

Zapewnienie jakości badań w laboratorium: moda czy konieczność?



- ✦ M. Trzcinka-Ochocka
- ✦ G. Raźniewska

- ✦ Instytut Medycyny Pracy im prof. J. Nofera, Łódź
- ✦ Pracownia Monitoringu Biologicznego



Polityka jakości

- ✓ **formalne określenie własnych zamierzeń laboratorium w sprawach jakości**
- ✓ **w przypadku laboratoriów higieny pracy i większości innego rodzaju laboratoriów, deklarowana polityka jakości ma odniesienie do normy międzynarodowej**

ISO/IEC 17025:1999 (PN-EN ISO/IEC 17025/2001)



System jakości

- ✦ **Struktura organizacyjna laboratorium**
- ✦ **Podział odpowiedzialności**
- ✦ **Księga Jakości**
- ✦ **Procedury Systemu Jakości**
- ✦ **Procedury badawcze, instrukcje robocze, instrukcje obsługi**
- ✦ **Wyposażenie badawcze i pomiarowe**

Kompetencje techniczne laboratorium

☀ Organizacja i zarządzanie

- ✓ Laboratorium powinno określić zakres swojej działalności badawczej
- ✓ Laboratorium powinno posiadać personel kierowniczy i niezbędne środki do wykonywania swoich obowiązków (kierownik techniczny, ds.jakości, sygnatariusz uwierzytelniony)

☀ Personel

- ✓ Zasady kwalifikowania personelu na stanowiska kluczowe,
- ✓ Zakres obowiązków i uprawnień całego personelu,
- ✓ Polityka szkolenia personelu:
 - szkolenia wewnętrzne
 - szkolenia zewnętrzne
- ✓ Rejestr każdego pracownika

Kompetencje techniczne laboratorium

*** Pomieszczenia i środowisko (nie może stanowić przyczyny unieważnienia wyników badań)**

- ✓ miejsce wykonywania badań: przestronność, brak wpływu czynników zewn., odpowiednie wyposażenie, ewent. konieczność stosowania „czystego pokoju” lub komory laminarnej (ślepe próbki),
- ✓ monitor. warunków środowiska,
- ✓ odpowiednie przechowywanie wzorców i odczynników,
- ✓ miejsce lub pomieszczenie do przyjmowania próbek od klientów,
- ✓ określenie dostępu do laboratorium osób spoza laboratorium,

*** Wyposażenie pomiarowe i badawcze**

Wszystkie przyrządy pomiarowe i urządzenia do badań, które są niezbędne do badań.

wzorce pomiarowe, materiały odniesienia, aparatura pomocnicza, instalacje, materiały, odczynniki oraz instrukcje z oprogramowaniem komputerowym. **Laboratorium powinno prowadzić wykazy różnych kategorii WPiB.**

Przyrządy pomiarowe powinny być wzorcowane, sprawdzane i potwierdzane metrologicznie. Potwierdzenie metrologiczne obejmuje: wzorcowanie, niezbędną adjustację lub naprawę i ponowne wzorcowanie (W Urzędach Miar, w laboratorium przez porównanie z wzorcem odniesienia lub roboczym jednostki miary, lub z materiałem odniesienia).

WPIB

- ✱ **Przyrządy pomiarowe** – wzorcowane i sprawdzane

- ✱ **Naczynia pomiarowe** - sprawdzane

kolby pomiarowe, pipety, biurety; objętość tych naczyń powinna być sprawdzana okresowo metodami grawimetrycznymi

- ✱ **Wzorce i materiały odniesienia:**

Jako wzorce w analizie chemicznej należy stosować wzorce chemiczne kupione od producenta wraz z certyfikatem oraz referencyjne materiały odniesienia dostępne w handlu. Zawsze nową partię wzorca chemicznego należy sprawdzić przez porównanie ze starą

- ✱ **Sprzęt pomocniczy i materiały pomocnicze** - konserwowane

Sprzęt pomocniczy: lodówki, ciepłarki, łaźnie wodne, płyty grzejne, ekсыkatory, mineralizatory, mieszadła, pompy.

Materiały pomocnicze (zużywalne): odczynniki chemiczne, sorbenty, naczynia laboratoryjne niemiarowe, sączi itp.

