



BOSNIA AND HERZEGOVINA
Ministry of Foreign Trade and Economic Relations
Veterinary Office of Bosnia and Herzegovina

VODIČ

za validaciju orijentacijskih metoda za rezidue veterinarskih lijekova (inicijalna validacija i transfer)





BOSNIA AND HERZEGOVINA
Ministry of Foreign Trade and Economic Relations
Veterinary Office of Bosnia and Herzegovina

*Vodič za validaciju orijentacijskih (screening)
metoda za rezidue veterinarskih lijekova
(početna/inicijalna validacija i transfer)*

Rujan
2011

Referentni laboratoriji Europske unije za ispitivanje rezidua veterinarskih lijekova u živim životinjama i proizvodima životinjskog podrijetla su pripremili i objavili *Vodič za validaciju orijentacijskih (screening) metoda za rezidue veterinarskih lijekova (početna/inicijalna validacija i transfer) - Community Reference Laboratories Residues (CRLS) – Guidelines for the validation of screening methods for Residues of Veterinary Medicines (Initial Validation and Transfer)*. S obzirom da je Vijeće ministara Bosne i Hercegovine na prijedlog Ureda za veterinarstvo BiH usvojilo Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata, (Službeni glasnik BiH broj 95/10), koja kao obvezu uvodi validaciju metoda ispitivanja, svrha pripreme prijevoda vodiča uz originalnu verziju je da laboratorijima ovlaštenim za ispitivanje rezidua u BiH olakša validaciju orijentacijskih metoda, putem korištenja skraćenog postupka koje su prethodno validirane u drugim laboratorijima uz manji broj obavljenih ispitivanja. Validacija metoda svakako olakšava proces akreditacije prema standardu BAS ISO 17025, te predstavlja dodatni instrument za povjerenje u vlastite rezultate obavljenih laboratorijskih ispitivanja.

Direktor
Doc. dr Drago N. Nedić

DOKUMENT REFERENTNIH LABORATORIJA EUROPSKE UNIJE ZA REZIDUE-
COMMUNITY REFERENCE LABORATORIES RESIDUES (CRL) - 20/1/2010

**VODIČ ZA VALIDACIJU ORIJENTACIJSKIH (SCREENING) METODA ZA
REZIDUE VETERINARSKIH LIJEKOVA
(POČETNA/INICIJALNA VALIDACIJA I TRANSFER)**

SADRŽAJ

1. Predmet	5
2. Definicije	5
2.1. Pravni limit/limit za poduzimanje mjera u svrhe validacije	5
2.2. Orijentacijska ciljana koncentracija	5
2.3. Sposobnost dokazivanja $CC\beta$	6
2.4. Razina razlučivanja (<i>Cut-Off Level</i>)	6
2.5. Uzorci „negativne kontrole“ (slijepa proba – neobogaćeni uzorak)	7
2.6. Uzorci “orijentacijski pozitivne kontrole“	7
2.8. Standardni operativni postupak (SOP) za metodu	7
2.9. Početna validacija	7
2.10. Skraćena validacija (<i>abridged validation</i>)	8
2.11. Orijentacijska metoda	8
3. Klasifikacija orijentacijskih metoda	8
3.1. Klasifikacija prema principu utvrđivanja/dokazivanja	8
3.2. Klasifikacija prema stupnju kvantifikacije	8
4. Principi koji se slijede za validaciju orijentacijskih metoda	9
4.1. Ključni uvjeti	9
4.2. Izbor analita koji se koriste za validaciju i selektivnost metode	10
4.2.1. Multi-klasa metode koje koriste ispitivanja inhibicije	10
4.2.2. Multi-klasa metode koje koriste biokemijska ispitivanja	10
4.2.3. Multi-klasa metode uz korištenje fizikalno-kemijskih orijentacijskih tehnika	11
4.2.4. Sažetak	11

4.3. Priprema „simuliranog tkiva“ za validaciju ispitivanja inhibicije mikrobiološkog rasta	12
5. Postupak validacije	12
5.1. Određivanje specifičnosti/selektivnosti i sposobnosti dokazivanja CCβ prema klasičnom pristupu	12
5.1.1. Broj uzoraka potrebit za validaciju	12
5.1.2. Identifikacija razine razlučivanja i kalkulacija CCβ	13
5.1.3. Određivanje primjenjivosti i robusnosti orijentacijske metode	15
5.1.4. Stabilnost	16
5.2. Određivanje specifičnosti/selektivnosti i sposobnosti detekcije CCβ sukladno alternativnom opsežnom pristupu matrici.	16
6. Transfer orijentacijskih metoda između laboratorija	17
6.1. Uvjeti transfera	17
6.2. Šta je uključeno u skraćenu validaciju prema klasičnom konceptu	18
6.3. Što je uključeno u skraćenu validaciju prema alternativnom konceptu	18
7. Kontinuirana verifikacija/potvrđivanje	19
7.1. Uzorci kontrole kvalitete (QC)	19
7.2. Usporedna ispitivanja osposobljenosti (eng. <i>Proficiency tests</i>)	20
8. Izvješće o validaciji	20
9. Reference	22
10. Dodaci	24
Dodatak I. Utvrđivanje razine razlučivanja i CCβ u polukvantitativnom orijentacijskom ispitivanju	24
Dodatak II. Utvrđivanje razine razlučivanja i CCβ u polukvantitativnim orijentacijskim ispitivanjima	27
Dodatak III. Validacija kvantitativnih i polu-kvantitativnih metoda prema alternativnom pristupu	29

1. Predmet

Ovaj vodič dopunjuje Odluku Europske komisije 2002/657 [1] ¹ glede validacije orijentacijskih (*screening*) metoda. Vodič pokriva dvije odvojene faze u procesu validacije: „početnu“ validaciju (*initial validation*) orijentacijskih metoda u laboratoriju podrijetla i skraćenu validaciju (*abridged validation*) ovih metoda u prijemnom laboratoriju nakon njihovog transfera tom laboratoriju. Ciljevi ovog vodiča su da definiira:

- minimalne uvjete koji moraju biti ispunjeni početnom validacijom (u laboratoriju podrijetla);
- kriterije koji su neophodni da se odredi da li orijentacijska metoda može biti transferirana drugom laboratoriju i pod kojim uvjetima;
- minimalne uvjete koji moraju biti ispunjeni kod skraćene validacije (u prijemnom laboratoriju).

Ovaj vodič uključuje:

- protokol „početne validacije“ za dokazivanje performansi karakterističnih za novo razvijene ili uvedene orijentacijske metode;
- opis uvjeta pod kojim metode razvijene i validirane prema Odluci Europske komisije 2002/657 [1] u jednom laboratoriju (laboratoriju podrijetla) mogu biti transferirane prijemnom laboratoriju i skraćenu validaciju neophodnu da se dokaže da je prijemni laboratorij sposoban da primijeni transferiranu metodu na pravilan način; i
- preporuke o rutinskoj kontroli kvalitete (kontinuirana verifikacija) za orijentacijske metode.

2. Definicije

2.1. Pravni limit/limit za poduzimanje mjera u svrhe validacije

U svrhu validacije analitičkih metoda u laboratoriju podrazumijeva se da je *pravni limit* za odobrene veterinarske medicinske proizvode u Europskoj uniji *maksimalna razina rezidua* (u daljnjem tekstu: MRL), kako je definirano u Uredbi (EC) broj 470/2009 [2] (kojom se ukida Uredba Vijeća (EEC) broj 2377/90 [3]). Također, *pravni limit* za određene zabranjene ili neodobrene analite je *najniža zahtijevana granica efikasnosti izvođenja metode* (*Minimum Required Performance Limit - MRPL*) ili *referentna točka za poduzimanje mjera* (*Reference Point for Action - RPA*) kao što je definirano u članku 4. Odluke 2002/657/EC [1] i članku 2. Odluke Komisije 2005/34/EC [4] i članku 18/19. Uredbe Vijeća (EEC) No 470/2009 [2].

2.2. Orijetacijska ciljana koncentracija

Orijetacijska ciljana koncentracija (*The Screening Target Concentration*) je koncentracija na kojoj orijentacijsko ispitivanje kategorira uzorak kao “orijentacijski pozitivan“ (*Screen Positive*) (potencijalno nezadovoljavajući) i povlači (zahtijeva) potvrdno ispitivanje.

¹ Odluka EC 2002/657 je transponirana u važeću legislativu - Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata („Službeni glasnik BiH“, broj 95/10)

1. Za odobrene analite, orijentacijska ciljana koncentracija je na ili ispod pravnog limita, odnosno MRL (i trebalo bi da bude podešena kao jedna polovica MRL kada god je to moguće).

2. Za zabranjene i neodobrene analite orijentacijska ciljana koncentracija mora biti na ili manja od MRPL ili RPA.

3. Za analite za koje MRL nisu uspostavljeni prema Uredbi Vijeća (EC) broj 470/2009 [2], orijentacijska ciljana koncentracija bi trebala biti kada god je to moguće na nivou ili ispod preporučene koncentracije, kako je opisano u Vodiču referentnog laboratorija (CRL Guidance Paper) od 07. prosinca 2007. [5].

Što je ciljana orijentacijska koncentracija bliža pravnom limitu, manja je vjerojatnoća dobivanja lažno zadovoljavajućih rezultata (npr. lažno negativnih) onih uzoraka čiji je sadržaj ljekovite tvari u okviru pravnog limita.

