

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Laboratoriotekniikka

2013

Janne Suojanen

# LAADUNVALVONTAMENETELMÄN KEHITTÄMINEN

BNP-kontrollituotteille AQT90 FLEX järjestelmään



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikka | Laboratoriotekniikka

2013 | 43

Marja Storberg, laaturapäälikkö; Taina Hovinen, lehtori

Janne Suojanen

# LAADUNVALVONTAMENETELMÄN KEHITTÄMINEN

Uudelle tuotteelle tarvitaan laadunvalvontamenetelmät, joilla tuotteen laatu voidaan varmistaa. Tässä työssä kehitettiin ja validoitiin laadunvalvontamenetelmät käytettäväksi Innotrac Diagnosticsissa kehitetyn määritysmenetelmän kontrollituotteen valmistukseen.

Laadulla arkikielessä käsitetään jotain hyvin tehtyä tai toimivaa. Teollisuudessa laadukkuus tarkoittaa tuotteelle asetettujen kriteerien täyttymistä tai että asiakkaan vaatimukset täyttyvät. Laadua voidaan saada aikaan, noudattamalla selkeästi määritellyjä prosesseja. Laadun ylläpitämiseen on kehitetty standardeja, jonka lisäksi useimmat maat ovat asettaneet diagnostiikkateollisuudelle vaatimuksia. Näitä viranomaisvaatimuksia on pyritty yhtenäistämään. Laadukkaisiin prosesseihin ja siten tuotteisiin päästään validoimalla valmistukseen käytetyt menetelmät. Validoinneissa voidaan käyttää hyväksi riskianalyysiä.

Käytetty mittausjärjestelmä koostui analysaattorista ja sille kehitetystä immunomäärityksestä. Spesifinen signaali merkkiaineelle saadaan kahdella vasta-aineella; toinen kiinnittää merkkiaineen kuppiin ja toisessa olevasta fluoresoivasta leimasta saadaan signaali aikaerotteisella fluoresenssilla.

Menetelmien kehitys aloitettiin määrittelemällä validointitarpeen laajuus, kriteerit sekä varsinainen menettely. Kehitetyt laadunvalvontamenetelmiä toistettiin kolmesti eri laitteilla ja reagenssieriällä saatuja tuloksia verrattiin asetettuihin kriteereihin. Lisäksi arvioitiin menetelmien toistettavuutta.

Kaikki validoinnille asetetut kriteerit täyttyivät, ja menetelmät saatiin validoitua, jolloin ne voitiin ottaa tuotantokäyttöön. Uusittavuusarviointit osoittivat heikkoa uusittavuutta, mutta menetelmät oli suunniteltu ottamaan se huomioon.

ASIASANAT:

laatu, laadunvalvonta, validointi, menetelmäkehitys, immunomääritys

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Laboratory Technology

2013 | 43

Marja Storberg, Quality manager; Taina Hovinen, Senior lecturer

Janne Suojanen

## DEVELOPMENT OF A QUALITY CONTROL METHOD

A new product needs quality control methods developed for quality assurance. In this thesis project quality control methods were developed and validated for the production process of a quality control product. Quality control methods were developed and validated to be used in the manufacturing of quality control products that are used together with an assay developed Innotrac Diagnostics.

The term "quality" in everyday usage means something well done or effective. In the industry, the quality of a product refers to the fulfillment of set criteria or that the customer's requirements are met. Quality can be achieved by following clearly defined processes. Quality standards have been developed to maintain quality and most countries have imposed requirements on the diagnostics industry. There have been efforts to harmonize regulatory requirements. The validation of processes used in manufacturing leads to high quality products. Risk analysis is a tool for determining validation needs.

The measurement system consisted of the analyzer and the developed immunoassay. The specific signal was measured from a complex of two antibodies and the analyte. The first antibody attaches the analyte in to the cup and the second contains a marker from which the signal is measured utilizing time resolved fluorescence.

The development of methods was initiated by determining the extent and criteria of the validation. The developed quality control methods were repeated three times with different equipment and reagents, and the results were compared to the set criteria. In addition, reproducibility was evaluated.

All the criteria were met thus validating the methods, which could then be introduced to the production. Repeatability assessments indicated poor performance but the methods were developed to take this into account.

### KEYWORDS:

quality, quality control, validation, method development, immunoassay

# SISÄLTÖ

<b>KÄYTETYT LYHENTEET</b>	<b>6</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>7</b>
<b>2 LAATU IVD-ALALLA</b>	<b>9</b>
2.1 Laatu, standardit ja viranomaisvaatimukset	9
2.2 Menetelmän validointi	10
2.3 Riskianalyysi	12
2.4 Laadunvalvonta	14
<b>3 KÄYTETTY MITTAUSJÄRJESTELMÄ</b>	<b>16</b>
3.1 Laite	16
3.2 Määrittäminen	17
<b>4 LAADUNVALVONTAMENETELMÄN KEHITYS JA VALIDOINTISUUNNITELMA</b>	<b>20</b>
4.1 Laadunvalvontamenetelmän kehitys	20
4.2 Sisäntulotesti	22
4.3 Pitoisuuden määrittäminen	25
4.4 Lopputesti	28
<b>5 VALIDOINTITULOKSET</b>	<b>31</b>
5.1 Sisäntulotesti	31
5.2 Pitoisuuden määrittäminen	34
5.3 Lopputesti	37
5.4 Tulosten arviointi	38
<b>6 PÄÄTELMÄT</b>	<b>40</b>
<b>7 VALIDOIDUN MENETELMÄN ARVIOINTI</b>	<b>41</b>

## KUVAT

Kuva 1. Kontrollituotteen laadunvalvontamenetelmän sijoittuminen järjestelmään.	7
Kuva 2: AQT90 FLEX mittausjärjestelmän analyysointilaite.	17

Kuva 3. Yksittäisiä kuppeja, kasetin kupit ja kasetti.	17
Kuva 4. Immunokemiallisen määritysmenetelmän reaktioperiaate.	18
Kuva 5. Aikaerotteisen fluoresenssin fluoresenssi-aika -kuvaaja.	19
Kuva 6. Prosessikaavio laadunvalvonnalliset vaiheet merkittyinä (QC).	20
Kuva 7. Keskiarvot ja variaatiot kalibraatio- ja laitekohtaisesti.	27
Kuva 8. Sisääntulotestitoistokertojen rinnakkaispopulaatioiden yhteneväisyydet tasoittain.	33
Kuva 9. Rinnakkaispopulaatioiden yhteneväisyydet tasoittain pitoisuuden määrittämisessä.	36

## TAULUKOT

Taulukko 1. Riskianalyysiesimerkki (S:n, O:n ja D:n asteikko 1-5 )	14
Taulukko 2. Riskianalyysi sisääntulotestille.	23
Taulukko 3. Konsentraatio- ja hajontarajat neljälle raaka-ainetasolle sisääntulotestissä.	24
Taulukko 4. Riskianalyysi pitoisuuden määrittämiselle.	26
Taulukko 5. Konsentraatio- ja hajontarajat neljälle kontrollituotetasolle pitoisuuden määrittämisessä.	28
Taulukko 6. Riskianalyysi lopputestille.	29
Taulukko 7. Tasokohtaiset kontrollirajat prosentteina.	30
Taulukko 8. Sisääntulotestissä käytetyt reagenssierät ja laitteet toistoittain.	31
Taulukko 9. Sisääntulotestissä saadut konsentraatiot (n=20) rajoineen tasoittain eri toistoissa.	32
Taulukko 10. Sisääntulotestissä saadut kokonaishajonnat (n=20) rajoineen tasoittain eri toistoissa.	32
Taulukko 11. Toistojen ANOVA-tulokset tasoittain sisääntulotestissä.	33
Taulukko 12. Määrittämisessä käytetyt reagenssierät, laitteet ja määrittäjät toistoittain.	34
Taulukko 13. Määritetyt pitoisuudet (n=72) rajoineen tasoittain eri toistoissa.	35
Taulukko 14. Pitoisuudet määrittämisessä kokonaishajonnat (n=72) rajoineen tasoittain eri toistoissa.	35
Taulukko 15. Pitoisuuden määrittämisessä ANOVA:n tulokset tasoittain.	36
Taulukko 16: Toistojen väliset erot prosentteina.	37
Taulukko 17. Lopputestissä käytetyt reagenssierät ja laitteet sekä määrittäjät toistoittain.	37
Taulukko 18. Lopputestien pitoisuudet (n=1) rajoineen tasoittain eri toistoissa.	38

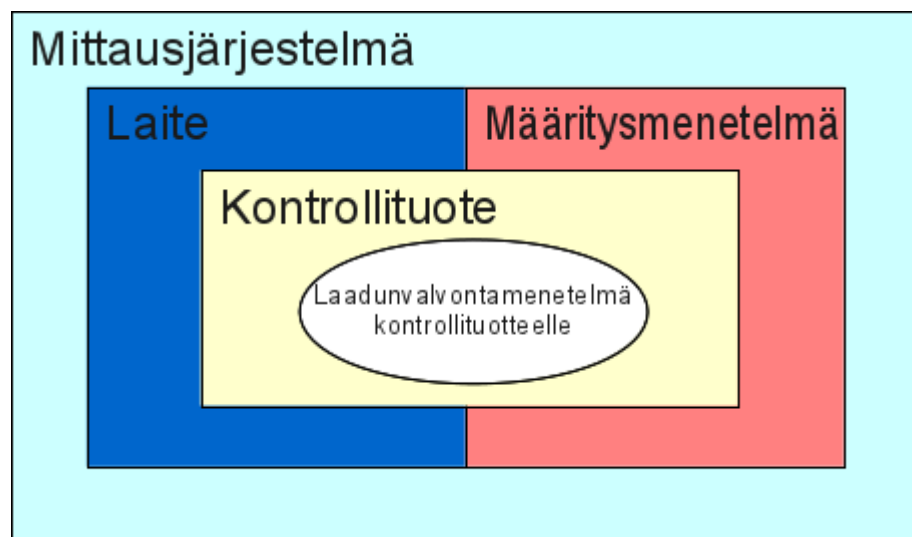
## KÄYTETYT LYHENTEET

ANOVA	Analysis Of Variance, varianssianalyysi; tilastollinen menetelmä tulosjoukkojen yhteneväisyyden tutkimiseen
BNP	B-type natriuretic peptide
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CV	Coefficient of variation, variaatiokerroin
CE	Conformité Européenne
FMEA	Failure mode and effect analysis, Riskianalyysi
IVDD	In vitro Diagnostics Directive, Direktiivi in vitro diagnostiikalle
IVD	In vitro diagnostics, ns. Koeputkessa tapahtuva diagnostiikka
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
IMDRF	International Medical Device Regulators Forum
ISO	International Organization for Standardization
IUPAC	International Union Of Pure And Applied Chemistry; Kansainvälinen puhtaan ja sovelletun kemian liitto
MDD	Medical Devices Directive, Direktiivi lääketieteellisille laitteille
MIKES	Mittatekniikan keskus
n	Number; rinnakkaistulosten määrä
PoC	Point-of-care; vierihoito (laite)
QC	Quality control, laatukontrolli; laadunvarmistustapa tai -tuote
QSR	Quality System Regulations
RPN	Risk Priority Number, Riskin vakavuus tai priorieettiluku
SOP	Standard Operating Procedure, toimintaohje

# 1 JOHDANTO

Uutta diagnostista tuotetta kehitettäessä on tarpeen kehittää laadunvalvontamenetelmät ja laadunvalvontaan kontrollimateriaalit, joilla valmiin tuotteen laatu voidaan varmistaa. Kehitetyillä menetelmillä voidaan varmistaa, että tuote toimii, kuten on suunniteltu; läpäistessään laadunvalvontatestit tuote voidaan hyväksyä ja toimittaa loppukäyttäjälle käytettäväksi.

