

TEST USPOSOBLJENOSTI KOT DEL ZAGOTAVLJANJA KAKOVOSTI V DIAGNOSTIČNIH LABORATORIJIH

Jana ERJAVEC¹, Tanja DREO², Manca PIRC³, Nataša MEHLE⁴, Aleš BLATNIK⁵,
Lidija MATIČIČ⁶, Špela PRIJATELJ NOVAK⁷, Maja RAVNIKAR⁸

Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Ljubljana

IZVLEČEK

Izvajanje testov usposobljenosti (ang. »proficiency test«) je eden izmed načinov zagotavljanja kakovosti diagnostičnih laboratorijev in potrjevanja usposobljenosti za izvajanje diagnostičnih analiz. Temeljijo na primerjavi rezultatov analiz centralno pripravljenih in preverjenih vzorcev med laboratoriji. V Evropi teste usposobljenosti na področju fitodiagnostike od leta 2007 ponuja FAPAS[®] (angl. »Food Analysis Performance Assessment Scheme«), od leta 2009 v okviru programa PhytoPAS. V letu 2009 so laboratoriji izbirali med več kot desetimi testi usposobljenosti na področju varstva rastlin, FAPAS[®] pa je zabeležil skupno 93 prijav. V okviru FAPAS[®] je Nacionalni inštitut za biologijo v preteklih letih uspešno sodeloval pri več testih usposobljenosti za detekcijo rastlinskih patogenih bakterij in virusov kot so *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Erwinia amylovora*, virus mozaika pepina (PepMV) in virus pegavosti in venenja paradižnika (TSWV). V okviru prispevka bomo predstavili rezultate in izkušnje sodelovanja v testih usposobljenosti.

Ključne besede: detekcija patogenih mikroorganizmov, sistem kakovosti, test usposobljenosti

ABSTRACT

PROFICIENCY TESTS AS A PART OF QUALITY ASSURANCE SYSTEM AND PROOF OF COMPETENCE FOR DIAGNOSTIC LABORATORIES

Proficiency tests are an important part of quality assurance system and offer an independent proof of competence of diagnostic testing. It is based on the comparison of laboratories' results in an inter-laboratory trial. The quality of a laboratory's result is checked against criteria that are set independently of the laboratory carrying out the testing. Since 2007 proficiency tests have been organised by FAPAS[®] (Food Analysis Performance Assessment Scheme), an international proficiency test provider. In 2009 FAPAS[®] organised over 10 plant health proficiency tests under the trademark PhytoPAS, distributing 93 individual tests to diagnostic laboratories around the world. The National Institute of Biology has successfully

¹ univ. dipl. mikr., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

² dr., prav tam

³ asist. dr., prav tam

⁴ mag., prav tam

⁵ prav tam

⁶ prav tam

⁷ prav tam

⁸ prof. dr., prav tam

participated in several proficiency tests in the past years, which included detection of plant pathogens such as *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Erwinia amylovora*, Pepino mosaic virus (PepMV) and Tomato spot wilt virus (TSWV). In the following article we will present different systems for quality assurance and our experience and results from proficiency tests.

Keywords: pathogen detection, proficiency test, quality assurance system

1 UVOD

S sistemom kakovosti v laboratoriju zagotavljamo zanesljive in primerljive rezultate diagnostičnih metod. Diagnostični laboratorij spremlja kvaliteto izvajanja analiz z uporabo referenčnih materialov, ponovitvami poskusa z različnimi metodami ter tudi s testi usposobljenosti (angl. »Proficiency test«) (PM 7/98 (1), 2010).. V okviru testa usposobljenosti laboratorij prejme različne, v naprej pripravljene vzorce, ki vsebujejo mikroorganizme, na primer vzorec nanešen na objektno stekelce, pripravljen ekstrakt, DNA ali tkivo, ki ga nato analizira z metodami in reagenti, ki jih običajno uporablja v laboratoriju. Nasprotno je pri medlaboratorijskih primerjavah (angl. »Ring test«) diagnostična metoda v naprej določena, poleg vzorcev pa laboratorij prejme tudi vse potrebne reagente. Na ta način se v medlaboratorijskih primerjavah preverja metoda, predvsem njeno robustnost, s testi usposobljenosti pa delo laboratorijev. Eden redkih ponudnikov testov usposobljenosti laboratorijev na področju prehrane je shema FAPAS[®] (angl. Food Analysis Performance Assessment Scheme; <http://www.fapas.com/>). V okviru FAPAS[®] pa program PhytoPAS omogoča laboratorijem, ki delujejo na področju varstva rastlin, preverjanje usposobljenosti za izvajanje diagnostičnih metod za detekcijo bakterijskih, virusnih in glivnih rastlinskih patogenih mikroorganizmov (Reynolds and Owen, 2010).