2.3. Sposobnost dokazivanja $CC\beta$

Sposobnost dokazivanja ($CC\beta$) je definirana u točki 1.12. Aneksa Odluke 2002/657/EC [1]. $CC\beta$ predstavlja najmanju količinu sadržaja analita koja se može utvrditi (detektirati), identificirati i/ili kvantificirati u uzorku s vjerojatnošću β greške. β greška ukazuje na vjerojatnoću da je ispitivani uzorak stvarno neusklađen, čak i da je izvršeno mjerenje bilo zadovoljavajuće. **Za orijentacijska ispitivanja β grešaka (npr. iznos lažno zadovoljavajućih) trebalo bi biti $< 5\%$.**

U slučaju analita za koje je uspostavljen pravni limit, $CC\beta$ predstavlja najnižu koncentraciju za koju je metodom moguće utvrditi stvarno kontaminirane uzorke sa statističkom sigurnošću od $1 - \beta$. **U ovom slučaju, $CC\beta$ vrijednost mora biti što je moguće niža ili niža od preporučene koncentracije ukoliko ona postoji [5].**

U slučaju analita za koje je uspostavljen pravni limit, $CC\beta$ predstavlja koncentraciju za koju je metodom moguće utvrditi dozvoljeni limit koncentracije sa statističkom sigurnošću od $1 - \beta$. **$CC\beta$ je koncentracija kod koje se javlja samo $\leq 5\%$ pogrešno usuglašanih rezultata. U ovom slučaju, $CC\beta$ mora biti ispod granice ili jednak pravnom limitu.**

2.4. Razina razlučivanja (*Cut-Off Level*)

Razina razlučivanja je odgovor ili signal orijentacijskog ispitivanja koji naznačava da uzorak sadrži analit na granici ili iznad orijentacijski ciljane koncentracije. Ukoliko se premaši razina razlučivanja, kao posljedica se mora obaviti potvrdno ispitivanje. Tokom postupka početne validacije razina razlučivanja može biti uspostavljena preko analize matrica za probu uzorka na slijepo i ponavljanja (replikata) istih onih uzoraka koji su obogaćeni/pojačani (*spiked/fortified*) na orijentacijsku ciljanu koncentraciju. U Dodacima I i II su prikazana dva primjera za uspostavljanje razine razlučivanja.

2.5. Uzorci „negativne kontrole“ (slijepa proba matrice)

Ova vrsta uzoraka se uzima od životinja za koje se zna da u prošlosti nisu bile izložene supstancama koje su u pitanju. Ako uzorci ovih životinja nisu dostupni, kako bi se utvrdilo da su uzorci usklađeni i da ne sadrže rezidue tvari od interesa, mogla bi biti prihvatljiva uporaba prikladno osjetljivog fizikalno-kemijskog ispitivanja.

2.6. Uzorci „orijentacijski pozitivne kontrole“

Ova vrsta uzoraka koja se koristi za negativne kontrole je obogaćena/pojačana ispitivanim analitom na orijentacijski ciljanu koncentraciju. Međutim, ovi uzorci mogu biti također i izazvani pozitivni uzorci (*incurred*) (npr. uzorci uzeti od životinja koje su bile tretirane supstancom koja je u pitanju) ili certificirani referentni materijal. Ako se ispitivanje obavlja ispravno uzorci orijentacijski pozitivne kontrole u orijentacijskom ispitivanju se trebaju klasificirati kao „orijentacijski pozitivni“.

2.6. Matrica za ispitivanje

Ispitivana matrica predstavljaju tkivo ili tekućina koji se podnose na analizu (npr. jetra, bubreg, mišić, med, mlijeko). Matrica za ispitivanje je specificirana u Standardnoj operativnoj proceduri (SOP) orijentacijske metode. Na primjer, matricu za ispitivanje može predstavljati „mišić goveda“ ili može biti samo „mišić“. U drugom slučaju, metoda se pokazala kao primjenjiva na više vrsta bez značajne razlike u odgovoru na ispitivanje za različite vrste. Vrste na koje nije primjenjiva trebaju biti specificirane u standardnom operativnom postupku (SOP).

2.8. Standardni operativni postupak (SOP) za metodu

Standardni operativni postupak (u daljnjem tekstu: SOP) treba biti pripremljen *prije* obavljanja bilo početne ili skraćene validacije i treba pokrivati one točke pobrojane u odjeljku 5.4.4. standarda ISO 17025:2005. Tijekom razvoja analitičke metode, mora biti određen opseg metode (npr. koji analit može biti utvrđen, matrice koje se mogu ispitivati itd.).

Tokom razvoja metode, svi relevantni parametri metode moraju biti optimalno određeni, a moraju biti identificirane i kontrolirane kritične točke (npr. temperatura, pH). Kada se izvrši transfer metode u prijemni laboratorij, ovaj laboratorij mora pripremiti svoj vlastiti SOP koji mora korespondirati sa SOP-om laboratorija podrijetla. Glede fizikalno-kemijskih metoda, može biti slučaj da laboratorij podrijetla i prijemni laboratorij nabavljaju opremu od različitih proizvođača; zbog toga karakteristike mogu biti značajno različite. U prijemnom laboratoriju, operator može biti slobodan prilagoditi uvjete sa samo jednim ciljem da postigne iste performanse.

2.9. Početna validacija

Postupak validacije koji se primjenjuje na novorazvijenu analitičku metodu u laboratoriju podrijetla kojim se dokazuje da je metoda prikladna za uporabu.

2.10. Skraćena validacija (*abridged validation*)

Skraćeni postupak validacije predstavlja validaciju koja se primjenjuje u prijemnom laboratoriju na metodu koja je prethodno validirana u laboratoriju podrijetla. Skraćeni postupak validacije bi trebao omogućiti prijemnom laboratoriju dokazati da će metoda raditi povjerljivo u tom laboratoriju i da je prikladna za uporabu.

2.11. Orijehtacijska metoda

Orijehtacijske metode Odlukom Komisije 2002/657 [1] definirane kao "metode koje se koriste da utvrde prisutnost analita ili klase analita na nivou od interesa. Ove metode omogućavaju veći protok uzoraka i koriste se za filtriranje većeg broja uzoraka potencijalno neusklađenih rezultata. One su posebno dizajnirane da se izbjegnu „lažno neusklađeni rezultati“.

“Razina od interesa” je obično pravni limit (*Regulatory Limit* - MRL, MRPL) ili razina/limit za poduzimanje mjera (*Action Level/Limit*) (vidjeti odjeljak 2.2.).

3. Klasifikacija orijentacijskih metoda

Orijehtacijske metode se mogu klasificirati prema principu utvrđivanja ili prema tome da li su kvalitativne ili (polu)kvantitativne.

3.1. Klasifikacija prema principu utvrđivanja/dokazivanja

Biološke metode utvrđuju stanični odgovor na analit (npr. estrogini efekt, inhibiciju bakterijskog rasta, stanični efekt, hormonski efekt). Ove metode nisu selektivne i mogu pokriti nekoliko kemijskih klasa aktivnih analita (npr. hormone, antimikrobo). One ne omogućavaju identifikaciju pojedinačnih analita.

Biokemijske metode utvrđuju molekularne interakcije (npr. antigene, proteine) između analita i protutijela ili receptorskih proteina (ELISA, RIA, ...). Kemijsko označavanje analita ili protutijela/receptora omogućava da interakcija bude praćena i mjerena. Ove metode su selektivne za familiju analita koji imaju srodne molekularne strukture ili su ponekad analit-specifićni.

Fizikalno-kemijske metode razlikuju kemijsku strukturu i molekularne karakteristike sa separacijom molekula (npr. TLC, GC, HPLC) i određivanje signala koji se odnose na molekularne karakteristike (npr. UV- DAD, Visible, Fluo, FID, ECD, MS, tandem MS, trap MS, ToF MS, druge hibridne MS tehnike). One su sposobne da odvoje slične molekularne strukture i omoguće simultanu analizu razlićitih analita.

3.2. Klasifikacija prema stupnju kvantifikacije

Kvalitativne metode daju da/ne odgovor, bez indikacije o koncentraciji pretpostavljenog analita. Primjeri ukljućuju:

- ispitivanja inhibicije bakterijskog rasta koja daju rezultat “bez zone” ili “zona inhibicije”;
- inhibicijska ispitivanja koja daju rezultat u promjeni boje;
- imunokemijska/ligand vezana ispitivanja, gdje se odgovor smatra kao “iznad” ili “ispod” razine razlučivanja; ili gdje su analiti s različitom unakržnom reaktivnošću (*cross-reactivities*) uključeni u opseg metode;
- kromatografska ispitivanja (HPLC, LC-MS/MS,...), gdje se vrh (*peak*) smatra kao “prisutan” ili “odsutan”. Ona mogu biti jednostavno validirana kao kvalitativne orijentacijske metode kako je opisano u ovom dokumentu kada kvantifikacija nije potrebna kao orijentacijski korak [6].

Polu-kvantitativne metode daju indicaciju o koncentraciji (otprilike) pretpostavljenog analita.

Dok se prema brojčanim rezultatima ne može odnositi kao izvješćima, ovo može biti korisno analitičaru u odlučivanju kalibracijskog raspona za iduće (kvantitativno) ispitivanje. Primjeri uključuju:

- ispitivanje inhibicije mikrobiološkog rasta gdje se pokušava napraviti povezivanje veličine zone inhibicije s pretpostavljenom koncentracijom analita;
- biokemijska ispitivanja koja uključuju kalibracijsku krivulj (npr. ELISA, ali samo ako je test specifičan za pojedinačni analit);
- kromatografska ispitivanja, kalibrirana preko kratkog raspona koji može da ne uključi odgovor uzorka;
- sva fizikalno-kemijska ispitivanja (npr. HPLC, LC-MS/MS,...) gdje karakteristike izmjerene preciznosti metode ne ispunjavaju uvjete za kvantitativna ispitivanja.

