

VALIDACIJA METODA ISPITIVANJA

VALIDATION OF TEST METHODS

Marija Karajović Zogović¹⁾, mr Vesna Matović²⁾

Rezime: Laboratorija sanitarne hemije Instituta za zaštitu zdravlja Kragujevac u postupku akreditacije mora da odgovori na niz zahteva standarda JUS ISO/IEC 17025:2001 koji su podeljeni u 5 modula. U okviru modula 5 u tački 5.4.5. definisan je zahtev koji se odnosi na validaciju metoda ispitivanja.

U ovom radu biće prikazani osnovni elementi validacione studije koja je u primeni u laboratoriji sanitarne hemije Instituta za zaštitu zdravlja, Kragujevac.

Summary: The Laboratory of Sanitary Chemistry at the Institute of Public Health Kragujevac in the process of accreditation must respond to a series of standards JUS ISO/IEC 17025:2001 which are subdivided into five modules. Within module 5, in article 5.4.5, the demand related to the research method validation has been defined.

In this work, the basic elements of validation study which is applied in The Laboratory of Sanitary Chemistry at the Institute of Public Health Kragujevac, will be shown.

1. UVOD

Standard JUS ISO /IEC 17025:2001 tačka 5.4.5 zahteva da laboratorija mora validovati:

- nestandardne metode,
 - metode projektovane i razvijene u laboratoriji,
 - standardne metode izvan predviđenog obima,
 - proširene i modifikovane standardne metode.
- i laboratorija mora da čuva:
- dobijene rezultate,
 - procedure korišćene za validaciju,
 - izjavu o tome da metoda odgovara za nameravano korišćenje.

U cilju zadovoljenja ovog zahteva standarda laboratorija sanitarne hemije Instituta za zaštitu zdravlja Kragujevac sprovodi validacionu studiju koja je prikazana kroz osnovne elemente u ovom radu.

2. KARAKTERISTIKE IZVOĐENJA

Da bi se sproveda validacija metode potrebno je identifikovati neophodne karakteristike izvođenja.

Karakteristika izvođenja je važna operativna karakteristika metode ispitivanja i obezbeđuje osnovu za izbor metode koja je prikladna za predviđenu namenu. Karakteristike izvođenja nisu konstante metode, već su njihove numeričke

vrednosti zavisne od korisnika i stoga će zavisiti od načina korišćenja metode.

Brojne karakteristike izvođenja se ocenjuju statističkim metodama kao što:

- mere centralne tendencije:
 - srednja vrednost,
 - medijana,
 - opšta srednja vrednost,
- mere disperzije:
 - standardna devijacija,
 - opseg (range),
 - udruženje procena standardne devijacije,
 - totalna varijansa (standardne devijacije unutar serija i standardne devijacije među serijama),
 - granica detekcije,
 - linearnost.

U laboratoriji sanitarne hemije Instituta za zaštitu zdravlja Kragujevac su identifikovane potrebne karakteristike izvođenja za opis metoda ispitivanja i to: limit detekcije, tačnost, preciznost, linarnost, osetljivost, opseg, selektivnost/specifičnost, a raspolaganje sledećim karakteristikama izvođenja je često poželjno: robustnost, brzina, cena.

2.1 Limit detekcije

Kriterijum detekcije je najniža vrednost za koju, sa datim nivoom poverenja (obično 95%) može da se kaže da je veća od nule.

1) Marija Karajović Zogović, dipl. maš. inž., Institut za zaštitu zdravlja Kragujevac, Nikole Pašića 1, 34000 Kragujevac, izzkg@eunet.yu

2) Mr Vesna Matović, dipl. hem, Institut za zaštitu zdravlja Kragujevac, Nikole Pašića 1, 34000 Kragujevac, izzkg@eunet.yu

Limit detekcije je najniža vrednost sa datim nivoom poverenja (obično istim kao za kriterijum detekcije) koja će dati rezultat veći od kriterijuma detekcije.

2.2 Tačnost

Tačnost metode je bliskost dobijene vrednosti tačnoj vrednosti.

Za određivanje tačnosti postoje mnoge metode:

- rikaveri test,
- poređenje sa rezultatima druge validovane ili generalno prihvaćene metode,
- međulaboratorijske studije,
- analiza sertifikovanog referentnog materijala.

2.3 Preciznost

Preciznost metode je izjava o bliskosti slaganja između međusobno nezavisnih rezultata ispitivanja.

