

Elżbieta Stefaniuk<sup>1,2\*</sup>, Karolina Bosacka<sup>2</sup>, Waleria Hryniewicz<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowy Instytut Leków w Warszawie

<sup>2</sup>Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej w Warszawie

Wpłynęło we wrześniu 2015 r.

1. Wprowadzenie. 2. Walidacja i weryfikacja metod i testów diagnostycznych w laboratorium mikrobiologicznym. 2.1. Weryfikacja i walidacja metody. 2.2. Weryfikacja i walidacja testów. 2.2. Walidacja metod biologicznych. 3. Procedura walidacyjna – zasady. 3.1. Plan walidacji. 3.2. Protokół walidacji. 4. Rewalidacja. 5. Procedura weryfikacji metody komercyjnej – przykład. 5.1. Cel badania. 5.2. Plan badania. 5.2.1. Zasada wykonania oznaczeń. 5.2.2. Parametry i kryteria akceptacji. 5.2.2.1. Dokładność. 5.2.2.2. Precyzja. 5.3. Wyniki i obliczenia. 5.3.1. Dokładność. 5.3.2. Precyzja w warunkach powtarzalności. 5.3.3. Precyzja w warunkach odtwarzalności. 5.3.4. Przedstawienie precyzji w formie graficznej. 5.4. Wyniki a kryteria akceptacji. 5.5. Stwierdzenie walidacyjne. 6. Podsumowanie

#### Validation and verification methods and diagnostic tests in the microbiology laboratory

*Abstract:* There are a number of measurable factors evidence of the “quality” of laboratory tests. They allow to evaluate the laboratory proficiency, staff competency and applied technologies. There is a duty of each laboratory to prove that the method meets the quality requirements and is suitable for a particular purpose and result is credible. There are many acts that require verification and validation procedures in a laboratory. The aim of this article is to present a concept of validation and verification in microbiology and give an explanation of the difference between these processes. In this study a validation and verification parameters for the methods (e.g. accuracy, precision, repeatability, reproducibility, ruggedness, LOD, LOQ, linearity) were also described and they were divided into quantitative and qualitative methods. Parameters for tests validation and verification included sensitivity, specificity PPV, NPV. In the second part of the study an example of verification process of commercial methods is presented. A various the steps of the verification tests, the rules for calculation parameters and conclusions are also shown.

1. Introduction. 2. Validation and verification methods and diagnostic tests in the laboratory. 2.1. Verification and validation of the methods. 2.2. Verification and validation of the tests. 2.2. Validation of the biological methods. 3. Validation procedure – rules. 3.1. Validation scheme. 3.2. Validation protocol. 4. Revalidation. 5. Verification procedure of the commercial method – an example. 5.1. Aim of the study. 5.2. The study plan. 5.2.1. The principle study. 5.2.2. The parameters and acceptance criteria. 5.2.2.1. Accuracy. 5.2.2.2. Precision. 5.3. Results and calculations. 5.3.1. Accuracy. 5.3.2. Precision under repeatability conditions. 5.3.3. Precision under reproducibility conditions. 5.3.4. Presentation of precision in graphical form. 5.4. Results and the acceptance criteria. 5.5. The statement validation. 6. Summary

**Słowa kluczowe:** walidacja, weryfikacja, parametry metody, parametry testu, kryteria akceptacji

**Key words:** validation, verification, method's parameters, test's parameters, acceptance criteria

## 1. Wprowadzenie

Istnieje wiele mierzalnych wskaźników składających się na „jakość” badania laboratoryjnego, które uważane są za cechy charakterystyczne metody i poszczególnych testów, jak również pozwalają określić biegłość laboratorium w aspekcie kompetencji personelu oraz stosowanych technologii.

Platon, grecki filozof (ok. 427–347 p.n.e), określił „jakość” jako pewien stopień doskonałości; Joseph Moses Juran (1904–2008), amerykański teoretyk zarządzania, mówił o jakości jako o stopniu, w jakim określony wyrób zaspokaja potrzeby określonego nabywcy. Dlatego też, każde przeprowadzane w laboratorium badanie należy rozważać pod kątem zdolności laboratorium do wydania dokładnego, precyzyjnego i powta-

rzalnego wyniku, czasu realizacji badania, jak również przydatności wyniku badania do dalszego postępowania, a w przypadku medycznych laboratoriów diagnostycznych, postępowania diagnostyczno-terapeutycznego. „Jakość” zatem, to zgodność z wymaganiami (Philip Bayard Crosby, 1926–2001), czyli „jakość badania laboratoryjnego” to „jakość” otrzymanego wyniku. Stosowane testy powinny cechować się wysoką precyzją, dokładnością oraz powtarzalnością wyników. Obowiązkiem każdego laboratorium jest więc podejmowanie stosownych działań utwierdzających zarówno personel laboratorium, jak i odbiorcę wyników badań laboratoryjnych, w przekonaniu, że metoda spełnia wymagania jakościowe i jest odpowiednia do określonego zastosowania (norma PN-EN ISO/IEC 17025:2005) [9]. Zgodnie z normą PN-EN ISO/IEC 17025:2005 „laboratorium

\* Autor korespondencyjny: Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowy Instytut Leków, 00-725 Warszawa, ul. Chełmska 30/34, tel. 22 851 46 70; e-mail: estefaniuk@cls.edu.pl

powinno stosować właściwe metody i procedury do wszystkich badań objętych jego zakresem działalności. Dotyczy to pobierania próbek do badań, postępowania z obiektami (materiałami) poddawanych badaniom, ich przygotowania, przechowywania, transportowania oraz tam, gdzie to właściwe, oszacowania niepewności pomiaru, jak również technik statystycznych, stosowanych do analizy danych pochodzących z badania”.

Światowa Organizacja Zdrowia zdefiniowała walidację jako ustanowienie udokumentowanych dowodów dających wysoki stopień pewności, że zaplanowany proces będzie konsekwentnie przebiegać w przewidywalny i określony sposób [15]. Walidacja metod stała się standardem nie tylko w normach technicznych, ale także w przepisach prawnych, aczkolwiek żaden z tych dokumentów nie określa częstotliwości przeprowadzania walidacji metody. Autorzy dokumentów przyjęli też różne wymagania walidacyjne (definicje, metodologię i zakres parametrów walidacyjnych), w zależności od zakresu wykonywanych badań.

