

# A szabadalmazott laboratóriumi módszerek validálásának alapelvei

(Az AOAC International dokumentumának 2. tervezete)

## Háttérinformáció

Az élelmiszervizsgálattal foglalkozó Nemzetközi Szervezetek Tanácsának (IAM) Budapesten 1991. április 5-én megtartott VIII. ülésén felkérték az AOAC-t (Hivatalos Analitikai Kémikusok Szövetsége), az IDF-et (Nemzetközi Tejipari Szövetség), az ISO-t (Nemzetközi Szabványügyi Szervezet) és a IUPAC-ot (Elméleti és Alkalmazott Kémikusok Nemzetközi Szövetsége), hogy közösen dolgozzanak ki egy dokumentumot a szabadalmazott laboratóriumi eljárások és módszerek validálásának alapelveiről. Az említett dokumentumot az AOAC INTERNATIONAL munkaokmányként kívánta felhasználni ahhoz, hogy megismerhesse más szervezetek és más IAM-tagok állásfoglalását. A cél egy nemzetközileg elfogadott nyilatkozat kidolgozása a validálás alapelveiről a szabadalmazott komponenseket magukban foglaló laboratóriumi módszerek elfogadásához. A dokumentum hasznos irányelvként szolgál majd az Analitikai és Mintavételi Codex Bizottság (CCMAS), más szabványosítási testületek, a módszerek alkalmazói, a szabadalmazott laboratóriumi eljárások vagy részelemek tulajdonosai, szállítói és egyéb érdekelt fél számára. Az IAM IX. ülésén (Budapest, 1992. november 6.) előterjesztésre került egy előzetes munkaokmánytervezet és felszólították minden érintett szervezetet, hogy észrevételeiket küldjék meg az AOAC INTERNATIONAL részére. A megjegyzések és javaslatok figyelembevételével az AOAC INTERNATIONAL átdolgozta az említett dokumentumot.

## Bevezetés

A szabadalmazott technológián alapuló módszereket egyre kiterjedtebben alkalmazzák a gyorsan elvégezhető analízis és reakciók, a nem teljesen laboratóriumi környezetben is könnyű kezelhetőség, illetve – sokszor – a specifikus jelleg miatt. Megfelelő validálással – adott szituációban – ezeket az eljárásokat a standard módszerek alternatíváiként kell elfogadni.

Jelen dokumentumban **a szabadalmazott technológián alapuló módszer fogalmán az alapvető és kulcsfontosságú részelemeinek olyan komplex rendszerét értjük, amely – analitikai módszerként alkalmazva – laboratóriumi és nem laboratóriumi környezetben egyaránt felhasználható valamely adott mátrix specifikus analízisének elvégzésére.** Az említett kulcsfontosságú részek legtöbbször olyan

szabadalmazott elemeket vagy reagenseket reprezentálnak, amelyeket csak a komplex rendszer (a "csomag") tulajdonosa vagy szállítója állíthat elő. A szabadalmazott technológián alapuló módszerek – amelyek legtöbbször önmagukban zárt, komplett analitikai rendszert képeznek – használati utasításokat is tartalmaznak, de megfelelő felszerelést és más feltételek teljesítését is igénylik. (1)

## 1. A dokumentum tárgya

Jelen dokumentum tartalmazza a szabadalmazott technológián alapuló analitikai tesztmódszerek validálásának általános alapelveit.

A szabadalmazott technológián alapuló módszerek elfogadását és használatát az alábbiaknak kell alátámasztaniuk:

- a) megfelelő garancia arra nézve, hogy a módszer – a validálás során meghatározott – érzékenységi szinten alkalmas az adott mérések elvégzésére;
- b) a rendszer alkalmasságát tesztelő olyan eljárások beépítése, amelyek a felhasználó számára lehetővé teszik a módszer megfelelő funkciójának meghatározását;
- c) biztosíték arra, hogy egy kvalitatív módszer nem ad elfogadhatatlan szinten hamis pozitív vagy hamis negatív válaszokat;
- d) a validálás adatainak dokumentálása publikált vagy szabadon hozzáférhető formában;
- e) a szabadalmazott technológián alapuló módszerek meghatározott időszakonkénti felülvizsgálására szolgáló eljárások kidolgozása arra az esetre, ha a gyártó megváltoztatja az adott szabadalmazott módszert vagy már nem gyártja azt, illetve ha a módszer teljesítményében változás áll be.