Preciznost se izražava standardnom devijacijom i sastoji se od:

- *standardne devijacije ponovljivosti - standardna devijacija u serijama* (tip preciznosti koja odgovara merenjima izvršenim pod uslovima ponovljivosti, tj. ista metoda, isti materijal, isti operator, ista laboratorija, ista oprema, kratak period vremena),
- *standardne devijacije reproduktivnosti* (tip preciznosti koji odgovara merenjima izvršenim pod uslovima reproduktivnosti, tj. isti uzorak, ista metoda, drugi operator, druga laboratorija, druga oprema, dug period vremena) i
- *srednje mere preciznosti - standardna devijacija među serijama* (tip preciznosti koja odgovara merenjima izvršenim pod maksimalno promenljivim uslovima u jednoj laboratoriji, tj. ista metoda, ista laboratorija, različit operator, različita oprema, srednje dug vremenski period).

Neophodno je da svaka laboratorija uspostavi za svaku metodu koju koristi standardnu devijaciju među serijama i standardnu devijaciju u serijama koje zajedno određuju totalnu laboratorijsku standardnu devijaciju.

2.4 Linearnost

Linernost je mera linearne zavisnosti ulaznih i izlaznih veličina u opsegu u kome je predviđeno da se metoda sprovođa.

Namera ispitivanja linearnosti je u najvećem broju slučajeva dokumentovanje linearnog opsega metode.

2.5 Osetljivost

Osetljivost može da bude:

- konstantna za linearne sisteme (izračunava se iz nagiba linearne krive),

- promenljiva kada zavisi od veličine izmerene veličine.

2.6 Opseg

Za procenu opsega su potrebne tačnost i preciznost, naročito za gornji i donji kraj opsega. Validovani opseg nije nužno i totalni teoretski opseg metode. Dovoljno je validovati opseg u kome se metoda normalno koristi.

2.7 Robustnost

Kada različite laboratorije upotrebljavaju istu metodu one neminovno uvode male varijacije u proceduri, koje mogu ili ne moraju da imaju značajne uticaje na izvođenje metode. Robustnost metode se testira promišljenim uvođenjem malih promena i ispitivanjem posledica tih promena.

Robustnost, kao karakteristika izvođenja metode, nije neophodna da se meri u svakoj laboratoriji. Kada se koristi standardizovana metoda razumno je da se prihvati da je robustnost metode određena procedurom standardizacije.

2.8 Brzina metode

Ako se mora analizirati veliki broj uzoraka metoda koja je brza je bolja, jer se do podataka dolazi brzo i sa minimumom naprezanja i troškova.

2.9 Cena metode

Većina analitičkih laboratorija i njihovi korisnici su zainteresovani za cenu metode ispitivanja. Mada su glavni faktor u ceni osoblje, rad i održavanje laboratorije, cena metode ispitivanja može imati doprinos u ukupnoj ceni posla.

Izbor metode će zavistiti od nekoliko faktora, najznačajniji su sedam osnovnih karakteristika izvođenja ranije spomenute. Koraci u proceduri za odabir metode su prikazani šematski na sl. 1

3. VALIDACIJA METODA

Izrazi validacija i verifikacija se često koriste zajedno kada se procenjuju zahtevi za validaciju metode. Verifikacija je, uopšte, manje strog proces nego validacija. U standardu JUS ISO 9000:2001 – Sistem menadžmenta kvalitetom. Osnove i rečnik date su sledeće definicije:

„**Verifikacija.** Potvrđivanje pružanjem objektivnog dokaza da su ispunjeni specifikirani zahtevi.

Napomena 1: termin "verifikovan" se koristi da označi odgovarajući status.

Napomena 2: Potvrđivanje može sadržati, na primer, sledeće aktivnosti:

- obavljanje alternativnih proračuna,
- upoređivanje nove projektne specifikacije sa sličnom odobrenom projektom specifikacijom,
- preduzimanje ispitivanja i prikazivanja,
- preispitivanje dokumenata pre izdavanja.

Validacija. *Potvrđivanje pružanjem objektivnog dokaza da su ispunjeni zahtevi za specifičnu predviđenu upotrebu ili primenu.*

Napomena 1: termin "validan" se koristi da označi odgovarajući status.

