

Odabir, verifikacija i validacija laboratorijskih metoda

Zlatko GRGIĆ, dipl. ing. univ. spec.

Svaki laboratorij nastoji dati brze, točne i pouzdane rezultate svojih aktivnosti, a da bi se to postiglo primjenjuje odgovarajuće metode ispitivanja, umjeravanja ili uzorkovanja. Uz odabir metode vrlo važno je utvrditi sposobnost laboratorija da u svojim uvjetima primjenom odabrane metode postiže željeni cilj. Zato je potrebno da na prikladan način provjeri metodu i tako potvrdi da ona služi željenoj svrsi. To se postiže njezinom verifikacijom i validacijom.

Iako je i staro izdanje norme HRN EN ISO/IEC 17025:2007 zahtijevalo da laboratorij ima jasna pravila za odabir, verifikaciju i validaciju metode u novom izdanju norme HRN EN ISO/IEC 17025:2017 to je posebno naglašeno i jasnije razrađeno. Zahtjev je norme da je metoda ispitivanja, umjeravanja ili uzorkovanja prikladna za namijenjenu joj svrhu tako da kupac usluge može imati povjerenje u rezultat koji se dobije njezinom primjenom. Pod metodom se ne podrazumijeva samo način provedbe određenog procesa i obrada podataka, nego ona obuhvaća i alate, reagense, uređaje, platforme, proračune i softvere koji se upotrebljavaju u njezinoj primjeni. Čitav taj sklop mora biti dobro povezan da bi laboratorij mogao postići ono što se od njega traži, zato on metodu koju će upotrebljavati treba pomno odabrati i preispitati.

Odabir metoda

Prema zahtjevu norme HRN EN ISO/IEC 17025:2017, laboratorij mora upotrebljavati prikladne metode i postupke za svoje aktivnosti (ispitivanja, umjeravanja ili uzorkovanja). Izraz „metoda” smatra se istoznačnicom s izrazom „mjerni postupak” koji se u Međunarodnom mjeriteljskom rječniku definira kao *podroban opis mjerenja u skladu s jednim ili više mjernih načela i danom mjernom metodom, na temelju mjernog modela i uključujući svaki izračun kako bi se dobio mjerni rezultat*. U istom rječniku daju se napomene koje upućuju na to da metoda mora biti dostatno dokumentirana da bi onaj koji je primjenjuje mogao provesti potrebna ispitivanja, umjeravanja ili uzorkovanja i da metoda može imati ciljnu mjernu nesigurnost.

Što bi to značilo „prikladna” metoda? Svaka metoda ima svoje područje primjene unutra kojeg ona daje rezultate koji su točni, čitljivi, razumljivi, izvorni, pouzdani i ponovljivi. Ta svojstva metoda je zadobila putem validacije koja je i temelj za određivanje njezinog područja primjene. Dakle, metoda koja nije validirana ni u kom slučaju ne može biti prikladna, jer ne postoji nikakva sigurnost da se s njom unutar nekog područja mogu dobiti valjani podaci. Stoga je validacija preduvjet za primjenu metode. Takvu metodu je, u daljnjem koraku, potrebno verificirati u uvjetima rada laboratorija, a u nekim slučajevima potrebno je provesti ponovnu validaciju ili dopunu validacije, ovisno o metodi, ispitivanju koje se provodi i veličinama koje se određuju.

Cilj svakog laboratorija je upotrebljavati metode koje daju valjane rezultate na temelju kojih se donose odgovarajuće odluke. Zato je odabir, verifikacija i validacija metoda važan korak u procesu ispitivanja i umjeravanja.