## 2. Definíciók

2.1. **Módszer validálás:** annak módszeres tanulmányozása és demonstrálása, hogy a teljesítménymutatók megfelelnek az adott analitikai alkalmazás követelményeinek. A teljesítménymutatók kifejezése rendszerint a következő vizsgálati paraméterekben történik: precízió, pontosság, észlelési küszöb, számszerűsítési küszöb, fajlagosság, terjedelem, linearitás és állékonyság (ruggedness) (2).

2.2. **Referenciamódszer:** olyan rendkívül alaposan kidolgozott módszer, amely világosan és szabatosan meghatározza az egy vagy több jellemző tulajdonság méréséhez szükséges feltételeket és eljárásokat; demonstráltan rendelkezik a tervezett alkalmazáshoz

szükséges pontossággal; ebből kifolyólag más, ugyanazon mérések elvégzésére szolgáló módszerek értékelésére is alkalmas, különös tekintettel valamely referenciaanyag jellemzésére (3).

2.3. **Pontosság:** megállapodásban rögzített korreláció a teszteredmény és az elfogadott referenciaérték között (4).

Megjegyzés: a teszteredmények sorozatára alkalmazva a pontosság a szűrőpróbaszerű komponensek és a közös rendszerhiba, illetve az egymást átfedő komponensek kombinációját írja le.

2.4. **Precízió:** megállapodásban rögzített korreláció az előírt feltételek mellett kapott független teszteredmények között (4).

2.5. **Fajlagosság:** egy módszer azon képessége, hogy pontosan és specifikusan méri az analizált értékeket olyan komponensek jelenlétében, amelyek várhatóan a mintamátrixban is jelen vannak (2).

2.6. **Észlelési küszöb:** az a legkisebb mért mennyiség, amelyből megfelelő statisztikai biztonsággal lehet következtetni valamely anyag jelenlétére; egyenlő a reprezentatív kontrollminták középértéke plusz a középérték háromszoros szórása (5).

2.7. **Számszerűsítési küszöb:** az a legkisebb mért mennyiség, amely fölött valamely anyag meghatározása – laboratóriumi körülmények között – előírt pontosság és ismételhetőség mellett lehetséges (5).

2.8. **Specifikációs szint:** a legnagyobb érdeklődésre számot tartó anyag koncentrációja az analízis során, amit a módszer alkalmazója vagy észlelési küszöbe, illetve a törvényes előírások szabnak meg.

2.9. **Állékonyág (ruggedness):** valamely analitikai folyamat azon képessége, hogy ellenáll a környezet és/vagy az operatív feltételek változásainak (6).

2.10. **Interferencia:** a módszer viszonya azokhoz az analógokhoz, metabolitokhoz vagy más, a céllal nem kapcsolatos komponensekhez, amelyek jelen lehetnek a mátrix(ok)ban (7).

2.11. **Hamis pozitív arány:** az analizált pozitív tesztek aránya az ismert negatív tesztek között (8).

2.12. **Hamis negatív arány:** az analizált negatív tesztek aránya az ismert pozitív tesztek között (8).

2.13. A mérések eredményeinek **ismételhetősége:** megállapodásban rögzített korreláció ugyanazon tárgyra irányuló, egymást követő mérések eredményei között, ha az alábbiakban felsorolt feltételek mindegyike **változatlan:**

– ugyanazon mérési eljárás,

- ugyanaz a megfigyelő,
- ugyanazon mérőeszköz ugyanazon feltételek mellett alkalmazva,
- ugyanaz az elhelyezés,
- rövid időn belüli megismétlés (3).

2.14. A mérések eredményeinek **reprodukálhatósága**: megállapodásban rögzített korreláció ugyanazon tárgyra irányuló, a következő **megváltozott** feltételek bármelyikének fennállása esetén eszközölt mérések eredményei között:

- megváltozott mérési elv vagy módszer,
- más megfigyelő,
- megváltozott mérőeszköz,
- más elhelyezés,
- megváltozott használati feltétel(ek),
- más időpont (3).