**Celem niniejszego opracowania jest:**

- przedstawienie pojęć *walidacja* i *weryfikacja* oraz wskazanie parametrów, które powinny być określane przez laboratorium mikrobiologiczne w każdym z tych procesów dla metod i testów diagnostycznych;
- przedstawienie przykładu procedury weryfikacji metody badawczej wykorzystującej nowe, komercyjne, dotychczas nie stosowane w laboratorium testy diagnostyczne.

## 2. Walidacja i weryfikacja metod i testów diagnostycznych w laboratorium mikrobiologicznym

Opisywane parametry walidacyjne dotyczące metod mikrobiologicznych w pierwszej kolejności odnosiły się do laboratoriów farmaceutycznych i środowiskowych. Najpełniejszy zakres parametrów walidacyjnych dla metod mikrobiologicznych przedstawiła Agencja Ochrony Środowiska w Stanach Zjednoczonych (Environmental Protection Agency, EPA) [3]. Większość zaleceń walidacyjnych dotyczyła jednak wytwórców różnego rodzaju wyrobów mających zastosowanie w diagnostyce mikrobiologicznej. Dokument Amerykańskiego Towarzystwa Mikrobiologów *Verification and validation of procedures in the clinical microbiology* (Cumitech 31A) [1] dokonał rozdziału pomiędzy walidacją przeprowadzaną przez producenta testów a walidacją i weryfikacją wykonywaną przez użytkownika. Zakres walidacji realizowanej w laboratorium jest stosunkowo niewielki w porównaniu z zakresem walidacji przeprowadzanej przez producenta testów. Laboratorium ma obowiązek ustalenia zasad i procedur pozwa-

lających utrzymać lub poprawić niezawodność, wydajność i kliniczną użyteczność badań laboratoryjnych.

Zgodnie z zaleceniami ASM (Cumitech 31A), laboratorium powinno opracować i stosować procedury dotyczące:

- procesów zapewniania o wiarygodności wyniku, polegających na utrzymywaniu niezmienności poszczególnych kroków badawczych (metodologii), kwalifikacji i kompetencji personelu do wykonywania testów i interpretacji wyników (*walidacja*),
- metody analizy nowo wprowadzanych do stosowania w laboratorium testów komercyjnych (*weryfikacja*).

**Walidacja jest więc ciągłym procesem monitorowania** badania, procedury lub metody, w celu zapewnienia, że badania stale wykonywane są zgodnie z oczekiwaniami. Walidacja odpowiada zatem na pytanie: „*czy stosowany test nadal działa w naszym laboratorium?*”. Walidacja jako proces ciągły, rozpoczyna się w momencie wdrażania nowego testu, metody diagnostycznej i kończy się w momencie jego zatrzymania. Status procesu „walidowanego” oznacza, że proces ten pozostaje pod stałą kontrolą [11].

**Weryfikacja natomiast, to proces jednorazowy**, przeprowadzany w celu ustalenia lub potwierdzenia oczekiwanej wydajności testu, przed zastosowaniem jego w laboratorium. Weryfikacja udziela więc odpowiedzi na pytanie: „*czy test działa w naszym laboratorium?*”. **Weryfikacja oznacza sprawdzenie testu w warunkach naszego laboratorium.** Jest to więc pierwszy etap walidacji.

Zarówno normy techniczne PN-EN ISO/IEC 17025:2005, PN-EN ISO 15189:2013 [8], jak i Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 21 stycznia 2009 r. w sprawie standardów jakości w medycznych laboratoriach mikrobiologicznych [12] wskazują tylko na konieczność potwierdzenia przydatności metod badawczych przed wprowadzeniem ich do zastosowania w laboratorium. Walidacja, zgodnie z normą PN-EN ISO/IEC 17025:2005, jest kompromisem pomiędzy kosztami, ryzykiem i możliwościami technicznymi. Nowe badania laboratoryjne zawsze należy rozważać pod kątem dodatkowych czynników, takich jak koszty jego wprowadzenia w warunkach panujących w danym laboratorium, koszty nowego oprzyrządowania, ale również łatwości wykonania testów, kompetencji personelu, a także znaczenia klinicznego wyników uzyskanych przy ich zastosowaniu.

Korzystając ze wskazówek zawartych w przewodniku opracowanym przez organizację europejską EURACHEM „Przydatność metod analitycznych do określonych celów. Przewodnik walidacji metod w laboratorium i zagadnienia związane” [4] metodę należy walidować wtedy, gdy:

- opracowano nową metodę,

- wprowadzono zmiany w metodzie polegające na udoskonaleniu lub rozszerzeniu jej stosowania (inny zakres pomiarowy, inny materiał kliniczny),
- kontrola jakości wskazuje na zmiany zachodzące w metodzie badawczej w czasie,
- zastosowano nowe wyposażenie pomiarowo-badawcze w danej metodzie.

W laboratoriach medycznych stosuje się trzy typy metod:

- metody ilościowe – wynik wyrażony w liczbach w skali ciągłej, której górne i dolne granice są znane i pozostają w ścisłym związku z daną ilością,
- metody półilościowe – wynik opatrzony interpretacją, pojęcie prognostyczne,
- metody jakościowe – wynik nie niesie informacji na temat wartości liczbowej parametru, lecz tylko na temat jego obecności lub braku (dodatni/ujemny). Do tego typu metod można zaliczyć wszystkie analizy, których wynik uzyskuje się poprzez wizualny odczyt reakcji, porównując z próbką kontrolną dodatnią, ujemną lub daną próbką. W pewnym sensie, odczyt analizy wykonanej metodą jakościową jest odczytem subiektywnym, stąd w metodach tych bardzo ważną rolę odgrywa czynnik ludzki.

Mało elementów uchwytanych, mierzalnych w metodach jakościowych sprawia, że ważną, wręcz fundamentalną rolę odgrywa bibliografia, dokumentacja literaturowa. Różnice poszczególnych typów metod powodują, że inaczej przeprowadza się walidację metody ilościowej, inaczej – metody jakościowej. W protokole z walidacji powinny być naniesione wszystkie dane wejściowe metody, które mogą mieć wpływ na wynik analiz.

