

STRUČNI RAD – PROFESSIONAL PAPER

UDK 619:57.083:389.64

**VALIDACIJA LABORATORIJSKIH DIJAGNOSTIČKIH
METODA U SISTEMU KVALITETA ***
*LABORATORY DIAGNOSTIC METHODS, SYSTEM OF QUALITY AND
VALIDATION*

Ružica Ašanin, Branka Vidić, D. Krnjaić**

Poznato je da se na osnovu laboratorijskih ispitivanja, konačna potvrda kvaliteta rada ostvaruje dobijanjem sigurnih i pouzdanih rezultata. Ideje, planiranje, znanje, veština, iskustvo i okruženje, uz dobru laboratorijsku praksu, kontrolu kvaliteta i pouzdanost kvaliteta čine oblast bioloških ispitivanja veoma složenom. Poslednjih godina kontrola kvaliteta je uključujući i kontrolu rada u laboratoriji, zasnovana na međunarodnim standardima i na tom nivou se i koristi. Primena široko priznatih međunarodnih standarda, kao što je Internacionalni standard ISO/IEC 17025 (9) i implementiranje sistema kvaliteta serije ISO/IEC 9000 (7), postala je imperativ na osnovu koga laboratorije imaju formalni, vidljiv i odgovarajući sistem kvaliteta. Dijagnostičke metode koje se primenjuju moraju konstantno da daju rezultate koji identifikuju životinju kao pozitivnu ili negativnu, na osnovu čega se određuje tačan status životinje sa prethodno definisanim stepenom statističke sigurnosti. Metode primenjene na odabranu populaciju, smanjuju rizik od dobijanja lažno pozitivnog i lažno negativnog rezultata. Uslov za to su dobro osmišljene i dokumentovane metode uz primenu odgovarajućih reagenasa i rad sa stručnim i obučanim osobljem. Ovaj proces zahteva i doslednu primenu najrigoroznijih eksperimentalnih planova, epidemioloških i statističkih podataka i procena, uz stalan monitoring validnosti primenjenih metoda. Ovakvi pristupi su potrebni radi smanjenja pogrešnih pretpostavki i slučajnih grešaka kada je u pitanju referentna populacija životinja na kojoj se proverava validnost metode. Kada se validne metode uvrste u svakodnevna rutinska ispitivanja, neophodno je da se primenom stalnog monitoringa, sprovodi interna kontrola kvaliteta kako bi se na adekvatan način procenila njegova ponovljivost i

* Rad primljen za štampu 15. 3. 2005. godine

** Dr Ružica Ašanin, redovni profesor, Katedra za mikrobiologiju, Fakultet veterinarske medicine, Beograd; dr Branka Vidić, viši naučni savetnik, Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Novi Sad; dr Dejan Krnjaić, docent, Katedra za mikrobiologiju, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

pouzdanost. Takođe je potrebno sprovesti i uporedna međulaboratorijska ispitivanja o reproducibilnosti korišćenih metoda najmanje dva puta godišnje. Imajući u vidu iznete činjenice može da se zaključi da će dobra laboratorijska praksa, kao i implementacija potpunog programa za obezbeđenje kvaliteta u bliskoj budućnosti postati neophodne za sve laboratorije koje su zainteresovane za dobijanje nacionalnih i međunarodnih sertifikata.

Ključne reči: dijagnostika, sistem kvaliteta, validacija

Uvod / Introduction

Sistem kvaliteta u laboratoriji za dijagnostikovanje zaraznih bolesti životinja obuhvata aktivnosti i ključne elemente kvaliteta koji predstavljaju: okruženje laboratorije, izbor odgovarajuće metode, kontrolu metoda, uspostavljen sistem upravljanja kvalitetom (politika kvaliteta, poslovnik, procedure i drugo), upoređivanje standarda i planiranje, važeće standarde i uputstva (međunarodni i nacionalni nivo) [7, 9].

Pre razvijanja ili izvođenja bilo koje metode, laboratorija mora da ima odgovarajuće prostore i resurse što podrazumeva laboratorijski prostor i osoblje. Kvalitet može da se definiše kao pogodan za nameravanu upotrebu, što podrazumeva, u ovom slučaju, kontrolu metode koja se ispituje. Izbor odgovarajućih metoda ispitivanja mora da je zasnovan i na činiocima optimizacije metode ispitivanja i validacije metode koja se ispituje.