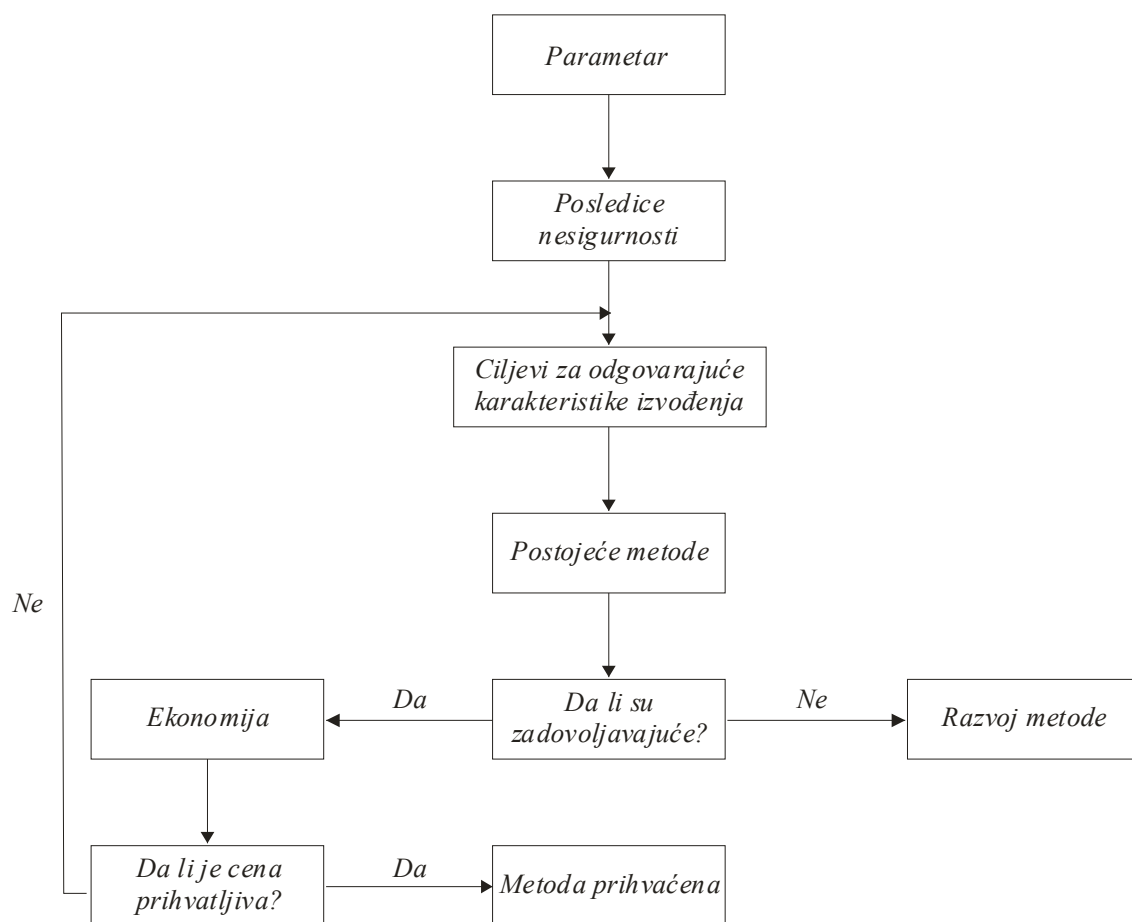
Napomena 2: uslovi za validaciju mogu biti stvarni ili simulirani."

Proces validacije se realizuje kroz sledeće faze:

- uspostavljanje ciljeva vezano za karakteristike izvođenja,

- dobijanje podataka o karakteristikama izvođenja,
- dokumentovanje validacionog procesa,
- zaključci o primenljivosti metode za namenjenu svrhu.

Ako je metoda validovana i nema novih zahteva, laboratorija može da odluči da potvrdi važne karakteristike izvođenja. Zavisno od situacije validacija može da obuhvati verifikaciju nekoliko karakteristika do potpune validacije metode.



Slika 1 - Proces odlučivanja pri odabiranju metoda isptivanja

Primeri verifikacije su:

- provera linearnosti na nekoliko nivoa manje nego u originalnoj validaciji,
- upoređivanje rezultata pre i posle modifikacije,
- provera preciznosti sa manje ponavljanja nego u originalnoj validaciji.

Stepen u kojem će se metoda validovati zavisi od tipa metode i okolnosti koje zahtevaju da se validacija izvede.

Različiti slučajevi koji se dešavaju u svakoj laboratoriji, mogu da iniciraju validaciju metode. Različiti takvi događaji i vodič za obim validacije

metode u pretpostavljenim slučajevima je dat u tab. 1.

3.1 Dobijanje podataka za karakteristike izvođenja

Validacija metode se može izvesti na mnogo načina.