Tässä työssä kehitettiin laadunvalvontamenetelmä kontrollituotteen valmistusprosessiin. Kyseistä kontrollituotetta käytetään sydämen vajaatoimintaa mittaavan määritysmenetelmän ja sitä hyödyntävän mittausjärjestelmän oikean toiminnan varmistamiseen. Kuva 1 esittää kontrollituotteen laadunvalvontamenetelmän sijoittumisen järjestelmässä.



Kuva 1. Kontrollituotteen laadunvalvontamenetelmän sijoittuminen järjestelmään.

Diagnooseihin käytettävää määritysmenetelmää kehitettäessä on välttämätöntä, että jokainen tuote – määrittäjä ja sitä käyttävä laite – toimii kuten on suunniteltu. Oikein toimiessaan tätä tarkoitusta varten kehitetyllä laadunvalvontatuotteella (jatkossa: kontrollituote) voidaan varmistaa sekä laitteiston että määrittäjän toiminta. Mittausjärjestelmän virheellinen toiminta aiheuttaa virheellisen diag-

noosin riskin, joka voi johtaa väärään hoitoon tai hoitamatta jättämiseen, ja siten vaarantaa potilasturvallisuuden.

Innotracissa jokaiselle eri merkkiaineille kehitettävälle määritysmenetelmälle kehitetään oma kontrollituote, vaikka kontrollituotteita olisi saatavilla myös kolmansilta osapuolilta. Kontrollituotteiden kehittäminen on perusteltua, sillä laitteen, määrityksen ja kontrollituotteen ollessa saman valmistajan kehittämiä ja tuottamia, saadaan luotettava ja helppokäyttöinen järjestelmä.

### **Innotrac Diagnostics**

Innotrac Diagnostics toi markkinoille vuonna 2001 AiO! -laitteen ja siihen kolme akuutin sydäninfarktin merkkiaineen määritysmenetelmää. Menetelmät perustuvat immunokemian – merkkiaineina toimivia antigeenejä ja vasta-aineita – ja aikaerotteiseen fluoresenssiin (ks. luku 3: Kuva 4 ja Kuva 5). Menetelmissä käytetään kuivakemiaa, joka tekee reagenssien käsittelystä perinteistä märkäkemiaa helpompaa.

### **Radiometer ApS**

Tanskalainen Radiometer osti vuonna 2006 Innotracin Diagnosticsin ja kehitti Innotracin määrityksille uuden AQT90 FLEX – järjestelmän (ks. luku 3: Kuva 2). Järjestelmän ideoita ovat helppokäyttöisyys, nopeus ja laitteen hoitopaikalle (engl. Point-of-care; PoC) sijoittamista tukeva pieni koko, joka samalla mahdollistaa tulosten nopean saannin keskuslaboratorioista riippumattomasti.

### **Danaher Corporation**

Radiometerin omistaa yhdysvaltalainen Danaher. Danaher on tieteeseen ja tekniikkaan erikoistunut monialasijoitusyhtiö.



## 2 LAATU IVD-ALALLA

Laatu on abstrakti, vaikeasti määriteltävä ja kuvattava käsite. Arkikielessä sillä tarkoitetaan jotain kestäväää, hyvin tehtyä tai toimivaa. Teollisuudessa laatua voidaan pitää osaamisen mittana, joka kertoo laadukkaiden objektien – tuotteiden tai prosessien – olevan virheettömiä vailla puutteita tai merkittäviä toistokerrojen välisiä eroja. Laatua on mahdollista saada aikaan noudattamalla selkeästi määriteltäviä prosesseja, joille on myös määritelty hyväksyttävät vaihteluvälit. Laadukkaasta prosessista tai tuotteesta voidaan puhua myös silloin, kun asiakkaan tai käyttäjän vaatimukset täyttyvät.

### 2.1 Laatu, standardit ja viranomaisvaatimukset

Laadun ylläpitämisen helpottamiseksi on kehitetty monia laatustandardeja. Näin kaikkien ei tarvitse kehittää omia järjestelmiään. Samalla saavutetaan tilanne, jossa tietyllä asialla tarkoitetaan samaa kaikkialla, missä ko. standardeja noudatetaan. Osa standardeista on kansainvälisiä, osa kansallisia. Standardit ovat vapaaehtoisia ottaa käyttöön, mutta joidenkin standardien käyttö auttaa varmistamaan viranomaisvaatimusten mukaisen toiminnan.

Laajimmin käytettyjä standardeja kehittää ja julkaisee kansainvälinen ISO (engl. *International Organization for Standardization*). Yleisesti käytössä oleva ISO 9001<sup>1</sup> laadunhallintajärjestelmästandardi kuvaa johtamista laadunhallinnan kannalta. Tämän työn kannalta olennainen ISO 13485<sup>2</sup> on 9000-sarjan laadunhallintajärjestelmästandardeja täydentävä standardi lääketieteellisille laitteille, testeille ja reagensseille (engl. *In vitro diagnostics, IVD*).

Mikäli laatu järjestelmää noudattava valmistaja haluaa sertifiointin laatu järjestelmälleen, tarvitsee valmistaja virallisen tahon suorittaman laatu järjestelmän sertifiointiauditin ja tähän liittyvät säännöllisin väliajoin toistuvat seuranta-auditit. Sertifiointi ja siihen liittyvä audit on lisäksi uudistettava säännöllisin väliajoin, esimerkiksi ISO 13485 sertifiointi uusitaan kolmen vuoden välein. Sertifiointimer-

kintä kuten esimerkiksi CE-merkintä (ransk. *Conformité Européenne*), edellyttää tiettyjen ISO-standardien käyttöä.

Euroopan unioni on asettanut lääketieteellisille laitteille direktiivit (engl. *Medical Devices Directive, MDD* ja engl. *In vitro Diagnostics Directive, IVDD*)<sup>3,4</sup>, jotka vastaavat sisällöllisesti em. ISO 13485 standardia. Direktiivi on EU:n jäsenmaille laadittu ohje, joka on lain veroinen ja jäsenmaiden implementoitava omaan lainsäädäntöönsä. Erityyppisille tuotteille on laadittu omat direktiivinsä ja vaatimuksensa, ja jos tuote täyttää ko. vaatimukset voidaan tuotteeseen liittää CE-merkki. Valmistajalle CE-merkistä on hyötyä, sillä se mahdollistaa tuotteiden vapaan liikkumisen EU-maiden välillä.

Yhdysvalloissa Medical Device ja IVD-tuotteille on laadittu laatuun liittyvät viranomaisvaatimukset sisältävä QSR<sup>5</sup> (engl. *Quality System Regulations*), joka on Euroopan direktiiveistä poiketen laki. Se, että QSR on laki, tarkoittaa Yhdysvalloissa kyseisen lain alaisten tuotteiden pakkoa täyttää vaatimukset myyntiluvan saamiseksi. Vaatimusten rikkomuksista voi seurata rangaistuksia kuten tuotantolaitoksen sulkeminen tai sakko- ja vankilatuomioita. Yhdysvaltain ulkopuolella QSR:llä ei ole lain voimaa, mutta säädösten rikkomisesta saattaa vietävä tuote joutua myyntikieltoon.

Viranomaisvaatimuksia on pyritty harmonisoimaan eri maiden välillä, jolloin harmonisoitujen vaatimusten mukaisesti toimiminen kattaa useamman harmonisoinnin piiriin kuuluvan maan vaatimukset. Muun muassa IMDRF (engl. *International Medical Device Regulators Forum*) on pyrkinyt luomaan yhdenmisen ohjeistuksen, joka pitää sisällään QSR- ja IVDD-ohjeistuksien vaatimukset. Vaikka Japani yhdessä EU:n ja USA:n kanssa kuuluu IMDRF:n, vaativat Japanin viranomaiset tuotetta rekisteröitäessä jonkin verran enemmän, kuin mitä kuuluu IMDRF:n harmonisoinnin piiriin.

## 2.2 Menetelmän validointi

Käytännössä uutta (määritys)menetelmää kehitettäessä on välttämätöntä varmistaa, että sen antamat tulokset ovat oikeita. Käytännöllisistä syistä jokaista

saatua tulosta ei ole mielekästä varmistaa toisella menetelmällä, joten uusi menetelmä pyritään yleensä validoimaan tuloksen oikeellisuuden ja tarkkuuden varmistamiseksi. Validoinnilla siis halutaan varmistaa, että menetelmän tuloksiin voidaan luottaa.

IUPAC (engl. *International Union Of Pure And Applied Chemistry*) on määritellyt menetelmävalidoinneissa tutkittavat parametrit, joille mittaustekniikan keskus (MIKES) on koonnut suomenkieliset.<sup>6,7</sup> Parametrit esitetään alla yhdessä su-luissa olevien CLSI:n (engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*) englan-ninkielisten vastineiden kanssa mikäli mahdollista:

- lineaarisuus (CLSI: engl. *linearity*<sup>8</sup>),
- mittausalue (CLSI: engl. *range*<sup>9</sup>),
- toteamisraja (CLSI: engl. *detection limit*<sup>9</sup>),
- määritysraja (CLSI: engl. *quantitation limit*<sup>9</sup>),
- poikkeama (CLSI: engl. *bias*<sup>10</sup>),
- oikeellisuus (CLSI: engl. *accuracy*<sup>11</sup>),
- toistettavuus (CLSI: engl. *precision*<sup>11</sup>),
- uusittavuus (CLSI: engl. *reproducibility*<sup>11</sup>),
- mittausepävarmuus (CLSI: engl. *measurement uncertainty*<sup>11</sup>),
- selektiivisyys ja spesifisyys (engl. *specificity*<sup>12</sup>),
- saanto (engl. *recovery*<sup>12</sup>),
- häiriökestävyys, toimintavarmuus (engl. *robustness*<sup>12</sup>).

Validointiin kuuluvia parametreja on yritetty harmonisoida kansainvälisesti mm. ICH järjestön toimesta (engl. *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*).

Kuitenkin on huomattava, että harmonisointiyrityksistä huolimatta paikallisissa laeissa, säädöksissä tai farmakopeoissa määritellään em. lisäksi vielä muita vaatimuksia tai niitä tarkennetaan jollain tapaa.

Validoinnissa kaikille valituille testausparametreille määritellään ennen suoritusta hyväksyntäkriteerit, joiden täytyessä voidaan katsoa menetelmän toimivan. Validointitestien toistomäärä, ts. tarvitseeko validointia varten mittaukset toistaa useamman kerran riittävän luotettavuustason saavuttamiseksi, pitäisi määritellä riskianalyysin (engl. *failure mode and effect analysis, FMEA*) kautta. Menetelmävalidointitestit tehdään vain kerran (sis. toistoja), mutta esim. prosessivalidoinnit on tapana toistaa vähintään kolmella peräkkäisellä erällä. Tulosten pitää täyttää kriteerit, jotta validoitava kohde voidaan hyväksyä käyttöön.

Poikkeamat validoinnissa – itse testien suorittamisessa tai kriteerien täyttymisessä – ovat mahdollisia. Poikkeamat kuitenkin luovat aina riskin validoitavan menetelmän toimivuudelle tai hyvyydelle, ja yleensä ne vaativatkin riskianalyysiä ennen menetelmän käyttöönottoa. Monesti validointipoikkeamatapauksissa poikkeava testi uusitaankin kokonaisuudessaan luotettavuuden vahvistamiseksi.