Potek testa usposobljenosti je enak, ne glede na to, kdo ga organizira. Organizator objavi seznam testov usposobljenosti, na katere se lahko posamezni laboratoriji prijavijo. Prijavljeni laboratoriji nato prejemajo obvestila preko elektronske pošte o ključnih datumih kot tudi navodila za izvedbo testa usposobljenosti ter ostala pomembna obvestila. Cena, ki jo mora laboratorij plačati organizatorju je običajno med 400 in 500 EUR kar vključuje tudi stroške pošiljanja materiala. K temu mora laboratorij prišteti še vse stroške za izvedbo testa, ki so odvisni od cene in števila uporabljenih metod ter časa porabljenega za izvedbo testov. Ko se laboratoriji prijavijo in organizator pošlje vzorce se določi tudi datum za oddajo rezultatov. Običajno je čas za oddajo rezultatov en do dva meseca. Laboratoriji za analizo uporabljajo metode, ki so uvedene v njihovih laboratorijih. Organizator nato zbere in obdela vse rezultate in jih v obliki poročil pošlje vsem udeležnim laboratorijem. Posamezni laboratorij pregleda rezultate in v primeru odstopanja po potrebi prilagodi svoje postopke. Laboratoriji sodelujejo v testih usposobljenosti zaradi želje po zagotavljanju točnih rezultatov analiz v skladu z različnimi predpisi kot so ISO/IEC 17025; Pravilnik o pogojih ..., Uradni list RS, št. 82/2002). Primer poteka testov usposobljenosti je prikazan na sliki 1.



Slika 1: Shema poteka testa usposobljenosti na osnovi FAPAS®. V pravokotnih okencih so navedene naloge organizatorja, v elipsah pa naloge posameznega laboratorija.

2 MATERIALI IN METODE

V našem laboratoriju smo uspešno sodelovali v več testih usposobljenosti v okviru FAPAS®. Navedeni so v preglednici 1.

Preglednica 1: Testi usposobljenosti v katerih smo sodelovali od leta 2005 z navedenimi mikroorganizmi, tipi vzorcev, metodami in ustreznostjo našega rezultata.

patogen mikroorganizem	tip vzorca	metoda	leto	ustreznost rezultata
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	IF stekelce	indirektna imunofluorescenca	2010	Da
virus mozaika pepina (PepMV)	liofilizirani listi	DAS-ELISA; RNA extraction; RT-real time PCR	2010	Da
virus pegavosti in venaenja paradižnika (TSWV)	liofilizirani listi	DAS-ELISA; RNA extraction; RT-real time PCR	2010	Da
<i>Erwinia amylovora</i>	IF stekelce	indirektna imunofluorescenca	2009	Da
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	IF stekelce	indirektna imunofluorescenca	2009	Da
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	liofilizirane bakterijske kulture	indirektna imunofluorescenca, rast na gojiščih, real-time PCR, test patogenosti na rastlinah	2007	Da
<i>Ralstonia solanacearum</i>	liofilizirane bakterijske kulture	indirektna imunofluorescenca, rast na gojiščih, PCR, test patogenosti na rastlinah	2005	Da