### 3. A validálási jegyzőkönyv

A szabadalmazott technológián alapuló módszerek validálási jegyzőkönyvének megtervezésekor a következő elemek veendőek figyelembe (1) (9):

- A validálás céljai.
- Feladatok és alkalmazhatóság, a módszer szükségessége, típusa.
- Érvényességi kör, beleértve az anyagokat vagy mátrixokat, az analízist és az érdeklődésre számot tartó koncentrációkat, továbbá egybevetés a referencia módszerrel.
- A vizsgálat/tanulmány alapjául szolgáló elvek.
- Potenciális észlelése a vizsgálat körén kívüleső vegyületeknek, illetve az általuk keltett interferencia.
- Az anyagok és a mátrixok fajtája és száma.
- A teszthez szükséges teljesítmény-paraméterek: pontosság, ismételhetőség, reprodukálhatóság, észlelési küszöb, számszerűsíthetőségi küszöb, hamis pozitív és hamis negatív arány.
- A minőség szabályozás követelményei.

### 4. A módszerrel kapcsolatos információ

A módszerek leírásakor az alábbi elemek veendőek figyelembe (1) (9):

- Jellemző módszercím.
- Alkalmazhatóság és korlátok.
- A módszer alapelve.

- d) Szükséges felszerelés, továbbá a reagensek és azok előkészítése.
- e) Szabványok és minták előkészítése.
- f) A folyamat lépései.
- g) Számítások és értelmezések.
- h) Biztonsági óvintézkedések.
- i) Minőségsszabályozás, teljesítmény-kritériumok, valamint rendszer megfelelőségi tesztek a komplex vagy szabadalmazott reagensekre.

#### 4.1. A gyártó utasításai

A gyártó által a laboratóriumi módszereken alapuló szabadalmazott technológia felhasználói számára készített utasításoknak a következőket kell tartalmazniuk (10):

- a) A felhasználók körének meghatározása.
- b) Mátrix alkalmazhatóság és a lehetséges interferenciák.
- c) Interpretálási kritériumok.
- d) A minták elkészítésére vonatkozó utasítások.
- e) A teszt elvégzésének módja.
- f) Információ az eltarthatóságról.
- g) A tesztek elvégzéséhez szükséges környezet.
- h) Teljesítmény-meghatározások.
- i) Biztonsági óvintézkedések.
- j) A műszaki segítségnyújtás referenciái.

### 5. A validálás megtervezése

A módszer alkalmazója számára elfogadható validálási szint biztosítása érdekében a validálás folyamatát úgy kell megtervezni, hogy az kielégítsen bizonyos minimális követelményeket a laboratóriumok, az analitikai szintek, illetve az egyes szinteken szükséges minták száma tekintetében. A laboratóriumközi kooperációs vizsgálatokat olyan nemzetközileg elismert dokumentumok alapján kell végezni, mint például: *Irányelvek az analitikai módszerek jellemzőinek validálását célzó kooperációs vizsgálati eljárásokhoz* (11), vagy *A mérési módszerek és eredmények pontossága (megbízhatóság és precízió)* (4).

#### 5.1. A laboratóriumközi kooperációs validálási tanulmány megtervezésekor figyelembe veendő minimális követelmények (1)

A szabadalmazott technológián alapuló laboratóriumi módszerek vonatkozásában minden laboratóriumközi kooperációs tanulmány dokumentumainak ki kell elégíteniük a laboratóriumok, az analitikai

szintek, illetve az egyes szinteken szükséges minták számával kapcsolatos alábbi minimum-követelményeket:

a) A **kvalitatív** adatokat generáló módszerek esetében a tanulmánynak legalább 15, érvényes adatokat szolgáltató laboratóriumra kell kiterjednie. A kívülállók száma nem haladhatja meg az érvényes adatokat szolgáltató laboratóriumok 33%-át. A kívülállókat leszámítva legalább 10 laboratóriumnak kell maradnia. Csak nagyon különleges esetekben (rendkívül drága anyagok és felszerelés, speciális laboratóriumok iránti igény) végezhető el a tanulmány legalább 10 laboratórium bevonásával. Ilyenkor azonban azzal kell számolni, hogy csökken a teljesítmény-indikátorokra vonatkozó becslések pontossága, illetve a kívülállókkal kapcsolatos hipotétikus tesztek meggyőző ereje.

