

Lejla Lasić, Naris Pojskić, Naida Lojo-Kadrić
Jasna Hanjalić Kurtović, Lejla Ušanović



EKSPERIMENTALNE LABORATORIJSKE TEHNOLOGIJE



Lejla Lasić, Naris Pojskić, Naida Lojo-Kadrić,
Jasna Hanjalić Kurtović, Lejla Ušanović

EKSPERIMENTALNE LABORATORIJSKE TEHNOLOGIJE

Univerzitet u Sarajevu – Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju

Sarajevo, 2024.

Autori

Svi autori su uposlenici Instituta za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju Univerziteta u Sarajevu:

Dr. sc. Lejla Lasić, viša naučna saradnica

Dr. sc. Naris Pojskić, naučni savjetnik

Dr. sc. Naida Lojo-Kadrić, viša naučna saradnica

Dr. sc. Jasna Hanjalić Kurtović, naučna saradnica

Mr. Lejla Ušanović, viša stručna saradnica

Izdavač

Univerzitet u Sarajevu – Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju, Zmaja od Bosne 8, 71000 Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Za izdavača

Dr. sc. Adaleta Durmić-Pašić, naučna savjetnica, direktorica

Recenzenti

Akademik prof. dr. emeritus Rifat Hadžiselimović

Prof. dr. Adisa Ahmić

Lektorica i korektorica

Dr. sc. Zenaida Karavdić, viša stručna saradnica Instituta za jezik Univerziteta u Sarajevu

Tehnički urednik i dizajn naslovnice

Dr. sc. Jasna Hanjalić Kurtović

Izdanje

Elektronsko prvo izdanje 2024. godine

CIP - Katalogizacija u publikaciji

Nacionalna i univerzitetska biblioteka Bosne i Hercegovine, Sarajevo

577.2.082:001.891.5

Eksperimentalne laboratorijske tehnologije [Elektronski izvor] / Lejla Lasić ... [et al.] – e-knjiga. – Sarajevo : Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju, 2024
Link:

https://drive.google.com/file/d/1bEho6qzQ8zY_xsQiXsyX9uy0lc3IT9og/view?usp=sharing – Nasl. sa nasl. ekrana. – Opis izvora dana: 17. 5. 2024. – Bibliografija: str. 149-153.

ISBN 978-9958-083-14-3

COBISS.BH-ID 60030726

SADRŽAJ

1. OSNOVI NAUČNE SPOZNAJE.....	4
2. KREIRANJE TEMELJA ZA USPJEŠNO POKRETANJE LABORATORIJE ZA MOLEKULARNU BIOLOGIJU: KLJUČNE SMJERNICE I PRAKTIČNI SAVJETI.....	8
3. POSTUPAK AKREDITACIJE LABORATORIJE.....	20
4. VALIDACIJA I VERIFIKACIJA MOLEKULARNIH METODA...	41
5. HISTORIJAT LABORATORIJSKO-TEHNOLOŠKIH EKSPERIMENATA I ANALIZA.....	58
6. EKSPERIMENT I TIPOVI EKSPERIMENTA.....	66
7. DIZAJN EKSPERIMENTA (DoE).....	71
8. LABORATORIJSKI PROTOKOL.....	84
9. OPTIMIZACIJA U LABORATORIJSKOM EKSPERIMENTU....	100
10. STANDARDNA OPERATIVNA PROCEDURA – SOP.....	103
11. LABORATORIJSKA KNJIGA, DNEVNIK I SVESKA.....	120
12. PRINCIPI RADA S BIOHAZARDNIM MATERIJALOM U MOLEKULARNOBIOLOŠKOJ LABORATORIJI.....	124
13. KLINIČKE STUDIJE.....	133
14. BIOETIČKI ASPEKTI MOLEKULARNOBIOLOŠKIH PROCEDURA S OSNOVNIM PROCEDURAMA GENETIČKOG SAVJETOVANJA.....	140
LITERATURA.....	149
INDEX POJMOVA.....	154

Popis skraćenica

BATA	Institut za akreditaciju BiH
BSL	Biosafety level
CLIA	Clinical Laboratory Improvement Amendments
CNV	Submikroskopske varijacije broja kopija
CTIS	Clinical Trials Information System
dATP	dezoksiribonukleozid adenin trifosfat
dCTP	dezoksiribonukleozid citozin trifosfat
dGTP	dezoksiribonukleozid guanin trifosfat
dTTP	dezoksiribonukleozid timin trifosfat
ddNTP	didezoksiribonukleozid trifosfat
DEPC	Dietilpirokarbonat
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
DI	Deionizirana voda
DLP	Dobra laboratorijska praksa
DoE	Design of Experiments
DTC	Direct to consumer testovi
ELN	Electronic laboratory notebook
ELSI	Ethical, legal and social implications
EMA	European Medicines Agency
EPA	Environmental protection agency
FDA	Food and drug administration agency
GCP	Good clinical practice
gDNK	Ukupna genomska DNK
GLP	Good laboratory practice
HEPA	High-efficiency particulate air
ILAC	Međunarodna organizacija za saradnju u području akreditiranja laboratorija
ISO	International organization for standardization
LOD	Granica detekcije
NIPS	Neinvazivni prenatalni probir
NIPT	Non invasive prenatal testing
ML	Machine learning
PCR	Lančana reakcija polimeraze
RNK	Ribonukleinska kiselina
RNaza	Ribonukleaza
rcf	Relative centrifugal force
rpm	Rotations per minute
RT-PCR	Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu
SOP	Standardna operativna procedura
ULPA	Ultra-Low penetration air
UV	Ultraljubičasto svjetlo

1. OSNOVI NAUČNE SPOZNAJE

Postoji veliki broj definicija nauke, ali prema svim, to je “sređeno, sistematizirano i provjereno znanje o nečemu, postignuto metodičnim, pažljivim i savjesnim istraživanjem i razmatranjem” čiji je cilj proširiti i produbiti poznavanje prirode i društva, mijenjati uvjete rada i života. Nije svako mišljenje naučno mišljenje. Naučno mišljenje je specifičan način razmišljanja, a mora biti istinoidno, jer je rezultat naučnih analiza. Naučno mišljenje je složena aktivnost koja mora biti zasnovana na principima logike. To znači da se mora temeljiti na naučnoj teoriji i uključivati postupke empirijske verifikacije. Da bi neka misao bila naučno valjana i uvrštena u nauku kao spoznajni sistem, ona mora da bude objektivna (da odgovara činjenicama), logična (proizvod logičkih zakona mišljenja), sistematična (svaki podatak mora dobiti svoje značenje), provjerljiva (drugi istraživači mogu provjeriti rezultate), mjerljiva (jasno definirane općeprihvatljive mjerne jedinice), precizna (tačno određivanje općeprihvaćenih pojmova) i skladna (u skladu s drugim pojavama).

Iz svega ovoga može se zaključiti da je naučno istraživanje skup svjesnih, sistemskih i metodološki organiziranih aktivnosti (disciplinarnih i/ili interdisciplinarnih) koje omogućuju otkrivanje i dokazivanje naučnih istina o predmetima, odnosno pojavama u prirodi i društvu pomoću naučnih metoda. Naučna istraživanja mogu se klasificirati na fundamentalna (temeljna), aplikativna (primijenjena) i stručna (razvojna) istraživanja.

Temeljna (fundamentalna) istraživanja su bazična (osnovna), povećavaju opće znanje, determiniraju nova područja spoznaja te, što je posebno značajno, služe kao osnova primijenjenim i razvojnim (stručnim) istraživanjima. Traže velika finansijska ulaganja te ih primarno provode velike i bogate države, institucije i multinacionalne kompanije.

Primijenjena (aplikativna) istraživanja podrazumijevaju teorijski ili eksperimentalni rad koji se poduzima radi sticanja novih znanja. Prvenstveno je usmjeren na rješavanje nekog praktičnog zadatka i poduzima se radi ispitivanja moguće primjene rezultata temeljnih

istraživanja ili utvrđivanja novih metoda ili postupaka za postizanje određenog cilja. Time se proširuju i produbljuju postojeća znanja.

Stručna (razvojna) istraživanja nazivaju se još “tehnološka usavršavanja” i bitna su za početak proizvodnje novih materijala, proizvoda. Imaju praktični cilj i usmjerena su na uvođenje novih ili znatno poboljšavanje postojećih postupaka, proizvoda i usluga.

Sistem naučnog saznanja o prirodi, čovjeku i društvu zasniva se na sljedeća četiri osnovna konstitutivna metodološka principa:

- (1) objektivnost;
- (2) pouzdanost;
- (3) općenitost i
- (4) sistematičnost.

Objektivnost podrazumijeva da naučno saznanje mora biti lišeno ličnih stavova, emocija, predrasuda, prethodnih životnih iskustava, pojedinačnih i grupnih interesa. Pouzdanost podrazumijeva da naučno saznanje mora imati odgovarajuće empirijske provjerljive dokaze, ali bez nekritičke privrženosti činjenicama. Općenitost podrazumijeva da je nauka usmjerena na otkrivanje općih veza i odnosa među pojavama, procesima i predmetima u objektivnoj stvarnosti. Da bi to postigla, nauka se služi apstrakcijom, analizom i sintezom. Nauka kompleksne pojave raščlanjuje na prostije elemente, spoznavši svaki element odvojeno i analizom zajedničkih imenitelja. Zatim ih takve spaja u konstantne, opće i nužne odnose među pojavama, procesima i odnosima. Sistematičnost se izražava u koherentnosti i konzistentnosti unutrašnjeg predmetnog, sadržajnog, logičkog i metodološkog poretka konstitutivnih dijelova nauke, naučnih teorija, naučnih zakona, naučnoteorijskih pojmova i slično. Nauka ne može biti haotična, već mora imati sistem koji mora biti zadovoljen da bi istraživanje imalo prefiks “naučno”.

U naučnim istraživanjima uvijek je nezaobilazni segment hipoteza. To je naučna pretpostavka koja objašnjava neku pojavu koju svojim istraživanjem trebamo provjeriti (dokazati ili opovrgnuti). Postoji pet pretpostavki valjane hipoteze: relevantnost s obzirom na problem

istraživanja, provjerljivost, kompatibilnost s prethodno provjerenim i prihvaćenim hipotezama, usmjerenost k objašnjavanju što više pojava i jednostavnost.

Nauku čine dva konstitutivna elementa, a to su predmet istraživanja i metod istraživanja. Oni su nerazdvojno povezani. Predmet istraživanja jeste objektivna stvarnost, tj. cjelokupnost pojava, procesa i odnosa koji čine tu stvarnost. To bi u principu značilo da objekt istraživanja podrazumijeva određenu pojavu od interesa. Metoda je specifična tehnika prikupljanja i obrade podataka. Riječ metodologija naučnog istraživanja potječe od grčkih riječi *methodos* i *logos* što znači “riječ, govor, nauka o metodama naučnog istraživanja”. Metoda potječe od grčke riječi *methodos* što znači “put, način istraživanja”. Metoda istraživanja može se definirati kao skup različitih postupaka kojima se nauka koristi u naučnoistraživačkom radu da bi istražila i izložila rezultate naučnog istraživanja u određenom naučnom području ili naučnoj disciplini. Metode moraju biti jasno definirane, sistematične i bazirane na naučnim dostignućima.

Možemo razlikovati metode analize i sinteze. Metoda analize podrazumijeva raščlanjivanje složenih sistema na njihove jednostavnije sastavne dijelove i elemente i izučavanje svakog elementa za sebe i u odnosu na druge elemente, odnosno cjelinu. Metoda sinteze predstavlja spajanje, sastavljanje jednostavnih elemenata u složene i složenih u još složenije, povezujući izdvojene elemente, pojave, procese i odnose u jedinstvenu cjelinu u kojoj su njezini dijelovi uzajamno povezani.

U literaturi se može jasno uočiti klasifikacija naučnih metoda, pri čemu razlikujemo osnovne (analiza, sinteza, apstrahovanje, konkretizacija, specijalizacija, generalizacija, dedukcija, indukcija, analogija, odnosno komparacija), općenaučne metode (statistička metoda modeliranja, aksiomatska, analitičko-deduktivna, hipotetičko-deduktivna i historijsko-komparativna), specifične metode pojedinih grupa nauka, metode prikupljanja podataka (metode ispitivanja, metode posmatranja, metode eksperimenta, metoda analize dokumenata i metoda studije slučaja) i metode obrade podataka.

U sklopu ovoga, posebno možemo izdvojiti induktivnu i deduktivnu metodu zaključivanja. Induktivno zaključivanje podrazumijeva zaključivanje na osnovu brojnih opservacija i razvija se od pojedinačnog k općem (*down-top*). Drugim riječima, ovakvo zaključivanje počinje opservacijama, a završava formulacijom uopćenog iskaza koji se odnosi na spomenute opservacije. Deduktivno zaključivanje obuhvata izvlačenje specifičnih (pojedinačnih) zaključaka iz jedne veće, polazne pretpostavke. Za razliku od induktivnog, deduktivni zaključak se razvija od općeg ka pojedinačnom (*top-down*), od opće ideje ka specifičnom iskazu.

2. KREIRANJE TEMELJA ZA USPJEŠNO POKRETANJE LABORATORIJE ZA MOLEKULARNU BIOLOGIJU: KLJUČNE SMJERNICE I PRAKTIČNI SAVJETI

Efekte bolesti na ljudsko tijelo prvi su dokumentirali drevni Egipćani; međutim, koncept organskih oboljenja počeo se razvijati tek u posljednjim stoljećima, a promjene na nivou tkiva i ćelija privukle su pažnju nakon izuma mikroskopa. Era molekularne biologije započela je integracijom molekularnih testova u laboratorijsku praksu, posebno u dijagnozi solidnih tumora i hematoloških maligniteta, kao dio poboljšanja u molekularnim naukama koje su bile potaknute završetkom Projekta ljudskog genoma početkom 2000-ih. S obzirom na to da se molekularni testovi sve više kombinuju s konvencionalnim metodama, laboratorije se trebaju dizajnirati i voditi prema zahtjevima postupaka molekularnog testiranja.

Potrebni su adekvatan prostor, odgovarajuća oprema i kvalificirano osoblje za uspostavu laboratorije za molekularnu biologiju. Jedna od najvažnijih tačaka koje treba uzeti u obzir prilikom dizajniranja laboratorije za molekularnu biologiju jeste stvaranje plana za sprečavanje kontaminacije. Iako se specifičnosti zahtjeva mogu razlikovati zavisno od spektra testova koji će se izvoditi, postoji nekoliko osnovnih kriterija koje treba ispuniti u cilju standardizacije. U ovom će poglavlju biti predstavljene ključne smjernice potrebne za uspostavu laboratorije za molekularnu biologiju.

Potrebni fizički uslovi

Metode zasnovane na lančanoj reakciji polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) posebno su podložne kontaminaciji. Mogućnost dobijanja velikog broja kopija izuzetno malog uzorka ciljane sekvence upotrebom PCR metode pruža važnu dijagnostičku prednost, ali ova sposobnost također može dovesti do lažnih rezultata u slučaju kontaminacije. Lažno pozitivni rezultati mogu se javiti zbog kontaminacije između uzoraka, unakrsne kontaminacije različitih PCR reakcija pripremljenih istovremeno i kontaminacije reagenasa s dezoksiribonukleinskom (DNK) i ribonukleinskom (RNK) matricom.

U tehnikama zasnovanim na polimeraznoj lančanoj reakciji u stvarnom vremenu (*Real-time* PCR), završetak PCR-a podudara se sa završetkom analize, budući da se detekcija temelji na fluorescenciji. Važno je napomenuti da nakon završetka PCR-a, amplikoni (PCR proizvodi) ne zahtijevaju dodatnu obradu. Ovaj proces smanjuje potrebu otvaranja tubica ili zatvorenih ploča, čime se eliminiše rizik od kontaminacije. Laboratorije koje primjenjuju *Real-time* PCR metode imaju prednost jer ne moraju ponovo otvarati tubice ili ploče nakon završetka reakcije. To znači da nema potrebe za transportom amplikona, čime se značajno smanjuje potencijalna opasnost od unošenja kontaminacije u uzorke. Ovaj pristup ne samo da poboljšava brzinu analize već i povećava preciznost rezultata, čineći *Real-time* PCR metodu pouzdanim alatom u molekularnoj dijagnostici.

Glavne procedure koje se izvode u laboratoriji za molekularnu biologiju koristeći PCR metode su postupci prije PCR-a (priprema uzorka, priprema PCR-a) i postupci poslije PCR-a (izvođenje PCR-a i analiza poslije PCR-a). Ključno je izvoditi ove operacije u odvojenim prostorima označenim kao “čisti” i “prljavi”. “Čisti” prostor predstavlja područje gdje se obavljaju svi postupci prije PCR-a (kao što su ekstrakcija DNK/RNK, priprema PCR-a), a “prljavi” prostor predstavlja područje gdje se obrađuju svi proizvodi poslije PCR-a (amplikoni).

Osoblje i istraživači trebaju držati sve reagense, materijale i opremu korištenu u tim područjima u svakom trenutku odvojene i nikada ih ne prebacivati iz prljavog u čisti prostor. Kontaminacija se značajno smanjuje fizičkim razdvajanjem čistih i prljavih područja te izvođenjem aktivnosti prije PCR-a i poslije PCR-a u odvojenim prostorijama. Stoga je esencijalno planirati najmanje dvije odvojene prostorije prilikom dizajniranja laboratorije za molekularnu biologiju.

Preporučuje se da se koraci pripreme uzorka, kao što je ekstrakcija nukleinskih kiselina, izvode u laboratoriji prije PCR-a, a PCR i drugi postupci poslije PCR-a u laboratoriji poslije PCR-a. Idealno, četiri odvojene prostorije – za pripremu reagenasa, pripremu uzorka, PCR fazu i post-PCR faze – pružaju još bolju kontrolu nad radnim okruženjem. Svaka prostorija mora biti opremljena vlastitom

opremom, zaštitnom odjećom i potrošnim materijalom, s jasnim pravilima o nenamjernom prijenosu materijala između prostorija. Dizajn laboratorije može varirati zavisno od primijenjenih metoda, pa se, primjerice, laboratorija za *Real-time* PCR može optimalno organizirati s tri odvojene sobe, s obzirom na specifičnosti te metode.

Prostorija za pripremu reagenasa u laboratoriji za molekularnu biologiju predstavlja prostoriju u kojoj se pripremaju sve potrebne hemikalije. U ovom okruženju, reagensi se prvo pripremaju, zatim dijele na određeni broj manjih upotrebljivih alikvota, te na kraju koriste za pripremu reakcijskih smjesa. Ova soba mora biti potpuno čista od bilo kakvih bioloških materijala, uključujući ekstrakte DNK/RNK i PCR proizvode.

Prostorija za separaciju uzoraka je mjesto gdje se izvodi izolacija nukleinskih kiselina i dodavanje izolirane DNK/RNK reakcijskim smjesama PCR-a. Ova prostorija se naziva i *low copy* sobom, jer broj kopija DNK/RNK još nije amplificiran PCR-om. Idealno je izvoditi korake izolacije nukleinske kiseline i dodavanja izoliranih nukleinskih kiselina reakcijskim smjesama PCR-a u odvojenim prostorijama, ali ova dva koraka obično se izvode u istoj prostoriji, samo na različitim područjima / radnim mjestima, jer većina laboratorija nema dovoljno prostora. Priprema PCR reakcija u biološkom sigurnosnom kabinetu s laminarnim protokom zraka osigurava da prostor ostane čist.

Prostorija za amplifikaciju je mjesto gdje se nalaze PCR uređaji i gdje se izvode koraci amplifikacije, dok je *prostorija poslije PCR-a* mjesto gdje se izvodi analiza PCR proizvoda pomoću horizontalne gel elektroforeze, sekvenciranja, nested PCR-a itd. Ove dvije prostorije čine kontaminirane – prljave prostorije tako da se oprema ili materijali korišteni u njima ne bi trebali koristiti u drugim prostorijama. One se nazivaju i *high copy* sobama. U PCR aplikacijama poput *Real-time* PCR-a, gdje tubice s PCR proizvodima ne moraju biti otvorene, PCR uređaji mogu biti smješteni u sobi poslije PCR-a. Međutim, u laboratorijama koje koriste PCR aplikacije, poput nested PCR-a itd., gdje su potrebni višestruki koraci u PCR reakciji i tubice se moraju otvarati, PCR uređaji trebali bi biti smješteni u odvojenu prostoriju /

područje. U fazi amplifikacije, primarni i sekundarni koraci PCR-a (ako ih ima) trebali bi biti odvojeni prema fizičkom stanju laboratorije, idealno u odvojenim prostorijama. Ako to nije moguće, trebali bi se izvoditi na odvojenim radnim mjestima i na odvojenim PCR uređajima. Aplikacije sekvenciranja nove generacije također uključuju jedan ili više koraka amplifikacije PCR-om, što se također preporučuje izvoditi u odvojenim prostorijama / područjima.

Kada se radi o prostornim zahtjevima, preporučuje se da prostorija za pripremu reagenasa bude otprilike 33 m², dok bi prostorija za amplifikaciju trebala biti približno 22 m². Ovo su samo smjernice, a specifične preporuke mogu varirati zavisno od međunarodnih standarda i vrste eksperimenata koje laboratorije provode. Važno je pridržavati se ovih smjernica kako bi se osigurala učinkovita i sigurna primjena metoda molekularne biologije u laboratorijskom okruženju.

Radni tok (engl. *Workflow*)

Radni tok u laboratoriji za molekularnu biologiju mora biti organiziran tako da se kretanje odvija jednosmjerno, od “čistih” područja prema “prljavim područjima”. Kada osoblje ili istraživači prelaze iz prljavih prostorija u čiste prostorije, obavezno trebaju promijeniti laboratorijske mantile, rukavice i svu drugu vrstu zaštitne opreme, uz obavezno pranje ruku. Važno je spriječiti prijenos materijala iz prljave prostorije u čistu. Da bi se izbjegao prolazak osoblja iz prljave u čistu prostoriju, preporučljivo je imati više istraživača koji rade u svakoj prostoriji ili izvoditi postupke prije PCR-a i poslije PCR-a u različite dane.

Sve češće se koriste automatizirani sistemi za molekularnu biologiju koji omogućavaju jednosmjerni radni tok, uključujući izolaciju DNK iz uzorka, miješanje izolirane DNK s reagensima za amplifikaciju te izvođenje analize. Prostorije i radni tokovi za koje bi bilo idealno da budu prisutni u laboratoriji za molekularnu biologiju prikazani su na Slici 1. Ako je potrebno obavljati sve operacije u jednoj prostoriji, tada su neophodni odvojeni radni prostori za pripremu reagenasa, pripremu uzoraka, PCR fazu i post-PCR faze. Pravilo jednosmjernog radnog toka od čistih prema prljavim odjeljcima treba uvijek poštovati. Ukoliko je

moгуće, priprema uzorka trebala bi se izvoditi u biološkom sigurnosnom kabinetu s laminarnim protokom zraka, uključujući i ultraljubičasto (UV) svjetlo. Ako nema odvojenih prostorija, trebalo bi uspostaviti raspored u kojem će se koraci prije PCR-a i poslije PCR-a izvoditi u različitim dijelovima dana.



Slika 1. Jednosmjerni tok rada u laboratoriji za molekularnu biologiju

Ventilacija

Kruženje zraka između laboratorija predstavlja ključni izvor potencijalne kontaminacije u laboratorijama gdje se koriste tehnike detekcije vrlo malih količina DNK/RNK. Svaka laboratorija trebala bi imati zasebnu ventilaciju, a pritisak zraka treba se prilagoditi odvojeno. Pri pozitivnom pritisku, pritisak zraka unutar prostorije veći je od pritiska zraka izvan prostorije, čime se sprečava prijenos neželjenih tvari izvana. Negativni pritisak, s druge strane, omogućava ulazak zraka u prostoriju i sprečava migraciju zraka u okolne prostorije / laboratorije. Vrata trebaju ostati zatvorena kako bi se održao negativan pritisak. Pritisak u pre-PCR prostoriji trebao bi biti blago pozitivan kako bi se spriječio ulazak kontaminiranog zraka izvana, dok bi post-PCR prostorija trebala imati blago negativan pritisak kako bi zadržala zrak unutra. Ventilacijski sistemi laboratorije trebali bi biti odvojeni, koristeći različite zračne kanale, te se otvarati s različitih lokacija.

Ultraljubičasto (UV) svjetlo za potrebe dekontaminacije i sterilizacije

Ultraljubičasto zračenje obuhvata valne dužine u rasponu od 100 do 400 nm, pri čemu se za procese sterilizacije najčešće koristi UV-C zračenje (200–280 nm). Slično gama zračenju, UV zračenje posjeduje germicidna svojstva, što znači da je učinkovito u uništavanju bakterija. UV-C zračenje djeluje na oštećenje DNK putem umrežavanja vodikovih veza između baza timina i citozina. Na taj način poremeti transkripciju i replikaciju DNK, što može rezultirati mutacijama i ćelijskom smrću. Osim toga, hidracijski status DNK ima značajan utjecaj na otpornost DNK prema UV zrakama. Osušena DNK je otpornija na UV zrake, pa UV svjetlo manje djeluje u sprečavanju kontaminacije na suhim površinama laboratorija. Ako se UV svjetlo koristi za dekontaminaciju master mikseva, treba paziti da nukleotidi i enzimi ne budu oštećeni UV svjetlom. Izvor UV svjetla može se postaviti na strop ili radnu površinu laboratorije i može se aktivirati uređajem na izlaznim vratima, kada posljednja osoba koja napušta laboratoriju zatvori vanjska vrata. Ako se koristi UV svjetlo, ozon koji

nastaje pod utjecajem UV-a mora se ukloniti ventilacijom. Nakupljanje taloga zbog taloženja oksidacijskih produkata na staklu UV lampe tokom zračenja smanjuje učinkovitost UV sistema. Ti talozi trebaju se uklanjati mjesečno, a rad UV lampe mora se strogo nadzirati.

Šta učiniti kako bi se izbjeglo miješanje i kontaminacija uzoraka

Molekularni laboratorijski testovi općenito su visoko osjetljivi i specifični, pružajući izuzetno precizne rezultate. Ipak, mogu se pojaviti situacije s lažno pozitivnim ili lažno negativnim rezultatima. Za smanjenje takvih netačnosti, ključno je primjenjivati kontrolne mehanizme, uključujući provjeru sekvenci prajmera i proba, ispitivanje i potvrdu optimalnosti uslova testiranja te upotrebu negativnih kontrola.

Amplifikacija, iako neizostavan dio molekularne dijagnostičke metode, može biti izuzetno osjetljiva, detektirajući čak i pojedinačne molekule DNK. Uprkos prednostima, treba biti svjestan mogućnosti kontaminacije, što može uzrokovati lažno pozitivne rezultate. Stoga je nužno postaviti prioritete u prevenciji kontaminacije u laboratorijama za molekularnu biologiju. Unakrsna kontaminacija, jedan od izvora grešaka, može se dogoditi tokom različitih faza procesa obrade uzoraka ili ekstrakcije DNK, rezultirajući lažno pozitivnim ili negativnim rezultatima. Mikroorganizmi poput virusa ili bakterija mogu također biti preneseni s jednog slučaja na drugi tokom ovih procesa.

Uprkos predostrožnostima, izvještava se da stopa unakrsne kontaminacije iznosi oko 3%. Pozitivne kontrole korištene u testu mogu predstavljati potencijalne izvore rizika za kontaminaciju. Odjeća, laboratorijski otpad i/ili nečišćeni laboratorijski stolovi mogu sadržavati izvore kontaminanata poput nukleinskih kiselina. Važno je održavati visoke standarde čistoće i provoditi protokole kako bi se minimizirao rizik od netačnih rezultata u laboratoriji molekularne biologije.

Čest uzrok kontaminacije je loša tehnika osoblja. Zato je neophodno da osoblje prođe obuku i bude ocijenjeno kao kompetentno prema lokalnim

propisima prije nego što obavi bilo koji postupak u laboratoriji. Pored osoblja, posjetitelji i studenti moraju proći obuku o odgovarajućoj upotrebi PCR prostorija. Preporučuje se uspostava formalnog procesa uvoda za nove radnike u laboratoriji, bez obzira na prethodno iskustvo. Politika urednosti mora se prakticirati u svakom trenutku.

Kako bi se spriječila i kontrolisala kontaminacija, nužni su odgovarajući fizički uslovi, arhitektonska struktura i dizajn laboratorije, pažljiva primjena laboratorijskih tehnika i protokola te plan rada. Korištenje odvojenih područja ili prostorija za preamplifikaciju, amplifikaciju i postamplifikaciju s odvojenim sistemima ventilacije učinkovit je način prevencije kontaminacije. Rizik od kontaminacije manji je u uređajima zatvorenog sistema. U testnom području laboratorije trebalo bi biti samo osoblje koje je odgovorno za provođenje određene analize. Svaka prostorija / područje trebala bi imati vlastitu opremu, uključujući laboratorijske mantile i pipete.

Minimiziranje aerosolizacije prilikom otvaranja tubica također je nužno kako bi se spriječio prijenos između uzoraka. Čišćenje prije i nakon svakog postupka trebalo bi se provoditi pomoću sredstava za dekontaminaciju nukleinskih kiselina. Na primjer, pranje s 10% varikinom koja je svježe pripremljena i ispiranje sa 70% etanolom vrlo je učinkovito. Na taj način mogu se ukloniti i biološki opasne tvari i nukleinske kiseline koje mogu biti izvor kontaminacije. Osim toga, kontaminacija se može spriječiti ili smanjiti odbacivanjem nepročišćenih tubica u posljednjoj fazi, korištenjem pipeta s pozitivnim pritiskom, izbjegavanjem razgovora prilikom rada i redovnim izlaganjem laboratorijskih uređaja UV zračenju. Prilikom izvođenja PCR analize, uzorci i pozitivne kontrole trebaju biti zadnji koji se stavljaju u reakcijske smjese kako bi se smanjio rizik od prijenosa nukleinskih kiselina. Ako se koriste pozitivne kontrole, preferirano je da se koriste najniža razrjeđenja.

Kao negativne kontrole mogu se koristiti voda ili puferi bez DNK kako bi se otkrila i pratila kontaminacija. Negativna kontrola trebala bi sadržavati sve materijale za sve faze testa, kao i bilo koji drugi uzorak.

Pozitivan rezultat detektiran u negativnoj kontroli ukazuje na mogućnost kontaminacije. Kontrola adekvatnosti hemijske sterilizacije (kao što su protokoli za uracil glikozilazu) može se provesti inkorporiranjem male količine amplikona u negativnu kontrolu. Kontaminacija površina i opreme može se provjeriti uzimanjem briseva s laboratorijskih površina gdje se izvodi test pomoću vlažnog filter-papira, a pozitivan rezultat u brisnom uzorku ukazuje na prisutnost kontaminacije. Osim toga, više od očekivane stope pozitivnosti određenog testa može ukazivati na kontaminaciju.

Budući da je RNK osjetljivija od DNK i podložna ribonukleazama (RNazama) prisutnim u svim ćelijama, sprečavanje kontaminacije RNazama vrlo je važno u molekularnim testovima zasnovanim na RNK. RNaze su otporne na helatne agense za metal i mogu perzistirati čak i nakon produženog ključanja ili autoklaviranja. Najčešći izvori kontaminacije RNazama su kontaminirani puferi i automatske pipete. Također, svi laboratorijski prostori i staklenke mogu biti kontaminirani RNazama s kože i kose osoblja laboratorije. Nošenje rukavica i njihova česta promjena tokom svih faza rada, korištenje odvojene laboratorijske opreme za testove zasnovane na RNK, alikvotiranje malih količina pufera, korištenje inhibitora RNaze poput dietilpirokarbonata (DEPC) te korištenje otopina i tubica slobodnih od RNaza samo su neke od laboratorijskih mjera opreza za sprečavanje kontaminacije RNazama. Preporučuje se izrada dokumentiranog plana postupanja u slučaju kontaminacije. Većina laboratorija uništava sve kontaminirane reagense i potrošni materijal.

Oprema i uređaji potrebni u laboratoriji za molekularnu biologiju

Oprema i uređaji mogu se neznatno razlikovati između molekularnih laboratorija zavisno od spektra testova koji se izvode. S druge strane, često je potrebna detaljna inventarna lista (Tabela 1) kako bi se uspostavila molekularna laboratorija i omogućilo standardno testiranje. Također je važno predvidjeti budžet za servisne ugovore za održavanje i popravak opreme. Prilikom organiziranja / postavljanja opreme trebalo bi uzeti u obzir jednosmjerni tok rada.

Tabela 1. Lista aparata i opreme potrebnih u molekularnoj laboratoriji

Oprema	Svrha upotrebe u laboratoriji
Hladnjaci +4°C i zamrzivači (−20°C, −80°C)	Skladištenje reagensa, uzoraka i drugih materijala na odgovarajućim temperaturama
Vortex mješači	Miješanje i homogenizacija uzoraka
Centrifuge	Odvajanje različitih komponenata uzoraka, kao što su ćelijski dijelovi, proteini ili nukleinske kiseline
Spektrofotometar	Mjerenje koncentracije nukleinskih kiselina i proteina
PCR mašine	Amplifikacija i replikacija specifičnih DNK segmenata pomoću lančane reakcije polimeraze (PCR)
Kvantitativni PCR instrumenti	Praćenje <i>Real-time</i> PCR reakcija, omogućavajući kvantifikaciju amplifikacije
Sekvencer / Genetički analizator	Određivanje redoslijeda nukleotida, fragmentarna analiza
Sistem za elektroforezu i fotodokumentaciju	Razdvajanje i analiza fragmenata nukleinskih kiselina ili proteina na osnovu njihove veličine i naelektrisanosti
Inkubator	Kontrola temperature i uslova inkubacije tokom eksperimenata
Termoblok	Održavanje tačnih temperatura tokom različitih faza molekularnih eksperimenata
Automatizirani sistemi za izolaciju nukleinskih kiselina	Brza i učinkovita izolacija DNK ili RNK iz različitih vrsta uzoraka
Biološki sigurnosni kabineti	Rad u sterilnim uslovima, sprečavanje kontaminacije uzoraka i obezbjeđenje sigurnosti
Automatske pipete i pipetori	Precizno doziranje tekućina u malim volumenima
Mikroskopi	Vizualizacija ćelija i drugih bioloških struktura
Ledomat	Hlađenje uzoraka bioloških materijala, hemikalija ili reagensa
pH metar	Određivanje pH prilikom pripreme reagenasa
Analitička vaga	Precizno mjerenje mase
Sistem za dejonizaciju vode	Proizvodi dejoniziranu (DI) ili demineraliziranu vodu za pripremu pufera i ostalih hemikalija
UV svjetlo	Dekontaminacija prostora

Oprema	Svrha upotrebe u laboratoriji
Autoklav	Sterilizacija pribora i hemikalija
Računari i softver za analizu podataka	Obrada i analiza rezultata
Adekvatan potrošni materijal (tipovi, tubice itd.)	Ključna komponenta u svim laboratorijama za prikupljanje, čuvanje, obradu i analizu uzoraka u istraživačke svrhe
UPS, generator	Neprekidno napajanje električnom energijom

Upute za kalibraciju i održavanje opreme trebaju biti evidentirane u laboratoriji kao pismene smjernice. Smjernice za kalibraciju trebaju obuhvatiti raspored kalibracije (npr. dnevno, mjesečno itd.), detaljne korake postupka kalibracije, specifikacije materijala za kalibraciju, uslove pripreme i pohrane, rješavanje problema te metode dokumentiranja. Osim toga, smjernice za održavanje trebaju uključivati raspored održavanja, precizne upute za izvođenje održavanja te smjernice za rješavanje problema.

Osiguranje kvaliteta

Upravljanje kvalitetom ima ključnu ulogu u svim fazama evaluacije, uključujući preanalitičku, analitičku i postanalitičku fazu, te predstavlja neizostavan element prakse molekularne biologije. Postoje brojne regulatorne smjernice, uključujući priručnike, koje je potrebno slijediti pri uspostavi i/ili upravljanju molekularnobiološkom laboratorijom. Prisutnost pogrešaka koje mogu utjecati na tačnost rezultata u molekularnoj laboratoriji redovno se mora kontrolisati pod nadzorom molekularnog biologa kako bi se spriječilo ili minimaliziralo izvještavanje o greškama te osigurala ispunjenost zahtjeva kvalitete.

Statistika i vrijeme dobijanja rezultata testiranja trebaju se redovno provjeravati i potvrđivati korištenjem standardnih studija o validaciji. Za interno vrednovanje kvalitete preporučuje se upotreba kontrolnih materijala.

Osim internih mjera opreza navedenih u prethodnim dijelovima, eksterno vrednovanje kvalitete također se mora provoditi u određenim intervalima za određene vrste testova, budući da je to najkritičnija faza

upravljanja kvalitetom. Eksterna kontrola kvaliteta, kao mjera učinka laboratorija, pokazala se korisnom za poboljšanje molekularnobioloških laboratorija, a njihovi programi ključni su elementi okvira laboratorija.

Redovno sudjelovanje u programima eksterne kontrole neophodno je kako bi se potvrdila i poboljšala kvaliteta testiranja, s obzirom na to da eksterni programi kvalitete laboratorije za molekularnu biologiju ocjenjuju izvještaje i rezultate testiranja. Kao dio programa, sudionici dobivaju uzorke za testiranje, a njihovi rezultati potom se pregledavaju radi otkrivanja grešaka. Izvještaji se ocjenjuju, pružajući laboratorijskim sudionicima priliku za poboljšanje svoje usluge.

Laboratorije širom Evrope također su obavezne posjedovati akreditaciju. Akreditacija je postupak u kojem ovlašteno nezavisno tijelo službeno priznaje da je laboratorija sposobna obavljati određene zadatke. Može se smatrati najučinkovitijim sistemom za osiguranje kvaliteta, budući da se usklađenost s ISO standardima provjerava putem tijela za akreditaciju. Akreditacija i sudjelovanje u eksternim vrednovanjima kvalitete prepoznati su kao učinkovita i važna sredstva za poboljšanje tačnosti i pouzdanosti molekularnog testiranja.

Zaključno, ako rezultati dobiveni molekularnim dijagnostičkim testovima nisu tačni zbog bilo kojeg od navedenih faktora, mogu nastati ozbiljni problemi koji nepovoljno utječu na dijagnozu i odluke o liječenju. Budući da molekularna dijagnostika ima važnu ulogu u odlukama o liječenju, posebno kod pacijenata oboljelih od karcinoma, upravljanje molekularnom laboratorijom od izuzetne je važnosti.

3. POSTUPAK AKREDITACIJE LABORATORIJE

Akreditacija predstavlja potvrdu o osposobljenosti laboratorije da pruža uslugu koristeći određenu metodu rada u skladu s normom prema kojoj se vrši akreditacija. Ovaj proces obuhvata sve aspekte laboratorijskog rada u području akreditacije, uključujući postupanje s dokumentacijom, osobljem, opremom, ispitnim / kalibracionim metodama te konačnim rezultatom. Bitno je naglasiti da se akreditacija odnosi isključivo na rad u području akreditacije, tj. na aktivnosti povezane isključivo s akreditiranim metodama, a ne automatski na rad sa svim metodama koje laboratorija koristi. Ista laboratorija može primjenjivati i akreditirane i neakreditirane metode.

Certifikacija se, s druge strane, ne odnosi na sveukupni rad laboratorije niti potvrđuje opću osposobljenost laboratorije, već samo usklađenost predmeta koji se certificira s određenom normom. Certifikacija može obuhvatiti proizvod, osobu, proces, sistem itd., prema normi poput BAS EN ISO 9001 (koja nije predmet akreditacije). Postupak certificiranja provodi certifikacijska kompanija, dok potvrdu o akreditaciji može dati samo nacionalno akreditacijsko tijelo.

Ovlašćivanje se odnosi na dobivanje dozvole od tijela državne uprave ili drugog tijela relevantnog za obavljanje određenih poslova. Akreditacija može biti preduslov za ovlašćivanje, tj. tijelo koje dodjeljuje ovlaštenje može zahtijevati akreditaciju kao jedan od uslova za stjecanje ovlaštenja.

U skladu sa zahtjevima za ispitne i kalibracione laboratorije u Evropskoj Uniji, ključni zahtjev je akreditacija prema standardu ISO/IEC 17025. Taj standard postavlja opće zahtjeve za kompetenciju ispitnih i kalibracijskih laboratorija, obuhvatajući organizacijske aspekte (upravljanje, sistem upravljanja, kontrola dokumenata, nabavka proizvoda) i tehničke zahtjeve (osoblje, uslovi smještaja, metode ispitivanja itd.). Institut za akreditaciju Bosne i Hercegovine (BATA) odgovoran je za akreditaciju ispitnih i kalibracijskih laboratorija u BiH prema nacionalnom standardu BAS ISO EN/IEC 17025, u skladu sa Zakonom o akreditaciji (Službeni glasnik BiH, broj 19/01).