Izvođenje jednog eksperimenta za drugim u cilju određivanja svih karakteristika izvođenja treba izbegavati, s obzirom da se svaki eksperiment, u mnogim slučajevima, može koristiti u oceni nekoliko karakteristika izvođenja.

U tom smislu je neophodna pažljiva razrada eksperimentalnog plana pre početka laboratorijskog rada. To će eliminisati probleme tokom validacionog procesa i u mno-gim slučajevima može uštedeti značajno vreme

koristeći iste rezultate merenja za ocenu više od jedne karakteristike izvođenja.

Tabela 1 - Vodič za obim validacije metoda za različite slučajeve u laboratoriji

Slučaj	Postupak	
1	Nova metoda je razvijena u laboratoriji. To je standardna metoda sa matriksom koji nije pokriven metodom	Puna interna validacija
2a	Metoda je objavljena u naučnom časopisu, ali bez najznačajnijih karakteristika izvođenja	Puna validacija kako je specificirano
2b	Metoda je objavljen u naučnom časopisu sa najvažnijim karakteristikama izvođenja	Laboratorija će potvrditi sposobnost da postigne date karakteristike izvođenja i oceniti potrebu da specificira bilo koju nedostajuću karakteristiku izvođenja
3a	Metoda je standardizovana i dobro ustanovljena, ali podaci o eksternoj validaciji nisu dostupni	Laboratorija će oceniti potrebu da validuje karakteristike izvođenja koje su kritične za metodu
3b	Metod je objavljen od strane jedne od organizacija za standardizaciju, npr. AOAC, CEN, ISO i NMKL. Metoda je eksterno validovana.	Laboratorija će potvrditi svoju sposobnost da zadovolji specificirane karakteristike izvođenja metode. Robustnost se može prihvatiti kao testirana i ne mora se testirati u laboratoriji
	Metoda je dobro uspostavljena, ali je modifikovana u laboratoriji	Gde modifikacija može da ima mogući efekat na karakteristiku izvođenja, karakteristika će se validovati
	Izmena metode	Obim validacije je isti kao za 2 i 3
	Proširenje radnog opsega za validovanu metodu	Limit detekcije, preciznost, linearnost i opseg se moraju testirati u novom opsegu
	Nova oprema, zasnovano na istoj metodi merenja	Limit detekcije, preciznost, linearnost i opseg se moraju testirati
	Nov analitičar	Limit detekcije, preciznost, tačnost se moraju testirati

3.2 Dokumentovanje validacionog procesa

Validacija metode bi trebalo da rezultuje izveštajem o validaciji. U izveštaju su inicijalno pokrivena sledeće tačke:

- opis validacije;
- ciljevi koji se odnose na karakteristike izvođenja za metodu ispitivanja: limit detekcije, preciznost, tačnost i opseg su generalno značajni. Ako je moguće, koriste se zahtevi korisnika i nadređenih institucija. Ako nisu dostupni ostaje na laboratoriji da definiše ciljeve na osnovu namene rezultata merenja. Za standardizovanu metodu ciljevi će biti najmanje da laboratorija bude sposobna da zadovolji specifikaciju datu u standardu metode;
- planiranje tipa korišćenih uzoraka, osnove za izbor eksperimentalnog plana i druge stvari koje opisuju zašto je metod validacije upravo tako planiran;
- rezultati i njihova statistička obrada;
- zaključci o validaciji: dobijeni rezultati se moraju oceniti prema cilje-vima. Zaključak se može sažeti u uverenju o validaciji metode.

Na osnovu studije validacije metode se uspostavljaju karakteristike izvođenja metode. Stalno je važno kontrolisati da karakteristike ostaju na uspostavljenom nivou. To se čini internom

kontrolom kvaliteta gde se istražuje limit detekcije, tačnost i preciznost, a rezultati upoređuju sa onim u uverenju o validaciji metode. Preporučuje se da se to čini s vremena na vreme da bi se uočile postepene promene u karakteristikama izvođenja.

Osim toga validacioni proces se mora ponoviti kad god dođe do promena kao što su one opisane u tab. 1.

4. VALIDACIONI POSTUPAK ISPITIVANJA GVOŽDA U VODI ZA PIĆE

4.1 Opis i izvor metode

Gvožđe, prisutno u vodi u Fe (II)-obliku, oksiduje se azotnom kiselinom do Fe (III)-oblika, a onda u prisustvu KSCN (kalijum-tiocijanata), podleže reakciji građenja kompleknog jedinjenja, karakteristične crvene boje, čiji je intenzitet proporcionalan koncentraciji i meri se spektrofotometrijski, u vidljivoj oblasti, na 480 nm.

