

## ANALÜÜTIDE ANALÜÜTILISE VALIDEERIMISE JUHEND MEDITSIINILABORITES

### SISUKORD

1. EESMÄRK .....	1
2. MÕISTED .....	1
3. TEGEVUSKIRJELDUS.....	3
3.1 Kliinilise keemia ja hematoloogia uuringud .....	4
3.2 Antigeeni ja antikeha uuringud .....	9
3.3 Nakkustekitajate uuringud nukleiinhapete amplifitseerimise tehnikaga (NAT) .....	11
Lisa1. Kvaliteedi määratlused analüütide valideerimise plaani koostamisel .....	14
Kasutatud kirjandus.....	16

### 1. EESMÄRK

Juhendi eesmärk on analüütide analüütilise valideerimisega seotud toimingute sätestamine meditsiinilaborites, et valideerimise kavandamine, läbiviimine, tulemuste analüüsimine ning hindamine toimuksid nõuetekohaselt ja sarnastest põhimõtetest lähtudes.

Käesolev juhend annab meditsiinilaborile juhiseid CE-IVD ja IVDR märgiseta ning labori poolt CE-IVD ja IVDR märgisega toodete kasutamisel väljaspool tootja lubatud piire valideerimise protseduuriks, selleks et täita standardi EVS-EN ISO 15189:2022 vastavat nõuet.

### 2. MÕISTED

**Analüüt** on laborianalüüsiks võetud eeldatav olev aine (komponent), mille sisaldust määratakse.

**Analüütiline spetsiifilisus** on analüütilise meetodi võime määrata sihtanalüüdi kontsentratsioon potentsiaalsete segavate ainete või tegurite juuresolekul proovimaatriksis.

**Analüütiline tundlikkus** on analüütilise meetodi võime detekteerida analüüdi kontsentratsiooni väikseid erinevusi.

**CE (Conformité Européenne) tähis** on vastavusmärgis. Tootele või selle pakendile lisatav visuaalne kinnitus, et vastavushindamine Euroopa Liidus kehtivatele õigusaktidele on tehtud ja toode vastab nõuetele. CE-märgis on sertifitseerimistähis, mis kinnitab, et toodet on hinnatud ning see vastab Euroopa Majanduspiirkonna (EMP) keskkonnakaitse-, tervise- ja ohutusnõuetele. Ei ole kvaliteedi ega päritolumärk.<sup>18</sup>

**IVD tähis** on vastavusmärgis. Tootele või selle pakendile lisatav visuaalne kinnitus, et vastavushindamine on tehtud ja toode vastab direktiivile *The In vitro Diagnostics Directive*. IVD-märgistus näitab, et tootja on meetodi valideerinud.

**IVDR tähis** on vastavusmärgis (asendas IVD 2022 aastal). Tootele või selle pakendile lisatav visuaalne kinnitus, et vastavushindamine on tehtud ja toode vastab määrusele *The In vitro Diagnostics Regulation*. IVDR märgistus näitab, et tootja on meetodi valideerinud.

**Kontrollmaterjal** (edaspidi: KM) on materjal, mis sisaldab ühte või mitut analüüti, millele kontrollmaterjali tootja või väline kontrollikeskus on avaldanud analüüdi sihtväärtuse ja kontrollvahemiku. Kontrollmaterjali võib valmistada ise, lisades proovimaterjalile vajalikku analüüti või analüüte.

**Kontrolltüvi** (edaspidi: KT) on biokeemiliste, nukleiinhappelise järjestusega või muul viisil iseloomustatud mikroorganismi (viirus, seen, bakter) tüvi.

**Kordustäpsus** (precision) on sõltumatute mõõtmistulemuste lähedus üksteisele antud tingimustel. Mõõdetakse juhuslikku viga (random error, RE), koondab korduvuse ja vahelmise kordustäpsuse andmed.<sup>4</sup>

**Korduvus** (repeatability) on kordustäpsus korduvuse tingimusel (aeg), s.t. seeriasiseselt.<sup>4</sup>

**LOB (Limit of blank) - madalaim avastamispiir** on suurim proovi kontsentratsioon, mis on eristatav teatud usaldusnivooga ( $\alpha=0,05$ ) tühiproovist. Madalaim avastamispiir on väärtus, mille juures on kinnitanud väga suure tõenäosusega, et analüüti proovis ei leidu.

**LOD (Limit of detection) - avastamispiir** on proovis analüüdi kontsentratsioon, millest alates analüüsi meetodika suudab analüüdi proovimaterjalis detekteerida

**LOQ (Limit of quantitation) - kvantiteerimispiir** on proovis analüüdi kontsentratsioon, millest alates annab meetod kvaliteedinõuetele vastava täpsusega mõõtetulemuse.

**Lineaarsus-** meetodi võime väljastada analüüdi tulemusi, mis on proportsionaalselt seotud analüüdi kontsentratsiooniga.

**Maatriks-** proovimaterjali komponendid välja arvatud analüüt.

**Meditsiinilabor** on labor inimkehast pärinevate materjalide uuringuteks, mille eesmärk on saada informatsiooni haiguste diagnoosimiseks, ennetamiseks või raviks.

**Patsiendimaterjal** (edaspidi: PM) on labori uuringuteks patsiendilt võetud proovimaterjal.

**Referentsmaterjal** (*reference material*, RM) on kindlaksmääratud kontsentratsiooniga ning sertifikaadiga varustatud materjal. Referentsmaterjal on seotud kindla jälgitavuse ahelaga, mille igal etapil on olemas nõuded laiendmõõtemääramatuse osas. Üldjuhul kasutatakse referentsmaterjale sisestandardite või sisekontrollide tootmisel ja meetodi valideerimiseks.