Kvantitativne metode ispunjavaju iste uvjete za točnost, dinamički raspon i preciznost kao potvrdni testovi. Tako, kada je potrebna kvantifikacija, ove metode moraju biti validirane kao potvrdne metode, kako je navedeno u Odluci [1]. Kada se metoda koristi samo za orijentacijske svrhe, posebni uvjeti glede potvrde identiteta (identifikacijska točka prema Odjeljku 2.3.2.2. Tabela 6. Odluke [1]) nisu neophodni.

4. Principi koji se slijede za validaciju orijentacijskih metoda

4.1. Ključni uvjeti

Ključni uvjet za orijentacijsku metodu (bilo kvalitativnu ili (polu)kvantitativnu) je njena mogućnost da pouzdano utvrdi analit koji je u pitanju na orijentacijskoj ciljanoj koncentraciji i da izbjegne pogrešno udovoljavajuće rezultate. Orijetacijska ciljana koncentracija treba biti dovoljno niska da osigura, da ako je analit u pitanju prisutan na pravnoj razini u uzorku, uzorak bude klasificiran kao „orijentacijski pozitivan“. **Validacija (bilo početna ili skraćena) treba osigurati objektivan dokaz da su ovi uvjeti ispunjeni.** Validacija (i početna i skraćena) mora pokrivati cijele kombinacije matrica/vrsta/analit koje su utvrđene u SOP-u metode. **Međutim, zahtijevana mjera validacije će varirati u ovisnosti da li je validacija početna ili skraćena.** Minimalne karakteristike parametara za orijentacijska ispitivanja su specificirana u Poglavlju 3., Tabela 9. Odluke Komisije 2002/657/EC [1]. Kao opći princip, mora postojati dovoljan rub razlike između orijentacijske ciljane koncentracije i pravne razine. **Zbog toga, CC β mora biti manja ili jednaka pravnoj razini.**

Važno je zabilježiti da orijentacijska metoda nije dovoljna da pouzdano utvrdi sve relevantne ciljane analite na pravnoj razini u svim matricama i vrstama. Ukoliko esencijalni analiti ili vrste nisu pokriveni, onda dodatna ispitivanja, uz uporabu alternativne metode, moraju biti obavljena u dodatku.

4.2. Izbor analita koji se koriste za validaciju i selektivnost metode

Izbor analita koji će biti korišteni za studiju početne ili skraćene validacije ovisi o opsegu orijentacijske metode koji je opisan u SOP-u metode. Ukoliko orijentacijska metoda ne može odvojiti različite analite unutar jedne kemijske familije (npr. tetracikline ili beta-laktame), validacija bi trebala biti obavljena za svaki analit koji se smatra relevantnim za laboratorij. Na primjer, relevantni analiti su svi analiti za koje se od laboratorija može zahtijevati da budu uključeni u analitički program za određivanje rezidua u *kontrolnom planu*. Alternativno, validacija može biti obavljena koristeći broj analita koji su predstavnici skupine koja je u pitanju (vidjeti odjeljke 4.2.1., 4.2.2., 4.2.3.).

4.2.1. Multi-klasa metode koje koriste ispitivanja inhibicije

Za multi-klasa metode bazirane na inhibiciji, barem jedan analit bi trebao biti izabran u studiji validacije da predstavlja svaku skupinu analita (npr. za ispitivanje inhibicije mikrobiološkog rasta: jedan tetraciklin, jedan sulfonamid, jedan β -laktam, jedan aminoglikozid i jedan makrolid bi se trebali koristiti).

Međutim, treba biti poznato, da u slučaju ispitivanja inhibicije mikrobiološkog rasta, svi analiti u jednoj antimikrobnoj familiji neće pokazati isti profil aktivnosti. Zbog toga je preporučeno, prije validacije, odrediti profile aktivnosti za sve relevantne analite u svakoj antimikrobnoj familiji koristeći standardne otopine u različitim koncentracijama oko MRL-a. Ovi profili aktivnosti omogućavaju da se za studiju validacije razmatraju barem jedan ili dva predstavnika analita po familiji analita.

Analit(i) koji se biraju za studiju validacije trebali bi idealno biti iste senzitivnosti/osjetljivosti u njihovoj klasi, npr. orijentacijska ciljana koncentracija najbliža *pravnom limitu*. Kada je MRL isti za sve u familiji (npr. tetraciklini), mogao bi biti izabran pojedinačni analit (najmanje senzitivan). Tako je na primjer dokazano od strane Referentnog laboratorija Unije (CRL) AFSSA-Fougères da je oksitetraciklin manje osjetljiv tetraciklin (između onih koji imaju uspostavljen MRL), koji može biti utvrđen s mnogim ispitivanjima inhibicije mikrobiološkog rasta na više ploča. Kada su uspostavljeni različiti MRL-ovi u jednoj familiji (npr. penicilini), nekoliko analita bi trebalo da bude validirano i orijentacijske ciljane koncentracije će biti uspostavljene sukladno odgovarajućim MRL. Na primjer, u familiji penicilina, ampicilin i kloksacilin su bili manje osjetljivi penicilini i oba moraju biti izabrani kao predstavnici antibiotika, s različitim orijentacijskim ciljanim koncentracijama. CRL mogu osigurati specifične savjete o izboru predstavnika analita za ispitivanja inhibicije bakterijskog rasta [8-10].

4.2.2. Multi-klasa metode koje koriste biokemijska ispitivanja

Za biokemijska ispitivanja (npr. ELISA), koja mogu vezati nekoliko analita s promjenjivom unakrižnom reaktivnosti, ako su svi ovi analiti uključeni u opseg metode, inicijalna validacija

mora biti dovoljna da dokaže da će svi ovi analiti koji su u pitanju biti pouzdano ekstrahirani (ukoliko je neophodno) i utvrđeni.

Zajednički problemi s kojim se sreće uključuju činjenicu da proizvođači ELISA kitova mogu ne naznačiti da li je osigurana informacija o protutijelo-antigen unakrižnoj reaktivnosti dobivena u pufer (standard) otopini ili u biološkoj matrici. U ELISA ispitivanjima s korakom kemijske ekstrakcije, iskorištenja mogu biti nespecifična. Zbog toga nije uvijek moguće izračunati sposobnost dokazivanja svake unakrižne reaktivnosti analita od CCβ predstavnika analita.

Sposobnost dokazivanja mora biti određena za pojedinačni analit detektirano testom ili za predstavnika analita (npr. analit s najnižom unakrižnom reaktivnošću). U slučaju da test nije specifičan za jedan analit (npr. multi-sulfonamidski test), unakrižne reaktivnosti s različitim drugim analitima moraju biti određene. Konačno, sposobnost dokazivanja drugih analita multi ispitivanjem može biti izvedena na temelju sposobnosti dokazivanja reprezentativnog analita povezano s postocima unakrižne reaktivnosti.

4.2.3. Multi-klasa metode uz korištenje fizikalno-kemijskih orijentacijskih tehnika

Glede fizikalno-kemijskih metoda koje omogućavaju da analiti budu diferencirani na bazi njihovih kemijskih svojstava, prva ideja je da se validira za barem jedan analit koji bi trebao biti iz svake poznate kemijske klase ili pod klase (npr. za kvinolone, jedan kiseli spoj i jedan amfoterni spoj mogu biti izabrani za studiju validacije).

Međutim, korištenjem multi-klasnih orijentacijskih metoda (npr. LC-ToF-MS orijentacijska metoda), ako analiti imaju različito vrijeme retencije (R_t), oni se mogu izložiti različitim efektima (ion supresija ili poboljšanje iona) zbog različite količine različitih otopljenih spojeva matrice. Iz tog razloga preporučljivo je da se testira za sve analite i ne za pod izbor čak i ako analiti imaju veoma slična fizikalno-kemijska svojstva.

4.2.4. Sažetak

Primjeri kriterija koji bi mogli biti korišteni za izbor analita uključenih u metodu koja se mora validirati:

- za ispitivanje inhibicije mikrobiološkog rasta:
 - izbor analita ili više njih koji daje/daju najnižu inhibiciju u korištenim uvjetima;
 - kada je metoda ispitivanja na više ploča, studija validacije mora biti obavljena na barem najosjetljivoj ploči prema ispitivanom antibiotiku;
- za imunološka ispitivanja:
 - analite s najnižom unakrižnom reaktivnošću;
- za (polu)kvantitativne metode s korakom ekstrakcije:
 - analit s najnižim analitičkim iskorištenjem;
 - svi analiti uključeni u metodu kada se može desiti ionska supresija.

4.3. Priprema „simuliranog tkiva“ za validaciju ispitivanja inhibicije mikrobiološkog rasta

Za one metode s ekstrakcijskim korakom prije analize (biokemijske i fizikalno-kemijske metode), priprema matrica je donekle jednostavnija s obogaćenim uzorcima. Čak i neka ispitivanja inhibicije mikrobiološkog rasta koriste tečnost ekstrahiranu iz tkiva i zbog toga mogu biti jednostavno validirane koristeći obogaćene uzorke.

Međutim, postoji poseban problem kod onih ispitivanja inhibicije mikrobiološkog rasta koja koriste krute matrice (npr. izrezane dijelove cijelog tkiva – mišić, bubreg – koji se primjenjuju izravno na ploču) i gdje ne postoji korak ekstrakcije.

U takvim slučajevima validacija mora biti obavljena koristeći „simulirano tkivo“. Ovo tkivo treba sadržavati analit u koncentraciji od značaja i uzorak se mora ponašati na isti način kao nastali izrezani komad tkiva, npr. mogući efekti matrice trebaju biti zabilježeni i uzeti u obzir u rezultatima.

Postoje dva praktična načina za dobivanje simuliranog tkiva.