Kupac laboratorijskih usluga može, ali i ne mora poznavati metode ispitivanja, umjeravanja i uzorkovanja. U slučajevima kad on ne odredi metodu, onda je to dužnost laboratorija. Pri odabiru metoda laboratorija može upotrebljavati metode objavljene u međunarodnim, regionalnim ili nacionalnim normama, u stručnim tekstovima ili časopisima, u publikacijama proizvođača, može se koristiti metodama koje je sam razvio ili prilagodio. Kupac se, naravno, sukladno zahtjevima norme HRN EN ISO/IEC 17025 mora složiti s laboratorijskim odabirom metode. Tu treba imati na umu da su neke laboratorijske aktivnosti zakonski definirane, što znači da je primjena određenih metoda za određene aktivnosti strogo definirana propisima. U tom slučaju laboratorij je dužan primjenjivati propisane metode te s tim upoznati kupca. Međutim, propisi ponekad ne moraju biti jednoznačni pa se i tu mora provesti odabir metode. Na primjer, *Pravilnik o tehničkim zahtjevima za građevine odvodnje otpadnih voda, kao i rokovima obvezne kontrole ispravnosti građevina odvodnje i pročišćavanja otpadnih voda (NN 3/2011)* definira da se ispitivanje vodonepropusnosti cjevovoda ispituje prema normi HRN EN 1610. Ta norma daje mogućnost da se ispitivanje provede s jednim od dva postupka: postupak vodom i postupak zrakom. U tom se slučaju kupac usluge ispitivanja vodonepropusnosti i laboratorij moraju dogovoriti koji će se postupak primijeniti (ako odabir metode padne na postupak s vodom, dalje se moraju dogovoriti tko će osigurati vodu potrebnu za ispitivanje itd.).

Dakle, treba imati na umu da neke norme ispitivanja u sebi sadrže više primjenjivih postupaka koji se mogu primijeniti s istom svrhom. Laboratorij može biti sposoban provoditi jedan od tih postupaka, neke od tih postupaka ili sve od njih. Zato se u daljnjem koraku traži verifikacija metode kako bi se jasno i nedvosmisleno znalo za što je laboratorij osposobljen.

Verifikacija metoda

Metode koje su objavile normirna tijela poput ISO, CEN/CENELEC, IEC, ASTM, već su bile predmet validacije putem kolaborativnih studija i utvrđeno je da su prikladne za namijenjenu svrhu u području primjene metode. Stoga je strogost provjere takve metode manja od one kakva se zahtijeva za validaciju vlastite (nenormirane) metode. Ako se npr. laboratorij upotrebljava opremu koja odgovara tehničkih specifikacijama koje zahtijeva metoda, ta oprema se ne mora posebno validirati. Dovoljno je utvrditi da zadovoljava zahtjeve koji su uvjet za provedbu metode.

Normirane metode objavljene od normiranih tijela ili priznatih stručnih organizacija mogu se razlikovati u manjoj ili većoj mjeri. U nekim slučajevima ne postoje ni izvještaji o validaciji kao temeljni dokumenti metode tako da izvedbene karakteristike metode nisu validirane ili su možda djelomično validirane. U tim slučajevima nije moguća izravna primjena metoda nego ih laboratorij mora prethodno validirati.

Verifikacija metode može se činiti kao novi zahtjev norme HRN EN ISO/IEC 17025:2017, ali međutim on to nije. Novi je zahtjev da laboratorij mora čuvati zapise o verifikaciji. U normi HRN EN ISO/IEC 17025:2007 zahtijevalo se da

laboratorij mora prije poduzimanja ispitivanja ili umjeravanja potvrditi da može ispravno provoditi normirane metode. Također, pri promjenama normiranih metoda takvo potvrđivanje se mora ponoviti. To „potvrđivanje” u novom izdanju norme nazvano je „verifikacija”. U Međunarodnom mjeriteljskom rječniku dana je definicija pojma *verifikacija*, a u prijevodu tog rječnika kojeg je Državni zavod za mjeriteljstvo objavio 2009. godine, pojam se prevodi kao *ovjera*, odnosno *ovjeravanje*. Definicija ima nekoliko napomena, a koje se tiču razlikovanja ovjeravanja/verifikacije u zakonskome mjeriteljsku kako to definira VIML (*Međunarodni rječnik izraza u zakonskome mjeriteljstvu*) te razlikovanja umjeravanja, validacije i verifikacije. Definicija verifikacije u Međunarodnom mjeriteljskom rječniku i normi HRN EN ISO/IEC 17025:2017 je identična. Verifikacija je *osiguranje objektivnog dokaza da promatrani predmet ispunjava utvrđene zahtjeve*. U ovom slučaju promatrani predmet je metoda (ispitivanja, umjeravanja ili uzorkovanja), a osim metode to može biti proces, mjerni sustav, smjesa i drugo. Norma HRN EN ISO/IEC 17025:2017 također zahtjeva i verifikaciju opreme.