Bez obzira kako je dobro pripremljena (proizvedena), metoda mora da se kontroliše radi dobijanja pouzdanih rezultata. Aktivnosti i materijali koji su potrebni za izvođenje kontrole obuhvataju tehničke uslove (oprema, potrošni materijal i slično), protokole izvođenja metode, kao i ostale aktivnosti (ispravno rukovanje i kalibracija instrumenata i opreme, nabavke, planiranja i slično).

Validacija laboratorijskih metoda / Validation of laboratory methods

Nakon obavljene validacije, metoda koja se primenjuje u ispitivanjima konstantno mora da daje rezultate koji identifikuju životinju kao pozitivnu ili negativnu, na osnovu čega se određuje tačan infektivni status životinje sa prethodno definisanim stepenom statističke sigurnosti. Ovakve metode, primenjene na odabranu populaciju, smanjuju rizik od dobijanja lažno pozitivnog i lažno negativnog rezultata. Uslov za to je dobro osmišljena i dokumentovana metoda i primena odgovarajućih reagenasa, kao i stručno i obučeno osoblje. Sam proces validacije zahteva i doslednu primenu najrigoroznijih eksperimentalnih planova i epidemioloških i statističkih pomoćnih postupaka. Ovo je neophodno kako bi se smanjila pogrešna pretpostavka i slučajna greška na referentnoj populaciji životinja na kojoj se proverava validnost metoda.

Ispitivanje validacije neke metode se odvija postupno kroz pet faza:

1. ispitivanje primenljivosti metoda za određenu namenu;
2. izbor, optimizacija i standardizacija reagenasa, tehnika i metoda;
3. određivanje performansi metoda;
4. praćenje validnosti metoda i
5. nadzor i unapređenje validacionih kriterijuma u rutinskom radu.

Faza 1. Primenljivost metode za određenu namenu /

Phase 1. Applicability of special-purpose methods

Ovaj postupak predstavlja početnu fazu u validaciji nove metode i daje procenu u pogledu ponovljivosti, analitičke osetljivosti i specifičnosti. Njime je obuhvaćen izbor uzoraka i metode koja obezbeđuje dobijanje adekvatnih rezultata, uz obavezno poznavanje i primenu međunarodnih standarda. Na ovaj način će se omogućiti poređenje i harmonizacija metode koja se ispituje u odnosu na standardnu metodu za ovakve namene koja se primenjuje u svetu.

Faza 2. Razvoj i standardizacija metode ispitivanja

Phase 2. Development and standardization of investigation methods

Nakon što je metoda definisana kao primenljiva, pristupa se njenom razvoju i standardizaciji odabranih reagenasa i protokola.

Selekcija optimalnih koncentracija reagenasa i parametara protokola uključuje procenu tačnosti i pouzdanosti reagenasa i protokola tako što se tokom izvođenja metode, u svaku fazu uvodi jedan ili više standardnih seruma sa poznatim nivoom aktivnosti. Optimizovana metoda koja u više ponavljanja daje iste rezultate za standardni serum i kontrolne serume može da se označi kao merodavna.

Preliminarna procena ponovljivosti je neophodna da bi se pristupilo daljem razvoju metode. Ovo se postiže tako što se procenjuju rezultati iz više ponovljenih ispitivanja.

Postupak određivanja analitičke senzitivnosti i specifičnosti obuhvata parametre koji se razlikuju od dijagnostičke senzitivnosti i specifičnosti. Analitička senzitivnost metoda je najmanja utvrđena količina produkta koji se detektuje, a analitička specifičnost je stepen u kome primena ove metode isključuje unakrsne reakcije. Analitička specifičnost se procenjuje pomoću seruma životinja koje su bile izložene infekciji čiji uzročnici mogu da stimulišu stvaranje antitela koja izazivaju unakrsnu reaktivnost. Metode niske specifičnosti mogu da se koriste kao „skrining testovi” u situacijama kada je neophodno da se ispita veliki broj uzoraka, ali samo ukoliko pokazuju visoku senzitivnost, ili ako je na raspolaganju „potvrđna” metoda visoke specifičnosti [6, 8].

Faza 3. Određivanje performansi metoda /

Phase 3. Determination of method performances

Procena *dijagnostičke senzitivnosti* i *dijagnostičke specifičnosti* su primarni parametri u validaciji metode. Oni su osnova za izračunavanje drugih parametara na osnovu kojih se donosi zaključak o valjanosti metode.