**Seeria-** ajavahemik, kus analüüdi kordustäpsus ja tõesus ei ole mõjutatud ning on suhteliselt stabiilsed (ilma muutuseta mõõtmised, ei teostata uut kalibratsiooni, ei vaheta reagente jne).

**Valideerimine** on objektiivsete tõendite abil kinnituse andmine, et nõuded kindlal ettenähtud otstarbel kasutamiseks või rakendamiseks on täidetud.<sup>2</sup> Analüütiline valideerimine tuleb teostada meetodikatele, millel pole CE-IVD või IVDR märgist või kus vastavate märgistega meetodikad on labori poolt muudetud.

**Verifitseerimine** (nõuetekohasuse tõendamine) on objektiivse tõenduse esitamine, et määratletud nõuded on täidetud.<sup>2</sup> See on kinnituse saamine selle kohta, et kõnealust meetodit asjaomastes tingimustes rakendades on võimalik püsivalt saavutada soovitud tulemusi. Kasutatakse CE IVD ja IVDR märgisega toodete puhul. Üldjuhul viiakse verifitseerimine läbi enne meetodi tavakasutusse võtmist ja verifitseerimise käigus saadud patsienditulemusi ei väljastata.

**Tõesus** (trueness) on suure hulga mõõtmistulemuste keskmise väärtuse lähedus tegelikule väärtusele. Mõõdetakse süstemaatilist viga (systematic error, SE).<sup>4</sup>

**Vaheline kordustäpsus** (intermediate precision) on kordustäpsus erinevatel tingimustel (aeg, kalibratsioon, operaator, analüsaator), s.t. seeriade vahel.<sup>4</sup>

**Täpsus** (accuracy) on mõõtmistulemuse lähedus tõesele väärtusele, koondab tõesuse ja kordustäpsuse andmed.

Tõesus, kordustäpsus ja täpsus on kvalitatiivsed mõisted. Tõesuse kvantitatiivseks väljendamiseks on **erinevus** või **nihe (bias)**. Kordustäpsuse kvantitatiivseks väljendamiseks on **hajuvus (imprecision) ehk varieeruvus/variatsioon (variation)**, arvutatakse seeriasisese ja seeriade vahelise hajuvuse andmetel ja väljendatakse variatsioonikoefitsiendina (*coefficient of variation, CV*). Täpsuse kvantitatiivseks väljendamiseks on vaja nii nihke kui hajuvuse andmeid, sest täpsusele avaldavad mõju juhuslikud ja süstemaatilised vead koos - sellega mõõdetakse koguviga (total error, TE).<sup>4</sup>

### 3. TEGEVUSKIRJELDUS

Kui meetodil puudub IVDR tähis või on tegemist laboris välja töötatud meetodiga (laboratory developed test ehk LDT), siis teostatakse analüütiline valideerimine ehk siis tõesusele-ja kordustäpsusele lisaks määratakse ka lineaarsus<sup>22,24</sup>, analüütiline tundlikkus ja analüütiline spetsiifilisus<sup>25</sup>.

Kui meetodil on IVDR tähis, kuid labor muudab meetodit või ei järgi tootjajuhendit, siis labor peab IVDR-tähisega meetodit samuti valideerima, lähtudes aga seejuures modifikatsiooni ulatusest. Kui modifikatsioon on väike, siis on mõistlik ja otstarbekas kasutada minimaalseid määratlusi.

Meditsiinilabor koostab lähtudes uuringutulemuste kavatsetud kasutamiseviisist asjakohase valideerimisplaani ja kehtestab valideerimise eesmärgid.

Kordusmõõtmiste ning hindamispäevade arv valideerimisel määratakse ELMÜ töörühma kvaliteedimääratlustest (minimaalne, soovituslik, optimaalne) lähtudes. Kui see on võimalik ja otstarbekas, tuleb hierarhias optimaalset ja soovituslikku taset eelistada minimaalsele tasemele.

Minimaalse taseme kasutamine tuleb põhjendada. Kui mõne analüüdi puhul ei ole võimalik kasutada ELMÜ töörühma kvaliteedimääratlusi (või kvaliteedimääratlus puudub), koostab labor valideerimise plaani, põhjendades vajalike proovimaterjalide arvu.

Mitmeparametriseliste uuringute puhul (NAT, multiplex testid, allergia, autoimmuunsus jne) peaks valideerimine hõlmama kliiniliselt olulisi ja/või populatsioonis enam levinud parameetreid.

Analüütide valideerimiseks sobilikud materjalid on referentsmaterjalid (RM), kommertspäritolu kontrollmaterjalid (KM), kontrolltüved (KT) ja patsiendi proovimaterjalid (PM).

Käesolevas juhendis käsitletakse kvantitatiivsete ja kvalitatiivsete analüütide valideerimist eraldi.

Valideerimise plaani kordustäpsuse ja tõesuse kvaliteedi määratluste tabelid on toodud dokumendi lõpus „Lisa 1“.

Statistilise tulemuse hinnanguks on võimalik kasutada erinevaid tarkvaraprogramme:

- A.Kallneri Exceli põhised tabelarvutustarkvara (<https://www.acb.org.uk/our-resources/science-knowledge-hub/measurement-verification.html>)
- Finbiosoft tarkvara ValidationManager <https://finbiosoft.com/validation-manager/>.

Valideerimisel tuleb kasutada eesmärgi, mis põhinevad kas bioloogilisel varieeruvusel (<https://biologicalvariation.eu/>), ravijuhistel või on erialasiseselt kokku lepitud.

### **3.1 KLIINILISE KEEMIA JA HEMATOLOOGIA UURINGUD**

#### **KVANTITATIIVSED UURINGUD**

##### **KORDUSTÄPSUS**

Kordustäpsuse hindamise skeem sõltub sellest, mitmel analüsaatoril või kohas seda analüüti määratakse.