Način 1. Tkivo se samelje, izvaže, obogati i smrzne. Dijelovi smrznutog obogaćenog tkiva se stave izravno na ploče. (NB Ovaj postupak može biti neprimjenjiv na uzorke bubrega - obzirom na pogrešno pozitivne rezultate zbog endogenih komponenti koje mogu biti oslobođene tijekom procesa mljevenja – ili za testove gdje se tekućina tkiva upija u diskove papira – zbog nedovoljnog upijanja tekućine u samljeveni uzorak).

Način 2. Papirni diskovi se stavljaju na ploče i onda obogate standardnim otopinama. Papirni diskovi su još vlažni kada se završni komadi tkiva stavljaju na obogaćene diskove u „sendvič“ formatu (po slijedećem redu: agar-disk papira-komad tkiva). Ovim protokolom održava se integritet tkiva.

Referentni laboratorij EU (CRL) može osigurati asistenciju za protokol pripreme simuliranog tkiva za validaciju testova inhibicije mikrobiološkog rasta.

5. Postupak validacije

5.1. Određivanje specifičnosti/selektivnosti i sposobnosti dokazivanja CCB prema klasičnom pristupu²

5.1.1. Broj uzoraka potrebit za validaciju

Broj uzoraka „orijentacijski pozitivnih“ kontrolnih uzoraka (npr. uzorci obogaćeni na orijentacijsku ciljenu koncentraciju) za svaki analit ovisi o stupnju statističke povjerljivosti potrebite za rezultat i veze između orijentacijske ciljane koncentracije i pravne razine. Niža orijentacijska ciljana koncentracija u poređenju s pravnom razinom, zahtijeva manje

² Može biti korišten alternativni više-faktorski „matrica sveukupni“ model validacije. Ovo je opisano u odjeljku 5.2.

ponavljanja (replikata) da dâ isti stupanj povjerljivosti da će orijentacijsko ispitivanje točno identificirati pravilno kontaminirane uzorke na pravnoj razini.

Na primjer:

- Ako je orijentacijska ciljana koncentracija postavljena na polovicu pravne/razine za poduzimanje mjera ili niže (npr. 1/2 MRL), pojavljivanje jednog ili niti jednog lažno zadovoljavajućeg rezultata nakon analize barem 20 “orijentacijskih pozitivnih” kontrolnih uzoraka je dovoljno da se dokaže da je $CC\beta$ manja od pravnog/limita za poduzimanje mjera (MRL) i manja od ili jednaka $\frac{1}{2}$ MRL;
- Ako je orijentacijska ciljana koncentracija postavljena između 50% i 90% pravnog limita/limita za poduzimanje mjera, bit će dovoljno barem 40 “orijentacijski pozitivnih” kontrolnih uzoraka (s ne više od 2 pogrešno udovoljavajuća rezultata) da dokaže da je $CC\beta$ manja od pravnog/limita za poduzimanje mjera;
- Ako je senzitivnost orijentacijskog ispitivanja takva da se orijentacijska ciljana koncentracija približava pravnom/limitu za poduzimanje mjera (10 % ispod pravnog/limita za poduzimanje mjera), više “orijentacijskih pozitivnih” kontrolnih uzoraka može biti potrebno. Maksimum od 60 ponavljanja (s ne više od 3 pogrešno udovoljavajuća rezultata) je potrebno da se dokaže da je $CC\beta$ prikladna za svrhu.

Ove veće studije mogu biti poduzete u sekvencama npr. prvih dvadeset parova kontrolnih uzoraka koji su ispitani i ako je više od jednog obogaćenog uzorka ispod razine razlučivanja, validacija može biti odbačena u ovoj fazi, orijentacijska ciljana koncentracija mora biti povećana i vježba validacije ponovljena.

Ukoliko je orijentacijska metoda primjenjiva na jednu matricu, ali različite vrste životinja, 60 različitih uzoraka može biti uzeto od različitih vrsta (npr. 20 mišića svinja, 20 mišića goveda, i 20 mišića peradi) (vidjeti odjeljak 5.1.3.).

5.1.2. Identifikacija razine razlučivanja i kalkulacija $CC\beta$

Validacija orijentacijskih metoda (bilo kvalitativnih ili polukvantitativnih) zahtijeva identifikaciju razine razlučivanja na ili iznad koje se uzorak kategorizira kao „orijentacijski pozitivan“ i obavezan je za fizikalno-kemijsku potvrdu. U Dodacima I. i II. prikazana su dva različita pristupa za uspostavu razine razlučivanja za polukvantitativna orijentacijska ispitivanja.

U slučaju ispitivanja inhibicije mikrobiološkog rasta, tipična razina razlučivanja bi bila zona inhibicije sa širinom $> 2\text{mm}$. U ovom slučaju, svaki uzorak koji daje zonu $> 2\text{mm}$ bi se klasificirao kao „orijentacijski pozitivan“. Svi uzorci obogaćeni na orijentacijsku ciljanu koncentraciju bi trebali davati zone $> 2\text{mm}$ da budu klasificirani kao „orijentacijski pozitivni“.

- Orijetacijske ciljane koncentracije ($\times 1$) na kojim će matrica slijepih proba (neobogaćenih uzoraka) biti obogaćena kako bi se uspostavio nivo razlučivanja za analit koji je u pitanju. Trebao bi idealno biti postavljen kao polovina pravnog/limita za poduzimanje mjera; ako nije moguće trebala bi biti izabrana koncentracija između 50 i 100 % pravnog/nivoa za poduzimanje mjera.

- Izabrati **60³ uzorka jedne matrice**. Ako je na primjer matrica mišić goveda, svaki uzorak treba proizlaziti iz različite skupine. Za vjerodostojno određivanje $CC\beta$ i specifičnosti, treba biti analizirano barem 60 slijepih proba (neobogaćenih uzoraka) i 60 obogaćenih uzoraka. Gdje orijentacijska metoda utvrdi više od jednog analita ova vježba obogaćivanja mora biti ponovljena za svaki analit ili barem za svaki od analita za koje se smatra da su reprezentativni.

Korak 1. Obogaćivanje 60 slijepih proba (neobogaćenih uzoraka) analitom u pitanju na koncentraciji x_1 ;

Korak 2. Analizirati 60 obogaćenih uzoraka i 60 slijepih proba (neobogaćenih uzoraka) prema SOP-u metode. Ove analize bi trebalo obavljati različitim danima i trebale bi se obavljati od strane različitih operatora i idealno bi trebale oponašati cijeli raspon operativnih uvjeta u kojima bi se vjerojatno moglo naći prilikom korištenja metode. Preporučeno je da se ova studija obavlja „na slijepo“ uvjetima (operator ne zna koji su uzorci obogaćeni, a koji nisu).

Korak 3.

Pristup 1. (vidjeti primjer u Dodatku I.):

Ocijeniti raspon analitičkog odgovora za slijepe probe (neobogaćene uzorke) i raspon za obogaćene uzorke. Izabrati najniži odgovor u obogaćenim uzorcima. Ovo je razina razlučivanja koja osigurava da se najniži odgovor za obogaćene uzorke ne preklapa s najvišim odgovorom za slijepe probe uzoraka (vidjeti Dodatak I.).

Pristup 2. (vidjeti primjer u Dodatku II.):

Drugi pristup je statistički koji uzima u račun β grešku od 5 %. Analitički odgovor B_i se utvrđuje za svako istraživanje. Onda se računaju glavni odgovor seta B i standardne devijacije njihovih odgovora. „Granična vrijednost“ T se može izračunati (vidjeti Dodatak II.). Analitički odgovor Y_i je određen za svako istraživanje obogaćenih uzoraka. Nakon toga se računaju glavni odgovor M i standardna devijacija „ SD “ odgovora obogaćenih uzoraka. „Faktor razine razlučivanja“ F_m može biti izračunat. Pozitivnost granice T i faktor razine razlučivanja F_m su matrica-specifični.

Korak 4. Identificirati broj obogaćenih uzoraka s rezultatima *ispod* razine razlučivanja. Ako je više od 3 od 60 obogaćenih uzoraka (npr. 5%) ispod razine razlučivanja, orijentacijska ciljana koncentracija izabrana za studiju obogaćivanja suviše niska kao ova neće dati odgovor iznad razine razlučivanja i neće biti prosuđena „orijentacijski pozitivnom“.

Napomena: Ako je x_1 na MRL (ili pravnom, odnosno limitu za poduzimanje mjera) i ako su više od 3 uzorka (od 60 uzoraka) obogaćena na x_1 ispod razine razlučivanja, studija validacije treba biti odbačena za ovu koncentraciju dok se metoda ne unaprijedi.

Ako je x_1 na polovici MRL (ili polovici pravnog, odnosno limita za poduzimanje mjera) i ako su više od 3 uzorka (od 60) obogaćena na x_1 pala ispod razine razlučivanja, koncentracija za obogaćivanje treba biti povećana (npr. tri četvrtine MRL) i studija treba biti ponovljena.

³ Nije uvijek neophodno analizirati 60 uzoraka. Vidjeti Odjeljak 5.1.1.

Korak 5. Izračunavanje CC β . Poslije analize 60 obogaćenih (ili napravljenih) uzoraka, razina obogaćivanja, (orijentacijska ciljana koncentracija), gdje bi $\leq 5\%$ pogrešno usklađenih rezultata bilo na pravnom, odnosno limitu za poduzimanje mjera, je sposobnost dokazivanja (CC β) metode (npr. koncentracija na kojoj je ≤ 3 pogrešno udovoljavajućih uzoraka (od 60 obogaćenih uzoraka).