Akreditacija laboratorije prema standardu ISO/IEC 17025 predstavlja ključni korak ka postizanju visokog nivoa kvaliteta u laboratorijskim aktivnostima. Ovaj standard razvijen je s ciljem obezbjeđivanja povjerenja u rezultate ispitivanja i kalibracije koje laboratorije pružaju. U ovom poglavlju istražiti ćemo proces akreditacije prema ISO/IEC 17025, razmatrajući ključne elemente i korake koje laboratorije moraju poduzeti kako bi zadovoljile zahtjeve ovog standarda.

ISO/IEC 17025 je međunarodni standard koji postavlja opće zahtjeve za kompetentnost laboratorije u oblasti ispitivanja i kalibracije. Ovaj standard uspostavlja okvir za postizanje visokog nivoa kvaliteta u laboratorijskim procesima, obezbjeđujući dosljednost, tačnost i pouzdanost rezultata. Ključne oblasti obuhvaćene standardom uključuju upravljanje kvalitetom, tehničku kompetentnost, opremu, metode ispitivanja i kalibracije, kao i postupke uzorkovanja.

Upravljanje kvalitetom tokom procesa akreditacije od ključne je važnosti kako bi laboratorije osigurale usklađenost s normama, propisima i zahtjevima akreditacijskih tijela. Postavljanje jasne politike kvalitete ključno je za odražavanje posvećenosti laboratorije postizanju i održavanju visokih standarda kvalitete. Ova politika treba biti usklađena s ciljevima organizacije i treba odražavati njenu viziju. Razvoj i održavanje sistema dokumentacije koji obuhvata sve relevantne postupke, priručnike, evidencije i druge dokumente koji se odnose na rad laboratorije također su ključni. Svi dokumenti trebaju biti ažurirani i lako dostupni osoblju. Osiguravanje da osoblje posjeduje potrebna znanja i vještine za obavljanje poslova u skladu s akreditiranim metodama također je od iznimne važnosti. Planiranje i provođenje obuka prema potrebama osoblja mogu pomoći u minimiziranju rizika od nepoštivanja procedura.

Redovno provođenje internih auditiranja doprinosi osiguravanju da su sve aktivnosti u skladu s postavljenim standardima i procedurama. Interni audit pomaže identificirati potencijalne probleme i omogućava pravovremeno poduzimanje korektivnih mjera. Upravljanje korektivnim i preventivnim mjerama ključno je za eliminaciju uzroka

nepravilnosti, sprečavanje njihovog ponovnog pojavljivanja i kontinuirano poboljšavanje učinkovitosti sistema upravljanja kvalitetom. Identifikacija, procjena i upravljanje rizicima koji mogu utjecati na kvalitetu rezultata, te planiranje i primjena odgovarajućih mjera, dodatno su važni koraci kako bi se smanjili rizici i osiguralo postizanje kvalitetnih rezultata ispitivanja. Održavanje i kalibracija svih relevantnih uređaja i opreme važni su za osiguranje njihove tačnosti i pouzdanosti. Redovno praćenje statusa opreme i izvođenje pravovremenih popravki ili zamjena ključni su za kontinuiranu funkcionalnost laboratorije. Uvođenje sistema praćenja i mjerenja performansi laboratorije, zajedno s analizom podataka o performansama, pomaže u identifikaciji područja za poboljšanje.

Učinkovita i transparentna komunikacija s akreditacijskim tijelom tokom cijelog procesa akreditacije ključna je kako bi se izbjegli nesporazumi i osigurala saradnja u postizanju zajedničkih ciljeva. Integriranje filozofije kontinuiranog poboljšanja u sve aspekte rada laboratorije, uz sistemsko praćenje i evaluaciju, omogućava stalno usavršavanje procesa i postizanje najviših standarda kvalitete. Integracija ovih elemenata u cjelokupni sistem upravljanja kvalitetom pomaže laboratorijama ne samo da postignu akreditaciju već i da održavaju visoke standarde kvalitete u svakodnevnom radu. Rukovodstvo laboratorije koje se opredijelilo za akreditaciju dužno je na godišnjem nivou pratiti i preispitivati efikasnost cijelog sistema kako bi on kontinuirano napredovao.

Tehnička kompetentnost, u kontekstu laboratorije i procesa akreditacije, predstavlja ključni faktor u osiguravanju preciznosti, pouzdanosti i relevantnosti rezultata ispitivanja ili mjerenja. Osoblje laboratorije treba posjedovati odgovarajuće obrazovanje, iskustvo i stručnost u područjima relevantnim za izvođenje tih aktivnosti. Visokokvalificirani stručnjaci igraju ključnu ulogu u doprinosu tehničkoj kompetentnosti laboratorija. Korištenje najnovijih metoda ispitivanja i tehnologije važno je za osiguranje tačnosti i preciznosti rezultata, a praćenje razvoja tehnologije ključno je za održavanje tehničke kompetencije. Redovna kalibracija opreme predstavlja ključan element u održavanju tehničke kompetentnosti, osiguravajući

da instrumenti pravilno mjere i pružaju pouzdane rezultate. Validacija metoda ispitivanja, koja potvrđuje prikladnost odabrane metode za namjeravanu upotrebu, također doprinosi tehničkoj kompetentnosti laboratorije. Implementacija sistema upravljanja kvalitetom, poput ISO 9001 ili ISO/IEC 17025, pomaže u standardizaciji procesa, što značajno doprinosi tehničkoj kompetentnosti. Sudjelovanje laboratorije u međunarodno priznatim šemama ocjenjivanja usklađenosti, uključujući međunarodna poređenja i ispitivanja osposobljenosti, dodatno podiže njenu tehničku kompetentnost. Korištenje referentnih materijala i sudjelovanje u programima ispitivanja osposobljenosti pomaže u procjeni i unapređenju tehničke kompetentnosti laboratorije. Kontinuirano usavršavanje osoblja kroz sudjelovanje u stručnim seminarima, konferencijama i obukama ključno je za održavanje tehničke kompetentnosti u dinamičnom tehničkom okruženju. Praćenje i ocjena performansi laboratorije ključni su za identifikaciju područja poboljšanja i osiguranje održavanja visokih standarda tehničke kompetentnosti. Uspjeh laboratorije u akreditaciji i pružanju pouzdanih rezultata neposredno zavisi od njihove tehničke kompetentnosti.

Oprema u laboratoriji igra ključnu ulogu u osiguravanju tačnosti, preciznosti i pouzdanosti rezultata ispitivanja ili mjerenja. Pravilan odabir opreme ključan je za ispravno obavljanje specifičnih ispitivanja ili mjerenja. Oprema treba odgovarati potrebama laboratorijskih aktivnosti i biti kompatibilna s primijenjenim metodama. Sva oprema vezana za akreditovanu metodu treba biti kalibrirana. Redovna kalibracija i verifikacija opreme neophodni su koraci kako bi se osigurala tačnost i preciznost mjerenja. Kalibracija osigurava da instrumenti pravilno prikazuju stvarne vrijednosti. Redovno održavanje opreme ključno je za njeno dugotrajno funkcioniranje. Preventivno održavanje više pomaže u otkrivanju potencijalnih problema nego što utječe na rezultate ispitivanja.

Oprema treba biti usklađena s metodama ispitivanja koje laboratorija primjenjuje. Korištenje referentnih materijala pomaže u verifikaciji tačnosti opreme i metoda. Referentni materijali su poznate tvari koje se koriste kao standardi za poređenje rezultata. Implementacija

sistema za praćenje i upravljanje opremom olakšava praćenje njezinog statusa, kalibracije i održavanja. Ovo je važno za održavanje urednog rada opreme. Obezbjedenje sigurnosti operatera i okoline od ključnog je značaja. Pravilno obučeno osoblje treba znati koristiti opremu, a laboratoriju treba osigurati poštujući sve sigurnosne protokole.

Oprema bi trebala biti fleksibilna i omogućavati proširenje ili nadogradnju prema potrebama laboratorije. To je posebno važno u dinamičnim okruženjima gdje se zahtjevi mogu mijenjati. Automatizacija procesa i integracija s računarskim sistemom mogu poboljšati učinkovitost laboratorije, smanjiti rizik od ljudske pogreške i olakšati praćenje podataka. Oprema bi trebala biti ergonomski dizajnirana kako bi olakšala rad osoblja i smanjila umor, posebno u situacijama gdje je potrebno dugotrajno praćenje ili manipuliranje opremom. Pružanje adekvatne pažnje i brige prema opremi u laboratoriju ključno je za osiguravanje visokih standarda kvalitete i pouzdanosti u rezultatima ispitivanja.

Metode ispitivanja su postupci ili pravila koja se primjenjuju za dobivanje određenih informacija o svojstvima materijala, proizvoda, sistema ili procesa. Laboratorije koriste metode ispitivanja za provođenje analiza, mjerenja ili evaluacija u skladu s postavljenim standardima ili specifičnim zahtjevima klijenata. Validacija metode je proces koji potvrđuje da je odabrana metoda prikladna za namjeravanu upotrebu. Uključuje testiranje tačnosti, preciznosti, osjetljivosti i drugih relevantnih parametara. Kalibracija je proces postavljanja i prilagođavanja mjernih instrumenata kako bi se osigurala tačnost njihovih očitavanja u poređenju s referentnim standardima. Cilj kalibracije je osigurati da mjerni instrumenti pravilno mjere i daju tačne rezultate. Kalibracija se provodi redovno, a frekvencija zavisi od vrste instrumenta, uslova rada, važnosti mjerenja i relevantnih propisa. U mnogim industrijskim i znanstvenim sektorima postoje pravni zahtjevi koji propisuju redovno kalibriranje opreme.

Ispitivanje osposobljenosti je proces u kojem laboratorija sudjeluje u testiranju uzoraka nepoznatog sastava kako bi se procijenila njena sposobnost da pravilno izvodi ispitivanja. Cilj je provjera tačnosti i

preciznosti laboratorijskih rezultata te identifikacija područja za poboljšanje ukoliko postoje. Redovno sudjelovanje u ispitivanjima osposobljenosti pomaže laboratorijama u održavanju nivoa tehničke kompetentnosti. Referentni materijali su poznate tvari čiji su sastav i svojstva dobro definirani. Koriste se kao standardi za poređenje i kontrolu u laboratorijskim ispitivanjima. Upotreba referentnih materijala pomaže u potvrđivanju tačnosti rezultata ispitivanja i u kontrolisanju kvalitete metoda. Ove aktivnosti zajedno čine temelj sistema osiguranja kvalitete u laboratorijama. Implementacija i redovno provođenje metoda ispitivanja, kalibracija te sudjelovanje u ispitivanjima osposobljenosti doprinose povjerenju u rezultate laboratorijskih analiza.

Uzorkovanje igra ključnu ulogu u postupku akreditacije laboratorije. To je važan korak jer kvaliteta i reprezentativnost uzoraka neposredno utječu na vjerodostojnost rezultata ispitivanja i na sposobnost laboratorije da zadovolji zahtjeve akreditacijskih tijela. Navest ćemo nekoliko ključnih razloga zašto je uzorkovanje važno u kontekstu akreditacije: pravilno uzorkovanje osigurava da uzorci odražavaju stvarnu populaciju materijala ili tvari koji se ispituju. Reprezentativni uzorci ključni su za donošenje relevantnih zaključaka o kvaliteti, sigurnosti ili usklađenosti. Standardizirane procedure uzorkovanja pomažu u postizanju dosljednosti u prikupljanju uzoraka. Dosljednost je važna za akreditaciju jer omogućava procjenu stalnosti performansi laboratorija.

Neppravilno uzorkovanje može dovesti do iskrivljenih rezultata ispitivanja. Akreditacijska tijela posebnu pažnju posvećuju tome da laboratorije primjenjuju adekvatne postupke uzorkovanja kako bi smanjile mogućnost pogrešaka. Akreditacija često zahtijeva pridržavanje određenih normi i standarda, uključujući one koji se odnose na uzorkovanje. Pridržavanje standarda osigurava da laboratorije primjenjuju priznate i validirane metode uzorkovanja. Ako su uzorci uzeti na pravilan način i u skladu s propisanim procedurama, povećava se povjerenje u rezultate ispitivanja. Povjerenje u rezultate ključno je da bi akreditaciju priznala relevantna tijela i klijenti. Pravilno uzorkovanje omogućava identifikaciju potencijalnih rizika ili

problema koji mogu utjecati na kvalitetu ispitivanja. Rano prepoznavanje rizika ključno je za njihovo upravljanje i poboljšanje postupaka.

Ako laboratorija uzima uzorke u skladu s očekivanjima tržišta i industrije, to može olakšati postizanje akreditacije, posebno ako se ta uzorkovanja temelje na priznatim standardima. Pravilno dokumentirano uzorkovanje doprinosi transparentnosti i odgovornosti. Akreditacijska tijela traže dokumentaciju koja pokazuje kako su uzorci uzeti, kako su identificirani i kako su obrađeni. U konačnici, uzorkovanje je ključna komponenta sistema upravljanja kvalitetom u laboratorijama koje teže akreditaciji. Ono osigurava da laboratorije primjenjuju visoke standarde u prikupljanju uzoraka, čime se poboljšava vjerodostojnost i pouzdanost njihovih rezultata ispitivanja.

Postupak akreditacije

Iako se neki detalji procesa akreditacije mogu razlikovati u zavisnosti od tijela za akreditaciju, opći proces će biti isti i sastojati se od sljedećih koraka:

- priprema za akreditaciju;
- podnošenje zahtjeva;
- preliminarna ocjena (opciono);
- pregled dokumenata;
- ocjena na licu mjesta;
- korektivne radnje.

Vremenski okvir ovih aktivnosti zavisić će od tijela za akreditaciju koje laboratorija izabere. Neka tijela zahtijevaju da podnosioci zahtjeva već primijene sistem upravljanja kvalitetom i da dostave priručnik o kvalitetu i procedure prilikom podnošenja zahtjeva. Druga tijela za akreditaciju će dozvoliti da laboratorija podnese zahtjev bez ovih dokumenata i rado će sačekati dok podnosilac zahtjeva ne bude spreman da ih dostavi.

Priprema za akreditaciju

Laboratorija će biti spremna za akreditaciju nakon što:

- implementira i dokumentira sistem upravljanja kvalitetom u skladu s ISO/IEC 17025;
- zaposleni postanu upoznati sa sistemom;
- laboratorija obezbijedi dovoljan broj dokumenata i evidencija koji mogu biti ocijenjeni.

Dokumentacija treba uključivati sljedeće:

Laboratorija mora jasno definirati svoje ciljeve i opseg ispitivanja ili mjerenja koje će obuhvatiti.

Uspostavljanje sistema upravljanja kvalitetom: Razvija se i implementira sistem upravljanja kvalitetom, prilagođen zahtjevima standarda ISO 17025.

Identifikacija resursa: Identificiraju se svi potrebni resursi, uključujući opremu, osoblje i prostor, te se osigurava njihova dostupnost.

Zapisi o kvalitetu: Različiti zapisi poput rezultata ispitivanja ili kalibracije, rezultata ocjena, koji pružaju objektivne dokaze da se pridržavate zahtjeva Međunarodnog standarda ISO 17025.

Izvještaji o internim revizijama: Zabilježavanje oblasti, dokumenata i zapisa koji su pregledani kako bi se obezbijedilo pridržavanje sistema upravljanja kvalitetom, zajedno s izvještajima o neusaglašenostima.

Zapisi koji podržavaju validnost rezultata ispitivanja ili kalibracije: Podrazumijevaju rezultate testova performansi ili studija upoređivanja između laboratorija, zajedno s rezultatima studija praćenja performansi unutar laboratorije.

Zapisi o obuci osoblja: Sve obuke koje su provedene, zajedno s planom predviđenih obuka.

Zapisi o kalibraciji i održavanju opreme: Certifikati o kalibraciji i zapisi o održavanju, zajedno s programom kalibracije i održavanja, te tehnički zapisi.

Podnošenje zahtjeva

Podnošenje zahtjeva za akreditaciju prema Međunarodnom standardu ISO 17025 obično uključuje popunjavanje obrasca zahtjeva, što podrazumijeva pružanje informacija o laboratoriji, uključujući sljedeće:

- Koji je željeni vremenski okvir za akreditaciju?
- Koje je područje ispitivanja i/ili kalibracije vaše laboratorije? Vjerovatno će akreditacijsko tijelo pitati za informacije o sposobnostima laboratorije, poput opsega mjerenja i povezane nesigurnosti.
- Kakav je pravni status laboratorije?
- Da li je laboratorija samostalna ili dio veće ustanove?
- Kakav je status implementacije postojećeg sistema upravljanja laboratorijom?
- Kako izgleda dokumentacija sistema upravljanja laboratorijom?

Važno je da informacije koje laboratorija pruža budu što potpunije i tačnije, jer će to omogućiti tijelu za akreditaciju da pruži najbolje procjene troškova i vremenskog okvira potrebnog za akreditaciju.

Nakon što laboratorija završi i podnese paket zahtjeva, tijelo za akreditaciju će poslati ponudu ili procjenu troškova za ocjenu. U nekom trenutku laboratorija će potpisati dokumente kojima se uspostavlja ugovor između laboratorije i tijela za akreditaciju. To može biti potrebno kao dio zahtjeva ili nakon što vam tijelo pruži procjenu troškova.

Preliminarna ocjena

Mnoga tijela za akreditaciju nude aplikantima opcionu preliminarnu ocjenu njihovog sistema upravljanja laboratorijom prije samog procesa akreditacije. Preliminarna ocjena nije obavezna za akreditaciju prema ISO 17025 i strogo je opcionalna, zavisno od potreba laboratorije. Opseg preliminarne ocjene također zavisi od laboratorije. Prednost preliminarne ocjene je u tome što laboratoriji omogućava identifikaciju i ispravljanje potencijalnih problema prije nego što počne proces akreditacije. Preliminarna ocjena također pruža tijelu za akreditaciju

priliku da unaprijed identificira eventualne slabosti koje mogu postojati u sistemu upravljanja kvalitetom laboratorije. Tokom preliminarne ocjene, tijelo za akreditaciju će poslati tim za ocjenu u laboratoriju podnosioca zahtjeva. Ovaj tim čine kompetentni ocjenitelji, koji će ocjenjivati sistem upravljanja kvalitetom laboratorije, zapise i druge dokumente, obavještavajući podnosioca zahtjeva o eventualnim problemima koji mogu ometati uspješnu ocjenu akreditacije.

Faza 1: Pregled dokumentacije sistema upravljanja laboratorijom

Prva faza ocjene sastoji se od pregleda dokumentacije koja se odnosi na sistem upravljanja kvalitetom. To će uključivati pregled priručnika o kvaliteti, politike i procedure kvaliteta. Međutim, u zavisnosti od odabranog tijela za akreditaciju, također se može pregledati interni raspored revizija, plan aktivnosti radi obezbjeđenja validnosti rezultata ispitivanja ili kalibracije, metode ispitivanja ili kalibracije, kao i izvještaji o validaciji ili verifikaciji metoda.

Ovaj pregled će utvrditi da li sistem upravljanja kvalitetom ispunjava zahtjeve Međunarodnog standarda ISO 17025. Svi nedostaci otkriveni tokom pregleda faze 1 bit će prijavljeni, a laboratorija će ih morati ispraviti prije nego što započne ocjena na licu mjesta. Prije nego što laboratorija započne ocjenu na licu mjesta, trebala bi se pobrinuti da ima dovoljno dostupnih zapisa, kao dokaza, kako bi se pokazalo da posluje u skladu sa sistemom upravljanja kvalitetom i Međunarodnim standardom ISO 17025.

Opći zahtjevi

Nepriistrasnost

Laboratorija bi trebala imati dokaze koji pokazuju da se potrudila da identificira prijetnje nepriistrasnosti unutar laboratorije. Ovo može biti u obliku liste potencijalnih prijetnji, uključujući vlasništvo, upravljanje, menadžment, osoblje, finansije, ugovore, marketing (uključujući brendiranje), plaćanje prodajne provizije ili druge nagrade za preporuku novih klijenata, ograničenu bazu klijenata. Laboratorija

treba moći objasniti kako je menadžment strukturiran radi zaštite nepristrasnosti laboratorije. Gdje god je identificirana prijetnja nepristrasnosti laboratorije, trebalo bi imati zapise o poduzetim radnjama radi eliminisanja ili smanjenja takvog rizika.

Povjerljivost

Laboratorija bi trebala imati primjere ugovora ili drugih pravno obavezujućih dokumenata kao dokaz da može obezbijediti povjerljivost informacija o klijentima. Trebala bi pokazati kako štiti povjerljive interese svojih klijenata i kako obezbjeđuje da osoblje radi na povjerljiv način. To može uključivati i dokaze o obukama koje pruža svom osoblju. Također se preporučuje da poduzme korake kako bi zaštitila interese povjerljivosti svojih klijenata prilikom skladištenja i rada s uzorcima klijenata.

Struktura

Pravna priroda laboratorije, zajedno sa strukturom upravljanja i međusobnim odnosima između osoblja, trebala bi biti navedena u priručniku o kvalitetu koji je dostavljen uz zahtjev i stoga se ne očekuje da se o njoj raspravlja tokom ocjene na licu mjesta.

Resursi

Opći zahtjevi uključuju zapise koji pokazuju da su identificirani resursi koji su potrebni laboratoriji kako bi postigla svoje ciljeve. Trebaju uključivati osoblje, smještaj, opremu, objekte i komunalije.

Osoblje

Svi zaposleni trebaju znati svoje odgovornosti, dužnosti i ovlaštenja. Ove informacije treba saopćiti osoblju, u sklopu opisa posla. Nadalje, treba imati zapise koji pokazuju da su određeni zahtjevi za kompetencije za svaku poziciju u okviru laboratorije, što uključuje obrazovanje, vještine, obuke i iskustvo. Također treba imati dokumentiran program obuke i ažurirane zapise o obuci. Trebalo bi također odrediti aktivnosti za koje je potrebna posebna autorizacija, kriterije za autorizaciju i zapise koji pokazuju ko je odgovoran za obavljanje ovih aktivnosti.

Objekti i okolišni uslovi

Potrebno je imati pismene evidencije koje opisuju smještaj i tehničke zahtjeve laboratorija. Također je potrebno identificirati sve okolišne uslove koji bi mogli utjecati na rezultate ili kalibracije isporučene od strane laboratorija i imati sredstva za kontrolu, mjerenje, praćenje i zapisivanje tih uslova. Potrebno je imati odgovarajuće sigurnosne kontrole, zajedno s adekvatnom kontrolom kontaminacije, poput uklanjanja otpada i aranžmana za čišćenje površina. Također je potrebno pokazati adekvatno odvajanje nespojivih aktivnosti.

Oprema

Laboratorija treba imati skup specificiranih korisničkih, funkcionalnih i operativnih zahtjeva, uključujući specifikacije za tačnost i/ili nesigurnost, za svaku stavku mjerne opreme u laboratoriji, zajedno s dokazima da oprema zadovoljava te specifikacije. Ove potrebe uključuju evidenciju o provedenim aktivnostima prilikom puštanja u rad nove opreme, zajedno sa zapisima o kalibraciji i održavanju. Osim toga, mora imati dokaze da sva oprema može postići tačnost i preciznost potrebnu za dobivanje tačnih rezultata. Tu treba uključiti zapise o vremenskim provjerama obavljenim na opremi i, gdje je primjenljivo, dokaze, kao što je prikladnost opreme ili provjere kvalitete ili kontrole, koje se provode kao sastavni dio testa ili kalibracija, kako bi se podržala valjanost rezultata koje pruža oprema. Laboratorija bi trebala imati dostupne sljedeće zapise, gdje je to primjenljivo:

- identitet opreme, uključujući verziju softvera i firmvera;
- ime proizvođača, tip identifikacije i serijski broj ili drugi jedinstveni identifikator;
- dokaze o provjeri da oprema odgovara određenim zahtjevima;
- trenutnu lokaciju unutar laboratorije;
- datume kalibracije, rezultate kalibracije, podešavanja, kriterije prihvatanja i datum sljedeće kalibracije ili interval kalibracije;
- zapise o referentnim materijalima, rezultate, kriterije prihvatanja, relevantne datume i period važenja;

- plan održavanja i održavanje opreme provedeno do sada, gdje je relevantno za performanse opreme;
- detalje o bilo kakvim oštećenjima, neispravnostima, izmjenama ili popravkama opreme.

Resursi

Pregled zahtjeva, ponuda i ugovora

Laboratorija mora imati dokaz da su zahtjevi kupaca jasno definirani i zabilježeni te da se sve nejasnoće razjasne prije testiranja ili kalibracije. Ako se u zahtjeve unesu promjene nakon što su započeti radovi, mora postojati dokaz da su takve promjene saopćene osoblju. Laboratorija mora imati zapise o svim komunikacijama sa svojim klijentima.

Metode

Potrebno je posjedovati pismene primjerke metoda koje laboratorija koristiti za svaki test ili kalibraciju. Ove metode moraju biti dovoljno detaljne kako bi ih različiti članovi osoblja mogli izvoditi na dosljedan način tokom dužeg razdoblja. Laboratorija treba imati objektivne dokaze, uvjerljive stručnjaku, da može pravilno izvoditi svaki test ili kalibraciju. To može uključivati poređenja s drugim laboratorijama. Potrebno je posjedovati dokaze o validaciji metoda ako su neke od metoda koje se koriste nestandardne, ili standardne, ali se koriste izvan svoga opsega, ili su pak modificirane. Takvi dokazi moraju pružiti visok nivo pouzdanosti da metoda može dati valjane rezultate na dosljedan način. Osim toga, takvi dokazi moraju biti uvjerljivi stručnjaku.

Uzorkovanje

Ako laboratorija provodi aktivnosti uzorkovanja, mora imati planove uzorkovanja i metode koje se moraju baviti faktorima koje je potrebno kontrolisati kako bi se osigurao valjan test ili rezultati kalibracije. Mora biti u mogućnosti objasniti kako kontrole koje su implementirane rješavaju faktore i potencijalne probleme koji su identificirani. Osim

toga, mora imati zapise o svim operacijama uzorkovanja koje je provela.

Postupanje s testnim ili kalibracionim predmetima

Laboratorija treba imati evidenciju svih uzoraka ili predmeta za kalibraciju koje je zaprimila. Treba moći objasniti kako sistem upravljanja uzorcima ili predmetima za kalibraciju sprečava da se uzorci ili predmeti za kalibraciju pomiješaju, bilo fizički ili kada se navode u zapisima. Osim toga, treba moći objasniti kako sprečava oštećenje ili kontaminaciju uzoraka ili predmeta za kalibraciju i kako ih štiti od propadanja. U konačnici treba biti spremna da pokaže svoj postupak s uzorcima ili predmetima za kalibraciju.

Tehnički zapisi

Laboratorija može očekivati da će biti zamoljena da pokaže uzorak svojih zapisa ispitivanja ili kalibracije.

Obezbjeđivanje validnosti rezultata

Za praćenje validnosti rezultata laboratorija treba imati plan. Trebali biste se uvjeriti da ste proveli sve aktivnosti praćenja koje ste planirali poduzeti. Prema politici ILAC-a (Međunarodna organizacija za saradnju u području akreditiranja laboratorija), laboratorija koja traži akreditaciju po prvi put mora provesti ili test performansi ili studiju međulaboratorijskog upoređivanja za svaki test ili kalibraciju za koju traži akreditaciju. Pored toga, laboratorije su obavezne da provedu barem jedan test performansi i/ili studiju međulaboratorijskog upoređivanja za svaki test ili kalibraciju za koji su akreditovane tokom svakog četverogodišnjeg ciklusa reakreditacije.

Pritužbe i neusaglašen rad

U laboratoriji trebaju biti evidencije svih pritužbi koje je zaprimila i neusaglašenosti koje su identificirane. Iako, u slučaju da traži akreditaciju po prvi put, možda nema mnogo pritužbi ili neusaglašenosti koje treba prijaviti, važno je da prijavi sve identificirane neusaglašenosti. Ako se neusaglašeni događaj identificira tokom procjene na licu mjesta, a nije prijavljen u trenutku

kada se dogodio, to je neusaglašenost sama po sebi. Također treba imati zapise o korektivnim radnjama i mora moći objasniti kako će korektivne radnje spriječiti ponovno javljanje problema. Kada bilo koja laboratorija uvodi nove sisteme i radne prakse, dolazi do grešaka kako se zaposleni upoznaju s radom u novom okruženju. Stoga će ocjenjivači očekivati da bude nekih neusaglašenosti. Stoga, ako laboratorija prijavi da nema neusaglašenosti, to će vjerovatno značiti da nepravilno identificira neusaglašene događaje. Druga mogućnost je da ne pridaje dovoljno pažnje identifikaciji neusaglašenosti.

Kontrola podataka i upravljanje informacijama

Unutar laboratorije moraju postojati dokazi da svi računari i drugi sistemi upravljanja informacijama koji se koriste u vezi s ispitivanjem ili kalibracijom, poput računara koji kontrolišu mjerne uređaje, mogu obavljati dodijeljene im funkcije. Ako se računari već neko vrijeme koriste, tada se oni mogu koristiti kao dokaz. Međutim, treba moći objasniti kako se dokazi koriste da podupru zaključke. Osim toga, potrebni su dokazi koji pokazuju da sistemi upravljanja informacijama unutar laboratorije:

- zaštićeni su od neovlaštenog pristupa;
- zaštićeni su od manipulacije i gubitka podataka;
- rade u skladu sa zahtjevima pružatelja usluga i laboratorije;
- održavaju se na način koji obezbjeđuje integritet podataka koji se čuvaju.

Pored toga, trebaju postojati evidencije o bilo kakvim kvarovima ili prekidima rada sistema, zajedno s poduzetim korektivnim radnjama. Treba imati i zapise koji pokazuju da su sve kalkulacije i prijenosi podataka sistemski provjereni.

Sistem upravljanja

Dokumenti i evidencije

Svi dokumenti i evidencije moraju biti lako i brzo dostupni. Generalno, laboratorija bi trebala moći dostaviti bilo koji dokument ili evidenciju u roku od 30 minuta od zahtjeva, ako je dokument na licu mjesta, i u

roku od 24 sata, ako je dokument van mjesta. Međutim, bilo bi korisno imati sva dokumenta, ili njihove kopije, lako dostupne tokom procjene na licu mjesta.

Upravljanje rizicima

Upravljanje rizicima prilikom akreditacije laboratorije ključno je za osiguranje kvaliteta, tačnosti i pouzdanosti rezultata koje laboratorija proizvodi. Akreditacija je proces u kojem nezavisno tijelo procjenjuje usklađenost laboratorije sa standardima i propisima, što uključuje i procjenu rizika. Upravljanje rizicima započinje provođenjem temeljne analize svih aktivnosti laboratorije kako bi se identificirali potencijalni rizici. To uključuje proučavanje procesa uzimanja uzoraka, analize, upravljanja podacima, skladištenja uzoraka itd. Nakon toga potrebno je razmotriti moguće izvore rizika, uključujući ljudske resurse, opremu, procedure i okolinu. Na osnovu njih laboratorija treba utvrditi vjerovatnoću da se rizici ostvare i ozbiljnost posljedica ako do toga dođe. Treba rangirati identificirane rizike prema njihovoj ozbiljnosti i važnosti za kvalitetu rezultata.

Sljedeći korak jeste razvoj planova za upravljanje identificiranim rizicima. Potrebno je uključiti mjere prevencije kako bi se smanjila vjerovatnoća nastanka rizika i mjere ublažavanja kako bi se smanjila ozbiljnost posljedica ako do rizika dođe. Planove je potrebno ažurirati na osnovu novih saznanja ili promjena u laboratorijskim aktivnostima. Bitno je da osoblje bude svjesno rizika i postupaka za njihovo upravljanje, te je kontinuirana obuka o važnosti usklađenosti s propisima i standardima neizostavna. Svu dokumentaciju o identificiranim rizicima, njihovoj procjeni i poduzetim mjerama treba redovno ažurirati. Pravilno upravljanje rizicima doprinosi poboljšanju performansi laboratorije, povećava povjerenje klijenata i doprinosi održavanju akreditacije. Važno je prilagoditi ove smjernice specifičnim uslovima i potrebama laboratorije.

Interna revizija

Interne revizije su ključni element sistema upravljanja kvalitetom u laboratorijama. One pružaju nezavisan pregled internih kontrola,

procesa i sistema kako bi se osiguralo da laboratorija djeluje učinkovito, usklađeno s propisima te da postiže svoje ciljeve. Interne revizije potrebno je planirati, gdje se na prvom mjestu utvrđuju oblasti koje će biti obuhvaćene revizijom na osnovu značajnosti i razlika. Plan uključuje ciljeve, opseg, resurse i raspored aktivnosti. Potrebno je procijeniti učinkovitost sistema kvalitete i identificirati mjesta gdje postoje nepravilnosti te analizirati prikupljene podatke kako bi se utvrdila usklađenost sa standardima i identificirala područja za poboljšanje. Nakon revizije potrebno je pripremiti izvještaj o reviziji koji uključuje identificirane prilike za poboljšanje, preporuke i planove djelovanja.

Dobivene rezultate potrebno je prezentirati upravi i odgovornim osobama u laboratoriji. Pravilno provedene interne revizije pomažu laboratorijama u održavanju visokih standarda kvalitete, pouzdanosti i sigurnosti u njihovim aktivnostima. Laboratorija treba osigurati da interni revizori posjeduju potrebne vještine i kompetencije o laboratorijskim procesima, standardima i propisima. U skladu s tim neophodno je praćenje njihovog usavršavanja kako bi se održali informiranima o najnovijim standardima i praksama. Interni revizori trebaju biti nezavisni od utjecaja onih koje kontrolišu.

Međulaboratorijska poređenja

Međulaboratorijska poređenja igraju značajnu ulogu prilikom akreditacije laboratorije i predstavljaju važan element u ocjeni i osiguravanju kvalitete laboratorijskih rezultata. Kada laboratorija traži akreditaciju, akreditacijsko tijelo često traži dokaze o tome kako laboratorija usklađuje svoje rezultate s drugim laboratorijama.

Međulaboratorijska poređenja su postupci u kojima laboratorije uspoređuju svoje rezultate analiza s rezultatima drugih laboratorija. Ovaj proces igra ključnu ulogu u osiguranju kvalitete laboratorijskih rezultata, pruža povjerenje u tačnost i preciznost mjerenja te pomaže identificiranju i rješavanju potencijalnih problema. Laboratorije se obično pridružuju programima međulaboratorijskih poređenja koje organiziraju relevantna tijela, institucije ili udruženja. Sudjelovanje u tim programima omogućava laboratorijama da uspoređuju svoje

rezultate s rezultatima drugih laboratorija. Uzorci koji se koriste u međulaboratorijskim poređenjima često su poznati materijali s već poznatim koncentracijama ili karakteristikama. Laboratorijama se šalju slijepi uzorci, znači, ne znaju unaprijed njihove stvarne karakteristike. Laboratorije analiziraju pristigle uzorke koristeći svoje uobičajene postupke i metode. Rezultate analiza dostavljaju organizatoru programa međulaboratorijskih poređenja. Organizatori programa prikupljaju rezultate od svih sudionika. Analiziraju se rezultati kako bi se procijenila preciznost i tačnost svake laboratorije.

Svaki laboratorij dobiva povratne informacije o vlastitim rezultatima u odnosu na rezultate drugih laboratorija. Povratne informacije obično uključuju statističke podatke o odstupanjima, standardnim devijacijama i slično. Ako laboratorija primijeti odstupanja u svojim rezultatima u odnosu na druge, poduzimaju se korektivne mjere. Ove mjere mogu uključivati reviziju metoda, poboljšanje opreme, dodatnu obuku osoblja itd. Međulaboratorijska poređenja su obično redovna, što omogućava laboratorijama kontinuirano praćenje svojih performansi i poboljšanja s vremenom.

Procjena na licu mjesta

Procjenu na licu mjesta će provesti tim od dva ili tri ocjenjivača, u zavisnosti od veličine laboratorije. Barem jedan od ocjenjivača je stručnjak iz oblasti ispitivanja laboratorije ili kalibracije. Procjena na licu mjesta sastoji se od sljedeće tri faze:

- sastanak otvaranja;
- procjena ili revizija;
- sastanak zatvaranja.

Priprema

- Definiranje ciljeva i opsega procjene;
- Priprema dokumentacije koja će biti predmet procjene;
- Uspostavljanje komunikacije između akreditacijskog tijela i laboratorija.

Dolazak i predstavljanje:

- Dolazak tima za procjenu na mjesto;
- Formalno predstavljanje članova ocjenjivačkog tima i članova laboratorijskog osoblja;
- Ponovno usaglašavanje ciljeva i opsega procjene.

Pregled dokumentacije:

- Potvrda valjanosti dokumentacije koja se odnosi na postupke i prakse laboratorija;
- Procjena sukladnosti s relevantnim standardima.

Fizički pregled:

- Pregled infrastrukture, opreme i radnih prostora;
- Evaluacija pridržavanja propisanih standarda sigurnosti, zaštite okoliša i zdravlja.

Intervjuiranje osoblja:

- Razgovor s ključnim članovima osoblja o njihovim ulogama, odgovornostima i pridržavanju procedura;
- Utvrđivanje nivoa svijesti o kvaliteti i postupcima.

Provjeravanje usklađenosti:

- Provjera da li je laboratorij usklađen s propisima i standardima;
- Identifikacija potencijalnih neusaglašenosti i rizika.

Analiza uzoraka i rezultata:

- Procjena laboratorijskih testiranja putem analize uzoraka;
- Provjera ispravnosti rezultata i usklađenosti s propisima.

Izvještavanje:

- Priprema izvještaja o procjeni koji uključuje identificirane neusaglašenosti, preporuke i pohvale;

- Pregled izvještaja s osobljem laboratorije radi provjere tačnosti.

Završni sastanak i odluka o akreditaciji

Na osnovu rezultata procjene, akreditacijsko tijelo donosi odluku o dodjeli ili odbijanju akreditacije. Ako je potrebno, daju se smjernice za ispravak neusaglašenosti. Identificirane neusaglašenosti laboratorija je u obavezi ispraviti i poduzeti korektivne radnje kako bi spriječila ponovno pojavljivanje, ako je to prikladno. Sve neusaglašenosti zahtijevaju pisanu reakciju s objašnjenjem kako je neusaglašenost ispravljena i koje su mjere poduzete kako bi se spriječilo ponovno pojavljivanje. Obično akreditacijsko tijelo daje rok između 60 i 90 dana da laboratorija da svoj odgovor. Nakon što ocjenitelji budu zadovoljni odgovorom laboratorije, neusaglašenosti će biti zatvorene i akreditacijsko tijelo donijet će odluku o akreditaciji.

Izazovi u procesu akreditacije

Standardi poput ISO/IEC 17025 često su opsežni i precizni. Laboratorije se suočavaju s izazovom u interpretaciji i implementaciji svih detalja standarda, odnosno prilagođavanju svojih postojećih praksi prema zahtjevima standarda.

Postupak akreditacije može zahtijevati značajna finansijska ulaganja. Laboratorije moraju osigurati sredstva za obuku osoblja, nabavku nove opreme ili ažuriranje postojeće te prilagoditi infrastrukturu. Proces akreditacije može trajati duže od očekivanog, s obzirom na sve faze koje uključuju pripremu dokumentacije, inspekciju, izradu izvještaja te obradu potrebnih promjena i ispravaka. Implementacija novih procedura i pridržavanje standarda zahtijeva temeljitu obuku osoblja. Osiguravanje da svi članovi tima razumiju i primjenjuju propisane postupke može biti izazov, posebno ako se radi o promjenama u postojećim rutinama. Tokom procesa akreditacije mogu se pojaviti neočekivani problemi, kao što su tehničke poteškoće ili administrativni izazovi, koji zahtijevaju hitna prilagođavanja i rješavanja.

Uvođenje promjena u postojeće metode i procese može izazvati otpor unutar laboratorije. Osoblje može doživjeti izazove prilikom

prilagođavanja novim standardima i postupcima. Osiguravanje da osoblje posjeduje potrebno znanje i iskustvo, pogotovo u specifičnim područjima koja su predmet akreditacije, može biti izazov, a može biti potrebna i obuka ili zapošljavanje novih stručnjaka. Nakon postizanja akreditacije, laboratorija mora aktivno održavati postignuti standard. Ovo uključuje redovno ažuriranje postupaka, prilagođavanje promjenama standarda i kontinuirano osiguravanje kvalitete.

Jasna i učinkovita komunikacija s akreditacijskim tijelom ključna je tokom cijelog procesa. Bilo kakvi nesporazumi ili nepreciznosti u komunikaciji mogu uzrokovati dodatne poteškoće u postizanju akreditacije. Sve ove izazove laboratorije moraju pažljivo adresirati kako bi uspješno prošle kroz proces akreditacije i održavale visoke standarde kvalitete u svom radu.