##### Ühe analüsaatori puhul:

Optimaalse määratluse järgi teostatakse 2 kordusmõõtmist 2 seerias 2 tasemel 20 päeva jooksul ehk ühtekokku 160 tulemust.<sup>3</sup> On võimalik teha päevas 1 seeria, siis tuleb korduste arvu päevas suurendada (3-4 kordust). Soovitusliku määratluse järgi teostatakse 3 kordusmõõtmist ühes seerias 20 päeva jooksul kahel erineval tasemel, kokku 120 tulemust. Minimaalse määratluse järgi teostatakse kahel erineval tasemel 2 kordusmõõtmist 10 päeva jooksul kahes seerias, kokku 80 tulemust. Aktsepteeritav on teha ka ühes seerias 3 kordusmõõtmist 10 päeva jooksul, kokku 60 tulemust.

##### Mitme analüsaatori või koha puhul:

EESTI LABORIMEDITSIINI ÜHING  
ESTONIAN SOCIETY FOR LABORATORY MEDICINE

Ühel analüsaatoril tuleb rakendada ühe analüsaatori puhul soovitatud valideerimise plaani (20x2x2) ja teistel analüsaatoritel võib rakendada verifitseerimise plaani (5x5), kokku 210 tulemust (2 analüsaatori puhul), (Vt Lisa 1, tabel 1).

Tulemuste esitamise viis

Statistiliste ebatäpsuste vähendamiseks on soovitatav kasutada ühe komakoha võrra täpsemat tulemust kui patsienditulemuste väljastamisel.<sup>3</sup>

Valideerimisel saadud tulemused dokumenteeritakse protokollis. Soovitatav oleks hinnata enne variatsioonikordaja arvutamist kordustulemuste hajuvust, et elimineerida arvutusest statistilised erandid.

Kordustäpsuse hindamisel tuleb kasutada eesmärke, mis põhinevad kas bioloogilisel varieeruvusel (<https://biologicalvariation.eu/>), ravijuhistel või on erialasiseselt kokku lepitud.

Eesmärkväärtused lähtudes bioloogilisest variatsioonist

Labori andmed	Bioloogiline varieeruvus	Soovituslik	Optimaalne	Minimaalne
CV1 <sub>WL</sub>	CV <sub>I</sub>	0,5 CV <sub>I</sub>	0,25 CV <sub>I</sub>	0,75 CV <sub>I</sub>
CV2 <sub>WL</sub>	CV <sub>I</sub>	0,5 CV <sub>I</sub>	0,25 CV <sub>I</sub>	0,75 CV <sub>I</sub>

CV<sub>I</sub> - individuaalne bioloogiline varieeruvus (*within-subject biological variation*)

CV<sub>WL</sub> -laborisisene varieeruvus (*within-laboratory* või *total precision*)

**TÕESUS**

Tõesuse või meetodite erinevuse hindamisel võib kasutada sertifitseeritud materjale, kontrollmaterjale ja/või patsiendi proovimaterjale<sup>20</sup>. Kvaliteedi määratlused tõesuse plaani koostamiseks on toodud lisades (Vt Lisa 1, tabel 2)

**Tõesuse hinnang kontrollmaterjalidega**

Kui kordustäpsust on hinnatud teadaoleva kontsentratsiooniga kontrollmaterjalidega, siis on vajalikud andmed tõesuse hindamiseks olemas. Labori keskmise väärtuse ja kontrollmaterjali sihtväärtuse vaheline erinevus ei tohiks ületada 2 standardhälvet ( $\leq 2SD$ ).

**Tõesuse hinnang patsiendi proovimaterjalidega**

Uue meetodi tõesust hinnatakse mõõtetulemuste võrdlemisel varem kasutatud laborimeetodiga või teise meetodiga (laborite võrdluskatsed, väline kvaliteedikontroll).

Võrdluses kasutatud analüüdi mõõtetulemused peavad olema määramispiirkonna sees ning korrapäraselt hajutatud.

Kui meetodite vahel esineb statistiline erinevus, tuleb hinnata, kas leitud erinevus on kliiniliselt oluline.

Erinevuse hindamisel võib kasutada eesmäärke, mis põhinevad bioloogilisel varieeruvusel, ravijuhistel või on erialasiseselt kokku lepitud.

Eesmärkväärtused lähtudes bioloogilisest variatsioonist

Labori andmed	Bioloogiline varieeruvus	Soovituslik	Optimaalne	Minimaalne
Bias, %	CV <sub>G</sub>	$B_A < 0,250(CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2}$	$B_A < 0,125(CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2}$	$B_A < 0,375(CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2}$

CV<sub>G</sub>- grupisisene bioloogiline varieeruvus (*within-group biological variation*)

CV<sub>I</sub>- individuaalne bioloogiline varieeruvus (*within-subject biological variation*)

Bias, % - meetodite vaheline keskmine erinevus, %.

#### LINEAARSUS

Lineaarsuse<sup>22</sup> hindamiseks tuleb analüüsida 9 proovimaterjali.

Tuleb valida kõrge kontsentratsiooniga proovimaterjal (suhteline kontsentratsioon, *relative concentration*, RC=1) ja proovimaterjal, kus analüüdi sisaldust ei ole (tühiproov, *Blank*, RC=0).

Allpool tabelis on tööskeem, kuidas valmistada veel 7 lahjendatud proovimaterjali.

