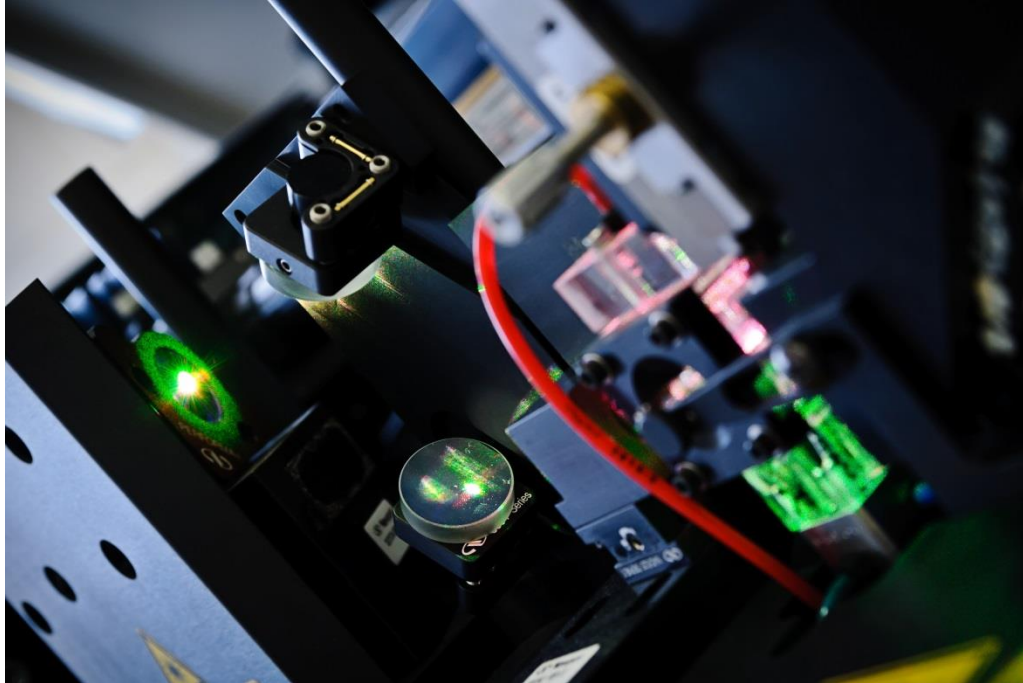


Validace a verifikace v průtokové cytometrii



RNDr. Veronika Kanderová, Ph.D.
CLIP, Klinika dětské hematologie a onkologie
2. LF UK a FN Motol
veronika.kanderova@lfmotol.cuni.cz

Disclaimer

Přednáška zazněla na semináři I.T.A. 2017 a doporučení z ní plynoucí není oficiálním doporučením ČSAC.

Proč provádíme validaci / verifikaci ?

- ISO 15189 - Medical laboratories - Requirements for quality and competence



NASKL

- European Pharmacopoeia (Lékopis)



- **Validace/Verifikace je činnost, kterou si laboratoř zajišťuje kvalitu dat v rutinním provozu ... provádět měření v dostatečné kvalitě je profesionální povinností laboratoře.**

Naše měřicí metody musí být **VALIDOVANÉ**

„Před zavedením nové metody do rutinního laboratorního provozu je třeba nový postup prověřit pomocí objektivních důkazů (dat), validovat.“

„Validace musí být dostatečně rozsáhlá a musí potvrdit, prostřednictvím poskytnutí objektivního důkazu (tzv. výkonnostních charakteristik), že specifické požadavky na zamýšlené použití jsou u daného postupu laboratorního vyšetření splněny“.

1) Použijeme kity validované výrobcem - CE/IVD

CE = certifikovaný ; IVD = In vitro diagnosticum

2) Metodu publikovaná v mezinárodním impaktovaném časopise, kde projde recenzním řízením

3) Vlastní validace tzv. home-made metody

Validace a výkonnostní charakteristiky

„Pro validaci kvantitativních a tzv. semikvantitativních metod doporučuje SLI ČSAKI používat validační kritéria dle doporučení ČSKB“

<http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2011/2011-1/dop-validace.pdf>