Budućnost akreditacije

U budućnosti, tehnološke inovacije će igrati ključnu ulogu u procesu akreditacije. Korištenje digitalnih alata, automatizacija i analitika podataka poboljšat će efikasnost akreditacije i omogućiti brže reakcije na promjene u standardima. Stremljenje ka globalnoj harmonizaciji akreditacionih standarda postaje sve značajnije. Ovo će olakšati organizacijama koje posluju na internacionalnom nivou da se usaglasе s različitim standardima i olakšat će razmjenu informacija između akreditacionih tijela širom svijeta.

U skladu s rastućom svijesti o održivosti, akreditacija će vjerovatno postati sredstvo za ocjenu i promociju održivih praksi u laboratorijama. Standardi vezani za ekološku odgovornost i društvenu svijest postat će integralni dio procesa akreditacije. U zaključku, proces akreditacije nije samo formalnost, već ključni element za postizanje visokih standarda kvaliteta. Kroz planiranje, obuku, internu reviziju i saradnju s akreditacionim tijelom, laboratorije mogu uspješno implementirati akreditaciju i ostvariti brojne prednosti koje donosi.

4. VALIDACIJA I VERIFIKACIJA MOLEKULARNIH METODA

Molekularna genetika je ključna disciplina u savremenoj nauci koja omogućava analizu DNK i RNK na molekularnom nivou. Metode molekularne genetike često se koriste u različitim područjima, uključujući biomedicinska istraživanja, forenziku, poljoprivredu i biotehnologiju. Kako bi se osigurala pouzdanost i tačnost rezultata dobivenih ovim metodama, neophodno je provesti proces validacije i verifikacije.

Validacija i verifikacija su dinamični procesi koji zahtijevaju kontinuirano praćenje i održavanje kako bi se osigurala konzistentnost i pouzdanost metode tokom vremena. Predstavljaju ključne korake u osiguravanju kvalitete, pouzdanosti i preciznosti u ovim analitičkim tehnikama. Ovi procesi osiguravaju da su rezultati tačni, precizni i pouzdani, te da su usklađeni sa standardima i regulativama.

Svaka laboratorija nastoji brzo, precizno i pouzdano dobiti rezultate svojih aktivnosti, primjenjujući odgovarajuće metode ispitivanja, kalibracije i uzorkovanja. Važno je pažljivo odabrati metodu kako bi se postigao željeni cilj u laboratorijskim uslovima. To zahtijeva provjeru metode kako bi se osiguralo da je prikladna za svrhu testiranja. Ovo se postiže putem verifikacije i validacije.

Nove smjernice norme BAS EN ISO/IEC 17025:2018 posebno ističu važnost odabira, verifikacije i validacije metode. Ove smjernice osiguravaju da metoda ispitivanja, kalibracije ili uzorkovanja odgovara svrsi za koju je namijenjena, što omogućava klijentima da imaju povjerenje u rezultate koje dobiju. Metoda obuhvata ne samo postupak izvođenja određenog procesa i obradu podataka već i alate, reagense, uređaje, platforme, računarske izračune i softver koji se koriste u njezinoj primjeni. Svi ovi elementi moraju biti dobro usklađeni kako bi laboratorija postigla očekivane rezultate, zbog čega je ključno temeljito odabrati i pregledati metodu koju će koristiti.

Jedan od zahtjeva EN ISO/IEC 17025 je da metode korištene u laboratorijama za ispitivanje trebaju biti validirane i verificirane.

Budući da EN ISO/IEC 17025 utvrđuje samo opći standard, uloga stručnjaka u određenom području je pružiti detaljnije preporuke.

Ovo poglavlje nudi osnovni pregled ključnih aspekata validacije i verifikacije molekularnogenetičkih metoda, ali važno je napomenuti da detalji validacije i verifikacije mogu varirati zavisno od specifične metode i svrhe za koju se koristi. Mogu postojati i drugi načini za validaciju i verifikaciju određenog protokola ili instrumenta. Bez obzira na kriterije za validaciju sistema, moraju pružiti dokaze da su postupci i instrumenti prikladni za svrhu za koju se koriste prema EN ISO/IEC 17025. Također je apsolutna potreba da rezultati budu u saglasnosti s međunarodnim standardima kako bi se osiguralo da dobiveni rezultati budu usporedivi između laboratorija.

Validacija predstavlja postupak ispitivanja općih karakteristika određene metode, a obično je provodi proizvođač, posebno iz laboratorijske perspektive. S druge strane, verifikacija uključuje potvrdu općih karakteristika analitičke izvedbe metode, prema postavljenim specifikacijama proizvođača. Proizvođač najčešće provodi validaciju metode analitičkih sistema, dok korisnik, tj. laboratorija, izvodi verifikaciju kako bi potvrdila primjenjivost karakteristika u stvarnom radu. U situacijama gdje se vrši modifikacija proizvođačeve metode ili uvođenje potpuno nove metode u vlastitu laboratoriju (poznato kao *in house* metoda), nužno je provesti postupak validacije kako bi se osigurala adekvatna pouzdanost i preciznost rezultata. Proces validacije molekularnogenetičkih metoda sastoji se od nekoliko ključnih koraka.

Planiranje

Proces započinje izradom plana validacije i uključuje odluke zasnovane na kliničkoj potrebi za testom, npr. trenutnim epidemiološkim studijama, kontrolom infekcija ili probiru. Postoje razlike između nivoa validacije koje laboratorije provode prilikom uvođenja komercijalnih ili testova koji su razvijeni u samoj laboratoriji (*in house* testovi). Laboratorija koji uvodi komercijalni test mora utvrditi da se tvrdnje proizvođača o performansama mogu reproducirati. Nakon što su zadovoljene karakteristike performansi testa, bilo komercijalnog ili

u laboratoriji razvijenog, validacija se mora nastaviti svakodnevno. To uključuje kontinuirano praćenje nivoa unutarnjih i vanjskih pozitivnih kontrola kako bi se osiguralo održavanje statusa validiranog testa.

Izvođenje eksperimenata

Nakon što se planira validacija, provode se eksperimenti ili testiranja kako bi se prikupili podaci o performansama metode. Ovo uključuje testiranje ponovljivosti (reproducibilnosti), preciznosti, osjetljivosti, specifičnosti i drugih relevantnih parametara.

Analiza rezultata i dokumentiranje

Nakon prikupljanja podataka, rezultati se analiziraju kako bi se utvrdilo ispunjavaju li metoda i rezultati kriterije za prihvatljivost. Analiza podataka često uključuje statističke metode za procjenu preciznosti i tačnosti metode. Svi detalji o planiranju, izvođenju eksperimenata i analizi rezultata trebaju biti dokumentirani na jasan i sistematičan način. To uključuje pisanje izvještaja o validaciji koji će biti dio dokumentacije o metodi.

Održavanje

Validacija metode nije statički proces. Ona zahtijeva kontinuirano praćenje i održavanje kako bi se osiguralo da metoda ostane ispravna i pouzdana tokom vremena. Bilo kakve promjene u metodi ili uslovima moraju biti ponovo validirane.

Pripremna razmatranja

U ovoj fazi bitno je voditi računa o tri varijable koje mogu utjecati na performanse metode i moraju se uzeti u obzir:

- (1) Zavisno od interakcija između tipa uzorka i domaćina / patogena određuje se je li potreban kvalitativni ili kvantitativni test.
- (2) Odabir metode: biološki, tehnički i faktori vezani za laboratorijskog djelatnika koji mogu utjecati na sposobnost metode da otkrije specifični analit u određenoj vrsti uzorka. Svi testovi se smatraju multipleksnim, jer moraju uključivati koamplificiranu kontrolu ekstrakcije.

- (3) Rezultat: hoće li rezultat tačno predvidjeti status pojedinca ili populacije u odnosu na detektirani analit?

Različite vrste uzoraka (npr. tkivo, puna krv, likvor) mogu sadržavati inhibitore koji utječu na aktivnost enzima *Taq* polimeraze u PCR-u. Stoga je neophodno pažljivo odabrati metodu ekstrakcije DNK za svaku vrstu uzorka te imati opciju korištenja alternativne metode ekstrakcije. Nadalje, postavlja se pitanje treba li u multiplex testu identificirati više od jednog analita? Dostupnost pozitivnih kontrola ključna je za validacijski proces. Pozitivne kontrole koriste se kako bi se osiguralo da analiza konzistentno i precizno identificira analite od interesa.

Da bi se održala objektivnost u procesu validacije, važno je uspostaviti unaprijed određenu metodu za rješavanje eventualnih nesuglasica u rezultatima, koja treba biti navedena kao dio plana validacije prije početka testiranja. Unaprijed definiran plan pomaže osigurati dosljednost i pouzdanost u tumačenju rezultata i doprinosi općoj pouzdanosti procesa validacije.

Za validaciju metode mora biti uspostavljen plan osiguranja kvaliteta. Treba također razmotriti dostupnost pozitivnih kontrola za osiguranje kvaliteta. To može biti problem kod novih analiza usmjerenih npr. na rijetke mutacije, gdje takvi reagensi vjerovatno neće biti dostupni. U tom slučaju laboratorija može razmotriti saradnju s komercijalnim kompanijama kako bi proizvela odgovarajuće pozitivne kontrole. Nakon što se postavi zahtjev za testom, sljedeća odluka je hoće li se koristiti komercijalna analiza ili razviti analiza u laboratoriji (*in house* analiza). U SAD-u CLIA (*Clinical Laboratory Improvement Amendments*) specificira da laboratorije koje koriste testove koje je odobrila FDA moraju potvrditi da se specifikacije performansi proizvođača za tačnost, preciznost, izvještajni opseg i referentne intervale mogu replicirati. Za modificirane komercijalne testove također bi trebalo testirati sljedeće:

- (1) analitičku osjetljivost (engl. *limit of detection*, LOD);
- (2) analitičku specifičnost, uključujući inhibicijske tvari;
- (3) bilo koje druge performanse koje su potrebne za izvedbu metode.

Pri ocjenjivanju komercijalnog testa, također je potrebno verificirati proces ekstrakcije DNK. U većini slučajeva, proizvođačev protokol uključuje detalje o procesu ekstrakcije DNK koju treba koristiti. Međutim, test možda treba validirati s nekoliko različitih metoda ekstrakcije, zavisno od vrste dostupne opreme.

Plan validacije

Postoje brojni aspekti metode koji moraju biti kontinuirano praćeni tokom njene upotrebe u laboratoriji. Na primjer, mikroorganizmi, posebno virusi, često mutiraju. To znači da učinkovitost PCR-a treba biti praćena radi mogućih lažno negativnih rezultata, budući da to može biti prvi znak da je potrebno ažurirati i ponovo validirati prajmere i/ili probu. Proizvođači kontinuirano razvijaju nove puferske otopine, enzime i komplete za ekstrakciju. Laboratorija nove hemikalije mora procijeniti i, ako se uvedu u rad, ponovo verificirati, a test ponovo validirati. Stalno se uvode nove vrste hemikalija i proba i oni također zahtijevaju testiranje kako bi se održala ili poboljšala učinkovitost testa.

Iako svaki novi test može predstavljati poseban izazov, primjenjuju se osnovni kriteriji za validaciju, poput specifičnosti, osjetljivosti i reproduktivnosti, i bilo kakve specifične razlike mogu se lako uključiti. Prvi koraci uključuju odluke zasnovane na potrebi za testom, tj. na opsegu, svrsi i primjeni testa, te odluku o tome hoće li biti potreban komercijalni ili *in house* test (test razvijen u laboratoriji).

Tri druga ključna koncepta koja treba razmotriti u ovoj fazi su:

- (1) Određuje se potreba za kvalitativnim ili kvantitativnim testom.
- (2) Odabir metode obuhvata biološke, tehničke i faktore povezane s laboratorijskim osobljem koji mogu utjecati na sposobnost metode da otkrije određeni analit u specifičnom uzorku. Svi testovi se smatraju multipleksnim jer uključuju koamplifikaciju kontrolnih ekstrakcija.
- (3) Hoće li rezultat tačno predvidjeti status pojedinca ili populacije u odnosu na detektirani analit?

Referentni materijali i broj uzoraka

Prvo pitanje koje se javlja prilikom razvoja laboratorijskih testova jeste dostupnost uzoraka. Ukoliko nije dostupan dovoljan broj uzoraka, postavlja se pitanje jesu li dostupni negdje drugo? Ako nisu, mogu se konstruirati testni uzorci dodavanjem različitih koncentracija analita u odgovarajuću matricu. Druge izvore odgovarajućih uzoraka mogu činiti druge kliničke / istraživačke laboratorije ili komercijalni standardi, materijali za kontrolu kvalitete. Obično se koristi 100 uzoraka, od kojih su 50–80 pozitivni i 20–50 negativni primjerci.

Također treba razmotriti potencijalne inhibitore koji se mogu nalaziti u testiranim uzorcima. Stoga bi se kontrolni uzorci trebali pripremiti dodavanjem niskih koncentracija analita, s poznatim inhibitorima i bez njih, odgovarajućim negativnim uzorcima. Međutim, takvi umjetno konstruirani uzorci vjerovatno neće imati iste karakteristike kao klinički uzorci. Stoga, kada postane dostupan dovoljan broj pravih uzoraka, test i metode ekstrakcije morat će se ponovo procijeniti. Gdje su uzorci dostupni, možda će biti potrebno više od jednog tipa uzorka. Pretraživanje literature uvijek treba provesti kako bi se odredio tip uzoraka koji će se ocjenjivati i najefikasnija metoda ekstrakcije za svaki tip uzorka.

Broj uzoraka korištenih u validaciji određuje njezinu statističku moć, koja je mjera koliko se povjerenja može polagati u rezultate validacije. Stoga je veličina uzorka za validaciju konačno jedan od najvažnijih faktora u određivanju analitičke upotrebe testa. Nažalost, konkretne smjernice za određivanje veličine uzorka ne mogu se realno dati zbog mnogih faktora poput prirode ispitivanja performansi testa, kritičnih parametara, načina primjene testa i potrebnih nivoa pouzdanosti za kliničku upotrebu.

Postoji mnogo alata za određivanje veličine uzorka na osnovu određenih kriterija (npr. intervali pouzdanosti) koji su dostupni na internetu. Međutim, ograničavajući faktor često je dostupnost odgovarajućih pozitivnih kontrola, čak i u slučaju verifikacije koja zahtijeva manje rigoroznu analizu i manje uzoraka. Stoga je važno razumjeti statističku relevantnost odabrane veličine uzorka i kako

nivo pouzdanosti koji se može postići s tom veličinom uzorka utječe na korisnost testa. Svakako se preporučuju konsultacije sa statističkim stručnjakom, a sve treba pažljivo razmotriti u kontekstu kliničke upotrebe.

Ako je na raspolaganju dovoljan broj uzoraka, onda se izračunom vrši određivanje potrebnog broja uzoraka za validaciju. U idealnom slučaju to bi trebalo odrediti statističkom analizom, gdje se veličina uzorka potrebna za otkrivanje značajne razlike određuje standardnom devijacijom od razlike srednjih vrijednosti uparenih uzoraka korištenih u testu u razvoju i komparatoru zlatnog standardnog. Ovaj način omogućava ili 2% ili 5% izračunate pogreške u dijagnostičkoj osjetljivosti i specifičnosti. Tako, na primjer, uz pretpostavku greške od 2%, broj uzoraka potreban za test s 99% pouzdanošću i 99% procijenjenom osjetljivošću / specifičnošću je 164. Međutim, ako isti test postigne 95% procijenjenu osjetljivost / specifičnost, tada bi broj uzoraka potreban za postizanje visoke pouzdanosti (99%) bio 788.

Ključno je provesti validaciju bez prethodnog saznanja o stvarnom statusu svakog uzorka, što se naziva slijepa analiza, posebno kada su u pitanju kvalitativni testovi. Radi eliminacije sistemskih pogrešaka ili pristrasnosti, preporučuje se razmotriti redoslijed uzoraka, koji bi trebao biti što je moguće nasumičniji. Uvođenje redundantnosti u eksperiment, na primjer dupliciranjem uzoraka, može biti korisno kako bi se osigurala pokrivenost svih očekivanih rezultata. Iako ovo samo po sebi nije presudno za rezultate validacije, može značajno uštedjeti vreme ponavljanja neuspješnih analiza. Također, ovi podaci mogu poslužiti u procjeni preciznosti, uključujući ponovljivost i/ili reproduktivnost.

Parametri validacije

Parametri validacije koji se testiraju razlikuju se između različitih vrsta testova, kao i između kvalitativnih i kvantitativnih testova, ali uobičajeni parametri uključuju linearnost, specifičnost, osjetljivost, utjecaj matrice, selektivnost, ponovljivost i reproducibilnost. Za svaki parametar validacije trebalo bi postaviti aktivnosti koje će se provesti u laboratoriji, kao i kriterije prihvatljivosti za svaki od njih. Kriteriji

prihvatljivosti trebali bi odražavati i podatke o validaciji i specifikacije zahtjeva korisnika.

Linearnost testa mjeri proporcionalnost odgovora metode u odnosu na povećanje koncentracije analita unutar određenog raspona. Planira se izvođenje eksperimenta s prikladnim rasponom koncentracije ciljnog analita kako bi se demonstrirao opseg u kojem testni sistem proporcionalno reagira na rast koncentracije analita. Za procjenu linearnosti obično se koriste serijska razrjeđenja. Broj testiranih razrjeđenja zavisi od vrste testa; na primjer, standardna krivulja iz real-time PCR-a trebala bi uključivati barem pet standarda s razrjeđenjima od 10 puta, do granice detekcije. Ovim pristupom omogućava se precizno ocjenjivanje linearne veze između koncentracije analita i odgovora testnog sistema.

Specifičnost predstavlja sposobnost metode da detektira analit za koji je dizajnirana, a da ne reagira s drugim analitima u uzorku. Specifičnost se dokazuje ili dodavanjem različitih patogena uzorcima prije ekstrakcije ili dodavanjem ekstrahirane DNK ovih patogena uzorku koji se istražuje. Sve reakcije treba analizirati agaroznom gel elektroforezom kako bi se osiguralo da amplifikacija nije nastupila u bilo kojem od uzoraka kod kojih se očekuje da budu negativni. U nekim slučajevima može doći do nespecifične amplifikacije, što se možda neće detektirati probom. To će ugroziti osjetljivost metode i mora biti eliminisano, ili ponovnim procjenjivanjem uslova PCR (obično povećanjem annealing temperature), ili po mogućnosti redizajniranjem prajmera.

Osjetljivost je sposobnost metode da detektira veoma niske koncentracije određenog analita u biološkom uzorku. Analitička osjetljivost predstavlja sinonim za limit detekcije, tj. najnižu koncentraciju analita koja se konzistentno detektira u $\geq 95\%$ uzoraka testiranih s prihvatljivom preciznošću. Za dijagnostičke testove, limit detekcije obično se određuje korištenjem serije razblaženja pozitivnih kontrola. Prilikom određivanja limita detekcije važno je uključiti negativnu kontrolu. Za određivanje limita detekcije Američki institut za kliničke i laboratorijske standarde predlaže najmanje 60 podataka

(12 odvojenih mjerenja iz svakog od 5 uzoraka) od proizvođača kako bi se uspostavio LOD. Ovo se čini razumnim pristupom kako za metodu razvijenu u laboratoriji tako i za komercijalno proizvedene testove i pružit će potrebna mjerenja varijacija unutar testa. Ovo mjerenje treba također provesti na drugoj PCR mašini kako bi se utvrdila varijacija od mašine do mašine. Procjena limita detekcije obično se vrši probit analizom, vrstom regresije korištene za analizu binarnih odgovora, gdje se sigmoidna doza-odgovor kriva transformiše u ravnu liniju koja se može analizirati regresijom putem metoda najmanjih kvadrata ili maksimalne vjerodostojnosti. Za PCR testove, najniža koncentracija analita koja se može detektirati s navedenom vjerovatnoćom može se odrediti grafikonom podataka od pozitivnih repliciranih rezultata u odnosu na koncentraciju analita.

Utjecaj matrice odnosi se na biološki materijal ili uzorak u kojem se provodi analiza u molekularnobiološkim metodama. Utjecaj matrice tokom validacije ovakvih metoda ima značajan doprinos pouzdanosti i preciznosti rezultata. Matrica može sadržavati tvari koje inhibiraju enzimске reakcije ili uzrokuju interferenciju s reakcijama amplifikacije, kao što je PCR, što značajno utječe na učinkovitost metode. Stoga je od suštinske važnosti provesti testiranje kako bi se razumjelo kako matrica utječe na detekciju ciljnog analita. Postupci ekstrakcije molekula iz matrice igraju ključnu ulogu jer matrica može sadržavati tvari koje otežavaju ekstrakciju ili dovode do gubitka ciljnog materijala, što može narušiti kvantitativnu tačnost rezultata. Često je potrebno dodatno optimizirati postupke kako bi se ispravile ove poteškoće. Varijabilnost bioloških uzoraka, koja se često manifestira u različitom sastavu i kvaliteti, također je bitan faktor koji se mora uzeti u obzir prilikom validacije. Preporučuje se izvođenje standardne krivulje unutar same matrice uzorka kako bi se procijenilo kako prisutnost matrice utječe na kvantifikaciju ciljnog analita, omogućavajući potrebne ispravke za postizanje tačnih rezultata. Sveukupno, validacija molekularnobioloških metoda zahtijeva temeljito razumijevanje utjecaja matrice na analizu kako bi se osigurala preciznost i pouzdanost rezultata, posebno pri radu s raznolikim biološkim uzorcima.

Selektivnost se odnosi na sposobnost metode da prepozna i detektira određeni ciljni gen ili sekvencu, bez značajnih interferencija od drugih gena ili nepoželjnih komponenata u uzorku. Selektivnost je ključna karakteristika jer omogućava precizno i specifično određivanje prisutnosti ili količine određenog genetičkog materijala. Ova svojstva posebno su važna u analizama DNK ili RNK gdje se traže specifične genske mutacije. Na primjer, pravilno dizajnirani prajmeri su ključni za postizanje selektivnosti. Oni moraju biti specifični za ciljane sekvence i spriječiti neželjene reakcije s drugim dijelovima genoma. U praksi, provodi se pažljiva optimizacija i validacija molekularnogenetičkih metoda kako bi se osigurala visoka selektivnost. To uključuje testiranje na pozitivne i negativne kontrolne uzorke, evaluaciju specifičnosti prajmera te praćenje i analizu potencijalnih interferencija iz različitih izvora. Selektivnost igra ključnu ulogu u postizanju tačnih i pouzdanih genetičkih analiza.

Ponovljivost i reproducibilnost su ključni koncepti u validaciji molekularne metode. Ovi termini se odnose na sposobnost metode da proizvede konzistentne rezultate kada se isti eksperiment ponovi u istim ili sličnim uslovima.

Ponovljivost se odnosi na sposobnost metode da proizvodi konzistentne rezultate kada se isti eksperiment ponavlja pod istim uslovima. Drugim riječima, ako isti istraživač ponavlja isti eksperiment više puta, očekuje se da će rezultati biti slični ili identični. Ponovljivost je važna jer omogućava pouzdano procjenjivanje tačnosti i preciznosti metode. Ponovljivost stoga predstavlja "preciznost unutar serije".

Reproducibilnost se odnosi na sposobnost metode da daje slične rezultate kada se eksperiment ponavlja u drugim laboratorijama ili pod drugim uslovima. Ako druga laboratorija ili istraživač ponove isti eksperiment koristeći iste ili slične metode, očekuje se da će dobiveni rezultati biti usporedivi. Reproducibilnost je ključna za vjerodostojnost rezultata i generalizaciju nalaza.

Važno je napomenuti da ponovljivost i reproducibilnost nisu uvijek potpuno iste i mogu varirati zavisno od različitih faktora, poput kompleksnosti metode, laboratorijskih uslova i iskustva istraživača. U

svakom slučaju, cilj je osigurati da metoda bude pouzdana u svojoj primjeni.

Inhibicija i unakrsna kontaminacija su dva važna aspekta koji se moraju uzeti u obzir prilikom validacije svih laboratorijskih metoda. Ukratko ćemo objasniti njihovu važnost:

Inhibicija kod molekularnih metoda obuhvata faktore koji inhibiraju ili sprečavaju amplifikaciju PCR produkata i mogu biti prisutni u ekstraktima iz različitih izvora. Inhibitori obično djeluju na sljedeći način:

- (1) ometaju lizu ćelija neophodnu za ekstrakciju DNK,
- (2) degradiraju nukleinske kiseline,
- (3) inhibiraju aktivnost *Taq* polimeraze tokom amplifikacije ciljnog segmenta DNK, što dovodi do lažno negativnih rezultata ili netačne kvantifikacije.

Različite vrste uzoraka imaju različite probleme zbog raznolikosti endogenih inhibitora, na primjer, u fekalnim uzorcima mogu biti prisutni kompleksni polisaharidi, produkti razgradnje hemoglobina i žučne kiseline, i potrebno je pažljivo razmotriti metod ekstrakcije DNK. Drugi potencijalni inhibitori uključuju metabolite nastale usljed patoloških stanja kao što su dijabetes mellitus i hepatitis, ili od lijekova koji se koriste u liječenju. Proizvođači nastavljaju razvijati svoje PCR komplete kako bi prevazišli mnoge uobičajene endogene inhibitore koji se nalaze u kliničkim uzorcima, te se preporučuje evaluacija različitih komercijalnih kompleta za amplifikaciju u vezi s njihovim performansama u tom smislu.

Kao što je već spomenuto, inhibitori se mogu detektirati pomoću interne PCR kontrole. Ako se PCR kontrola ne amplificira ili pokazuje potiskivanje ispod prihvatljivog praga, amplifikacija ciljanog DNK segmenta može također biti inhibirana. Kako bi se izbjeglo smanjenje osjetljivosti testova, interne PCR kontrole trebalo bi koristiti pri najnižim koncentracijama koje se mogu amplificirati kako bi se smanjila bilo kakva konkurencija između njegove amplifikacije i amplifikacije ciljnog segmenta.

Unakrsna kontaminacija kod molekularnih metoda predstavlja situaciju u kojoj uzorci ili reagensi namijenjeni analizi jednog uzorka dospiju u kontakt s drugim uzorcima ili reagensima, što može dovesti do neželjenog prenošenja genetičkog materijala ili drugih molekula između uzoraka. To može dovesti do pogrešnih rezultata analize i iskrivljavanja podataka.

Kod molekularnih metoda, kao što su PCR, sekvenciranje DNK i slično, vrlo je važno osigurati čistu radnu okolinu i pravilno rukovanje uzorcima i reagensima kako bi se spriječila unakrsna kontaminacija. To uključuje korištenje pipeta, tubica, centrifuga i drugih laboratorijskih alata koji su čisti te provođenje postupaka u prostorijama s kontrolisanom sterilnošću. Postoje različiti načini kako se može spriječiti unakrsna kontaminacija, uključujući:

- korištenje pipeta s barijerama ili jednokratnih pipeta kako bi se izbjeglo kontaminiranje samih pipeta;
- korištenje različitih prostornih zona ili čak laboratorijskih prostorija za pripremu, obradu i analizu uzoraka;
- redovno čišćenje radnih površina i opreme dezinfekcijskim sredstvima kako bi se uklonile potencijalne kontaminacije;
- provjera negativnih kontrola koje se uvode u analizu kako bi se detektirala unakrsna kontaminacija;
- upotreba odgovarajućih zaštitnih odijela, rukavica i drugih osobnih zaštitnih sredstava kako bi se izbjeglo unošenje kontaminacije od strane laboratorijskog osoblja.

Osim toga, laboratorije često implementiraju protokole za rukovanje uzorcima koji minimiziraju rizik od unakrsne kontaminacije, kao što su određivanje redoslijeda dodavanja reagensa, korištenje fizički odvojenih radnih površina za pripremu različitih uzoraka te korištenje pozitivnih i negativnih kontrola kako bi se pratila kvaliteta i pouzdanost rezultata.

Protokol validacije uključuje dvije faze: studiju poređenja *in house* metode s referentnom metodom te studiju međulaboratorijskog poređenja. Tehnička pravila za ova dva procesa zavise od toga je li *in house* metoda kvalitativna ili kvantitativna. Kvalitativne metode

uspoređuju tačnost i osjetljivost nove metode s referentnom, dok se kod kvantitativnih metoda provjerava linearnost, granice detekcije, kvantifikacije i specifičnost. U konačnici, usporedna studija pruža ključne informacije o performansama nove molekularne metode i omogućava donošenje informirane odluke o prihvatljivosti te metode za daljnju primjenu u laboratorijskoj praksi.

Studija međulaboratorijskog poređenja osigurava konzistentnost rezultata između različitih laboratorija. Konačan dokaz prikladnosti testa je njegovo uspješno integriranje u druge laboratorije. Reagensi i uzorci korišteni za usporednu studiju trebali bi biti poslani barem u tri laboratorije koje su spremne sudjelovati u testiranju. Ovo će također pružiti dodatne podatke o reproduktivnosti i robusnosti testa.

Nakon što je validacija testa prihvaćena (tj. upotreba i tačnost su ocijenjene kao prikladne za namijenjenu dijagnostičku svrhu), test je spreman za dijagnostičku primjenu. Međutim, to nije kraj evaluacije performansi. Specifikacija performansi koja proizlazi iz validacije trebala bi se koristiti za procjenu "valjanosti" svakog testa i ove informacije trebaju se dodavati datoteci za validaciju u odgovarajućim intervalima. U mnogim slučajevima, akumulacija podataka tokom vremena važna je dodatna komponenta validacije koja se može koristiti za neprestano poboljšavanje procjene tačnosti i kvalitete testa. Kontinuirana validacija trebala bi uključivati rezultate interne kontrole kvaliteta, eksternu kontrolu kvaliteta i neusaglašenosti povezane s testom ili tehnikom kad je to primjereno.

Verifikacija

Cilj ovog procesa je provjeriti može li laboratorija koja namjerava koristiti određenu metodu zadovoljiti dokumentirane karakteristike izvedbe opisane tokom validacije. Drugim riječima, verifikacija pokazuje da laboratorija može izvršiti test. Pomaže istraživačima da pokažu izvodljivost metode u njihovoj laboratoriji. Laboratorije bi trebale verificirati metodu svaki put kada počnu koristiti novu metodu, kada se mijenja bilo koji parametar u laboratoriji koji utječe na samu metodu, kada se validirana metoda inovira.

S obzirom na karakteristike same metode koja se verificira, potrebno je odabrati nekoliko značajki za verifikaciju i osigurati da laboratorija može koristiti metodu kako bi postigla tačne rezultate. Obično je prilikom verifikacije metode dovoljno provjeriti preciznost – u koju spada ponovljivost, međulaboratorijska preciznost i mjerna nesigurnost, obnovljivost, robusnost i osjetljivost. Ovdje ćemo se malo više dotaći pojma mjerna nesigurnost, jer su ostali pojmovi već opisani prilikom validacije metode.

Mjerna nesigurnost

Potreba za procjenom mjerne nesigurnosti proizlazi iz potrebe za usklađenošću rezultata laboratorijskih testiranja. Prema standardu EN ISO 15189, mjerna nesigurnost je faktor povezan s rezultatom mjerenja koji opisuje raspršenost vrijednosti koja bi se mogla opravdano pripisati mjerenoj veličini. Drugim riječima, mjerna nesigurnost označava opseg vrijednosti unutar kojega se rezultat mjerenja vjerovatno nalazi, s jednakom vjerovatnošću unutar cijelog opsega.

Mjerna nesigurnost ne odražava grešku mjernog sistema, već promjenjivost mjernih uslova, što je ključna karakteristika rezultata mjerenja. Izvori varijabilnosti u laboratorijskom procesu obuhvataju sve pojave koje doprinose nesigurnosti rezultata mjerenja i mogu se identificirati u svim fazama – preanalitičkoj, analitičkoj i postanalitičkoj.

Korištenjem proširene mjerne nesigurnosti s faktorom proširenja $k=2$, izražava se mjerna nesigurnost za 95% rezultata mjerenja. Informacija o mjerenoj nesigurnosti ima praktičnu primjenu u procjeni značajnosti razlika između dva mjerenja, kao i u postavljanju analitičkih ciljeva kvalitete. Proširena mjerna nesigurnost (U) računa se koristeći formulu u kojoj je CV koeficijent varijacije:

$$U = 2 \times CV_u$$

Dobivena vrijednost uspoređuje se s odabranim kriterijem prihvatljivosti.

Organizacija je ključna za uspješnu verifikaciju validirane metode; to uključuje planiranje vremenskog okvira, naručivanje svih reagenasa, potrošnog materijala i referentnih materijala koji su potrebni, osiguravanje da je ispravna oprema dostupna i kalibrirana te dokumentiranje plana verifikacije. Korisno je isprobati metodu prije početka verifikacije. To može biti jednostavan zadatak, gdje se koristi nekoliko uzoraka s dodatkom ili pozitivnih i negativnih kontrola, te se izvodi metoda. Ovo će omogućiti istraživaču da se upozna s metodom i procijeni laboratorijsko okruženje i opremu. Ovaj postupak također treba pomoći u pripremi plana verifikacije i može istaknuti eventualne promjene koje treba izvršiti prije početka verifikacije. Te promjene mogu uključivati nabavku opreme ili potrošnog materijala, izmjene u samoj laboratoriji ili traženje obuke za metodu.

Planiranje verifikacije jedan je od najvažnijih koraka u pripremi za akreditaciju molekularne metode. Plan bi trebao biti oblikovan iz niza laboratorijskih aktivnosti koje osiguravaju da korisnik može reproducirati podatke o validaciji. To se postiže izvođenjem podskupa aktivnosti za parametre navedene u dokumentu o validaciji. Plan verifikacije može također uključivati komponente specifične za testni laboratorij koje se ne nalaze u dokumentu o validaciji. Na primjer, verifikacija sistema može se koristiti kako bi se testirala učinkovitost pomoćnih dijelova laboratorijskog testnog sistema, uključujući prijem uzorka, praćenje uzorka i pisanje rezultata.

Nakon što je plan napisan, organizacija laboratorijskog rada trebala bi biti puno lakša. Osiguravanje da postoje svi potrebni uređaji, potrošni materijali, reagensi i referentni materijali omogućit će glatko odvijanje procesa. Istraživač koji provodi verifikaciju treba imati dobro predznanje u vezi s metodom jer će tokom postupka verifikacije vjerovatno biti potrebna prilagođavanja planu. Fleksibilan pristup vremenskim okvirima može biti koristan kako bi se uzeli u obzir nepredviđeni problemi, poput unakrsnih kontaminacija i neuspjelih reakcija. To su česti problemi prilikom izvođenja molekularnih metoda po prvi put. Dodatni koraci čišćenja i dobra laboratorijska praksa tokom postupka mogu prevladati ovaj problem.

Tokom analize rezultata, podaci dobijeni tokom verifikacije uspoređuju se s kriterijima prihvatanja, kako je navedeno u postupku provjere. Ako rezultati ne zadovolje kriterije prihvatanja, treba provesti istragu. Ako se uzrok neuspjeha može razumno objasniti, dio verifikacije može biti ponovljen. Važno je istražiti uzroke i poduzeti korektivne mjere kako bi se osiguralo da se ne ponavljaju. Svi podaci trebaju biti zabilježeni, čak i ako su vidljivi neuspjesi i potrebni su ponovljeni testovi. Tehnička podrška od dobavljača kompleta mogla bi biti korisna u ovom trenutku. Analiza rezultata nekih metoda ili kompleta je jednostavna; rezultati se izvještavaju kao detektirani ili nedetektirani. Drugi mogu zahtijevati više tehničkog znanja i nešto interpretacije.

Izvještaj o verifikaciji bit će osnova koja će pokazati da laboratorij može učinkovito provoditi metodu i reproducirati podatke dobijene tokom validacije. Ovaj izvještaj može se dostaviti tijelu za akreditaciju prilikom podnošenja zahtjeva za akreditaciju. Dokument bi trebao biti jasno napisan, tako da procjenitelj može pregledati dokument, pratiti šta je učinjeno, dobivene rezultate i opravdanje za akreditaciju metode. Izvještaj može sadržavati sljedeće:

Sažetak validacije od strane dobavljača

Podaci o validaciji i relevantne akreditacije koje dobavljač ima za komplet, trebali bi biti uključeni. Ovaj dokument će postaviti postupak verifikacije u kontekst i pokazati karakteristike performansi kompleta.

Postupak verifikacije

Ovo će pokazati koje su laboratorijske aktivnosti bile planirane, zasnovane na podacima o validaciji dobavljača.

Rezultati verifikacije

Rezultati verifikacije trebali bi biti jasno i nedvosmisleno prikazani kako bi ocjenjivač mogao razumjeti koje su rezultate dobili tokom verifikacije. Ako se koriste specijalizirani programi za dobijanje i analizu podataka, na primjer elektroferogrami, može biti korisno koristiti anotirane snimke zaslona.

U izjavi bi trebalo biti navedeno kako se rezultat uspoređuje s postavljenim kriterijima prihvatanja. Gdje god kriteriji nisu ispunjeni, trebalo bi pružiti objašnjenje, a svaki ponovljeni rad trebao bi biti jasno naznačen.

Analiza podataka

Detalji bilo koje analize podataka trebali bi biti jasno prikazani. To može uključivati statističku analizu, poređenje skupova podataka i grafičko prikazivanje.

Zaključak

Zaključak je najvažniji dio izvještaja o verifikaciji. Navodi da li je postupak verifikacije pokazao da je metoda, kako je izvedena u laboratoriji, prikladna za svoju svrhu. Ovaj zaključak trebao bi se zasnivati na tome kako rezultati ispunjavaju kriterije prihvatanja, koji, pak, proizlaze iz podataka o validaciji i specifikacije korisničkih zahtjeva.

Validacija i verifikacija imaju dvije slične, ali jasno različite uloge u testiranjima. Dok prva daje bitne informacije o performansama testne metode, druga pokazuje da su rezultati laboratorija u skladu s načinom na koji je test dizajniran da se izvede.

5. HISTORIJAT LABORATORIJSKO-TEHNOLOŠKIH EKSPERIMENATA I ANALIZA

Odrediti tačno vrijeme početka laboratorijskih eksperimenata vrlo je teško. Čovjek je bez sumnje kroz svoj razvoj promatrao okolinu i zaključivao o njoj. U jednom trenutku počeo je da spoznaje o pojavama mijenjajući okolinu i sagledavajući promjene oko sebe. Laboratorijski eksperiment počinje onda kada tehnološki uvjeti, tj. u početku razvoj sofisticiranijih alata, a kasnije uređaja, dozvoljavaju. Također, interdisciplinarni pristup omogućava spoznaje, a primjer za to je medicinska biohemija koja se razvila na temeljima fizike, matematike, biologije, hemije i medicine. U 19. vijeku ova nauka je nazvana “patološka” ili “medicinska hemija”, da bi kasnije bio uveden naziv “medicinska biohemija” koji je zadržan do današnjih dana. U drugoj polovini 20. vijeka uvodi se naziv “klinička hemija”. Prema definicijama, klinička hemija proučava hemijske aspekte zdravih i oboljelih uz primjenu hemijsko-laboratorijskih metoda kojim se dolazi do rezultata ispitivanja relevantnih za prevenciju oboljenja, dijagnozu i kontrolu tretmana oboljenja. Medicinska biohemija istovremeno je i fundamentalna i primijenjena nauka, koja se bavi proučavanjem hemijskog sastava tjelesnih tečnosti (npr. krv, urin, likvor itd.) i tkiva.

Historija laboratorijskih eksperimenata

Početak historijata eksperimenata vezuje se za antičko doba. Iako je u vrijeme antičkih Grka jasno bilo zabranjeno istraživati na ljudima radi sticanja znanja, istraživanja s ciljem unapređenja zdravlja bila su dozvoljena. Aristotel je znatiželjno proučavao raznolikost prirode te je secirao životinjska trupla da bi mogao izraditi vjerne anatomske slike. No, u principu nije bio zagovornik eksperimentalne metode smatrajući da se stvaranjem umjetnih uvjeta mijenja narav pojave koju želimo proučiti. Postoji zapis da je u starom Egiptu Kleopatra davala osuđenima na smrt razne otrove kako bi izabrala onaj koji će joj omogućiti najbezbolnije samoubojstvo u slučaju potrebe. Također ju je zanimala tačnost tadašnjeg vjerovanja da je potrebno 40 dana da se formira muški fetus i 80 dana da se formira ženski. U cilju rješavanja “dileme”, naredila je da se oplode njezine sluškinje osuđene na smrt

kako bi ih kasnije mogla podvrgnuti operacijama na kojima bi se otvarala njihova materica i tako odredilo trajanje trudnoće i proučio razvoj ploda. U zapisima rimskog enciklopediste Celza navodi se kako su Herofil iz Halkedona i Eristrat s Kosa secirali zločince koje su kraljevi puštali iz zatvora i “davali” njima na raspolaganje. Zapisi samih Herofila i Eristrata ukazuju na seciranje ljudskih trupala i izvođenja eksperimenata na živim životinjama. Galen je u velikom opsegu vršio eksperimente na živim bićima, svojim robovima, pa i na samom sebi. Vivisekcija na ljudima je za njega bila moralno neprihvatljiva.