Zgodnie z zaleceniami przewodnika EURACHEM, w procesach weryfikacji i walidacji ocenie podlegają różne parametry, w zależności czy dotyczą charakterystyki metod, czy też testów stosowanych w laboratorium mikrobiologicznym.

## 2.1. Weryfikacja i walidacja metody

Poniżej przedstawiono parametry oceniane w procesach weryfikacji i walidacji metody badawczej [1].

- **Dokładność** (*accuracy*) – oznacza „bliskość, zgodność” wartości poszczególnych parametrów do wartości uzyskanych metodami referencyjnymi; powinna być sprawdzana odpowiednimi materiałami kontrolnymi, porównaniami międzylaboratoryjnymi, jeśli są dostępne, za pomocą metody referencyjnej. W metodach ilościowych pojawia się także pojęcie **poprawności**, która w większości przypadków będzie tożsama z dokładnością. Różnica polega na tym, że poprawność określa stopień zgodności między wartością średnią otrzymaną z dużego zbioru pomiarów a wartością odniesienia. Miarą poprawności jest całko-

wity błąd systematyczny, czyli różnica pomiędzy wynikiem badania a wartością odniesienia.

$$\text{dokładność} = \frac{\text{liczba wyników prawidłowych}}{\text{liczba wszystkich wyników}} \times 100\% \quad (\text{A1})$$

- **Precyzja** (*precision*) – zgodność wyników serii pomiarów w danej próbce przy użyciu danej metody. Miernikiem precyzji dla metod ilościowych jest odchylenie standardowe (S) lub współczynnik zmienności wyrażany w procentach dla wyników uzyskanych w serii pomiarów. Miarą precyzji jest powtarzalność i odtwarzalność. Precyzja (w metodach ilościowych) to synonim powtarzalności/odtwarzalności (w metodach jakościowych) przy zastosowaniu identycznych procedur.

$$\begin{array}{l} \text{precyzja w warunkach} \\ \text{powtarzalności/odtwarzalności} \\ \text{wyrażona jako} \\ \text{odchylenie standardowe (S)} \\ \text{(metody ilościowe)} \end{array} \quad S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{A2})$$

- **Powtarzalność** (*repeatability*) – zgodność wyników pomiarów uzyskanych w danej próbce w tych samych warunkach pomiarowych, tj. w tym samym laboratorium, tą samą metodą, przez tę samą osobę, w krótkim czasie (seria jednoczesna).

$$\text{powtarzalność} = \frac{\text{liczba „powtórzonych” wyników zgodnych}}{\text{całkowita liczba wyników}} \times 100\% \quad (\text{A3})$$

- **Odtwarzalność** (*reproducibility*) – precyzja w warunkach odtwarzalności, tj. w różnych laboratoriach, tą samą metodą, przez różne osoby, w długim okresie czasu (seria niejednoczesna).

$$\text{odtwarzalność} = \frac{\text{liczba „odtworzonych” wyników zgodnych}}{\text{całkowita liczba wyników}} \times 100\% \quad (\text{A4})$$

- **Odporność metody** (*ruggedness*) – wpływ zmiany warunków wykonywania pomiarów na stabilność wyników. Umożliwia wskazanie krytycznych etapów badanej metody oraz etapów, w których dopuszczalne są pewne zmiany pozostające bez wpływu na parametry analityczne metody (np. wpływ temperatury i czasu inkubacji na wyniki, wpływ sposobu postępowania z próbką i warunków jej przechowywania, wpływ doświadczenia personelu, zwłaszcza w przypadku metod jakościowych oraz oznaczeń manualnych).

- **Granica wykrywalności** (*limit of detection* – LOD) – najmniejsze stężenie parametru w próbce, które można wykryć daną metodą.

- **Granica oznaczalności (granica oznaczenia ilościowego)** (*limit of quantification* – LOQ) – najmniejsze stężenie parametru, jakie można oznaczyć daną metodą z określoną dokładnością i precyzją.

- **Liniowość metody** (*linearity*) – zakres liniowej krzywej kalibracji, w którym sygnał jest liniowo zależny od stężeń wzorców.

Na uzyskane wyniki pomiarów mają wpływ:

- niedokładność narzędzi pomiarowych,
- nieściśłość w wykonaniu procedury pomiarowej,
- niemożność dokładnego określenia, scharakteryzowania mierzonego obiektu,
- wpływ czynników losowych na przebieg pomiaru.

## 2.2. Weryfikacja i walidacja testów

Poniżej przedstawiono parametry oceniane w procesach weryfikacji i walidacji testów [1].

- **Czułość** (*sensitivity*)

$$\text{czułość} = \frac{\text{liczba prawdziwie-dodatnich wyników}}{\text{liczba prawdziwie-dodatnich wyników} + \text{liczba fałszywie-ujemnych wyników}} \times 100\% \quad (\text{A5})$$

- **Specyficzność** (*specificity*)

$$\text{specyficzność} = \frac{\text{liczba prawdziwie-ujemnych wyników}}{\text{liczba prawdziwie-ujemnych wyników} + \text{liczba fałszywie-dodatnich wyników}} \times 100\% \quad (\text{A6})$$

- **Dodatnia wartość predykcyjna** (*positive predictive value, PPV*)

$$\text{PPV} = \frac{\text{liczba prawdziwie-dodatnich wyników}}{\text{liczba prawdziwie-dodatnich wyników} + \text{liczba fałszywie-dodatnich wyników}} \times 100\% \quad (\text{A7})$$

- **Ujemna wartość predykcyjna** (*negative predictive value, NPV*)

$$\text{NPV} = \frac{\text{liczba prawdziwie-ujemnych wyników}}{\text{liczba prawdziwie-ujemnych wyników} + \text{liczba fałszywie-ujemnych wyników}} \times 100\% \quad (\text{A8})$$

**Badanie precyzji powtarzalności, precyzji odtwarzalności oraz poprawności są wystarczające dla potwierdzenia przeprowadzenia procesu walidacji ilościowych komercyjnych metod badawczych stosowanych w laboratoriach medycznych.** W normie PN-EN ISO/IEC 17025:2005 wskazano techniki, których stosowanie zalecane jest podczas walidacji:

- sprawdzanie bieżące z wykorzystaniem certyfikowanych wzorców lub innych materiałów odniesienia,
- porównanie otrzymanych wyników z wynikami uzyskanymi innymi metodami, dotychczas stosowanymi w laboratorium (*weryfikacja*),
- analiza wyników uzyskanych w porównaniach międzylaboratoryjnych lub badaniach biegłości,
- okresowa ocena czynników wpływających na wynik,
- ocena niepewności wyników oparta na teoretycznych podstawach metody i praktycznym doświadczeniu personelu laboratorium.

