

Verifikacija automatiziranih metoda za analizu ekstravaskularnih uzoraka u laboratorijskoj medicini

Ana Nikler

mag.med.biochem.

spec.med.biokemije i lab.medicine

Zavod za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku Klinička bolnica Sveti Duh, Zagreb

HKMB Tečaj trajnog usavršavanja

Analiza odabranih ekstravaskularnih uzoraka u laboratorijskoj medicini

19.9.2026.

Zašto je ova tema važna?



- uzorci ograničenog volumena i heterogenog sastava
- upitan utjecaj matriksa na metodu mjerenja
- tehnički izvediv rezultat ne podrazumijeva da je i klinički pouzdan!

Ključno pitanje nije:
„Može li analizator izmjeriti?”

nego:
„Smijemo li taj rezultat izdati i kako ga tumačiti?”

**cerebrospinalna tekućina
likvor**

**pleuralna tekućina
izljev**

**peritonejska tekućina
ascites**

**EKSTRAVASKULARNI
UZORCI**

**perikardijalna tekućina
izljev**

**zglobna tekućina
sinovija**

**dren / dijalizat
nestandardni uzorci**

Učinak matriksa = središnji analitički izazov

proteini / lipidi

stanice / detritus

viskoznost

**MATRIKS
UZORKA**

pH i elektroliti

**enzimi /
hemoglobin**

kristali / ugrušci

**Posljedica: proizvođačeve tvrdnje za serum/plazmu/mokraću
ne smiju se nekritično prenijeti na ekstravaskularne tekućine.**



Sastav tekućine može utjecati na pipetiranje, reakciju i konačni rezultat



Učinak matriksa = središnji analitički izazov

proteini / lipidi

stanice / detritus

viskoznost

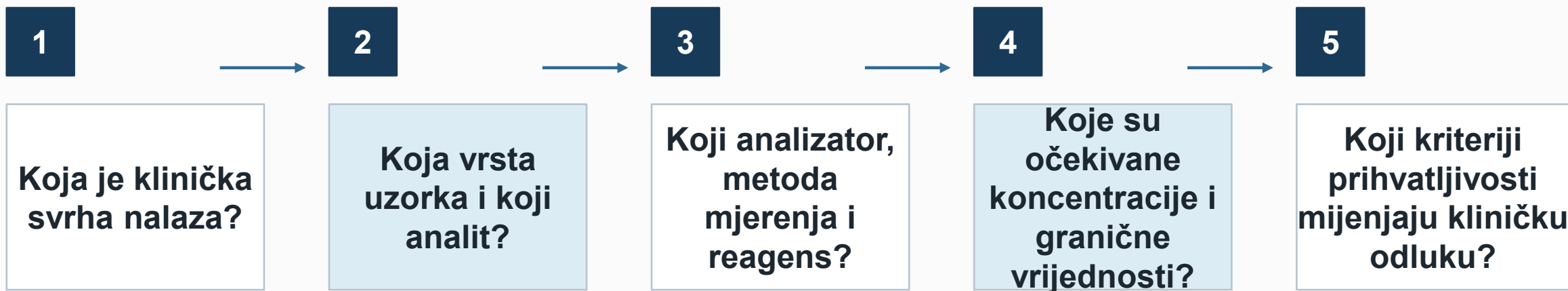
pH i elektroliti

**MATRIKS
UZORKA**

enzimi /
hemoglobin

kristali / ugrušci

Planiranje verifikacijskog protokola



GLAVNI ZADATAK

Verifikacija ne treba započeti pitanjem što se sve tehnički može izmjeriti, nego pitanjem koje su pretrage klinički opravdane i prikladne za izdavanje rezultata.

Verifikacija ili validacija?

Navodi li proizvođač analizu
uzoraka određene ekstravaskularne
tekućine?

DA

VERIFIKACIJA

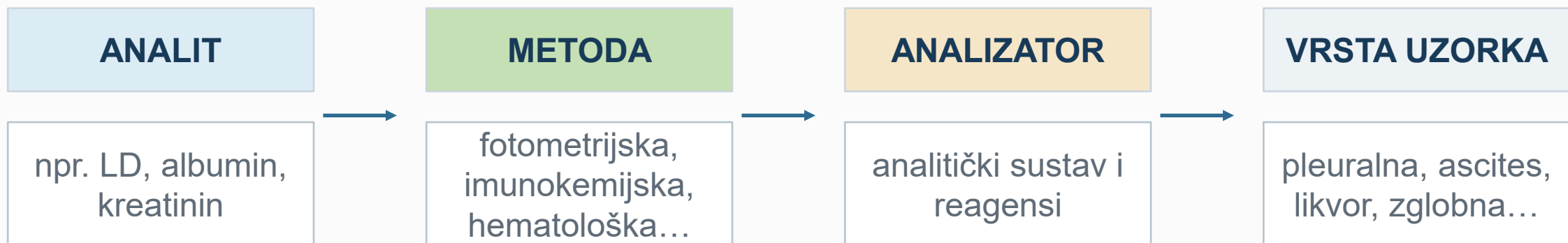
Potvrđujemo istinitost analitičkih značajki
koje navodi proizvođač
u laboratorijskim uvjetima.