Etykieta odczynników

Odczynniki przygotowane w laboratorium powinny być zaopatrzone w etykiety zawierające następujące informacje i ewidencjonowane i opatrzone symbolem :

- ✱-nazwę substancji;
- ✱-stężenie lub miano;
- ✱-datę przygotowania;
- ✱-datę ważności (jeśli wymagana)
- ✱-nazwisko i imię (inicjały) osoby przygotowującej;
- ✱-użyty rozpuszczalnik (jeśli inny niż woda);
- ✱-sposób przechowywania, wpisać odpowiedni symbol, np. t_z -temperatura zamrażarki (do -18°C), t_L -temperatura chłodziarki (ok. $+5^{\circ}\text{C}$), t_p -temperatura pokojowa ($20-25^{\circ}\text{C}$); ponadto, jeśli to konieczne napisy lub znaki ostrzegawcze, np. palny, wybuchowy, truczna, żrące, chronić przed światłem.

Dokumentacja WPiB

1. wykazy WPiB;
2. świadectwa i certyfikaty wystawione przez instytucje zewnętrzne (uprawnione);
3. protokoły (karty, metryki) zainstalowania;
4. zapisy dotyczące wzorcowań i/lub sprawdzeń;
5. zapisy dotyczące napraw, konserwacji lub modernizacji;
6. instrukcje obsługi;
7. dzienniki pracy przyrządów

POBIERANIE PRÓBEK i POSTĘPOWANIE Z PRÓBKAMI

Metody pobierania próbek powinny gwarantować reprezentatywność próbki w stosunku do badanej populacji oraz jej integralność.

✓Jeśli laboratorium stosuje w badaniach metody znormalizowane, to zasady pobierania próbek (strategia) i warunki techniczne, np. niezbędne przyrządy, objętość próbki, warunki transportu i przechowywania, trwałość – są podane w treści metody badawczej .

✓Jeśli laboratorium nie stosuje znormalizowanych metod pobierania próbek, to powinna zostać opracowana w laboratorium i opisana własna procedura techniczna pobierania próbek.

POSTĘPOWANIE Z PRÓBKAMI

Zapisy dotyczące pobierania próbek (procedura)- **oznakowanie próbek:**

1. Plan pobierania próbek zatwierdzany przez kierownika tematu,

2. Sterowanie jakością pobierania próbek:

monitorowanie i dokumentowanie wskazań przyrządów, próbników
ocenę możliwych kontaminacji: „ślepa próbka”

2. Protokół pobierania / przyjęcia próbek

3. Ewidencja przychodu próbek badanych/ postępowanie z próbkami w laboratorium:

identyfikacja próbek, miejsce przyjmowania i przechowywania próbek, czas przechowywania, zasady pozbywania się próbek i materiałów pomocniczych po badaniu

METODY BADAŃ

Laboratorium powinno stosować udokumentowane metody badawcze gwarantujące otrzymanie poprawnego wyniku, nieobciążonego błędami systematycznymi.

Mogą to być metody:

- ✓ znormalizowane: państwowe, międzynarodowe
- ✓ nieznormalizowane

METODY BADAŃ

Metody nieznormalizowane powinny być opisane w formie procedury badawczej i zawierać

➤ **niepowtarzalne identyfikatory (w tym status wydania np.. nr edycji lub data) oraz:**

➤ **opis metody analitycznej, w tym: zakres stosowania i ograniczenia, przyrządy pomiarowe i materiały pomocnicze, przygotowanie wzorców i przeprowadzenie wzorcowania, zasady i warunki pobrania próbek, postępowanie z próbkami, wykonanie oznaczania, inne szczególne ustalenia, obliczenie wyniku;**

➤ **parametry walidacji metody;**

➤ **zasady wewnętrznego sterowania jakością badań (program, w tym: częstość analiz/pomiarów kontrolnych, stosowane materiały odniesienia/wzorce, metody zapisywania i przedstawiania wyników analiz/pomiarów kontrolnych (karty kontrolne), kryteria oceny.**

METODY BADAŃ

Laboratorium powinno prowadzić właściwy nadzór nad metodami badawczymi polegający na:

- ✱ **walidacji metod badawczych;**
- ✱ **dokumentowaniu odstępstw;**
- ✱ **aktualizacji zmian wprowadzanych do norm państwowych lub międzynarodowych przez komitety normalizacyjne;**
- ✱ **aktualizacji metod znormalizowanych;**
- ✱ **kontroli systemu rozpowszechnienia.**

Charakterystyka metod badawczych

Zakres walidacji metod badawczych stosowanych w laboratoriach może obejmować:

- ✦ **Analizę chemiczną jakościową:** wykrywalność, zakres roboczy i specyficzność
- ✦ **Analizę chemiczną ilościową:** zakres roboczy, oznaczalność, liniowość, powtarzalność, poprawność, specyficzność i czułość.