5.1.3. Određivanje primjenjivosti i robusnosti orijentacijske metode

Primjenjivost:

Generalno MDK se ne razlikuje u matrici istog tipa (npr. mišić) između vrsta, ali se često razlikuju u različitim matricama kod iste vrste. I pored toga, ako je CC β određen za jednu matricu (npr. mišić goveda) za vrijeme početne validacije i ako će se primjenjivati metoda na istoj matrici kod druge vrste (npr. mišić svinje), efekt interferirajuće matrice je očekivan i ne može se pretpostaviti da će isti CC β biti primjenjiv na novoj matrici. Radi toga, CC β mora biti uspostavljena za predmetni analit(e) u novoj matrici. Opet, ovo se treba vršiti za svaki analit koji laboratorij zahtijeva da se uradi u programu kontrole rezidua ili najmanje na određenom broju analita koji su reprezentativni za predmetnu skupinu analita (pogledajte odjeljak 4.2.)

Operativna shema:

Primjer: Za istu vrstu matrice (pr. mišić) od četiri različite vrste.

Pod uvjetom da je pravni/limit za poduzimanje mjera isti za sve vrste i da je isti kao originalna matrica, CC β treba biti određena analizom 20 slijepih proba (neobogaćenih uzoraka) (5 uzoraka po vrsti) i istih 20 slijepih proba (neobogaćenih uzoraka) obogaćenih na orijentacijski ciljano koncentraciju korištenoj za originalnu matricu (5 uzoraka po vrsti). Onda, pod uvjetom da su sve slijepa proba uzoraka pokazale da su negativne na odnosne rezidue:

- Ako su 20 obogaćenih uzoraka „orijentacijski pozitivni“ (premašena je razina razlučivanja) ili ako je najviše jedan rezultat ispod razine razlučivanja, metoda je primjenjiva na nove matrice (ili vrste), s istim CC β kao i originalna matrica;
- Ako ima 2 ili više obogaćenih uzorka koji su „orijentacijski negativni“ može se zaključiti da CC β za ove vrste veća nego što je procijenjeno za originalnu matricu. U tom slučaju orijentacijska metoda bi trebala biti u potpunosti validirana za novu matricu (orijentacijska ciljano koncentracija bi se trebala povećati i istraživanje s obogaćivanjem ponovljeno).

Produženje metoda za različite vrste matrica i/ili različite vrste.

Ako je CC β određena za jednu matricu (npr. mišić goveda) za vrijeme početne validacije i metoda se treba koristiti za različitu matricu (npr. jetra) bilo kod iste ili različite vrste, gotovo sigurno se dobija efekt označene matrice i ne može se pretpostaviti da će se isti CC β primjenjivati kod ove nove matrice. Radi toga, CC β se mora uspostaviti za predmetni analit(e) u ovoj novoj matrici. Jedan od pristupa ovom problemu je da se koristi opsežan pristup matrici kao što je opisano u Poglavlju 3.1.3. Dodatka Odluke Komisije 2002/657/EZ. Alternativno, CC β se može odrediti za svaku novu kombinaciju vrsta/matrica analizom 20 slijepih proba (neobogaćenih uzoraka) (npr. 20 svinjskih jetri) i istih 20 slijepih proba

(neobogaćenih uzoraka) svinjskih jetri obogaćenih do orijentacijski ciljane koncentracije. Ovo istraživanje se treba vršiti za svaki analit ili za reprezentativni analit iz skupine predmetnih analita. Interpretacija rezultata je opisana iznad. U slučaju da je validacija kod prve matrice vršena za svaki analit, produženje metode matrice može se testirati na svakom analitu ponovno ili smanjiti na listu reprezentativnih analita (ako se ne sumnja na efekt matrice). U slučaju da je validacija kod prve matrice vršena za listu reprezentativnih analita, ista lista se može koristiti za proširenje validacije metode za novu matricu. U oba slučaja, isti analiti se mogu koristiti za validaciju u novoj matrici samo ako su ovi analiti relevantni za novu matricu (pr. jedan analit relevantan za validaciju mišića goveda ne mora biti relevantan za mišić ovaca, jer lijek nije odobren za korištenje kod ovaca).

Robusnost:

Studije robusnosti koriste namjerno uvođenje manjih razumnih varijacija od strane laboratorija i razmatranje posljedica na rezultate. Studije robusnosti trebaju se provoditi kao što je preporučeno u Odluci Komisije 2002/657/EZ, putem eksperimentalnih planova. Matrice ili vrste životinja se mogu uključiti u studiju robusnosti kao faktori koji mogu utjecati na rezultate. U ovom slučaju, studija primjenjivosti i studija robusnosti se kombiniraju. Da bi istražili robusnost orijentacijske metode, preporučeno je fokusirati se na analit koji reprezentira druge analite (ako metoda prikazuje široki pojas detekcije). Robusnost se procjenjuje analizom najmanje 10 različitih praznih materijala i 10 različitih materijala obogaćenih/spajkovanih (ili nastalih) na razini interesa. Preporučeno je da se studija vrši za otkrivanje mogućnosti i specifičnosti analita kao slijepa proba (nepoznat uzorak) različitim danima s različitim treniranim operatorima, ako je moguće. Kada je demonstrirano da jedan faktor ima efekt na performansu metode, karakteristike performanse (specifičnost, mogućnosti detekcije) se trebaju odrediti za taj faktor. Štoviše, utjecaj tog faktora na karakteristike performanse mora se opisati u izvješću validacije i finalnom SOP.

5.1.4. Stabilnost

Kada je stabilnost analita poznata (bibliografske reference ili već karakteriziran u laboratoriju), nema potrebe za ponovnim određivanjem stabilnosti. Inače, stabilnost analita u standardnoj otopini i stabilnost analita u biološkoj matrici treba se odrediti kao što je opisano u Odluci Komisije 2002/657/EZ.

5.2. Određivanje specifičnosti/selektivnosti i sposobnost detekcije CC β sukladno alternativnom opsežnom pristupu matrici.

Alternativni opsežni pristup matrici za validaciju metode je opisan u Poglavlju 3.1.3. Dodatka Odluke Komisije 2002/657/EZ. Korištenje ovog višefaktorskog pristupa smanjuje broj proba (faktor-razina kombinacija) potrebitih za validaciju

Pristup:

Prvo, osam uzoraka treba opisati sukladno statističkom dizajnu opisanom u poglavlju 3.1.3. Dodatka Odluke Komisije 2002/657/EZ.

Nakon ove početne studije validacije, uzorci osiguranja kvalitete (QA-uzorci) se koriste za svrhe validacije i najmanje 20 QA-uzoraka godišnje se mora uključiti (pogledati dio 6.3.1.). U slučaju da se ovo ne može ispuniti, validacija na osam uzoraka se mora ponavljati svake

godine i što je više moguće QA-uzoraka treba ispitati. Nakon jedne godine rezultati QA-uzoraka mogu se statistički usporediti s kombiniranim inicijalnim i/ili transfer validacijskim podacima.

Primjer postupka validacije u skladu s alternativnim pristupom je prikazan u Dodatku III. Opsežan opis ovog postupka će biti dostupan kod referentnog kontakt laboratorija, CRL-BVL (Berlin, Njemačka).

6. Transfer orijentacijskih metoda između laboratorija

Cilj skraćene validacije je dokazati (demonstrirati) da je prijemni laboratorij sposoban da primjenjuje transferiranu metodu na korektan način sukladno SOP-u metode. SOP korišten u prijemnom laboratoriju ne smije odstupati od SOP razvijenog u laboratoriju podrijetla. Glede fizikalno-kemijskih metoda (npr. LC-MS/MS) i biokemijskih ispitivanja (npr. ELISA čitač), oprema može biti nabavljena od različitih proizvođača. Naročita pažnja mora biti posvećena spojevima između instrumenata koji mogu jako utjecati na rezultate (vidjeti odjeljak 2.8.). Čak i da su principi validacije (određivanje performansi karakteristika) zajednički za inicijalnu i skraćenu validaciju transferirane metode, ovo poglavlje se bavi uvjetima za skraćenu validaciju.

6.1. Uvjeti transfera

Kada je orijentacijska metoda validirana u laboratoriju („podrijetla“) prenesena u drugi laboratorij („prijemni“), tada prijemni laboratorij može koristiti protokol za skraćenu validaciju **osiguravajući da:**

- prijemni laboratorij **ima neophodnu opremu i vještine** da se koristi metoda;
- prijemni laboratorij ima **potpuni pristup originalnom SOP-u i podacima inicijalne validacije (npr. izvješće o validaciji)**;
- se **metoda koristi kako je opisano** u originalnom SOP-u koristeći **iste operative uvjete** (matrice, mjerne tehnike, pripremu uzorka, prečišćavanje, kritičnu opremu*), **istu orijentacijsku ciljanu koncentraciju** i ako je primjenjivo, istu razinu/razine razlučivanja.

* Ako je oprema koju posjeduje laboratorij (proizvođač, reference) različita od opreme laboratorija podrijetla, prijemni laboratorij mora provjeriti je li oprema ili nije od kritičnog značaja za provođenje metoda na zadovoljavajući način. Ako oprema nije od od kritičnog značaja, SOP bi se mogao koristiti na isti način kao i u laboratoriju podrijetla.

U biokemijskim metodama, promjena vrste i/ili prividno nije kritična (npr. ispirać ili čitač). Glede ELISA kitova, proizvođač kitova treba biti isti kao kod inicijalne validacije. Ukoliko je oprema kritična, SOP bi mogao biti blago promijenjen da bi se dosegli isti učinci.

Prije nego se poduzme skraćena validacija u prijemnom laboratoriju, prijemni laboratorij mora dokazati (demonstrirati) da su operativni uvjeti koji prevladavaju u laboratoriju podrijetla pokriveni u prijemnom laboratoriju. Ako nisu, transferirana metoda mora imati punu validaciju u prijemnom laboratoriju.