1	Blank, RC=0 maht=1/2	+	Kõrge, RC=1 maht=1/2	=	RC=0,5
2	Kõrge, RC=1 maht=1/2	+	RC=0,5 maht=1/2	=	RC=0,75
3	Blank, RC=0 maht=1/2	+	RC=0,5 maht=1/2	=	RC=0,25
4	Kõrge, RC=1 maht=1/2	+	RC=0,75 maht=1/2	=	RC=0,875
5	Kõrge, RC=1 maht=1/2	+	RC=0,25 maht=1/2	=	RC=0,625
6	Blank, RC=0 maht=1/2	+	RC=0,75 maht=1/2	=	RC=0,375
7	Blank, RC=0 maht=1/2	+	RC=0,25 maht=1/2	=	RC=0,125

Andmete analüüsil ja töötlusel lähtuda dokumendis CLSI EP06 ED2:2020 toodust.

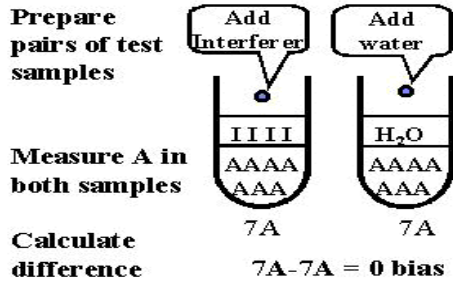
#### ANALÜÜTILINE SPETSIIFILISUS

Analüütilise spetsiifilisuse hindamiseks on vaja teostada interferentsi ja saagise katsed.

#### INTERFERENTS

Tuleb hinnata vähemalt 3 segava faktori suhtes: hemolüüs, lipeemia ja hüperbilirubineemia. Allpool on toodud näide, kuidas lisatakse uuritavale proovimaterjalile interferentsiga materjal ning hinnatakse interferentsi mõju.

***The Interference Experiment***

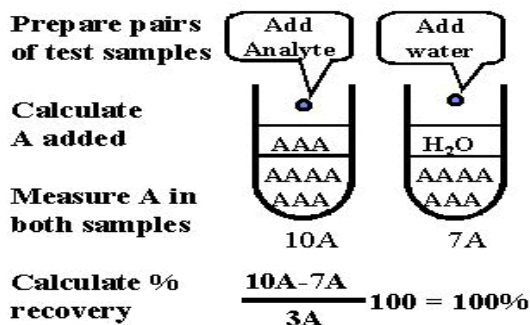


Interferentsi mõju hindamiseks tuleb valida proovimaterjale kliiniliselt olulisel analüüdi väärtusel (nt. referentspiirid või otsustuspiirid). Interferentsi hinnang tuleb teha vähemalt kahel tasemel 5 kordusmõõtmist interferentsiga ja interferentsita proovimaterjalidel, kokku 20 tulemust. Kui interferentsi mõju on suurem kui lubatud (näiteks suurem kui lubatud koguviga), siis tuleb interferentsi mõju täpsustada ning teostada interferentsiga proovi lahjendused (vähemalt 3 lahjendust: 0,25, 0,5 ja 0,75, vaata tööskeemi lineaarsuse hinnangul).

**SAAGIS**

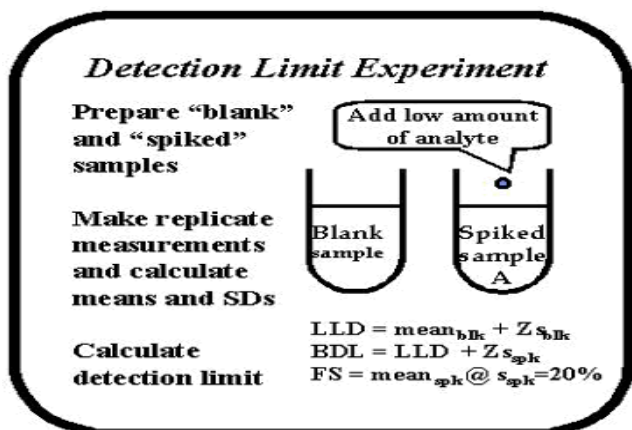
Maatriksi mõju tuleks hinnata vähemalt 3 proovimaterjaliga lisades teise maatriksiga proovimaterjale ning arvutada analüüdi saagis %. Allpool on toodud skeem ja saagise arvutuse valem.

***The Recovery Experiment***



**ANALÜÜTILINE TUNDLIKKUS**

Analüütilise tundlikuse hindamiseks on vaja teostada LOB, LOD ja LOQ katsed. Allpool on toodud skeem ja arvutuse valemid.



LLD- lower limit of detection (LOB)

BLD-biologic limit of detection (LOD)

FS- functional sensitivity (LOQ)

### Madalaim avastamispriir

Teostada 20 kordusmõõtmist tühiprooviga ja arvutada LOB.

### Avastamispriir

Teostada 20 kordusmõõtmist madala analüüdi sisaldusega proovimaterjalist ja arvutada LOD.

### Kvantiteerimispriir

Teostada 20 kordusmõõtmist 4 erineva madala analüüdi sisaldusega proovimaterjaliga.

Arvutada mõõtmiste keskvaärtused ja SD ning CV%. Kvaniteerimispriir on analüüdi kontsentratsioon, mille juures on varieeruvus 20%.

## KVALITATIIVSED UURINGUD

### KORDUSTÄPSUS

Kordustäpsuse hinnang tuleb teha kahel (võimaluse korral kolmel) tasemel ehk negatiivse ja positiivsega materjaliga (võimaluse korral otsustuspiiri *cut-off* lähedal, piiripealne materjal).