Dijagnostička osetljivost je odnos koji se dobija poređenjem poznatih inficiranih referentnih životinja koje su primenjenom metodom registrovane kao pozitivne i životinja za koje je primenjenom metodom dobijen negativan rezultat (lažno negativne životinje).

Dijagnostička specifičnost je odnos dobijen između neinficiranih referentnih životinja koje su primenjenom metodom reagovala negativno i neinficiranih životinja koje su istom metodom bile pozitivne (lažno pozitivne životinje).

Broj i izvor referentnih uzoraka koji se koriste u određivanju dijagnostičke senzitivnosti i specifičnosti su od velike važnosti, pre svega kada je metoda namenjena za ispitivanje velike populacije životinja.

„Standard poređenja” je metoda ili kombinacija metoda na osnovu čijih se rezultata poredi rezultati dobijenih novom metodom. Iako se obično koristi izraz „zlatni standard” kako bi se opisalo bilo koje poređenje standarda, treba se ograničiti na metode koje nedvosmisleno klasifikuju životinje kao inficirane ili neinficirane. Pojedine metode izolacije su problematične u pogledu ponovljivosti i senzitivnosti. „Zlatne standardne metode” uključuju pouzdanu izolaciju agensa ili patognomonične promene registrovane na osnovu histopatoloških nalaza. Pošto nije moguće postići pravi „zlatni standard”, često su neophodni relativni standardi poređenja, koji uključuju rezultate drugih seroloških metoda na eksperimentalno inficiranim ili vakcinisanim životinjama. „Zlatni standard” je osnovna pretpostavka za pouzdano izračunavanje dijagnostičke osetljivosti i specifičnosti, dok se na osnovu *ponovljivosti* i *reproducibilnosti* procenjuje tačnost metode.

Preciznost je merilo za odstupanje rezultata kod ponovljenog ispitivanja istog uzorka, pri čemu precizno ispitivanje pokazuje mali stepen odstupanja.

Ponovljivost u dijagnostičkom ispitivanju predstavlja broj koji pokazuje slaganje rezultata ponovljenih ispitivanja (najčešće) za svaki uzorak u seriji ispitivanja i stepen slaganja između serija sa referentnim vrednostima za svaki kontrolni uzorak.

Reproducibilnost podrazumeva usaglašenost rezultata dobijenih ispitivanjem istih uzoraka u različitim laboratorijama.

Tačnost je stepen usaglašenosti vrednosti metode i očekivane vrednosti za ispitivane i standardne uzorke poznate aktivnosti i sastava (na primer, titar ili koncentracija). Postupak ispitivanja može da bude precizan, ali ne i tačan, ako se rezultati dobijeni ispitivanom metodom ne slažu sa očekivanim vrednostima standarda.

Prag/granica kategorizacije (cut-off tačka) predstavlja najnižu ili najveću vrednost na skali na osnovu koje se nalaz definiše kao pozitivan ili negativan.

Metoda koja se ispituje može da se upoređuje i harmonizuje sa međunarodnom standardnom metodom, ukoliko je ona na raspolaganju. Ovaj proces zahteva primenu istog kontrolnog seruma i/ili standarda u obe metode.

*Faza 4. Praćenje (monitoring) validnosti metode /
Phase 4. Monitoring of method validity*

Analiza dobijenih rezultata metode je korisna jedino ako su zaključci koji iz nje proizilaze tačni. Česta greška koja se javlja je pretpostavka da će metoda sa stopama dijagnostičke specifičnosti i dijagnostičke osetljivosti od 99 posto dati jedan lažno pozitivan i jedan lažno negativan rezultat na svakih 100 ispitanih životinja iz odabrane populacije. Primenjena metoda može da bude precizna i tačna, ali dobijeni rezultati metode ne mogu tačno da predvide infektivni status jedinke i zbog toga se takva metoda ne može da smatra potpuno validnom. Sve prethodno izneto zahteva obavezno uvođenje nadzora i unapređenja validacionih kriterijuma u rutinskom radu.