A tanulmánynak mátrixonként legalább 2 analitikai szintre kell kiterjednie, beleértve a negatív kontroll szintet is. A pozitív és a negatív kontroll szintek meghatározása a következő 2 módszer valamelyikével lehetséges: (a) egy folyamatos skála kettéosztása egy ún. referencia komponens szinttel oly módon, hogy a referenciaszinten, illetve az afölött elhelyezkedő értékek pozitívak, a többi negatív; vagy (b) a beoltott tesztminták egy adott szinten pozitívak, míg az oltatlan, illetve a komponensektől mentes tesztminták negatívak.

b) A **kvantitatív** adatokat generáló módszerek esetében a tanulmánynak legalább 8, érvényes adatokat szolgáltató laboratóriumra kell kiterjednie. A kívülállók száma nem haladhatja meg az érvényes adatokat szolgáltató laboratóriumok 2/9 részét. Csak nagyon különleges esetekben (rendkívül drága anyagok és felszerelés, speciális laboratóriumok iránti igény) végezhető el a tanulmány legalább 5 laboratórium bevonásával. Ilyenkor azonban ki kell terjeszteni a módszer jellemzőinek statisztikai becslésére szolgáló konfidencia intervallumot.

A tanulmánynak mátrixonként legalább 5 analitikai szintre kell kiterjednie. A minimum csak akkor csökkenthető 3 analitikai szintre, ha egyetlen mátrixra egyetlen szintspecifikáció van megadva.

Mátrixonként minden szintet meg kell válaszolni vak mintaismétlések vagy osztott szintek felhasználásával (Youden-féle párosítás).

### **5.1.1. A laboratóriumközi kooperációs tanulmány jegyzőkönyvének információ szükséglete (1)**

A kooperációs tanulmány tervezetének a következő elemeket kell magában foglalnia:

a) A módszer teljesítmény-paramétereinek leírása különféle analízis szinteken, beleértve a várható döntési pont(ok)at is.

- b) Az anyagok és a mátrixok típusának (ahol lehetséges, az összetartozó minták, a természetes módon előforduló maradványok stb.) megadása.
- c) Az analizálandó anyagok száma és koncentrációja.
- d) A pozitív és a negatív kontrollok leírása.
- e) A teszt pontosságának meghatározását célzó eljárások.
- f) Információ nyújtása az együttműködő partnereknek a minták stabilitásáról, a minták előkészítésével kapcsolatos instrukciókról, a kritikus szabályozási pontokról, az adatok jelentésének módjáról és formájáról, a feladat elvégzésének idő- és munkaigényességéről, valamint – ha vannak – a gyakorlati minták felhasználásának szabályairól.
- g) Az együttműködő partnerek várható száma.
- h) Az adatelemzés tervezett módjának meghatározása, beleértve a kívülállókra vonatkozó eljárásokat is.

## 5.2. Minimum követelmények a harmadik fél által végzett teljesítmény-ellenőrzés validálásához (12)

Minden, harmadik fél által végzett teljesítmény-ellenőrzési jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell az illetékes műszaki szakértőktől származó következő információt: (1) a gyártó "házon belüli" validálásának adatai és (2) legalább 1 független laboratórium által a gyártó saját teljesítmény-nyilatkozatának verifikálásával kapcsolatban kiállított validálási adatok.

A gyártó saját teljesítmény-nyilatkozatát verifikáló jegyzőkönyveket az alábbi irányelvek szerint kell elkészíteni:

- a) **Kvalitatív** módszerek esetében a módszer alkalmazásakor kapott reakciót olyan válaszgörbe (10-10 válasz minden szinten) megszerkesztésével kell kiértékelni, amely az alábbi koncentrációs értékekkel rendelkező tesztminták (megerősített és – amennyiben van – természetben előforduló) és tiszta standardok (ha alkalmazhatók) felhasználásán alapul: (1) nulla koncentráció, (2) éppen a specifikációs szint alatt, (3) a specifikációs szinten, (4) éppen a specifikációs szint felett és (5) meglehetősen magas szinten. A válaszgörbe megszerkesztése a pozitív és a negatív százalékos értékeknek a koncentráció függvényében való feltüntetésével történik.