Optimaalse määratluse järgi teostatakse kahel (kolmel) tasemel 2 kordusmõõtmist 20 päeva jooksul ühes seerias ehk kokku 80 (120) tulemust.<sup>3</sup> Soovitusliku määratluse järgi teostatakse 2 kordusmõõtmist 10 päeva jooksul ühes seerias kahel (kolmel) tasemel, kokku 40 (60) tulemust. Minimaalse määratluse järgi teostatakse mõõtmised 5 päeva jooksul (päevas 1 mõõtmine ühes seerias) kahel (kolmel) tasemel, kokku 10 (15) tulemust.

Saadud andmete põhjal arvutatakse tulemuste kokkulangevus.



## TÕESUS

### Tõesuse hinnang kontrollmaterjalidega

Kui kordustäpsust on hinnatud kontrollmaterjalidega, siis on vajalikud andmed tõesuse hindamiseks olemas. Laboris saadud tulemusi võrreldakse kontrollmaterjali tootja infomaterjali andmetega. Hinnang dokumenteeritakse.

### Tõesuse hinnang patsiendi proovimaterjalidega

Uue meetodi tõesust hinnatakse tulemuste võrdlemisel varem kasutatud laborimeetodiga või teise meetodiga (laborite võrdluskatsed, väline kvaliteedikontroll). Analüüside väärtused peavad olema korrapäraselt hajutatud (negatiivsed, piiripealsed ja positiivsed).

#### Võrdluste tulemused

		Meetod Y (uus)			
		Positiivsed	Negatiivsed	Kokku	Kokkulangevus, %
Meetod X (eelmine)	Positiivsed	a	b	a + b	$100 \times a / (a + c)$
	Negatiivsed	c	d	c + d	$100 \times d / (b + d)$
	Kokku	a + c	b + d	N	$100 \times (a + d) / N$

Saadud kokkulangevust tuleb hinnata.

Kvaliteedi määratlused tõesuse plaani koostamiseks on toodud lisas (Lisa 1, tabel 2).

## 3.2 ANTIGEENI JA ANTIKEHA UURINGUD

### KVANTITATIIVNE MEETOD

#### KORDUSTÄPSUS

Optimaalse määratluse järgi teostatakse ühel analüsaatoril 2 kordusmõõtmist 20 päeva jooksul 2 seerias kahel tasemel ehk ühtekokku 160 tulemust.<sup>3</sup> On võimalik teha päevas 1 seeria, siis tuleb korduste arvu päevas suurendada, vähemalt 4 kordusmõõtmist. Soovitusliku määratluse järgi teostatakse 3 kordusmõõtmist ühes seerias 20 päeva jooksul kahel tasemel, kokku 120 tulemust. Minimaalse määratluse järgi teostatakse 2 kordusmõõtmist 10 päeva jooksul kahel tasemel ühes või kahes seerias, kokku 40 (80) tulemust. Mitme analüsaatori korral määrata kordustäpsus vastavalt Lisas 1, tabelis 1 toodule.

## TÕESUS

Tõesuse hindamiseks kasutatakse referentsmaterjale, kontrollmaterjale või patsiendi materjale. Kui kordustäpsust on hinnatud referentsmaterjalidega/kontrollmaterjalidega, siis on vajalikud andmed tõesuse hindamiseks olemas.

Labori keskmise väärtuse ja kontrollmaterjali sihtväärtuse vaheline erinevus ei tohiks ületada 2 standardhälvet ( $\leq 2SD$ ).

EESTI LABORIMEDITSIINI ÜHING  
ESTONIAN SOCIETY FOR LABORATORY MEDICINE

Kvaliteedi määratlused tõesuse plaani koostamiseks on toodud lisas (Lisa 1, tabel 2).

Erandjuhtudel, kui ei ole võimalik saada piisaval arvul võrdlusproovimaterjali, siis otsustab proovimaterjalide arvu erialaspetsialist.

#### **ANALÜÜTILINE TUNDLIKKUS**

Kvantitatiivsel meetodil tuleb minimaalselt määrata alumine kvantiteerimispiir (*lower limit of quantification, LLOQ*) ja ülemine kvantiteerimispiir (*upper limit of quantification, ULOQ*). LLOQ ja ULOQ saab määrata kontsentratsioonide põhjal kui intervalli lõpp-punkte, mille puhul CV% on teatud tasemest madalamal.

1. Määra 10-20 väga madala analüüdi kontsentratsiooniga proovi ja 10-20 väga kõrge analüüdi kontsentratsiooniga proovi kahes paralleelis.
2. Arvuta keskmine kontsentratsioon ja proovide CV%.
3. Koosta hajuvusdiagramm
4. LLOQ saab leida määrates kindlaks kontsentratsioonide madalaima keskmise taseme, millest kõrgemal on enamike proovide CV% <20%
5. ULOQ saab leida määrates kindlaks kontsentratsioonide kõrgeima keskmise taseme, millest madalamal on enamike proovide CV% < 20%

#### **ANALÜÜTILINE SPETSIIFILISUS**

Analüütilise spetsiifilisuse hindamiseks on vaja teostada interfernsti ja saagise katsed (vaata 3.1).

#### **PROOVIMATERJALI STABIILSUS**

Kui ei ole teada säilitustingimusi, siis teha kindlaks, kas proovide erinevad säilitustingimused põhjustavad süstemaatilist viga analüüdi määramisel. Jaga analüüt 3 erineval tasemel (madal, keskmine, kõrge) võrdsetesse alikvootidesse. Hoia alikvoodid vajalike temperatuuride juures (nt toatemperatuur, +2-8 °C, -20 °C, -70°C). Seejärel külmuta toatemperatuuril ja +2-8 °C juures hoitud proovid ettenähtud ajavahemike järgi (nt 1 h, 2 h, 4 h .... jne). Sulata kõik proovid ja määra analüüt kõikides proovides ühemomentselt 2 paralleelis.

