



## **Validace a verifikace v oboru lékařské mikrobiologie Dokument VV20100504v.1**

***Vypracovala: prim. MUDr.Eliška Bébrová, MUDr. Eva Žampachová, prim.  
MUDr.Blanka Heinigeová.***

***Základní dokument schválený výborem Společnosti pro lékařskou  
mikrobiologii České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně dne  
4.5.2010***

***Veřejně oponováno vyvěšením na webovských stránkách SLM ČLS JEP  
[http://www.splm.cz/dokumenty/PSSLP\\_2.pdf](http://www.splm.cz/dokumenty/PSSLP_2.pdf)***

***Adresáti dokumentu: MUDr.Pavla Křížová, Společnost pro epidemiologii a  
mikrobiologii ČLS JEP, Ing.Petr Zdílna, Český institut pro akreditaci (ČIA),  
Praha, prof. MUDr.Antonín Jabor, CSc. Národní autorizační středisko pro  
klinické laboratoře (NASKL), Praha, prof.MUDr.Vladimír Palička, CSc.,  
Rada pro akreditaci ČLS JEP.***

### **Úvod**

Mikrobiologická vyšetření nejsou standardizovatelná z několika důvodů. Vzorky jsou obvykle nehomogenní a nestabilní, proto zjišťovat opakovatelnost vyšetření je často zavádějící. Nejsou k dispozici nezávislé kontroly, sbírkové kmeny jsou vhodné jen na dílčí kontrolu některých technologií. I když je výsledek některých vyšetření číselně vyjádřen, má charakter semikvantitativního nálezu a za podstatné považujeme slovní hodnocení nálezu. Vzhledem k tomu, že mikrobiologické vyšetření popisuje proces interakce mezi makro a mikroorganizmem, je zásadní částí výsledku jeho interpretace. Proto pro odbornost lékařská mikrobiologie (a související odbornosti) máme nižší požadavky na kontrolu analytické části výsledku a vyšší požadavky na interpretaci výsledku.

### **Základní poznámky k validaci kultivačních metod**

Výběr metod se opírá o

- odbornou literaturu
- národní standardy
- doporučené postupy odborných společností

Charakteristika metod

- většinou neopakovatelné
- variabilně citlivé

- interpretace výsledků vychází z odborné erudice a zkušeností mikrobiologa
- absence biologických referenčních rozmezí
- nejistoty měření jsou biologicky variabilní

### **Kultivace – metodika a provedení**

#### Validace

Validace se provádí odkazem na relevantní literaturu (nikoliv učebnice) nebo odkazem na národní standardy (v přípravě). Literární odkazy jsou součástí SOP.

#### Verifikace

Provádí se 1-2x ročně testováním celého postupu od zpracování biologického vzorku po identifikaci infekčních agens a antibiogram současně se sbírkovým kmenem v těch případech, kdy je sbírkový kmen k dispozici.

*Je veden jmenný seznam sbírkových kmenů s katalogovým číslem, s datem expirace.*

V případech, kdy není dostupný sbírkový kmen, lze za verifikaci postupu považovat úspěšnou účast v EHK nebo výsledky mezilaboratorního porovnání.

Tam, kde lze sledovat opakované vyšetření validních vzorků u téhož pacienta, je nutné monitorovat diskrepantní nálezy v souladu s klinickým stavem, popř. též s aktuální léčbou pacienta. Je nezbytné mít zdokumentovaný postup řešení diskrepantních nálezů a zpracovaná pravidla pro reakci na neshodu.

### **Testování kultivačních a diagnostických půd**

Validace půd s CE značkou se nemusí provádět, stačí dohledatelný aktuální atest dodavatele.

#### Verifikace

Je nutné provést vstupní kontrolu každé šarže, pokud dodavatel neprokáže, že byl výrobek monitorován po celou dobu i během skladování a transportu a pokud není schopen uživatel doložit stabilitu podmínek při skladování, včetně dokladu o převzetí a uložení půd. (Zápis o převzetí dodávky od dodavatele s datem, hodinou, podpisem přebírajícího a zápis s podpisem, datem a hodinou o uložení šarže do monitorovaného chladičového boxu.)