Výkonnostní charakteristiky analytického postupu v biochemických laboratořích

OPAKOVATELNOST

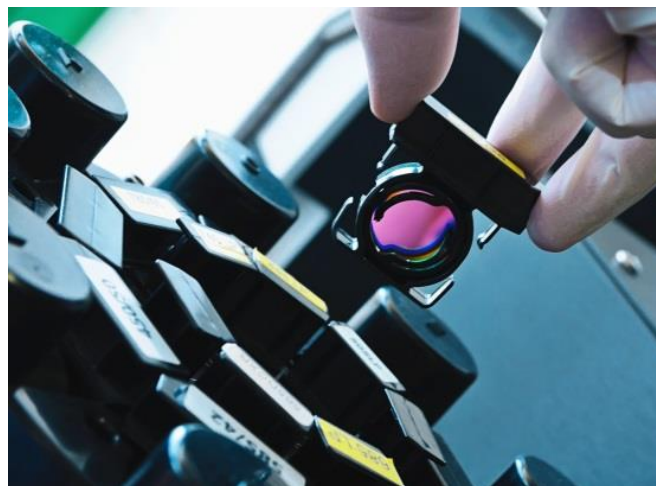
MEZILEHLÁ PRECIZNOST

VYCHÝLENÍ (BIAS)

PRACOVNÍ ROZSAH

MEZ DETEKCE a MEZ STANOVITELNOSTI

OSTATNÍ (matricové interference,
srovnání s jinou metodou
srovnání pomocí výsledků EHK
robustnost, výtěžnost ...)



„ČSAKI nedoporučuje validovat home-made kvalitativní testy“

Mezinárodní doporučení k validaci

Mezinárodní doporučení pro validaci cytometrických testů:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.b.v84.5/issuetoc>

20 normálních a 20 abnormálních vzorků

Analytická specifita ~ specifita reagensí + „gating strategy“

Klinická specifita ~ korelace výsledků s jinými laboratorními daty či klinickým stavem pacienta

Senzitivita (MRN, CD34+, PNH) ~ „replicate assays with dim fluorescence or a low population frequency“

„Imprecision“ ~ reprodukovatelnost, opakovatelnost

Linearita (CD64)

Stabilita (vzorku/reagensí) ~ viabilita (čas, teplota), fixativa, ...

Naše měřicí metody musíme **VERIFIKOVAT**

„Ověření, zda je laboratoř schopna dosáhnout při zavádění již validovaných metod deklarovanou výkonnost metody, tj. že měřicí postup nebo systém je plně funkční v konkrétní laboratoři “

➤ CE IVD kity je také nutné verifikovat

Vstupní verifikace při zavádění nové metody
při změně výrobce diagnostické soupravy
při změně cytometru
při změně místa provádění
pokud rozšíříme nebo pozměníme použití stávající metody
o další účel (například rozšíříme měření o další druh biologického materiálu)

Reprodukovatelnost : 10 - 20 opakování u dvou vzorků

Opakovatelnost : 6 - 10 opakování u jednoho vzorku

Průběžná verifikace

Reprodukovatelnost : 10 - 20 opakování u dvou vzorků; 1x ročně

Opakovatelnost : 6 - 10 opakování u jednoho vzorku; 1x za 3 roky
(opak. pouze pro kvantitativní metody)

Kde hledat pomoc?

Česká doporučení : <http://www.sli-csaki.cz/metodicke-pokyny/>

Mezinárodní doporučení :

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.b.v84.5/issuetoc>

Cytometry Part B: Clinical Cytometry

Special Issue: Validation of Cell-Based Fluorescence Assays:

Practice Guidelines from the **International Council for**

Standardization of Haematology and the **International Clinical**

Cytometry Society

B. Wood, V. Litwin, M. Béné, ...

part I – rationale and aims

part II – preanalytical issues

part III – analytical issues

part IV – postanalytic considerations

part V – assay performance criteria

<http://cytometry.org/public/newsletters/eICCS-5-1/article4.php>

<http://icsh.org/guidelines/>

Kvantitativní testy

- ✓ **měříme hustotu antigenu nebo absolutní počet cílových bb**
- lymfocytární subpopulace
- B a T-lymfocytární subpopulace
- CD34+ progenitory
- exprese CD64 na neutrofilech při infekcích a sepsích

Doporučení:

