

Evaluační protokoly CLSI a hodnocení analytických metod prováděných výrobky IVD

B. Friedecký

Co je CLSI

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (dříve NCCLS) s volně přístupnými elektronickými stránkami <http://www.nccls.org> produkuje velké množství standardů a doporučení pro hodnocení analytické a interpretační činnosti klinických laboratoří. Jeho činnost je respektována v celém světě. Slouží jako poradní centrum Světové zdravotnické organizace (WHO) pro klinické laboratoře a akreditaci. Spolupracuje s CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendment) a FDA (Food and Drug Administration). *CLIA je orgán pro kontrolu kvality a posuzování kompetence laboratoří, FDA je orgán, schvalující uvolňování farmak, potravin, diagnostik a dalších na trh.* Toto sdělení se zabývá pouze malou částí produkce CLSI a to evaluačními protokoly - EP.

Edukační prezentace CLSI hodnocení analytických metod

Na webových stránkách CLSI je možné vyhledat několik edukačních prezentací o postupech při hodnocení analytických metod v klinických laboratořích s použitím EP. Tématy prezentací jsou:

- Dokumenty CLSI a systém managementu kvality
- FDA a evaluační protokoly (EP) CLSI
- Evropská směrnice IVD 98/79 a evaluační protokoly (EP) CLSI
- Evaluační protokoly (EP) CLSI v in vitro diagnostice
- CLIA a evaluační protokoly (EP) v kontrole analytické kvality
- Použití evaluačních protokolů (EP) CLIA k validaci postupů v klinické laboratoři

Obecné závěry, plynoucí z edukačních dokumentů o hodnocení metod

- Verifikace údajů výrobců v každé laboratoři je nezbytná
- Data verifikace pocházejí z pracovní dokumentace výrobců, z periodicky prováděných laboratorních experimentů, z výsledků kontroly kvality

- Verifikační data jsou důležitým nástrojem tvorby a aktualizace standardních operačních postupů
- Verifikace má být prováděna podle přijatých obecných doporučení a kvalifikovaně
- Verifikace představuje prospěch laboratoří i výrobců
- Cílem verifikace v laboratoři je zajistit plnění požadavků na úroveň analytických metod a na způsobilost pracovníků laboratoří
- Hodnocení a verifikace mají být úzce provázány s vnitřní kontrolou kvality a jejím externím hodnocením
- Procesy kontroly kvality, validace/verifikace a akreditace nelze uvažovat odděleně, ale komplexně

EP – evaluační protokoly CLSI a použití při verifikaci výrobků IVD v laboratořích

Výrobci IVD své produkty validují a hodnoty validovaných parametrů povinně poskytují uživatelům.

IVD (a FDA schválené) metody vyžadují podstatně menší rozsah validace v laboratoři, než metody ostatní. Tato zjednodušená validace IVD metod se považuje za verifikaci.

Podstatou verifikace je srovnání hodnot analytických parametrů, zjištěných v laboratoři, s parametry udanými výrobcem. Metoda má být akceptována laboratoři až po průkazu, že v laboratoři stanovené hodnoty analytických parametrů nejsou statisticky významně horší, než udané výrobcem.

Zákonné předpisy CLIA o kontrole kvality a způsobilosti laboratoří a jejich personálu explicitně vyžadují **verifikaci** validovaných přípravků IVD.

Na rozdíl od našich neujasněných poměrů definuje CLIA parametry a rozsah požadované verifikace jasně. EP CLSI jsou jejími metodickými nástroji.

Parametry verifikace CLIA

- přesnost
- bias
- měřící (pracovní) rozsah
- interference
- mez detekce/stanovitelnosti
- **referenční intervaly**

Verifikace přesnosti IVD metod

Experiment trvá minimálně 5 pracovních dní. Použijí se aspoň dva různé materiály doporučené výrobcem IVD. Analyzují se třikrát denně. Statisticky se vyhodnotí opakovatelnost (přesnost v sérii) a mezilehlá přesnost (přesnost mezi sériemi). **Hod-**

noty SD a CV(%) musí být nižší, než udává výrobce. Pokud jsou vyšší, musí být rozdíly statisticky nevýznamné. Standardem je EP 15.

Výrobce IVD nebo laboratoř, používající jiné než IVD metody stanovuje přesnost (opakovatelnost a mezilehlou přesnost) po dobu 20 dní a každé měření provede v duplikátu. Hodnoty stanovené přesnosti má výrobce porovnat s klinickými požadavky. Zde se postupuje podle protokolu EP 5.

Verifikace bias srovnáním dvou metod

Použije se dvacet vzorků pacientů s koncentracemi přes celý měřicí rozsah. Vzorky se měří v singletu dvěma metodami-verifikovanou a srovnávací. Metody jsou totožné s těmi, které ve své srovnávací studii použil výrobce IVD. Sestrojí se grafická závislost hodnot bias pro použité vzorky. Na ose x jsou výsledky srovnávací metody, na ose y difference mezi verifikovanou a srovnávací metodou (ideální je použití Blandova-Altmanova diferenčního diagramu). **Porovná se výsledek s údajem výrobce.** Bias je považován za verifikovaný, pokud není výsledek experimentu statisticky významně odlišný od údaje výrobce. Provádí se současně s experimentem přesnosti. Standardem je EP 15.