Jeśli laboratorium samodzielnie opracowuje i wdraża

metodę badawczą (tzw. „*home brew test*”), Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 28 grudnia 2009 r. w sprawie zmiany rozporządzenia o standardach jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych, jak i normy techniczne, wymagają od laboratorium przeprowadzenia pełnej walidacji metody.

## 2.3. Walidacja metod biologicznych

Walidacja klasycznych metod mikrobiologicznych, które przeważnie są metodami jakościowymi, jest bardziej skomplikowanym procesem niż walidacja metod chemicznych, gdyż dotyczy żywych organizmów, które nierównomiernie rozkładają się w badanej próbce, a także mogą wykazywać pewne różnice w zachowaniu. Mamy więc do czynienia z procesem dynamicznym, a nie statycznym [7]. W Tabeli I wskazano parametry walidacji metod biologicznych w zależności od rodzaju metody [10, 13, 14].

W Tabeli II przedstawiono parametry, które laboratorium powinno określić w ramach weryfikacji komercyjnych metod biologicznych (opisanych i opracowanych przez producenta) [1, 6].

Tabela I  
Parametry walidacji metod biologicznych

Walidowany parametr	Metoda ilościowa	Metoda jakościowa/półilościowa
Dokładność	+	-
Precyzja	+	-
Specyficzność	+	+
Granica wykrywalności	+	+
Granica oznaczalności	+	-
Liniowość	+	-
Zakres	+	-
Powtarzalność	+	+
Odtwarzalność	+	+
Równocенność	+	+

Tabela II  
Parametry służące do weryfikacji komercyjnych metod biologicznych zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 28 grudnia 2009 r.

Parametry weryfikacyjne dla metod komercyjnych	Metoda ilościowa	Metoda jakościowa /półilościowa
Dokładność	+	
Precyzja	+	
Powtarzalność		+
Odtwarzalność		+
Równocенność*	+	+

\* parametr powinien być oznaczany dodatkowo dla metod komercyjnych modyfikowanych w laboratorium



Do oceny przydatności testów służą parametry takie jak czułość, swoistość, dodatnia i ujemna wartość predykcyjna. Warto jednak podkreślić, że ocena nowych testów diagnostycznych będzie wykonywana zawsze w oparciu o wyniki otrzymane metodą referencyjną.

### 3. Procedura walidacji – zasady

#### 3.1. Plan walidacji

Przed przystąpieniem do walidacji, laboratorium powinno opracować plan walidacji, w którym należy:

- uwzględnić rodzaj metody: jakościowa, półilościowa, ilościowa;
- określić rodzaj wyposażenia niezbędnego do przeprowadzenia badania;
- ustalić kliniczne materiały biologiczne oraz gatunki drobnoustrojów, jakie będą użyte w badaniu;
- określić wartości referencyjne ustalone na podstawie metod odniesienia;
- określić kryteria akceptacji wyników;
- wskazać personel odpowiedzialny za przeprowadzenie oznaczeń oraz interpretację wyników;
- określić czas wykonywania oznaczeń.

#### 3.2. Protokół walidacji

Po zakończeniu badań walidacyjnych należy skompletować całą dokumentację źródłową oraz wyniki przeprowadzonych oznaczeń, zarówno wydruki z zastosowanych systemów analitycznych, jak i pochodzące z odczytów wizualnych. Laboratorium samo decyduje o sposobie zapisów wyników walidacji, czy to w formie opisowej, czy w postaci tabeli. Niemniej, jako minimum informacji w protokole walidacyjnym, należy zawrzeć:

- identyfikację metody badawczej, dla metod opracowanych w laboratorium, odniesienie literaturowe,
- cel badania,
- obiekty wykorzystane do badania: materiały biologiczne od pacjenta, jak i szczepy drobnoustrojów wzorcowych i/lub odniesienia, wraz ze stosowną ich charakterystyką,
- badane cechy,
- zastosowane wyposażenie pomiarowo-badawcze (nazwa, producent),
- zastosowane odczynniki, testy (nazwa, producent, numer serii, data ważności),
- parametry walidacyjne – wartości cech charakterystycznych metody uzyskane w procesie walidacji i ich ocena pod kątem spełnienia przyjętych kryteriów akceptacji,
- dane osób wykonujących badania, podpisy,

- dane osoby analizującej i interpretującej wyniki oznaczeń, podpis,
- stwierdzenie walidacyjne – stwierdzenie o przydatności metody do zamierzonego zastosowania (zgodnie z celem badania),
- dane i podpis osoby upoważnionej do zatwierdzenia walidacji metody.

### 4. Rewalidacja

Ciągłe monitorowanie metody badawczej stanowi integralną część programu laboratoryjnej kontroli jakości. Zaleca się także, aby po wprowadzeniu istotnej zmiany w metodzie badawczej przeprowadzić ponowną walidację (rewalidacja), przynajmniej w zakresie objętym zmianą [1]. Zakres ponownej walidacji ustala laboratorium. Rewalidację wykonuje się w następujących sytuacjach:

- zmiany wyposażenia pomiarowo-badawczego lub zmianie jego lokalizacji,
- zmiany producenta odczynników i testów stosowanych w metodzie,
- zmiany warunków lokalowo-środowiskowych, w jakich wykonywane są badania,
- zmiany personelu wykonującego badania, na personel o mniejszym doświadczeniu,
- „nowych” zagrożeń ze strony epidemiologii zakażeń, np. pojawienie się nowych patogenów o niespotykanych dotąd w laboratorium cechach fenotypowych, genotypowych.