Tablica 1. Zahtjev norme HRN EN ISO/IEC 17025 s obzirom na vrstu metode.

Metoda	Zahtjev za laboratorij
Normirana metoda	Verifikacija (druga validacija)
Normirana metoda – preinaka	Validacija
Normirana metoda – uporaba izvan područja primjene	Validacija
Nenormirana metoda	Validacija

Verifikacija se provodi za već validirane metode, a uključuje neku od sljedećih situacija:

- kad se validirana metoda po prvi put upotrebljava u laboratoriju;
- kad se validirana metoda po prvi put upotrebljava za neki proizvod;
- kad validirana metoda doživi novo izdanje;
- kad se iz bilo kojih razloga promjene neki uvjeti u laboratoriju koji utječu na metodu.

Općenito, normirane metode se trebaju verificirati u pogledu osposobljenosti osoblja (obuka, iskustvo, kompetencije), opreme (karakteristike uređaja), zahtijevanih materijala, etalona, reagensa, uvjeta okoliša, ponovljivosti ili obnovljivosti, sposobnosti da se postignu izvedbene karakteristike metode i svih drugih karakteristika koje mogu utjecati na rezultat. Izvedbene karakteristike metode mogu obuhvatiti mjerni raspon, točnost, mjernu nesigurnost, granicu detekcije, granicu kvantifikacije, selektivnost metode, linearnost, ponovljivost ili obnovljivost, robusnost na vanjske utjecaje ili osjetljivost na utjecaje iz matrice uzorka ili ispitnog predmeta te sustavnu mjernu pogrešku.

Verifikacija u radnim uvjetima laboratorija dokazuje se zadovoljenjem zahtjeva prikladnosti sustava koji su utvrđeni u uvjetima metode, kao i dokazivanjem točnosti, preciznosti i drugih parametara ovisno o vrsti metodi koja se verificira.

Izvedba metode može se, npr., dokazati:

- uporabom slijepih proba ili necijepljenih sredstava (npr. u mikrobiologiji) za procjenu kontaminacije;
- laboratorijskim kontrolnim uzorcima (npr. uzorci obogaćeni kemikalijama ili pozitivne kontrole kulture u mikrobiologiji) za procjenu točnosti;
- duplikatima za procjenu preciznosti;
- etalonima za provjeru umjeravanja;
- uzorcima za praćenje kontrole kvalitete (putem kontrolnih karata);
- sudjelovanjem u programima ispitivanja sposobnosti s time da je predmet ispitivanja sposobnosti reprezentativan u pogledu matrice, parametara, razina koncentracije i drugim bitnih parametara.

Ovisno o složenosti metode, verifikacija može biti jednostavnija ili složenija, a u pojedinim situacijama može se praktički približiti validaciji metode. Verifikacija metode sastoji se i od djelomične validacije metode. Tamo gdje je to primjenjivo, verifikacija bi se trebala provesti u skladu s protokolom validacije koji bi uključuje postupke i kriterije prihvatljivosti za sve izvedbene karakteristike.

Ako se provode manje prilagodbe validirane metode, one se također trebaju verificirati kako bi se potvrdilo da nema promjena u očekivanom rezultatu metode. Dodatna validacija također se mora uzeti u obzir ako kupac zahtijeva strože specifikacije od one za koje je validirana normirana metoda ili ako se ona primjenjuje izvan predviđenog područja primjene.

Ključni parametri na koje treba svratiti pozornost pri verifikaciji metode ovise o prirodi metode i rasponu vrsta uzoraka. Mora se koristiti statistički značajan broj uzoraka u postupku procjene i time mora biti obuhvaćeno cjelokupno područje rezultata za predviđenu uporabu.