Pokud toto není splněno, musí se kontrolovat každá šarže před uvedením do provozu naočkováním doporučeného příslušného sbírkového kmene na 3 kusy půd.

#### Validace a verifikace půd bez CE značky

#### Validace

musí být doložena relevantní literaturou s přesným zněním receptury složení a přípravy půdy.

#### Verifikace

Musí se kontrolovat každá šarže před uvedením do provozu naočkováním příslušného doporučeného sbírkového kmene nejméně na 3 kusy půd u často používaných a nejméně na 1 kus půdy u sporadicky používaných kultivačních médií.

### **Testování ATB disků**

Kontrola účinnosti antibiotických disků pomocí referenčních kmenů

- u každé nová šarže před uvedení do laboratorního procesu
- nejméně jednou týdně u nejčastěji právě používaných antibiotických disků v laboratorním procesu

*Je veden jmenný seznam sbírkových kmenů s katalogovým číslem, s datem expirace.*

## **Mikroskopické metody**

Validace

Validace se provádí odkazem na relevantní literaturu (nikoliv učebnice) nebo odkazem na národní standardy (v přípravě). Literární odkazy jsou součástí SOP.

Verifikace

Zpracování: 1-2x ročně, podle frekvence výkonu, dvojím nezávislým zpracováním vzorku. Lze použít i EHK nebo mezilaboratorní srovnání.

Odečítání: 2x ročně 3-5 preparátů (podle frekvence vyšetření) odečtou všichni pracovníci, kteří v průběhu roku s danou metodou pracovali. Preparáty vybere vedoucí laboratoře, o výsledku musí být proveden zápis. U sezónních infekcí není obvykle možné dodržet frekvenci 2x ročně, lze zvýšit počet testovaných preparátů.

## **Validace a verifikace metod průkazu protilátek a průkazu antigenu**

### **Východiska**

Metody průkazu protilátek a antigenu nejsou v mikrobiologii standardizované. Žádnou z metod nelze považovat za standard, ke kterému by se měly ostatní metody vztahovat. Neexistují nezávislé standardní vzorky, podle kterých by bylo možné provést validaci nebo verifikaci. Jednotky u takzvané kvantitativních metod mají charakter arbitrárních jednotek a neshodují se mezi soupravami různých firem. Není možné převádět jednotlivé arbitrární jednotky analytu mezi metodami např. pomocí koeficientů. Proto metody validace a verifikace, používané v jiných laboratorních odbornostech, nejsou pro mikrobiologii jednoduše přenosné.

Přesto, že některé metody mají jako výstup číslo (arbitrární jednotky, titr, cut - off index), nejedná se o kvantitativní hodnocení v pravém slova smyslu. Výsledek proto musí být **vždy vyjádřen slovně**, a pokud je to možné musí být dále slovně interpretován. Pomocná číselná hodnota může být rovněž udávána, samotné číslo jako výsledek však nestačí ani v případě, že laboratoř stanovuje pro danou metodu takzvané referenční meze.

### **CE metody**

Metody typu ELISA

Validace

Tyto metody validuje výrobce. Výrobce dodává i relevantní literaturu a má dostupné protokoly. Laboratoř může bez dalšího převzít validaci výrobce. V případě, že laboratoř provede jakoukoliv změnu v metodice předepsané výrobcem, musí provést validaci, jakoby se nejednalo o CE metodu.

Verifikace

Verifikaci není možné provádět nezávislými séry, jelikož nejsou obvykle k dispozici. Stabilita vlastních vyšetřovaných vzorků není zaručena. Použití kontrol z jiné soupravy obvykle není výrobcem doporučeno. Proto má laboratoř omezené možnosti provádění verifikace metod a odborná společnost vyžaduje následující kontroly.