### 5. Procedura weryfikacji metody komercyjnej

#### – przykład

Metoda: Oznaczanie wartości najmniejszych stężeń hamujących MIC (mg/L) z użyciem pasków z gradientem stężeń.

Poniżej przedstawiono przykład procedury weryfikacji metody badawczej, która w laboratorium jest już stosowana od dłuższego czasu, ale w ramach tej metody laboratorium zamierza wprowadzić nowe testy diagnostyczne. W opisie procedury pominięto etap „inventaryzacji” (tj. nazw, producentów, numerów katalogowych, spisu numerów serii, dat ważności, itp.) stosowanych testów, odczynników i wyposażenia. Pominięto również szczegółowy opis metody badawczej, tj. oznaczania lekowrażliwości metodą pasków z gradientem stężeń. W procesie planowania badania uwzględniono aspekt ekonomiczny, co znalazło odzwierciedlenie m.in. w liczbie wykonanych oznaczeń i doborze materiałów odniesienia.

**Przedstawione poniżej wyniki należy traktować wyłącznie jako materiał metodyczny i nie mogą być one wykorzystywane do celów komercyjnych.**

## 5.1. Cel badania

Celem badania była weryfikacja metody oznaczania lekowrażliwości drobnoustrojów – oznaczania wartości najmniejszych stężeń hamujących antybiotyku (*minimal inhibitory concentration*, MIC [mg/L]) przy użyciu nowych testów – bibułowych pasków z gradientem stężeń antybiotyków/chemioterapeutyków dotychczas nie stosowanych w laboratorium, pod kątem oceny ich przydatności do zastosowania w rutynowej pracy laboratorium.

## 5.2. Plan badania

Ze względu na koszty badania weryfikacyjnego, oznaczenie wykonano tylko na szczepach referencyjnych – szczepach wzorcowych z Amerykańskiej Kolekcji Kultur Typowych (*American Type Culture Collection*, ATCC), bardzo dobrze sklasyfikowanych.

### 5.2.1. Zasada wykonania oznaczeń

Wyjaśnienie: Metoda oznaczania najmniejszego stężenia hamującego antybiotyku – MIC (zalicza się do metod ilościowych, gdyż wynikiem badania jest wartość liczbową podaną w mg/L, określająca stężenie antybiotyku, przy którym zahamowany zostaje wzrost drobnoustroju). Metoda ta jest rutynowo wykorzystywana w laboratoriach mikrobiologicznych i podlega kontroli jakości (*quality control*, QC) zgodnie z wytycznymi EUCAST [5]. Dlatego też, do weryfikacji metody oznaczania MIC „nowymi” paskami gradientowymi można wykorzystać wyniki kilkakrotnie przeprowadzonej kontroli jakości.

1. Badanie zostało wykonane przez dwóch mikrobiologów w trzech powtórzeniach (łącznie 6 oznaczeń). Wyjaśnienie: Taka liczba powtórzeń i odtworzeń pozwala obliczyć precyzję w warunkach powtarzalności i odtwarzalności.
2. Do weryfikacji pojedynczego testu (jeden typ paska z gradientem stężeń, np. pasek nasączony gradientem stężeń cefepimu) wykorzystano jeden z trzech szczepów wzorcowych zastosowanych w badaniu. Szczepy wzorcowe wykorzystane do oceny „nowych” pasków z gradientem stężeń oraz wykaz testów – pasków z gradientem stężeń poszczególnych antybiotyków przedstawiono w Tabeli III.
3. Aby ograniczyć liczbę zmiennych mających wpływ na wynik, próby powtórzone były wykonywane z tej samej zawiesiny bakteryjnej szczepu wzorcowego.
4. Zawiesinę badanych izolatów o gęstości 0,5 McFarlanda posiewano na podłoże Mueller-Hinton Agar, a następnie nakładano odpowiednie paski z gradientem stężeń (zgodnie z rekomendacjami EUCAST). Inkubację prowadzono w warunkach tlenowych przez  $18 \pm 2$  godzin w temperaturze  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Tabela III

Zestawienie wykorzystanych w badaniu szczepów wzorcowych z kolekcji ATCC vs. badany antybiotyk (pasek z gradientem stężeń)

Paski z gradientem stężeń antybiotyku	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213
Cefepim		+	
Cefotaksym	+		
Ceftazydym		+	
Ciprofloksacyna	+		
Kolistyna		+	
Daptomycyna			+
Gentamicyna	+		
Imipenem	+		
Linezolid			+
Meropenem	+		
Piperacylina/tazobaktam		+	
Teikoplanina			+
Tigecyklina	+		
Wankomycyna			+

5. Wartości MIC odczytano zgodnie z zaleceniami producenta testów i rekomendacjami EUCAST. Uzyskane wyniki wykorzystano do oceny parametrów charakteryzujących metodę.

### 5.2.2. Parametry i kryteria akceptacji

#### 5.2.2.1. Dokładność

Otrzymany wynik oznaczenia lekowrażliwości (wartość MIC) należy porównać z wartością odniesienia (wartością umownie rzeczywistą). Badanie przeprowadza się wykorzystując szczepy wzorcowe, służące do rutynowej kontroli jakości, dla których wartości MIC (mg/L) poszczególnych antybiotyków są ściśle określone. Wynik dokładny to taki, który mieści się w przedziale (*range*) wartości prawidłowych dla danego szczepu i antybiotyku. Dokładność można obliczyć korzystając ze wzoru:

$$\text{dokładność} = \frac{\text{liczba wyników zgodnych z wartościami QC dla każdego szczepu i każdego antybiotyku}}{\text{liczba wszystkich oznaczeń}} \times 100\% \quad (\text{A9})$$

(wzór odpowiada wzorowi A1 z rozdz. 2.1.)

**Kryterium akceptacji:** dla metod oznaczania lekowrażliwości akceptowalnym kryterium jest uzyskanie > 90% wyników zgodnych z metodą odniesienia [2].