Validacija metode i parametri validacije

Nenormirane metode i vlastite metode moraju se prethodno validirati. Izvedbene karakteristike metode temelje se na namjeravanoj uporabi metode. Na primjer, ako se metoda koristi za kvalitativnu analizu, nema je potrebe ispitivati i validirati za linearnost metode za cjelokupni dinamički raspon opreme.

Prema definiciji, validacija je *verifikacija da su utvrđeni zahtjevi prikladni za namjeravanu uporabu*. Ona je nužna da bi laboratorij dugogodišnjom primjenom metode osigurao točnost, preciznost i ponovljivost rezultata.

Opseg metode i kriteriji validacije trebaju se definirati i dokumentirati u prvim fazama procesa. Tu se mogu razmatrati svrha mjerenja, moguće matrice uzoraka, očekivanja smetnji i kako ih utvrditi, opseg (koncentracije, rasponi), propisi i zakoni ukoliko postoje, potrebe za prostorom i uvjetima okoliša, oprema koja će se moći koristiti, način pripreme (pod)uzroka i drugo. Opsežnost ovisi o namjeravanoj primjeni metode.

Za validaciju se mogu primjenjivati razni alati ili njihove kombinacije:

- slijepe probe: uporabom različitih slijepih proba moguće je procijeniti količinu analitičkog signala koja se može pripisati analitu i drugim sastojcima (smetnjama); njima se također može utvrditi granica detekcije;
- referentni materijali i certificirani referentni materijali i etaloni: uporaba materijama s poznatim svojstvima i vrijednostima može pomoći pri procjeni točnosti metode kao i za dobivanje informacija o smetnjama; ako se koriste kao dio mjernog postupka, tada se koriste kao etaloni;
- obogaćeni materijali i otopine: oporavak se može izračunati na temelju rezultata analiza uzoraka obogaćenih referentnim materijalom;
- nastali materijali: to su materijali kojima analit može biti strani element, ali se u određenom trenutku unosi u masu prije uzorkovanja materijala;
- ponavljanje: ponovljene analize omogućuju procjenu preciznosti metode;
- statistička analiza podataka: za procjenu točnosti, preciznosti, linearnosti, granice detekcije i kvantifikacije te mjerne nesigurnosti mogu se koristiti statističke metode;
- sustavno ocjenjivanje čimbenika koji utječu na rezultat;
- ispitivanje robusnosti metode promjenom kontroliranih parametara;
- usporedba rezultata s rezultatima dobivenim uporabom drugih validiranih metoda;
- međulaboratorijske usporedbe.

Validacija je u manjoj ili većoj mjeri složeniji proces od verifikacije. Pri planiranju validacije potrebno je utvrditi koji su čimbenici od najveće važnosti i zahtijevaju najviše pozornosti. Stručne organizacije preporučuju tri koraka:

- razlikovanje metode ispitivanja od uzimanja i procesiranja uzorka;
- razmatranje ispitnih ili mjernih čimbenika (opreme i umjeravanja, rukovanja uzorkom, ispitnog ili mjernog postupka, analize i oblika rezultata);
- razmatranje dodatnih čimbenika koji se mijenjaju (okoliš, izobrazba i iskustvo operatora, učestalost uporabe metode).

Ovisno o vrsti metode, sam postupak validacije može biti jednostavniji ili složeniji. Ako se radi o proširenju područja primjene metode ili prilagodbi metode određenoj svrsi, tu se mogu iskoristiti znanstveno znanje ili iskustvo za validaciju metode. Kad je riječ o vlastitoj metodi laboratorija, onu koju je sam razvio, nju sam laboratorij mora validirati uzimajući u obzir troškove i zahtjeve kupca. Tu je često riječ o proširenju ili prilagodbi poznatih metoda koje laboratorij razvija za svoju specifičnu potrebu. Ako laboratorij razvija potpuno novu metodu, ta se metoda mora u potpunosti validirati i verificirati te se ti postupci moraju dokumentirati.