U srednjem vijeku već se koriste termini laboratorije (od latinskog izraza *labor* – “napor” ili “rad”). U 14. vijeku pojam laboratorija je značio jednostavno mjesto izvršenja zadatka ili rada. U periodu oko 1450. godine, upotrebe ovog termina, koji se više odnosio na radionice, mogu se otkriti u kontekstu manastira. Paralelno s ovim, koristio se termin skriptorij, što je bila soba za prepisivače u srednjovjekovnim manastirima, kao i dormitorij (spavaonica). Tek u 16. vijeku laboratorija približno dobija značenje koje danas ima. Ipak, u 16. vijeku termin laboratorija prvenstveno se odnosio na radionice alhemičara, apotekara i metalurga, a tek kasnije na sve lokacije u kojima su se prirodne pojave i procesi istraživali pomoću alata i instrumenata. Uzimajući u obzir sticanje znanja praktičnim i materijalnim sredstvima, historija laboratorije može se posmatrati kao blisko povezana s historijom kabineta, anatomskog pozorišta, botaničke bašte, opservatorije i sličnih prostora. Prvi poznati zapis o prostoru i infrastrukturi uređenoj za naučne spoznaje je istražvački centar koji je bio smješten u Uraniborgu, koji je sagrađen i opremljen krajem 16. stoljeća za danskog astronoma Tychoa Brahea. To je bio zamak na ostrvu Ven u Öresundu. Prostori su bili podijeljeni na tri dijela: a) gornji sprat je sadržavao astronomsku opremu i služio za posmatranje neba, b) donji sprat je bio matematička laboratorija s tablicama za karte i proračune i c) podrum koji je sadržavao laboratoriju za alhemiju.

Pojam naučne laboratorije kakvu danas poznajemo pojavio se tek krajem 19. i početkom 20. vijeka. Kako je definirano u njemačkoj

enciklopediji Brockhaus, na primjer, u današnjem njemačkom ovaj termin opisuje “radni prostor za naučne i tehničke eksperimente, mjerenja, zadatke evaluacije, kontrole itd., s namještajem i opremom potrebnim za te zadatke.” Na sličan način Oksfordski rječnik engleskog jezika definira laboratoriju kao “zgradu odvojenu za sprovođenje praktičnih istraživanja u prirodnim naukama”. Tokom prvih decenija 20. vijeka moderna laboratorija je postala jasno koncipirana. Zgrade su bile eksterijerno prilagođene njihovim nacionalnim kontekstima, ali su interijeri jasno definirali potrebe smještaja instrumenata, istraživača, biblioteke i drugih pratećih objekata. Laboratorije konceptijski postaju kompleksnije i prilagođene različitim tipovima eksperimenata.



Slika 2. Izgled hemijske laboratorije u 19. vijeku (izvor: <https://www.sciencephoto.com/>)

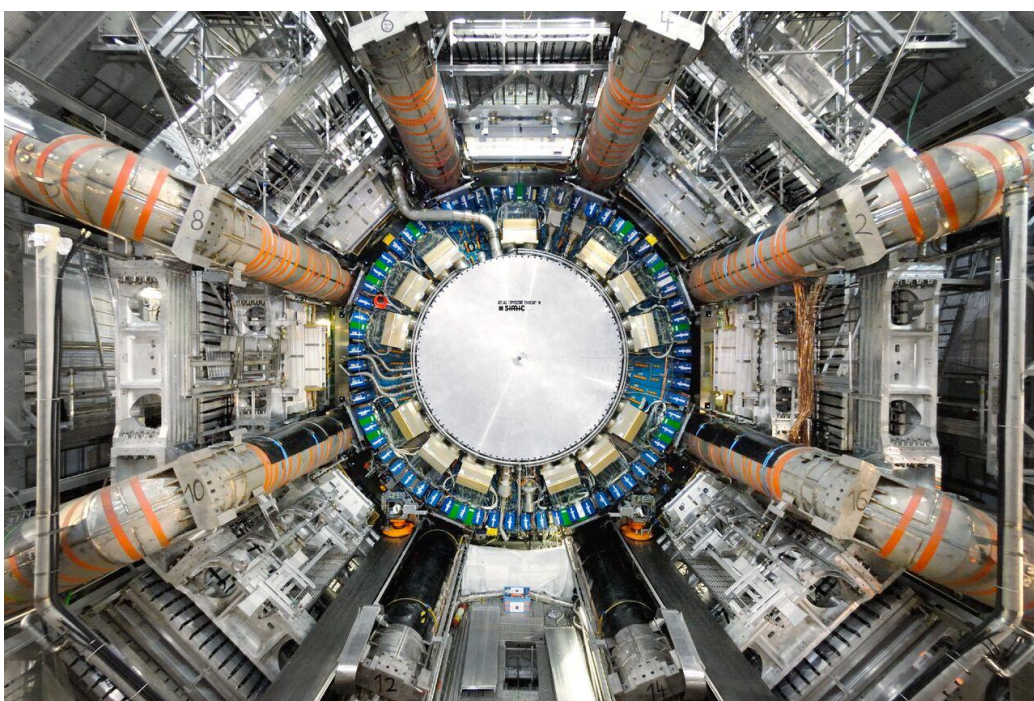
Daljnji rezultat razvoja laboratorija je stvaranje “industrijskih laboratorija” koje se dovode u vezu s brzim rastom industrije boja, što se opet mora posmatrati u kontekstu historije moderne hemije. Danas su industrijske laboratorije komponente naučno-tehnološkog razvoja pa se ne može tvrditi da su laboratorije sastavni dio samo istraživačkih centara i univerziteta.

Iza II svjetskog rata, laboratorije uz finansijsku pomoć država i privatnog sektora postaju sve veće i kompleksnije, u mogućnosti su zadovoljiti kriterije za najkompliciranije eksperimente. Arhitektonski i građevinski koncipirane su prema usvojenim savremenim standardima i potrebama i zgrade su namjenski građene za tu funkciju. Današnje laboratorije odslikavaju “novo doba” uključujući ne samo adekvatan prostorni koncept već i svu infrastrukturu za najsofisticiranije eksperimente. Laboratorije su povezane u mrežu gdje se u svakoj od njih vrši određeni segment eksperimenta ne gubeći cjelovitost procesa.

Diferenciraju se s obzirom na naučna polja te se počinju razlikovati laboratorije u biologiji, hemiji, fizici, geografiji i matematici. Specijalizovane laboratorije kao što su molekularno-biohemijske, laboratorijsko-tehnološke, informatičko-tehnološke, psihološke, razvijaju se tehnološkim napretkom i danas postoji velika diferencijacija između laboratorija u skladu s njihovom namjenom. Međutim, može se primijetiti zajednički imenitelj, a to je prilagođen prostor koji uključuje izvedbeni, podatkovno-analitički i prateći dio. U skladu s navedenim, koncept današnje laboratorije se mijenja. To više nije struktura sama za sebe, već dio uvezane cjeline. Komunikacije između laboratorija kao dijelova te mreže su u realnom vremenu, iako laboratorije mogu biti geografski udaljene jedne od drugih. Eksperiment može biti izuzetno kompleksan i izveden u više različitih laboratorija, a primjer za to je sekvenciranje ljudskog genoma u kojem su učestvovalе laboratorije iz 20 instituta šest različitih država.

Prema Grmeku, historija nauke se može promatrati kroz tranziciju iz empirijsko-eksperimentalnog do elementarnog kvalitativnog i analogijskog eksperimentiranja. Eksperimentalno istraživanje može

se podijeliti na pet epistemoloških razina: 1. praiskonsko eksperimentalno “prahistorijsko” (metode pokušaja i pogrešaka), 2. elementarno i/ili analogijsko kvalitativno eksperimentiranje, 3. kvantitativno eksperimentiranje, 4. naučni empirizam koji nastaje u 18. stoljeću i donosi sve tačnije i sve hrabrije eksperimente, 5. sistemsko eksperimentiranje koje se razvija u 20. stoljeću, a odlikuje se sofisticiranim instrumentima, statističkom analizom podataka i novim kritičkim razmatranjima metodologije naučnog otkrića.



Slika 3. CERN – primjer mreže laboratorija (izvor: CERN – *Conseil Européen pour la Recherche Eucléaire*)

Od eksperimenata očekujemo da imaju progresivnost, da služe dobrobiti čovječanstva, ali i prirode, no tokom historije to nije uvijek bilo tako. Poznati su laboratorijski eksperimenti s ciljem “opravdavanja” rasizma, “naučnog utemeljenja” “superiornih nadskupina” (rasa, skupina određenog geografskog porijekla) tokom nacizma i fašizma te nalaženja razloga za marginalizaciju i

odstranjivanje iz društva ljudi koji su imali urođena fizička ili mentalna patološka stanja. Poseban segment su laboratorijski eksperimenti u cilju stvaranja atomskog, biološkog i hemijskog oružja, koji i danas imaju dosta veliki udio u eksperimentima.

Historijski razvoj analitičkih metoda

Ideja o tome da detektovanjem razlika u hemijskom sastavu mogu dijagnosticirati oboljenja potekla je prvobitno od Roberta Boylea oko 1680. godine. Međutim, trebalo je 150 godina za uvođenje osnovnih hemijskih analiza zasnovanih na istraživanjima Berzeliusa i von Liebiga. Polovinom 19. vijeka zabilježena su ispitivanja vezana za određivanje hemijskog sastava tjelesnih tekućina (Andral, Heller, Becquerel, Bence Jones), pa je tako Heller razvio metode za ispitivanje urina u cilju dokazivanja proteina, šećera i dr.

Razvijaju se protokoli, odnosno uputstva za hemijsko analiziranje urina, a zatim i krvi, pa su nove dijagnostičke metode postale široko poznate. Naime, krajem 19. vijeka koncept hemijskog analiziranja tjelesnih tečnosti kao značajan dijagnostički postupak poprimio je široku upotrebu. Razvoj fiziološke hemije ili biohemije kao novih disciplina u tom periodu imao je ogroman značaj za kliničku hemiju. Razvoj metodologije koja je omogućila analizu acidobaznog stanja u svrhu dijagnosticiranja i terapije poremećaja acidobazne ravnoteže možemo zahvaliti istraživanjima Van Slykea.

Poseban dijagnostički značaj u kliničkoj hemiji daje spoznaja da se mjerenjem aktivnosti enzima u tjelesnim tečnostima mogu dijagnosticirati oboljenja. Tako je npr. Wohlgemuth 1908. godine prvi konstatovao da se enzimi koji izlaze iz ćelija mogu koristiti kao osjetljivi indikatori koji ukazuju na oštećenja ćelija ili organa. Kasnija istraživanja su dovela do razvoja kliničke enzimologije. Rezultati istraživanja su pokazali da ćelijski enzimi izlaze u krv usljed oštećenja ćelija.

Tek polovinom 20. vijeka dolazi da masovnije primjene detekcije enzima u dijagnostičke svrhe, i to alfa-amilaze, kisele i alkalne fosfataze i lipaze. Kasnije je metodologija unaprijeđena optičkim

testovima te su novija saznanja doprinijela razvoju dijagnostičke enzimologije. Treba napomenuti da je francuski optičar Jules Duboscq konstruirao 1854. godine kolorimetar koji je kao takav korišten neizmijenjen skoro cijeli jedan vijek.

Razvoju analitičkih metoda doprinijele su prirodne nauke, posebno fizika i fizička hemija, pa su tako npr. 1860. godine Kirchhof i Bunsen opisali niz spektralnih analiza, koje su odmah zatim prilagođene za biohemijska i kliničko-hemijska određivanja npr. hemoglobina i derivata hemoglobina. Razvoj fizičke hemije omogućio je primjenu kinetičkih metoda za proučavanje enzimatskih katalitičkih reakcija, kao što je i razumijevanje elektrometrijskih mjerenja omogućilo određivanje koncentracije vodikovih jona.

Poseban razvoj analitičkih metoda predstavlja uvođenje kolorimetrijskih i fotometrijskih metoda pri kraju 19. vijeka. Time počinje nova era primjene analitičkih metoda kada se, u skladu s radovima Otta Folina, uvodi niz fotometrijskih metoda za određivanje sastojaka krvi i urina. Ova metoda je omogućila i značajno smanjenje količine uzorka potrebnog za analizu. Kasnih dvadesetih godina prošlog vijeka konstruirani su prvi fotometri s fotoelektričnim ćelijama, a danas fotometar ima nezaobilaznu primjenu u kliničko-hemijskim laboratorijama. Doprinos razvoju analitičkih metoda svakako je dao razvoj gasometrijske tehnike na volumetrijskom, a kasnije manometrijskom instrumentu kojim je postignuta mnogo veća preciznost. Primjena fotoelektričnih detektora umjesto obojenih filtera omogućila je da se osim vidljivog dijela spektra koriste i ultravioletna i infracrvena oblast spektra. Nešto kasnije je opisana emisiona spektroskopija koja je omogućila kvantitativnu analizu elektrolita u biološkom materijalu, te polovinom 20. vijeka dolazi do razvoja modernih gasnih analizatora. Također, počinje primjena hromatografskih tehnika, metoda ultracentrifugiranja i slobodne elektroforeze.

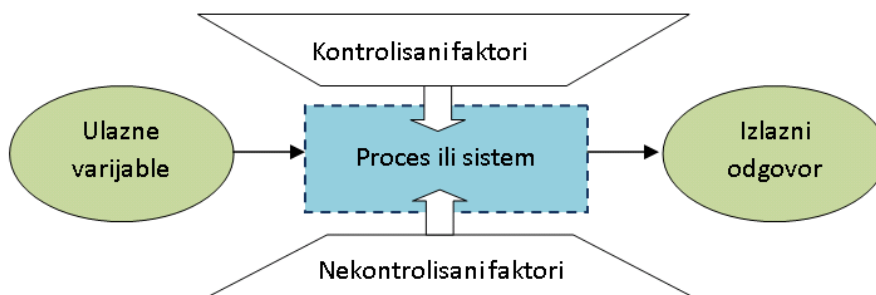
Do sredine prošlog vijeka većina analiza u kliničko-biohemijskim laboratorijama radila se ručno. Razvojem uređaja i intencijom smanjivanja mogućih grešaka, a povećanja tačnosti analiza dolazi do

automatizacije cijelog procesa. Naravno da time značaj analitičara nije umanjen, već je dobio novu, dodatnu ulogu. Prvi mehanizovani instrument bio je “autoanalizator”, koji je izradio Leonard Tucker Skeggs, a koji je 1957. godine firma Technicon Corporation počela proizvoditi i prodavati. Godine 1964. nakon modificiranja proizveden je analizator na principu kontinuiranog protoka poznat pod nazivom višekanalni automatski sekvencijalni analizator. Godine 1969. proizvedeni su i centrifugalni analizatori. Uza sve navedeno, i razvoj personalnih računara i informatike doveo je do automatizacije, ali naročito je kompjuterska obrada podataka uveliko utjecala na tačnost i obim kliničko-hemijskih analiza.

Razvoj metodologije i instrumenata omogućio je da se u kliničko-biohemijskim laboratorijama analize vrše na svim vrstama bioloških materijala do kojih je moguće doći. Otkriće strukture DNK, a zatim i funkcije nukleinskih kiselina, strukture i funkcije proteina, te razvoj naučno-tehnoloških metoda, a kasnije i sofisticiranih uređaja, omogućava detekciju promjena nasljednog materijala na genskom, hromosomskom i genomskom nivou, detektirajući genopatije, tj. patološka stanja uvjetovana mutacijama genetičkog materijala. Danas je molekularnogenetička analiza dijagnostička procedura potvrde različitih oboljenja, metoda procjene predispozicije za oboljenje, kao i detekcije prijemčivosti za određeni tip lijekova, kao i detekcije prisustva infekta u organizmu i slično.

6. EKSPERIMENT I TIPOVI EKSPERIMENTA

Posmatranje sistema ili procesa tokom njegovog rada veoma je važan dio procesa učenja i sastavni je dio razumijevanja i učenja o tome kako sistemi i procesi rade. Međutim, samo posmatranjem se ne može shvatiti šta se dešava prilikom promjene ulaznih faktora. Stoga je potrebno učiniti više od posmatranja – potrebno je mijenjati faktore. To znači, da bi se spoznale uzročno-posljedične veze u sistemu, potrebno je svjesno mijenjati ulazne varijable sistema i posmatrati promjene u izlaznim odgovorima. Drugim riječima, potrebno je provesti eksperimente na sistemu ili procesu.



Slika 4. Dijagramski prikaz eksperimenta

Posmatranje sistema ili procesa može voditi uspostavljanju teorija ili hipoteza o tome šta sistem radi, ali je izvođenje eksperimenata potrebno za dokazivanje tačnosti teorije ili hipoteze. Hipoteza, kao osnova za postavljanje eksperimenta, predstavlja predloženo objašnjenje zapažanja. Istraživači izvode eksperimente u gotovo svim istraživačkim oblastima, obično da bi otkrili nešto o određenom procesu ili sistemu. Svako izvođenje eksperimenta je test. Stoga eksperiment možemo definirati kao test ili seriju izvođenja u kojima se vrše namjerne promjene na ulazne varijable procesa ili sistema kako bismo mogli uočiti i identificirati razloge za promjene koje se mogu primijetiti u izlaznom odgovoru (Slika 4).

Izvođenjem eksperimenta nastojimo utvrditi koje su ulazne varijable odgovorne za uočene promjene u odgovoru, razviti model prema dobijenom odgovoru na važne ulazne varijable i iskoristiti model za poboljšanje procesa ili sistema. Opći pristup planiranju i provođenju eksperimenta naziva se strategijom eksperimentiranja.

Nekoliko ključeva dobrog eksperimentalnog dizajna uključuje efikasnu upotrebu kontrola, reproduktivnost, veliku veličinu uzorka i višestruka ispitivanja. U eksperimentu, kako bi se utvrdilo da su sve promjene koje se javljaju samo zbog manipulacije istraživača, mora postojati neka osnova za poređenje. Za uspostavljanje ove osnove poređenja neophodna je kontrolna grupa. U kontrolnoj grupi sve je isto kao i u eksperimentalnoj grupi, osim nezavisne varijable. Na eksperimentalnoj grupi se zapravo eksperimentira.

Da bismo bolje razumjeli razliku između kontrolne i eksperimentalne grupe, navest ćemo primjer jednog eksperimenta. U ispitivanju lijeka bit će formirana grupa koja prima lijek (eksperimentalna grupa) i grupa koja prima placebo¹ (kontrolna grupa). Sam lijek se smatra nezavisnom varijablom i svaka promjena koja se dogodi zbog lijeka smatra se zavisnom varijablom. Kako bi se osiguralo da samo lijek uzrokuje promjene, sve ostale varijable moraju biti strogo kontrolisane (na primjer prehrana, vježbanje, pušenje). One se nazivaju kontrolisanim varijablama.

Tipovi eksperimenata

Izvođenje eksperimenata podrazumijeva plansku promjenu kontrolnih faktora ili nezavisnih varijabli kako bi se procijenio efekat ovih promjena na odgovor. Na osnovu dva različita pristupa u eksperimentisanju, razlikuju se dva tipa eksperimenta:

- (1) klasični eksperiment i
- (2) planirani eksperiment.

Pored klasičnog i planiranog, prepoznavamo i industrijski eksperiment.

¹ Placebo je supstanca ili procedura s potpuno neutralnim djelovanjem koja se daje prilikom ispitivanja nekog novog farmakološkog preparata.

Klasični eksperiment je pouzdan i konzervativan pristup u eksperimentisanju koji koristi većina istraživačko-razvojnih ustanova. Omogućava izračunavanje efekta jednog faktora na odgovor sistema. Rezultat svakog eksperimenta uzima se u obzir prije izvođenja sljedećeg. Upoređivanje rezultata jednog eksperimenta s rezultatima drugog daje jasnu sliku za razumijevanje procesa. Nedostatak je što poređenje nosi mogućnost greške, jer su dva eksperimenta dva nezavisna događaja, a veoma je teško obezbijediti identične faktore u različitim vremenskim distancama.

Planirani eksperiment obezbjeđuje praktičan i efikasan plan kako varirati faktore / nezavisne varijable da bi se odgovorilo na precizno definiran cilj istraživanja. Rezultat planiranog eksperimenta je maksimum informacija po izvođenju eksperimenta i objektivno razumijevanje istraživačkog sistema. U okviru planiranog eksperimenta vrši se minimalan set pokusa (najčešće 10 do 20) u kojima će svaki faktor biti variran na sistematski način. Analizom podataka planiranog eksperimenta utvrđuju se optimalni uslovi, kao i najznačajniji faktori za varijaciju rezultata te faktori koji nemaju značajan efekt.

Industrijski eksperiment, kako i sam naziv kazuje, generalno se izvodi u cilju povećanja nivoa znanja o određenom procesu koji ima industrijski značaj. Proces se može se poboljšati samo ako se zaista dobro razumije. Industrijski eksperiment zavisi od većeg broja ključnih faktora, kao npr.: statističko znanje, komunikacija, rad tima, razvijenost proizvodnog procesa itd.

Poseban segment dizajniranja eksperimenta su kliničke studije. U medicini, svaki lijek ili neka medicinska procedura moraju biti klinički ispitani. Za kliničko ispitivanje postoje stroga pravila regulisana ne samo na nivou neke države već i internacionalno. Kliničko ispitivanje mora se vršiti prema općim principima, zakonima te dobroj laboratorijskoj i kliničkoj praksi. Vrlo je bitno istaći specifičnosti kliničkog ispitivanja, a to je da uključuje ljude, i to pacijente, kao i zdrave osobe, te sama procedura može imati utjecaj na zdravlje. Rezultati kliničkog ispitivanja dovode do prihvatanja ili odbacivanja

lijeka ili procedure kao adekvatne. Zbog svega navedenog, za provođenje kliničke studije potrebno je sprovesti pravila koja uključuju dizajniranje kliničkog ispitivanja gdje je obavezno učešće statističara, finansijera (sponzora) i tima za monitoring ispitivanja. Implementacija kliničke studije je djelokrug implementatora. Monitor je lice koje je ovlašteno da nadgleda tok same studije (istraživanja) s ciljem procjene poštivanja svih normativnih pravila dobre kliničke i laboratorijske prakse.

Uslovi u kojima se izvode eksperimenti mogu biti različiti. Najčešće korištene tri vrste eksperimenata prema tipu uslova u kojima se primjenjuju su:

- (1) laboratorijski;
- (2) eksperiment u prirodnim uslovima;
- (3) prirodni eksperiment.

Tabela 2. Osnovne razlike između različitih tipova eksperimenta

Vrsta eksperimenta	Kontrolisani uvjeti	Dužina trajanja	Način
U laboratoriji	Da	Kratko	Eksperimentalni uslovi – djelovanje faktora
U prirodnim uslovima	Djelimično	Srednje dugo	Ispitivačka i kontrolna grupa – usporedba
Prirodni	Ne	Dugo	Opservacija i analiza prirodno kontroliranih pojava

Laboratorijski eksperiment je naučno posmatranje određenih pojava u vještački stvorenim uslovima koji omogućavaju što povoljnije sagledavanje njenih uzroka. U laboratorijskom eksperimentu stvara se odgovarajuća eksperimentalna situacija u cilju neposrednog izučavanja djelovanja jednog ili više faktora za koje se pretpostavlja da su uzroci određene pojave.

Eksperiment u prirodnim uslovima izvodi se u stvarnim prirodnim uslovima u kojima istraživač kontroliše djelovanje eksperimentalnog

činioca. Eksperiment podrazumijeva dvije grupe, i to jednu eksperimentalnu (ispitivačku) i drugu kontrolnu. Uporednim posmatranjem situacije u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi dolazi se do saznanja o djelovanju faktora kojim se eksperimentiše.

Prirodni eksperiment je eksperiment koji koristi prirodne uvjete i prirodnu kontrolu eksperimenta. Traje mnogo duže od prethodna dva.

7. DIZAJN EKSPERIMENTA (DoE)

U ovom poglavlju fokus je na dizajnu eksperimenta (engl. *Design of Experiments*, DoE) kao krucijalnog segmenta potrebnog za izvedbu eksperimenta, odnosno laboratorijske procedure.

Dizajniranje eksperimenta podrazumijeva opis niza eksperimenata koji se provode s ciljem izrade nekog modela i optimizacije produkata procesa. Izbor eksperimenata koji će biti opisani i provedeni utječe na rezultat – kvalitet modela (neku osobinu modela koja je od interesa istraživaču). U optimizaciji produkata procesa dizajniranje eksperimenta omogućava određivanje niza uvjeta potrebnih da se dobije produkt ili proces željenih karakteristika. Istraživač najčešće želi postići optimalne karakteristike, ali u nekim slučajevima i zadovoljavajuće. Najčešće se eksperiment provodi da bi se odredili željeni uslovi, odnosno vrijednosti faktora. Kontrolisanim faktorom se nazivaju varijable koje se mijenjanju na kontrolisan način da bi se proučio njihov utjecaj na proces ili produkt. Pri dizajniranju eksperimenta istraživač je često zainteresovan za nekoliko faktora, pa možemo reći dizajn eksperimenta obično ima viševarijantni pristup. Karakteristike produkta ili procesa koje treba optimizirati nazivaju se odzivom ili nekontrolisanim faktorom i mogu se smatrati varijablama koje opisuju izvođenje. Vidimo da postoje dvije vrste varijabli: odzivi ili nekontrolisani faktori i kontrolisani faktori.

Kao što je već rečeno, dizajniranje eksperimenta koristi se s ciljem dobivanja produkta željenih karakteristika ili provođenja procesa na željeni način. Ciljevi dizajniranja eksperimenta su razumjeti utjecaj kontrolisanih faktora i/ili modelirati vezu između kontrolisanih i nekontrolisanih faktora, po mogućnosti uz što manji broj eksperimenata, tj. uz finansijsku uštedu. Ovo zahtijeva pravilno i učinkovito mapiranje eksperimentalnog prostora. U većini slučajeva ovi ciljevi se najčešće kombinuju. Prvi korak je odrediti koji kontrolisani faktori utječu na nekontrolisane faktore (odzive) i u kojoj mjeri. Nakon toga kreće se u potragu za modelom koji na kvantitativan način opisuje taj utjecaj. U konačnici, cilj je definirati optimalne vrijednosti faktora, tj. one koje daju najbolje karakteristike produkta

ili procesa koje proučavamo. Za primjer, optimum može biti najviša ili najniža vrijednost odziva (nekontrolisanog faktora). Izbor kontrolisanih faktora prvi je korak primjene dizajna eksperimenta. Kontrolisani faktori u dizajnu eksperimenta mogu biti kvalitativni ili kvantitativni.

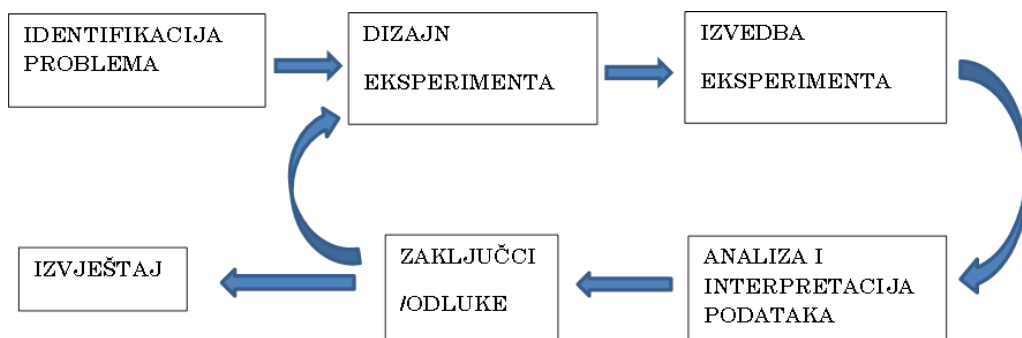
Specifičnosti dizajna eksperimenta

Dizajn eksperimenta ima za cilj dizajniranje aktivnosti i zadataka u cilju objašnjenja varijacija u skladu s uvjetima eksperimenta. Za uspješno dizajniranje eksperimenta potrebna je dostupnost literaturi, odnosno prethodnim informacijama i saznanjima o predmetu istraživanja. Sasvim je jasno da nije moguće dizajniranjem eksperimenta predvidjeti sve moguće rezultate. Adekvatno dizajniran eksperiment predvidjet će veći broj faktora koji utječu na sam rezultat. Pravilo je da samo planirani eksperiment ima 90% šansi da odgovori postavljenom cilju. Samim time, cilj dobro dizajniranog eksperimenta jest predvidjeti rezultate koji nastaju promjenom uvjeta. U tom smislu se definiraju nezavisni ulazni parametri ili drugim riječima prediktorne varijable. Pretpostavka je da promjena takvih varijabli dovodi do promjena izlaznih ili drugim riječima zavisnih varijabli.

Bitan segment dizajniranja eksperimenta je identificiranje konstantnih eksperimentalnih varijabli koje nisu u relaciji s rezultatima. Osnovni cilj dizajniranja eksperimenta je princip validnosti, pouzdanosti i replikabilnosti. Dizajniranjem eksperimenta se za najkraće vrijeme i najmanje materijalnih sredstava dobijaju najvažniji rezultati. Planiranjem eksperimenta produktivnije se koriste postojeći resursi koji podrazumijevaju povećanje produktivnosti te manje ulaganje vremena, smanjenje troškova i bolji kvalitet rezultata. Taj dizajn treba odslikavati zahtjeve laboratorije vodeći računa o troškovima, vrstama uzoraka, potrebnom vremenu za izvođenje analize, potrebnoj opremi, obučenosti osoblja, prostoru za rad, bezbjednosnim aspektima itd.

Jedno od najzahtjevnijih segmenata dizajniranja eksperimenta je uspješno sagledavanje uzročno-posljedičnih veza, a to znači detekcija faktora koji uzrokuju određeni odgovor. U statističkim analizama,

postoji nešto što se zove zbunjujući faktori i oni koji su na prvi pogled teško vidljivi, ali su prisutni u pozadini, i mogu utjecati na rezultat.



Slika 5. Slijedovi realizacije eksperimenta i pozicija njegovog dizajna

Specifičnosti procesa dizajniranja eksperimenta

Preduvjet za adekvatno dizajniranje eksperimenta je nepristrasnost u smislu klasične greške “namještanja rezultata” istraživanja. U tom smislu je potrebno onemogućiti pristrasno uzorkovanje i primjenu pristrasne metodologije.

U određenim situacijama u dizajniranju eksperimenta potrebno je napraviti probni eksperiment, a to je eksperiment kojim se dobijaju preliminarni rezultati. Razlika između probnog i pravog eksperimenta je u reduciranju broja uzoraka ili reduciranoj metodologiji. Probni eksperiment ima veliki značaj kada je u pitanju dizajniranje eksperimenta, jer omogućava sagledavanje mogućih grešaka i adekvatnost metodologije.

Eksperiment vrlo često može zahtijevati ponavljanje i replikaciju. Treba razlikovati ponavljanje i replikaciju eksperimenta. Replikacija je proces koji za izvođenja eksperimenta podrazumijeva različite uslove, a ponavljanje je proces izvođenja eksperimenta s istim uslovima i istim podešavanjima. Replikacija se koristi često i u procesu

optimizacije, jer se pronalazi najoptimalniji parametar za određenu proceduru.

BLOCK strategija podrazumijeva utjecaj različitih faktora na rezultate eksperimenta gdje je moguće da postoji jedan faktor koji utječe na rezultat i koji je objašnjiviji od višefaktorijskog utjecaja. U tom se slučaju vrši minimiziranje ostalih faktora u eksperimentu da bi se dobio odgovarajući rezultat uzročno-posljedičnih veza. Isto tako, ako želimo bolje razumjeti eksperiment i procese, onda ga možemo podijeliti na manji broj sekvencijalnih eksperimenata, gdje svaki predstavlja logičan niz gdje se jedan nadovezuje na drugi.

Uloga statistike u dizajniranju eksperimenta

Analiza podataka dobijenih laboratorijskim eksperimentom ili procedurom predstavlja širok metodološki spektar koji se može stratificirati u analize prije, u toku i nakon laboratorijskog eksperimenta/procedure. Metode koje podrazumijevaju analize uključuju primjenu različitih statističkih metoda počev od standardnih pa sve do “specijaliziranih” primjerenih za laboratorijske svrhe. Od klasičnih statističkih metoda možemo naglasiti deskriptivne statističke testove, procjene unutargrupne varijacije, kao i međugrupne varijacije.

Dizajn eksperimenta podrazumijeva korištenje statističkih metoda. Upravo takve metode omogućuju, bilo u laboratorijskim uslovima ili u proizvodnji, razvijanje matematičkih modela kojima se analizira uzročno-posljedična veza utjecaja ulaznih promjenljivih na izlazne rezultate. Matematički model omogućava istraživačima da sagledaju kako se rezultati mijenjaju i u kakvoj su interakciji s ostalim faktorima, a i ovim modelima se može predvidjeti greška eksperimenta. Takvi “predikcioni” modeli podrazumijevaju primjenu statističkog modeliranja u smislu predviđanja izlaznih, tj. zavisnih varijabli (rezultata), zbog utjecaja nezavisnih ulaznih parametara, tj. varijabli.

Zbog toga je uloga statističara veoma velika. Jedan od historijski krucijalnih statističara bio je Ronald Aylmer Fisher kao rodonačelnik

savremene statistike i on se ujedno smatra i jednim od “utemeljitelja” populacijske genetike. Fisher je uvidio značaj dizajniranja eksperimenta, razvijao je metode bazirajući ih na usporedbi dobijenih vrijednosti s očekivanim rezultatima eksperimenta. Njegovi modeli su bili bazirani na realnim podacima o vrsti zemljišta, načinu đubrenja, sortama biljaka itd. Time je dao poseban značaj u primjeni statistike u poljoprivredi, čime je omogućio bolje prinose i poboljšao uzgojnu metodologiju. Poseban interes su mu bile procjene uzročno-posljedičnih veza, te je za tu svrhu, između ostalih, razvio neke od najvažnijih statističkih metoda.

The Design of Experiments

By

R. A. Fisher, Sc.D., F.R.S.

Formerly Fellow of Gonville and Caius College, Cambridge
Honorary Member, American Statistical Association
and American Academy of Arts and Sciences
Galton Professor, University of London

Oliver and Boyd

Edinburgh: Tweeddale Court
London: 33 Paternoster Row, E.C.

1935

Slika 6. Naslovnica knjige R. A. Fishera o dizajniranju eksperimenta koja je bila osnova kasnijeg razvoja metodologije DoE

Statističari Yule, Box, Stu, B. Hunter, S cheffe, Cox, Taguchi i drugi (od koji su neki bili u enici R. A. Fishera) kasnije su usavr шали metodologiju u svojim radovima. Uzmimo za primjer primjenu Taguchijeve

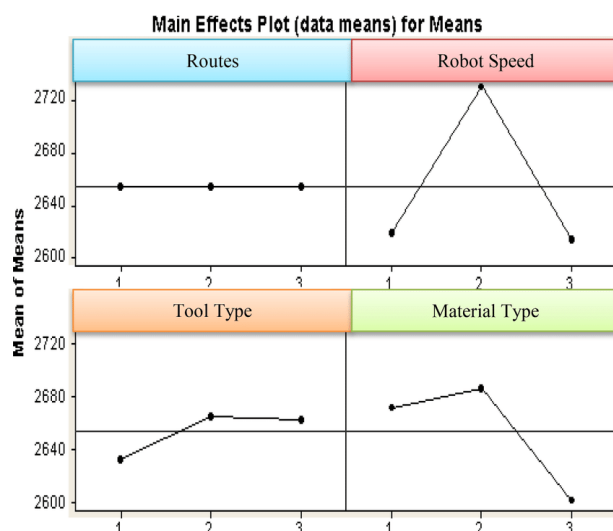
statistike. Ovom metodom se reducira utjecaj “nerelevantnih” faktora na eksperiment ili proces u laboratorijskom radu. Također, omogućava sagledavanje varijacija u eksperimentu i cjelokupnom procesu, kontrolu eksperimenta i kontrolu kvalitete proizvoda.

Razvojem tehnologije i informacionih sistema, u dizajnu eksperimenta sve se više koristi mašinsko učenje (engl. *machine learning*, ML). To je podoblast vještačke inteligencije koja ima za cilj konstruiranje statističkih algoritama i računarskih sistema koji mogu “učiti” iz podataka i na osnovu toga izvršiti buduće analize na novim setovima podataka, te na taj način obavljati zadatke bez izričitih instrukcija.

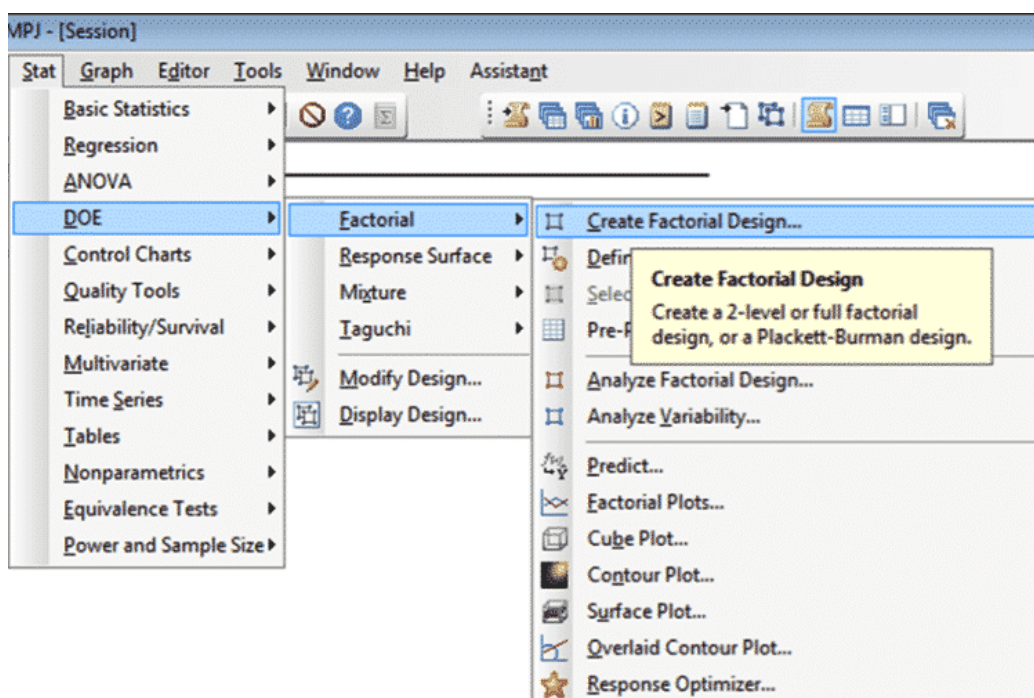
Prednost mašinskog učenja u odnosu na konvencionalne metode je što se njegovom promjenom mogu sagledati obrasci u velikom setu podataka. Podrazumijeva “učenje” sistema iz eksperimentalnih podataka pronalazeći vezu između faktora i zavisnih varijabli. Mašinskim učenjem se automatski analizira model izgradnjom algoritma koji sagledava podatke “učeći” iz njih i pronalazi skrivene obrasce. Time se onemogućava situacija previda određenog faktora i njegov utjecaj na rezultat. Različite statističke metode u dizajnu eksperimenata, uključujući i mašinsko učenje, sastavni su dio različitih softverskih paketa ili u sklopu programa i prilagođeni samo za DoE.

Tabela 3. Lista nekih od softverskih paketa koji mogu vršiti ciljane statističke analize za DoE

Naziv	DeE inkorporiran	Besplatan
Minitab	Dio paketa	Ne
R	<i>Design of Experiments</i> (DoE) set paketa	Da
NCSS	Dio paketa	Ne
SAS	Dio paketa	Ne
DEVELVE	Dio paketa	Da
JASP	Dio paketa	Ne
Stat-Ease	Kompletan	Da



Slika 7. Prikaz rezultata primjene Taguchijeve statistike (izvor: International Journal on Interactive Design and Manufacturing)



Slika 8. Sučelje Minitab softvera za DoE (preuzeto s: <https://goleansixsigma.com/how-to-run-a-design-of-experiments-full-factorial-in-minitab/>)

Osnovno pitanje je ko učestvuje u dizajniranju eksperimenta. To nije zadatak samo statističara, koji svakako mora biti u timu, već interdisciplinarnog tima, koji uključuje vođu (glavnog istraživača), izvođače eksperimenta, pa i statističara, čija je uloga velika. Adekvatna primjena planiranog eksperimenta omogućena je kvalitetnom obukom i sve boljim softverskim paketima. Zbog toga naučnici i istraživači, tj. implementatori eksperimenta, mogu s malim ili nikakvim predznanjem iz statistike koristiti planirani eksperiment s velikom efikasnosti.