### 2.3 Riskianalyysi

Kehitettäessä uutta tuotetta tai prosessia joudutaan usein miettimään asioiden välisiä vaikutussuhteita ja sitä, aiheutuuko jonkin tekemisestä tai tekemättä jättämisestä riskiä johonkin toiseen asiaan. Tällaisia pohdintoja voi tehdä vapaamuotoisestikin, mutta myös formaalisia riskianalyysimenetelmiä on kehitetty. Esimerkiksi ISO 14971<sup>13</sup> riskinhallintastandardi tukee MD ja IVD direktiivejä.

Riskianalyysissä pyritään analysoitavasta asiasta, esim. suunnitellusta prosessista tai tuotteesta tunnistamaan mahdolliset vikatilanteet. Tunnistetuille vikatilanteille pyritään löytämään ns. juurisyy, eli mahdollisimman perustavanlaatuisen ominaisuus, josta kyseinen vika aiheutuu. Lisäksi vikatilanteille määritellään numeeriset vakavuus- (engl. *severity, S*), yleisyys- (engl. *occurrence, O*) ja havaitsemisarvot (engl. *detection, D*). Vakavuus- ja yleisyysarvot ovat sitä suu-

rempia, mitä suurempi on toteutumistodennäköisyys, kun taas havaitsemisarvo kasvaa vikatilanteen huomaamatta jäämisen myötä. Näiden arvojen avulla saadaan laskettua kokonaisuutta kuvaava riskille prioriteettiarvo (engl. *Risk Priority Number, RPN*), joka monesti lasketaan kertomalla tekijät keskenään. Kun prioriteettiarvo ylittää määritellyn rajan, on kyseisen riskin aiheuttaville tekijöille pyrittävä löytämään juurisyy. Lisäksi riskille on pyrittävä tekemään lieventäviä toimenpiteitä kokonaisriskiarvon ja siten itse riskin pienentämiseksi.<sup>14</sup> Yksittäisille arvoille kuten myös prioriteettiarvoille, voidaan itse määrittää asteikot, mutta standardit tarjoavat valmiita asteikkoja. Tässä työssä käytetään skaalaa 1-5, jossa 5 kuvaa pahinta mahdollista vikatilannearvoa, ja  $RPN > 36$  vaatii korjaavaa toimenpidettä.

#### Riskianalyysin soveltamisesimerkki

Seuraavassa esitetään esimerkki riskianalyysin soveltamisesta validoinnissa, jossa esiintyy validointipoikkeama. Validoinnissa asetetut kriteerit ylittyvät, mutta kokonaisuus hyväksytään silti riskianalyysin tukemana poikkeaman kautta.

Prosessin osana oleva määrittäminen haluttiin validoida. Riskianalyysin kautta päästiin tulokseen, että mittaustuloksen pitäisi olla toistettavasti oikea, kun taas muilla menetelmän ominaisuuksilla ei tässä ollut niin merkittävää vaikutusta. Määrittäminen keskihajonta oli entuudestaan tiedossa ja tämän perusteella päätettiin hyväksyntäkriteeriksi  $CV < 5\%$ . Lisäksi sallittiin kymmenen rinnakkaisnäytteen sarjassa olevan yksi poikkeava tulos, joka voitiin poistaa riittävin perustein.

Määrittäminen validoitiin osana prosessivalidointia, eli se toistettiin kolmesti. Viimeisessä toistossa kuitenkin havaittiin kaksi poikkeavaa tulosta, jotka kasvattivat CV:n 44 %:n. Poikkeavien tulosten poistamisen jälkeen CV oli 2 %.

Validoinnin tuloksista tehtiin poikkeamakäsittely ja sen vaatima riskianalyysi (taulukko 1). Poikkeamakäsittelyn kautta viimeinenkin tulos päätettiin hyväksyä, sillä poikkeamakäsittelyn yhteydessä havaittiin toisen poikkeavan tuloksen joh-

tuvan virheellisestä näytteen käsittelystä, ei itse prosessista tai menetelmästä. Koska kuitenkin RPN oli suurempi kuin 36, ei riskiä voitu hyväksyä, joten prosessiin lisättiin vielä näytteenkäsittelykirjaus, jonka arvioitiin pienentävän riskiä riittävästi. Syntynyttä jäännerriskiä päätettiin vielä arvioida seuraamalla viittä peräkkäistä prosessin läpikäynyttä erää varsinaisessa tuotannossa.

Taulukko 1. Riskianalyytiesimerkki (S:n, O:n ja D:n asteikko 1-5)

Toiminto	Mahdollinen vika-tilanne	Mahdollinen seuraus	Vakavuus (S)	Mahdollinen syy	Yleisyys (O)	Kontrollointitapa	Havaitseminen (D)	RPN
Pitoisuuden määrittäminen	Väärä pitoisuus	Kontrollituote antaa väärän tuloksen	5	Pitoisuus määritetty väärin	2	---	4	40
	Liian suuri hajonta pitoisuusmäärittämisessä	Pitoisuuden ei voi luottaa	3	Näytteen väärä käsittely	4	Näytteiden sulatus ja säilytys ohjeistettu	1	12

## 2.4 Laadunvalvonta

Laadunvalvonta pyritään varmistamaan, että validoitu kokonaisuus – prosessi tai tuote – täyttää jatkuvasti sille asetetut vaatimukset. Laadunvalvonnan avulla voidaan myös esim. havaita, jos prosessi on vähitellen siirtymässä pois optimaaliselta toiminta-alueeltaan (esim. sekoitusaika lyhenee tai pakkausaika pitelee), jolloin tilanne voidaan korjata ajoissa, ennen kuin tuote ei enää täytä sille asetettuja vaatimuksiaan. Yleensä laadunvalvontaa tehdään käyttämällä hyväksittyä tilastollisesti määriteltyä näytteenottoa niin, ettei jokaista prosessin vaihetta tai prosessissa syntyvää tuotetta ole välttämätöntä tarkistaa. Näytteenotto voidaan valita esim. prosessin toleranssien mukaan tai tuotantoprosessissa valmistettavan eräkoon mukaan. ISO-standardit, kuten ISO 2859-1:1999<sup>15</sup> - ISO 2859-10:2006<sup>16</sup> tarjoavat yksiselitteiset ohjeistukset näytteenottoon. Niiden avulla saadaan määriteltyä esim. käytetyn näytteenottofrekvenssin kautta saavutettu luotettavuus koko erälle. Käytännön esimerkkinä valmistettaessa tuhat tulitikkua

voidaan testata joka sadas, jolloin voidaan olettaa, että testattavien välissä olleet tulitikut ovat myös täyttäneet valmistusvaatimukset – kaikkia tulitikkuja olisi-kin hieman epäkäytännöllistä testata. Sopivalla näytteenotolla siis mahdollistetaan myös testattavan kohteen tuhoavien menetelmien käyttö. Kun laadunvalvontamenetelmä on oikein luotu ja se on asianmukaisesti validoitu, voidaan laadunvalvonnalla taata oikea lopputulos tai asianmukainen tuote.

## 3 KÄYTETTY MITTAUSJÄRJESTELMÄ

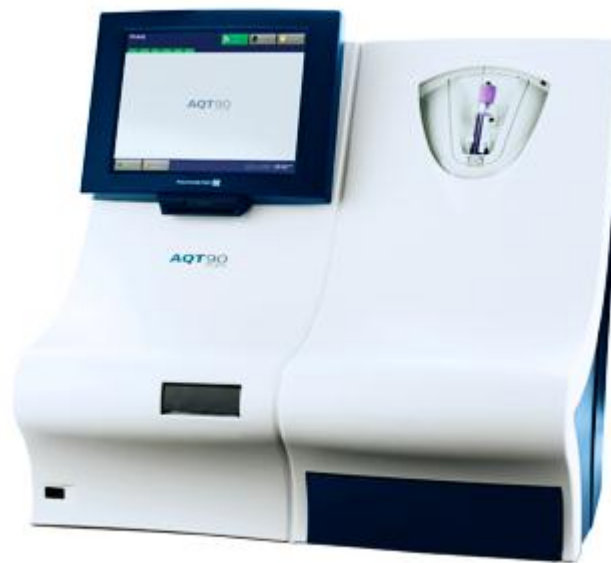
Aiemmin kehitetty määrittymenetelmä ja sille tarkoitettu kontrollituote kehitettiin osaksi AQT90 FLEX -järjestelmää (Kuvat 1 ja 2). Työssä kehitetty kontrollituotteen laadunvalvontamenetelmä (engl. *quality control*, QC) kehitettiin tälle järjestelmällä. Mittausjärjestelmälle on saatavilla myös muiden merkkiaineiden määrittymenetelmiä: akuuttiin sydäninfarktiin (troponit T ja I, kreatiinikinaasi MB sekä myoglobiini), sydämen vajaatoimintaan (BNP ja NT-proBNP), infektiin (CRP) ja raskauteen (hCG).

### 3.1 Laite

AQT90 FLEX analysaattori (kuva 2) on ns. vierihoidolaite. Vierihoidolaitteiden tarkoituksena on mahdollistaa hoitopaikan yhteydessä tehtävät analyysit ja lyhyessä ajassa saatavat tulokset tukemaan nopeaa kliinistä päätöksentekoa.

Määrittymet voidaan tehdä suoraan verinäytteestä tai käsitellystä veri-plasmasta. Näytteet syötetään laitteeseen suljetuissa näyteputkissa, jotka voivat olla suoraan verinäytteiden ottoon tarkoitettuja putkia. Jätteenä syntyvä liuos ohjataan suljettuun jätesäiliöön, joka voidaan hävittää ilman roiskevaaraa. Näin kosketus potentiaalisesti infektiiviseen vereen tai plasmaan vältetään, mikä parantaa näytteiden käsittelyn turvallisuutta.





Kuva 2: AQT90 FLEX mittausjärjestelmän analysaattori.<sup>17</sup>

### 3.2 Määritys

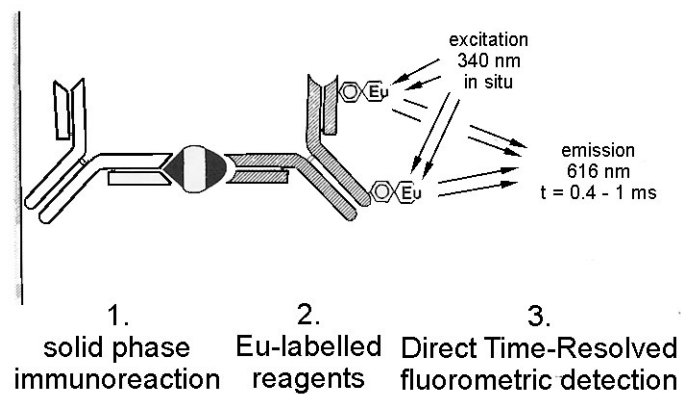
Analysaattorin immunomääritys perustuu kuivakemialliseen konseptiin, jossa tarvittavat reagenssit, kuten sitomis- ja leimavasta-aine ja tarvittavat puskuri-komponentit, kuivataan kaivon pohjalle (kuva 3).