Arvuta proovide keskmine, SD ja CV uuritavatele proovidel algkontsentratsiooni suhtes.

#### **KVALITATIIVNE MEETOD**

##### **KORDUSTÄPSUS**

Optimaalse määratluse järgi teostatakse 2 kordusmõõtmist 20 päeva jooksul 1 seerias kahel tasemel ehk ühtekokku 80 tulemust.<sup>3</sup> Soovitusliku määratluse järgi teostatakse 2 kordusmõõtmist 10 päeva jooksul kahel tasemel ühes seerias, kokku 40 tulemust. Minimaalse määratluse järgi teostatakse 2 kordusmõõtmist 5 päeva jooksul kahel tasemel, kokku 20 tulemust. (Lisa 1, tabel 1).

##### **TÕESUS**

Tõesuse hindamiseks kasutatakse referentsmaterjale, kontrollmaterjale või patsiendi materjale. Kui kordustäpsust on hinnatud kontrollmaterjalidega, siis on vajalikud andmed tõesuse hindamiseks olemas.

Kvaliteedi määratlused tõesuse plaani koostamiseks valideerimisel on toodud lisa (Lisa 1, tabel 2).

#### **ANALÜÜTILINE TUNDLIKKUS**

Kvalitatiivsel meetodil tuleb minimaalselt määrata alumine kvantiteerimispiir kasutades tühiproovide määramist:

1. Analüüsi 16 tühiproovi (negatiivne maatriks või proovi lahjendaja)
2. Arvuta tulemuste keskmine ja SD
3. Määra kontsentratsioon põhinedes +10 SD tühiproovi keskmisest

#### **PROOVIMATERJALI STABIILSUS**

Kui ei ole teada säilitustingimusi, siis teha kindlaks, kas proovide erinevad säilitustingimused põhjustavad süstemaatilist viga analüüdi määramisel. Jaga analüüt 2 erineval tasemel (nõrk positiivne, positiivne) võrdsetesse alikvootidesse. Hoida alikvoodid vajalike temperatuuride juures (nt toatemperatuur, +2-8 °C, -20 °C, -70°C). Seejärel külmuta toatemperatuuril ja +2-8 °C juures hoitud proovid ettenähtud ajavahemike järgi (nt 1 h, 2 h, 4 h .... jne). Sulata kõik proovid ja määra analüüt kõikides proovides ühemomentselt 2 paralleelis.

### **3.3 NAKKUSTEKITAJATE UURINGUD NUKLEINHAPETE AMPLIFITSEERIMISE TEHNIKAGA (NAT)**

Kordustäpsuse teostamiseks võib kasutada nii referentsmaterjale (RM), kontrolltüve (KT), kontrollmaterjale (KM) kui ka patsiendi materjale (PM). Tõesuse hindamiseks kasutatakse kontrolltüve (KT) ja/või kontrollmaterjali (KM) ja/või referentsmaterjali (RM). Kõiki neid materjale nimetatakse valideerimismaterjalideks. Kui puudub eelnev, siis kasutatakse teise testsüsteemiga teada oleva tulemusega või kliiniliselt kinnitatud diagnoosiga patsientide proovimaterjale (PM). Valideerida tuleks kõik erinevat tüüpi proovimaterjalid, detekteeritavad patogeenide liigid, genotüübid.<sup>7</sup> Valideerimise protsess peab hõlmama kogu töövoogu alates proovimaterjali kogumisest kuni vastuste tõlgendamiseni.

#### **KVANTITATIIVSED UURINGUD**

##### **TÕESUS**

Sobilikud valideerimismaterjalid: RM, KT, KM. Optimaalse määratluse järgi kasutatakse 15 positiivset, 15 piiripealset ja 9 negatiivset valideerimismaterjali, kokku 39 tulemust. Soovitusliku määratluse järgi kasutatakse 10 positiivset, 10 piiripealset ja 6 negatiivset valideerimismaterjali, kokku 26 tulemust. Minimaalse määratluse järgi kasutatakse 5 positiivset, 5 piiripealset ja 3 negatiivset valideerimismaterjali, kokku 13 tulemust.

Kvantitatiivse NAT analüüsi puhul võrreldakse omavahel logaritmilisi tulemusi, lubatud varieeruvus peaks jääma 0.5 log piiresse.

##### **KORDUSTÄPSUS**

Sobilikud valideerimismaterjalid: RM, KT, KM, PM.

EESTI LABORIMEDITSIINI ÜHING  
ESTONIAN SOCIETY FOR LABORATORY MEDICINE

Kordustäpsuse hinnang tuleb teha erinevate tasemetega: kõrge kontsentratsiooniga positiivne materjal (positiivne), läviväärtust pisut ületava kontsentratsiooniga ja/või madala kontsentratsiooniga allpool läviväärtust materjal (piiripealne) ning negatiivse kontrollmaterjaliga.

Optimaalse määratluse järgi kasutatakse 8 positiivset, 8 piiripealset ja 3 negatiivset valideerimismaterjali, mida analüüsitakse seeria siseselt kahes korduses 3 päeva jooksul, kokku 114 tulemust (Lisa 1, tabel 1).

Soovitusliku määratluse järgi kasutatakse 5 positiivset, 5 piiripealset ja 2 negatiivset valideerimismaterjali, mida analüüsitakse seeria siseselt kahes korduses 3 päeva jooksul, kokku 72 tulemust (Lisa 1, tabel 1).

Minimaalse määratluse järgi kasutatakse 3 positiivset, 3 piiripealset ja 1 negatiivset valideerimismaterjali, mida analüüsitakse seeria siseselt kahes korduses 3 päeva jooksul, kokku 42 tulemust (Lisa 1, tabel 1).