#### 5.2.2.2. Precyzja

W badaniach ilościowych precyzję oznacza się w warunkach powtarzalności i odtwarzalności. Przy projektowaniu badań należy uwzględnić odpowiednią liczbę oznaczeń:

Tabela IV

Wyniki oznaczeń – weryfikacja metody oznaczania wartości MIC (mg/L) z wykorzystaniem „nowych” pasków gradientowych

Paski z gradientem stężeń antybiotyku	Szczep wzorcowy*	Prawidłowe wartości QC MIC (mg/L)	1. mikrobiolog oznaczenie / MIC (mg/L)			2. mikrobiolog oznaczenie / MIC (mg/L)		
			I	II	III	I	II	III
Cefepim	1	0,5–4	2	1,5	2	1,5	1,5	1,5
Cefotaksym	2	0,03–0,125	0,047	0,064	0,047	0,047	0,047	0,047
Ceftazydym	1	1–4	1,5	1,5	1,5	1,5	1	1
Ciprofloksacyna	2	0,004–0,016	0,016	0,016	0,016	0,023	0,016	0,016
Kolistyna	1	0,5–4	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Daptomycyna	3	0,125–1	0,75	0,5	0,75	0,5	0,75	0,5
Gentamicyna	2	0,25–1	0,75	0,75	0,75	0,75	0,5	0,75
Imipenem	2	0,06–0,25	0,19	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Linezolid	3	1–4	2	2	1,5	2	1,5	2
Meropenem	2	0,008–0,06	0,023	0,023	0,016	0,016	0,016	0,016
Piperacylina/tazobaktam	1	1–8	4	4	4	4	6	4
Teikoplanina	3	0,25–1	0,75	1	0,75	1	0,75	0,75
Tigecyklina	2	0,03–0,25	0,125	0,125	0,094	0,125	0,094	0,094
Wankomycyna	3	0,5–2	1	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75

\* szczepy wzorcowe: nr 1 – *P. aeruginosa* ATCC 27853; nr 2 – *E. coli* ATCC 25922; nr 3 – *S. aureus* ATCC 29213.

- w celu obliczenia precyzji w warunkach powtarzalności oznaczenie powinno być powtórzone minimum trzykrotnie przez jedną osobę;
- natomiast, aby ocenić precyzję w warunkach odtwarzalności, wskazane jest wykonanie badania przez minimum dwie niezależne osoby.

Precyzję można wyrazić w postaci współczynnika zmienności zgodnie ze wzorem:

$$\text{współczynnik zmienności} = \frac{\text{odchylenie standardowe}}{\text{wartość średnia}} \times 100\% \quad (\text{A10})$$

(patrz: precyzja, rozdz. 2.1.)

**Kryterium akceptacji:** Dla metod mikrobiologicznych współczynnik zmienności jest akceptowalny w zakresie 15–30% [6]. Im niższa wartość współczynnika zmienności, tym precyzja większa.

### 5.3. Wyniki i obliczenia

Wyniki oznaczeń zebrano w tabeli IV.

#### 5.3.1. Dokładność

Tylko jeden wynik – wartość MIC (mg/L) ciprofloksacyny dla szczepu *E. coli* ATCC 25922 odczytany przez mikrobiologa nr 2. (oznaczenie nr I) nie mieścił się w zakresie prawidłowych wartości referencyjnych QC (patrz: tabele EUCAST). Dokładność wszystkich oznaczeń została obliczona zgodnie z wzorem (A9) i zebrana w Tabeli V.

#### 5.3.2. Precyzja w warunkach powtarzalności

Do oceny precyzji w warunkach powtarzalności zostały wykorzystane trzykrotnie powtórzone wyniki otrzymane przez dwóch niezależnych mikrobiologów.

Tabela V

Dokładność metody określania wartości MIC (mg/L) wybranymi paskami z gradientem stężeń

Antybiotyki w paskach gradientowych	Dokładność [%]
Cefepim	100,00
Cefotaksym	100,00
Ceftazydym	100,00
Ciprofloksacyna	83,33
Kolistyna	100,00
Daptomycyna	100,00
Gentamicyna	100,00
Imipenem	100,00
Linezolid	100,00
Meropenem	100,00
Piperacylina/tazobaktam	100,00
Teikoplanina	100,00
Tigecyklina	100,00
Wankomycyna	100,00
Wartość średnia z dokładności	98,8

Precyzję oznaczeń obliczono, zgodnie ze wzorami (A2) i (A10), osobno dla każdego z mikrobiologów (powtarzalność). Wyniki przedstawiono w Tabeli VI.

#### 5.3.3. Precyzja w warunkach odtwarzalności

W celu wyznaczenia precyzji w warunkach odtwarzalności do obliczeń zostały zakwalifikowane wszystkie wyniki otrzymane w badaniu (razem mikrobiolog 1. i 2. – odtwarzalność). Podobnie, jak powyżej, precyzję wyrażono w postaci wartości średniej współczynnika zmienności (patrz: Tabela VII).

Tabela VI  
Precyzja w warunkach powtarzalności

Paseki z gradientem stężeń antybiotyku	1. mikrobiolog			2. mikrobiolog		
	Średnia	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności [%]	Średnia	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności [%]
Cefepim	1,83	0,29	15,75	1,50	0,00	0,00
Cefotaksym	0,05	0,01	18,64	0,05	0,00	0,00
Ceftazydym	1,50	0,00	0,00	1,17	0,29	24,74
Ciprofloksacyna	0,02	0,00	0,00	0,02	0,00	22,04
Kolistyna	1,50	0,00	0,00	1,50	0,00	0,00
Daptomycyna	0,67	0,14	21,65	0,58	0,14	24,74
Gentamicyna	0,75	0,00	0,00	0,67	0,14	21,65
Imipenem	0,23	0,03	15,06	0,25	0,00	0,00
Linezolid	1,83	0,29	15,75	1,83	0,29	15,75
Meropenem	0,02	0,00	19,56	0,02	0,00	0,00
Piperacylina/tazobaktam	4,00	0,00	0,00	4,67	1,15	24,74
Teikoplanina	0,83	0,14	17,32	0,83	0,14	17,32
Tigecyklina	0,11	0,02	15,61	0,10	0,02	17,15
Wankomycyna	0,83	0,14	17,32	0,75	0,00	0,00
<b>Współczynnik zmienności [%] – wartość średnia (warunki powtarzalności)</b>	<b>11,19</b>			<b>12,01</b>		