NE

VALIDACIJA / PROŠIRENA PROVJERA

Uporaba izvan namjene proizvođača: šira
ocjena prikladnosti za utvrđenu namjenu.

Protokol specifičan za vrstu uzorka



ZAPAMTITI !

Rezultat verifikacije za jedan analit ili jednu vrstu tekućine ne vrijedi automatski za druge analite ili druge uzorke.

HEMATOLOŠKA ANALIZA

Tradicionalna

- ručno brojanje u komorici
- mikroskopski pregled preparata
- morfološka procjena i atipične stanice

Automatizirana

- brža analiza i izdavanje nalaza
- standardizacija
- manje opterećenje osoblja
- mogući body fluid način rada

Oprez

- vrlo niske koncentracije stanica
- interferencije i heterogenost
- ograničenja optičkih/impedancijskih metoda

Sastavnice verifikacijskog protokola

LoB

granica slijepe probe

LoD

granica detekcije

LoQ

granica kvantifikacije

Preciznost

ponovljivost metode

Točnost

usporedba s postojećom metodom

Linearnost

mjerno područje

Carry-over

prijenos iz prethodnog uzorka

ICSH guidelines for the verification and performance of automated cell counters for body fluids

G. BOURNER*, B. DE LA SALLE†, T. GEORGE‡, Y. TABE§¶, H. BAUM***, N. CULP††, T. B. KENG‡‡,
ON BEHALF OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE FOR STANDARDIZATION IN HEMATOLOGY (ICSH)

Table 2. Full verification vs. transference

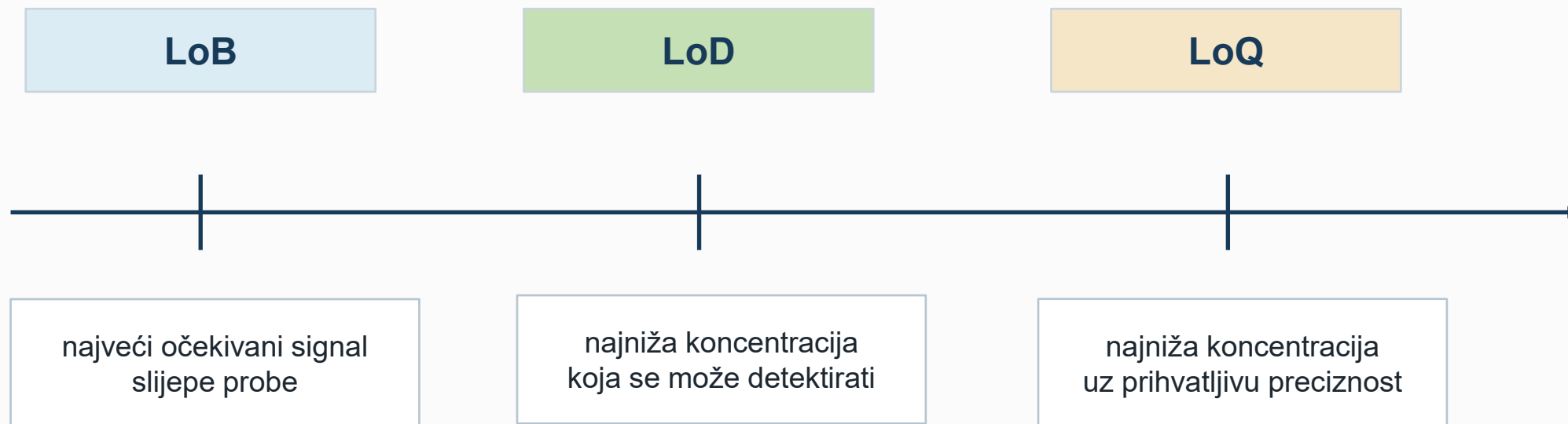
Studies	Full verification	Transference
Precision (repeatability)	Yes	Yes
Accuracy	Yes	Yes
Analytical sensitivity	Yes	Yes
Analytical specificity	Yes	Yes
in include interfering substances		
Reference range	Full study	Smaller study
Patient correlation studies	Full study	Smaller study
Linearity	Yes	Yes
Limits of detection	Yes	Yes
Carryover	Yes	Yes
Analytical measuring range	Yes	Yes

Opseg ovisi o vrsti tekućine i kliničkoj namjeni nalaza.