A kapott válaszok teljes terjedelme vizsgálható a tesztminták és a standardok sorozatán keresztül. A standardok a következőkből tevődnek össze: negatív tesztminták, a specifikációs szinten levő tesztminták (a kitben vagy a módszerleírásban foglaltak szerint), szorosan a specifikációs szint körül szóródó tesztminták, valamint erősen pozitív tesztminták. Minden koncentrációs szinten 5-10

független válasz-tesztmintának kell lennie. A válaszgörbe megszerkesztése a pozitív százalékos értékek és a koncentráció függvényében történik.

- b) **Kvantitatív** módszerek esetében a precíziót és a pontosságot 10-10 válasz segítségével kell felmérni a szükséges lineáris terjedlem következő 3 koncentrációs szintjének mindegyikén: 10% (alacsony), 50% (közepes) és 90% (magas). Amennyiben lehetséges, a mintáknak természetesen előforduló maradványt kell tartalmazniuk és/vagy a természetes szennyeződés szimulálása érdekében meg kell erősíteni azokat.

A standard görbe kiértékelése az egyes pontokon 5-5 válasz által meghatározott intervallumban történik.

A koncentráció függvényében kapott válaszok definiálásához megfelelő számú standard oldatra van szükség. A standard oldatok száma a gyakorlatban alkalmazott koncentráció-intervallum függvénye. A kalibrációs görbe elkészítéséhez a legtöbb esetben a standard oldatok legalább ötféle koncentrációjára (plusz zéró) van szükség. A linearitás nem követelmény: a görbét statisztikai úton kell tesztelni és kifejezni. Megállapítandó a különböző koncentrációs szinteken kapott válasz tiszta és definiált oldatban, továbbá a mátrix(ok)ban. Nem-lineáris görbék esetében több standard oldatra lehet szükség. A tesztelt koncentrációk fölötti és alatti extrapoláció csak abban az esetben fogadható el, ha az a "zéró" szinten való viselkedés tanulmányozásához, illetve az addíciós módszer alkalmazásához szükséges.

### **5.2.1. A harmadik fél által végzett teljesítmény-ellenőrzés jegyzőkönyvéhez szükséges információ**

A tervezett verifikációs tanulmány leírásának a következő elemeket kell tartalmaznia:

- a) Az értékelés alatt álló módszer leírása, beleértve a gyártó jellemzését, a modellszámot stb.
- b) Analitikai eredmények, amelyek meghatározására a módszer irányul, illetve amelyeket a tanulmánynak elemeznie kell.
- c) A gyártó instrukcióiban (leírásaiban) szereplő teljesítmény-specifikációk, pl. "X mutató mértékei 20 ppb vagy annál magasabb szinten".
- d) A tanulmányban használandó mátrix(ok).
- e) A tesztminták leírása, illetve azok kinyerése, előkészítése és tárolása.  
Megerősített tesztminták esetében az erősítő eljárások ismertetése.
- f) Az értékeléskor használandó referencia módszerek.

- g) Azon időszak meghatározása, ami alatt az összes minta analízisét el kell végezni, naponként ütemezve az analizálandó reakciók számát. Meg kell határozni azt is, hogy az egyes sorozatok analízisét végezheti-e ugyanaz a személy.
- h) A teszt vagy a tanulmány elvégzése során szükséges óvintézkedések és speciális utasítások.
- i) Az eredmények kiszámításának módja, a szükséges statisztikai számítások és az eredmények közzlése.

## 6. A gyártó felelőssége (1)

A gyártó köteles az alábbiak megtételére:

- a) Biztosítani, hogy a jövőben minden részleg és üzemegeység megfeleljen a teljesítmény-kritériumoknak. A szabadalmazott módszer alkalmatlansága a megfelelő folyamatos teljesítmény nyújtására a jóváhagyás visszavonását vagy újraértékelést vonhat maga után. A gyártó kötelessége tájékoztatni a validáló szervezetet, ha változtatásokra van kilátás a reagensek, a komponensek vagy az eljárások elfogadott specifikációiban, illetve, ha változások következnek be olyan területen, ahol nincsenek elfogadott specifikációk.
- b) Amennyiben mód van rá, a felhasználó megfelelő biztosítékkal való ellátása érdekében a módszer teljesítményét illetően a minőségbiztosítási, valamint az egyéb kontroll eljárások és szabványok ismertetése.
- c) Teljesítmény-specifikációkat megállapítani a reagensekre és a komponensekre.
- d) Azon "házon belüli" validálási tesztek eredményének közzlése, melyek alapján a módszert alkalmasnak találták a validálással kapcsolatos kísérletekre. Ide tartoznak a megtervezett állékonysági (ruggedness) tesztek is, különös tekintettel az interferenciákra, az egyes részlegek közötti szóródásra, továbbá minden olyan egyéb tényezőre, amelyek a teszt alkalmazásának környezetében nagy valószínűséggel jelentkehetnek.