Kratke smjernice prilikom dizajna eksperimenta

U dizajniranju eksperimenta, svakako se mora voditi računa o sljedećem:

1) Odabir tima za dizajn eksperimenta i njegovu implementaciju

Iako to možda ne izgleda kao bitan segment procesa dizajna eksperimenta i njegove primjene, odabir adekvatnog interdisciplinarnog tima stručnjaka podrazumijeva da će svaki iz svog ugla ekspertize dati doprinos što boljem dizajnu i samoj implementaciji. Ovdje je bitan ljudski faktor, a to je adekvatna i korektna komunikacija u timu, iz koje će se moći implementirati i naredni segmenti dobrog planiranja eksperimenta i njegove implementacije.

2) Razumijevanje problema

Preduvjet dobrog dizajniranja eksperimenta je razumijevanje problema, pri čemu je potrebno sagledati problem kroz različite discipline, te je sasvim jasno da je u tom pogledu potreban timski rad.

2) Brainstorming sesija

Dizajniranje i provođenje eksperimenta podrazumijeva povezivanje statističara i istraživača te je *Brainstorming* kao interaktivna timska kreativna tehnologija nužna kao temeljni dio dizajna eksperimenta.

4) Izbor odgovarajućih mjernih rezultata eksperimenta

Izuzetno je bitno izabrati i adekvatno mjeriti odgovarajući rezultat eksperimenta razumijevajući moguće varijacije na promjenu faktora.

5) Izabrati odgovarajući dizajn eksperimenata

Krucijalan segment je odabir dizajna, koji zavisi od vrste samog eksperimenta, različitog broja faktora, raspoloživih resursa za eksperiment, troškova, istraživačkog kadra itd.

6) Uvođenje probnog eksperimenta

Primjenom probnog eksperimenta broj varijabli procesa reducira se na neki racionalan broj, pa se na taj način smanjenjem broja eksperimenata mogu smanjiti i troškovi.

7) Jasno koncipiranje izvođenje eksperimenta

Za dizajniranje eksperimenta veoma je bitno jasno i nedvosmisleno koncipirati izvođenje eksperimenta sa svim sekvencijalnim slijedovima, te predvidjeti moguće greške.

8) Primijeniti strategiju ponavljanja eksperimenta

U cilju boljeg sagledavanja varijacija rezultata eksperimenta i njenih faktora potrebno je ponavljati eksperiment gdje se ne mijenjaju postavke.

9) Primjena Blok-strategije

Blok strategija se koristiti za minimiziranje utjecaja različitih faktora na eksperimentalne rezultate.

10) Pristup sekvence manjih eksperimenata

Kao što je već naglašeno, u cilju sagledavanja procesa i samog eksperimenta, dobra praksa je izvođenje niza manjih sekvencijskih eksperimenata, gdje svaki predstavlja logičan niz gdje se jedan nadovezuje na drugi.

11) *Izvođenje verifikacionih eksperimenata*

U određenim slučajevima potrebno je sprovesti “dokazne” eksperimente radi verifikovanja rezultata statističkih analiza. Tako npr. uzroci za nedostizanje cilja eksperimenata mogu biti: pogrešan izbor dizajna eksperimenata, nesvrshodan izbor rezultata eksperimenta, neidentifikovanje ključnih varijabli procesa, i to onih koji utiču na rezultat, neodgovarajući mjerni sistem, nedostatak statističkih znanja i drugi.

Dizajniranje eksperimenta u molekularnoj biologiji

U molekularnoj biologiji dizajniranje eksperimenta je polazna osnova za izvođenje laboratorijskih aktivnosti. Dobro dizajniran eksperiment je preduslov za ispravno i pravovremeno izvođenje laboratorijskih aktivnosti. Dizajniranje eksperimenta i njegovo provođenje u molekularnoj biologiji uključuje deset faza:

1. *faza*: Identificiranje istraživačkog pitanja;
2. *faza*: Odabir odgovarajućeg sistema modela;
3. *faza*: Odabir odgovarajućih metoda i tehnika;
4. *faza*: Dizajniranje eksperimentalnih uslova;
5. *faza*: Razvijanje plana za analizu podataka;
6. *faza*: Pripremanje detaljnog protokola;
7. *faza*: Izvođenje eksperimenta;
8. *faza*: Analiziranje podataka;
9. *faza*: Interpretiranje rezultata;
10. *faza*: Objavljivanje nalaza (ishoda eksperimenta).

Da bi istraživač realizirao svaku od navedenih faza, postoji nekoliko uniformnih pitanja / smjernica koja istraživaču pomažu da ispravno definira faze dizajniranja eksperimenta. Smjernice definiranja faza su date u Tabeli 4.

Tabela 4. Smjernice, odnosno pitanja koja olakšavaju istraživaču da definira i provede deset faza dizajniranja eksperimenta u molekularnoj biologiji.

Faza	Pitanja / smjernice
Identificiranje istraživačkog pitanja	Šta pokušavate istražiti? Koju hipotezu testirate?
Odabir odgovarajućeg sistema modela	Hoćete li koristiti ćelije, tkiva ili organizme? Koje ćete vrste ili sojeve koristiti?
Odabir odgovarajućih metoda i tehnika	Koje ćete tehnike molekularne biologije koristiti?
Dizajniranje eksperimentalnih uslova	Koji su kontrolisani faktori u eksperimentu? Koje kontrole ćete koristiti i zašto?
Razvijanje plana za analizu podataka	Kako ćete analizirati podatke koje prikupljate? Odredite koji su vam očekivani rezultati spram kojih možete napraviti plan analize podataka.
Pripremanje detaljnog protokola	Detaljno napišite protokol taksativno navodeći korake i opisujući ih, sve potrebne materijale, reagense i opremu koja će biti korištena.
Izvođenje eksperimenta	Pažljivo pratite svoj protokol i zabilježite sva zapažanja i podatke
Analiziranje podataka	Koristite odgovarajuće statističke metode za analizu podataka i izvođenje zaključaka.
Interpretiranje rezultata	Šta rezultati znače u kontekstu vašeg istraživačkog pitanja i hipoteze?
Objavljivanje nalaza (ishoda) eksperimenta	Zapišite svoje rezultate u obliku naučnog rada ili prezentacije i podijelite ih s naučnom zajednicom.

Laboratorijski eksperiment (primjer)

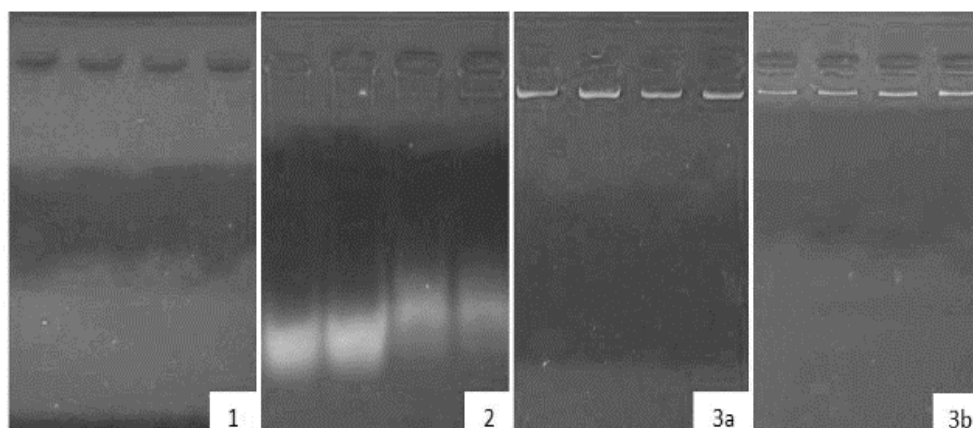
Primjer laboratorijskog eksperimenta u Laboratoriji za molekularnu genetiku prirodnih resursa (Univerzitet u Sarajevu – Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju) je “Komparacija efikasnosti tri različite metode DNK izolacije iz sjemenki šljive”. DNK je iz sjemenki šljive izolirana korištenjem tri različita protokola:

- (1) standardni CTAB Soltis metod koji je najčešći protokol za izolaciju DNK iz biljnog tkiva;
- (2) CTAB – metod originalno opisan za DNK izolaciju iz ljekovitih biljaka s visokim nivoom sekundarnih metabolita;

(3) komercijalno dostupan komplet (kit) za DNK izolaciju iz biljnog uzorka.

Kvalitet dobijenih genomskih DNK (gDNK) iz uzoraka sjemenki šljive je evaluiran korištenjem fragment analize sedam mikrosatelitnih markera. Nakon izolacije, gDNK je stavljena na horizontalnu gel elektroforezu. Rezultati horizontalne gel elektroforeze pokazuju da je prinos gDNK varirao u zavisnosti od tipa izolacije (Slika 9).

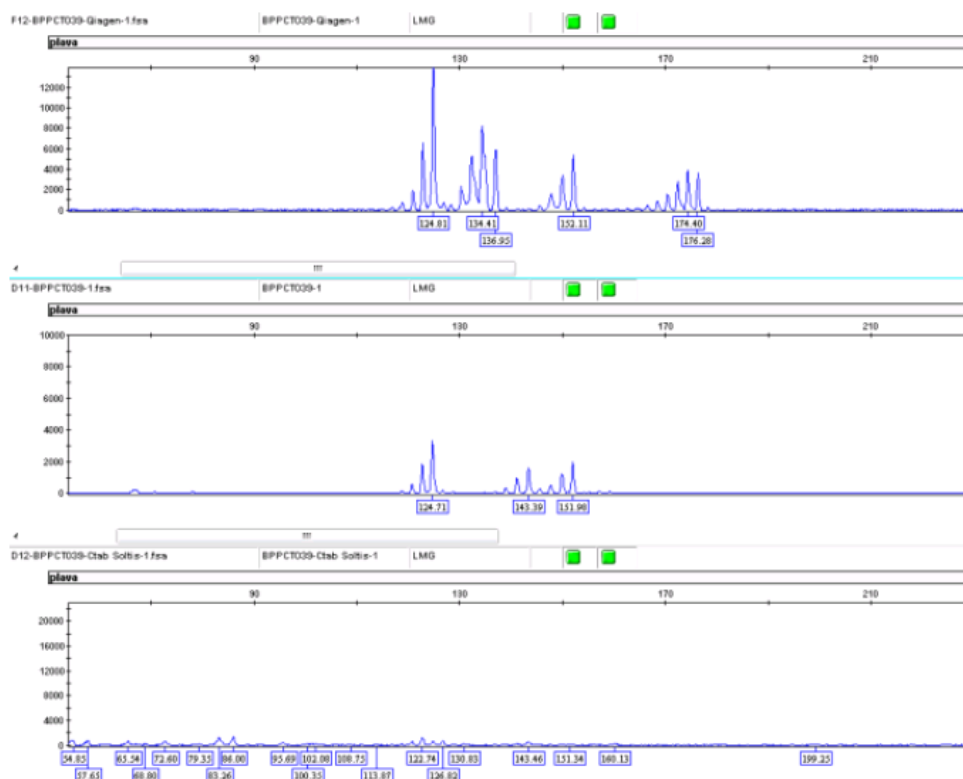
Standardni CTAB Soltis metod dao je najniži prinos gDNK (bendovi su jedva vidljivi na gelu). Veći prinos gDNK ostvaren je upotrebom CTAB metoda originalno opisanog za DNK izolaciju iz ljekovitih biljaka s visokim nivoom sekundarnih metabolita. Međutim, visoka koncentracija kontaminanata je prisutna, što je evidentirano u obliku tragova. Najveći prinos i čistoća izolirane gDNK postignuti su upotrebom komercijalnog kompleta za izolaciju.



Slika 9. Gel elektroforeza izolirane DNK: (1) CTAB Solits lab protokol; (2) CTAB metod – originalno opisan za DNK izolaciju iz ljekovitih biljaka sa visokim nivoom sekundarnih metabolita; (3) DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen; 3a prva elucija, 3b druga elucija).

Od tri primijenjene metode izolacije DNK, najbolji rezultat fragment analize ostvaren je korištenjem gDNK izolirane upotrebom DNeasy

Plant Mini Kit (Qiagen). Jedino u tom slučaju je ostvaren puni profil (Slika 10).



Slika 10. Primjeri elektroferograma za *BPPCT039* lokus nakon PCR-a provedenog na gDNK dobijenim korištenjem tri metode: prvi prikaz – DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen); drugi prikaz – CTAB metod, originalno opisan za DNK izolaciju iz ljekovitih biljaka s visokim nivoom sekundarnih metabolita, i treći prikaz: CTAB Solits lab protokol.

8. LABORATORIJSKI PROTOKOL

Za izvođenje laboratorijskih eksperimenata, potrebno je imati laboratorijski protokol prema kojem će se izvoditi laboratorijski eksperiment. Jedan laboratorijski eksperiment može obuhvatati jedan ili više sukcesivnih laboratorijskih protokola. Laboratorijski protokol, kao najvažniji zvanični dokument u laboratoriji, predstavlja tačan i precizan slijed aktivnosti u cilju dobijanja određenog rezultata, npr. izolirana gDNK, amplificiran određeni lokus i dr.

Za izradu laboratorijskog protokola potrebno je definirati problem, hipotezu, navesti korišteni materijal (decidno navesti proizvođača) i metodologiju, prikazati dobivene podatke i interpretirati rezultate. Stoga možemo reći da su sastavni dijelovi laboratorijskog protokola eksperimenta: svrha, materijal i metode, kontrole, interpretacija rezultata, reference.

Svrha je formalna izjava koja obuhvata vašu hipotezu. To je izjava o tome na koje pitanje pokušavate odgovoriti kroz eksperiment i koju hipotezu želite testirati. *Hipoteza* je naučna pretpostavka postavljena za objašnjenje neke pojave koju treba provjeriti i dokazati da bi postala vjerodostojna naučna teorija ili zakon. *Materijali i metode* podrazumijevaju dio laboratorijskog protokola u kojem su jasno navedene hemikalije koje se koriste uz obavezno navođenje proizvođača i precizno napisani koraci za provođenje eksperimenta. U laboratorijskom protokolu važno je identificirati bitne postupke kontrole. Vaša se kontrola mora izvoditi pod prirodnim, ili nemanipuliranim uslovima, na koje testirana promjenjiva ne utječe.

Interpretacija rezultata se zasniva na organiziranim i sažetim podacima. Oni se obično prikazuju u tablicama i grafikonima, a prati ih statistička analiza, koja predstavlja poređenje eksperimentalne i kontrolne grupe. Na samom kraju protokola potrebno je navesti literaturne izvore. *Literaturni izvori* su radovi i knjige na osnovu kojih je napisan protokol i taksativno su pobrojani na kraju protokola. Navedeni literaturni izvori trebaju biti i citirani u tekstu protokola. Navođenjem literaturnih izvora čitaocu je omogućeno da provjeri korišteni protokol. Bitno je naglasiti da se laboratorijski protokoli

nikada ne uče napamet i nezavisno od godina iskustva istraživača u izvođenju određenog eksperimenta, uvijek se pri izvođenju prati protokol.

U molekularnobiološkoj laboratoriji, laboratorijske protokole možemo podijeliti prema tipu polaznog materijala i prema svrsi laboratorijskog protokola. Prema tipu polaznog materijala, razlikujemo:

- (1) laboratorijske protokole za manipulaciju biljnim uzorcima;
- (2) laboratorijske protokole za manipulaciju animalnim (životinjskim) uzorcima;
- (3) laboratorijske protokole za manipulaciju humanim uzorcima;
- (4) laboratorijske protokole za manipulaciju mikrobiološkim uzorcima.

Prema svrsi laboratorijskog protokola, u molekularnobiološkoj laboratoriji susrećemo se s:

- (1) laboratorijskim protokolom za izolaciju gDNK, RNK i proteina;
- (2) laboratorijskim protokolom za određivanje koncentracija uzoraka;
- (3) laboratorijskim protokolom za amplifikaciju željenog regiona;
- (4) laboratorijskim protokolom za provjeru rezultata amplifikacije (gel elektroforeza, fragment analiza, sekvenciranje).

Laboratorijski protokoli za izolaciju gDNK

Izolacija ukupne genomske DNK iz ćelija podrazumijeva izdvajanje DNK iz jedra (nuklearna DNK) i organela (mitohondrijalna ili plastidna DNK). DNK se u ćeliji ne nalazi u čistom obliku, već je udružena i okružena brojem drugih molekula (proteini, masti i dr.). Navedene supstance, sa stanovišta DNK analize, mogu biti kontaminirajuće, odnosno mogu kontaminirati i/ili inhibirati proces analize ciljanih genetičkih markera. Pored supstanci koje ulaze u sastav ćelija, u uzorcima se mogu naći i tragovi drugih materija koje su naknadno u njih dospjele. Stoga izolacija DNK, pored izdvajanja molekule DNK iz njenog biološkog okruženja, podrazumijeva i čišćenje

od mogućih kontaminirajućih supstanci. Za izdvajanje DNK molekula, ćelije se razbijaju, oslobađajući sadržaj u kojem se nalaze molekule ugljikohidrata, proteina, masti i dr. DNK se oslobađa iz jezgre i hromosomskog kompleksa, a u narednom koraku se ona oslobađa većine proteina djelovanjem raznih enzima.

Shodno navedenom, osnovni koraci izolacije DNK podrazumijevaju: lizu ćelija, purifikaciju DNK i prikupljanje DNK u željenom volumenu i koncentraciji. Liza ćelija podrazumijeva mehaničko i hemijsko razbijanje i liziranje sljedećeg: ćelijske membrane (animalnih ćelija), membrane organela (mitohondrija i plastida), ćelijskog zida (bakterija, biljaka, gljiva), ali i veoma čvrstih zidova spora (sporogenih bakterija, protozoa) i drugih čvrstih tvorevina poput hitinske kutikule, kosti, rožne tvorevine, keratina.

U laboratorijskom protokolu za izolaciju gDNK prikazane su hemikalije koje se koriste za izvođenje izolacije i sukcesivno koraci čiji je krajnji cilj dobiti gDNK. Izbor protokola za izolaciju gDNK zavisi od dva faktora. Prvi faktor podrazumijeva tip organizma iz kojeg se radi izolacija (bilnog, animalnog ili humanog organizma), tip i količinu početnog materijala (krv, bukalna sluznica, dio animalnog tkiva, dio bilnog tkiva i dr.). Drugi faktor su finansijska sredstva. Poznato je da se najbolji prinos, kvalitet i kvantitet izdvojene gDNK postiže upotrebom komercijalnih kompleta za izolaciju, ali njihove nabavne cijene su visoke. U nastavku poglavlja ćemo prikazati nekoliko laboratorijskih protokola za izolaciju gDNK iz različitih organizama i različitog početnog materijala (Tabela 5, 6).

Tabela 5. CTAB Soltis laboratorijski protokol za izolaciju gDNK iz biljnog materijala

CTAB Soltis	
Izolacija ukupne gDNK iz biljnog materijala	
M A T E R I J A L I I M E T O D E	Hemikalije: CTAB pufer, hloroform, amonijum acetat, izopropanol, 70% etanol, apsolutni etanol, ddH₂O PRVI DAN 1. Označiti tubice 2. Izgrindati uzorak u tubici (izgrindati = pretvoriti u prah) 3. U izgrindane uzorke dodati određeni volumen CTAB pufera 4. Tipom promiješati, a potom se vorteksirati 5. Inkubirati na 55°C preko noći u vodenom kupatilu DRUGI DAN 6. Dodati hloroform (CTAB pufer : hloroform = 1 : 1) 7. Jako protresti 1 minut 8. Centrifugirati 10 minuta na 13000 obrtaja 9. Otpipetirati gornju fazu u nove označene tubice 10. Na osnovu tog volumena dodati amonijev acetat i izopropanol; $V_a = 0,08 \times V_1$; $V_i = 0,54 \times (V_1 + V_a)$ 11. Lagano promiješati prevrtanjem gore-dolje 12. Staviti u led na 20 minuta 13. Centrifugirati 5 minuta na 13000 obrtaja 14. Odliti supernatant 15. Dodati određeni volumen hladnog 70% etanola i promiješati 16. Centrifugirati 1 minut na 13000 obrtaja 17. Izbaciti supernatant, pažljivo da ostane talog DNK 18. Dodati određeni volumen hladnog apsolutnog etanola 19. Centrifugirati 1 minut na 13000 obrtaja 20. Odliti supernatant 21. Osušiti uzorke 22. Dodati destilovanu vodu u sve tubice
	REZULTATI izolacije gDNK iz biljnog materijala provjeravaju se na horizontalnoj gel elektroforezi (1,5% gel obojen bojom Midorigreen)
	1. Cullings KW (1992) Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. Mol Ecol, 1:233-240. 2. Doyle JJ, Doyle JL (1987) Arapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull, 19:11-15.

Tabela 6. Izolacija iz tkiva peraja ribe prema Mulleru

Izolacija iz tkiva peraja ribe prema Mulleru	
Izolacija ukupne gDNK iz animalnog uzorka	
M A T E R I J A L I M E T O D E	Hemikalije: Mastermix za ribe – Kern pufer, SDS 20%, pronase), 6M NaCl, 70% etanol, apsolutni etanol PRVI DAN 1. Označiti tubice 2. Komadić tkiva peraja potopiti u mastermix za ribe, u tubici koja je označena 3. Svaku tubicu posebno iščvokati da zapjenuša 4. Staviti na inkubaciju na temperaturu 37°C preko noći
	DRUGI DAN 5. Dodati određeni volumen 6M NaCl i protresti 1 minut 6. Centrifugirati na 13000 obrtaja 15 minuta 7. Prebaciti supernatant u novu označenu tubicu (izbjeći talog i pjenu) 8. Snažno protresti 15 sekundi 9. Centrifugirati na 13000 obrtaja 15 minuta 10. Supernatant prebaciti u novu označenu tubicu 11. Dodati 2x volumen apsolutnog etanola 12. Ostaviti 20 minuta 13. Okrenuti tubicu, lagano zaokrećući nekoliko puta dok se ne ugledaju tragovi DNK 14. DNK pokupiti tipom i prebaciti u novu tubicu* 15. Dodati određeni volumen 70% etanola 16. Centrifugirati na 13000 obrtaja 3 minute, odliti etanol i ostaviti da se suši 17. Otopiti u dH₂O
	*Ako se ne može prebaciti, onda se centrifugira na 13000 obrtaja 3 minute da se istaloži DNK, supernatant se odlije i nastavlja se s korakom 15.
	REZULTATI izolacije gDNK iz animalnog materijala provjeravaju se na horizontalnoj gel elektroforezi (1,5% gel obojen bojom Midorigreen).
	1. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1998) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res., 16(3):1215.

Izolacija upotrebom komercijalnog kompleta

Postoji veliki broj proizvođača kompleta za izolaciju gDNK, RNK i proteina iz različitih tipova uzoraka i različitih organizama. Neki od proizvođača su Sigma, Thermo Fisher Scientific, Macherey-Nagel itd. (Slika 11).

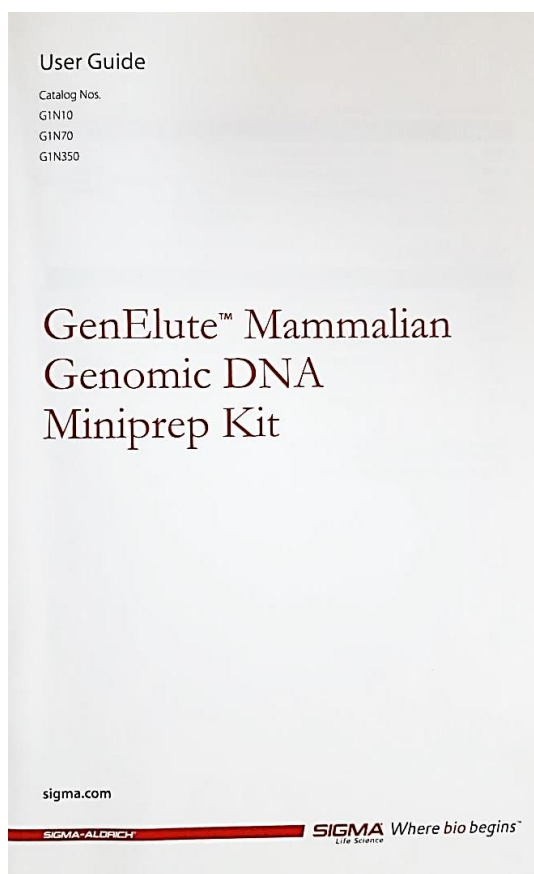


Slika 11. Kompleti za izolaciju gDNK različitih proizvođača

Na svakom kompletu je označen njegov naziv, broj uzoraka za koje je predviđen i za koji tip početnog materijala uzorka je namijenjen (Slika 12). Uz njega priložen je laboratorijski protokol koji je neophodno slijediti da bi se dobio najbolji prinos gDNK (Slika 13). Proizvođač u kompletu obezbijedi sve potrebne hemikalije, naznači njihovu pripremu prije upotrebe, način upotrebe i na kojoj temperaturi je potrebno čuvati hemikalije, obezbijedi tubice i kolonice kroz koje se vrši filtriranje (Slika 14). Ono što niti jedan proizvođač ne navodi je sastav hemikalija.



Slika 12. Oznaka na pakovanju kompleta; naziv: GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kits; organizam: sisari; broj uzoraka: 70

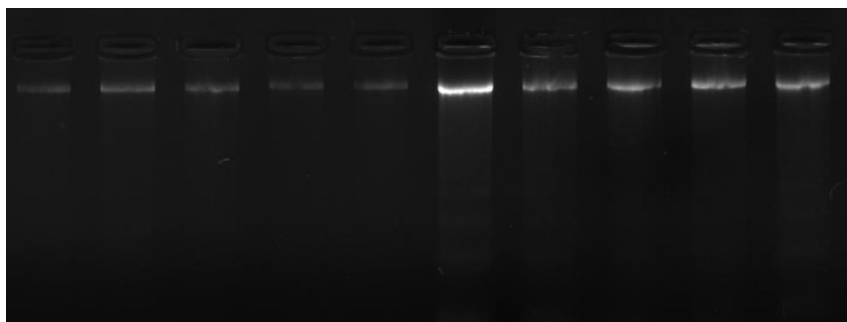


Slika 13. Priručnik koji sadrži laboratorijski protokol preporučen od strane proizvođača



Slika 14. Hemikalije, tubice i kolonice koje dođu u GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kits (Sigma-Aldrich)

Očekivani rezultat izolacije gDNK iz kompleta je veliki prinos, kvalitet i kvantitet gDNK koji se može provjeriti primjenom metoda horizontalne gel elektroforeze (Slika 15).



Slika 15. Genomska DNK izolirana korištenjem GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kits na horizontalnoj gel elektroforezi

Laboratorijski protokoli za određivanje koncentracije uzorka

Određivanje koncentracije DNK i RNK molekula

Nanofotometar je sveobuhvatan uređaj za različite spektrofotometrijske primjene u modernoj laboratoriji. Na osnovu raspoloživih metoda za pojedinačne ili višestruke talasne dužine i mjerenja koncentracije, određivanja standardnih krivulja, kao i izračunima omjera i kinetikom, korisnik može stvoriti sve vrste prilagođenih aplikacija za individualne potrebe. Automatski računa koncentracije i prikazuje ih kao $\text{ng}/\mu\text{L}$ ($1 \text{ ng}/\mu\text{L} = 1 \text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$). Koncentracija DNK se određuje pomoću jednadžbe: $c\text{DNK} = A_{260} \times 50 \text{ }\mu\text{g}/\text{ml} \times 50$.

UV spektrofotometar kao tačan, jednostavan i dugotrajan uređaj je pogodan za upotrebu. Glavna mu je prednost mogućnost razlučivanja od 1 nm za spektralnu širinu pojasa te ta tačnost talasne dužine rezultira visokom rezolucijom i jasnijim očitanjem spektra apsorpcije. Optički spektrofotometar zabilježit će talasnu dužinu svjetlosti pri kojoj je došlo do apsorpcije kao i veličinu apsorpcije pri svakoj talasnoj dužini. Načelo UV/VIS spektroskopije je da se prolaskom UV/VIS zračenja kroz otopinu uzorka dio apsorpira, a dio prolazi. U kratkom vremenu, spektrofotometar skenira UV/VIS spektar i na detektoru registriira talasnu dužinu (nm) pri kojoj nastupa apsorpcija. Dio molekule koja apsorpira zračenje naziva se hromofor. Koncentracija DNK uz pomoć UV/VIS spektrofotometra se računa, isto kao i kod nanofotometra.

Određivanje koncentracije proteina

Izbor metode za određivanje koncentracije proteina u pojedinom slučaju zavisi od količine proteina kojom se raspolaže, njihove koncentracije, prisutnosti različitih agenasa koji mogu utjecati na rezultate mjerenja, od vrste i čistoće proteina u otopini, te od potrebne preciznosti mjerenja. Fizikalno-hemijske metode za određivanje koncentracije proteina dijele se na:

- (1) apsorpcijske;
- (2) kolorimetrijske metode.

Apsorpcijske metode se baziraju na apsorpciji svjetlosti određene talasne dužine u otopini proteina. Proteini imaju apsorpcijske maksimume pri talasnim dužinama od 280 nm i 205 nm (UV dio spektra). *Kolorimetrijske metode* se baziraju na hemijskoj reakciji proteina s različitim reagensima, pri čemu se razvija karakteristično obojenje otopine. Intenzitet razvijene boje je u određenom opsegu proporcionalan koncentraciji proteina, a najpreciznija su mjerenja u središnjem dijelu područja proporcionalnosti.

Laboratorijski protokoli za amplifikaciju određenog lokusa

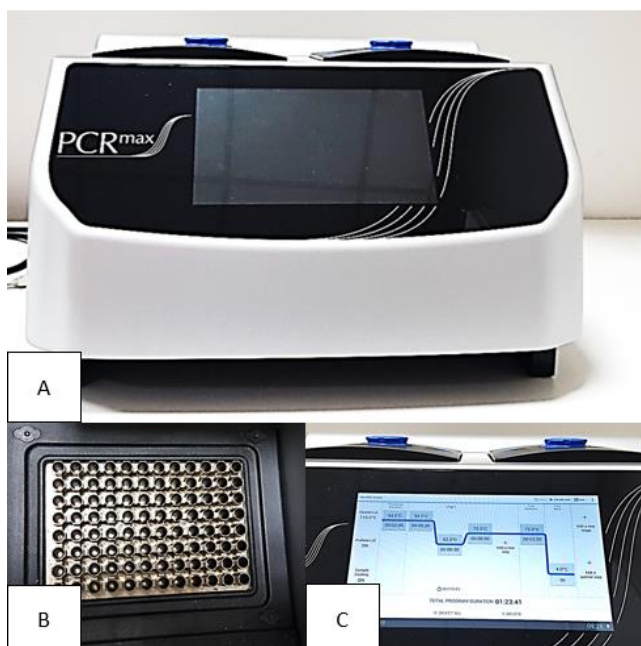
Polimerazna lančana reakcija je metoda kojom se ciljani dio DNK molekule umnožava (amplificira) u veliki broj identičnih kopija. Ova metoda je izvršila utjecaj na primjenu molekularnobioloških metoda u naučnim istraživanjima i u području molekularne dijagnostike. Primjenjuje se u razvoju dijagnostičkih testova u mikrobiologiji, virusologiji, dijagnostici nasljednih bolesti, neoplastičnih i malignih bolesti, izboru usmjerenih “pametnih” lijekova, u praćenju terapija i odgovora na terapiju, u forenzičkim i identifikacijskim dokazivanjima, kao i u istraživanjima biodiverziteta, populacijskoj genetici i DNK barkodiranju. Proces amplifikacije ciljanog regiona čine sljedeći koraci:

- (1) inicijalna denaturacija;
- (2) denaturacija;
- (3) vezivanje prajmera (engl. *annealing*);
- (4) elongacija (produživanje) rastućeg lanca;
- (5) finalna elongacija.

Koraci od 2. do 4. ponavljaju se u određenom broju ciklusa, najčešće od 25 do 40 ciklusa, a u cilju ostvarenja dovoljnog broja kopija ciljanog fragmenta DNK.

Krajnji produkt PCR-a naziva se PCR produkt ili amplikon. U svakom ciklusu količina amplikona se duplicira (u prvom ciklusu nastaju 2 amplikona, u drugom 4, u trećem 8, u četvrtom 16, u petom 32, u šestom 64 itd.) tako da na kraju PCR procesa nastaje od milion do bilion amplikona. Proces amplifikacije odvija se u PCR mašini (Slika

16A), koja sadrži termoblok (Slika 16B), s mogućnošću podešavanja različitih temperatura u različitom periodu trajanja (Slika 16C).



Slika 16. **A:** PCR mašina koja sadrži dva odvojena termobloka, lijevi i desni. Omogućava istovremeno trajanje dva različita programa, a kapacitet joj je 2 X 96 reakcija. **B:** Termoblok se nalazi ispod poklopca s plavim vijkom. Kapacitet jednog termobloka je 96 PCR reakcija. U okrugle jažice stavljaju se 0,2 ml tubice predviđene za PCR reakciju. **C:** PCR program instaliran na PCR mašini sastoji se iz koraka navedenih u tekstu ovog poglavlja, a koji su okarakterisani različitim temperaturama u različitom periodu trajanja.

Hemijske komponente PCR-a su:

- DNK čiji fragment želimo umnožiti;
- prajmeri ili početnice (oligonukleotidne sekvence) – PCR reakciji neophodan je par prajmera (*forward* i *reverse*) koji se dizajniraju tako da budu komplementarni sekvencama koje okružuju ciljani region DNK koji želimo umnožiti;
- slobodni nukleotidi (mješavina dezoksiribonukleozid trifosfata, dNTPs), odnosno gradivne jedinice za sintezu novih lanaca DNK, koje sadrže četiri tipa dezoksiribonukleozid trifosfata:

adeninskih (dATP), timinskih (dTTP), guaninskih (dGTP) i citozinskih (dCTP);

- $MgCl_2$ – kofaktor neophodan za aktivnost *Taq* polimeraze i polimerizaciju (vezuje se za slobodne nukleotide i obezbjeđuje njihovo ugrađivanje u rastući lanac DNK);
- Pufer;
- Destilovana H_2O ;
- Enzim *Taq* polimeraza – enzim izoliran iz bakterije *Thermus aquaticus*, koja je rezistentna na visoke temperature.

PCR metodologija podrazumijeva postojanje jasno definiranog laboratorijskog protokola specifičnog za ciljani region, koji obuhvata hemizam reakcije i temperaturni režim. Hemijske komponente PCR-a jednake su za svaki protokol amplifikacije, a razlikuju se prema finalnim koncentracijama hemikalija u PCR mješavini i prajmerima koji se koriste (u zavisnosti od ciljanog regiona).

Tabela 7. Hemizam PCR reakcije

	Stock	Final	1x	Broj uzoraka
prajmer F	10 μM	0,10	0,1	
prajmer R	10 μM	0,10	0,1	
dNTPs	10 μM	0,20	0,2	
PCR pufer	noMg	1,00	1,0	
$MgCl_2$	50mM	1,50	0,3	
TaqGold	5u/ μl	0,05	0,1	
DNK	25 ng/micl		1	
dH ₂ O			7,2	
Total			10	
Aliq.			9	

Temperaturni režim prati korake PCR-a. Ključna temperatura je temperatura vezivanja prajmera i ona je specifična za svaku prajmersku sekvencu posebno. Laboratorijski protokol za amplifikaciju prikazuje se kroz hemizam PCR reakcije (Tabela 7) i

temperaturni režim (Tabela 8). PCR hemikalije se skladište na -20°C , a prilikom rada, nakon odleđivanja stoje na ledu. Priprema PCR reakcije se radi na ledu.

Tabela 8. Temperaturni režim PCR reakcije

Početna denaturacija	94°C	1 min	35 ciklusa
Denaturacija	94°C	45 s	
Vezivanje prajmera	57°C	45 s	
Elongacija	72°C	2 min	
Finalna elongacija	72°C	4 min	
	4°C	∞	

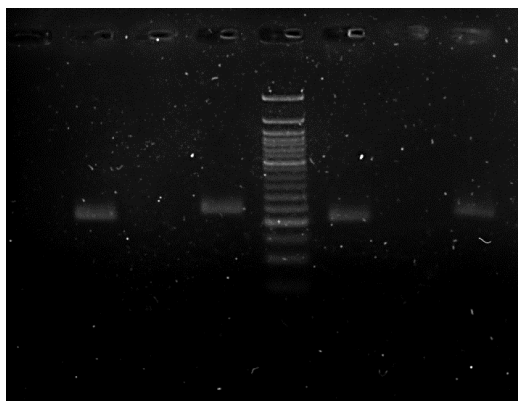
Laboratorijski protokoli za provjeru amplifikacije

Nakon završene PCR amplifikacije, rezultati se provjeravaju i vizualiziraju upotrebom horizontalne gel elektroforeze, fragment analize na genetičkom analizatoru, ili sekvencioniranja. Svaki od navedenih načina provjere rezultata ima svoje odgovarajuće laboratorijske protokole.

Horizontalna gel elektroforeza je metoda koja služi za razdvajanje i analizu molekula pod djelovanjem električnog polja prilikom njihovog kretanja kroz inertan i porozan matriks (agarozni ili poliakrilamidni gel) potopljen u rastvor slabog elektrolita. Ova metoda služi i za provjeru kvalitete izdvojenih nukleinskih kiselina, kao i za detekciju fragmenata nastalih po završetku procesa PCR amplifikacije. Na horizontalnoj gel elektroforezi uporednim puštanjem markera mogu se očitati i veličine nastalih amplikona (Slika 17).

Fragment analiza se koristi u širokoj namjeni poput detekcije mutacija, genotipizacije, DNK profiliranja, genetičkog mapiranja itd. Ovom metodom otkrivaju se razne bolesti, stanja i hromosomske nepravilnosti. Tradicionalno, fragmenti DNK se odvajaju po veličini u matrici za razdvajanje poput agaroznih ili poliakrilamidnih gelova. Veličine fragmenata mogu se odrediti uspoređivanjem sa standardom

veličine. Zatim se fragmenti vizualiziraju gel elektroforezom upotrebom interkalarne boje ili radioizotopa. Međutim, danas je u upotrebi automatizirana kapilarna elektroforeza koja koristi fluorescentne boje i odvaja fragmente s većom rezolucijom i većom preciznošću (Slika 18).

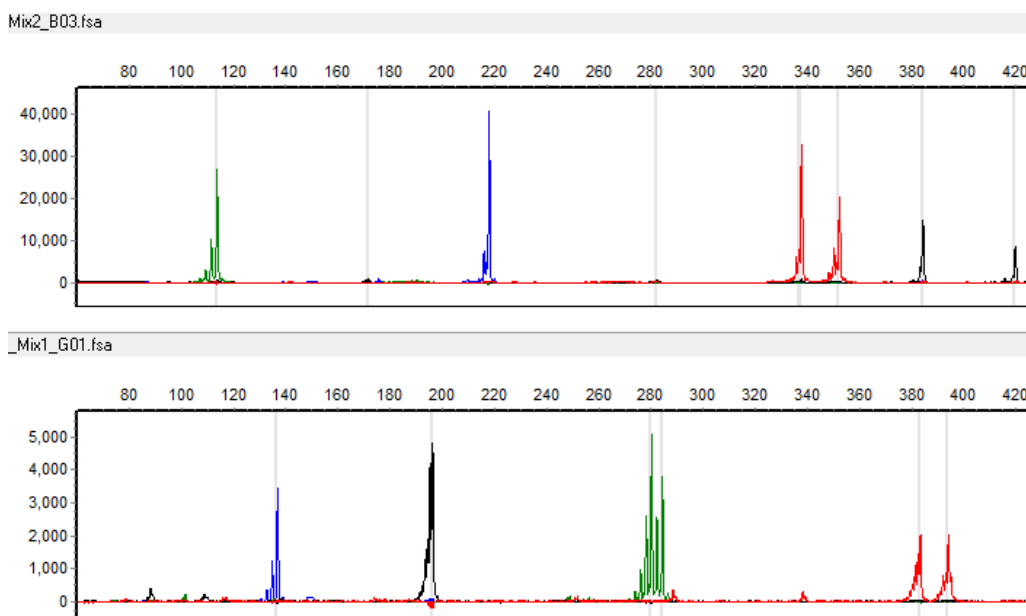


Slika 17. Provjera rezultata PCR amplifikacije korištenjem horizontalne gel elektroforeze i određivanje veličine benda korištenjem 50 bp markera. Korištenjem primijenjenog veličinskog markera određena je veličina amplificiranih bendova i iznosi 250 bp.

Da bi se pokrenula analiza fragmenata na sistemu kapilarne elektroforeze, potrebno je koristiti prajmere obilježene fluorescentnom bojom koji odgovaraju području DNK od interesa. Obično se fluorescentna boja pričvršćuje na prajmere, a može i na probe, a fragmenti se umnožavaju PCR-om prije elektroforeze. Ljestve su obično označene bojom koja je različita od boja fragmenata. Fluorescentno obilježeni PCR produkti i veličinski standard (marker) se po završetku PCR-a elektrokinetički ubrizgavaju u kapilare. Tokom elektroforeze, negativno nabijeni fragmenti DNK kreću se od katode, kroz kapilaru ispunjenu polimerom prema pozitivno nabijenoj anodi kada se visoki napon primijeni između elektroda.