Metoda je objavljena u knjizi "VODA ZA PIĆE", Standardne metode za ispitivanje higijenske ispravnosti od strane Saveznog zavoda za zdravstvenu zaštitu, NIP Privredni pregled, Beograd, 1990. god., na 346 strani.

4.2 Zahtevane karakteristike izvođenja

U knjizi u kojoj je metoda objavljena su definisane zahtevane karakteristike izvođenja za osetljivost i limit detekcije.

Laboratorija za sanitarnu hemiju je odlučila da specificira nedostajuće karakteristike izvođenja kao što su linearni opseg, preciznost i tačnost.

Validacionim postupkom laboratorija za sanitarnu hemiju treba da potvrdi sposobnost da postigne postavljene zahteve za karakteristike

4.3 Validacioni postupak

Karakteristika izvođenja	Plan ispitivanja	Broj merenja	Rezultati validacionog postupka
Linearni opseg	- sintetički rastvor gvožđa, pripremljen od soli gvožđa, (gvožđe(II)-amonijum-sulfat), takav da 1 ml sadrži 10µgFe - od njega pripremiti seriju od 7 rastvora različitih koncentracija u opsegu od 0,04 do 1,00 µg Fe/ml	dupli uzorci	0,08-1,00 mgFe/l
Osetljivost	- iz podataka dobijenih pri određivanju linearnosti		0,01 mgFe/l
Limit detekcije	- koristiti prirodni uzorak vode sa malim sadržajem gvožđa	dupli uzorci u 6 serija	0,09 mgFe/l
	- „slepa proba” (reagensi, bez uzorka)	dupli uzorci u 6 serija	0,09 mgFe/l
Preciznost	- prirodni uzorci vode sa različitim sadržajem gvožđa (0,30; 0,40; 0,50; 1,00 mg/l)	dupli uzorci u 10 serija	4,84% (0,355 mgFe/l) 3,31% (0,452 mgFe/l) 3,38% (0,548 mgFe/l) 6,36% (1,014 mgFe/l).
Tačnost	- sintetički standard gvožđa (0,10 mg/l i 0,20 mg/l) dodati prirodnom uzorku vode, poznate koncentracije gvožđa, radi dobijanja obogaćenog (spajkovanog) uzorka. Razlika između prirodnog i spajkovanog uzorka daje rikaveri.	dupli uzorci u 10 serija	92,3%-107,7% (0,10 mgFe/l) 91,9%-106,3% (0,20 mgFe/l)

Rezultati validacije prikazani u tabeli 3 ukazuju da je laboratorija sanitarne hemije zadovoljila zahtevane karakteristike izvođenja definisane u tabeli 2, na osnovu čega se metoda ispitivanja gvožđa u vodi za piće prihvata kao validovana.

5. ZAKLJUČAK

Stepen u kojem će se metoda ispitivanja validovati zavisi od tipa metode i okolnosti koje zahtevaju da se validacija izvede.

Planiranje validacije metode ispitivanja mora da se zasniva na zahtevima za specifičnu metodu kao i na korišćenju tako dobijenih podataka.

Ne treba zaboraviti činjenicu da validacija metode ne zamenjuje bilo koju od aktivnosti za osiguranje kvaliteta u dnevnom radu kao npr. internu kontrolu kvaliteta, učešće u međulaboratorijskim studijama (eksterna kontrola kvaliteta) itd.

izvođenja metode određivanja gvožđa u vodi za piće (tabela 2).

Tabela 2- Zahtevane karakteristike izvođenja metode određivanja gvožđa u vodi za piće

Linearni opseg	0,08 – 1,00 µg Fe/ml
Osetljivost	0,05µg Fe/ml
Limit detekcije	0,22µg Fe/ml
Preciznost	10%
Tačnost	100 ± 10%

LITERATURA

- [1] ISO 5725 (1986): Precision of test methods - Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests
- [2] EAL-P1: Validation of Test Methods, General principles and concepts, Edition 1, February 1997.
- [3] Guidance for Industry: Analytical procedures and methods validation. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA, 2000.
- [4] ICH Q2B: Validation of Analytical Procedures: Methodology, May 1997.
- [5] VODA ZA PIĆE, Standardne metode za ispitivanje higijenske ispravnosti, Savezni Zavod za zdravstvenu zaštitu NIP Privredni pregled, Beograd, 1990.
- [6] Dokumentacija QMS Instituta za zaštitu zdravlja Kragujevac