- Výsledkem je abs hodnota stanovované populace ($bb \cdot 10^9/L$)
- Kvantifikovat pomocí cytometrických kuliček nebo přepočtem podle hodnoty WBC a AbsLymfo získané hem. analyzátozem
- Kalibrační křivka pro expresi CD64 (referenční kuličky)
- Hodnoty vydávat i jako normální/vyšší/nížší než referenční mez
 - Jak dobře stanovit referenční (věkové) meze? Kde je najít?*
 - „120 individuals (60 females, 60 males)“*
- Pro verifikaci testovat „intra-assay and inter-assay imprecision“
 - Preciznost - výsledky opakovaných měření nesmí být výrazně rozdílné
 - Míru preciznosti vyjadřuje SD a CV
 - Opakovatelnost a reprodukovatelnost měření
- Accuracy cannot be established for cell-based assays !!!

Semi-kvantitativní testy

- ✓ % zastoupení hledané populace v gejtované oblasti
- ✓ stanovení referenčního rozmezí není možné
- ✓ rozhodovací hodnota „cut off“
- minimální reziduální nemoc
- PNH klony

Doporučení:

- Nahrát dostatečný počet eventů k dosažení potřebné senzitivity
Např. 25 eventů v populaci při celkovém počtu nahraných eventů 250 000 = senzitivita 0,01%
- Dobře charakterizovat sledovanou populaci
Např. CD45dimCD19+CD10++CD20-CD34++ při MRD.
- Pro verifikaci testovat „intra-assay and inter-assay imprecision“
 - Preciznost - výsledky opakovaných měření nesmí být výrazně rozdílné
 - Míru preciznosti vyjadřuje SD a CV
 - Opakovatelnost a reprodukovatelnost měření
- Accuracy cannot be established for cell-based assays !!!

Kvalitativní testy

- ✓ **multiparametrická analýza atypických buněk na pozadí zdravých buněk**
- imunofenotypizace leukemií, lymfomů, myelodysplázií, myelomů

Doporučení:

- interpretace kvalifikovaným pracovníkem
- porovnání s morfologií
- vyšetřované znaky a panely protilátek doporučené v European / Bethesda guidelines
- výsledkem % zastoupení atypické populace
- dim / bright pozitivita
- zajistit „consistent and reproducible performance of the reagents“
tj. verifikovat reagencie na vhodném materiálu
 - jak často?*
 - jak rozsáhle?*
 - na jakém materiálu?*

Jak respektujeme „doporučení“ a jak v CLIPu kontrolujeme kvalitu?



Interní kontrola kvality

- Validované a pravidelně kontrolované přístroje (CST, Rainbow beads)
- Validace postupů - mezinárodní publikace
- Verifikace reagensů a postupů
- Monitoring prostředí

Externí kontroly kvality

- SEKK
- UK NEQAS
- Mezilaboratorní porovnání EuroFlow
- Mezilaboratorní porovnání iBFM

Protilátky

Primární verifikace reagensů - kontrola probíhá při prvním měření vzorku danou reagensů. Reagensie jsou monitorovány, včetně šarže, doby expirace, data otevření a data vypotřebování.

Doba expirace

Reagents should be used within the manufacturer's expiration dates. Any manufacturer or LDT validator should have stability data for a minimum of three lots of the assay reagents with **inter-batch CVs anticipated to be < 10%**. **If reagents are used outside of expiration dates, equivalent performance must be documented.** Reagent cocktails and other solutions prepared within the laboratory must be evaluated for stability under the expected storage containers and temperatures.

Titrace - doporučena

Pravidelná kompenzace

Musíme hlásit změnu akreditovaného postupu, pokud vyměníme reagensie?

- pokud **měníme princip metody** nebo máme **kit v názvu SOP** : provedeme verifikaci, pozastavíme akreditaci a výsledky vydáváme jako neakreditované. Posouzení akreditačním orgánem může být mimořádné (vyhotovíme verifikaci a nahlásíme změnu) nebo v rámci dozorové návštěvy.
- pokud **neměníme princip metody** : pouze provedeme verifikaci, akreditační orgán to pak posoudí v rámci dozorové návštěvy

Pokud vyměníme klon x fluorochrom, část panelu protilátek, kit

- neměníme princip
- musíme verifikovat