosti 818**