Tabela VII  
Precyzja z warunkach odtwarzalności

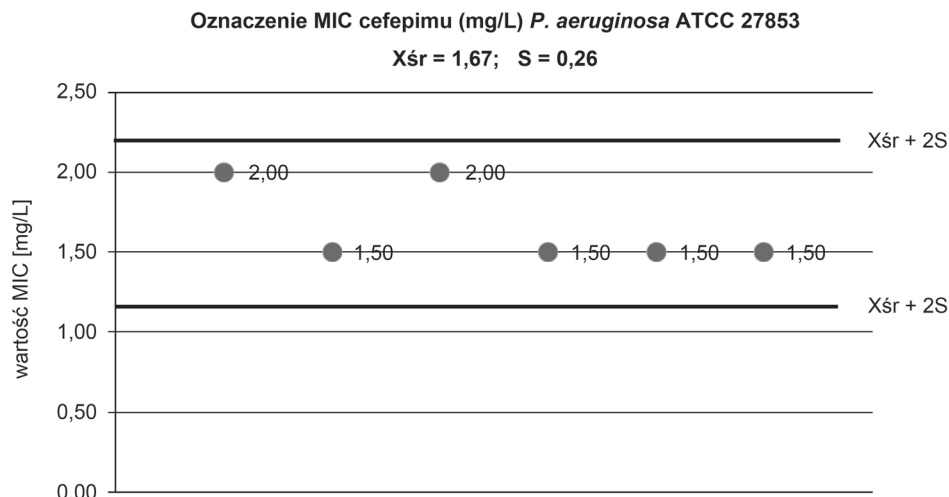
Paseki z gradientem stężeń antybiotyku	Zebrane wyniki (mikrobiolog 1. i 2.)		
	Średnia	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności [%]
Cefepim	1,67	0,26	15,49
Cefotaksym	0,05	0,01	13,93
Ceftazydym	1,33	0,26	19,36
Ciprofloksacyna	0,02	0,00	16,65
Kolistyna	1,50	0,00	0,00
Daptomycyna	0,63	0,14	21,91
Gentamicyna	0,71	0,10	14,41
Imipenem	0,24	0,02	10,21
Linezolid	1,83	0,26	14,08
Meropenem	0,02	0,00	19,72
Piperacylina/tazobaktam	4,33	0,82	18,84
Teikoplanina	0,83	0,13	15,49
Tigecyklina	0,11	0,02	15,51
Wankomycyna	0,79	0,10	12,89
<b>Współczynnik zmienności [%] – wartość średnia (warunki odtwarzalności)</b>	<b>14,89</b>		

#### 5.3.4. Przedstawienie precyzji w formie graficznej

Dodatkowo, precyzję, dla każdego z antybiotyków osobno, przedstawiono także w formie graficznej. Rys. 1. przedstawia wyniki oznaczania wartości MIC (mg/L) cefepimu dla szczepu *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Wyjaśnienie: Aby wyniki oznaczeń uznać za precyzyjne, 95% z nich ( $n=6/6$ ) powinno mieścić się w zakresie  $\bar{X} \pm 2S$  ( $\bar{X}$  – wartość średnia;  $S$  – odchylenie standardowe); np. oznaczanie wartości MIC (mg/L) cefepimu:  $\bar{X} = 1,67$ ;  $S = 0,26$





Rys. 1. Graficzne przedstawienie precyzji oznaczenia MIC cefepimu (mg/L); wartość średnia  $\bar{X} = 1,67$ ; odchylenie standardowe  $S = 0,26$

Zakres, w którym powinno się mieścić 95% wyników (w przedstawianym przykładzie wszystkie wyniki), zgodnie ze wzorem  $\bar{X} \pm 2S$  wynosi  $1,67 \pm (2 \times 0,26)$ . Przedział, w którym powinny się znaleźć otrzymane wartości wynosi więc od 1,15 do 2,19.

Wszystkie otrzymane wyniki mieszczą się w wyznaczonym zakresie, co pozwoliło uznać metodę (dla tego antybiotyku) za precyzyjną (precyzja w warunkach odtwarzalności, wyniki obu mikrobiologów łącznie).

#### 5.4. Wyniki a kryteria akceptacji

1. Zastosowana metoda oceny lekowrażliwości z wykorzystaniem „nowych”, bibułowych pasków z gradientem stężeń (określanie wartości MIC w mg/L) dotychczas nie stosowanych w laboratorium, charakteryzuje się wysoką dokładnością (za wyjątkiem ciprofloksacyny) oraz precyzją, zarówno w warunkach powtarzalności, jak i odtwarzalności.
2. Najniższą dokładność (83,3%) otrzymano dla oznaczeń wartości MIC ciprofloksacyny dla szczepu wzorcowego *E. coli* ATCC 25922. Jeden z sześciu pomiarów nie mieścił się w zakresie referencyjnym QC dla tego szczepu. Dokładność dla tego antybiotyku nie spełniła więc kryteriów akceptacji, dlatego też przed dopuszczeniem tego testu (pasek z ciprofloksacyną) do rutynowego stosowania w laboratorium należy wykonać serię dodatkowych oznaczeń z zastosowaniem np. innej serii pasków tego producenta, czy też podłoży antybiogramowych.
3. Badanie zostało wykonane niezależnie przez dwóch mikrobiologów. Precyzja, wyrażona jako współczynnik zmienności, obliczona dla każdej z tych osób wynosiła poniżej 15% (precyzja w warunkach powtarzalności).

Niższy współczynnik zmienności, czyli wyższą precyzję, odnotowano w przypadku wyników mikrobiologa 1., co może świadczyć o większym doświadczeniu zarówno w kwestii technicznej wykonania badania, jak i odczycie wyników. Niemniej, różnica między mikrobiologiem 1. i 2. jest niewielka i nie jest istotna statystycznie.