Parametri koji se preispituju tijekom validacije najčešće su: istinitost (stupanj podudaranja stvarne vrijednosti i one dobivene metodom), preciznost (izraz slaganja niza mjerenja istog homogenog uzorka sukladno metodi), selektivnost (mjera mogućnosti da se utvrdi željeni analit u matrici), granica detekcije (najmanja količina analita u uzorku koja se može de-

tektirati, ali ne i kvantificirati), granica kvantifikacije (najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantificirati uz odgovarajuću preciznost i točnost), linearnost (područje unutar kojeg su rezultati izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku), radno područje (raspon između gornje i donje koncentracijske granice analita u uzorku koje se mogu kvantificirati uz odgovarajuću preciznost, istinitost i linearnost), robusnost (otpornost postupka na male namjerne promjene parametara metode), ponovljivost i obnovljivost, oporavak, mjerna nesigurnost i drugi.

Validacija metode zahtjeva značajan angažman osoblja laboratorija. Ona uključuje odabir i ovlaštavanje osoblja za provedbu aktivnosti, planiranje postupka validacije, utvrđivanje validacijskih parametara te dokumentiranje dokaza i izrada validacijskog izvještaja.

Nakon provedbe validacije metode, istu je potrebno verificirati u konkretnim uvjetima u kojima laboratorij provodi metodu. Dakle, validirana metoda se mora verificirati prije nego što se stavi u uporabu.

Zaključak

Metodu ispitivanja, umjeravanja ili uzrokovanja potrebno je na odgovarajući način validirati prije stavljanja u primjenu. Postupci validacije ovise o nizu parametara koje treba pažljivo odabrati s obzirom na namjeravanu uporabu. Kad se validirana metoda želi primijeniti u nekom laboratoriju u konkretnim uvjetima okoliša, opreme, osoblja i drugih bitnih čimbenika, potrebno ju je verificirati, tj. potvrditi da laboratorij ima sve potrebne resurse i ispunjava sve potrebne zahtjeve da ju može primjenjivati. Nevalidirana metoda ne može se verificirati, pa tako ni staviti u uporabu u laboratorijima koji djeluju u skladu sa HRN EN ISO/IEC 17025. Ukoliko laboratorij rabi objavljenu metodu koja nije validirana ili je djelomično validirana, on prije verifikacije mora provesti validaciju metode. Laboratorij, dakle, u svakom slučaju odabire validiranu metodu, bez obzira je li vlastita, normirana ili prilagođena, jer samo s tako odabranom metodom može biti siguran da postiže točne i pouzdane rezultate ispitivanja, umjeravanja ili uzorkovanja.

Literatura

- [1] HRN EN ISO/IEC 17025:2017, *Opći zahtjevi za osposobljenost ispitnih i umjernih laboratorija*
- [2] EUROLAB "Cook Book" – Doc No. 1, *Selection, certification and validation of methods*, rev.2017
- [3] NATA, *Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods*, June 2012



Novosti iz Svijeta kvalitete

Autor: Darko BOŠNJAK, dipl. ing. univ. spec.

www.svijet-kvalitete.com



► HZN e-Glasilo br. 1-2019

Objavljeno je HZN e-Glasilo za siječanj 2019. i oglasnik za normativne dokumente u kojima se donose nove informacije iz svijeta normizacije.

U siječanjskom broju HZN e-Glasila možete pročitati o osnivanju novoga ISO-ova tehničkoga odbora SO/TC322, *Sustainable finance*. Cilj je potaknuti tržište održivih investicija izradom novih međunarodnih norma.

U rubrici *Novosti iz međunarodnih i europskih normizacijskih organizacija* prenosi se IEC-ov prilog o zaštiti opskrbenih lanaca od internetskih napada.

U vijestima iz CEN-a i CENELEC-a prenosi se informacija o novoj normi CEN-a kojom se utvrđuju tipovi ispitnih plinova te novoj CENELEC-ovoj normi EN 50342-6:2015/A1:2018 za sekundarne članke i akumulatore. Tu je također i CEN/CENELEC-ov Program rada za 2019. godinu.

HZN e-Glasilo izlazi jedanput mjesečno, a objavljuje se u elektroničkom obliku i dostupno je besplatno na službenim mrežnim stranicama HZN-a.

Izvor: HZN