ANALIZA CHEMICZNA ILOŚCIOWA

ZAKRES ROBOCZY:

- ✦ w zakresie roboczym metody istotna jest akceptowana poprawność (błąd systematyczny) i precyzja oznaczeń (błąd przypadkowy)
- ✦ Zakres roboczy charakteryzowany jest przez: liniowość lub nieliniowość, wyznaczane krzywymi wzorcowania.
- ✦ Dla metod odznaczających się dobrą liniowością, **krzywą wzorcowania należy wyznaczyć na podstawie 5 wzorców** o różnym stężeniu badanego czynnika.
- ✦ Dla metod nieliniowych liczbę wzorców należy zwiększyć (nawet do 10).
- ✦ Dolna granica zakresu roboczego odpowiada zwykle granicy oznaczania ilościowego

ANALIZA CHEMICZNA ILOŚCIOWA

LINIOWOŚĆ:

- ✦ Do oceny liniowości wykorzystuje się współczynnik regresji r , którego wartość nie powinna być mniejsza niż 0,999.

ANALIZA CHEMICZNA ILOŚCIOWA

SELEKTYWNOŚĆ I SPECYFICZNOŚĆ

- ✦ **Selektywność metody** – zdolność metody do rozróżniania i oznaczania składnika lub grupy składników w złożonej mieszaninie bez zakłóceń ze strony innych składników mieszaniny.
- ✦ **Metoda specyficzna** – metoda, która jest idealnie selektywna dla substancji oznaczanej.
- ✦ Pojęcie **selektywności i/lub specyficzności** wiąże się z poprawnością metody, a więc z występowaniem błędu systematycznego.

ANALIZA CHEMICZNA ILOŚCIOWA

GRANICA WYKRYWALNOŚCI :

- **najmniejsza ilość substancji oznaczanej, jaką można wykryć w badanej próbce daną metodą (techniką) pomiarową.**

Miarą granicy wykrywalności są 3 standardowe odchylenia dla próbki ślepej dla np. n=20 oznaczeń

$$x_{\min} = 3s_{SP}$$

s_{SP} – standardowe odchylenie dla 20-stu oznaczeń próbki ślepej

$$x_{\min} = 3s_{1x}$$

s_{1x} – standardowe odchylenie dla najniższego stężenia wzorca, który można oznaczyć z określoną precyzją

ANALIZA CHEMICZNA ILOŚCIOWA

GRANICA OZNACZANIA ILOŚCIOWEGO

- ☀ Granica oznaczania ilościowego jest to najmniejsza zawartość (stężenie) danej substancji, którą daje się w sposób pewny ilościowo oznaczyć. Może to być dolna granica zakresu roboczego metody, uwarunkowana uzyskaniem żądanej precyzji oznaczeń.
- ☀ Zawartość substancji odpowiadającą granicy oznaczania ilościowego (x_{ozn}) oblicza się następująco:

$$x_{ozn} = 6 s_{sp} \quad \text{lub} \quad x_{ozn} = 6 s_{1x}$$

czyli $x_{ozn} = 2 x_{min}$ (granice wykrywalności)

ANALIZA CHEMICZNA ILOŚCIOWA

POPRAWNOŚĆ

- stopień zgodności między wartością średnią otrzymaną z długich serii wyników badania a przyjętą wartością odniesienia. Za miarę poprawności wyników badania przyjmuje się zwykle obciążenie.

Poprawność metody, charakteryzowana **obciążeniem** jest **określana przez błąd systematyczny**

Błąd systematyczny (B_w) można wyrazić ilościowo za pomocą błędu względnego obliczonego wg równania:

$$B_w = |x_i - x_{ref}| / x_{ref}$$

w którym x_i – wartość oznaczana ; x_{ref} – wartość odniesienia.

ANALIZA CHEMICZNA ILOŚCIOWA

POWTARZALNOŚĆ:

- ✦ Powtarzalność charakteryzuje precyzja metody i związana jest z pojęciem odchylenia standardowego
- ✦ Odchylenie standardowe charakteryzuje błędy przypadkowe Powtarzalność oblicza się wg równania:

$$r_p = 2 s_r \sqrt{2} \quad - \text{ dla analiz podwójnych } r_p = t_{(\alpha, f)} \cdot s_r \sqrt{2}$$

$(n=20 \quad t_{(\alpha, f)} = 2)$

$$r_p = 2 s_r \quad - \text{ dla analiz pojedynczych } r_p = t_{(\alpha, f)} \cdot s_r$$

ANALIZA CHEMICZNA ILOŚCIOWA

PRECYZJA METODY: $\frac{S_r}{x} 100 \%$

★ **Zmienność metody analitycznej** (zakresu roboczego), **zwana precyzją** charakteryzuje błąd losowy **wyrażony odchyleniem standardowym** lub jego pochodną względną – **współczynnikiem zmienności**.