#### **LINEAARSUS**

Kvantitatiivse uuringu korral 2 positiivse referentsmaterjali lahjendusrida 2 paralleelis 2 päeva (10 korda lahjendusrida vähemalt 4 lahjendusastmega).

#### **INTERFERENTS**

Interferentsi mõju hindamiseks tuleb valida nõrgalt positiivsed proovimaterjalid. Segavad faktorid peavad olema kõrgeimas võimalikus kontsentratsioonis, mis võiks leiduda päris proovimaterjalis. Algset ja segajaga proovimaterjali tuleb testida sama analüüsi käigus.

Kliiniliselt olulisel analüüdi väärtusel (nt. referentspiirid või otsustuspiirid). Interferentsi hinnang tuleb teha vähemalt kahel tasemel 5 kordusmõõtmist interferentsiga ja interferentsita proovimaterjalidel, kokku 20 tulemust. Kui interferentsi mõju on suurem kui lubatud (näiteks suurem kui lubatud koguviga), siis tuleb interferentsi mõju täpsustada ning teostada interferentsiga proovi lahjendused (vähemalt 3 lahjendust: 0,25, 0,5 ja 0,75, vaata tööskeemi lineaarsuse hinnangul).

#### **KVALITATIIVSED UURINGUD**

##### **TÕESUS**

Sobilikud valideerimismaterjalid: RM, KT, KM.

Optimaalse määratluse järgi kasutatakse 9 positiivset, 9 piiripealset ja 9 negatiivset valideerimismaterjali, kokku 27 tulemust. Soovitusliku määratluse järgi kasutatakse 6 positiivset, 6 piiripealset ja 6 negatiivset valideerimismaterjali, kokku 18 tulemust. Minimaalse määratluse järgi kasutatakse 3 positiivset, 3 piiripealset ja 3 negatiivset valideerimismaterjali, kokku 9 tulemust.

##### **KORDUSTÄPSUS**

Sobilikud valideerimismaterjalid: RM, KT, KM, PM.

Kordustäpsuse hinnang tuleb teha erinevate tasemetega: kõrge kontsentratsiooniga positiivne materjal (positiivne) ja läviväärtust pisut ületava kontsentratsiooniga ja/või madala kontsentratsiooniga allpool läviväärtust materjal (piiripealne) ning negatiivset kontrollmaterjali.

Optimaalse määratluse järgi kasutatakse 6 positiivset, 6 piiripealset ja 3 negatiivset valideerimismaterjali, mida analüüsitakse seeria siseselt kahes korduses 3 päeva jooksul, kokku 90 tulemust (Lisa 1, tabel 1).

Soovitusliku määratluse järgi kasutatakse 4 positiivset, 4 piiripealset ja 2 negatiivset valideerimismaterjali, mida analüüsitakse seeria siseselt kahes korduses 3 päeva jooksul, kokku 60 tulemust (Lisa 1, tabel 1).

Minimaalse määratluse järgi kasutatakse 2 positiivset, 2 piiripealset ja 1 negatiivset valideerimismaterjali, mida analüüsitakse seeria siseselt kahes korduses 3 päeva jooksul, kokku 30 tulemust (Lisa 1, tabel 1).

#### **ANALÜÜTILINE TUNDLIKKUS**

Nii kvalitatiivse kui ka kvantitatiivse uuringu korral 10 positiivset ja 10 kuni  $1\log_{10}$  üle testsüsteemi alumise määramispiiri positiivset kontrollmaterjali.

Multipleks analüüside puhul tuleb hinnata ka teiste paneelis olevate sihtmärkide inhibeerivat mõju (konkureeriv reaktsioon)

#### **ANALÜÜTILINE SPETSIIFILISUS**

Nii kvalitatiivse kui ka kvantitatiivse uuringu korral 20 negatiivset kontrollmaterjali samast taksonoomilisest perekonnast või potentsiaalselt ristreaktsioone andvat (populatsioonis levinud) tekitajat.