Kuva 3. Yksittäisiä kuppeja, kasetin kupit ja kasetti.<sup>17</sup>

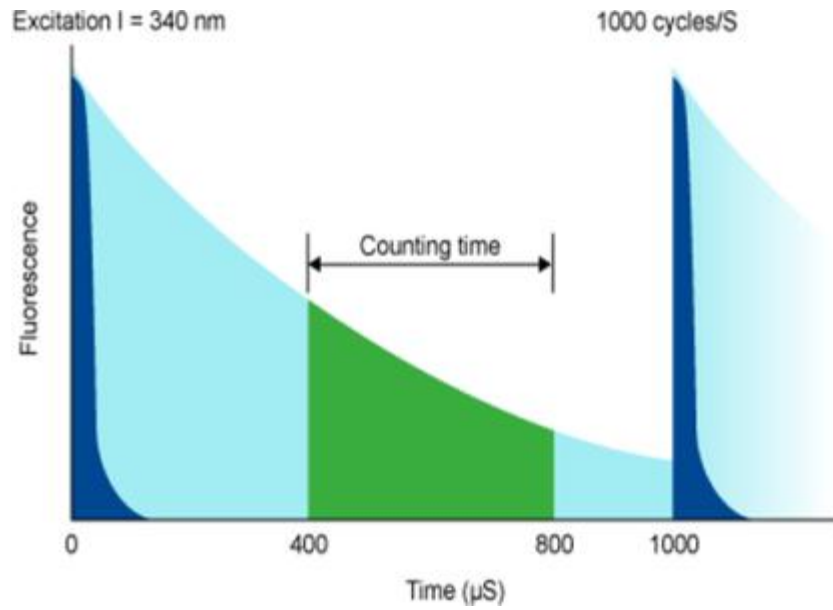
Näytteessä – veressä tai plasmassa – oleva määritettävä merkkiaine, antigeeni, siirretään näyteputkesta kaivoon automaattisesti. Määritysten reaktiot (kuva 4)

tapahtuvat nestefaasissa ja vaativat kullekin määrittämiselle optimoidun tilavuuden. Laite lisää kuppiin vielä kullekin määrittämiselle spesifisen tilavuuden reaktiopuskuria, jonka jälkeen kuppeja inkuboidaan määrittämiselle optimoitu aika. Inkuboinnin aikana antigeeni tarttuu kuppiin kiinnitettyyn vasta-aineeseen ja samalla toinen antigeeni, johon on kiinnitetty fluoresoiva leima eli europium-kelaatti, tarttuu antigeeniin toiseen osaan.



Kuva 4. Immunokemiallisen määrittämismenetelmän reaktioperiaate.<sup>18</sup>

Inkuboinnin jälkeen sitoutumattomat vasta-aineet pestään pois kupista puskuria käyttäen. Ennen mittauksia pesupuskuri poistetaan ja loputkin nesteet kuivataan pois. Sitoutuneen antigeenin detektointi tehdään kuivasta kupista aikaerotteista fluoresenssia hyödyntäen (kuva 5).

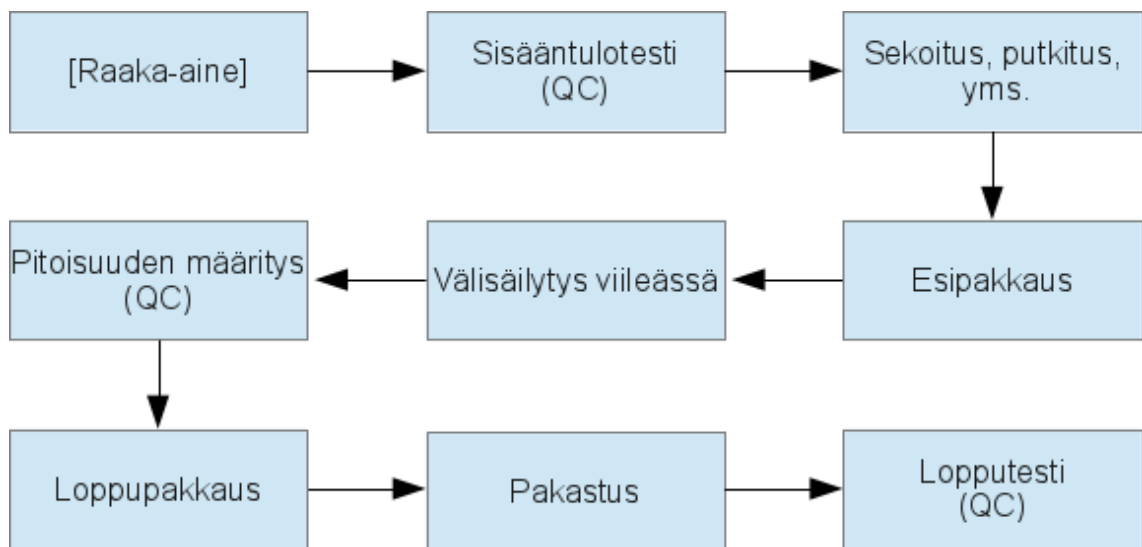


Kuva 5. Aikaerotteisen fluoresenssin fluoresenssi-aika -kuvaaja.<sup>18</sup>

Tässä työssä kehitetty laadunvalvontamenetelmä luotiin BNP (engl. *B-type natriuretic peptide*) määrittämisen kontrollituotteelle. BNP on sydämen vajaatoimintaan merkkiaine, jota voidaan käyttää mm. erottamaan johtuuko vajaatoiminnan oire hengenahdistus sydämen vajaatoiminnasta vai muista syistä. Kohonnutta BNP-pitoisuutta voidaan soveltaa myös akuutin sydäninfarktin diagnoosiin. Tällöin tarvitaan diagnoosin tueksi muita merkkiaineita, kuten troponiinit, kreatiiniini tai myoglobiini.<sup>19</sup>

## 4 LAADUNVALVONTAMENETELMÄN KEHITYS JA VALIDOINTISUUNNITELMA

Laadunvalvontamenetelmät pyrittiin sisällyttämään tuotantoprosessiin (Kuva 6) niin, että erillisiltä työvaiheilta olisi mahdollista välttyä. Kääntäen myös koko tuotantoprosessi pyrittiin suunnittelemaan sellaiseksi, että kun määritellyt ominaisuudet kontrollituotteen tietyissä tuotantovaiheissa olivat hyväksyttäviä, voitiin luottaa siihen, että myös lopullinen tuote täyttää vaatimuksensa.



Kuva 6. Prosessikaavio laadunvalvonnalliset vaiheet merkittyinä (QC).

Tuotantovaiheet, joissa valvontaa tehdään, ovat raaka-aineen sisääntulotesti ja valmistetun kontrollin pitoisuuden määrittäminen (engl. *target value assignment*). Suorittamalla laadunvalvonta pääosin em. vaiheissa, tuotteen lopputesti saatiin yksinkertaiseksi asiakkaan käyttöä simuloivaksi testiksi.

### 4.1 Laadunvalvontamenetelmän kehitys

Laadunvalvontamenetelmän kehitys on ohjeistettu prosessi, jota ohjaa toimintaohje (engl. *standard operating procedure, SOP*), kuten myös monia menetelmäkehityksessä sovellettuja prosesseja, mm. riskiarviointi, kriteerien määrittely,

poikkeamat. Tuotteen laadunvalvonnan suunnittelu aloitettiin määrittelemällä mikä oli tarpeellista todentamaan, että kehitetty kontrollituote toimii käyttötarkoituksessaan, ts. mitkä asiat on tarpeen validoida. Osa kohdassa 2.2 määritellyistä parametreista oli jo validoitu itse määritysmenetelmän validoinnin yhteydessä, ja näiden parametrien voitiin katsoa olevan itse määrittämisestä riippuvaisia, ei kontrollituotteesta. Tuotteen kannalta menetelmän tärkeimmiksi parametreiksi päätettiin ottaa oikeellisuus ja toistettavuus.

Oikeellisuus ei ollut olennainen, sillä BNP-merkkiaineelle ei ole olemassa yksiselitteisesti määriteltävää tai sovittua kansainvälistä pitoisuutta. Kuitenkin itse määritetyn pitoisuuden oikeellisuuden täytyi olla tilastollisesti mahdollisimman edustava. Tuotteen pitoisuus, ns. target-arvo määritettiin itse, ja määritetyn arvon piti järjestelmän mittauserävarmuuden rajoissa olla sama käytetystä analyysaattorista, reagenssierästä ja reagenssien iästä riippumatta. Toisin sanoen target-arvon piti olla em. variaatioelementit huomioiden määrättyissä kontrollirajoissa. Määritysmenetelmän validoinnissa käsitellyt parametrit olivat määrittämisraja, mittaosalue ja lineaarisuus, eikä niitä tarvinnut siksi sisällyttää enää laadunvalvontamenetelmän kehittämiseen. Sama koskee spesifisyyttä ja häiriökestävyyttä, sillä ne ovat tärkeitä vain, jos käytettyjen näytteiden koostumus vaihtelee – kontrollituotteella näytteiden koostumus on käytännössä vakio.

Laadunvalvontatesteissä, lopputesti pois lukien, tarkasteltiin pääasiassa saatua pitoisuutta sekä toistettavuutta tuotespesifikaation määrittelemiä vaatimuksia vastaan. Kehitettyjen laadunvalvontamenetelmien validoinnin hyväksyntäkriteerit saatiin tuotespesifikaatiosta, sillä menetelmävalidoinneissa käytettiin mahdollisimman tarkasti lopputuotetta vastaavia näytteitä. Näin toimimalla saatiin samalla näyttöä siitä, että menetelmät toimisivat myös lopullisen tuotteen kanssa. Toistettavuuskriteerit piti laskea kussakin testissä käytettyjä rinnakkaismääriä vastaaviksi (kaavat 1-3)<sup>20</sup> tuotespesifikaatiossa olleiden kriteerien ollessa määritettyjä yksittäiselle tulokselle.

$$CV_{Internal} = CV_{External} * \sqrt{\frac{\chi_{1-0.05}^2(DF)}{\chi_{1-0.95}^2(DF)}} \quad 1.$$

$$CV_{InternalCombined} = \sqrt{CV_{BetweenRun}^2 + CV_{Internal}^2} \quad 2.$$

$$CV_{CriticalTest} = CV_{InternalCombined} * \sqrt{\frac{\chi_{0.05}^2(DF)}{DF}} \quad 3.$$

Joissa

$CV_{External}$	Käyttäjävaatimukseen (SRS) määritelty kriteeri
$CV_{Internal}$	Sisäiseen testaukseen käytettävä kriteeri; sisältää 95 % luotettavuuskertoimen
$CV_{Between-run}$	Ajojen välinen variaatio
$CV_{InternalCombined}$	Yhdistetty ajojen välinen ja ajojen sisäinen variaatio
$CV_{CriticalTest}$	Testin kriteeri, joka ottaa huomioon käytetyn rinnakkais määrän
$DF$	Vapausasteluku (engl. <i>Degrees of Freedom</i> ), tässä määritelty $DF = n-1$
$\chi^2_i$	Khi-neliö -jakauman arvo i luottamustasolla

Kaikille testeille kirjoitettiin tuotanto-ohjeiden esiversiot, joita käytettiin testausvaiheen tekemisessä. Tuotanto-ohjeita ei hyväksytetty erillisinä ohjeina, vaan ne liitettiin validointisuunnitelmaan<sup>21</sup>, vaikka yleensä tuotanto-ohjeiden pitää olla hyväksytyjä, ennen kuin niitä voi käyttää. Tämä siksi, että validoinnin päätteeksi työohjeet oli tarkoitus korjata lopulliseen muotoonsa, mikäli validoinnin aikana olisi havaittu jotain puutteita ohjeissa, tai validoinnin tuloksissa<sup>22</sup> olisi havaittu jotain menetelmän muuttamista vaativaa.

#### 4.2 Sisääntulotesti

Sisääntulotestillä on tarkoitus varmistaa sisään tulevan raaka-aine-erän vastaavan sille asetettuja spesifikaatioita. Näin varmistetaan, että vastaanotettu materiaali on sellaista, mistä tuotespesifikaation mukainen tuote olisi mahdollista valmistaa.