## Irodalom

- (1) *Official Methods Board Policies and Procedures Manual*, (A Hivatalos Módszerek testületi politikájának és eljárásainak kézikönyve), AOAC INTERNATIONAL, 1993.
- (2) *Drug Directorate Guidelines-Acceptable Methods Minister of Health*, (A Gyógyszer Igazgatóság irányelvei – elfogadható egészségügyi módszerek), Health Protection Branch, Health Canada, 1993.

- (3) ISO Guide 30, *Terms and definitions used in connection with reference materials*, (A referenciaanyagokkal kapcsolatban használt fogalmak és definíciók), Second edition, 1992.
- (4) ISO/DIS 5725-1: – *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 1: General principles and definitions*, (A mérési módszerek és eredmények pontossága (valósághűség és precízió – 1. rész: Általános alapelvek és definíciók), Revision, in parts, of ISO 5725:1986.
- (5) *Official Journal of the European Communities*, (Az Európai Közösségek Hivatalos Közlönye), Annex 1, No L 351/41, 2.12.89.
- (6) Wernimont, G.T. *Use of Statistics to Develop and Evaluate Analytical Methods*, (Statisztikai módszerek alkalmazása az analitikai módszerek kialakításában és értékelésében), AOAC INTERNATIONAL, 1987.
- (7) *Test Kit Performance Testing Program – Data submission Requirements*, (A Test Kit teljesítményt ellenőrző program – az adatszolgáltatással kapcsolatos követelmények), AOAC Research Institute, 15 Oct. 1992.
- (8) McClure, F.D. *Design and Analysis of Qualitative Collaborative Studies: Minimum Collaborative Program*, (A kvalitatív kooperációs tanulmányok tervezése és elemzése: minimum kooperációs program), *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **73** 1990:953-960.
- (9) *Codex Alimentarius Commission Procedural Manual*, (A Codex Alimentarius Bizottság eljárási kézikönyve), Seventh edition, 1989.
- (10) *Test Kit Performance Testing Program – Descriptive Insert Requirements*, (A Test Kit teljesítményt ellenőrző program – az alkalmazás leíró követelményei), AOAC Research Institute, 15 October 1992.
- (11) *Guidelines for Collaborative Study Procedure to Validate Characteristics of a Method of Analysis*, (Irányelvek az analitikai módszerek jellemzőinek validálására szolgáló kooperációs tanulmányok eljárásaihoz), *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **72** 1989:694-704.
- (12) *Test Kit Performance Testing Program – Guidelines for Test Kit Technical Reviewers for the Preparation of Independent Laboratory Protocol*, (A Test Kit teljesítményt ellenőrző program – irányelvek a Test Kit műszaki felülvizsgálók részére a független laboratóriumi jegyzőkönyv elkészítéséhez), AOAC Research Institute, 15 October 1992.

---

---

### **A szerkesztő megjegyzése:**

Az AOAC International „A szabadalmazott laboratóriumi módszerek validálásának alapelvei” című dokumentumának 2. tervezete azzal a céllal került viszonylagos korai stádiumban közlésre az „Élelmiszervizsgálati Közlemények” hasábjain, hogy az érintett hazai szakemberek kifejthessék véleményüket, álláspontjukat a témával kapcsolatban. A Szerkesztőség köszönettel fogad minden észrevételt, kérdést, kiegészítést és vállalja a továbbítást az AOAC International részére. A dokumentum megtárgyalása - többek között - az IAM 1997. márciusra tervezett XII. ülésén, Budapesten várható, melynek eredményeiről az „Élelmiszervizsgálati Közlemények” hasábjain beszámolunk.