Kod više istovrsnih analizatora moguće je provesti punu verifikaciju na jednom, a prijenosnu na ostalima.

KLJUČNI KORAK PRIJE ANALIZE
provjera pozadinskog signala
(background check)

→ usporedba metoda → 40 vs 20 uzoraka



LoB

- uzorci tjelesnih tekućina bez stanica ili diluenti
- 10x
- tijekom 2 do 3 različita dana
- prihvatljivo ako su minimalno 3 analize jednake ili ispod deklariranog LoB

LoD

- isti postupak s uzorcima jednakim deklariranom LoD
- unutar 95% - prihvaćen LoD

LoQ

- laboratorij sam definira kriterije

PRECIZNOST I PONOVLJIVOST

- 2 ili više koncentracijskih razina pri čemu uključiti klinički važnu graničnu vrijednost
- ponovljivost = 10x – uzorci pacijenata
 - poželjno minimalno 5x (nedostatan volumen)
- preciznost = QC
 - uzorci pacijenata nestabilni

Usporedba metoda

- automatizirana metoda vs. ručno brojanje / postojeća metoda
- poželjno najmanje 40 uzoraka
- ručno brojanje u duplikatu kada je moguće

Interferencije

- ugrušci i kristali
- stanične nakupine i detritus
- mikroorganizmi
- viskoznost ili druge sastavnice koje smetaju reakciji
- navodi ih proizvođač

Klinička procjena

- statistička razlika nije dovoljna za odbacivanje
- ključno je mijenja li odstupanje odluku

Linearnost / mjerno područje

- verificirati za svaku vrstu tekućine
- 5–7 različitih koncentracija kroz mjerno područje (3 ponovljena mjerenja)
- klinički granične vrijednosti

Carry-over / prijenos stanica

- cilj je isključiti prijenos iz visokog u niski uzorak
- mjeri se slijed: A1–A3 pa B1–B3
- posebno važno kod izmjene visoko i niskocelularnih uzoraka

$$[(B1 - B3) / (A3 - B3)] \times 100$$

Ako metoda sustavno podcjenjuje ili precjenjuje broj stanica u području kliničke granične vrijednosti, odstupanje se mora uzeti u obzir pri izdavanju nalaza.

BIOKEMIJSKA I IMUNOKEMIJSKA ANALIZA

Česta praksa

Metoda se izvodi istim analizatorima i reagensima kao za serum/plazmu/mokraću.

Ključno pitanje

Je li metoda prikladna za točno određenu ekstravaskularnu tekućinu i određeni analit?

Ishod

verifikacija ili validacija prema namjeni proizvođača

Sastavnice **verifikacijskog**/validacijskog protokola

Preciznost

Točnost

Analitička osjetljivost

Specifičnost (interferencije)

Mjerno područje

Provjera RI

Carry-over

Klinička osjetljivost i specifičnost

Koristiti protokole verifikacije uobičajene za standardne uzorke.

Ograničenja

- uzorci nisu dostupni svakodnevno
- volumen je često ograničen
- sastav je heterogen

Mogući pristup

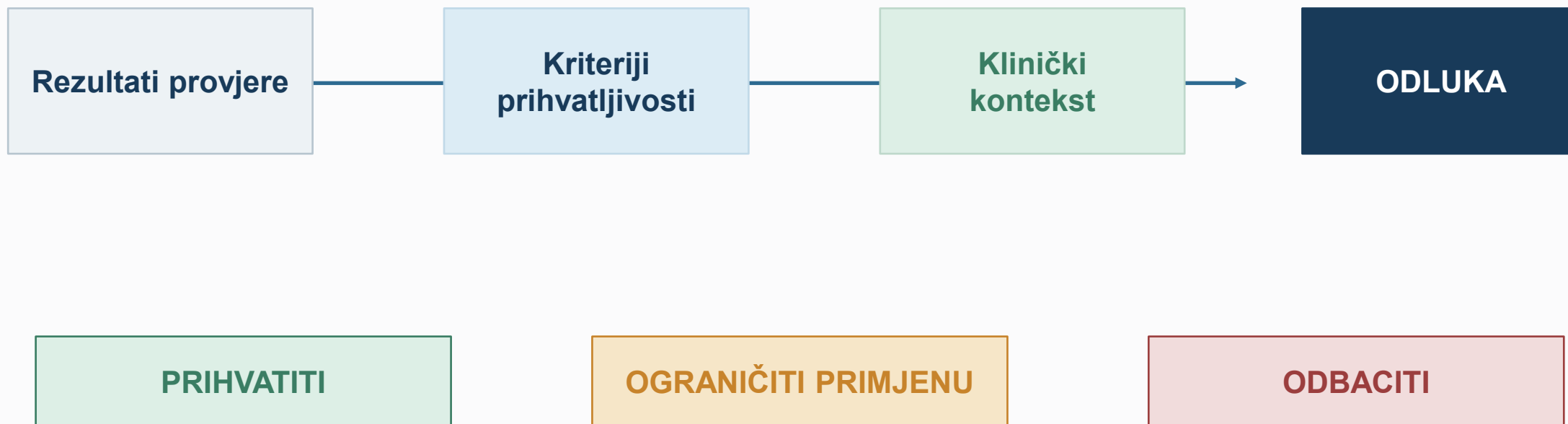
- ostatni uzorci nakon rutinske obrade
- pohrana samo uz procjenu stabilnosti (ILI literaturne podatke)