Prednost kapilarne elektroforeze je mogućnost multipleksiranja, što znači da više fragmenata postoji u reakciji koja prolazi kroz istu

kapilaru. Manji fragmenti se obično kreću brže, a veći se kreću sporije. Ubrzo, prije nego što dođu do pozitivne elektrode, fluorescentno obilježeni fragmenti DNK, odvojeni veličinom, kreću se stazom laserskog snopa. Laserski zrak uzrokuje fluorescenciju boja na fragmentima pri različitim talasnim dužinama emisije. CCD kamera otkriva fluorescenciju, a intenziteti fluorescencije su digitalizirani, obojeni u boji i prikazani kao vrhovi (engl. *peak*) u elektroforezi.



Slika 18. Rezultati multipleksirane fragment analize, pri čemu različito obojeni vrhovi / špicevi (engl. *peak*) predstavljaju različite lokuse, a očitavanja idu u smjeru određivanja da li je homozigot ili heterozigot, očitanjem njegove veličine. Npr. ispitivani organizam je homozigot za prvi zeleno obojeni lokus čija je veličina 115 bp.

Sekvenciranje je metod koji obezbjeđuje utvrđivanje redoslijeda nukleotida (adeninskih, guaninskih, citozinskih i timinskih) unutar lanca DNK, analizom PCR produkta (odnosno amplifikovanog fragmenta DNK koji je predmet analize). Najpoznatija i najviše korištena metoda sekvenciranja je SANGER (ili DIDEOKSI) metoda koja zahtijeva da se pri *in vitro* sintezi DNK, pored normalnih

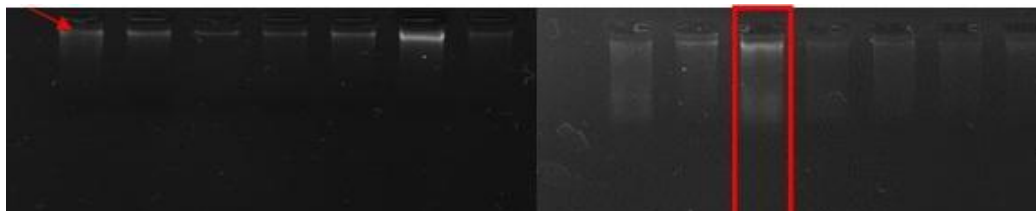
gradivnih jedinica (dNTP), dodaju i dideoksinukleotidi (ddNTP) koji u pentoznom šećeru nemaju OH grupe na pozicijama 2' i 3', te se nakon njihovog ugrađivanja u polinukleotidni lanac zaustavlja dalja sinteza (jer nema slobodne OH grupe na poziciji 3' za koju bi se sljedeći nukleotid trebao vezati). Zato se ova metoda naziva i “metoda prekida sinteze lanca”. Dideoksinukleotidi su obilježeni fluorescentnim markerima različite boje za svaki od četiri tipa dideoksinukleotida. Svaki ddNTP fluorescira različitom bojom kada ga osvjetli laserski zrak: npr. ddATP zeleno, ddGTP žuto, ddCTP plavo i ddTTP crveno, što se automatski zabilježi putem skenera (npr. svaki put kada se registruje crvena boja – automatski skener registruje da taj nukleotid nosi timin).

9. OPTIMIZACIJA U LABORATORIJSKOM EKSPERIMENTU

Podešavanje parametara pojedinih faza u procesu laboratorijske izvedbe naziva se optimiziranje laboratorijskog protokola, koji je dio eksperimenta. Time i eksperiment biva optimiziran. Značaj optimizacije ogleda se u uspješnosti faze/a eksperimenta, boljoj reproducibilnosti, a nerijetko i u uštedi vremena i troškova. Optimizacija laboratorijskog protokola može se primijeniti na sve korake laboratorijskog eksperimenta u molekularnobiološkoj laboratoriji, koji uključuju izolaciju DNK, izvođenje amplifikacije (PCR), sekvenciranje (uslovi sekvenciranja), fragment analizu, gel elektroforezu.

Optimizacija izolacije

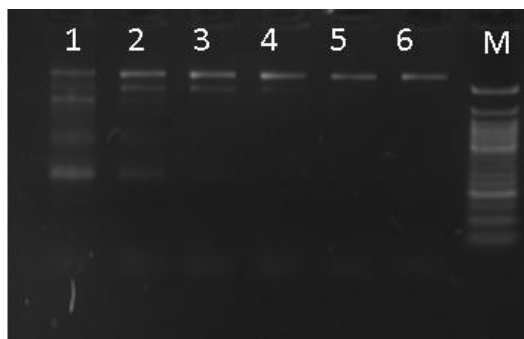
Optimizirati izolaciju prvenstveno znači pronaći najbolji protokol koji odgovara organizmu i tipu uzorka iz kojeg se radi izolacija, a potom protokol dovesti do nivoa u kojem daje najbolji prinos izolirane DNK. Stoga možemo reći da na optimizaciju izolacije utječu vrsta i količina biološkog materijala, ispravnost hemikalija za izolaciju i metode izolacije. Optimizirati izolaciju znači izabrati i primijeniti više metoda izolacije, shodno vrsti i količini biološkog materijala, a zatim rezultate njihove primjene uporediti upotrebom horizontalne gel elektroforeze. Prema jačini benda izolirane DNK i čistoći putanje kretanja DNK moguće je izabrati najpogodniji protokol za izolaciju DNK (Slika 19).



Slika 19. Crvena strelica obilježava bend gDNK. **A:** Izolacija gDNK upotrebom komercijalno dostupnog kompleta, gDNK je uspješno izolirana i čista. **B:** Izolacija gDNK upotrebom Millerovog protokola, gDNK je uspješno izolirana, pri čemu se primjećuje slabija jačina bendova i trag koji označava da je uzorak prljav. Putanja jednog uzorka DNK obilježena je crvenom bojom, a trag je vidljiv ispod benda gDNK.

Optimizacija amplifikacije

U molekularnobiološkoj laboratoriji pri izvođenju laboratorijskog eksperimenta, potreba za optimizacijom je najčešća pri amplifikaciji određenog lokusa (PCR-u). Na spisku optimizacijskih varijabli su koncentracija Mg^{++} , pH vrijednost pufera i ciklički uslovi. U pogledu cikličkih uslova, najvažnija je temperatura vezivanja prajmera. Optimizaciju dodatno komplicira činjenica da su neke od varijabli prilično međusobno zavisne. Na primjer, porast koncentracije dNTP-ova smanjuje koncentraciju slobodnog Mg^{++} dostupnog da utječe na funkciju polimeraze. Koncentracijom Mg^{++} najlakše je manipulirati, jer se sve varijacije koncentracija mogu pokrenuti istovremeno u zasebnim tubicama. Dobavljači *Taq* polimeraze sada pružaju otopinu $MgCl_2$ odvojeno od ostatka standardnog reakcijskog pufera kako bi pojednostavili njeno podešavanje. Optimizacija PCR-a u pogledu cikličkih uslova može se uraditi korištenjem gradijent PCR-a koji omogućava istovremenu primjenu raspona temperatura u PCR reakciji jednog uzorka, te nakon pregleda PCR produkata metodom agarozne gel elektroforeze moguće je odrediti najpodesniju temperaturu (Slika 20). Podešavanje polaznih osnova u PCR-u može se utvrditi i softverski – *in silico*.



Slika 20. Prikaz gradijent PCR-a. Brojevi 1–6 označavaju različite temperature vezivanja prajmera pri kojima se odvijala amplifikacija jednog uzorka. Temperature odgovaraju oznakama od 1 do 6 redoslijedom 50°, 52,6°, 54,7°, 57,3°, 59,4°, 62°. M je oznaka za veličinski marker. Iz navedene slike možemo vidjeti da je najbolja amplifikacija, s jasnim ciljanim bendom, bez prisutnih nespecifičnih amplikona na temperaturama od 59,4° i 62°.

Optimizacija sekvenciranja

Sekvenciranje DNK molekula predstavlja proces određivanja redoslijeda baza u lancu DNK. Produkt sekvenciranja se naziva DNK sekvenca koja predstavlja tačno određen slijed nukleotida. Optimizacija sekvenciranja podrazumijeva optimiziranje svih koraka koji vode do sekvence uključujući:

- ekstrakciju DNK (iz uzoraka tkiva, sline, krvi itd.) i njeno razblaživanje;
- lančanu reakciju polimeraze: efikasan proces pravljenja kopija ciljanih segmenata DNK;
- pročišćavanje proizvoda PCR-a: uklanjanje elemenata koji se koriste u procesu PCR-a za dobivanje visokokvalitetnih uzoraka DNK za sekvenciranje;
- reakciju sekvenciranja koja predstavlja PCR reakciju s PCR komponentama i fluorescentno obilježenim dideoksinukleotidima;
- prečišćavanje reakcije sekvenciranja, pri čemu se PCR fragmenti odvajaju od ostalih komponenti reakcije sekvenciranja;
- dobijanje sekvence DNK.

10. STANDARDNA OPERATIVNA PROCEDURA – SOP

Standardna operativna procedura (SOP) predstavlja skup detaljnih, pisanih uputstava za izvođenje protokola i vještina laboratorijskog rada. To je zvanični dokument koji sadrži precizno opisane korake koji se trebaju izvršiti po tačno određenom redoslijedu kako bi se ostvario očekivani rezultat. Također, opisuje sve faktore koji mogu imati utjecaj na kvalitet i konačni rezultat ispitivanja. Stoga predstavljaju nezamjenjive alate u postizanju kvalitete rada i sigurnosnih standarda.

Da bi dokumenti koji se definiraju kao standardne operativne procedure ostvarivali svoju svrhu, njihovoj izradi prethode različiti koraci koji se odnose na detaljnu analizu poslova i zadataka koji se trebaju obavljati, metodologiju rada, identifikaciju opasnosti i sigurnosti na radnom mjestu, metode kontrole i zaštite ljudi itd. Stoga u izradi standardnih operativnih procedura trebaju sudjelovati osobe koje će biti direktno uključene u njihovu primjenu, pravni tim koji treba uskladiti procedure s važećim zakonskim propisima te osobe koje će biti zadužene za uspostavu i praćenje primjene procedura, a naposljetku i njihovu reviziju.

Osnovna svrha operativnih procedura je sprečavanje operativnih grešaka i nezgoda, postizanje učinkovitosti i ujednačenosti, odnosno osiguranje kvaliteta. Upravo zbog toga, SOP dokumenti postoje u različitim djelatnostima (proizvodnja, farmacija, zdravstvena zaštita, kliničke studije, istraživačke laboratorije te mnoge druge). Međunarodni sistemi kvalitete (najpoznatiji je ISO9001) u osnovi zahtijevaju dokumentirane standardne operativne procedure koje se koriste u bilo kojem proizvodnom procesu koji ima utjecaj na kvalitetu proizvoda. Posebno u kliničkoj praksi, dokumentirano je da provođenje SOP dokumenata dovodi do poboljšanja u pružanju usluga.

SOP u laboratoriji

Laboratorije su zasebne organizacijske jedinice u sklopu bolnica, domova zdravlja ili instituta, koje za cilj imaju provođenje istraživačkih i/ili laboratorijsko-dijagnostičkih postupaka.

Visoki zahtjevi u osiguravanju najvećeg stepena kvaliteta laboratorijskog posla, počevši od uzimanja uzorka, preko metoda kojima se vrši njegova obrada, pohrane uzorka, pa do izdavanja nalaza ili rezultata, ukazali su na potrebu za sistemom upravljanja kvalitetom. Razvojem standardnih operativnih procedura omogućeno je postizanje nezavisnih rezultata bez obzira na osobu (laboratoriju ili instituciju) koja vrši određeno ispitivanje. Mnogo je razloga zbog kojih su standardne operativne procedure važne u radu i funkcionisanju svake laboratorije. Njima se osigurava:

- konzistentnost, uniformnost i pouzdanost u radu;
- reduciranje mogućnosti nastanka grešaka;
- zaštita, sigurnost i zdravlje ljudi prilikom rada;
- poštivanje vremenskih rokova za izvođenje analiza;
- brza obuka, osposobljavanje i edukacija novih uposlenika;
- pružanje informacija o materijalu i metodama u izvođenju analiza te osoblju koje treba da nadzire i kontroliše propisane načine rada;
- postojanje dokaza o odvijanju pojedinih procesa, opremi i korištenom materijalu;
- ušteda vremena i novca;
- primjena zakonskih regulativa i dobre laboratorijske prakse.

Standardne operativne procedure trebaju postojati za svaki postojeći proces ili analizu koja se primjenjuje u laboratoriji. One trebaju biti jasno vidljive i dostupne za korištenje svim uposlenicima u laboratoriji. Uvođenje novog procesa ili tehnologije u rad laboratorije treba slijediti kreiranje SOP dokumenata. U slučajevima izmjena u postojećem procesu ili izmjena u standardima i zakonskim regulativama, potrebno je promijeniti ili prilagoditi postojeće dokumente. Ukoliko se dogode incidentne situacije ili neuobičajene okolnosti koje isključuju pridržavanje smjernica sadržanih u SOP-u, potrebno je u pisanoj formi izvještaja opisati razloge i alternativne procedure koje su obavljene, kako bi se unaprijedile postojeće procedure. Standardne operativne procedure bi, generalno, trebalo provjeravati i ažurirati svake godine kako bi se osigurala njihova relevantnost. Sastavni dijelovi uvoda standardne operativne procedure su: naziv ustanove, naziv i vrsta

procedure, jedinstveni broj procedure, broj stranica i rok važenja procedure (vremena usvajanja ili izvršene revizije). Dokumenti trebaju sadržavati sve relevantne podatke o hemikalijama i aparaturi koji se koriste, objektu istraživanja (vrsti uzorka), uputstva za dokumentiranje podataka i arhiviranje, opis mjera predostrožnosti i drugo.

8.4. Prenos uzoraka u Jedinicu za kosti pri Odjelu za koordinaciju identifikacija (ICD) na DNK analizu

1. Prilikom pripremanja uzoraka za DNK analizu trebaju se slijediti propisane procedure primopredaje navedene u Standardnim operativnim procedurama *za prenos uzoraka, tabele podnesaka i izvještaje o podudaranju DNK u okviru Odjela za forenzičke nauke (FSD) (ICMP.SOP.FSD.108.doc)*.
2. Općenito, ICMP-ove unaprijed pripremljene koverta se trebaju koristiti za pakiranje gdje je to moguće. Bez obzira na vrstu pakiranja uzorka, oznaka uzorka mora biti napisana na pakiranju neizbirlivom tintom. Otvor pakiranja mora biti zapečaćen trakom, potpisan i datiran preko zapečaćenog dijela. Ovo štiti integritet uzorka jer će svaki pokušaj da se naruši sadržaj biti vidljiv.
3. Mogu postojati slučajevi kada osoba koja podnosi uzorke Odjeljenju za koordinaciju identifikacija nije osoba koja je izrezala ili izvadila uzorke. U takvim situacijama, ovo se mora jasno dokumentovati na pratećim papirima i na pakiranju uzorka (gdje je to izvodljivo).
4. Nepoštivanje preporučenih propisanih procedura primopredaje može rezultirati kašnjenjem u obradi uzoraka za DNK analizu.

Slika 21. Prikaz standardne operativne procedure koja se odnosi na način prijenosa uzoraka prilikom uzimanja uzoraka kostiju i zuba s posmrtnih ostataka za analizu DNK u ICMP-u

Obavezni elementi sadržaja SOP dokumenata su:

- opća izjava o politici, koja definira svrhu primjene određene procedure i obavještava o stavu ustanove prema toj proceduri;
- područje primjene, koje se odnosi na organizacijske jedinice ili zadatke u kojima se primjenjuje odgovarajuća procedura;
- distribucija i nadzor, što podrazumijeva navođenje osoblja laboratorije kojima procedura treba biti dostupna i koji trebaju postupati po donesenoj proceduri i svih osoba koje trebaju

obavljati povremeni ili stalni nadzor nad provođenjem procedure;

- procedura – postupak rada, koja predstavlja opis provođenja procesa rada kroz izvođenje niza međusobno povezanih koraka te evidenciju o provedenim postupcima;
- revizija procedure, koja se obavlja najduže svake tri godine, ili po nastanku promjena koje se odnose na propise ili zakonska rješenja u datoj oblasti, izmjenom opreme ili metodologije rada u laboratoriji itd.

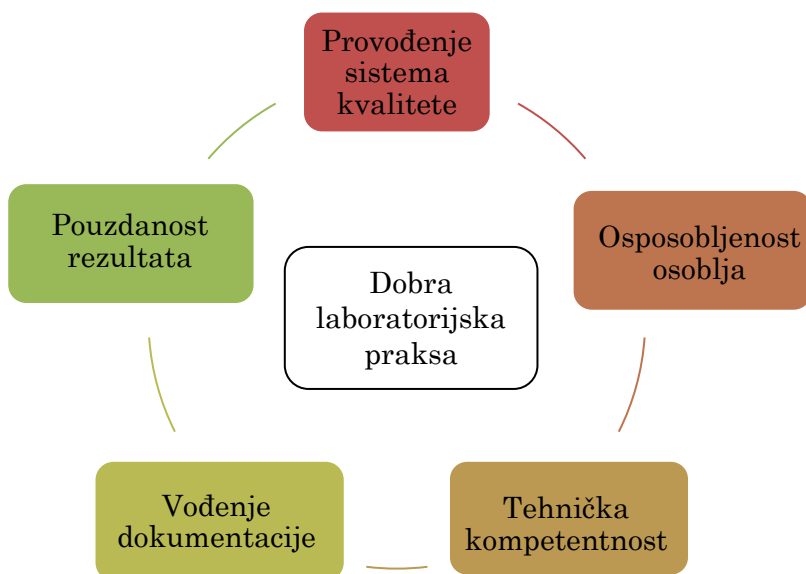
SOP dokumenti predstavljaju najbolji postojeći način obavljanja određenog posla, upravo zbog toga što su utemeljeni na principima sistema kontrole i osiguranja kvaliteta. Usvajanjem procedure ona postaje nalog za određeno ponašanje, a njeno nepoštivanje predstavlja povredu radne discipline.

Dobra laboratorijska praksa

Dobra laboratorijska praksa (DLP, engl. *Good Laboratory Practice*, GLP) predstavlja globalno općeprihvaćen sistem kvalitete koji se odnosi na način rada i organizaciju laboratorije s ciljem osiguravanja pouzdanih rezultata istraživanja koja se provode u laboratoriji. Potrebu za uspostavljanjem principa kvaliteta i dobre laboratorijske prakse na svjetskom nivou prvobitno je prepoznala Internacionalna organizacija za standardizaciju (engl. *International Organization for Standardization*, ISO). Prvi zvanični dokument “ISO Guide 25 – General Requirements for the Competence of Testing Laboratory” donesen je 1978. godine. Tri godine kasnije, 1981, Američke agencije (FDA – *Food and Drug Administration Agency* i EPA – *Environmental Protection Agency*) objavile su dokument “Good Laboratory Practice – GLP”.

Navedeni dokumenti su se u početku odnosili na set pravila u analitičkim i hemijskim laboratorijama, a kasnije su postali osnova za razvoj drugih modela upravljanja kvalitetom u laboratoriji u brojnim područjima (farmaceutski proizvodi, aditivi, testiranje hemikalija i dr.). Dobra laboratorijska praksa ne predstavlja samo smjernice, ona

može predstavljati i zakonsku obavezu, kao što je, na primjer, “Pravilnik o dobroj laboratorijskoj praksi” za institucije koje obavljaju laboratorijska ispitivanja lijekova (Službene novine Federacije BiH, br. 38/02).



Slika 22. Svrha osiguravanja dobre laboratorijske prakse

Osnovna svrha dobre laboratorijske prakse je osiguravanje minimuma standarda koji se mora dostići da bi se provodila istraživanja. Njena primjena podrazumijeva pravila i načine adekvatnog planiranja, izvođenja, monitoringa, pravljenja zabilježki o aktivnostima, arhiviranja uzoraka i podataka te izvještavanja o rezultatima istraživanja.

Principi dobre laboratorijske prakse bazirani su na organizaciji laboratorije i osoblja te odgovornostima menadžmenta ili rukovodioca ustanove (laboratorije) koji mora osigurati primjenu ovih principa. To se prije svega odnosi na pripremu detaljnog, pisanog plana istraživanja koji će sadržavati sve informacije relevantne za istraživanje, opis radnih zaduženja svakog člana istraživačkog tima te primjenu standardnih operativnih procedura i drugih dokumenata za osiguranje

kvaliteta. Time se omogućava kontrola i praćenje toka istraživanja, blagovremeno se mogu uočiti potencijalna vremenska odstupanja od plana te reagirati i preduprijediti daljnji nepovoljni tok studije, odstupanja od finansijskog plana i slično.

Dobra laboratorijska praksa podrazumijeva adekvatno organiziran prostor za istraživanje koji mora ispunjavati uslove veličine prostora, osvjetljenosti, prozračnosti i temperiranosti kako bi bio ugodan za rad, čime se smanjuju mogućnosti negativnih utjecaja na validnost istraživanja. Iz sigurnosnih razloga, prostor treba sadržavati sredstva za zaštitu od požara i sredstva za pružanje prve pomoći.

Prostori unutar laboratorije u kojima se odvijaju različiti dijelovi istraživačkog procesa trebaju biti fizički odvojeni. To podrazumijeva postojanje prostorije za uzimanje uzorka ili pripremu uzoraka za naredne korake, prostoriju u kojoj se odvija istraživački proces ili dijagnostika, čuvaju hemikalije, osjetljive supstance pohranjuju u laboratorijske frižidere ili zamrzivače te skladišni prostor u kojem se pohranjuju uzorci, podaci istraživanja, izvještaji i sl.

Prostorija za istraživanje treba biti opremljena odgovarajućom aparaturom, laboratorijskim priborom i posuđem te neophodnim hemikalijama za provođenje istraživanja. Rukovanje i održavanje aparata koji se koriste u laboratoriji treba pratiti preporuke proizvođača. Za hemikalije i reagense koji se koriste u istraživanju dobra laboratorijska praksa nalaže postojanje bilješki o datumu prijema, primljenim količinama, karakteristikama, roku trajanja te posebnim zahtjevima o načinu skladištenja.

Pet “zlatnih” pravila ponašanja u laboratoriji

- (1) Prilikom rada u laboratoriji, uvijek nositi laboratorijski mantil, rukavice ili drugu odgovarajuću zaštitu, posebno u slučaju korištenja toksičnih ili štetnih reagensa.
- (2) Uvijek unaprijed isplanirati tok eksperimenta i napraviti plan rada prije ulaska u laboratoriju.
- (3) Pitati osoblje u laboratoriji za informacije o adekvatnom odlaganju hemijskog i biološkog otpada. Biološki otpad se prije odlaganja dekontaminira autoklaviranjem (biološka kontrola).
- (4) Radne površine se dezinfikuju najmanje jednom dnevno, a obavezno nakon rada s potencijalno kontagioznim materijalom. Opremu treba očistiti svaki put prije početka i nakon završetka rada. Održavanje radnog prostora prevenira kontaminaciju koja može naškoditi vama, vašem ili radu drugih ljudi.
- (5) Ukoliko se radi s infektivnim biološkim agensima, obavezno pratiti upute za održavanje sigurnosti. Obavezno je pranje ruku sapunom i vodom prije ulaska u laboratoriju, poslije rada s biološkim materijalom i skidanja zaštitnih rukavica i nakon napuštanja laboratorije.

U laboratoriji je zabranjeno:

- ⊗ konzumirati hranu, piće, žvakati žvakaće gume;
- ⊗ nanositi kozmetička sredstva ili stavljati kontaktna sočiva;
- ⊗ unositi nepotrebne stvari (mobitel, jaknu, torbu i sl.);
- ⊗ ulazak neovlaštenog osoblja;
- ⊗ mirisati ili udisati hemikalije s kojima radite;
- ⊗ koristiti usta za pipetiranje;
- ⊗ sipati hemikalije u odvod bez dozvole;
- ⊗ koristiti laboratorijsku opremu bez dozvole.

Upotreba pipeta

Pipete predstavljaju izuzetno važan laboratorijski pribor koji je već desetljećima u upotrebi u biološkim, hemijskim ili medicinskim laboratorijama. Nastale su iz potrebe za preciznim mjerenjem i prenošenjem željenih volumena tekućine. Sve vrste pipeta funkcionišu na istom principu; iznad komore za zadržavanje tekućine dolazi do stvaranja djelimičnog vakuuma pomoću kojeg se selektivno uvlači ili ispušta tekućina. Najčešće su u upotrebi graduirane pipete i mikropipete.

Graduirane pipete su uske staklene ili plastične cijevi koje se pri dnu sužavaju u kapilaru. Na njima su urezane oznake volumena, a koriste se za volumene tečnosti veće od 1 ml (najčešće su u rasponu 10, 50 ili 100 ml). Gumeni nastavci ili pumpice (koje mogu biti i na električni pogon) koje služe za usisavanje rastvora i tečnosti u pipetu nazivaju se propipete.

Mikropipete ili automatski pipetori podesive zapremine služe za mjerenje (uzimanje ili dodavanje) vrlo malih volumena tečnosti, u rasponu od 0,1 μ l do 1 ml. Prototip je napravljen 1957. godine na Univerzitetu u Marburgu u Njemačkoj, a četiri godine kasnije kompanija Eppendorf pokreće komercijalnu proizvodnju mikropipeta. Plastični nastavci, koji se nazivaju tipovi, predstavljaju važan dio mikropipete. Dolaze u različitim veličinama i bojama, zavisno od tipa pipete i željenog volumena (Slika 23): veliki, plavi (za raspon 100–1000 μ l), manji, žuti (2–200 μ l), mali, bijeli (<10 μ l).

Tipovi se nalaze u sterilnim stalcima – kutijama koje su namijenjene za čuvanje tipova. Nakon korištenja, tipovi se odbacuju na odgovarajuće mjesto koje je namijenjeno za odlaganje laboratorijskog otpada. Kutije za tipove uvijek treba držati zatvorene kada se ne koriste. Potrebno je maksimalno izbjegavati dodirivanje tipova rukama (**iako nosite rukavice**), budući da to uveliko povećava rizik od kontaminacije materijala sa kojim se radi.

Na tržištu postoji mnogo proizvođača i različitih modela mikropipeta, a tako i nastavaka – tipova. Na primjer, pri radu s biološkim uzorcima

gdje je povećan rizik unakrsne kontaminacije, od velike koristi je upotreba sterilnih tipova koji u sebi imaju ugrađen filter, čime se sprečava aspiracija aerosola i tekućina u trup pipete. S druge strane, radi lakšeg rada s velikim brojem uzoraka, na tržištu postoje mikropipete s 8, 12 ili 16 kanala. Služe za prenošenje jednakih volumena u isto vrijeme, čime se značajno ubrzava proces rada. Također, isti cilj se može ostvariti korištenjem elektronskih pipeta koje zamjenjuju mehaničke verzije. Povremena, redovna kalibracija ili umjeravanje mikropipeta od ključne je važnosti u utvrđivanju njihove preciznosti u skladu s referentnim standardima. Uprkos njihovoj preciznosti, tačnost u pipetiranju zavisi i od vještine korisnika, njihove obučenosti i prakse.



Slika 23. Radni sto u laboratoriji: stalak s pipetama, kutije s različitim veličinama tipova i posuda za odbacivanje tipova



Slika 24. Multikanalna pipeta

Tehnika pipetiranja

Klip na pipeti može biti na tri pozicije (Slika 25). Svaki od tih položaja ima važnu ulogu u ispravnom korištenju pipete. Položaj 1 je mjesto gdje je pipeta u mirovanju. Položaj 2 postiže se pritiskom na klip dok se ne postigne otpor, što se naziva još i “prvo koljeno” i koristi se za

uzimanje željene količine tekućine. Položaj 3 postiže se pritiskom prema dolje iz položaja 2, odnosno pritiskom na “drugo koljeno” i obično se koristi za ispuštanje tekućine.

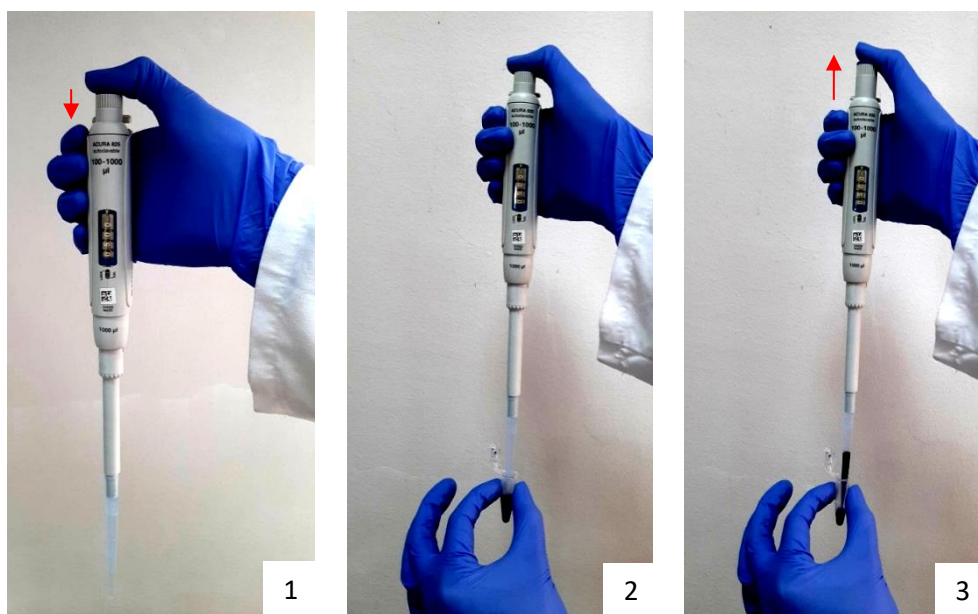


Slika 25. Položaj klipa na pipeti

Prije uzimanja željenog volumena tekućine, na mikropipeti se mora nalaziti odgovarajući nastavak, odnosno tip. Pipeta se drži tako da se palac nalazi na klipu, a prstima se čvrsto obuhvati oko gornjeg dijela tijela pipete. Palcem se pritisne klip pipete do prvog otpora, odnosno položaja 2. Držeći pipetu u tom položaju, vrh tipa se postavi ispod površine tekućine koja se uvlači. Pri tome treba paziti! Vrh tipa mora biti postavljen dovoljno duboko ispod površine kako se ne bi uvlačio zrak, ali ne smije biti uronjen do dna tubice u kojoj se nalazi tekućina jer može doći do zagušenja tipa, uvlačenja potencijalnog taloga i generalno aspiracije previše tekućine. Ispravna dubina uranjanja tipa je 1 do 2 mm za mikrovolumene i 3 do 6 mm ispod površine tekućine za veće volumene. Nakon toga, lagano se otpušta pritisak na klipu koji se vraća u položaj 1. Također treba biti pažljiv, posebno prilikom pipetiranja većih volumena. Ukoliko se prebrzo otpusti klip, tekućina koja se pipetira može prsnuti do vrha tipa i donjeg dijela mikropipete.

Ukoliko se u tipu pojave mjehurići, treba vratiti tekućinu u tubicu pritiskom klipa do položaja 3 i ponoviti postupak.

Za ispuštanje željenog volumena tekućine, mikropipeta se drži tako da se vrh tipa postavi unutar tubice gdje se tekućina želi prenijeti. Prilikom prenošenja manjih volumena u drugu tekućinu, vrh tipa treba postaviti ispod površine druge tekućine, najlakše uz rub tubice. Nakon toga, klip se palcem lagano gura prema položaju 2. Da bi se ispustila posljednja količina tekućine iz tipa, klip se pritisne prema položaju 3 neposredno ispod površine tekućine. Tip je potrebno izvaditi iz tekućine prije nego što se počne otpuštati klip pipete prema položaju 1. Naslanjanjem vrha tipa uz rub tubice smanjuje se ili potpuno uklanja mogućnost zaostajanja određene količine tečnosti u tipu.



Slika 26. Tehnika pipetiranja prilikom uzimanja željenog volumena

Promjena volumena na pipeti

Izuzev pipeta s fiksnim volumenima, kod većine mikropipeta postoji mogućnost njegovog podešavanja. Na svakoj pipeti je vidljivo očitavanje izabranog volumena. Neophodno je pridržavati se raspona unutar kojeg je moguće izabrati volumen na određenoj pipeti (Slika 27).

Njihova tačnost će se značajno smanjiti pokušajima da se odabere volumen ispod ili iznad njihovog specifičnog raspona, što rezultira oštećenjima pipete.



Slika 27. Pipete s obilježenim različitim rasponom volumena. Okretanjem klipa dolazi do promjene volumena



Slika 28. Gilson pipeta

U zavisnosti od proizvođača, modeli mikropipeta mogu se blago razlikovati. Stoga treba biti pažljiv prilikom očitavanja volumena. Na primjeru mikropipete Gilson P20 koja je u rasponu 2–20 µl, prva cifra označava desetine µl. Ona nikada ne smije preći broj 2. Druga cifra označava jedinice, dok je treća, crvena cifra za decimalne desetice. Ukoliko je željeni volumen 20 µl, to bi očitavanje volumena izgledalo kao 200. Na slici je predstavljen volumen od 9,5 µl.

Dobra laboratorijska praksa prilikom rukovanja mikropipetom podrazumijeva:

- ✓ lagano ispuštanje tekućine, bez prskanja;
- ✓ ispuštanje tekućine uz rubove tubica ili flaskova;
- ✓ izbjegavanje mjehurića;
- ✓ pipeta se nikada ne ostavlja na rubovima stola;
- ✓ iskorišteni tipovi se odlažu u posude za tu namjenu.

Upotreba centrifuga

Centrifuga je dio laboratorijske opreme koja se koristi za separaciju tekućina na osnovu gustoće, za izdvajanje taloga i gasova. Centrifugalna sila pod velikim brzinama gura teže molekule prema dnu tubice koja se centrifugira, istovremeno premještajući molekule manje gustoće prema vrhu. Centrifuge imaju veliku primjenu u različitim oblastima industrije. Laboratorijske centrifuge se koriste u hemiji, biologiji i kliničkoj medicini. Mogu se razlikovati prema brzini, kapacitetu, kontroli temperature i drugim karakteristikama. Sastoje se od tri osnovna dijela: rotora, pogonske osovine i motora. Rotor drži tubice s tekućinama koje se trebaju centrifugirati. Na pogonsku osovinu mogu se montirati različite vrste i veličine rotora. Na kućištu centrifuge nalaze se upravljačke komande kao što su prekidač za uključivanje centrifuge, kontrolni prekidači za određivanje brzine i vremena centrifugiranja. Određeni modeli centrifuga imaju i sposobnost hlađenja kako bi se spriječilo da se uzorci zagrijevaju tokom centrifugiranja ili omogućavaju centrifugiranje na željenoj temperaturi.

Brzina centrifugiranja je najčešće data u broju obrtaja po minuti (engl. *rotations per minute, rpm*), odnosno koliko puta rotor izvrši potpunu rotaciju u jednoj minuti. Brzina može biti izražena i kao odnos centrifugalne sile (engl. *relative centrifugal force, rcf*) ili G-sila na rotor. Modeli centrifuga novije proizvodnje imaju postavke za oboje. Određeni modeli centrifuga rade pri manjim brzinama obrtaja (do 10.000 *rpm*), a centrifuge velike brzine rade pri brzinama od 21.000 *rpm*. Ultracentrifuge mogu premašiti brzinu rotacije od 30.000 *rpm*. Rotor kod ultracentrifuge radi pod vakuumom, uklanjajući otpor

zraka, čime se omogućavaju velika brzina i precizna kontrola temperature.

Centrifuge mogu uzrokovati ozbiljne povrede ukoliko se s njima ne postupa na odgovarajući način. Opasnosti mogu biti povezane s mehaničkim kvarom ili raspršivanjem aerosola. Ukoliko se prekorači prag opterećenja rotora, dolazi do njegove deformacije, što ugrožava sigurno rukovanje centrifugom. S druge strane, ukoliko infektivni materijal procuri unutar rotora ili tijela centrifuge, predstavlja opasnost za korisnika i ostalo laboratorijsko osoblje. Zato je važno da svi poštuju principe dobre laboratorijske prakse za siguran rad centrifuga.

Tehnika centrifugiranja

Centrifuga treba biti smještena na čvrstoj i ravnoj površini koja može podupirati njenu težinu i osigurati stabilnost. Zavisno od uzorka, potrebno je odabrati centrifugu s odgovarajućim rotorom zbog brzine kojom je potrebno centrifugirati. Rotor i unutrašnjost centrifuge trebaju biti čisti i suhi.

Prije korištenja centrifuge potrebno je provjeriti postoje li neka oštećenja ili pukotine na tubicama koje se trebaju centrifugirati. Budući da se vrlo često centrifugira na velikom broju obrtaja, lako se može dogoditi da tubica pukne, a dragocjeni uzorak iscuri u rotor centrifuge. Tubice moraju biti potpuno zatvorene odgovarajućim čepovima. Ukoliko se radi s biohazardnim materijalom, prije stavljanja u centrifugu, zbog prevencije, spoljašnje strane tubica moraju biti prebrisane sredstvom za dezinfekciju. Također, zbog identifikacije i sprečavanja brisanja šifre uzorka, tubice moraju biti jasno obilježene dvostrukim obilježavanjem. To znači da se šifra uzorka piše na poklopcu i sa strane tubice. Volumen tekućine unutar tubice ne smije biti veći od tri četvrtine maksimalnog kapaciteta tubice.

Od izuzetne važnosti je osiguravanje balansa prije početka centrifugiranja (posebno ukoliko se želi centrifugirati neparan broj uzoraka). Pri velikim brzinama, centrifuga vrlo lako može postati neuravnotežena ukoliko u rotoru nema ravnomjerno raspoređenih

težina. Osim što može doći do trajnih oštećenja centrifuge, rotor se može odvojiti od ostatka centrifuge, što je vrlo opasno. Ako se centrifuga počne tresti ili pomjerati, odmah bi je trebalo zaustaviti jer to najčešće znači da nije u balansu. Manje vibriranje je normalno.

Nakon uključivanja centrifuge, potrebno je ostati u njenoj blizini sve dok ne dostigne punu brzinu rada, za slučaj da se treba prijevremeno ugasiti. Ukoliko se centrifuga počne pomjerati ili se čuju neobični zvukovi, mora se odmah ugasiti na prekidaču, a ukoliko nije pristupačan prekidač, isključiti iz utičnice.

Poklopac treba otvoriti tek kada se rotor potpuno zaustavi. Mnoge centrifuge imaju dodatnu zaštitu i ne mogu se otvoriti sve dok se rotor potpuno ne zaustavi. Tubice se pažljivo uzimaju iz centrifuge, tako da se razdvojene suspenzije ne bi ponovo pomiješale. Potrebno je provjeriti da li je došlo do curenja nekog uzorka i, ukoliko jeste, rotor je potrebno odmah očistiti. Nakon svake upotrebe potrebno je prebrisati rotor i centrifugu. U priručniku za svaku centrifugu stoje napomene u vezi s njenim održavanjem, a najčešće se preporučuje upotreba 10% rastvora varikine i 70% etanola te kratko ostavljanje otvorene unutrašnjosti centrifuge da se osuši na zraku. Dobra laboratorijska praksa prilikom rukovanja centrifugom podrazumijeva:

- ✔ prije početka rada provjeriti koja je željena brzina centrifugiranja i u skladu s tim odabrati centrifugu na kojoj je odgovarajući rotor;
- ✔ tubice moraju biti u balansu! Ukoliko je potrebno, koristite kao balans dodatnu tubicu s istom količinom tekućine kao u tubicama koje želite centrifugirati;
- ✔ tubice ne smiju nikada biti napunjene do vrha;
- ✔ ne zaboraviti staviti poklopac na centrifugu;
- ✔ nikada ne pokretati centrifugu dok je poklopac otvoren;
- ✔ ne pomicati centrifugu dok radi;
- ✔ ne naslanjati se na centrifugu;
- ✔ ne postavljati bilo šta na centrifugu dok radi;
- ✔ nikada ne otvarajte vrata centrifuge dok se rotor nije u potpunosti zaustavio, što je potvrđeno na zaslonu;
- ✔ po završetku, neophodno je očistiti rotor i centrifugu;

- ✔ ukoliko se primijeti neobičan zvuk, pregrijavanje centrifuge ili prosuta tečnost, to je potrebno odmah prijaviti laboratorijskom osoblju!