Kontrollituotteet ovat määritykseen käytettävistä reagenssieristä riippumattomia, eli kontrollituotteelle annettu pitoisuus on millä tahansa reagenssierillä sama. Reagenssierillä kuitenkin tiedettiin olevan vaihtelua niiden antamissa tuloksissa

(ns. erästä erään -vaihtelu) ja lisäksi tiedettiin myös, että käytettävillä analysaattoreilla sekä niiden kalibroinneilla oli oma vaihtelunsa. Kaikki tämä oli huomiotava, sillä vaihtelu olisi saattanut vaikuttaa mitattuun pitoisuuteen sisääntulevan materiaan kelpoisuutta varmistettaessa. Mitattu pitoisuus voisi vaihtelusta johtuen olla sellainen, että vaikka raaka-aine-erä olisi arvioitu kelvolliseksi, sitä ei voitaisikaan käyttää tuotteen valmistukseen. Tämän johdosta pyrittiin sisääntulotestistä ja sen hyväksyntärajoista luomaan sellaiset, että ne ottivat vaihtelutekijät huomioon.

Riskianalyysi sisääntulotestille esitetään taulukossa 2. Siitä havaitaan, että sisääntulotestissä riskit ovat pieniä, eikä niistä seuraa riskiä potilasturvallisuudelle. Arvioituista vikatilanteista ensimmäinen, väärä pitoisuus toimittajalta, voidaan estää niin, ettei väärällä pitoisuudella toimitettua materiaalia oteta sisään, vaan se reklamoidaan, ts. palautetaan toimittajalle korvausvaateen kanssa. Toinen vikatilanne, jossa pitoisuus ei ole rajoissa, ei välttämättä estä tuotteen valmistamista, koska tuotteelle myöhemmin tarkemmalla menetelmällä määritettävä pitoisuus saattaa olla halutulla pitoisuusalueella, vaikkei epätarkempi sisääntulotestipitoisuus olisikaan ollut. Epätarkkuutta aiheuttavat tekijät menetelmässä aikaansaavat kolmannen vikatilanteen, joka ehkäistään huomioimalla em. vaihtelutekijät ja luomalla menetelmästä riittävän yksinkertainen, että mahdollisuudet käyttövirheisiin saatiin mahdollisimman pieniksi.

Taulukko 2. Riskianalyysi sisääntulotestille.

Toiminto	Mahdollinen vika-tilanne	Mahdollinen seuraus	Vakavuus (S)	Mahdollinen syy	Yleisyys (O)	Kontrollintitapa	Havaitseminen (D)	RPN
Sisääntulotesti	1. Väärä pitoisuus toimittajalta	Kontrollituotetta ei voi valmistaa	4	Valmistajan virhe	1	Verrataan pitoisuutta valmistajan toimittamaan spesifikaatioon	1	4

Taulukko 2. (jatkuu)

Toiminto	Mahdollinen vika-tilanne	Mahdollinen seuraus	Vakavuus (S)	Mahdollinen syy	Yleisyys (O)	Kontrollintapa	Havaitseminen (D)	RPN
	2. Mitattu pitoisuus ei rajoissa	Kontrollituotetta ei voida valmistaa	3	Valmistajan virhe	2	Verrataan pitoisuutta valmistajan toimittamaan spesifikaation	2	12
	3. Mitattu pitoisuus ei rajoissa	Kontrollituotteen valmistus keskeytyy pitoisuuden määritykseen tai lopputestiin	4	Määrittymenelmä ei toimi tai sitä käytetään väärin	2	Tarkistus pitoisuuden määrityksessä	1	8

Sisäntulotesti rakennettiin niin, että kahdella reagenssierällä ja kahdella analyysattorilla ajettiin 5 rinnakkaista näytettä. Näin saatu konsentraation kokonaiskeskiarvo olisi riittävän oikea uuden materiaalin käyttöönottohyväksyntään. Menetelmävalidoinnissa pääasiallisesti kriteeriksi asetettiin konsentraation kokonaiskeskiarvon (n=20) olemisen tuotespesifikaatiossa määritellyissä rajoissa (taulukko 3). Yksittäisille viiden rinnakkaisen sarjoille asetettiin hajontakriteerit menetelmän sisäiseksi laadunvalvonnaksi, eikä ylitys niissä olisi aiheuttanut testitulosten hylkäämistä.

Taulukko 3. Konsentraatio- ja hajontarajat neljälle raaka-ainetasolle sisäntulotestissä.

	Taso 1	Taso 2	Taso 3	Taso 4
Pitoisuus (ng/L)	30–60	100–250	1200–2000	3600–4235
Ajonsisäinen CV	≤ 21,1 %	≤ 9,8 %	≤ 9,8 %	≤ 9,8 %

Kriteereitä koko 20 sarjan CV:lle ei asetettu, sillä tuloksen oikeellisuus oli testissä merkittävämpi kuin toistettavuus. Kaksikymmentä rinnakkaistulosta antoi



myös riittävän tilastollisen voimakkuuden, jotta voitiin arvioida menetelmän toistettavuutta tilastollisella menetelmällä, jolla voidaan verrata useiden joukkojen statistista ekvivalenttisuutta samanaikaisesti (ks. ANOVA kappaleessa 5). Toistettavuuden mittana käytetty statistinen ekvivalenttisuus päätettiin kuitenkin jättää optionaaliseksi sisääntulotestissä. Konsentraation poikkeaminen rajoista päätettiin myös sallia, sillä sisääntulotestillä pyritään minimoimaan tuotettavuusriskiä, mutta sen tulokset eivät suoraan vaikuta kontrollituotteen toimintaan. Konsentraatiopoikkeaman hyväksyntä määriteltiin vaatimaan riskianalyysiä ja poikkeamamenettelyä.

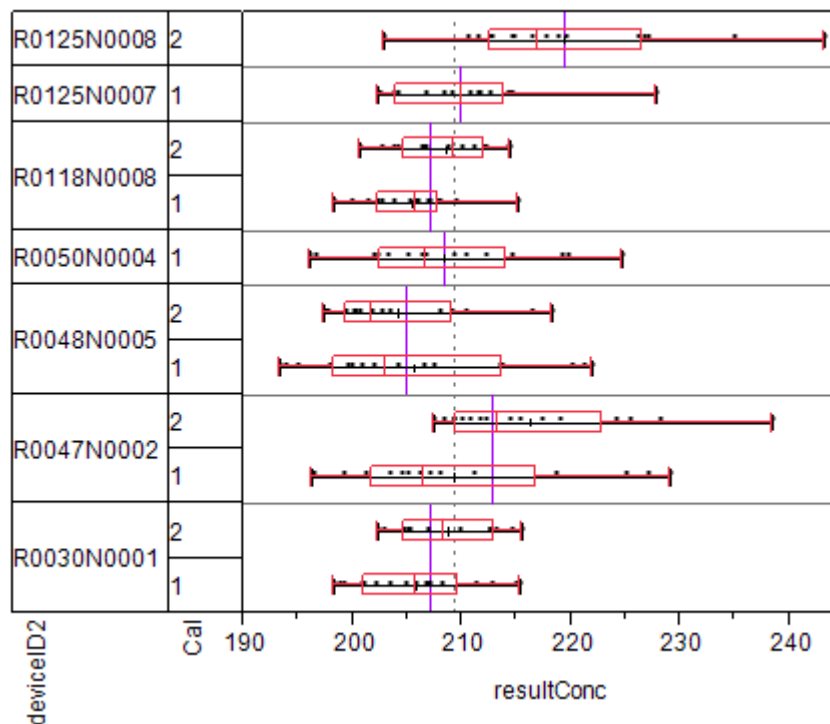
#### 4.3 Pitoisuuden määrittäminen

Pitoisuuden määrittäminen ja määrittämenetelmän toimivuus määriteltiin yhdeksi tärkeimmistä kontrollituotteen valmistusvaiheista ja siksi siihen kiinnitettiin erityistä huomiota. Vaikka erilaiset variaatiolähteet tiedettiin jo aiemmista tuotteen kehitysvaiheista (vrt. 4.2), oli välttämätöntä tutkia mikä oli riittävä määrä reagenssieriä, analysointilähteitä, ja analysointikohtaisia kalibraatioita pitoisuuden määrittämisessä. Toisin sanoen haluttiin varmistaa, ettei yksittäinen yksittäinen vaihtelun lähde vääristäisi tulosta. Pitoisuuden määrittämiselle tehty riskianalyysi esitetään taulukossa 4. Vain toinen vikatilanne aiheuttaisi todellisen vaaran potilasturvallisuudelle, ja sekin tapahtuisi vain epäsuorasti. Kontrollituotteen ilmoitetun pitoisuuden ja mittausjärjestelmällä määritetyn pitoisuuden ollessa (määrittelyissä rajoissa) samat, voidaan mittausjärjestelmän antamien tulosten olettaa olevan oikeita. Vikatilanne, siis väärä kontrollituotteelle ilmoitettu pitoisuus, saattaisi mahdollistaa mittausjärjestelmän käytön, vaikka kontrollituotteen olisi pitänyt osoittaa jonkin olevan vialla. Kuitenkin kehitetty menetelmä ja useat eri valmistusvaiheissa tehtävät varmistukset laskevat havaitsemattajäämisarvoa (D) niin, ettei kokonaisriski (RPN) ylitä toimenpiderajaa.

Taulukko 4. Riskianalyysi pitoisuuden määrittämiselle.

Toiminto	Mahdollinen vika-tilanne	Mahdollinen seuraus	Vakavuus (S)	Mahdollinen syy	Yleisyys (O)	Kontrollintapa	Havaitseminen (D)	RPN
Pitoisuuden määrittäminen	1. Väärä pitoisuus (tulos ulkona rajoista)	Kontrollituotteen valmistus keskeytyy	4	Väärä raaka-aineen pitoisuus	1	Sisääntulotesti	1	4
				Virheellinen menetelmän käyttö	2	Pitoisuuden määrittämisessä sisäiset varmennukset (CV-kriteerit). Pitoisuudella selkeät rajat	1	15
	2. Väärä pitoisuus (mitattu pitoisuus eri kuin todellinen)	Virheellinen tuote käyttäjälle	5	Virheellinen menetelmän käyttö	2	Loppup testi	3	30
	3. Hajonta (CV) sallittua suurempaa	Väärä pitoisuus tuotteelle (2.)	2	Virheellinen näytteenkäsittely	3	CV-kriteerit, ohjeistus uusinta-ajoista	1	6
	4. Paljon poikkeavia tuloksia	Väärä pitoisuus tuotteelle (2.)	3	Virheellinen näytteenkäsittely	3	Pitoisuuskriteerit, ohjeistus uusinta-ajoista	1	6

Variaatiokomponenttien tutkimista varten suunniteltiin esitesti, jossa neljä samaa pitoisuutta olevaa näytettä ajettiin neljällä rinnakkaisella näytteellä, kuudella laitteella ja kahdella yhden reagenssierän erillisellä kalibraatiolla. Jokaisesta ajosta saatiin yhteensä 16 tulosta ( $n=16$ ), mutta resursointiongelmien vuoksi suunnitellut toistot saatiin tehtyä vain neljällä laitteella. Saadut tulokset koottiin (kuva 7) niin, että pystyttiin arvioimaan eri tekijöiden vaikutusta saatuihin keskiarvoihin.



Kuva 7. Keskiarvot ja variaatiot kalibraatio- ja laitekohtaisesti.