★ Jeżeli znany jest zakres roboczy metody, to można oszacować zmienność wewnątrzlaboratoryjną tego zakresu, wykonując w jednym dniu lub w różnych dniach serię powtarzanych (wielokrotnych) analiz próbek materiału odniesienia na jednym lub na wielu poziomach stężeń.

ANALIZA CHEMICZNA ILOŚCIOWA

NIEPEWNOŚĆ POMIARU

- ✱ Niepewność – parametr, związany z wynikiem pomiaru charakteryzujący rozrzut wartości, które można w uzasadniony sposób przypisać wielkości mierzonej.
- ✱ Parametrem niepewności jest odchylenie standardowe (lub jego wielokrotność) albo połowa szerokości przedziału ufności, odpowiadającego określonemu poziomowi istotności.

Względna całkowita niepewność (u_T) metody (zwana inaczej dokładnością) obejmuje sumę błędów przypadkowych i systematycznych (poprawność + precyzja), stwierdzonych dla etapu pobierania próbki i analizy laboratoryjnej – wyrażonych współczynnikiem zmienności.

$$u_T = (|B_w| + 2 v_c) 100\% = \text{względna całkowita niepewność pomiaru}$$

Parametry walidacyjne metody oznaczania ołowiu we krwi

- **liniowość** - stwierdzono zależność liniową odczytów absorbancji wyrażonej powierzchnią pików od stężenia ołowiu w roztworach roboczych dla zakresu stężeń: = 100 - 800 $\mu\text{gPb/l}$.
- **granica wykrywalności:** = 7 $\mu\text{g/l}$ (n=12) ($3s_p$)
 s_p - standardowe odchylenie dla próbki ślepej
- **granica oznaczalności :** = 14 $\mu\text{g/l}$ (n = 12) ($6 \times s_p$)
- **poprawność** - obliczoną na podstawie oznaczeń materiału odniesienia SeronormTM i BCR wyrażona jako względne obciążenie w % wynosi dla SeronormuTM dla poziomu 2 = 0,65%; dla CRM - 194 = 1,9%; dla CRM-195 = 2,5%
- **powtarzalność jako precyzja metody** obliczona na podstawie oznaczeń SeronormuTM dla poziomu 2 = 2,3% dla CRM-194 = 5,6%; dla CRM-195 = 2,5%
- **precyzja oznaczeń ołowiu w zakresie** roboczym 100- 800 $\mu\text{g/l}$ = 1,3 % (n = 10).

Zapewnienie jakości



❖ **Wstępna ocena metody oznaczania obejmująca:**

praktyczną możliwość stosowania, precyzję oraz poprawność (trueness), na którą składają się:

liniowość, specyficzność, odzyskanie, stosowane materiały referencyjne, wpływ tła.

❖ **Sterowanie jakością (quality control)**

Sterowanie jakością

- * Wewnętrzna kontrola jakości oznaczeń**
- * Międzylaboratoryjne badania biegłości**

Wewnętrzna kontrola jakości oznaczeń

- ✦ Sterowanie jakością badań opisane jest w procedurze badawczej w pkt. "program wewnętrznego sterowania jakością badań":
 - ✦ Rodzaj materiału odniesienia,
 - ✦ Sposób postępowania z materiałem odniesienia,
 - ✦ Częstotliwość oznaczeń materiału odniesienia

KONTROLA WEWNĘTRZNA

Analizy pojedyncze materiału odniesienia:

Karta kontrolna Shewharta składa się z dwóch części:

a) tablicy informacyjnej , w której zapisywane są dane:

- rodzaj materiału kontrolnego (badany czynnik + matryca)
- wartości normatywne oraz nr serii (jeśli jest to materiał certyfikowany)
- wyniki analiz pojedynczych
- odchylenie standardowe obliczone (minimum $n=20$) po wykonaniu testu Dixona dla wartości odbiegających

b) wykresu dla analiz materiału odniesienia

podać wartość prawdziwą : referencyjna producenta oraz standardowe odchylenie s

Konstrukcja Karty Shewhart'a

- ☀ górna granica kontrolna: $x + 3s$
 - ☀ górna granica ostrzegawcza: $x + 2s$
 - ☀ linia centralna: x
 - ☀ dolna granica ostrzegawcza: $x - 2s$
 - ☀ dolna granica kontrolna: $x - 3s$
- ☀ badać trendy analiz pojedynczych wg kryteriów Wheelera.