Laminar s protokom sterilnog zraka

Kabinet, aspirator ili laminar s protokom sterilnog zraka je laboratorijski uređaj koji služi za rad sa specifičnim materijalom koji zahtijeva kontrolisano i sterilno radno okruženje kao što su kulture ćelija, hranjive podloge, sterilne tekućine i dr. Koristi se u istraživačkim, mikrobiološkim, farmaceutskim i drugim laboratorijama. Sprečavanje kontaminacije postiže se ugrađenim jednim ili više HEPA (engl. *High-Efficiency Particulate Air*) ili ULPA (engl. *Ultra-Low Penetration Air*) filtera i istovremenim jednosmjernim strujanjem vazduha unutar laminara dodatno sprečavajući ulazak čestica iz zraka (prašine, bakterija, gljivica) iz vanjskog okruženja u laminar. Hepa filteri zadržavaju čestice veličine i do 0,3 mikrona. Ispunjavaju EN 1822 ili ISO 29463 standarde certificiranja kojima se definira minimalna efikasnost filtracije.

Osnovna svrha laminara je osiguravanje zaštite istraživača, kvalitete rada i pouzdanosti rezultata. U zavisnosti od modela, laminari s prednje strane imaju stakleni štit, koji može biti potpuno ili djelimično otvoren (samo s otvorima za rukavice) te može sadržavati i ugrađenu UV lampu sa svrhom dodatne mjere sterilizacije unutrašnjosti. Dostupni su laminari s horizontalnim i vertikalnim protokom, prema smjeru kretanja zraka unutar laminara. Dobra laboratorijska praksa prilikom rukovanja laminarom podrazumijeva:

- ✔ ne koristiti ih za skladištenje, ne unositi nepotrebni materijal na radnu površinu i skloniti predmete koji ometaju protok zraka;
- ✔ svu potrebnu opremu ili materijal potrebno je dezinfikovati prije unošenja u laminar kako bi se smanjila mogućnost kontaminacije radne površine;
- ✔ periodično dezinficijensom za sterilizaciju (alkoholom ili nekim drugim), preporučenim od strane proizvođača, obrisati radnu površinu i staklo s unutrašnje strane;

- ✔ prije početka rada u laminaru pripremiti sav potrebni materijal i uključiti protok zraka 15 ili 30 minuta, zavisno od modela;
- ✔ otpad ne ostavljati unutar laminara, odmah po završetku eksperimenta ga iznijeti;
- ✔ UV lampa emituje ultraljubičasto svjetlo koje je vrlo učinkovito u sterilizaciji i eliminaciji bakterija, virusa i gljivica, ali također može biti vrlo štetna za ljudsku kožu i oči. Stoga se preporučuje aktivacija UV lampe i napuštanje neposredne blizine laminara dok je uključena kako bi se smanjila izloženost korisnika;
- ✔ ne nošenje nakita (ni sata) na zglobovima i rukama budući da nisu sterilni i povećavaju mogućnost kontaminacije ili unošenja čestica i bakterija na radnu površinu laminara.

Standardna operativna procedura pri rukovanju laminarom

- (1) Postavite na radnu površinu sve što vam je potrebno za rad prije pokretanja laminara s protokom sterilnog zraka i zatvorite stakleni štit.
- (2) Uvjerite se da na radnoj površini nema predmeta osjetljivih na UV zrake i da je zatvoren stakleni štit.
- (3) Upalite UV svjetlo da radi najmanje 15 minuta kako bi se sterilizirala radna površina.
- (4) Isključite UV svjetlo i sačekajte 10 minuta.
- (5) Pet minuta prije početka rada uključite protok zraka u laminaru.
- (6) Otvorite stakleni štit i uključite osvjetljenje unutar laminara.
- (7) Opcionalno: Za dodatnu zaštitu, sterilizirajte radnu površinu 70% etanolom, ili laboratorijski papir natopite etanolom kako biste mogli povremeno dezinfikovati rukavice.
- (8) Izvedite eksperiment unutar laminara.
- (9) Po završetku zadatka, iznesite otpad (iskorištene tipove, tubice ili dr.) iz laminara i sklonite s radne površine sve što vam nije više potrebno.
- (10) Zatvorite stakleni štit i isključite protok zraka. Opcionalno upalite UV svjetlo u trajanju od najmanje 15 minuta (napomena: ne zaboraviti isključiti UV).

11. LABORATORIJSKA KNJIGA, DNEVNIK I SVESKA

Pravilno uzimanje uzorka je ključan korak koji prethodi uspješnoj, tačnoj i preciznoj analizi bioloških uzoraka. Laboratorije imaju prilagođen pristup obradi različitih vrsta uzoraka, prema pravilima struke i zakona. Međutim, zajedničko svim vrstama uzoraka i tipovima kliničkih, dijagnostičkih i istraživačkih laboratorija jeste uvođenje u matičnu laboratorijsku knjigu svih vrsta materijala koji se obrađuju ili pohranjuju u okviru određene laboratorije.

Laboratorijska knjiga predstavlja radnu evidenciju i sadrži sve formalne informacije o uzorku od trenutka kada on dospije u laboratoriju do momenta izdavanja rezultata i/ili pohranjivanja uzorka. U laboratorijsku knjigu se bilježe podaci kao što su datum uzimanja uzorka, podaci o vlasniku uzorka, tip uzorka, analize koje je potrebno provesti, protokol koji se primjenjuje, ime osobe koja je uzela uzorak, poveznica s barkodom ili fajlom ukoliko se radi i o digitalizovanim bazama i podacima.

S druge strane, bilješke o uzorcima koji se obrađuju u istraživačkim laboratorijama zapisuju se u laboratorijski dnevnik i/ili laboratorijsku svesku. Laboratorijski dnevnik je termin koji se više odnosi na dokumentaciju realnog toka rada, tako da se u svakom trenutku može pratiti primijenjena metodologija i prethodno izvršeni koraci. Posebno je bitan u slučaju multidisciplinarnih istraživanja, rada istraživača iz više laboratorija ili gostujućih istraživača s drugih institucija koji sudjeluju u istraživanju.

Laboratorijska sveska je termin koji se više odnosi na autentičan i lični dokument, jedinstven po sadržaju i individualnom načinu vođenja. U nju se bilježe hipoteze, pitanja, skice, utisci i zapažanja te različite informacije o samom toku eksperimenta. Danas se, sve češće, koriste elektronske laboratorijske sveske (engl. *Electronic Laboratory Notebook*, ELN) koje omogućavaju arhiviranje podataka i dijeljenje između članova tima, imaju alate za organizaciju bilješki, a dostupne su kao web-aplikacije i besplatne za korištenje.

Preporuke za vođenje laboratorijskog dnevnika/sveske

Osnovne karakteristike laboratorijskog dnevnika/sveske su kompaktnost (listovi uvezani u cjelinu bez slobodnih papira), korištenje crne ili plave hemijske olovke i numeracija stranica redoslijedom, čime se utvrđuje njen legitimitet, budući da bi svako uklanjanje podataka ili stranica iz laboratorijskog dnevnika/sveske bilo očigledno.

Laboratorijski dnevnik/sveska na vidnom mjestu treba sadržavati osnovne podatke o vlasniku, ime i prezime i kontakt podatke (e-mail adresa ili broj telefona). Ukoliko se koristi u svrhu realizacije jednog projekta, također treba sadržavati naziv projekta i godinu realizacije.

Prvih nekoliko stranica laboratorijskog dnevnika/sveske trebalo bi biti rezervisano za sadržaj. Istraživači često mogu imati dva ili više eksperimenata u isto vrijeme, a u toku karijere mogu proizvesti nekolicinu laboratorijskih dnevnika/sveski, stoga postojanje sadržaja uveliko olakšava korištenje pohranjenih podataka.

Unosi u laboratorijski dnevnik uvijek počinju navođenjem datuma, plana i svrhe eksperimenta. Čak i kada su unosi vrlo kratki, datiranje predstavlja hronološki zapis o realizaciji eksperimenta, stoga ih je važno navoditi. Nakon toga navode se sve relevantne informacije povezane s eksperimentom, uključujući opis korištenog materijala/uzorka, opreme koja se koristi i specifičnosti u vezi s postavkama korištenih programa te reagenasa, njihove koncentracije, naziva proizvođača i slično. Zatim se opisuju korištene metode i njihove specifičnosti. Često su informacije navedene u ovom dijelu od ključne važnosti (čak i ako se mogu činiti trivijalnim ili beznačajnim) za otkrivanje rješenja ukoliko se pojavila poteškoća u realizaciji eksperimenta, ali i za njegovo ponavljanje, kako bi drugi istraživač koristeći istu laboratorijsku svesku mogao dobiti identičan rezultat. Zbog toga je ključno paziti na ispravnost i tačnost svih unesenih brojeva, mjerenja, temperature ili drugih specifičnosti eksperimenta. Kao dodatna preporuka u vođenju laboratorijskog dnevnika/sveske navodi se čitljiv i razumljiv rukopis. U posljednjem dijelu se mogu tabelarno prikazati rezultati, navesti preliminarne zaključke, bilješke

i zapažanja. Crteži ili skice mogu biti vrlo vrijedni u vizualnom predstavljanju eksperimenta.

Budući da je zapisivanje informacija o eksperimentu na pojedinačnim papirićima u suprotnosti s dobrom laboratorijskom praksom korištenja i vođenja laboratorijskog dnevnika/sveske, ukoliko eksperiment uključuje bilo koje dodatne informacije u vidu fotografija ili ispisa s instrumenta, takvi podaci trebaju biti čvrsto pričvršćeni prema odgovarajućem redoslijedu toka eksperimenta.

Svakodnevno pisanje laboratorijske sveske postaje rutina. Pouzdanost zapisanih podataka istovremeno u toku izvođenja eksperimenta mnogo je veća u odnosu na naknadno zapisivanje i oslanjanje na sjećanje. Unos u laboratorijski dnevnik/svesku treba biti jasan mjesecima ili godinama kasnije i ostvarivati osnovnu svrhu njegovog vođenja bez obzira na individualni stil koji svi istraživači vremenom razvijaju.

12. PRINCIPI RADA S BIOHAZARDNIM MATERIJALOM U MOLEKULARNOBIOLOŠKOJ LABORATORIJI

Znanje o pravilnoj upotrebi i rukovanju različitim hemikalijama i aparaturom koja se koristi u laboratoriji veoma je važno budući da predstavlja potencijalnu opasnost za zdravlje istraživača. Od ključne je važnosti pridržavati se pravila i mjera sigurnosti i odijevanja u laboratoriji.

U većini laboratorija su na vidljivom mjestu istaknuta osnovna sigurnosna pravila kojih se neophodno pridržavati. Sigurnosna oprema, kao što su aparat za gašenje požara, pribor za prvu pomoć ili mjesto za odlaganje hemijskog otpada, trebaju biti pristupačni i dostupni.

Laboratorijski mantil, koji treba da bude dugih rukava, dužine ispod kukova, laboratorijske rukavice i zaštitne naočale sa sigurnosnim staklima predstavljaju osnovnu zaštitnu opremu istraživača. Laboratorijske rukavice i maska smanjuju rizik kontaminacije uzorka koji se analizira od strane osobe koja vrši uzorkovanje i/ili analizu. Rukavice imaju dodatnu ulogu zaštite od eventualnih povreda tokom rada. Sandale ili bilo koja vrsta otvorene obuće nije dozvoljena u laboratoriji. Prije ulaska u laboratoriju i početka rada na eksperimentu potrebno se temeljito pripremiti i pročitati šta je sve potrebno koristiti za izvođenje eksperimenta. Zavisno od prirode eksperimenta, nekada je potrebno koristiti dodatnu zaštitnu opremu kao što su zaštitna maska i kapa, zaštita za sluh, zaštitni rukavi ili odijela za jednokratnu upotrebu.

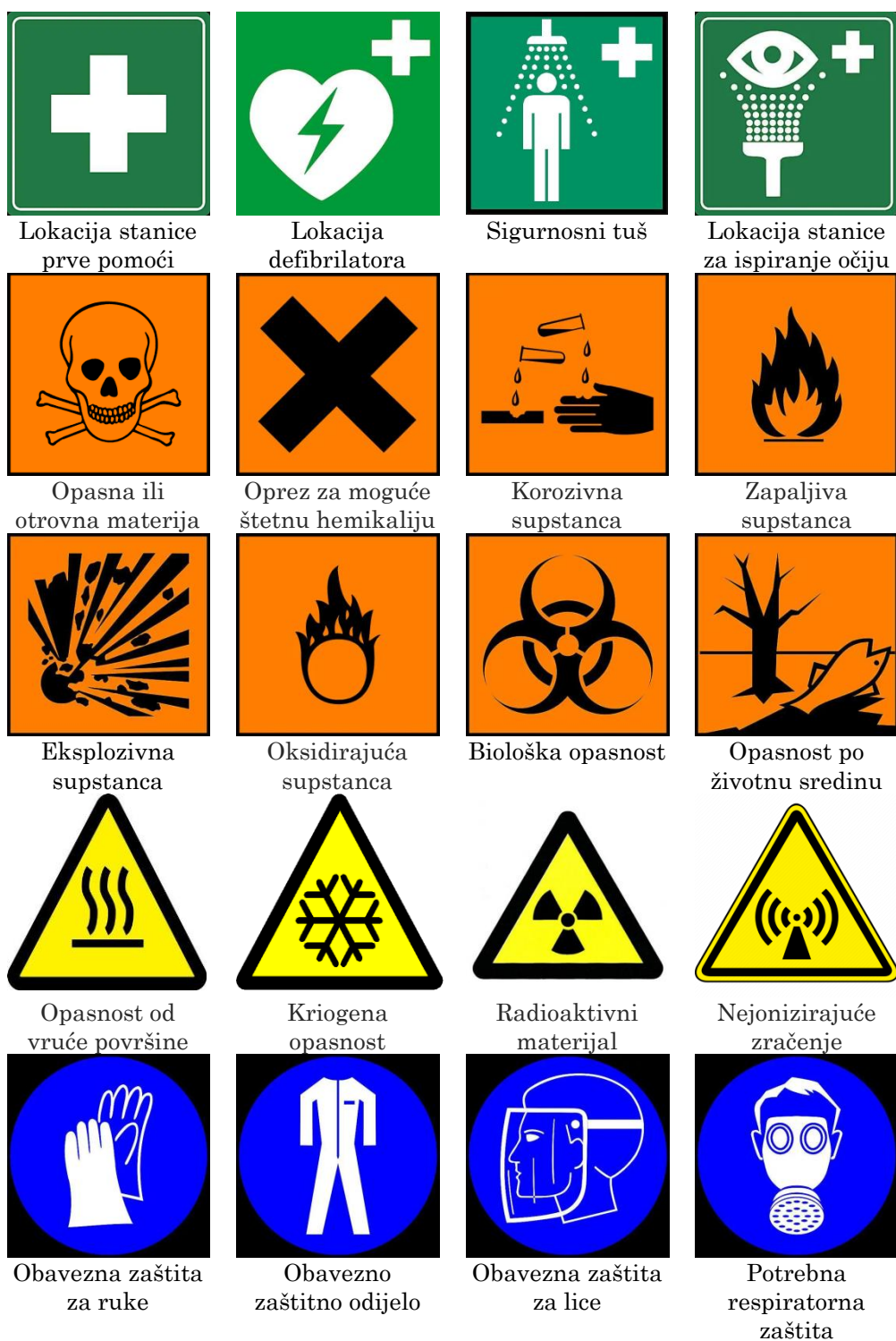
Najvažnije sigurnosno pravilo u radu s hemikalijama je pretpostaviti da je svaka hemikalija kojom rukujete opasna. Najčešće su štetne i otrovne stvari jasno obilježene i pohranjene na sigurnom mjestu. Neke od takvih hemikalija koje se uobičajeno koriste u laboratorijama za molekularnu biologiju su fenol, hlороform, β-merkaptоetanol, etidijum bromid i nekolicina drugih.

Fenol je jaka korozivna hemikalija i može uzrokovati ozbiljne opekotine, lahko prodire u kožu, iritira disajni sistem i može oštetiti

nervni sistem, jetru i bubrege, dok osjetljivije osobe mogu imati jake glavobolje čak i pri kratkom izlaganju parama fenola. Hloroform je jak kancerogen i može uzrokovati oštećenje tkiva i organa. Može se apsorbirati u kožu i udahnuti, a njegovi učinci su kumulativni. U kombinaciji s fenolom, povećava sposobnost fenola da prodire u kožu. β -merkaptetanol je toksičan i uzrokuje iritaciju disajnog sistema, kože, povraćanje i bolove u želucu. Pored laboratorijskog mantila, rukavica i zaštite za oči, uvijek se preporučuje raditi u laminaru ili kontrolisanim uslovima kada se koriste ove hemikalije.

Kuhanje agaroze i rukovanje s vrućom agarozom može izazvati ozbiljne opekotine. Dodatni oprez se preporučuje pri rukovanju uređajem za gel elektroforezu zbog napajanja električnom strujom, stoga se nikada ne treba skidati poklopac ukoliko je napajanje uključeno ili uključivati uređaj ukoliko podloga na kojoj stoji uređaj nije suha. Ranije se u laboratorijama za gel elektroforezu standardno koristio etidij bromid koji je jak mutagen, a u posljednje vrijeme se sve više koriste sigurnije zamjene za vizualizaciju DNK na gelovima kao što su Midori Green ili Syber Green.

Laboratorije često imaju sigurnosne priručnike ili upute koje su u skladu sa zakonskim propisima kojima se identificiraju opasnosti i navode strategije njihovog ublažavanja, navode kontrolne mjere za smanjenje izloženosti hemikalijama, osposobljavaju istraživače za upotrebu oštih predmeta i provođenje postupaka koje treba slijediti u slučaju nezgode te zbrinjavanje biootpada i reagenasa. Osoblje koje je u kontaktu s laboratorijom treba imati osnovna znanja o standardnim mjerama opreza koja su obuhvaćena standardnim operativnim procedurama i dobrom laboratorijskom praksom.



Slika 30. Sigurnosni znakovi u laboratoriji

Mjere biološke sigurnosti

U zavisnosti od karakteristika prostora i konstrukcije laboratorije, opreme, operativnih procedura koje se izvode u laboratoriji i podrazumijevaju rad s materijalom iz različitih rizičnih skupina, definirana su četiri nivoa biološke sigurnosti (engl. *biosafety level*, BSL). Oni podrazumijevaju mjere predostrožnosti koje se odnose na smanjenje rizika od izloženosti potencijalno zaraznom materijalu i ograničavanju kontaminacije radnog okruženja i okoliša. U skladu s tim, uključuju primarne i sekundarne barijere koje imaju za cilj biološku kontrolu širenja patogena i opasnih agenasa unutar zatvorenog laboratorijskog prostora. Primarne uključuju radne površine, laminare, zaštitne hude, rukavice i drugu zaštitnu opremu, dok sekundarne uključuju fizičke barijere i ograđene zasebne prostorije kojima se ograničava pristup laboratoriji.

Nivoi biološke sigurnosti klasificiraju se od najnižeg do najvišeg, BSL-1, BSL-2, BSL-3, BSL-4. Svaki nivo ima specifične zahtjeve s obzirom na patogene s kojima se radi, posebno u odnosu na njihov rizik za istraživača i okolinu. Nivo biološke sigurnosti 1 podrazumijeva rad s poznatim patogenima koji predstavljaju minimalnu opasnost za uposlenike u laboratoriji i okoliš (*Escherichia coli* K-12, *Bacillus subtilis*, adenoasocirani virusi 1-4, T4 bakteriofagi, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus stolonifer*, *Candida albicans*, *Pseudomonas*, infektivni hepatitis pasa, transgene biljke, plazmidi, gljive, plijesan, kvasac).

Nivo biološke sigurnosti 2 koristi se u radu s infektivnim patogenima koji mogu uzrokovati bolest kod ljudi ili životinja, ali su umjerenog rizika za uposlenike laboratorije i okoliš. Opasni su ukoliko se udahnu, progutaju ili izlože koži, ali postoje dostupne metode liječenja, a rizik od širenja infekcije je ograničen (*Staphylococcus aureus*, *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium diphthiriae*, određeni sojevi *E. coli*, *Nisseria gonorrhoea*, *Streptococcus pyogenes*, *Vibrio cholerae*, *Klesiella spp.*, *Proteus*, *Serratia marcescens*, *Salmonella*, Hepatitis A, B, C, *Cryptococcus neoformans*, većina parazitskih agenasa, Herpes simplex

virus, replikacijski atenuirani virus humane imunodeficijencije, uzorci pacijenata).

Nivo biološke sigurnosti 3 obuhvata rad s patogenima koji mogu izazvati ozbiljne ili potencijalno smrtonosne bolesti ljudi i životinja putem inhalacije, ali je ograničen prijenos sa zaražene osobe na drugu i dostupne su metode liječenja (*Francisella tularensis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia psittaci*, virus venecuelanskog konjskog encefalitisa, virus istočnog konjskog encefalitisa, SARS-CoV-1, SARS-CoV-2, MERS-CoV, *Coxiella burnetii*, nekoliko vrsta groznice Rift Valley, virus žute groznice, virus Zapadnog Nila, *Yersinia pestis*).

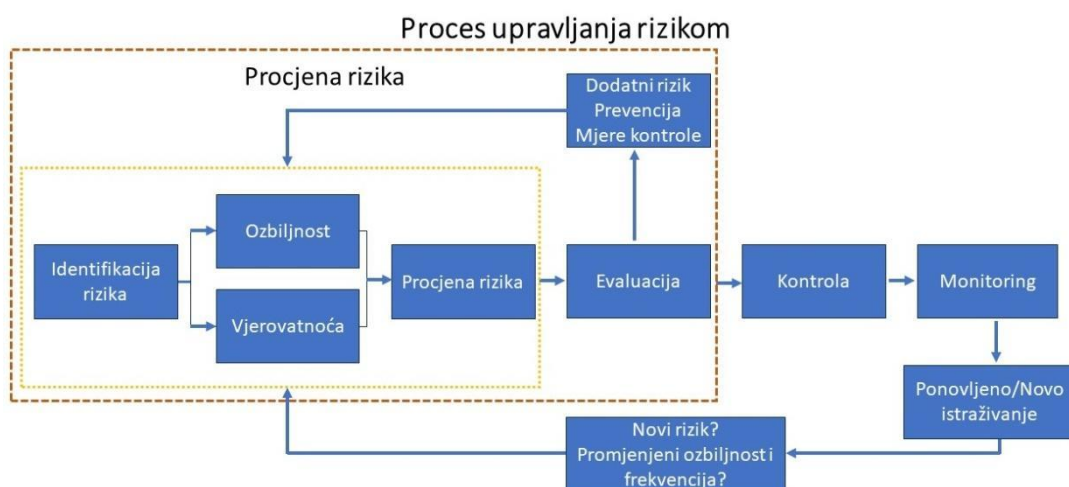
Nivo biološke sigurnosti 4 koristi se u radu s patogenima protiv kojih ne postoje vakcine ili tretmani liječenja, a lahko se prenose, direktno ili indirektno, s jedne osobe na drugu aerosolom i mogu uzrokovati teške ili smrtonosne bolesti (virus hemoragijske groznice ebole, virus Marburg, virus Lassa groznice, virus Machupo, virusi hemoragije Krimskog konga, bolivijski i argentinski virusi hemoragijske groznice, neki virusi encefalitisa, herpesvirus simiae).

U osnovi biološke sigurnosti je procjena rizika (Slika 31). Direktor ili glavni istraživač laboratorije odgovorni su za osiguranje provođenja istraživanja prema odgovarajućem nivou biološke sigurnosti, dostupnosti opremi i objektima koji su neophodni u istraživanju. Procjenu rizika treba kontinuirano pratiti i po potrebi revidirati. Sve dijagnostičke i laboratorije iz zdravstvenog sektora bi prema posljednjim smjernicama laboratorijske prakse trebale imati najmanje nivo 2 biološke sigurnosti budući da je u radu s biološkim uzorcima osoblje laboratorije uvijek u većem riziku izloženosti patogenima od očekivanog. Stoga su zlatna pravila u radu s biološkim uzorcima: (i) tretirati sve biološke uzorke kao potencijalno kontagiozne, (ii) sve pacijente smatrati potencijalno infektivnim.

Patogeni u krvi i tjelesnim tečnostima (engl. *blood borne pathogens*) i patogeni u vazduhu (engl. *air borne pathogens*) visoko su infektivni i prenose se bliskim kontaktom s inficiranom osobom (prenošenjem prilikom razgovora ili kašljanjem), pri radu s uzorcima ili aerosolom. Partikule aerosola su promjera manjeg od 5 µm i nisu vidljive golim

okom. Laboratorijske aktivnosti kojima se proizvode aerosolne partikule su miješanje, sipanje, vorteksiranje i homogeniziranje, centrifugiranje, inokulacija ćelijskih kultura i izljevanje agar ploča i brojne druge.

Biološki uzorci s visokim rizikom infekcije su krv, ejakulat, vaginalni sekret, likvor te sinovijalna, pleuralna, peritonealna, perikardijalna i amnionska tečnost.



Slika 31. Shematski prikaz procesa upravljanja rizikom

Sterilizacija

Sterilizacija predstavlja sve fizičke i fizičko-hemijske postupke kojima se potpuno uklanjaju sve forme mikroorganizama i njihovih spora s predmeta, instrumenata i materijala. Predmeti koje je potrebno sterilizirati moraju biti čisti i suhi. Sve nečistoće koje ostanu mogu djelovati kao zaštitni omotač mikroorganizama i ometati njihovo uništavanje, dok vlaga zbog isparavanja može dovesti do rashlađivanja i izostanka željenog djelovanja sterilizacije. Također, važno je osigurati da svi dijelovi instrumenata budu razdvojeni, koliko je to moguće, i da nema zaostalih vazdušnih džepova, kako bi toplota mogla prodrijeti i postupak sterilizacije biti ispravan.

Može se izvoditi suhom i vlažnom toplotom, zračenjem i hemijskim sredstvima. Suha toplota (vrući zrak) je najstariji način sterilizacije staklenih i metalnih predmeta, manjih instrumenata, masnih tvari i ulja, lijekova, pudera. Suhi sterilizator je uređaj koji radi na ovom principu, sastoji se od komore čije se stijenke zagrijevaju na temperaturu od 160 do 180°C, a sterilizacija se odvija u periodu ne kraćem od jednog sata. Sterilizacija vrućim vazduhom zahtijeva više temperature i duže vrijeme izlaganja, što može prouzrokovati oštećenja oštarih instrumenata u odnosu na sterilizaciju vodenom parom.

Vlažna toplota (vodena para) se koristi za sterilizaciju gumenih predmeta, otopina, tekstilnih predmeta, metalnih instrumenata i drugih materijala koji dobro podnose visoku temperaturu i predstavlja najpouzdaniji postupak sterilizacije. Izvodi se u autoklavu, uređaju koji se sastoji od vrata koja se hermetički zatvaraju te unutrašnje i vanjske komore između kojih je prostor ispunjen parom pod pritiskom. Temperatura, pritisak vodene pare i vrijeme su osnovne odrednice ovog tipa sterilizacije. Ukoliko je potrebno da vrijeme sterilizacije bude kraće, temperatura mora biti viša i obrnuto. Standardni programi sterilizacije autoklavom su 121°C u trajanju od 20 minuta uz pritisak od 1,2 bara i 134°C u trajanju od 5 minuta i pritisak od 2,5 bara. Mehanizam sterilizacije vlažnom toplotom temelji se na uništavanju ćelijskih proteina.

Sterilizacija zračenjem provodi se na sobnoj temperaturi pa se naziva i hladna sterilizacija. Koristi se za sterilizaciju prostorija, hirurških sala, plastičnih i gumenih jednokratnih predmeta prije odlaganja u komunalni otpad i sl. Najčešće se koristi ultraljubičasto zračenje koje izaziva oštećenja unutar ćelijskih nukleinskih kiselina i djeluje antimikrobno.

Sterilizacija hemijskim sredstvima primjenjuje se na radnim površinama i opremi korištenjem dezinfekcijskih sredstava koja sadrže spojeve hlora, jodoforma, alkohola i drugih. Manji instrumenti se trebaju potopiti u dezinficijense ili sredstva za čišćenje prema uputama proizvođača.

U specifične načine sterilizacije ubraja se žarenje, koje se provodi u mikrobiološkim laboratorijama zagrijavanjem bakterioloških igli iznad plamena do užarenosti, a zatim se hlade na zraku. Sterilizacija filtriranjem je postupak sterilizacije otopina koje se ne smiju izlagati visokim temperaturama korištenjem filtera s malim promjerima pora koje zadržavaju mikroorganizme. Na niskim temperaturama, sterilizacija se može izvoditi gasovima s mikrobicidnim djelovanjem: etilen-oksidi, formaldehid i vodonik peroksid. Sterilizacija etilen-oksidi i formaldehidom odvija se u automatiziranim sterilizatorima na temperaturi 45–70°C u trajanju 1–4 sata. Etilen-oksidi je izrazito toksičan i eksplozivan u smjesi sa zrakom pa se sterilisani predmeti duže vremena prozračuju, što produžava vrijeme njihove obrade. Prednost sterilizacije formaldehidom jeste što njegove pare nisu zapaljive ni eksplozivne, a kada je sterilizacijski ciklus završen, nema potrebe za dodatnim prozračivanjem. Sterilizacija vodikovim peroksidom odvija se uz korištenje visokofrekventnih energetske polja koja gas dovode u stanje plazme koja se koristi za sterilizaciju na temperaturi od 40°C u trajanju od 1 sata.

Posebnu pažnju treba posvetiti manualnom čišćenju i ručnom pranju instrumenata budući da nose najveći rizik od kontaminacije i predstavljaju najmanje učinkovit način sterilizacije. Nadzor sterilizacije i korištenje različitih indikatora osigurava sigurnost postupka i visoku pouzdanost rezultata sterilizacije.

Fizička metoda kontrole sterilizacije je praćenje termometra i manometra, čime se osigurava da su temperatura i pritisak postignuti, i izvodi se kontinuirano uz korištenje aparata za sterilizaciju. Vakuumski test (test curenja ili dihtovanja) koristi se za provjeru rada sterilizatora, postizanja i održavanja zadatih uslova i izvodi se jednom sedmično. Hemijske metode kontrole sterilizacije podrazumijevaju korištenje testnih indikatora koji pokazuju promjene boje uslijed djelovanja temperature od 160°C. Sterilni predmeti moraju biti zaštićeni od prašine, svjetla i nepovoljne temperature, pa se preporučuje njihovo skladištenje na sobnoj temperaturi na suhom mjestu. Ukoliko postoji sumnja u sterilnost materijala, zlatno pravilo je ponoviti postupak sterilizacije.

Upravljanje otpadom u laboratoriji

Pored rizika od hemikalija i (infektivnog) materijala kojima su izloženi istraživači, okoliš / životna sredina je također u opasnosti od kontaminacije opasnim materijalima i otpadom nastalim kao neposredna posljedica provođenja redovnih aktivnosti u laboratorijama. Otpad iz laboratorije predstavlja potencijalno visok rizik za kontaminaciju vode, zraka i tla, a koliki će biti utjecaj otpada na životnu sredinu uveliko zavisi od načina na koji se njime upravlja.

Neopasan otpad prema svom sastavu i osobinama ne šteti ljudskom zdravlju i ne ugrožava okoliš. S druge strane, opasni otpad se deklarira kao takav ukoliko posjeduje jednu ili više osobina rizika koje mogu prouzrokovati štetu i pri niskim koncentracijama (eksplozivnost, oksidativnost, zapaljivost, reaktivnost, nadražljivost, štetnost, toksičnost, infektivnost, mutagenost, kancerogenost). Opasni otpad nastaje u laboratorijama u područjima biologije, hemije, biomedicine, farmacije i drugim srodnim područjima. Nastaje kao rezultat upotrebe hemijskih spojeva (halogenirana i nehalogenirana otapala, reagensi, katalizatori, kiseline itd.) ili bioloških materijala (ćelijske linije, humani uzorci, bakterije, animalne ćelije i tkiva i sl.). Najčešće se klasificira kao infektivni otpad (sav otpad koji je opasan za čovjeka i životinje), hemijski otpad (koji sadrži opasne tvari), oštri predmeti i ostali opasni otpad (svaki drugi otpad za koji postoji sumnja na neko od opasnih svojstava). Stoga je od presudne važnosti da se u takvim laboratorijama opasni otpad zbrinjava na adekvatan način uspostavljanjem sistema upravljanja otpadom. Laboratorije individualno procjenjuju i uspostavljaju sistem za upravljanje otpadom u zavisnosti od vrste opasnog otpada koje generiraju. Osnovni principi se temelje na aktivnostima, odlukama i mjerama u pravcu smanjenja količine otpada, njegovom sortiranju i razdvajanju, evidenciji i dokumentiranju, odlaganju u odgovarajuće spremnike unutar laboratorija, sterilizaciji ili dekontaminaciji, odlaganju u odvojenim prostorijama do obrade ili predaji ovlaštenim osobama koje će dalje izvršavati radnje zbrinjavanja takvog otpada te provođenju nadzora upravljanja otpadom.

13. KLINIČKE STUDIJE

Kliničke studije su po definiciji naučnoistraživačke studije koje koriste humane volontere (participante studije) da bi proširili znanje u medicini. Postoji više tipova kliničkih studija, a najčešće su:

- (1) Opservacijska studija – Istraživači procjenjuju zdravstvene ishode u grupama učesnika u skladu s planom istraživanja ili protokolom. Participanti uglavnom slijede svoj normalni zdravstveni plan, bez dodatka terapije ili medicinskog uređaja od strane istraživača.
- (2) Kliničko ispitivanje ili intervencijska studija – Tretmani u kliničkim ispitivanjima uglavnom se baziraju na novim lijekovima ili medicinskim uređajima, koji nisu na tržištu, ili pak dodatnim funkcijama lijekova koji su već na tržištu. Istraživači u ovoj vrsti kliničkih studija posmatraju je li lijek siguran za upotrebu, kao i djeluje li kako je zamišljeno.
- (3) Istraživanje medicinske literature – Kliničke studije povezane s istraživanjem medicinske literature uglavnom su kao i drugo istraživanje literature u svrhu preglednih članaka ili knjiga. Svrha ovog tipa kliničkih studija povezana je s prethodnim istraživanjem činjenica o medicinskim sindromima prije samog početka kliničke studije.

Kliničko ispitivanje (engl. *clinical trials*) napoznatiji je tip kliničkih studija koji je u upotrebi danas. Prije svakog novog lijeka ili nove namjene već poznatog lijeka kliničko ispitivanje mora biti provedeno prije nego se lijek stavi na tržište. Klinička ispitivanja su pažljivo dizajnirana, nadgledana i zaključena. Ovakva ispitivanja moraju biti odobrena prije nego što počnu, najčešće od strane etičkog komiteta institucije u kojoj će se vršiti klinička ispitivanja, ili pak institucije države u kojoj se vrše klinička ispitivanja u slučaju da se radi o višecentričnoj studiji unutar jedne države.

Klinička ispitivanja trebaju odgovoriti na sljedeća pitanja:

- (1) Funkcioniše li novi tretman? Ako funkcionira, putem kliničkih ispitivanja se može vidjeti i specifičnost i senzitivnost novog tretmana.
- (2) Je li novi tretman bolji od tretmana koji se sada koristi? Ako nije bolji, je li dobar i izaziva manje neželjenih efekata? Funkcionira li kod nekih ljudi kojima ne pomažu trenutni tretmani?
- (3) Je li novi tretman bezbjedan? Nijedan tretman ili postupak – čak ni onaj koji je već u uobičajenoj upotrebi – nije bez rizika. Međutim, da li prednosti novog tretmana prevazilaze rizike?
- (4) Je li ovaj tretman bolji od standardnog tretmana?

Da bi odgovorila na ova pitanja, sva klinička ispitivanja su podijeljena na određene pretfaze i faze. Prva pretfaza kliničkih ispitivanja su pretklinička ili laboratorijska ispitivanja, dok je druga faza odobrenje kliničkih ispitivanja od strane administracije države ili klinike u kojoj će se istraživanja vršiti.

Pretklinička ili laboratorijska ispitivanja vrše se u dva dijela, i to *in vitro* i *in vivo*. *In vitro* se odnosi na ispitivanje novog lijeka ili spoja na ćelijskim kulturama. To su ispitivanja citotoksičnosti i genotoksičnosti, doziranja lijeka ili eventualnih efekata koji nisu poželjni u razvoju lijeka. *In vitro* ispitivanja se uglavnom vrše na humanim ćelijskim linijama koje su slične targetnom tkivu lijeka, iako se mogu vršiti i na animalnim ćelijama ako je to potrebno. *In vivo* ispitivanja se vrše na laboratorijskim životinjama, i to najčešće na miševima, pacovima, zamorcima i zečevima. Jedan od problema pretkliničkih studija je da ljudi i miševi mogu biti veoma različiti u načinu na koji apsorbiraju, obrađuju i oslobađaju se lijekova ili tretmana, npr. tretman koji djeluje protiv karcinoma kod miša može ili ne mora djelovati kod ljudi. Također, može biti neželjenih efekata i drugih problema, koji se nisu pojavili kada je tretman korišten kod miševa, ali se mogu pojaviti kod ljudi.

Pretkliničke studije daju mnogo korisnih informacija, ali ne i sve što je potrebno. One su uglavnom kratke i daju osnove o toksicitetu i doziranju lijeka. U pretkliničkim studijama se moraju poštovati

smjernice dobre laboratorijske prakse. Ovi propisi postavljaju minimalne osnovne zahtjeve za:

- (1) ponašanje tokom studije;
- (2) osoblje;
- (3) objekte – prostor u kojem se izvode pretkliničke studije;
- (4) opremu koja se koristi;
- (5) pisane protokole;
- (6) standardne operativne procedure;
- (7) studijske izvještaje;
- (8) sistem nadzora osiguranja kvaliteta za svaku studiju kako bi se obezbijedila sigurnost proizvoda.

Nakon pretkliničkih ispitivanja, istraživači pregledaju svoje nalaze i odlučuju treba li lijek testirati na ljudima.

Nakon pretkliničkih studija, a prije početka kliničkog ispitivanja, istraživači ili sponzori (koji su najčešće farmaceutske kompanije, istraživački instituti ili pak univerziteti) moraju uraditi dizajn kliničkog ispitivanja te prijaviti kliničko ispitivanje za odobrenje regulatornom tijelu. Ova tijela koja trebaju dati odobrenje za početak kliničkih ispitivanja su: u Sjedinjenim Američkim Državama – FDA (*Food and drug administration*), u Evropi sve kliničke studije moraju biti prijavljene putem *Clinical Trials Information System* (CTIS), u sklopu *European Medicines Agency* (EMA), dok u Bosni i Hercegovini odobrenje za kliničke studije izdaje Agencija za lijekove i medicinska sredstva Bosne i Hercegovine. Nakon odobrenja da se ispitivanje može vršiti na teritoriji određene države, klinička ispitivanja moraju proći i etički komitet klinike u kojoj bi se klinička ispitivanja vršila.

Istraživači dizajniraju klinička ispitivanja kako bi odgovorili na specifična istraživačka pitanja vezana za medicinski proizvod. Ova ispitivanja prate određeni plan studija, nazvan protokol, koji je razvio istraživač ili proizvođač. Prije nego što počne kliničko ispitivanje, istraživači pregledaju prethodne informacije o lijeku kako bi razvili istraživačka pitanja i ciljeve. U dizajnu kliničkog ispitivanja treba biti poznato sljedeće:

- (1) ko se kvalificira za učešće (kriteriji za odabir);
- (2) koliko ljudi sudjeluje u studiji;
- (3) koliko dugo traje studija;
- (4) hoće li postojati kontrolna grupa i koji su drugi načini da se ograniči pristrasnost istraživanja;
- (5) kako će se lijek davati pacijentima i u kojoj dozi;
- (6) koje će procjene biti provedene, kada i koji podaci će biti prikupljeni;
- (7) kako će podaci biti pregledani i analizirani.

Dizajn kliničkih ispitivanja ima dvije glavne vrste koje uključuju neintervencijske / opservacijske i intervencijske / eksperimentalne studije. Neintervencijske studije mogu imati usporednu skupinu (analitičke studije poput kontrole slučaja i kohortnih studija) ili ne (opisna studija). Eksperimentalne studije mogu biti randomizirane ili nerandomizirane. Dizajni kliničkih ispitivanja mogu biti nekoliko vrsta koje uključuju paralelni dizajn, crossover dizajn, faktorski dizajn, randomizirani pristup povlačenja, prilagodljivi dizajn, vrhunski dizajn i dizajn bez inferiornosti. Kod randomiziranog ispitivanja sudionici ispitivanja nasumično su raspoređeni u skupine. Kod *open-label* ispitivanja i ispitanici i istraživači svjesni su lijeka koji se testira. U jednostruko slijepim studijama, ispitanik nema pojma o skupini (test/kontrola) u kojoj je smješten, dok u dvostruko slijepoj studiji ispitanici i istraživači nemaju pojma o testno-kontrolnoj skupini. Jedan od glavnih parametara dizajna kliničke studije je i placebo – tvar koja se pojavljuje kao lijek, ali nema aktivnu supstancu.