Esitestissä kalibraatioiden välillä ei havaittu merkittäväksi arvioitua eroa, vaan laitteiden väliset erot sekä ajonsisäinen variaatio muodostivat suurimmat erot. Tulosten perusteella päätettiin pitoisuuden määrittämisessä käyttää kuutta analysointia, vaikka neljä analysointia olisi riittänyt tulosten luotettavuuteen. Lisäksi päätettiin käyttää kahta reagenssierästä erään -variaation huomioimiseksi (vrt. 4.2)

Pääasialliseksi hyväksyntäkriteeriksi asetettiin jälleen konsentraation kokonaiskeskiarvon ( $n=72 = 6$  analysointia  $\times$  2 reagenssierä  $\times$  2 ajokierrosta  $\times$  3 rinnakkaista) olemisen tuotespesifikaatio määritellyissä rajoissa rinnakkaisten määritysten lukumäärä huomioiden. Rinnakkaisten määrän vaikutus kriteeriin lasketaan kaavojen 1-3 avulla. Lisäksi yksittäisten rinnakkaissarjojen ( $n=3$ ) sisäinen CV otettiin kriteeriksi laskien se samoin kuin kokonaiskeskiarvon kriteeri. Rinnakkaissarjojen ajon sisäistä hajontaa käytettiin menetelmän sisäisenä laadunvalvontana; suuri CV viittaisi ongelmaan itse näytteessä, määrittämisessä tai laitteessa (vrt. 4.2). Lisäksi käytetty rinnakkaisten määrä tarjosi riittävän tilastollisen luotettavuuden menetelmän uusittavuusarviointiin (ks. ANOVA kappalees-

sa 5). Kuten sisääntulotestissäkin, statistinen ekvivalenttisuus päätettiin jättää harkinnanvaraiseksi, mutta vaadittaisiin perusteellinen tulostulostus, jotta menetelmää ei otettaisi käyttöön liian suurella vaihtelevuudella.

Tuotespesifikaatioissa oli määritelty neljä konsentraatioaluetta lopulliselle tuotteelle sekä niille vaatimukset. Näistä johdettiin kaavojen 1-3 avulla kriteerit ajon sisäiselle- ja kokonaishajonnalle (CV:lle). Määritellyt konsentraatioalueet sekä lasketut kriteerit esitetään taulukossa 5.

Taulukko 5. Konsentraatio- ja hajontarajat neljälle kontrollituotetasolle pitoisuuden määrittämisessä.

	Taso 1	Taso 2	Taso 3	Taso 4
Pitoisuus (ng/L)	30-60	100-250	1200-2000	3600-4235
Ajonsisäinen CV (n=3)	≤ 23,8 %	≤ 9,8 %	≤ 9,8 %	≤ 9,8 %
Kokonais CV (n=20)	≤ 18,3 %	≤ 9,2 %	≤ 9,2 %	≤ 9,2 %

Koska immunomääritysten luonteeseen kuuluu satunnaisesti esiintyvät poikkeavat tulokset (engl. *outlier*), arvioitiin niiden vaikutusta määrittämisluotattavuuteen. Arviossa todettiin määrittämisluotattavuuden tilastollisen voimakkuuden pysyvän riittävänä vaikka 72 rinnakkaisen joukosta poistettaisiin yksi tulos.

#### 4.4 Lopputesti

Ennen tuote-erän vapauttamista myyntiin on se testattava. Lopputestissä halutaan simuloida asiakasajoa mahdollisimman tarkasti, jotta voidaan todentaa tuotteen toimivan myös asiakkailta, kuten on tarkoitettu. Haittapuolena asiakasajosimulaatiossa on, että sen tarjoama statistinen luotettavuus on heikko, sillä asiakasajot suoritetaan ilman rinnakkaismäärittämiä. Taulukko 6 esittää lopputestin riskianalyysin. Erä jouduttaisiin hylkäämään, jos tuotteen pitoisuus on väärällä tasolla lopputestissä (ensimmäinen vikatilanne). Jos lopputesti an-

taisi hyväksyttävissä rajoissa olevan pitoisuuden, saattaisi kontrollituotteen toiminta silti olla virheellistä. Virheellinen kontrollituote ja siitä aiheutuvat virheellinen tulos mahdollistaisivat, että viallisella mittausjärjestelmällä tehtäisiin diagnostisia määryksiä. Tuotteen pitoisuuden määryksen jälkeen ei prosessissa enää tehdä muita pitoisuuteen vaikuttavia toimia kuin pakastaminen, jonka vaikutus on tutkittu ja validoitu tähän työhön kuulumattomassa prosessivalidoinnissa. Näin saatiin yleisyysarvoksi (O) riittävän pieni luku, joten lopputesti voitiin rakentaa hyvin yksinkertaiseksi.

Taulukko 6. Riskianalyysi lopputestille.

Toiminto	Mahdollinen vika-tilanne	Mahdollinen seuraus	Vakavuus (S)	Mahdollinen syy	Yleisyys (O)	Kontrollintitapa	Havaitseminen (D)	RPN
Lopputes- ti	1. Tuotteen pitoisuus ei rajoissa	Kontrollituotetta ei voi vapauttaa	4	Valmistusvirhe	1	Pitoisuuden määrittäminen + lopputesti	1	4
	2. Väärä pitoisuus tuotteessa	Toimimattoman laitteen tai määrittämyksen käyttö	5	Valmistusvirhe	1	Pitoisuuden määrittäminen	5	25
				Menetelmävirhe	1	Pitoisuuden määrittäminen	5	25

Lopputestiksi kehitettiin ajo yhdellä analysaattorilla, yhdellä reagenssierällä ja yhdellä rinnakkaisella (n=1). Reagenssierä pyrittiin valitsemaan niin, ettei se olisi kumpikaan aiemmassa pitoisuuden määrittämisessä käytetty. Lopputestille asetettiin kaksi kriteeriä: ensimmäiseksi määritetyn konsentraation täytyy olla taulukossa 3 määritellyllä tasokohtaisella konsentraatioalueella, jotta tuote ylipäättensä täyttäisi spesifikaationsa. Toiseksi yksittäisen tuloksen oli oltava tuoteeräkohtaisissa kontrollirajoissa, toisin sanoen määritetty konsentraatio saa poiketa pitoisuuden määrittämisessä saadusta target-arvosta enintään Taulukossa 7 esitetyn määrän.

Taulukko 7. Tasokohtaiset kontrollirajat prosentteina.

	Taso 1	Taso 2	Taso 3	Taso 4
Maksimipoikkeama	±33 %	±16 %	±16 %	±15 %

Kontrollirajoista lasketaan jokaiselle kontrollituote-erälle sitä vastaavat pituusrajat target-arvoa käyttäen.

## 5 VALIDOINTITULOKSET

Testeistä kerättyjä tuloksia analysoitiin SAS/JMP tilasto-ohjelmalla. Kaikista tuloksista laskettiin keskiarvo ja CV (engl. *Coefficient of Variation*) pois lukien lopputesti, jossa ajettiin vain yksi rinnakkainen näyte.

Lisäarvoa tuottavaa uusittavuutta tarkasteltiin tilastollisesti varianssianalyysillä (engl. *Analysis Of Variance, ANOVA*) 95 % luottamustasoa käyttäen. ANOVA on menetelmä, jolla pystytään testaamaan eri tulosjoukkojen kuulumista samaan populaatioon kyseisten joukkojen varianssien avulla. ANOVA:a käytettiin t-testin sijaan, koska sillä pystyttiin testaamaan useita joukkoja samanaikaisesti ja saamaan yksi joukkojen yhteneväisyyttä kuvaava todennäköisyysluku, P-arvo.<sup>23,24</sup>

### 5.1 Sisääntulotesti

Sisääntulotesti toistettiin kolmesti käyttäen vaihtelevina kombinaatioina kahta reagenssierää neljällä laitteella (taulukko 8). Toistot tehtiin kaikille neljälle raaka-ainetasolle

Taulukko 8. Sisääntulotestissä käytetyt reagenssierät ja laitteet toistoittain.

	Toisto 1	Toisto 2	Toisto 3
Reagenssierät	08233	08235	08233
	08247	08341	08235
Laitteet	R67N10	R67N10	R68N5
	R74N4	R74N4	R70N5

Taulukko 9:n ja taulukko 10:n esittämät konsentraatiot ja kokonaishajonnat saatiin toistoista 1-3. Ajonsisäisiä hajontoja (n=5) ei esitetä, koska niillä haluttiin ainoastaan arvioida yksittäisten ajojen luotettavuutta. Sisääntulotestissä saadut

konsentraatiot olivat niille asetetuissa rajoissa ja niiden kokonaishajonta oli hyväksyttävä.

Taulukko 9. Sisääntulotestissä saadut konsentraatiot (n=20) rajoineen tasoittain eri toistoissa.

	Konsentraatio (ng/L)			
	Toisto 1	Toisto 2	Toisto 3	Rajat
Taso 1	48	45	49	30–60
Taso 2	169	169	164	100–250
Taso 3	1432	1434	1423	1200–2000
Taso 4	3721	3746	3731	3600–4235

Taulukko 10. Sisääntulotestissä saadut kokonaishajonnat (n=20) rajoineen tasoittain eri toistoissa.

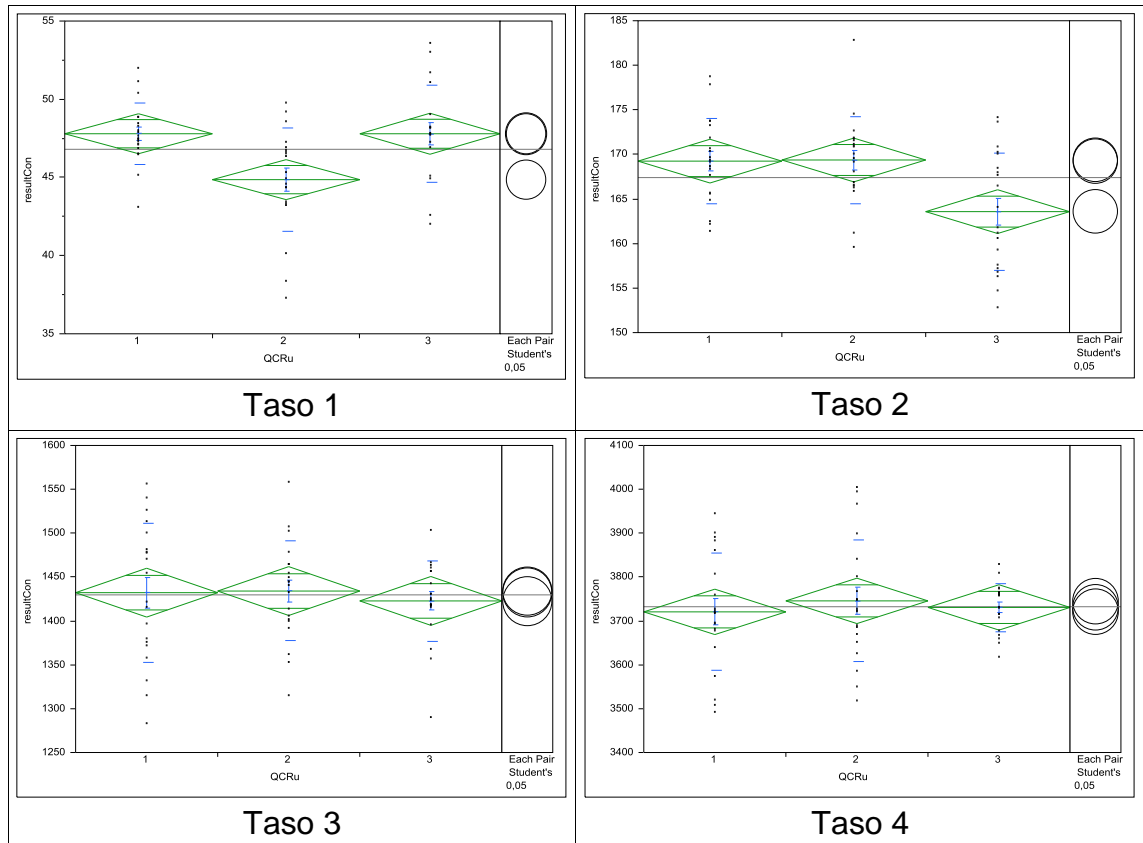
	Hajonta (%)			
	Toisto 1	Toisto 2	Toisto 3	Rajat
Taso 1	4,1	7,4	10,9	≤ 21,1
Taso 2	2,8	2,9	4,0	≤ 8,7
Taso 3	5,5	4,0	3,2	≤ 8,7
Taso 4	3,6	3,7	1,5	≤ 8,7

Menetelmän uusittavuutta arvioitiin käyttämällä ANOVA:a, jolla kaikkien vertailtavien ryhmien statistinen yhteneväisyys voitiin osoittaa yhdellä P-arvolla. P-arvon ollessa alle 0,05, ryhmiä ei pidetä yhteneväisinä. Saadut tulokset esitetään taulukossa 11 ja kuvassa 8. Kuvassa nelikulmioiden oleminen rinnakkain osoittaa ryhmien kuulumista samaan populaatioon. Käytetyllä tilasto-ohjelmalla oli mahdollista tehdä myös useita t-testejä ja yhdistää tulokset toistokerroista. Selkeyden vuoksi esitetään kuvassa myös t-testitulokset (renkaiden päällekkäisyys osoittaa kuulumisen samaan populaatioon).