OBAVEZNO procijeniti UČINAK MATRIKSA!

- niz uzoraka poznatih, očekivanih koncentracija duž raspona
- mješanje iste vrste uzorka niske i visoke konc. analita
- po potrebi obogaćivanje materijalom poznate koncentracije (serum, kalibrator)
- ocjena usporedbe izmjerenih i očekivanih vrijednosti

Kriteriji prihvatljivosti mogu se temeljiti na standardnim vrstama uzoraka, ali se moraju interpretirati prema kliničkoj važnosti odstupanja.

Odluka nakon provjere



Ako je učinak matriksa prisutan ili se ne može pouzdano isključiti, rezultat treba izdavati samo uz jasno naznačeno ograničenje i napomenu za kliničku interpretaciju.

PRIMJERI

QC razina 1

PARAMETAR	PONOVLJIVOST (%)			UKUPNA PRECIZNOST (%)		
	$\bar{x}$	CV (%)	SYSMEX	$\bar{x}$	CV (%)	XN CHECK BF - 1
WBC-BF ($10^6/L$)	71	5,7	10	72	6,0	35
RBC-BF ($10^9/L$)	26	2,3	40	26	2,7	35
TC-BF ($10^6/L$)	72	6,6	10	72	6,0	35

QC razina 2

PARAMETAR	PONOVLJIVOST (%)			UKUPNA PRECIZNOST(%)		
	$\bar{x}$	CV (%)	SYSMEX	$\bar{x}$	CV (%)	XN CHECK BF - 2
WBC-BF ($10^6/L$)	304	3,5	10	290	5,5	25
RBC-BF ($10^9/L$)	77	1,7	40	78	1,9	25
TC-BF ($10^6/L$)	306	3,5	10	290	5,5	25



SYSMEX XN-1000

PRIMJERI

Uzorci pacijenata

		NISKA KONCENTRACIJA			SREDNJA KONCENTRACIJA			VISOKA KONCENTRACIJA		
	PARAMETAR	$\bar{x}$	CV (%)	SYSMEX	$\bar{x}$	CV (%)	SYSMEX	$\bar{x}$	CV (%)	SYSMEX
ASCITES	WBC-BF ($10^6/L$)	57	7,6	10	363	1,2	10	973	2,8	10
	RBC-BF ($10^9/L$)	18	3,8	40	/	/	40	/	/	40
	TC-BF ($10^6/L$)	28	14,8	15	318	6,5	10	1 024,20	2,99	10
PLEURALNI IZLJEV	WBC-BF ($10^6/L$)	87	5,9	10	409	8,7	10	1 284,60	3,28	10
	RBC-BF ($10^9/L$)	19,00	3,51	40	/	/	40	123,60	3,52	40
	TC-BF ($10^6/L$)	90,83	6,40	10	532,40	9,70	10	1 398,20	3,31	10
SINOVIJALNA TEKUĆINA	WBC-BF ($10^6/L$)	/	/	10	352,00	6,05	10	766,33	3,74	10
	RBC-BF ($10^9/L$)	6,00	10,54	40	37,20	2,12	40	/	/	40
	TC-BF ($10^6/L$)	/	/	15	362,60	5,91	10	786,50	3,57	10



SYSMEX XN-1000

PRIMJERI

LINEARNOST LEUKOCITA (SINOVIJALNA TEKUĆINA)