*Faza 5. Nadzor i unapređenje validacionih kriterijuma u rutinskom radu /
Phase 5. Supervision and promotion of validation criteria in routine work*

Nadzor i unapređenje validacionih kriterijuma u rutinskom radu su neophodni iz razloga što je za validnu metodu potrebna stalna kontrola i njeno unapređivanje. Kada se metoda uvede u rutinsku primenu, pored sprovođenja interne kontrole kvaliteta metoda, svakodnevnim ispitivanjem u cilju procene ponovljivosti i pouzdanosti metoda, neophodna su i međulaboratorijska ispitivanja radi utvrđivanja reproducibilnosti metode najmanje dva puta godišnje [13, 15].

Imajući u vidu sve činjenice vezane za problematiku o kojoj je reč može da se zaključi da će dobra laboratorijska praksa, uz primenu kompletnog programa za obezbeđenje kvaliteta u bliskoj budućnosti postati neophodni za sve laboratorije koje su zainteresovane za dobijanje nacionalnih i međunarodnih certifikata.

Rad po pozivu referisan na 16. savetovanju veterinara Srbije, Zlatibor

Literatura / References

1. American National Standards Institute: ANSI/NSLZ540-2-1997, US Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, First Edition, American National Standards Institute, 1819 L Street, NW Washington, DC 20036, USA, 1997. - 2. Cembrowski G. S., Sullivan A. M.: Quality control and statistics. In: An introduction to Clinical Chemistry, Bishop M. L., Duben-Engelkrik J. L. and Fody E. P., eds Lippincott, Philadelphia, USA, 63-101, 1992. - 3. Enoe C., Georgiadis M. P., Johnson W. O.: Estimating the sensitivity and specific-

ity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease state is unknown. *Prev. Vet. Med.* 45, 61-81, 2000. - 4. Greiner M., Gardner I.: Epidemiologic issue in the validation of veterinary diagnostic tests *Vet. Prev. Med.*, 45, 3-22, 2000. - 5. Greiner M., Pfeiffer D., Smith R. D.: Principles and practical application of the receiver operating characteristic (ROC) analysis for diagnostic tests. *Vert. Prev. Med.*, 45, 23-41, 2000. - 6. Hui S. L., Walter S. D.: Estimating the error rates of diagnostic tests. *Biometrics*, 36, 167-171, 1980. - 7. ISO International Standard 9001: Quality management systems--Requirements. International Organisation for Standardisation (ISO), ISO Central Secretariat, 1 rue de Varembe, Case Postale 56, CH - 1211, Geneva 20, Switzerland, 2000. - 8. ISO/IEC International Standard 17025: General Requirement for the Competence of Testing and Calibration Laboratories, International Organisation for Standardisation (ISO), ISO Central Secretariat, 1 rue de Varembe, Case Postale 56, CH - 1211, Geneva 20, Switzerland, 1999. - 9. Jacobson R. H.: Validation of serological assay for diagnosis of infectious disease. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 17, 469-486, 1998. - 10. Kljajić R., Nedić D., Aćamović N., Vidić B., Petrović J.: Integrirani sistemi za bezbednost hrane-Integrated systems for food safety, *Veterinarski žurnal Republike Srpske*, I, 1/2, 50-58, (srp), R61 2,0, 2003. - 11. Kljajić R., Vidić B., Petrović J.: Standardi za bezbednost hrane (Standards for food safety). *Savremeni trendovi u mlekarstvu, Simpozijum mlekarske industrije Srbije i Crne Gore*, 07-11. maj, Zlatibor, Beograd, Zajednica stočarstva, 6-10 (srp), R65 0,5, 2003. - 12. Kljajić R., Vidić B., Tešić M., Ušćebrka G.: Standardisation and quality as a precondition of successful agricultural production and food safety - Standardizacija i kvalitet kao preduslovi uspešne poljoprivredne proizvodnje i bezbednosti hrane. *Proceedings, 5th International Congress (i) 31st National Conference of Yusq, 20th-24th 2004. Beograd, Beograd, JUSK udruženje Srbije i Crne Gore za kvalitet i standardizaciju*, 2004. - 13. Office International Des Epizooties: OIE Guide 3: Laboratory Proficiency Testing. In: *OIE Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Disease*. OIE, Paris, France, 53-63, 2002. - 14. Office International Epizooties: Standard for Management and Technical Requirement for Laboratories Conducting Tests for Infectious Animal Disease. In: *OIE Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Disease (2002)*. Office International des Epizooties (OIE), 12 rue de Prony, 75017 Paris, France 1-31, 2000. - 15. Wright P. F.: International standards for test methods and reference sera for diagnostic tests for antibody detection. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, 17, 527-533, 1998.