Jako verifikace interassay doporučujeme použít kontroly, které jsou součástí soupravy a které zaručují stabilitu vzorku. Laboratoř musí kontroly předepsané výrobcem použít pro každé provedení. Musí zkontrolovat, zda jsou splněna kritéria pro platnost testu a zapsat to do protokolu o měření. Musí mít zpracovaný postup, jak postupovat v případě neshody. Tyto kontroly lze považovat za hodnocení interassay reprodukovatelnosti.

Kontrola přesnosti (intraassay) se provádí opakovaným vyšetřením pozitivního a negativního vzorku (každý 3x) 1-2x ročně v závislosti na počtu vyšetření nebo na sezónním výskytu infekce.

#### CE metody s hodnocením mikroskopickým

Validace je prováděna výrobcem, laboratoř může validaci výrobce převzít, pokud používá metodu podle pokynů výrobce.

Verifikace odečítání se provádí opakovaným (2x) vyhodnocením minimálně 3 různých vzorků a záznamu o něm 1-2x ročně\*. Vyhodnocení by mělo být pro odečítajícího pracovníka zaslepené, kontrolu provádí vedoucí laboratoře. Na verifikaci by měli participovat všichni pracovníci, kteří odečítání v průběhu roku provádějí.

#### Ostatní metody bez CE značky

##### Validace

Je nutné doložit citací relevantní literatury případně některými standardními postupy (v ČR dříve přílohy Acta Hygienica, zahraniční standardní postupy apod.) validitu zvolené metody. Není možné porovnat s referenční metodou, neboť pro většinu mikrobiologických vyšetření neexistuje referenční metoda. Je možné prokázat validitu metody na srovnání souboru vlastních (případně komerčních) sér, pokud máme k dispozici soubor např. sérokonverzních sér. Je možné prokázat validitu mezilaboratorním porovnáním.

##### Verifikace

Pro interassay verifikaci je nutné používat komerční nebo vlastní kontroly v každém běhu. Intraassay verifikace se provádí 1-2x ročně nebo podle možností, vyšetřením pozitivního a negativního vzorku v duplikátu nebo triplikátu.

#### Speciální část kontroly mikrobiologického vyšetření

Zvláštní zřetel je nutné brát na kontinuitu vyšetření. Tvorba protilátek je proces, který se monitoruje v čase a pro diagnostiku je důležitější vývoj nálezu v čase, než jednotlivé měření. Optimální metodou monitorování protilátkové odpovědi v čase je vyšetření tzv. párových sér, odebraných s rozestupem obvykle 7 až 21 dnů. Je nutné prověřit, zda laboratoř sleduje vývoj nálezu v čase u jednotlivého pacienta, zda jí to jednoduše umožňuje informační systém a jak reaguje na neočekávané nebo netypické nálezy a neshody mezi jednotlivými nálezy vzhledem ke klinické diagnóze. Neshody nebo neobvyklé nálezy musí být komentovány na výsledkovém listu, zjevné závady musí být řešeny a zapsány na výsledkovém listu a v záznamu o neshodách.

Další důležitý faktor je správná interpretace výsledku a to zejména slovní interpretace nálezu, případně další doporučení pro ošetřujícího lékaře.

Mikrobiologické společnosti považují validaci a verifikaci za důležitou, nikoliv však postačující složku kontroly kvality. Za podstatnou část laboratorního výsledku považují slovní hodnocení a komplexní interpretaci nálezu v klinickém kontextu u konkrétního pacienta.

Diagnostika sezónních infekcí, jako je např. chřipka nebo klíšťová encefalitida, se provádí v době, kdy agens necirkuluje pouze okrajově. Proto bez ohledu na počet vyšetření má smysl provádět verifikaci u těchto infekcí pouze v období, kdy se infekce vyskytuje. U některých infekcí lze získat pozitivní sérum pouze v rámci EHK, u některých infekcí nedodávají pozitivní kontroly v rámci ČR ani referenční laboratoře. Proto není možné v rámci validace trvat na vyšetření pozitivních sér.