VISOKA KONCENTRACIJA

Razrjeđenja	1. mjerenje (10 ⁹ /L)	2. mjerenje (10 ⁹ /L)	3. mjerenje (10 ⁹ /L)	Srednja vrijednost mjerenja (10 ⁹ /L)	Očekivane vrijednosti (10 ⁹ /L)
100%	71,649	66,859	65,476	67,995	67,99
50%	35,06	35,632	35,423	35,371	33,995
25%	17,87	18,003	18,169	18,014	16,997
12,5%	8,804	8,749	8,68	8,744	8,498
6,75%	3,978	4,126	4,088	4,064	4,249
3,375%	2,057	2,084	2,071	2,070	2,124
0%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Nagib (a)	1,044 (95% CI: 0,96 – 1,09)				
r	0,9997 (95% CI: 0,997 – 1,000)				

NISKA KONCENTRACIJA

Razrjeđenja	1. mjerenje (10 ⁹ /L)	2. mjerenje (10 ⁹ /L)	3. mjerenje (10 ⁹ /L)	Srednja vrijednost mjerenja (10 ⁹ /L)	Očekivane vrijednosti (10 ⁹ /L)
100%	1,225	1,021	1,065	1,103	1,104
50%	0,515	0,457	0,58	0,517	0,552
25%	0,29	0,301	0,294	0,295	0,276
12,5%	0,139	0,15	0,157	0,148	0,138
6,75%	0,076	0,081	0,093	0,083	0,069
3,375%	0,036	0,039	0,039	0,038	0,0345
0%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Nagib (a)	0,99 (95% CI: 0,89 – 1,07)				
r	0,9990 (95% CI: 0,9908 – 0,9999)				



MINDRAY BC-6200

PRIMJERI

LoB

PARAMETAR	$\bar{x}$	SD	LoB	Deklarirana vrijednost LoB-a od proizvođača MINDRAY
Leukociti($\times 10^9/L$)	0,000	0,00	0,000	$\leq 0,001 \times 10^9/L$
Eritrociti($\times 10^{12}/L$)	0,000	0,00	0,000	$\leq 0,003 \times 10^{12}/L$



MINDRAY BC-6200

PRIMJERI

LoD

LoQ

	Eritrociti (10 ⁹ /L)							Mindray BC-6200
Ponavljjanja	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3	Uzorak 4	Uzorak 5	Uzorak 6	Uzorak 7	LoD = 86,7 x 10 ⁶ /L
1	1	1	2	3	2	19	11	
2	1	1	3	3	2	18	10	
3	1	1	3	4	3	20	11	
4	1	1	2	3	2	20	11	
5	0	1	3	3	2	19	10	
6	0	1	3	4	2	18	11	LoQ = 1 x 10 ⁹ /L
7	0	1	2	3	2	18	11	
8	1	1	3	4	2	19	10	
9	1	1	3	4	2	19	12	
10	1	1	2	3	2	20	8	
$\bar{x}$	0,7	1	2,6	3,4	2,1	19	10,5	
SD	0,48	0	0,51	0,51	0,31	0,81	1,08	
CV%	69,0	0,0	19,9	15,2	15,1	4,3	10,3	
LoD=MEAN+1.645 SD _{os} (SD uzorka najniže mjerljive koncentracije s CV% > 20%)=0+1.645*0,48= <u>0,789 x 10⁹/L = 78,9 x 10⁶/L</u>								
LoQ: Srednja vrijednost uzorka najniže koncentracije s CV% < 20%. <u>LoQ=1x10⁹/L.</u>								



MINDRAY BC-6200

PRIMJERI

PARAMETAR	VRIJEDNOST UZORKA H	VRIJEDNOST UZORKA L	SREDNJI % <i>CARRYOVER-A</i>	KRITERIJI PRIHVATLJIVOSTI MINDRAY
Leukociti ($\times 10^9/L$)	24,120	1,699	0,246	$\leq 0,3\%$
	24,750	1,669		
	24,062	1,644		
Eritrociti ($\times 10^{12}/L$)	6,455	2,020	0,289	$\leq 0,3\%$
	6,540	2,011		
	6,494	2,007		



MINDRAY BC-6200

ZAKLJUČNE PORUKE

- 1 Ekstravaskularni uzorci nisu samo “proširenje” standardnih uzoraka.
- 2 Svaka kombinacija analita, metode, analizatora i vrste uzorka zahtijeva jasnu procjenu.
- 3 Verifikacija treba biti praktično izvediva, ali stručno utemeljena.
- 4 Kriteriji prihvatljivosti moraju biti povezani s kliničkom odlukom.
- 5 **Nalaz treba izdati samo kada laboratorij zna što rezultat znači i koja su mu ograničenja.**