Izbor analita korištenih u skraćenoj validaciji treba biti baziran na jednom od onih iz inicijalne validacije i kao opći princip, trebao bi biti primjer najgoreg slučaja o kojemu je izvijestio laboratorij podrijetla. Međutim, postoje neke iznimke od ovoga. Ako je na primjer metoda transferirana drugoj zemlji gdje se različiti antibiotici unutar jedne familije antibiotika koriste učestalije u usporedbi sa zemljom podrijetla, bilo bi prikladnije da se koriste oni analiti u skraćenoj studiji validacije, osiguravajući da su ti analiti unutar obima originalnog SOP-a. Prijemni laboratorij također mora validirati više od jednog analita, ako laboratorij podrijetla dokaže (demonstrira) značajnu inter-klasnu varijaciju u odgovoru na ispitivanje. Ponovno, u slučaju da bude u mogućnosti za skraćenu validaciju, analiti koji su izabrani moraju biti u obimu originalnog SOP-a.

NB: U onim slučajevima gdje prijemni laboratorij želi modificirati početnu orijentacijsku metodu (npr. da proširi obim na druge matrice, uključi druge analite itd.), puna validacija mora biti obavljena u prijemnom laboratoriju za nove matrice i analite.

Kada odlučuje da usvoji orijentacijsku metodu koja je razvijena u laboratoriju podrijetla (ili kada nabavlja komercijalno dostupne kitove), prijemni laboratorij mora istražiti performanse metode konzultirajući znanstvenu literaturu, istraživajući podatke od laboratorija podrijetla ili dobavljača (početno izvješće o validaciji) i ako je dostupno podatke od nacionalnih i međunarodnih organizacija za standardizaciju (npr. ISO, AOAC, AFNOR). Jednom kada je uspostavljena metoda u laboratoriju i prije poduzimanja skraćene validacije, vještine tehničara i njihova sposobnost da provedu metodu moraju biti adresirane. Osoblje mora imati treninge o principima metode i kako da obavlja ispitivanje. Kada je osoblje obučeno, ono mora obavljati negativne (odjeljak 2.5.) i orijentacijski pozitivne kontrole (odjeljak 2.6.) uzoraka u više navrata da pokaže da je sposobno obavljati ispitivanja prema SOP-u.

6.2. Šta je uključeno u skraćenu validaciju prema klasičnom konceptu

Osiguravajući da su uvjeti iz točke 6.1. ispunjeni, može se izvršiti skraćena validacija. Po definiciji, skraćena validacija je manje intenzivna nego puna (početna/inicijalna) validacija. Njena svrha je isključivo naznačiti da će transferirana metoda raditi prihvatljivo u prijemnom laboratoriju. Tijekom skraćene validacije, samo specifičnost i sposobnost dokazivanja moraju biti određene na smanjenom broju uzoraka (20 uzoraka koja god da je orijentacijska ciljana koncentracija) i ove karakteristike moraju biti uspoređene s onim dobivenim tijekom početne/inicijalne validacije u laboratoriju podrijetla (vidjeti izvješće o validaciji ili znanstveni članak). Transfer metode će biti validan kada su performanse karakteristika metode istog reda. Razlike u performansama karakteristika znače da metoda nije pravilno transferirana. U ovim slučajevima, prijemni laboratorij mora se posavjetovati s laboratorijem podrijetla, dok se slučaj ne riješi.

6.3. Što je uključeno u skraćenu validaciju prema alternativnom konceptu

Osiguravajući da su uvjeti iz točke 6.1. ispunjeni, može se izvršiti skraćena validacija. Principi validacije transferiranih metoda je kombinacija uporabe podataka početne/inicijalne i podataka skraćene validacije. Ovo omogućava značajno smanjenje radnog opterećenja za rutinske laboratorije. Kombinacija dobivenih podataka je međutim jedino mogućna ako nema značajnih razlika. Ukoliko je vlastita mogućnost obnovljivosti (reprodukcija) dobivena u transferirane validacije gora za 1.5. puta niža od reprodukcije početne/inicijalne validacije

koju posjeduje vlastita kuća, prijemni laboratorij mora da razmotri da li da nastavi obavljanje metode.

Da bi se smanjilo radno opterećenje u najvećoj mogućoj mjeri, može se primijeniti kombinacija strategije validacije. Statistički dizajn skraćene validacije je ekvivalentan dizajnu početne/inicijalne validacije, ali uzima u obzir samo razinu koncentracije. Ovo znači da samo osam uzoraka mora biti ispitano. Ovi uzorci moraju biti utvrđeni na ili blizu vrijednosti maksimalno dozvoljene razine (MRL). Dodatno, uzorci kontrole kvalitete (QA) se moraju koristiti za svrhu validacije. Mora biti zahtijevano da barem 20 uzoraka kontrole kvalitete (QA) godišnje bude dostupno. U slučaju gdje se ovo ne može ispuniti, osam uzoraka validacije mora biti ponovljeno svake godine i onoliko uzoraka kontrole kvalitete (QA) koliko je moguće.

7. Kontinuirana verifikacija/potvrđivanje

7.1. Uzorci kontrole kvalitete (QC)

Bez obzira na vrstu orijentacijskog ispitivanja (kvalitativno ili (polu)kvantitativno), trenutačna kontrola kvalitete (QC) je vitalna da dopuni podatke dobivene tijekom inicijalne ili skraćene studije validacije. U ovu svrhu, svaka skupina analiza treba uključiti i “negativnu kontrolu” (slijepa proba matrice) i “orijentacijski pozitivnu kontrolu” uzoraka (obogaćenu/spajkovanu na orijentacijski ciljanu koncentraciju). Ukoliko uzorak “orijentacijski pozitivne kontrole” daje “negativan” rezultat (npr. manje nego razina razlučivanja), skupina analiza mora biti odbačena. Slično, ako “negativna” kontrola uzoraka daje pozitivan rezultat (npr. iznad razine razlučivanja), skupina analiza mora biti odbačena. U oba slučaja, trebala bi biti obavljena istraga zašto su ispitivanja neuspjela i poduzeti mjere za prevazilaženje. Rezultati ovih uzoraka trebaju biti zabilježeni kontinuirano i ovi podaci trebaju verificirati/potvrditi da orijentacijsko ispitivanje radi na prihvatljiv način i ima lažno zadovoljavajući /pogrešan raspon koji nije veći od 5% za ciljne analite. Izbor analita koji se uključuju u rutinsku kontrolu kvalitete (QC) uzoraka treba slijediti ista pravila kao i one vježbe za početnu/inicijalnu ili skraćenu validaciju *npr.* najgori slučaj analita koji su navedeni u opsegu metode ili najrelevantniji analiti u nacionalnom planu kontrole. Uporaba obogaćenih/spajkovanih uzoraka kao kontrola kvalitete (QC) je primjenjiva na kvalitativne testove (npr. tube testovi (Premi®Test, Delvotest®, COPAN®, itd...), receptor-bazirane testove (Tetrasensor®, Twinsensor®), polu-kvantitativne (npr. ELISA kitovi) i kvantitativne testove (npr. LC-MS/MS metode).

Veći problem predstavlja (iz razloga opisanih u odjeljku 4.3.) uporaba spajkovanih/obogaćenih matrica kontrole kvalitete (QC) uzoraka za ispitivanja inhibicije mikrobiološkog rasta. U takvim slučajevima, pozitivna kontrola kvalitete (QC) uzorka treba biti barem spajkovani/obogaćeni antibiotik standard papirnog diska. Međutim, visoko je preporučljivo da se kada je to moguće koriste nastali/napravljeni (eng. incurred) uzorci ili obogaćeno/spajkovano „simulirano tkivo“ pripremljeno kao tijekom početne/inicijalne ili skraćene faze validacije. Cilj kontinuirane verifikacije/potvrđivanja je da se proizvede više 20 rezultata kontrole kvalitete u 12 mjeseci.

Uzorci kontrole kvalitete (QC) trebaju biti skladišteni u razdoblju koje odredi laboratorij prema podacima o stabilnosti koji su dostupni za analit/matricu. Podaci dobiveni s uzorcima kontrole kvalitete (QC) trebaju biti pohranjeni i čuvani u cilju sljedivosti toliko dugo koliko se metoda koristi u laboratoriju. Ovo uključuje rutinsku uporabu komercijalno dostupnih ispitnih

kitova. Rezultati dobiveni kontrolom kvalitete (QC) uzoraka trebaju biti korišteni da dopune podatke početne/inicijalne i skraćene validacije. Oni mogu biti korišteni da verificiraju/potvrde:

- osobine metode;
- kvalitet skupine komercijalno dostupnih ispitnih kitova;
- kvalitet i stabilnost reagensa i
- vještinu i osobine testova koje obavljaju tehničari zaduženi za analize.

U roku od 12 mjeseci rutinske uporabe metode, svi dostupni podaci validacije (od početne/inicijalne, skraćene validacije i kontrole kvalitete) trebaju biti statistički analizirani. Ako je broj uzoraka kontrole kvalitete (QC) ispod 20, mora se obaviti dodatna validacija uzoraka. Zbir rezultata početne/inicijalne validacije, skraćene validacije i tekućih rezultata uzoraka kontrole kvalitete (QC) za "orijentacijski pozitivnu kontrolu" uzoraka treba dostizati barem 40 uzoraka tijekom prve godine. Nakon toga broj uzoraka kontrole kvalitete (QC) treba dostizati 20 uzoraka svake naredne godine. Ako ispitivanje radi pouzdano i ako je robusno, ne bi trebalo da više od 5% od ovih 40 ili 20 "orijentacijski pozitivnih kontrolnih" uzoraka pada ispod razine razlučivanja ispitivanja. Ako se metoda trenutačno ne koristi u laboratoriju, broj kontrola kvalitete (QC) može biti smanjen tijekom narednih godina.