4. Precyzja w warunkach odtwarzalności mieści się w akceptowalnym zakresie dla wszystkich antybiotyków (wartość średnia = 14,89). Najniższą precyzją charakteryzuje się oznaczenie wartości MIC daptomycyny, a najwyższą – MIC kolistyny.
5. Współczynnik zmienności obliczony w warunkach odtwarzalności może być wyznacznikiem komfortu pracy z daną metodą. Im mniejsze różnice pomiędzy osobami wykonującymi badanie, tym niższa jest wartość współczynnika zmienności, co świadczy o niskim stopniu trudności wykonania badania i bezproblemowej interpretacji wyników. Dlatego też, współczynniki zmienności dla poszczególnych antybiotyków mogą się od siebie różnić. Ma to związek nie tylko z jakością testu, ale także z budową antybiotyku (wielkość cząsteczki), zasadą działania na drobnoustroje (leki bakteriobójcze i bakteriostatyczne), specyfiką badanego szczepu oraz z jakością i składem podłoża.

W Tabeli VIII przedstawiono zgodność określonych parametrów metody z przyjętymi w niniejszym badaniu kryteriami akceptacji.

#### 5.5. Stwierdzenie walidacyjne (dotyczy przeprowadzonej weryfikacji)

Na podstawie przeprowadzonej analizy można wnioskować, że otrzymane w badaniu wartości parametrów charakterystycznych (dokładność i precyzja)

Tabela VIII  
Analiza spełnienia kryteriów akceptacji przez parametry wyznaczone dla badanej metody

Parametry metody oznaczania wartości MIC (mg/L) przy użyciu pasków bibułowych z gradientem stężeń			
Badany parametr	Wartość	Kryteria akceptacji	Spełnienie kryteriów
Dokładność	100% za wyjątkiem ciprofloksacyny	≥ 90%	Tak za wyjątkiem ciprofloksacyny
Precyzja w warunkach powtarzalności	11,60%*	≤ 30%	Tak
Precyzja w warunkach odtwarzalności	14,89%	≤ 30%	Tak

\* wartość średnia wyników mikrobiologa 1. i 2.

dla metody oznaczania lekowrażliwości drobnoustrojów z wykorzystaniem „nowych” pasków bibułowych z gradientem stężeń, spełniają przyjęte kryteria akceptacji za wyjątkiem paska z ciprofloksacyną.

Oznaczanie wartości MIC (mg/L) ciprofloksacyny dla szczepu *E. coli* ATCC 25922 cechuje się niedostateczną dokładnością. Sugeruje się, przed „dopuszczeniem” tego testu do stosowania, wykonanie dodatkowych oznaczeń.

**Oceniana metoda (za wyjątkiem paska z ciprofloksacyną) może być stosowana w laboratorium w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej do oznaczania lekowrażliwości drobnoustrojów.**

## 6. Podsumowanie

Stosowanie dobrze opisanych i sprawdzonych metod nie daje automatycznie gwarancji uzyskania rzetelnych wyników. Tą samą metodą można uzyskać różne wyniki w zależności od kwalifikacji personelu czy stosowanego wyposażenia pomiarowo-badawczego. Dlatego też, laboratorium powinno kontrolować jakość wykonywanych badań, aby móc udowodnić, że jest w stanie spełnić kryteria akceptacji opisane w stosowanych przez siebie metodach.

Walidacja i weryfikacja badań mikrobiologicznych przysparza trudności, ponieważ dotyczy żywych drobnoustrojów, które oprócz nierównomiernego występowania w badanej próbce, mogą także wykazywać pewne różnice w zachowaniu. Dlatego, podczas projektowania badań walidacyjnych czy toku weryfikacji, należy wziąć pod uwagę także naturę drobnoustrojów używanych do testów walidacyjnych, sposób przygotowania zawiesiny drobnoustrojów testowych, specyficzne warunki testu, a nawet warunki izolacji drobnoustrojów.

## Piśmiennictwo

1. Clark R.B., Lewinski M.A., Loeffelholz M.J., Tibbetts R.J.: Cumitech 31A (w) Verification and validation of procedures in the clinical microbiology, red. D.L. Sewell, ASM Press, Washington (2009)
2. CLSI. Development of *in vitro* susceptibility testing criteria and quality control parameters; approved guideline. Third ed. CLSI document M23-A3. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2008)
3. EPA: Method Validation of U.S. Environmental Protection Agency. Microbiological Methods of Analysis (2009)
4. EURACHEM. Przydatność metod analitycznych do określonych celów. Przewodnik walidacji metod w laboratorium i zagadnienia związane. *POLLAB, Biul. Inf.* 2, 30 (2000)
5. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Routine and extended internal quality control as recommended by EUCAST. Version 5.0 [www.eucast.org](http://www.eucast.org); [www.korld.edu.pl](http://www.korld.edu.pl) (2015)
6. Evaluation, Validation and Implementation of New Microbiological Testing Methods. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, Supp. TR 33, 54, 3 (2000)
7. Pasek W.: Walidacja metod mikrobiologicznych. *Pharmaceutica*, 8, 4–6 (1999)
8. PN-EN ISO 15189:2013. Laboratoria medyczne – wymagania dotyczące jakości i kompetencji.
9. PN-EN ISO/IEC 17025:2005. Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących.
10. Przewodnik walidacji metod oznaczania biologicznego. Raport Komisji SFSTP. *Pharmaceutica*, 3, 5–8 (2004)
11. Roman S.: Dlaczego i jak walidować. *Pharmaceutica*, 3, 58 (1998)
12. Rozporządzenie Ministra Zdrowia w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych 21 stycznia 2009 z późniejszymi zmianami (Dz.U.2009.22.128)
13. Tyski S.: Kontrolne badania mikrobiologiczne stosowane w farmacji, nowe metody i ich walidacja. *Mikrobiologia Medycyna*, 2, 16–24 (2001)
14. Tyski S.: Nowe, szybkie metody mikrobiologiczne w badaniach jakości leków. *Biuletyn Instytutu Leków*, 45, 636–652 (2001)
15. World Health Organization; A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation, 3 (2007)