V okviru testov usposobljenosti v katerih smo sodelovali od leta 2005 do danes, smo preizkusili metode za detekcijo šestih različnih mikroorganizmov v različno pripravljenih vzorcih. In sicer za dva rastlinska patogena virusa PePMV in TSWV ter štiri rastlinske patogene bakterije: *Erwinia amylovora*, *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* ter *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Vzorce smo prejeli v različnih oblikah, na primer bakterije smo prejeli kot liofilizirane kulture ali pa so bili vzorci nanesti na stekelca za imunofluorescenca, pri virusih pa smo okužene liste prejeli v liofilizirani obliki. Pri nekaterih testih usposobljenosti smo uporabili samo eno metodo (npr. indirektna imunofluorescenca oz. IIF) pri drugih pa več metod (npr. IIF, rast na gojiščih, PCR, test patogenosti). V vseh testih so naši rezultati ustrezali referenčnim.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Od organizatorja testov usposobljenosti (FAPAS®) smo vsakokrat na koncu prejeli poročilo, v katerem smo med drugim lahko svoje rezultate primerjali z rezultati drugih laboratorijev. V preglednici 2 je prikazan primer rezultatov testa usposobljenosti laboratorijev za ugotavljanje bakterije *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. V testiranje smo prejeli IF stekelce na katerem so bili na štirih okencih nanesti različni vzorci. V laboratorijih smo morali ugotoviti v katerih vzorcih je bakterija bila in v kolikšni koncentraciji. Naš laboratorij je bil označen s številko 2, kar pomeni, da so bili rezultati, ki smo jih pridobili z našo metodo in kemikalijami ustrezni. Iz tabele lahko tudi razberemo, da so bili rezultati dveh laboratorijev v tem primeru neustrezni, saj so napačno ocenili koncentracije bakterij na posameznem okencu. V primeru neustreznega rezultata je naloga laboratorija, da ugotovi vzrok oziroma vzroke za napake in jih v najkrajšem možnem času odpravi.

Preglednica 2: Rezultati ugotavljanja prisotnosti bakterije *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* laboratorijev, ki so sodelovali v testu usposobljenosti. Tabela je prirejena po tabeli iz poročila, ki ga po končanem testu usposobljenosti oblikuje FAPAS®.

številka laboratorija	ugotavljanje prisotnosti bakterije <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>				
	testni material (IF steklece, okence 1-4)				ustreznost rezultata
	1	2	3	4	
koncentracija bakterij (ni tarčnih bakterij/nizka/srednja/visoka*)					
001	nizka	visoka	ni tarčnih bakterij	srednja	Ustrezen
002	nizka	visoka	ni tarčnih bakterij	srednja	Ustrezen
003	nizka	visoka	ni tarčnih bakterij	srednja	Ustrezen
004	ni tarčnih bakterij	srednja	ni tarčnih bakterij	nizka	Neustrezen
005	nizka	visoka	ni tarčnih bakterij	srednja	Ustrezen
006	visoka	visoka	ni tarčnih bakterij	visoka	Neustrezen
Pričakovan rezultat	nizka	visoka	ni tarčnih bakterij	srednja	

*rezultate štetja bakterij smo zaradi boljše preglednosti pretvorili v srednjo nizko ali visoko koncentracijo

4 SKLEPI

S sodelovanjem v testih usposobljenosti potrdimo kompetentnost laboratorija, ki omogoča, da proizvajalcem in naročnikom zagotavljamo vrhunske diagnostične storitve. V preteklih letih smo na Nacionalnem inštitutu za biologijo, v laboratoriju za določanje rastlinskih patogenih mikroorganizmov uspešno sodelovali pri sedmih testih usposobljenosti. Podobna sodelovanja načrtujemo tudi v prihodnje.

5 LITERATURA

- Anon. 2010. PM 7/98 (1): Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. EPPO Bulletin 40, no. 1 (4): 5-22. doi:10.1111/j.1365-2338.2009.02347.x. <http://www.fapas.com/> (22.2.2010)
- ISO/IEC 17025 (2005) General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories, pp. 1–28. Geneve (CH).
- Pravilnik o pogojih glede strokovne, prostorske in tehnične usposobljenosti laboratorijev za izvajanje laboratorijskih preiskav zaradi diagnostike škodljivih organizmov; Uradni list RS, št. 82/2002
- Reynolds A. and Owen, L. 2010. Organisation of proficiency testing for plant health diagnostic tests: the experience of FAPAS®. OEPP/EPPO Bulletin 40, 86-90