7.2. Usporedna ispitivanja osposobljenosti (eng. *Proficiency tests*)

Redovito učešće u relevantnim usporednim ispitivanjima osposobljenosti se čvrsto preporuča. Na godišnjoj bazi Referentni laboratorij Europske unije za analite vodi usporedna ispitivanja osposobljenosti za one analize za koje je odgovorna. Postoje također i komercijalni dobavljači analita iz područja veterinarskih lijekova i odgovarajući Referentni laboratorij Europske unije može dati dodatne informacije o dostupnim opcijama. Ispitivanja i korektivne mjere trebaju biti poduzimane i dokumentirane u svakom slučaju gdje se dobiju upitni ili nezadovoljavajući rezultati.

8. Izvješće o validaciji

Kada je orijentacijska metoda validirana ili u laboratoriju podrijetla (početna/inicijalna validacija) ili prijemnom laboratoriju (skraćena validacija), mora biti napisano izvješće o studiji validacije. Početno izvješće o validaciji treba:

- identificirati raspon metode, uključujući izjave robusnosti, raspon koncentracije, matrice, vrste, stanja matrice i uvjete u laboratoriju;
- opisati dizajn studije, uključujući preduvjete, pretpostavke i formule koje su se koristile u dizajnu eksperimentalnog plana;
- osigurati i sažeti rezultate za parametre validacije;
- identificirati uvjete koji ne omogućavaju da analiza bude obavljena na prihvatljiv način;
- uputiti na smetnje zabilježene tijekom studije validacije ili tijekom analize kontrole kvalitete uzoraka (ovi tekući podaci kvalitete (QC) moraju biti upisani kasnije u izvješće o validaciji);

- uspostaviti, za testove inhibicije, listu različitih analiza koji su proizveli rezultate iznad razine razlučivanja za svaku kombinaciju analit/matrica na svakoj ploči;
- ako je moguće, osigurati rezultate učešća u testovima ispitivanja osposobljenosti (proficiency tests). Kada je orijentacijska metoda transferirana, prijemni laboratorij mora imati pristup originalnom izvješću o validaciji. Dodatno, prijemni laboratorij treba:
- dokumentirati izvor metode (npr. odakle je metoda transferirana);
- dati unakrižne reference podataka početne/inicijalne validacije, s podacima koji su korišteni od znanstvenih publikacija ili drugih izvora (uključujući reference);
- dokumentirati rezultate skraćene validacijske studije koja je obavljena da se potvrdi da je metoda pouzdana u njihovim rukama.

9. Reference

- [1] EC 2002. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC. Official Journal of the European Community. L 221:8-36.
- [2] EC 2009. Council Regulation (EC) No 470/2009 of 6 May 2009 laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin, repealing Council Regulation (EEC) No 2377/90. Official Journal of the European Community. L 152:11-22.
- [3] EEC 1990. Council Regulation (EEC) N° 2377/90 of 26 June 1990: laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. Official Journal of European Community. L224:1-8.
- [4] EC 2005. Commission Decision 2005/34/EC of 11 January 2005 laying down harmonised standards for the testing for certain residues in products of animal origin imported from third countries. Official Journal of the European Community. L 16: 61-63.
- [5] CRL Guidance Paper of 7th December 2007. CRLs view on state of the art analytical methods for national residuecontrol plans, 1-8.
- [6] M. Gaugain-Juhel, B. Delépine, S. Gautier, M.P. Fourmond, V. Gaudin, D. Hurtaud-Pessel, E. Verdon, P. Sanders. 2009. Validation of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometry screening method to monitor 58 antibiotics in milk : qualitative approach. Food Additives & Contaminants: Part A. In press.
- [7] V. Gaudin, C. Hedou, and P. Sanders. 2007. Validation of a Biacore Method for Screening Eight Sulfonamides in Milk and Porcine Muscle Tissues According to European Decision 2002/657/EC. JOURNAL OF AOAC International. 90 (6) 1706-1715.
- [8] V. Gaudin, P. Maris, R. Fuselier, J.L. Ribouchon, N. Cadieu, A. Rault. 2004. Validation of a microbiological method : the STAR protocol, a Five Plate Test, for the screening of antibiotic residues in milk Food Additives & Contaminants, 21 422-433.
- [9] V. Gaudin; C. Hedou; A. Rault; P. Sanders; E. Verdon. 2009. Comparative study of 3 screening tests, Explorer® test, Premi®Test 2 microbiological tube tests and a multi-sulphonamides ELISA kit, for the detection of antimicrobial and sulphonamide residues in eggs. Food Additives & Contaminants: Part A. 26 (4) 427–440.
- [10] V. Gaudin, C. Hedou and E. Verdon. 2009. Validation of a wide-spectrum microbiological tube test, the EXPLORER® test, for the detection of antimicrobials in muscle from different animal species. Food Additives & Contaminants: Part A.26 (8) 1162–1171.
- [11] B. Jülicher, P. Gowik and S. Uhlig. 1998. Assessment of detection methods in trace analysis by means of a statistically based in-house validation concept. Analyst, 120, 173.
- [12] P. Gowik, B. Jülicher and S. Uhlig. 1998. Multi-residue method for non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma using high performance liquid chromatography-photodiode-

array detection. Method description and comprehensive in-house validation. *J. Chromatogr.*, 716, 221.

10. Dodaci

Dodatak I.

Utvrđivanje razine razlučivanja i CC β u polukvantitativnom orijentacijskom ispitivanju

Primjer A:

$$\frac{3}{4} \text{ MRL} = 1.0 \text{ } \mu\text{g/kg}$$

$$\frac{3}{4} \text{ Orijentacijska ciljana koncentracije} = 0.5 \text{ } \mu\text{g/kg}$$

Izabrano je dvadeset različitih matrica slijepih proba (neobogaćenih uzoraka) (ili njihov umnožak). Replikati ovih uzoraka su obogaćeni/spajkovani na orijentacijsku ciljanu koncentraciju, u ovom slučaju 0.5 $\mu\text{g/kg}$. Analizira se matrica proba (neobogaćenih uzoraka) i obogaćenih/spajkovanih uzoraka, po mogućnosti tokom više dana. Ispituje se raspon odgovora u slijepim probama uzoraka. Bilježi se najviši odgovor u praznim uzorcima – u ovom slučaju to je 0.137 jedinica. Bilježi se i najniži odgovor u obogaćenim/spajkovanim – u ovom slučaju to je 0.252 jedinica. U prikazanom slučaju niti jedan od odgovora obogaćenih/spajkovanih uzoraka se nije preklapao s odgovorima slijepih proba (neobogaćenih uzoraka). Zbog toga se može reći da je CC β ove orijentacijske metode manji ili jednak 0.5 $\mu\text{g/kg}$. U prikazanom primjeru može se reći da je najniži odgovor 0.252. Zbog te razine razlučivanja ovog ispitivanja je 0.252 jedinica. Za svaki uzorak koji daje odgovor veći od ove razine se smatra da je „orijentacijski pozitivan“ i da prelazi CC β orijentacijske metode. Za ovo ispitivanje, kao kriterij za prihvatljivost serije, odgovor dobiven kao „orijentacijski pozitivan kontrolni uzorak“ mora biti ≥ 0.25 jedinica ili se suprotno serija odbija.

Sample Number	Negative Samples	Spike @ 0.5 µg/kg
1	0.000	0.355
2	0.090	0.252
3	0.000	0.532
4	0.000	0.554
5	0.000	0.408
6	0.070	0.501
7	0.000	0.524
8	0.015	0.559
9	0.000	0.471
10	0.010	0.661
11	0.070	0.642
12	0.129	0.724
13	0.046	0.596
14	0.034	0.599
15	0.041	0.640
16	0.137	0.750
17	0.112	0.655
18	0.120	0.660
19	0.132	0.695
20	0.063	0.635

Primjer B:

$\frac{3}{4}$ MRL = 1.0 µg/kg

$\frac{3}{4}$ Poželjna orijentacijska ciljana koncentracija = 0.5 µg/kg

U ovom primjeru, najviši odgovor u slijepim probama (neobogaćenim uzorcima) je 0.137 jedinica. Međutim, najniži odgovor koji je zabilježen u obogaćenim/spajkovanim uzorcima u ovom slučaju je 0.132 jedinica. U ovom slučaju postoji preklapanje između dva uzorka populacije koji je veći od 5% (odgovori dva obogaćena/spajkovana uzorka su manji od najvišeg odgovora u slijepim probama uzoraka). Jasna razina razlučivanja ne može biti uspostavljena (zbog preklapanja odgovora između slijepih proba (neobogaćenih uzoraka) i obogaćenih/spajkovanih uzoraka). Iz ovih podataka može se zaključiti da $CC\beta$ mora biti veća od 0.5 µg/kg i orijentacijska ciljana koncentracija od 0.5 µg/kg ne može biti pouzdano utvrđena korištenjem ove metode. Metoda mora biti modificirana ili se mora ponoviti studija validacije koristeći više orijentacijske ciljane koncentracije (osiguravajući da ona može biti održavana na ili ispod MRL-a).

Sample Number	Negative Samples	Spike @ 0.5 µg/kg
1	0.000	0.355
2	0.090	0.132
3	0.000	0.532
4	0.000	0.554
5	0.000	0.135
6	0.070	0.501
7	0.000	0.524
8	0.015	0.559
9	0.000	0.471
10	0.010	0.661
11	0.070	0.642
12	0.129	0.724
13	0.046	0.596
14	0.034	0.599
15	0.041	0.640
16	0.137	0.750
17	0.112	0.655
18	0.120	0.660
19	0.132	0.695
20	0.063	0.635

Dodatak II.