Taulukko 11. Toistojen ANOVA-tulokset tasoittain sisääntulotestissä.

	Taso 1	Taso 2	Taso 3	Taso 4
P-arvo	0,0051 <sup>I</sup>	0,0015 <sup>I</sup>	0,8285	0,7893



Kuva 8. Sisääntulotestitoistokertojen rinnakkaispopulaatioiden yhteneväisyydet tasoittain.

Tasoilla 1 ja 2 havaittiin tilastollisesti merkittävä ero ( $P < 0,05$ ); yksi kolmesta toistosta poikkesi merkittävästi muista. Ero viittasi heikkoon uusittavuuteen. Havaittua eroa ei kuitenkaan pidetty prosessin kannalta merkittävänä, sillä jos raaka-aineen konsentraatio on määritellyissä rajoissa, voidaan siitä valmistaa tuote, jonka pitoisuus määritetään uudelleen myöhemmin tarkemmalla menetelmällä.

<sup>I</sup> Alle 0,05:n arvot osoittavat eroja sarjojen välillä

## 5.2 Pitoisuuden määrittäminen

Pitoisuuden määrittämistä varten valmistettiin koetuotantoerät neljälle pitoisuudelle. Valmistetuilla erillä toistettiin pitoisuuden määrittäminen kolmesti käyttäen vaihtelevina kombinaatioina kahta reagenssierää ja kuutta laitetta (taulukko 12). Näytteet ajettiin kahdesti samalla kalibraatiolla riittävän rinnakkais määrän saamiseksi ( $n=6$  analysointia  $\times$  2 reagenssierää  $\times$  2 ajokierrosta  $\times$  3 rinnakkaista = 72).

Kolmatta toistoa varten päätettiin vielä vaihtaa määrittäjää, jotta menetelmän uusittavuutta voitaisiin arvioida, koska laitteita ei ollut käytettävissä eri kombinaatioiden saamiseksi. Koska määrittäjiä ei ole mahdollista validoida, eikä kyseistä variaatiokomponenttia ollut sisällytetty alkuperäiseen suunnitelmaan, sille ei myöskään ollut hyväksyntäkriteeriä. Määrittäjän vaikutus menetelmään oli otettava huomioon, jotta menetelmästä saataisiin riittävän toimintavarma. Uusittavuutta arvioitiin käyttämällä ANOVA:a.

Taulukko 12. Määrittämisessä käytetyt reagenssierät, laitteet ja määrittäjät toistottain.

	Toisto 1	Toisto 2	Toisto 3
Reagenssierät	08233	08233	08235
	08235	08341	08341
Laitteet	R19N3	R19N3	R19N3
	R20N4	R20N4	R20N4
	R21N2	R21N2	R21N2
	R67N10	R67N10	R67N10
	R68N5	R68N5	R68N5
	R74N4	R74N4	R74N4
Määrittäjä	A	A	B

Taulukoissa 13 ja 14 esitetään saadut konsentraatiot ja vastaavat hajonnat. Kaikki konsentraatiot ja toistettavuudet olivat asetetuissa rajoissa. Ajonsisäisiä toistettavuuksia ( $n=3$ ) ei esitetä, sillä niitä käytettiin vain ajonsisäiseen laadunvalvontaan. Sekä pitoisuudet että toistettavuudet olivat niille asetetuissa rajoissa.

Taulukko 13. Määritetyt pitoisuudet (n=72) rajoineen tasoittain eri toistoissa.

	Konsentraatio (ng/L)			
	Toisto 1	Toisto 2	Toisto 3	Rajat
Taso 1	48	46	45	30-60
Taso 2	170	169	166	100-250
Taso 3	1464	1453	1444	1200-2000
Taso 4	3810	3796	3793	3600-4235

Taulukko 14. Pitoisuudet määrittämisen kokonaishajonnat (n=72) rajoineen tasoittain eri toistoissa.

	Hajonta (%)			
	Toisto 1	Toisto 2	Toisto 3	Rajat
Taso 1	4,1	7,4	10,9	≤ 18,3
Taso 2	2,8	2,9	4,0	≤ 9,2
Taso 3	5,5	4,0	3,2	≤ 9,2
Taso 4	3,6	3,7	1,5	≤ 9,2

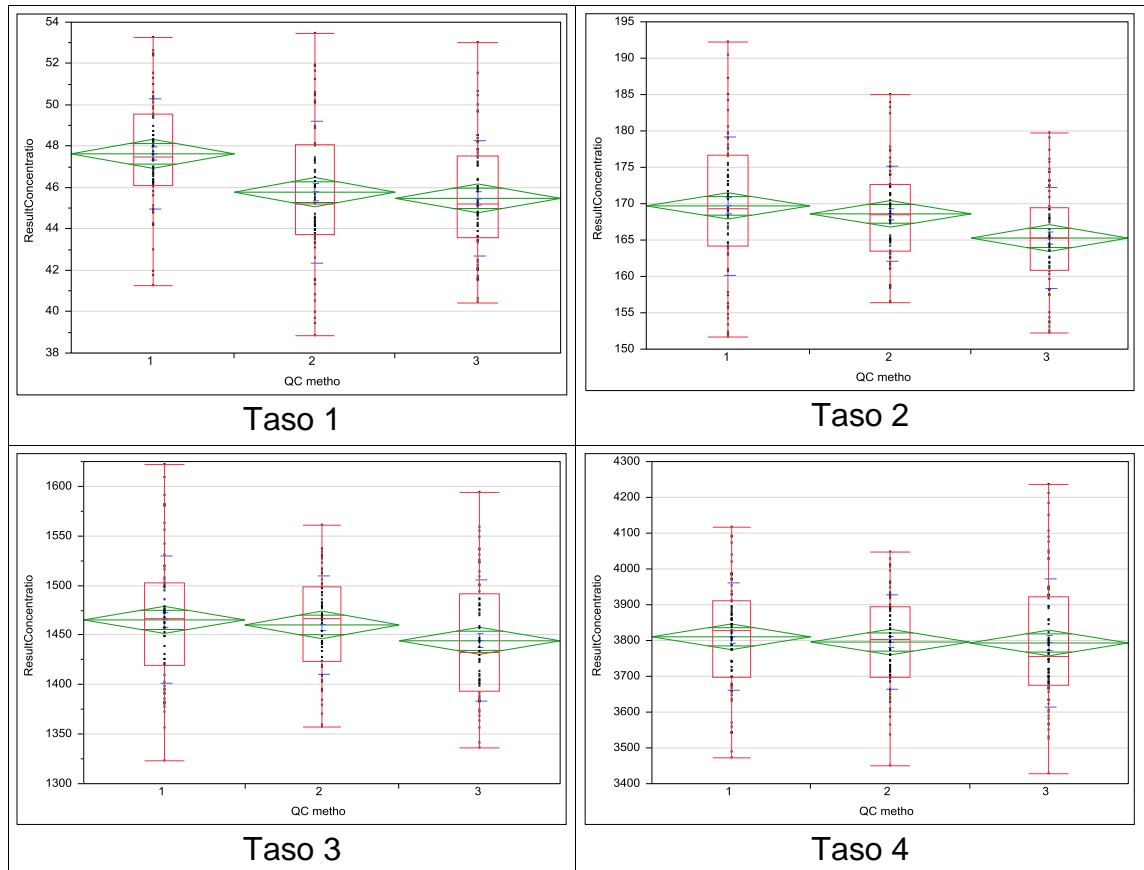
Pitoisuuden määrittämisestä tehtiin ANOVA-analyysi (taulukko 15). Määritetyt rinnakkaissarjat esitetään myös kuvassa 9, jossa nelikulmioiden olemisen rinnakkain osoittavat ryhmien kuulumista samaan populaatioon. Laatikko-palkki – kuvaajat osoittavat yksittäisten tulosten kuulumisen populaatioon. On kuitenkin huomattava, että populaatioon kuulumattomat tulokset poistettiin joukosta ennen ANOVA-testin tekemistä. Poisto tehtiin, jos yksittäinen

- tulos  $> \frac{3}{4}$  osakvartiili + 1,5 \* kvartiilinsisäinen väli tai jos
- tulos  $< \frac{1}{4}$  osakvartiili - 1,5 \* kvartiilinsisäinen väli.

Tasoittain poistettuja tuloksia oli 6 tasolla 1, 4 tasolla 2 ja 3 tasolla 3. Tasosta 4 ei poistettu tuloksia.

Taulukko 15. Pitoisuuden määrittämisen ANOVA:n tulokset tasoittain.

	Taso 1	Taso 2	Taso 3	Taso 4
P-arvo	0,0001 <sup>II</sup>	0,2256	0,1238	0,7711



Kuva 9. Rinnakkaispopulaatioiden yhteneväisyydet tasoittain pitoisuuden määrittämisessä.

Uusittavuuden puutteen vuoksi tasolla 1 ( $P=0,0001$ ) tehtiin lisäarviointi. Tason suurimmaksi eroksi keskikonsentraatioiden välillä laskettiin (taulukko 16) 5,5 % toistojen 1 ja 3 välillä. Koska kokonaishajonta oli samaa kokoluokkaa havaitun eron kanssa, päätettiin ANOVA:n olevan liian kriittinen menetelmä. Päätöstä tuki havainto kolmen muun samalla menetelmällä määritetyn tason pitoisuuksien olevan tilastisesti samoja, joten voitiin olettaa tason 1 eron johtuvan muista

<sup>II</sup> Alle 0,05:n arvot osoittavat eroja sarjojen välillä

syistä kuin menetelmästä itsestään, ilmeisesti mittausjärjestelmän kokonaishajonnasta.

Taulukko 16: Toistojen väliset erot prosentteina.

	Toistot 1 vs. 2	Toistot 2 vs. 3	Toistot 3 vs. 1
Taso 1	3,3 %	2,2 %	-5,3 %
Taso 2	0,6 %	1,5 %	-2,1 %
Taso 3	0,8 %	0,6 %	-1,4 %
Taso 4	0,4 %	0,1 %	-0,5 %

Uusittavuus ei ole pitoisuuden määrittämisessä täysin välttämätöntä, sillä määritettyä pitoisuutta käytetään yhdessä kontrollirajojen kanssa testaamaan järjestelmän toimivuutta. Kontrollirajoihin on sisällytetty järjestelmän vaihtelu, joka käytännössä poistaa vaateen uusittavuudelle, mikä vahvistettiin lopputestin hyväksytyillä tuloksilla (5.3).