Spektrometr atomowo-absorpcyjny Perkin Elmer model 4100 ZL

Obliczył: Eżbieta Hiler

Sprawdził:.....

Substancja oznaczana : OLÓW WE KRWI

Stężenie nominalne (prawdziwe) = 390,0 µg/l

Podpis								
Data	7.02.02	9.02.02	21.02.02	7.03.02	8.03.02	9.03.02	12.03.02	13.03.02
Wynik	390	398	389	400	380	380	375	367
	393	378	407	367	378	403	362	377
	396	367				392	388	403

Wartość prawdziwa (referencyjna producenta) 390 µg/l

Wartość standardowego odchylenia : 14 µg/l

Wyznaczenie granic dopuszczalnych odchyłeń dla wyniku materiału odniesienia

Górna granica kontrolna ; wartość prawdziwa + 3 s = 433,5 µg/l

Górna granica ostrzegawcza; wartość prawdziwa + 2s =419,0 µg/l

Wartość prawdziwa + s =404,5 µg/l

Wartość prawdziwa (referencyjna producenta) 390 µg/l (Linia centralna)

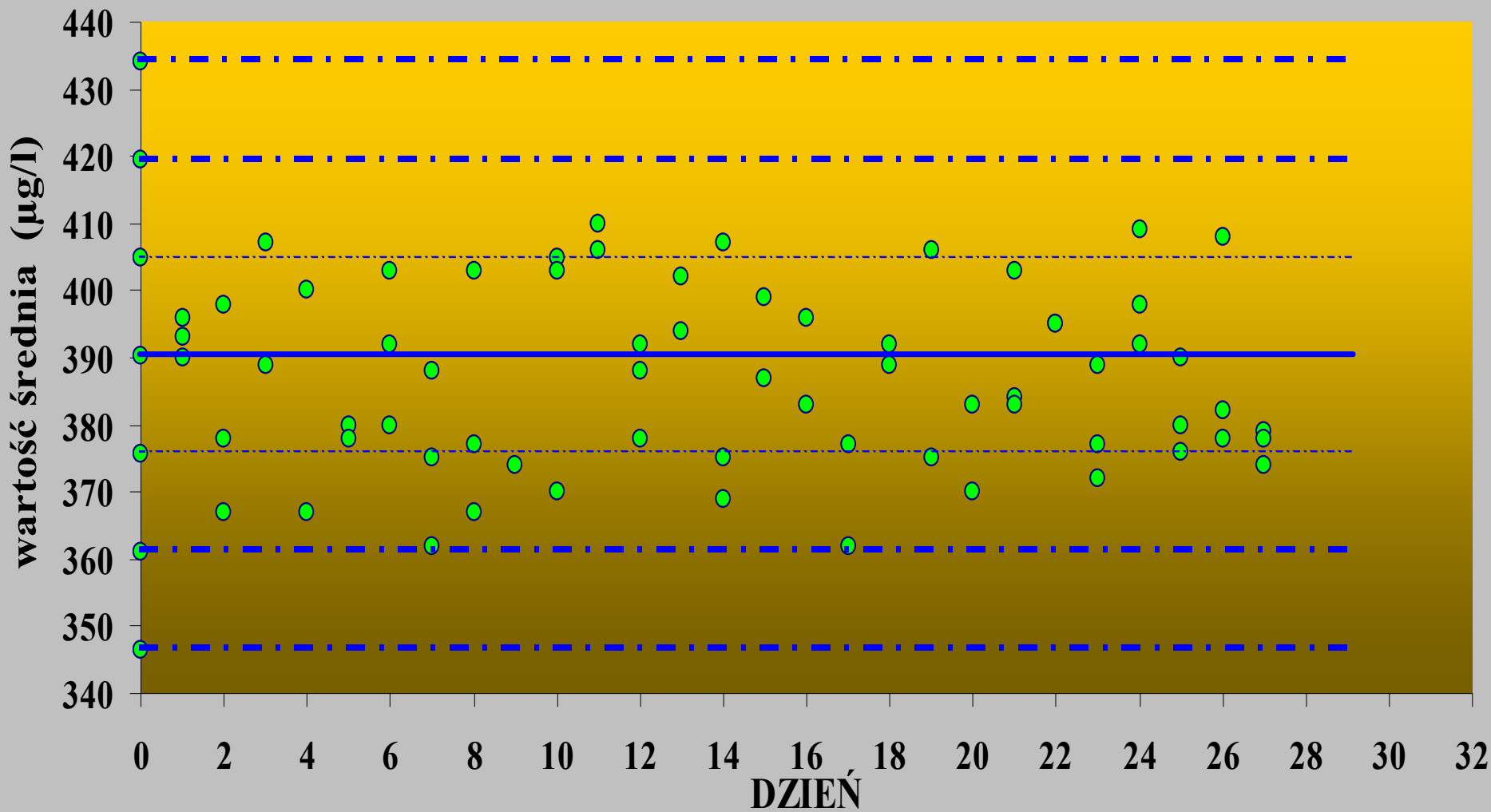
Wartość prawdziwa -s 375,5 µg/l

Dolna granic ostrzegawcza; wartość prawdziwa - 2s =361,0 µg/l

Dolna granica kontrolna; wartość prawdziwa -3 s =346,5 µg/l

KARTA KONTROLNA

Pb - B



KONTROLA WEWNĘTRZNA

Analizy podwójne materiału odniesienia:

Karta kontrolna Shewharta składa się z trzech części:

- **tablica informacyjna**
- **wykres dla wartości średnich analiz podwójnych - Karta Shewhart'a**
- **wykres dla wartości różnic (rozstępu) - Karta Shewhart'a**

KARTA KONTROLNA**Procedura ZCM-PB-06 Kwas benzoesowy****Chromatograf gazowy HP 5890 seria II Plus**Obliczył: **WIESIEK KUSZKA**

Sprawdził:

DATA Podpis Parametr	2.07.01	14.08.01	15.08.01	17.08.01	18.08.01	27.09.01	28.09.01							
h	0,0039	0,0046	0,0046	0,0040	0,0039	0,0040	0,0040							
Zakres h'(h + 15%)i (h - 0,0049 - 0,0037														
Próba _B (50mg/dm ³)	47,8	49,1	55,9	50,7	55,5	50,7	46,2	46,6	47,2	43,9	48,4	48,2	48,7	45,2
Próba _B (50mg/dm ³)	48,4	50,0	49,6	53,8	50,0	53,2	47,8	42,5	46,1	46,6	50,3	49,2	47,4	47,7
WART.ŚR. (x)	48,1	49,5	52,7	52,2	52,7	51,9	47,0	44,6	46,6	45,3	49,4	48,7	48,0	46,5
ROZSTĘP (próba A-B)	-0,5	-0,8	6,3	-3,1	5,5	-2,5	-1,6	4,1	1,1	-2,7	-1,9	-1,0	1,4	-2,6
	0,14	0,66	0,69	1,02	1,04	1,08	1,36	1,67	1,73	1,95	1,97	2,35	2,59	2,64

Odchylenie standardowe $S_x = 2,6$ Test Dixona: $Q_A = 0,061$ $Q_B =$

Odchylenie standardowe powtarzalności (1,60 (n= 21))

Precyzja powtarzalności dla wzorca 5,5%

Wyznaczanie granic dla x danej różnicy:

Górna granica kontrolna $x + 3S_x = 56,2$

Górna granica ostrzegawcza $x + 2S_x = 53,6$

Linia kontrolna $x = 48,3$

Dolna granica ostrzegawcza $x - 2S_x = 43,0$

Dolna granica kontrolna $x - 3S_x = 40,3$

Wyznaczanie granic dla powt

Górna granica kontrolna 6,81

Górna granica ostrzegawcza 4,54

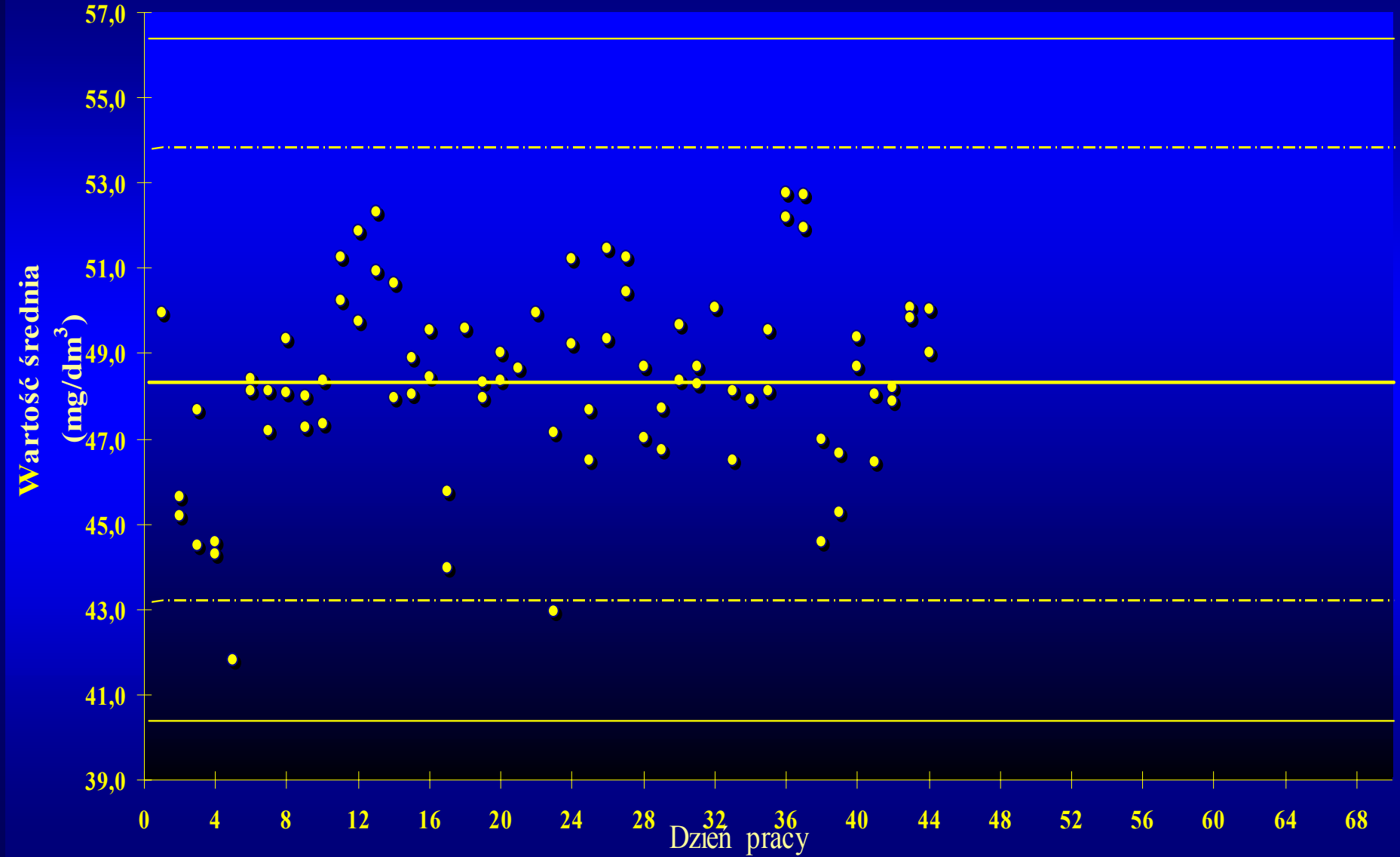
Linia centralna 0

Dolna granica ostrzegawcza -4,54

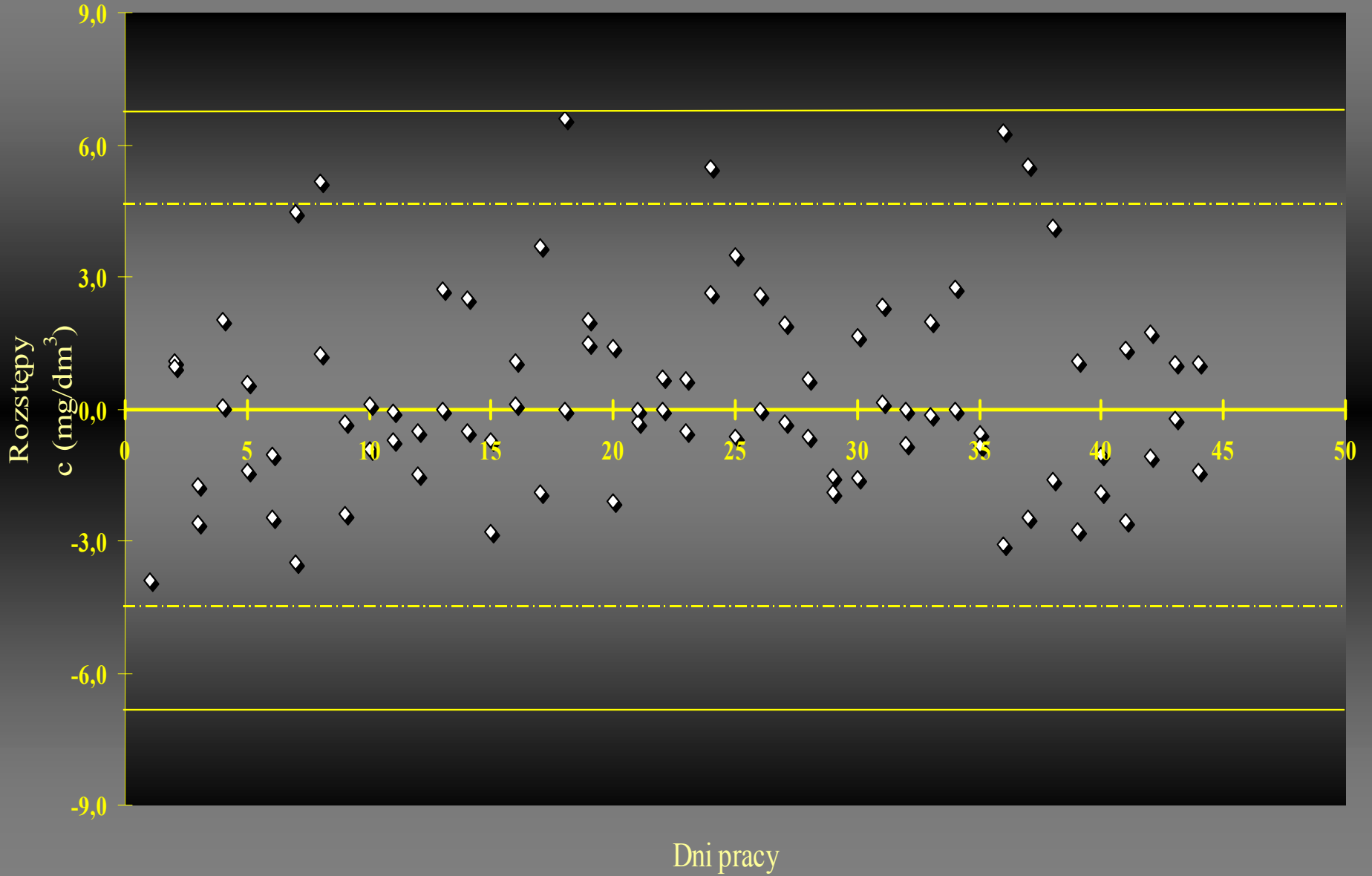
Dolna granica kontrolna -6,81

* - Próby do powtórzenia.

Kwas benzoesowy



Kwas benzoesowy



KRYTERIA WHEELERA

Według Wheelera należy podjąć działania korygujące:

- ✱ **jeden wynik** leży poza granicami 3s
- ✱ **dwa spośród trzech kolejnych wyników** leżą po tej samej stronie linii centralnej (wartości należnej) w obszarze między 2s i 3s;
- ✱ **cztery spośród pięciu kolejnych wyników** leżą po tej samej stronie linii centralnej (wartości należnej) w obszarze między 1s i 2s;
- ✱ **osiem kolejnych wyników** leży po tej samej stronie linii centralnej w obszarze do 1s.

Istniejące programy badania biegłości w dziedzinie monitoringu biologicznego

- **Centre du Toxicologie du Quebec (CTQ), Le Centre Hospitalier del' Universte Laval, Quebec, Canada.**
- **Danish External Quality Assessment Scheme (DEQAS) conducted in the National Institute of Occupational Health, Copenhagen, Denmark**
- **German External Quality Assessment Scheme, Institut fur Arbeits- und Sozialmedizin der Universitat Erlangen-Nurnberg, Germany. Interlab (IL), Germany.**
- **Japanese External Quality Assessment Scheme, Japan.**
- **FIOH-Finish Institute of Occupational Health, Helsinki, Finland.**
- **National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH) Proficiency Analytical Testing Program (PAT), Cincinnati, US.**
- **United Kingdom National External Quality Assessment Scheme (UKNQAS), Wolfson EQA Laboratory, Birmingham, England.**
- **Workplace Analysis Scheme for Proficiency (WASP), Health and Safety Executive, London, England.**
- **Korean Analytical Quality Assurance Program (KAQUA) Industrial Health Research Institute, Korea.**

Akredytacja

- ☀ **Formalne potwierdzenie kompetencji laboratorium do wykonywania określonych badań**



- ☀ **Obecnie PCA**