EESTI LABORIMEDITSIINI ÜHING  
ESTONIAN SOCIETY FOR LABORATORY MEDICINE

**LISA1. KVALITEEDI MÄÄRATLUSED ANALÜÜTIDE VALIDEERIMISE PLAANI KOOSTAMISEL**

**Tabel 1. Kordustäpsuse plaan**

	Proovimaterjalide tasemed-ridade arv; päevade arv x seeriade arv x korduste arv seerias		
	Optimaalne	Soovituslik	Minimaalne
Kliiniline keemia, Ag-Ak (kvantitatiivne)-ühel analüsaatoril (A <sub>1</sub> )	20 x 2(1) x 2(4) <sup>3</sup> 20 x 2(1) x 2(4)	20 x 1 x 3 20 x 1 x 3	10 x 2 (1) x 2 (3) 10 x 2 (1) x 2 (3)
Kliiniline keemia, Ag-Ak (kvantitatiivne)- kahel analüsaatoril (A <sub>1</sub> ja A <sub>2</sub> )	(A <sub>1</sub> ) 20 x 2 x 2 (A <sub>1</sub> ) 20 x 2 x 2 (A <sub>2</sub> ) 5 x 1 x 5 (A <sub>2</sub> ) 5 x 1 x 5	A <sub>1</sub> ) 20 x 1 x 3 (A <sub>1</sub> ) 20 x 1 x 3 (A <sub>2</sub> ) 5 x 1 x 3 (A <sub>2</sub> ) 5 x 1 x 3	A <sub>1</sub> ) 20 x 2 x 2 (A <sub>1</sub> ) 20 x 2 x 3 (A <sub>2</sub> ) 3 x 1 x 3 (A <sub>2</sub> ) 3 x 1 x 3
Kliiniline keemia, Ag-Ak (kvantitatiivne)- mitmel analüsaatoril (A <sub>n</sub> ) n≥3	(A <sub>n</sub> ) 5 x 1 x 5 (A <sub>n</sub> ) 5 x 1 x 5	(A <sub>n</sub> ) 5 x 1 x 3 (A <sub>n</sub> ) 5 x 1 x 3	(A <sub>n</sub> ) 3 x 1 x 3 (A <sub>n</sub> ) 3 x 1 x 3
Kliiniline keemia, Ag-Ak (kvalitatiivne)	20 x 1 x 2 <sup>5</sup> 20 x 1 x 2 (20 x 1 x 2, cut-off)	10 x 1 x 2 10 x 1 x 2 (10 x 1 x 2, cut-off)	5 x 1 x 2 5 x 1 x 2 (5 x 1 x 2, cut-off)
NAT (kvantitatiivne)  (valideerimismaterjali x kordus) x päeval	(8 x 2) x 3 (8 positiivset) (8 x 2) x 3 (8 piiripealset) (3 x 2) x 3 (3 negatiivset)	(5 x 2) x 3 (5 positiivset) (5 x 2) x 3 (5 piiripealset) (2 x 2) x 3 (2 negatiivset)	(3 x 2) x 3 (3 positiivset) (3 x 2) x 3 (3 piiripealset) (1 x 2) x 3 (1 negatiivne)
NAT (kvalitatiivne)  (valideerimismaterjali x kordus) x päeval	(6 x 2) x 3 (6 positiivset) (6 x 2) x 3 (6 piiripealset) (3 x 2) x 3 (3 negatiivset)	(4 x 2) x 3 (4 positiivset) (4 x 2) x 3 (4 piiripealset) (2 x 2) x 3 (2 negatiivset)	(2 x 2) x 3 (2 positiivset) (2 x 2) x 3 (2 piiripealset) (1 x 2) x 3 (1 negatiivne)

**Tabel 2. Tõesuse plaan (erinevuse hindamine, eelmise meetodiga võrdlus ja/või laborite vahelised võrdluskatsed/väline kvaliteedikontroll, referentsainete/konrolltüvede analüüsimine)**

	Optimaalne	Soovituslik	Minimaalne
Kliiniline keemia, Ag-Ak (kvantitatiivne)	100 <sup>20</sup>	40	10
Kliiniline keemia, Ag-Ak (kvalitatiivne)	100 <sup>5</sup>	40	10
NAT (kvantitatiivne)	39 (15 positiivset + 15 piiripealset + 9 negatiivset)	26 (10 positiivset + 10 piiripealset + 6 negatiivset)	13 (5 positiivset + 5 piiripealset + 3 negatiivset)
NAT (kvalitatiivne)	27 (9 positiivset + 9 piiripealset + 9 negatiivset)	18 (6 positiivset + 6 piiripealset + 6 negatiivset)	9 (3 positiivset + 3 piiripealset + 3 negatiivset)

**KASUTATUD KIRJANDUS**

1. Tervishoiuteenuste korraldamise seadus (TTKS) RTI 2001,50,284 ja määrus nr. 128 „Tervishoiuteenuste kvaliteedi tagamise nõuded“
2. Meditsiinilaborid. Kvaliteedi ja kompetentsi erinõuded (ISO 15189:2022)
3. CLSI EP05-A3 Evaluation of precision of quantitative measurement procedures
4. CLSI EP15-A3 User verification of precision and estimating of bias
5. CLSI EP12-A3 User protocols for evaluation of qualitative test performance
6. CLSI GP 37-A Quality management systems: equipment
7. CLSI MM17 Verification and validation of multiplex nucleic acid assays
8. CLSI MM19-A Establish of molecular testing
9. Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. Rabenau et al J.Clin. Virol. 2007. Oct;40(2):93-8. Epub 2007 Sep 4
10. CLSI MM 06-A2 Quantitative molecular methods for infectious diseases
11. Kenny D, Fraser CG, Hytolf Petersen P, Kallner A. Consensus agreement. Scand J Clin Lab Invest 1999; 59:585
12. Clark, R. B., M. A. Lewinski, M. J. Loeffelholz, and R. J. Tibbetts, 2009. Cumitech 31A, Verification and Validation of Procedures in the Clinical Microbiology Laboratory. Coordinating ed., S. E. Sharp. ASM Press, Washington, DC.
13. CLSI M100-S22 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing
14. CLSI M52 Verification of Commercial Microbial Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing Systems.
15. CLSI M58-A1 Methods for the Identification of Cultured Microorganisms Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry.
16. Tibbetts, R. J. Verification and Validation of Tests Used in the Clinical Microbiology Laboratory. Clinical Microbiology Newsletter, 2015; 37, 19
17. Molecular Diagnostics: For the Clinical Laboratorian Coleman et al, 2006
18. RT I 1999,92,825 Toote nõuetele vastavuse tõendamise seadus.
19. CLSI I/LA26-A2 Performance of single cell immune response assays.
20. CLSI EP-09-A3 Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline-Third Edition, 2013.
21. Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases. Clinical Microbiology Reviews, Burd, 2010
22. CLSI EP06 ED2:2020 — Evaluation of Linearity of Quantitative Measurement Procedures, 2nd Edition
23. CLSI EP28 ED3IG-2022 — Verification of Reference Intervals in the Medical Laboratory Implementation Guide, 1st Edition
24. CLSI EP17-A2 Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures, 2nd Edition
25. CLSI EP07-ED3:2018 Interference Testing in Clinical Chemistry [https://clsi.org > media > ep07a2\\_sample](https://clsi.org/media/ep07a2_sample)
26. CLSI H62: 2021 Validation of Assays Performed by Flow Cytometry