Utvrđivanje razine razlučivanja i CCβ u polukvantitativnim orijentacijskim ispitivanjima

Granična vrijednost (engl. Threshold value) T:

$SD_b \cdot B \cdot T \times + = 64 \cdot 1$ ili tehnička vrijednost.

B predstavlja odgovor slijepih proba (neobogaćenih uzoraka) i SD_b standardnu devijaciju slijepih proba (neobogaćenih uzoraka).

Faktor razine razlučivanja F_m :

$SD_M \cdot F_m \times - = 64 \cdot 1$

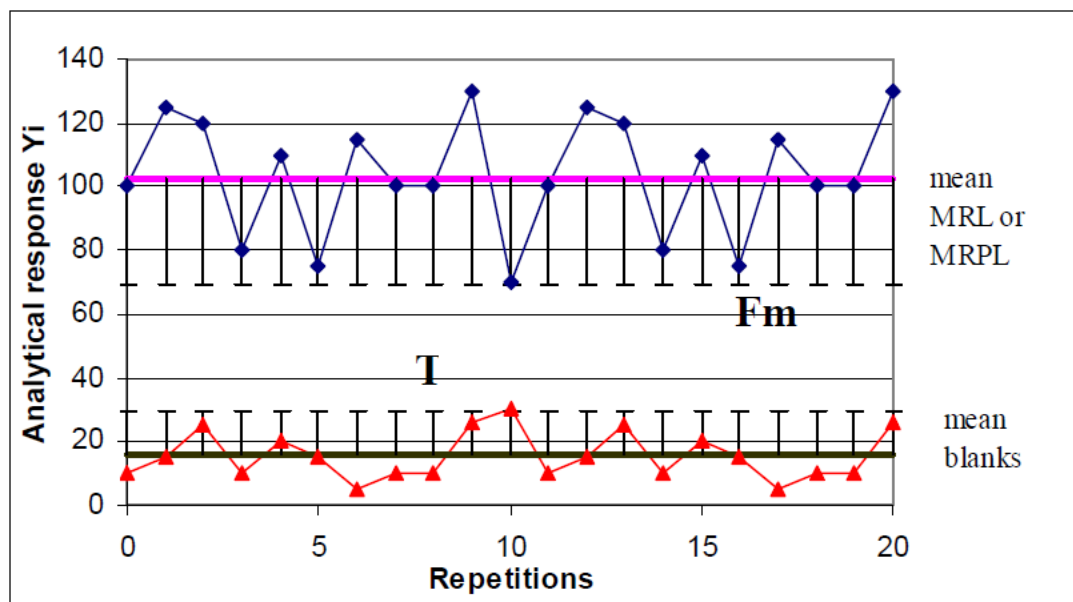
M predstavlja odgovor obogaćenih/spajkovanih uzoraka i "SD" standardnu devijaciju obogaćenih/spajkovanih uzoraka.

Za ELISA ispitivanja, odgovor (B/B₀ %) je obrnuto proporcionalan koncentraciji. Zbog toga:

$SD_M \cdot F_m \times + = 64 \cdot 1$

Granična vrijednost T i faktor razine razlučivanja F_m su matrica-specifični.

Grafički prikaz granične vrijednosti T i faktora "razine razlučivanja" F_m .



Između srednje vrijednosti slijepih proba (neobogaćenih uzoraka), B i T, lažno pozitivna vrijednost je viša od 5 %.

Prema Odluci Komisije 2002/657/EC [1], sposobnost dokazivanja je validirana kada je: $F_m > B$.

Također, laboratorij mora utvrditi mjeru pogrešno pozitivnih (FP) koja je prihvatljiva za metodu.

Ako je $B < F_m < T$, mjera lažno pozitivnih je veća od 5 %.

U slučaju $F_m > T$, mjera FP je ispod 5 %.

Dodatak III.

Validacija kvantitativnih i polu-kvantitativnih metoda prema alternativnom pristupu

Validacija prema alternativnom pristupu je dobivena iz principa eksperimentalnog dizajna korištenim za potvrdne metode (cf. alternativni pristup u Odluci Komisije 657/2002/EC). Prema ovom pristupu, barem 8 uzoraka mora biti izabrano slijedeći ortogonalni dizajn. Svaki uzorak mora biti podijeljen u barem 4 jednaka dijela (aliquote) i biti obogaćen/spajkovan na 4 MRL koncentracije. Ukoliko su uzorci neobogaćeni, njihov sadržaj mora biti ispitan referentnom metodom. Preporučeno je uključiti neobogaćene probe matrica uzoraka da bi se dobio obim odgovora metode na neobogaćene uzorke. Ovo služi da se utvrdi mjera lažno-pozitivnih i na taj način također služi u ekonomske svrhe, npr. za svaki uzorak u eksperimentalnom planu, 5 jednakih dijelova (aliquota) mora biti analizirano. Ukupan broj analiza se povećava do 40. Količina od 32 ili 40 poduzoraka se procesuiru u različitim danima prema ortogonalnom dizajnu. U okviru ovog eksperimentalnog plana, bilo matrica i/ili vrste, mogu varirati na dvije razine, formirajući dva faktora. Štoviše, različiti uvjeti u laboratorijima u kojima će se koristiti metoda moraju biti uzeti u obzir tako da se trebaju popisati dodatni faktori i to, dvije razine za svaki faktor.

Kada se biraju faktori, faktori buke (koji ne mogu biti kontrolirani rutinskom analizom) moraju posebno biti uzeti u razmatranje. Ovo uključuje na primjer fluktuacije u temperaturama ili različitim vještinama operatora.

Treba napomenuti da vještina i matrica utječu na mjereni odgovor na više različitih načina. One su često u interakciji sa specifičnim mjerenim uvjetima (npr. određene vještine su potrebite samo za određene matrice) ili utječu na promjenu preciznosti kada se podvrgnu ponavljanju ili obnavljanju (reproducibilnosti). Zbog navedenog, prilikom izrade dizajna i analize mora se voditi računa o tome da na rezultate mogu utjecati ne samo jednostavni faktorski „glavni“ efekti kao u studiji robusnosti, nego i efekti interakcije ili „disperzivni“ efekti (promjena preciznosti).

Ukoliko se za studiju uzme 8 različitih uzoraka, do 7 faktora može biti uzeto u razmatranje s uglavnom predvidljivim (obnovljivim) efektima (kao što su temperatura inkubacije ili vrijeme inkubacije ili vještina). U slučaju većeg broja uzoraka, više faktora s predvidljivim efektima može biti uzeto u obzir. Međutim, 3 do 7 faktora je dovoljno ako oni predstavljaju glavne izvore greške.

Dodatno, učinak faktora s nepredvidljivim efektima (npr. učinci koje postignu različiti tehničari koji posjeduju jednake vještine ili različite šarže (serije) ili različiti dani mjerenja) moraju biti uzeti u obzir. Faktori s nepredvidljivim efektima (npr. različiti lotovi reagensa ili

podloga) trebaju biti promijenjeni 8 puta⁴. Samo kombinirani efekti ovih faktora mogu biti kvantificirani.

Pomoću ovih faktora i odgovarajućih varijacija razina, dizajnira se eksperimentalni plan. U sljedećim tabelama je opisan tipični eksperimentalni dizajn za 6 faktora s predvidljivim efektima i 2 faktora s nepredvidljivim efektima. Faktor razine 1 i 2 predstavlja dvije kategorije ili dvije razine (visoka-niska) odnosnog faktora.

Factors with predictable effects						Factors with unpredictable effects			Spike levels [ppm]				
Species	Matrix	Storage of sample	Temperature	Incubation time	Skill	Day	Lot of reagent A	Lot of reagent B					
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	10	20	30	40
2	2	2	1	1	1	2	2	2	0	10	20	30	40
1	2	1	2	1	2	3	3	3	0	10	20	30	40
1	2	2	2	2	1	4	4	4	0	10	20	30	40
2	2	1	1	2	2	5	5	5	0	10	20	30	40
1	1	2	1	2	2	6	6	6	0	10	20	30	40
2	1	2	2	1	2	7	7	7	0	10	20	30	40
2	1	1	2	2	1	8	8	8	0	10	20	30	40

Statistička evaluacija podataka je obavljena da bi se osigurali potrebni parametri i kriva koncentracija-odgovor za određivanje lažno neusklađenih vrijednosti na različitim koncentracijama. Evaluacija je bazirana na uopćenom miješanom linearnom modelu koji je opisan u modelu iz literature [Gowik/Uhlig 2009]. Kalkulacija može biti obavljena uz pomoć posebnog softvera, npr. InterVal bioscreen. Ukoliko rezultat evaluacije nije zadovoljavajući glede vrijednosti lažno neusklađenih ili vrijednosti lažno usklađenih, može se uspostaviti druga razina razlučivanja. U tom slučaju se mora ponoviti kalkulacija vrijednosti lažno neusklađenih ili vrijednosti lažno usklađenih.

Napomena: Referentni kontakt za detaljne informacije o alternativnom sveobuhvatnom matričnom pristupu je Referentni laboratorij Europske unije (CRL) Berlin.

Referenca:

Uhlig/Gowik 2009: Factorial Interlaboratory Tests for Microbiological Measurement Methods Journal of Consumer Protection and Food Safety, 2010, DOI 10.1007/s00003-009-0524-z InterVal bioscreen 2009, Software for in-house validation of biochemical screening methods. quo data GmbH, www.quodata.de.

⁴ U slučaju da nije dostupno 8 lotova, može se razmotriti odstupanje od propisanog dizajna i koristiti samo 4 lota