Sva regulatorna tijela koja izdaju odobrenja za kliničke studije u svojim zahtjevima traže sljedeće:

- (1) podatke o studijama na životinjama i toksičnost (nuspojave koje uzrokuju veliku štetu);
- (2) informacije o proizvodnji;
- (3) kliničke protokole (studijske planove) za studije koje treba provesti;
- (4) podatke iz bilo kojih prethodnih istraživanja;

(5) informacije o istraživaču, sponzoru i ostalim učesnicima kliničkih studija.

Sva klinička ispitivanja imaju tri faze, dok određena klinička ispitivanja imaju četiri faze. U svim fazama kliničkih ispitivanja su ispitanici ljudi – pacijenti i volonteri.

Faza I kliničkih ispitivanja odnosi se na ispitivanje je li upotreba novog lijeka u određenoj dozi sigurna za korištenje. Studije prve faze obično testiraju nove lijekove po prvi put u maloj grupi ljudi kako bi procijenili siguran opseg doza i identificirali neželjene efekte. Prvih nekoliko ljudi u studiji dobija veoma nisku dozu terapije i pomno se posmatraju. Ako postoje samo manji neželjeni efekti, sljedećih nekoliko učesnika dobija veću dozu. Ovaj proces se nastavlja sve dok ljekari ne pronađu dozu koja će najvjerojatnije djelovati dok ima prihvatljiv nivo neželjenih efekata.

Prva faza ispitivanja također istražuje šta lijek radi tijelu i šta tijelo radi s lijekom. Sigurnost je glavna briga u toku faze I kliničkih ispitivanja. Istraživački tim pomno prati ljude i pazi na sve ozbiljne nuspojave. Zbog malog broja ljudi u studijama faze I, rijetke nuspojave mogu se vidjeti tek u kasnijim fazama ispitivanja, kada više ljudi prima terapiju. Placebo (neaktivni tretmani) se ne koristi u ispitivanjima faze I.

Faza II proučava tretmane za koje je utvrđeno da su sigurni u fazi I, ali sada trebaju veću skupinu ljudskih ispitanika za praćenje bilo kakvih štetnih učinaka. Skupina od 25 do 100 pacijenata dobiva novu terapiju u studiji faze II. Liječe se dozom i metodom za koju je utvrđeno da je najsigurnija i najučinkovitija u studijama faze I. Obično u kliničkim ispitivanjima faze II svi dobivaju istu dozu. No, neke studije faze II nasumično dodjeljuju ljude različitim terapijskim skupinama. Ove skupine mogu dobiti različite doze ili dobiti tretman na različite načine kako bi se vidjelo koji pruža najbolju ravnotežu sigurnosti i odgovora. Placebo se ne koristi u ispitivanjima faze II.

Tretmani za koje se pokazalo da djeluju u kliničkim ispitivanjima faze II moraju uspjeti u još jednoj fazi prije nego što budu odobreni za opću

upotrebu. Klinička ispitivanja faze III uspoređuju sigurnost i učinkovitost novog liječenja s trenutnim standardnim liječenjem. Budući da ljekari još ne znaju koja je terapija bolja, učesnici ispitivanja često se biraju nasumično (nazivaju se randomizirani) kako bi dobili standardnu terapiju ili novi tretman. Kada je to moguće, ni lekar ni pacijent ne znaju koji od tretmana pacijent dobiva. Ova vrsta istraživanja naziva se dvostruko slijepa studija. Studije faze III provode se na većem broju stanovnika i u različitim regijama i zemljama i često su korak neposredno prije odobrenja novog liječenja. Većina kliničkih ispitivanja faze III uključuje veliki broj pacijenata, najmanje nekoliko stotina. Ta se istraživanja često rade na mnogim mjestima diljem zemlje (ili čak širom svijeta) u isto vrijeme. Faza III obično traje duže od studija faze I i II. Placebo se može koristiti u nekim studijama faze III, ali se nikada ne koriste sami ako postoji dostupan tretman koji djeluje.

Studije faze IV provode se nakon odobrenja zemlje i postoji potreba za daljnjim testiranjem u širokoj populaciji tokom dužeg vremenskog perioda.

Većina kliničkih ispitivanja zahtijeva ogromne troškove, povećane vremenske rokove i resurse. Među najznačajnijim aspektima kliničkog ispitivanja je revizija. Revizija je sistemski proces procjene operacija kliničkih ispitivanja na mjestu na kojima se kliničko ispitivanje izvodi. Revizijom se osigurava da se postupak kliničkog ispitivanja provodi u skladu s protokolom i unaprijed definiranim postupcima sistema kvalitete, u skladu sa smjernicama dobre kliničke prakse (engl. *good clinical practice*, GCP) i prema zahtjevima regulatornih tijela. Revizori bi trebali biti nezavisni i raditi bez sudjelovanja sponzora ili osoblja na mjestu ispitivanja. Revizori osiguravaju da ispitivanje provodi stručno i odgovarajuće osposobljeno osoblje, s unaprijed definiranim odgovornostima. Revizori također osiguravaju valjanost istražnog lijeka te sastav i funkcioniranje institucionalnog preispitivanja / etičkih odbora. Dostupnost i tačnost dokumenata kao što su brošure kliničkog ispitivanja, informirani obrasci za pristanak, homologacijska pisma regulatornih tijela i akreditacija laboratorija / lokacija za ispitivanje su u domenu monitoringa studije. Budući da su zaštita

integriteta podataka, prava, sigurnosti i dobrobiti ispitanika u studiji značajniji tokom provođenja kliničkog ispitivanja, redovno praćenje i revizija procesa su ključni. Također, kvaliteta kliničkog ispitivanja uveliko zavisi od pristupa osoblja koje uključuje sponzore i istraživače. Osim revizora, za studiju su bitni i monitori studije, koji imaju slične odgovornosti za studiju kao i revizori. Odgovornost praćenja leži u različitim rukama, a zavisi od mjesta kliničkog ispitivanja. Kada ispitivanje pokrene farmaceutska industrija, odgovornost praćenja ispitivanja zavisi od firme ili sponzora, a kada ispitivanje provodi akademska organizacija, odgovornost je na glavnom istraživaču.

14. BIOETIČKI ASPEKTI MOLEKULARNOBIOLOŠKIH PROCEDURA S OSNOVNIM PROCEDURAMA GENETIČKOG SAVJETOVANJA

Bioetika je interdisciplinarno istraživanje etičkih pitanja u naukama o životu i biomedicini. Porijeklo bioetike datira iz izrade Nirnberškog kodeksa, koji se temeljio na nacističkim ispitivanjima koja su provodili nacistički liječnici u Nürnbergu u Njemačkoj. Molekularnogenetičke procedure, uključujući molekularnogenetičku karakterizaciju (genetičko testiranje) u sklopu medicinske dijagnostike, bave se osjetljivim osobnim podacima, koji bi mogli značajno utjecati na život pacijenta ili njegove porodice. Uzimajući u obzir ovu činjenicu, etička, pravna i društvena pitanja postaju imperativ u praksi genetičkog testiranja. Studije etičkih, pravnih i društvenih implikacija (engl. *Ethical, legal and social implications*, ELSI) službeno su započele 1990. godine u sklopu Projekta ljudskog a, s ciljem identificiranja i suočavanja s problemima koje donose genomska istraživanja koja bi mogla utjecati na pojedince, članove njihovih porodica i na kraju društvo u cjelini. ELSI studije danas su interdisciplinarno istraživačko područje u stalnoj evoluciji i širenju, trenutno prihvaćajući mnogo više nego što je bilo predviđeno na njihovim počecima prije 30 godina.

Pri sve većoj popularnosti genetičkih testova u sklopu medicinske dijagnostike, pojavila se zabrinutost u vezi s upotrebom i mogućom zloupotrebom genetičkih informacija. Sve češće se u svijetu navodi pojam “genetičke” diskriminacije, koja se stavlja u rang s ostalim tipovima diskriminacije osoba. Nelagoda se odnosi na niz zloupotreba: od analitičke i kliničke valjanosti genetičkog testa, preko moguće stigme nosioca mutacija, do dužnosti otkrivanja genetičkih informacija potencijalno pogođenim članovima porodice. Etičke, pravne i socijalne implikacije kod genetičkog testiranja mogu se podijeliti na:

- (1) Saopćavanje rezultata genetičkog testa pacijentu – Ključno je da se o rezultatima genetičkih testova razgovara s pacijentima na razumljiv i suosjećajan način. Budući da mnogi genetički testovi neće dati jednostavne pozitivne / negativne rezultate, nego potencijalno neuvjerljive rezultate ili procjene rizika, važno je da

pacijenti razumiju opseg informacija koje su stvarno pružene genetičkim testom. Rezultati bi se trebali objavljivati samo onim osobama za koje je primatelj testa dao pristanak. Ni u kojem slučaju rezultati s osobnim identifikatorima ne bi se smjeli dostavljati vanjskim stranama, uključujući poslodavce, osiguravatelje ili vladine agencije, bez pisane saglasnosti primatelja testa.

- (2) *Direct-to-consumer* testovi – Brojne kompanije nude genetičke testove direktno potrošačima (engl. *Direct-to-consumer*, DTC) bez potrebe za sudjelovanjem ljekara. Pacijenti bi trebali biti oprezni pri razmatranju DTC i potiče ih se da o toj opciji razgovaraju sa svojim zdravstvenim radnikom.
- (3) Dijeljenje rezultata testa s porodicom – Rezultati genetičkog testa mogu imati posljedice na članove porodice pacijenta. Ako zdravstveni radnik vjeruje da članovi porodice mogu biti ugroženi, pacijenta se može potaknuti da razgovara o rezultatima testa s drugim članovima porodice. Općenito, porodice se protive tome da ljekari obavijeste rizične članove bez njihovog pristanka, čak i u slučajevima kada se bolest lako može spriječiti.
- (4) Genetička diskriminacija – Pri razmatranju genetičkog testiranja često se povećava mogućnost diskriminacije na osnovu genetičkih informacija. Taj strah može utjecati na odluku pojedinca da koristi usluge genetičkog testiranja. Budući da su rezultati genetičkih testova obično uključeni u medicinski karton pojedinca, ljudi bi trebali biti svjesni da bi rezultati mogli biti dostupni drugima.
- (5) Informirani pristanak – Informirani pristanak se odnosi na proces koji se provodi prije svakog genetičkog testa. U procesu informiranog pristanka, osoba koja se testira mora dobiti sve informacije koje se odnose na odgovarajući test. Obrazac informiranog pristanka mogu potpisati samo punoljetne osobe koje su sposobne da samostalno donose odluke. U slučaju testiranja maloljetnika ili osoba sa smanjenim sposobnostima, informirani pristanak potpisuje njihov roditelj ili zakonski staratelj, što se i navodi u obrascu informiranog pristanka.

Pravilan informirani pristanak mora imati sljedeće karakteristike:

- opis testa koji se provodi, uključujući razlog testa i namjenu provođenja testa;
- koja vrsta uzorka je potrebna za genetičko testiranje i kako će se taj uzorak sakupiti;
- šta znače rezultati testa, uključujući pozitivan i negativan rezultat, kao i procenat lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata te mogućnost slučajnih pronalazaka;
- postoji li mogućnost fizičkih ili emocionalnih posljedica testa;
- hoće li se rezultati koristiti za naučna istraživanja;
- može li rezultat otkriti informacije o drugim osobama kao što su roditelji ili potomci testirane osobe;
- kome će se izdati rezultat testa i je li moguće test izdati dodatnim osobama (npr. lekarima);
- šta će se desiti s uzorkom osobe nakon testiranja.

(6) Privatnost – Genetičke informacije imaju ogromne implikacije na pojedinca i porodicu. Privatnost tih informacija predstavlja veliku brigu za pacijente, posebno one koji bi trebali imati ili im je potreban pristup tim informacijama.

(7) Psihosocijalni aspekti – Postoji više psihosomatskih problema vezanih za genetičko testiranje. Osobe koje razmišljaju o genetičkom testiranju često imaju sljedeće probleme:

- suočavanje sa značajem povećanog ili smanjenog rizika;
- projiciranje jakih osjećaja straha ili nelagode od boli ili smrti;
- osjećanje krivice zbog prenošenja mutacija na potomke, ili nemogućnosti pomaganja osoba koje vole;
- povećan stres, brige vezane za oboljenja te opsesivne misli;
- nemogućnost rješavanja problema, osjećaj bespomoćnosti;
- pokušaj pronalaženja efektivne strategije nošenja s određenom bolesti te optimistično gledanje na razvoj bolesti.

Većina stručnjaka preporučuje psihoterapiju za osobe koje se odluče za genetičko testiranje. Pokazalo se da se osobe koje primaju takvu vrstu terapije većinom zanimaju za svoje stanje i prelaze preko inicijalnih problema prouzrokovanih nalazom, poput gore nabrojanih.

- (8) Reproductivni aspekti – Genetičke informacije rutinski se koriste za informiranje o reproduktivnim odlukama. Faktori rizika za genetička stanja za koja se mogu uzeti u obzir predrasude ili prenatalno genetičko testiranje uključuju uznapredovalu dob majke, obiteljsku anamnezu, višestruke pobačaje te izloženost drogama i alkoholu. Budući da ovi postupci nose rizike i koristi, roditelji bi trebali pažljivo razmotriti i razgovarati o tim opcijama s ljekarom ili genetičkim savjetnikom.

Postoji niz filozofskih pitanja o definiciji i značaju života i smrti, prirodi osobnosti i identiteta te spektru ljudskih sloboda i individualne odgovornosti. U kojem trenutku bi se smrtno ozlijeđeni ili smrtno bolesni pacijent trebao smatrati mrtvim? Kada su njegove vitalne funkcije – npr. otkucaji srca i disanje – prestale? Kada moždano deblo prestane funkcionirati? Treba li prisutnost duboke kome biti dovoljna za utvrđivanje smrti? Od davnih vremena ova filozofska pitanja su postavljana, ali još nemaju odgovora, iako su pojavom novih metodologija kao što su transfuzija, transplantacija organa, aparati za podržavanje života bitna za bioetiku.

U ovaj opseg filozofskih pitanja može se uključiti i pitanje abortusa, što za sobom vuče i pitanje prenatalne i antenatalne dijagnostike – naročito s pojavom novih tehnologija kao što je neinvazivna prenatalna dijagnostika (engl. *non invasive prenatal testing*, NIPT). Neinvazivna prenatalna dijagnostika (NIPT), koja se naziva i testiranje DNK bez ćelija (cfDNK), i neinvazivni prenatalni probir (NIPS), vrlo su osjetljive i specifične tehnike probira, kako bi se procijenio rizik da fetus može nositi aneuploidije hromosoma i, eventualno, submikroskopske varijacije broja kopija (CNV) i druga genetička stanja. U smislu etičkih, pravnih i društvenih implikacija, NIPT ima širok spektar složenosti koje treba istražiti. Prenatalni probir na abnormalnosti

fetusa moralno je osjetljiva praksa, jer bi mogla dovesti ili barem doprinijeti odluci o prekidu trudnoće u slučaju pozitivnih rezultata. Jedna od bitnijih etičkih pitanja povezanih s NIPT-om je informirano donošenje odluka. Profesionalne smjernice trenutno preporučuju da pacijenti koji su se odlučili za prenatalni probir dobiju genetičko savjetovanje prije i poslije testa, kao što je to već slučaj u većini akademskih medicinskih centara širom svijeta. Međutim, rizik od trivijalizacije i normalizacije testiranja je kod NIPT-a jako visok s obzirom na to da se radi o neinvazivnoj metodi testiranja koja sa sobom ne nosi zdravstvene rizike u toku samog testa. Ako se ženama ne ponude jasne informacije koje bi im pomogle da se odluče o NIPT-u ili drugim tehnikama prenatalnog probira, o rizicima i koristima različitih pristupa i implikacijama svih mogućih ishoda, možda neće moći adekvatno razmišljati i utvrditi žele li stvarno rezultate testa ili kako bi reagirale na njih. Testiranje na nemedicinske osobine (npr. spol fetusa) u ranoj fazi moglo bi dovesti do toga da se pobačaji koriste kao “alat za odabir”, što je izuzetno kontroverzno iz etičke perspektive. Neki vjeruju da bi opsežna, dugoročna primjena tehnika NIPT-a i njihov mogući daljnji razvoj i validacija kao dijagnostičkog testa vjerovatno mogla proizvesti rast u postotku identificiranih fetalnih sindroma, kao i u postotku dobrovoljnih prekida trudnoće. Jedno od pitanja je i da li NIPT ili neki budući neinvazivni vrlo specifični prenatalni testovi mogu postaviti temelje za društvo u kojem “potraga za savršenom bebom” postaje prihvatljiva i poželjna. Tu možemo zamisliti da se stvara nova eugenika koja je bazirana na biotehnologiji, ili možemo misliti da budući roditelji imaju pravo da odaberu dijete koje prema svom genotipu ima najveću mogućnost za zdrav i uspješan život.

Osim navedenih tema i pitanja, tu svakako možemo spomenuti i etički problem ispitivanja na ljudima, kao i na životinjama, za koje trenutne smjernice mogu, a i ne moraju sačuvati autonomiju ljudskog bića, s obzirom na to da, kako znamo iz historije, autonomija čovjekovog bića nije uvijek poštovana. U posljednje vrijeme sve se više razgovara o prekidu testiranja na životinjama, gdje je također bioetika jedan od bitnijih razloga za novi akademski diskurs. Sve više ispitivanja se

dizajnira bez dodatnog ispitivanja toksičnosti i određivanja doze na životinjama, iako bazična ispitivanja još uvijek koriste laboratorijske životinje ekstenzivno. U smislu bazičnih ispitivanja pokušava se smanjiti broj laboratorijskih životinja što je više moguće, kao i racionalizirati upotreba različitih vrsta za isto testiranje.

Novija istraživanja o genskom editingu također nose razna etička pitanja koja donedavno nisu bila široko zastupljena u akademskoj populaciji. Uređivanje gena (engl. *gene editing*), koje omogućava ciljanje i promjenu određenih lokacija u genomu brisanjem, dodavanjem ili zamjenom nukleotida, trenutno je predmet mnogih akademskih, industrijskih i političkih rasprava. Iako sama po sebi nije nova metodologija, uređivanje gena postalo je posebno istaknuta tema prvenstveno zbog relativno novog alata nazvanog CRISPR-Cas9. Osim uređivanja gena somatskih ćelija, također se raspravlja o tome da bi se manipulacijom ćelija ili embrija zametnih linija uređivanje gena moglo koristiti za transgeneracijsko “ispravljanje” ili potpuno izbjegavanje monogenskih poremećaja. Naučnici, kliničari i pacijenti su uglavnom oduševljeni sadašnjom i potencijalnom budućom primjenom ovih metodologija u istraživačkom i kliničkom kontekstu, ali postoje i važne brige u pogledu napretka s tehnologijama uređivanja gena za kliničku upotrebu kod ljudi, a donekle i za upotrebu u laboratoriji. Kao što smo naučili iz drugih etički osjetljivih područja u području genetike i genomike, kao što su probir novorođenčadi, reproduktivna genetika ili genetičko testiranje, normativne pozicije različitih grupa mogu biti različite, pa čak i potpuno nespojive. Na to mogu utjecati različiti faktori, kao što su komercijalni pritisak, tehnološki imperativ, ideološki ili politički stavovi ili osobne vrijednosti.

Univerzalne deklaracije povezane s bioetikom su Opća deklaracija o ljudskom genomu i ljudskim pravima (1997), Međunarodna deklaracija o ljudskim genetičkim podacima (2003) i Opća deklaracija o bioetici i ljudskim pravima (2005).

Genetičko savjetovanje je proces pomaganja ljudima da razumiju i prilagode se medicinskim, psihološkim i porodičnim implikacijama genetičkih podloga bolesti. Genetički savjetnici pomažu identificirati

porodice s mogućim rizikom od genetičkog stanja prikupljanjem i analizom porodične historije i obrazaca nasljeđivanja te izračunavanjem šansi za recidiv. Oni pružaju informacije o genetičkom testiranju i povezanim postupcima. Obučeni su za predstavljanje složenih i teško razumljivih informacija o genetičkim rizicima, testiranju i dijagnozi porodicama i pacijentima. Genetičko savjetovanje je komunikacijski postupak koji se bavi ljudskim problemima povezanim s pojavom ili rizikom od pojave genetičkog poremećaja u porodici. Ovaj proces uključuje pokušaj jedne ili više odgovarajuće obučanih osoba da pomognu pojedincu ili porodici da:

- (1) razumiju medicinske činjenice, uključujući dijagnozu, vjerovatni tok poremećaja i dostupno upravljanje;
- (2) razumiju način na koji nasljednost doprinosi poremećaju i rizik od ponovnog nastanka kod određenih srodnika;
- (3) razumiju alternative za suočavanje s rizikom;
- (4) odaberu način djelovanja koji im se čini prikladnim s obzirom na njihov rizik, porodične ciljeve i etičke i vjerske standarde, kako bi postupili u skladu s tom odlukom;
- (5) se što bolje prilagode poremećaju kod pogođenog člana porodice i/ili riziku od ponovnog nastanka tog poremećaja.

Koncept genetičkog savjetovanja ima velike varijacije. "Savjetovanje" podrazumijeva domen mentalnog zdravlja, socijalnog rada ili psihoterapije i najčešće je usredotočeno na konvencionalni medicinski model, gdje je jako bitno znanje iz medicinske genetike i tačna dijagnoza. U sklopu genetičkog savjetovanja pacijent i savjetnik trebaju biti tim, a ne zdravstveni radnik i pacijent. Pacijent treba da zatraži genetičko savjetovanje, gdje savjetnik prolazi s pacijentom kroz dijagnozu, prognozu, moguće testove i moguće tretmane. Pacijent nakon prvog sastanka treba razumjeti informacije o vrstama nasljeđivanja i rizika od prenošenja mutacija ili obolijevanja od određene bolesti. Savjetnik treba pacijentu objasniti moguće opcije i izbore, nakon čega pacijent mora sam odlučiti o testiranju/tretmanu bez pritiska ili stresa, pri čemu se zadržava autonomija pacijenta. Primarna razlika između genetičkog modela i tradicionalnog

biomedicinskog pristupa je poštovanje porodične autonomije što uključuje nedirektivnost i reproduktivne odluke u sklopu porodice. Glavni cilj genetičkog savjetovanja jest pomoći pojedinoj porodici da razumije i izbori se s genetičkom bolešću, a ne smanjiti učestalost genetičke bolesti što se postiže direktnijim pristupom i preporukama za liječenje ili intervencije nego u tradicionalnoj medicini.

Elementi genetičkog savjetovanja uključuju:

- (1) Dijagnoza – Tačna dijagnoza temelj je preciznog genetičkog savjetovanja i svi elementi genetičkog savjetovanja zavise od toga. Porodična historija je vrhunsko genetičko sredstvo za prikupljanje genetičkih informacija u porodici, što se može iskazati rodoslovom koji je tačan vizuelni zapis o porodičnoj historiji. Rodoslov pomaže u postavljanju dijagnoze, procjeni načina nasljeđivanja, rizika od ponovne pojave, utvrđivanju rizičnih srodnika i planiranju medicinskog tretmana bolesti.
- (2) Procjena rizika – Može biti bazirana ili na dijagnozi ili na načinu nasljeđivanja prilikom uzimanja porodične historije ili pak kombinacijom dva faktora.
- (3) Komunikacija – Komunikacija je dvostrani proces. Kao genetički savjetnik budite spremni da:
 - slušate;
 - predstavite informacije na jasan, empatičan i prikladan način;
 - izbjegavate profesionalnu terminologiju;
 - procijenite razumijevanje pacijenta pomoću verbalne i neverbalne komunikacije;
 - pružite dovoljno prilike za pitanja pacijenta;
 - uzmete u obzir složene psihološke i emocionalne faktore.
- (4) Diskusija o opcijama i izborima.
- (5) Prolongiran kontakt i podrška.

Razlozi za posjetu genetičkom savjetovanju mogu biti višestruki, ali najčešći razlozi su sljedeći:

- (1) osoba s poznatim genetičkim stanjem u porodici za procjenu rizika;
- (2) dijete s tjelesnim i/ili poteškoćama u učenju;
- (3) osoba / dijete s urođenim anomalijama;
- (4) osoba s jakom porodičnom historijom karcinoma;
- (5) ženska i muška neplodnost;
- (6) osoba s bolešću u porodici koja želi znati etiologiju i rizik;
- (7) trudnoća;
- (8) teratogena izloženost;
- (9) pozitivni skrining test na Daunov sindrom;
- (10) fetus s anomalijama otkrivenim na ultrazvuku;
- (11) parovi s ponovljenim pobačajima;
- (12) osoba s nedijagnostificiranom bolešću.

U mnogim zemljama klinička genetika je posebna genetička specijalizacija, gdje profesionalci sa specijaliziranom obukom iz kliničke genetike mogu biti:

- (1) klinički genetičari;
- (2) genetički savjetnici;
- (3) genetičke sestre.

Kao zaključak možemo napomenuti da genetičko savjetovanje pomaže pacijentima i njihovim porodicama da razumiju i nose se s genetičkom bolešću. Najvažniji koraci u genetičkom savjetovanju su uspostavljanje dijagnoze, procjena rizika od recidiva, priopćavanje relevantnih informacija i pružanje dugoročne podrške. Zbog dugoročnih posljedica za pojedinca i njegovu porodicu genetičko savjetovanje trebalo bi biti sastavni dio genetičkog testiranja. Ispravno obučeni medicinski stručnjaci trebaju osigurati genetičko testiranje i savjetovanje unutar uspostavljenih sistema zdravstvene zaštite. Teorija genetičkog savjetovanja usmjerena je na osobu, nije direktivna i ne osuđuje.

LITERATURA

- Ascencio-Carbajal T, Saruwatari-Zavala G, Navarro-Garcia F, Frixione G (2021) Genetic/genomic testing: defining the parameters for ethical, legal and social implications (ELSI). *BMC Med Ethics*, 22:156.
- Association for Molecular Pathology (1999) Association for Molecular Pathology Statement: Recommendations for inhouse development and operation of molecular diagnostic tests. *Am J Clin Pathol*, 111:449–463.
- Ausserhofer D, Rakic S, Novo A, Dropic E, Fisekovic E, Sredic A, Van Malderen G (2016) Improving the safety and quality of nursing care through standardized operating procedures in Bosnia and Herzegovina. *Int Nurs Rev*, 63(2):208–217.
- Benatar D (2006) Bioethics and health and human rights: a critical view. *J Med Ethics*, 32(1):17–20.
- Bernadac C (1981) Liječnici zločinci. Povijest o nacističkim liječničkim zločinima. Globus, Zagreb.
- Bezinover D, Saner F (2019) Organ transplantation in the modern era. *BMC Anesthesiol*, 19:32.
- Boobier S, Davies JC, Derbenev IN, Handley CM, Hirst JD (2023) AI4Green: An Open-Source ELN for Green and Sustainable Chemistry. *J Chem inf model*, 63(10):2895–2901.
- Burd EM (2010) Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev*, 23(3):550–576.
- Centre for Disease Control and Prevention (2009) Good laboratory Practices for Molecular Genetic Testing for Heritable Disease and Conditions. *MMWR*, 58(RR-6):1–37.
- Dyson MC, Carpenter CB, Colby LA (2017) Institutional Oversight of Occupational Health and Safety for Research Programs Involving Biohazards. *Comp Med*, 67(3):192–202.
- Ferreira-Gonzalez A, Wilkinson DS, Garrett CT (2006) Establishing a molecular diagnostics laboratory. U: McPherson & Pincus: Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 21st ed. (Urednik: WB Saunders). Humana Press. Springer Science, USA.
- Ferriera-Gonzalez A, Garrett CT (2006) Laboratory-developed tests in molecular diagnostics. U: Molecular Diagnostics: For the Clinical

- Laboratorian, 2nd ed. (Urednici: WB Coleman i GJ Tsongalis). Humana Press. Springer Science, USA.
- Fleming EJ (2023) An Approach to Improve Laboratory Notebook Feedback and Decrease Instructor Fatigue from Grading Undergraduate Laboratory Notebooks. *JMBE*, 24(1):e00018–22.
- Forest T, Aeffer F, Bangari DS, Bawa B, Carter J, Fikes J, High W, Hayashi SM, Jacobsen M, McKinney L, Rudmann D, Steinbach T, Schumacher V, Turner O, Ward JM, Willson CJ (2022) Scientific and Regulatory Policy Committee Points to Consider: Primary Digital Histopathology Evaluation and Peer Review for Good Laboratory Practice (GLP) Nonclinical Toxicology Studies. *Toxicol*, 50(4):531–543.
- Galić D, Omanović S, Krtalić P, Mahmutbegović H, Ovčina D, Blaž S, Viteškić S, Franjić I (2017) Standardne operative procedure zdravstvene njege u primarnoj zdravstvenoj zaštiti. Fondacija Fami, Sarajevo.
- Genetic Alliance; The New York-Mid-Atlantic Consortium for Genetic and Newborn Screening Services (2009) Understanding Genetics: A New York, Mid-Atlantic Guide for Patients and Health Professionals. Washington.
- Grmek DM (2004) Medejin kotao. Pokusi na živim bićima u antici. ArTresor naklada, Zagreb.
- Hanjalić J, Lasić L, Gaši F, Meland M, Grahić J, Kalamujić Stroil B (2018) The Applicability of Three DNA Isolation Methods in SSR Analysis of Hexaploid Plum (*Prunus domestica* L.) Cultivars. *Genapp*, 2(1):1–7.
- Howard H, van El C, Forzano F, Radojkovic D, Rial-Sebbag E, de Wert G, Borry P, Cornel M (2018) One small edit for humans, one giant edit for humankind? Points and questions to consider for a responsible way forward for gene editing in humans. *Eur J Hum Genet*, 26(1):1–11.
- Huang W, du Sert NP (2020) General Principles of Preclinical Study Design. *Handb Exp Pharmacol*, 257:55–69.
- ICMP (2015) Standardne operative procedure za uzimanje uzoraka kostiju i zuba sa posmrtnih ostataka za analizu DNK u ICMP-u. Dostupno na: <https://www.icmp.int/wp-content/uploads/2015/04/icmp-sop-aa-136-2-bcs-doc.pdf> (pristup: 15. 11. 2023)
- Institut za akreditiranje BiH (BATA) (2024). Dostupno na: <http://www.bata.gov.ba/> (pristup: 11. 3. 2024)

- ISO, International Organisation for Standardisation (2017) International Standard ISO 17025:2017 General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories Geneva.
- ISO, International Organization for Standardization (2024) Dostupno na: <https://www.iso.org/home.html> (pristup: 11. 3. 2024)
- ISO, International Organization for Standardization 9000:2015. International standards for quality management. Quality management systems – Fundamentals and vocabulary. Genève.
- ISO, International Organization for Standardization. 15189:2012 “Medical laboratories – Requirements for quality and competence”.
- Jennings L, Van Deerlin VM, Gulley ML (2009) Recommended principles and practices for validating clinical molecular pathology tests. *Arch Pathol Lab Med*, 133:743–755.
- Jones B, Montgomery DC (2019) *Design of Experiments: A Modern Approach*, 1st Edition, Wiley.
- Kandi V, Vadakedath S (2023) Clinical Trials and Clinical Research: A Comprehensive Review. *Cureus*, 15(2):e35077.
- Krstić Ž (2006) Introduction to design of experiment. *Proceedings*. 33. Nacionalna konferencija o kvalitetu, Asocijacija za kvalitet i standardizaciju Srbije.
- Laboratory Biosafety Manual, WHO, 3rd Edition, 2004.
- Lohse S (2021) Scientific inertia in animal-based research in biomedicine. *Stud Hist Philos Sci*, 89:41–51.
- Lojo-Kadrić N, Pojskić N, Pojskić L (2018) Laboratorijske tehnologije u molekularnoj biologiji. Univerzitet u Sarajevu – Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju, Sarajevo.
- Machina HK, Wild DJ (2013) Electronic laboratory notebooks progress and challenges in implementation. *Journal of laboratory automation*, 18(4):264–268.
- McEwen JE, Boyer JT, Sun KY, Rothenberg KH, Lockhart NC, Guyer MS (2014) The ethical, legal, and social implications program of the national human genome research institute: reflections on an ongoing experiment. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 15:481–505.
- McPherson RA, Pincus MR (2021) *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 24th ed. Elsevier.

- Mifflin TE (2007) Setting up a PCR laboratory. CSH Protocols
- MM17-A, Verification and Validation of Qualitative Nucleic Acid Tests: A Review of the Approved CLSI Guideline.
- Montgomery DC (2012) Design and analysis of experiments. 8th edition. John Wiley & Sons.
- Pain E (2019) How to keep a lab notebook. Science, 3. 9. 2019. Dostupno na: doi: 10.1126/science.caredit.aaz3678.
- Panhwar A, Azhar Naeem M, Zainulibad S, Ahmed M, ul Haq A, ul Haq S (2020) Laboratory Quality improvement by ISO/IEC-17025 Accreditation: A case study of PCSIR. Int. J. Curr. Res., 12(01):9942–9945.
- Patch C, Middleton A (2018) Genetic counseling in the era of genomic medicine. Br Med Bull, 126(1):27–36.
- Patch C, Sequeiros J, Cornel MC (2009) Genetic horoscopes: is it all in the genes? Points for regulatory control of direct-to-consumer genetic testing. Eur J Hum Genet, 17(7):857–859.
- Prence EM (1999) A practical guide for the validation of genetic tests. Genetic Testing, 3:201–205.
- Principles and guidance reports for Good Laboratory Practice. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). <http://www.oecd.org/ehs/>
- Ravi R, Bose D, Gogtay NJ, Thatte UM (2018) Investigator preparedness for monitoring and audits. Perspect Clin Res, 9:95–98.
- Rennerg H, Leonard DGB (2007) Quality control and quality assessment programs. U: Molecular Pathology in Clinical Practice, pp. 568–574. DGB Leonard. Springer.
- Schmidgen H (2021) Laboratory, Encyclopedia of the History of Science. Dostupno na: <https://doi.org/10.34758/sz06-t975> (pristup: 01. 04. 2024)
- Silobrčić Z (1994) Kako sastaviti, objaviti i ocijeniti znanstveno djelo. Medicinska naklada, Zagreb.
- Službeni glasnik BiH, br. 58/08. Pravilnik o kliničkim studijama lijeka. 2008.
- Speich B, Schur N, Gryaznov D, et al. (2019) Resource use, costs, and approval times for planning and preparing a randomized clinical trial before and after the implementation of the new Swiss human research legislation. PLoS One.14:0.

- Stone E (2018) Evidence-Based Medicine and Bioethics: Implications for Health Care Organizations, Clinicians, and Patients. *Perm J.*, 22:18-030.
- Šamić M (2003) Kako nastaje naučno djelo : uvođenje u metodologiju i tehniku naučnoistraživačkog rada - opći pristup. Svjetlost, Sarajevo.
- Štajnbriker M (2017) Određivanje koncentracije DNA u humanim i biljnim uzorcima. Diplomski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.
- Viana RV, Wallis CL (2011) Good Clinical Laboratory Practice (GCLP) for Molecular Based Tests Used in Diagnostic Laboratories. U: *Wide Spectra of Quality Control* (urednik: dr. Isin Akyar). Dostupno na: <http://www.intechopen.com/books/wide-spectra-of-quality-control/good-clinical-laboratory-practice-gclp-for-molecular-based-tests-used-in-diagnostic-laboratories> (pristup: 22. 11. 2023)
- Weiss RB, Tuttle SS (2006) Preparing for clinical trial data audits. *J Oncol Pract*, 2:157–159.
- Zaami S, Orrico A, Signore F, Cavaliere AF, Mazzi M, Marinelli E (2021) Ethical, Legal and Social Issues (ELSI) Associated with Non-Invasive Prenatal Testing: Reflections on the Evolution of Prenatal Diagnosis and Procreative Choices. *Genes (Basel)*, 12(2):204.

INDEX POJMOVA

A

aerosol, 16, 112, 117, 129
akreditacija, 20, 21, 22, 26, 36, 41, 140
amplifikacija, 15, 18, 49, 52, 102
amplikon, 10, 17, 94, 97, 102
analiza, 5, 7, 10, 11, 18, 19, 25, 26, 37, 45, 48, 50, 51, 64, 65, 66, 70, 81, 85, 86, 97, 98, 105
annealing, 49, 94
automatizirani sistemi, 12, 18

B

bioetika, 141, 145

C

centrifuga, 53, 116, 117, 118
certifikacija, 21, 28
CTAB Soltis, 82, 88

D

dijagnostika, 10, 20, 48, 49, 129, 141, 144, 145
DNK, 10, 11, 14, 52, 53, 82, 83, 86, 87, 90, 93, 94, 95, 97, 99, 101, 103
dNTP, 95, 96, 100, 102
dobra laboratorijska praksa, 57, 107, 109, 116, 118, 119

E

eksperiment, 44, 49, 51, 59, 62, 63, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 79, 80, 81, 85, 86, 101, 110, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 137
elongacija, 94, 97
evaluacija, 19, 23, 25, 39, 51, 52, 54, 61

F

fragment analiza, 83, 86, 97, 101

G

gel elektroforeza, 11, 49, 83, 92, 97, 98, 101, 126
genetičko savjetovanje, 145, 146, 147, 149
genetičko testiranje, 143, 144, 146, 149
genom, 9, 51, 62, 66, 141, 146

H

hipoteza, 6, 7, 67, 82, 85, 122

I

in house, 43, 45, 46, 54
in vitro, 99, 135
in vivo, 135
ISO 9001, 21, 24
ISO/IEC 17025, 21, 22, 24, 28, 40, 42, 43
istraživanje, 5, 6, 62, 108, 109, 134, 141
izolacija, 11, 86, 87, 90, 101

K

kalibracija, 23, 25, 26, 32, 112
kliničke studije, 69, 70, 104, 134, 136, 137
koncentracija, 38, 47, 50, 53, 83, 86, 93, 96, 102, 133
kontaminacija, 10, 15, 16, 17, 52, 53, 57
kontrola, 15, 16, 20, 21, 35, 36, 44, 45, 47, 49, 52, 53, 56, 68, 85, 108, 110, 117, 137

L

laboratorija, 11, 14, 15, 17, 20, 21, 23,
24, 25, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34,
35, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 45, 51,
54, 55, 60, 61, 62, 65, 66, 107, 121,
125, 126, 131, 133, 140
laminar, 11, 13, 119, 120, 126, 128

M

marker, 83, 86, 97, 98, 100, 102
metoda, 7, 21, 24, 26, 33, 42, 43, 44,
50, 52, 55, 57, 65, 66, 75, 76, 81, 83,
93, 94, 97, 99, 101, 105, 132
molekularna biologija, 9, 17, 19, 82

N

nauka, 6, 7, 9, 59, 61, 141

O

obuka, 22, 24, 28, 31, 36, 41, 105
oprema, 9, 11, 17, 24, 25, 32, 56, 125
optimizacija, 51, 101, 102, 103
osiguranje kvaliteta, 19, 20, 36, 45,
104, 108

P

PCR, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 18, 46,
49, 50, 52, 53, 94, 95, 97, 98, 101,
102, 103
pipeta, 16, 53, 111, 112, 113, 114, 116
placebo, 68, 137, 138, 139
prajmer, 15, 46, 49, 51, 94, 95, 96, 98,
102
procedura, 22, 26, 39, 66, 69, 104,
105, 106, 108, 126, 128
protokol, 25, 43, 46, 54, 64, 81, 82, 85,
86, 87, 88, 90, 93, 94, 96, 101, 104,
121, 134, 136, 137, 139

R

Real-time PCR, 10, 49
revizija, 28, 30, 36, 38, 107, 139, 140
rizik, 15, 16, 22, 26, 31, 36, 39, 111,
125, 128, 129, 130, 132, 133, 135,
141, 143, 144, 147, 148, 149
RNK, 9, 10, 11, 14, 17, 42, 51, 86, 90,
93

S

sekvenciranje, 53, 62, 86, 99, 101, 103
sigurnost, 18, 25, 26, 37, 39, 104, 105,
110, 125, 128, 129, 132, 136, 138,
139, 140
standardna operativna procedura,
104, 105, 106
sterilizacija, 14, 17, 119, 120, 130,
131, 132, 133

T

Taq polimeraza, 45, 52, 96, 102

U

UV, 14, 16, 93, 94, 119, 120
uzorak, 11, 12, 15, 16, 25, 26, 27, 34,
36, 39, 45, 47, 48, 49, 50, 52, 53, 56,
73, 74, 83, 86, 90, 103, 108, 109,
112, 117, 121, 143

V

validacija, 24, 25, 42, 43, 44, 50, 51,
54, 58, 145
verifikacija, 24, 42, 43, 55, 56, 58

Z

zaštitna oprema, 11, 12, 53, 110, 119,
125, 128