### 5.3 Lopputesti

Asiakasajoa simuloiva lopputesti ajettiin yhdellä laitteella ja yhdellä reagenssierällä. Lisäksi vaihdettiin toistojen välillä määrittäjää (taulukko 17). Laitteita ei suunnitelmasta poiketen voitu valita toistokerroittain niin, että ne olisivat olleet eri kuin pitoisuuden määrittämiseen käytetyt.

Taulukko 17. Lopputestissä käytetyt reagenssierät ja laitteet sekä määrittäjät toistoittain.

	Toisto 1	Toisto 2	Toisto 3
Reagenssierät	08241	08235	08233
Laitteet	R74N4	R67N10	R74N4
Määrittäjä	A	B	A

Lopputestin rajat eli kontrollirajat oli määritelty prosentteina (taulukko 7). Kontrollirajat määrittivät suurimman sallitun poikkeaman kyseiselle toistokerralle saadusta pitoisuudesta (target-arvosta). Lopputestiä varten laskettiin toistoille kontrollirajat konsentraatioina määritetyistä pitoisuuksista (taulukko 13). Taulukossa 18 on esitetty lopputestistä saadut konsentraatiot ja niitä vastaavat taso- ja toistokohtaiset rajat. Kaikki tulokset olivat rajoissa.

Taulukko 18. Lopputestin pitoisuudet (n=1) rajoinen tasoittain eri toistoissa.

		Toisto 1	Toisto 2	Toisto 3
Taso 1 (ng/L)	Pitoisuus	47	46	49
	Rajat	32-64	31-62	30-60
Taso 2 (ng/L)	Pitoisuus	168	158	170
	Rajat	143-197	142-196	140-193
Taso 3 (ng/L)	Pitoisuus	1448	1394	1454
	Rajat	1231-1700	1220-1685	1213-1675
Taso 4 (ng/L)	Pitoisuus	3677	3571	3843
	Rajat	3239-4382	3226-4365	3224-4362

#### 5.4 Tulosten arviointi

Kaikki validointikriteerit täyttyivät, mutta uusittavuusarviointit osoittivat puutteita uusittavuudessa. ANOVA:sta saadut P-arvot osoittivat, etteivät kaikki tulosjoukot kuuluneet samaan populaatioon. Kuitenkin tarkasteltaessa joukkoja visuaalisesti havaittiin, että kaksi joukkoa oli tilastisesti ekvivalentteja.

Pitoisuuden määrittämisessä jouduttiin uusittavuusanalyysiä varten poistamaan huomattava määrä yksittäisiä tuloksia (8 % tuloksista tasolla 1, 6 % tasolla 2 ja 4 % tasolla 3; vrt. 5.2). Kun poistettujen tulosten määrä oli suurin alimmalla konsentraatiotasolla (taso 1), jossa myös uusittavuusongelmat ilmenivät, voitiinkin epäillä järjestelmän suorituskyvyn riittävyttä ko. konsentraatioalueella.

Syytä uusittavuuden puutteeseen ei tutkittu, mutta yhden käytetyn reagenssierän poikkeava suorituskyky olisi saattanut olla havaintojen syy. Poikkeavan erän raakasignaalin tasoero tai kalibraatiokäyrän poikkeava muoto, jonka avulla

raakasignaaleista lasketaan konsentraatiot, voisi aiheuttaa jonkin verran poikkeamaa saaduissa konsentraatioissa niin, että vaikei ero olisikaan määritysmenetelmän käyttötarkoituksen kannalta merkittävä ts. kliinisesti, se voisi tulla esiin statistisessa tarkistelussa.

## 6 PÄÄTELMÄT

Työssä validoitiin kolme kontrollituotteen valmistusprosessin osana toimivaa laadunvalvontamenetelmää. Validoinnissa menetelmät toistettiin kolmesti. Jokaisen toiston tulosten piti olla asetetuissa rajoissa. Kaikki asetetut kriteerit täyttyivät tehdyissä validoinnissa: sisääntulotestissä, pitoisuuden määrittämisessä ja lopputestissä. Näin ollen voitiin olla myös varmoja että tuote, jonka valmistusta validoiduilla menetelmillä valvottiin, täyttää spesifikaationsa, ja on siten käyttötarkoituksensa mukainen.

Varsinaisten hyväksyntäkriteerien lisäksi jokaista menetelmää arvioitiin toistettavuuden suhteen. Tämän mahdollisti jokaisessa kolmessa toistoissa käytetyt samat näytteet, sekä se että käytetty järjestelmä ja määrittäminen olivat itsenäisesti validoituja. Näin toistokertojen statistisissa uusittavuusvertailuissa havaittujen erojen olisi pitänyt olla vain kehitystyistä laadunvalvontamenetelmistä riippuvia. Vaikka uusittavuutta ei sisällytettykään validointeihin pakollisena kriteerinä, haluttiin statistinen tarkastelu sisällyttää tulosten tarkasteluun sen antaman lisäinformaation vuoksi. Menetelmät todettiin uusittaviksi korkeammilla konsentraatioilla (tasot 3 ja 4), mutta uusittavuuden havaittiin heikkenevän konsentraation ollessa alhainen (tasot 1 ja 2).

Vaikka sekä sisääntulotestissä että pitoisuuden määrittämisessä havaittiin ongelmia uusittavuudessa, eivät ne aiheuttaneet laadunvalvontamenetelmien kehittämistarvetta ja uusintavalidointia. Näin voitiin menetellä, sillä sekä tuote että sen valmistukseen käytetty prosessi oli suunniteltu riittävän vakaaksi kestämään jonkin verran vaihtelua rutiininomaisessa tuotantoprosessissa. Kehitetyt laadunvalvontamenetelmät oli siis kehitetty vaihtelu huomioiden.



## 7 VALIDOIDUN MENETELMÄN ARVIOINTI

Arvioitaessa menetelmän vahvuuksia todettiin että mittausjärjestelmä tunnettiin riittävän hyvin ja menetelmien kehityksen taustatyö oli ollut riittävä. Asetettujen validointivaatimusten täytyminen salli menetelmien käyttöönoton tuotannossa, sillä pääasialliset hyväksyntäkriteerit täyttyivät validoinnin kaikissa osissa. Myös menetelmien ohjeistus (vrt. 4.1) oli riittävä, sillä menetelmät saatiin validoitua ilman poikkeamia.

Uusittavuuden puute on menetelmän heikkous. Se oli kuitenkin tiedostettu jo validointisuunnitelmaa suunnitellessa, eikä uusittavuutta sen johdosta ollut asetettu kriteeriksi. Uusittavuusanalyysi haluttiin kuitenkin toteuttaa, sillä merkittävät ongelmat olisivat saattaneet olla osoitus koko mittausjärjestelmän ongelmista. Tällaiset näkökohdat olivat rajattu tämän laadunvalvontamenetelmäkehityksen ulkopuolelle. Ne olisivat kuitenkin saattaneet vaatia kyseisten mittausjärjestelmän osien – joko määritysmenetelmän, tai sekä menetelmän että laitteen – palauttamista kehitysvaiheeseen.

Osa uusittavuusarvioinneista läpäisi kriteerinsä, joka nähtiin osoituksena siitä, ettei kyseessä ollut systemaattinen ongelma menetelmissä. On mahdollista, että rinnakkaismääritysten lisääminen olisi parantanut uusittavuuden tuloksia; arviointiin käytetty ANOVA-menetelmä on vahvasti riippuvainen tulosjoukkojen sisäisestä hajonnasta ja rinnakkaismääritysten määrän lisääntyessä hajonta pienenee. Myös suurempi reagenssierien määrä kehitetyissä menetelmissä olisi antanut lisävarmuutta uusittavuudesta. Normaalia useampien erien käyttö validoinneissa, ts. eri toistokerroilla eri erät, olisi myös tuonut lisävarmuutta menetelmiin, vaikka rutiinikäytössä olisikin käytetty vain menetelmien vaatimia kahta. Rutiinituotannossa useamman kuin kahden reagenssierän käyttäminen olisi hankalaa laadunvalvontamenetelmissä, sillä yleensä saatavilla on vain 2-3 erää, ja lisäerien pitäminen saatavilla ei välttämättä tuottaisi riittävää tuotannollista hyötyä reagenssierien varaamisen ja varastoimisen maksaessa ja käytetyn kahden erän tuottaessa kuitenkin riittävän varmoja tuloksia.

## LÄHTEET

- 1 SFS ISO 9001:2008 (fi) Laadunhallintajärjestelmät — Vaatimukset.
- 2 SFS-EN ISO 13485:2003 (fi) Terveystuotteen laitteet ja tarvikkeet. Laadunhallintajärjestelmät. Vaatimukset viranomaismääräyksiä varten.
- 3 Neuvoston direktiivi 93/42/ETY, annettu 14 päivänä kesäkuuta 1993, lääkinnällisistä laitteista
- 4 Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 98/79/EY, annettu 27 päivänä lokakuuta 1998, in vitro-diagnostiikkaan tarkoitetuista lääkinnällisistä laitteista
- 5 Code of Federal Regulations (annual edition), Title 21 - Food and Drugs, Subchapter H - MEDICAL DEVICES, (Parts 800 - 898), Part 820 - QUALITY SYSTEM REGULATION, April 1, 2005
- 6 Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities, Pure Appl. Chem., 1995, Vol. 67, No. 10, pp. 1699-1723
- 7 Kemian metrologian opas, MIKES Julkaisu J6/2005, Kemian ja mikrobiologian jaosto, Kemian työryhmä, Toimittanut Tapio Ehder, Helsinki 2005
- 8 EP6-A Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline (2003)
- 9 EP17-A Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline (2004)
- 10 EP9-A2 Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline—Second Edition (2002)
- 11 EP5-A2 Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline—Second Edition (2004)
- 12 ICH harmonised tripartite guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), November 2005
- 13 SFS-EN ISO 14971 Terveystuotteen laitteet ja tarvikkeet. Riskinhallinnan soveltaminen terveystuotteen laitteisiin ja tarvikkeisiin
- 14 Nancy R. Tague, The Quality Toolbox, 2nd ed., ASQ Quality Press, 2004, pages 236–240, ISBN-13: 978-0873896399
- 15 ISO 2859-1:1999 (en) Sampling procedures for inspection by attributes -- Part 1: Sampling schemes indexed by acceptance quality limit (AQL) for lot-by-lot inspection
- 16 ISO 2859-10:2006 (en) Sampling procedures for inspection by attributes -- Part 10: Introduction to the ISO 2859 series of standards for sampling for inspection by attributes
- 17 Radiometer ApS:n sisäinen materiaali, henk. koht. pyyntö Brady Andersonilta
- 18 Innorac Diagnostics, koulutusmateriaali, Yleistä: fluoresenssimittaus
- 19 Carl A. Burtis; Edward R. Ashwood; David E. Bruns, 2012, Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 5th ed., s. 1501-1504, Philadelphia, Saunders/Elsevier, ISBN : 978-1-4160-6164-9

20 Innotrac Diagnostics, sisäinen dokumentti: SOP-0149 rev 1 SOP: Acceptance Criteria for Precision and Stability Studies

21 Innotrac Diagnostics, sisäinen dokumentti: DC-052951 rev 1 AQT90 FLEX BNP-CHECK and RANGE-CHECK BNP QC Method verification plan

22 Innotrac Diagnostics, sisäinen dokumentti: DC-053162 rev 2 AQT90 FLEX BNP-CHECK & RANGE-CHECK BNP QC method verification report

23 Biometria, Tilastotiedettä ekologeille, kuudes painos, s. 240-242, E. Ranta, H. Rita, J. Kouki, Yliopistopaino, Helsinki 1997, ISBN 951-570-085-X

24 Johdatus tilastotieteeseen, Kuvailu, mallit ja päättely, M. Gröönroos, s. 187-190, Tammerpaino Oy, Tampere 2003, ISBN 951-792-148-9