ENGLISH

LABORATORY DIAGNOSTIC METHODS, SYSTEM OF QUALITY AND VALIDATION

Ružica Ašanin, Branka Vidić, D. Krnjaić

It is known that laboratory investigations secure safe and reliable results that provide a final confirmation of the quality of work. Ideas, planning, knowledge, skills, experience, and environment, along with good laboratory practice, quality control and reliability of quality, make the area of biological investigations very complex. In recent years, quality control, including the control of work in the laboratory, is based on international standards and is used at that level. The implementation of widely recognized international standards, such as the International Standard ISO/IEC 17025 (1) and the implementing of the quality system series ISO/IEC 9000 (2) have become the imperative on the grounds of which laboratories have a formal, visible and corresponding system of quality. The diagnostic methods that are used must constantly yield results which identify the animal as positive or

negative, and the precise status of the animal is determined with a predefined degree of statistical significance. Methods applied on a selected population reduce the risk of obtaining falsely positive or falsely negative results. A condition for this are well conceived and documented methods, with the application of the corresponding reagents, and work with professional and skilled staff. This process requires also a consistent implementation of the most rigorous experimental plans, epidemiological and statistical data and estimations, with constant monitoring of the validity of the applied methods. Such an approach is necessary in order to cut down the number of misconceptions and accidental mistakes, for a referent population of animals on which the validity of a method is tested. Once a valid method is included in daily routine investigations, it is necessary to apply constant monitoring for the purpose of internal quality control, in order adequately to evaluate its reproducibility and reliability. Consequently, it is necessary at least twice yearly to conduct comparative inter-laboratory investigations of the reproducibility of the used methods. Having in mind the above presented facts, it can be concluded that good laboratory practice, as well as the implementation of a complete program for security quality, will in the near future become necessary for all laboratories which are interested in acquiring national and international certificates.

Key words: Diagnostics, quality system, validation

РУССКИЙ

ЛАБОРАТОРНЫЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ, СИСТЕМА КАЧЕСТВА И НАДЕЖНОСТЬ

Ружица Ашанин, Бранка Видич, Д. Крняич

Известно, что на основе лабораторных испытаний, конечное подтверждение качества работы осуществляется получением уверенных надёжных результатов. Идеи, планирование, знание, искусство, опыт и окружение при хорошей лабораторной практике, контроле качества и надёжности качества составляют область биологических испытаний очень сложной. Последних лет контроль качества, включая и контроль работы в лаборатории, обоснован на международных стандартах и на этом уровне и пользуется. Применение широко признанных международных стандартов, как Интернациональный стандарт ISO/IEC 17025 (1) и применение системы качества серии ISO/IEC 9000 (2), стало требованием на основе которого лаборатории имеют формальную, видимую и соответствующую систему качества. Диагностические методы, применяемые должны постоянно давать результаты, идентифицирующие животное как положительное или отрицательное, на основе чего определяется точный статус животного с предыдуще определённой степенью статистической уверенности. Методы, применённые на отобранную популяцию, уменьшают риск от получения ложно положительного и ложно отрицательного результата. Условие для того хорошо осмысленные и документированные методы при применении соответствующих реагентов и работа с специальным и обученным персоналом. Этот процесс требует и последовательное применение наиболее ригористичных экспериментальных планов, эпидемиологических и статистических данных и оценок, при постоянном мониторинге надёжности применённых методов. Такие (по качеству) подходы нужны ради уменьшения ошибочных предположений и

случайных ошибок, когда вопрос референтная популяция животных на которой проверяется надёжность метода. Когда надёжный метод зачислится в ежедневные умелые испытания, необходимо применением постоянного мониторинга, проводить внутренний контроль качества как бы на адекватный способ оценилась его повторяемость и надёжность. Также и сравнительные междулабораторные испытания о репродуцировании использованных методов нужно проводить меньше всего два раза ежегодно. Имея в виду вперёд, приведённые факты можно сделать вывод, что хорошая лабораторная практика словно и применение полной программы для обеспечения качества в близком будущем станут необходимые для всех лабораторий, заинтересованные для получения национальных и международных сертификатов.

Ключевые слова: диагностика, система качества, надёжность