Výrobce IVD nebo laboratoř, používající jiné, než IVD metody analyzuje 40 vzorků v duplikátech. Ke kalkulaci bias použije regresní analýzy. Standardem je EP 9.

Verifikace bias srovnáním dvou metod se volí například při změně generací měřících systémů (reagencií, pracovních kalibrátorů výrobce) nebo při současné změně obou systémů. Pokud je z dokumentace výrobce zřejmé, že je nutné očekávat při změně měřícího postupu jiné výsledky, než u systému starého, nemá smysl provádět srovnávací pokus a je zapotřebí vyhodnotit bias měřením referenčního materiálu.

Verifikace bias měřením referenčního materiálu

Tato alternativa nahrazuje srovnání dvou metod, pokud je k dispozici vhodný referenční materiál. Za vhodný materiál se považuje certifikovaný referenční materiál nebo materiál externího hodnocení kvality nebo referenční materiál, dodaný výrobcem (blíže nespecifikovaný). Je nutné použít aspoň dvou materiálů současně. **Experimentální bias se porovná s hodnotou udanou výrobcem.** Standardem je EP 15.

Nejspolehlivějším dostupným referenčním materiálem jsou materiály externího hodnocení kvality. Tento způsob verifikace bias je patrně nejpoužitelnější v praxi.

Rozsah verifikace mezi detekce a stanovitelnosti- EP 17

CLIA požaduje k verifikaci meze detekce a stanovitelnosti dvacetí měření blanku. Pro validaci IVD a in-house metod je požadováno takových měření šedesát. **Verifikace meze detekce spočívá ve srovnání experimentální hodnoty meze detekce s hodnotou, udanou výrobcem.** Z dvacetí měření mohou výsledky tří přesahovat hodnotu výrobce. Při validaci meze stanovitelnosti má výrobce použít čtyřiceti vzorků s hodnotami nad mez detekce. Laboratoř má mez stanovitelnosti, uvedenou výrobcem verifikovat na 25 vzorcích, z nichž jen tři se mohou lišit od údaje výrobce.

Způsob výpočtu meze stanovitelnosti je v protokolech CLIA poněkud odlišný od způsobu, používaného v Evropě a uvedeného v Doporučení ČSKB o validaci měření. Evropská výrobcí definují mez stanovitelnosti obvykle jako nejnižší koncentraci analytu, umožňující dosažení hodnoty mezilehlé přesnosti $CV \leq 20\%$ (u troponinu $\leq 10\%$). Výrobci by měli poskytovat laboratorním kontrolním materiálům s koncentracemi, blízkými hodnotám mezi stanovitelnosti u těch analytů, kde hrají takové hodnoty významnou roli.

Referenční intervaly

Ustanovení referenčních intervalů je obsahem protokolu CLSI-C 28. K určení referenčního intervalu u výrobku IVD je zapotřebí aspoň 120 referenčních jedinců s definovaným stavem zdraví. V případě rozdělení jedinců do skupin se pak počet násobí počtem takových skupin (například 240 jedinců pro rozdělení na muže a ženy). Protokol C28 je zde shodný s doporučeními IFCC.

Pro verifikaci referenčních intervalů podle protokolu CLSI-C28 postačuje dvacet referenčních jedinců, jejichž materiály jsou měřeny v singletu. Referenční interval výrobce je považován za verifikovaný, pokud 18 ze 20 výsledků leží uvnitř něj.

Závěr

- Výrobci, řídicí se předpisy Směrnice IVD 98/79 ES používají k validaci svých metod běžně evaluačních protokolů CLSI EP a uvádějí tento fakt ve své pracovní dokumentaci
- CLSI poskytuje nyní také evaluační protokoly i pro laboratorní verifikaci (redukovanou validaci) metod IVD
- Metody FDA a non-FDA (schválené a neschválené organizací FDA) jsou podle mého názoru prakticky ekvivalentní metodám IVD CE a metodám, které do této skupiny nepatří (in-house). Nemá žádný rozumný důvod nepoužívat příslušných evaluačních protokolů CLSI v našich laboratořích

- Verifikace již validovaných metod IVD je povinností laboratoří a bylo by vhodné ji striktně vyžadovat nejen při akreditačních procesech, kde je to samozřejmostí (viz ISO 15189)
- Verifikace není v žádném případě předmětem Směrnice IVD. Ta má jiné, dostatečně popsané účely. Je možné se s nimi seznámit studiem NV 453 (přepisu Směrnice IVD do českého jazyka) na webových stránkách organizace CZEDMA.
- V textu Směrnice IVD není ani slovo o tom, že by validační parametry, sdělované výrobcem IVD laboratoří mohly nahradit proces verifikace
- Spory, které se o verifikaci vedly nedávno ve výboru ČSKB jsou mimo kontext současného stavu laboratorní medicíny a jejich presentování je pro mne nepochopitelné
- Toto sdělení se snaží odstranit případný komunikační blok
- Četnost nové periodické verifikace (reverifikace) byla dostatečně uvedena v minulém čísle FONS (FONS 3/2007, s. 22-24).