

COURSE NOTES

Validation of GOD / PAP method for quantitative determination of glucose concentration in human serum

Validarea metodei GOD / PAP pentru determinarea cantitativă a concentrației de glucoză în ser

Irina L Dumitriu^{1*}, Bogdan Gurzu¹, Elena Cojocaru^{1,2},
Simona M. Slătineanu¹, Maria Enea^{2*}

1. "Gr T Popa" University of Medicine and Pharmacy, Iași, România

2. Netconsult Medical Laboratory, Iași, România

Abstract

All accredited medical laboratories from Romania comply with the requirements of SR EN ISO 15189:2007. These requirements include method validation. Medical laboratories use validated methods taken from the literature but, before using it, each laboratory has the responsibility to verify if the method performances are accomplished in a range of conditions which are specific for that laboratory (personnel, equipment, reagents, reference material and control material). Method validation is a process by which every laboratory should check and establish the method's performance characteristics, but also the laboratory should identify the influences which may change these characteristics and to what extent. In this study the authors described the manner in which they documented and verified performance parameters (precision and accuracy of measurements, measurement uncertainty) in order to demonstrate that GOD / PAP method to measure serum glucose is fit for purpose in own laboratory conditions.

Keywords: method validation, precision, accuracy, measurement uncertainty.

Rezumat

Toate laboratoarele de analize medicale acreditate din România respectă cerințele Standardului SR EN ISO 15189:2007. Una dintre cerințele acestui standard este validarea metodelor utilizate. Laboratoarele medicale utilizează metode validate, preluate din literatura de specialitate dar înainte de utilizare, fiecare laborator are responsabilitatea să verifice dacă performanțele metodei se mențin în condițiile specifice de laborator (personal, echipament, reactivi, material de referință, material de control). Validarea unei metode este procesul prin care laboratorul verifică și stabilește caracteristicile de performanță, dar identifică și factorii care influențează aceste caracteristici precum și gradul de influență al acestor factori. Autorii prezintă modul cum au documentat și au verificat parametrii de performanță (precizia și acuratețea măsurătorilor, incertitudinea de măsurare) în vederea demonstrării adecvării la scop a metodei GOD / PAP de măsurare a glucozei în sânge în condițiile proprii de laborator.

Cuvinte cheie: validare metodă, precizie, acuratețe, incertitudine de măsurare.

***Corresponding Authors:** Irina L Dumitriu, „Gr T Popa” University of Medicine and Pharmacy, University Street no 16, Iași, 700115, România. E-mail: dumitriu_irinaluciana@yahoo.com, Maria Enea. E-mail: enea_radu_maria@yahoo.com

Introduction

One of SR EN ISO 15189:2007 (*Medical laboratories. Particular requirements for quality and competence*) requirements is analytical method validation (1). Therefore all accredited medical laboratories have the obligation and responsibility to validate their analysis methods before using them.

The EURACHEM guide – *The Fitness for Purposes of Analytical Methods* (2) lays down the guidelines to be observed for method validation. According to EURACHEM, validation is “confirmation by examination and provision of objective evidence that the particular requirements for a specified intended use are fulfilled” (2). Method validation represents the process by which (i) the laboratory decides the method’s performance parameters and limitation and (ii) identifies the factors influencing these characteristics as well as their degree of influence (2). These parameters are laid down to show that the method implemented in the medical laboratory is “fit for the intended purpose” (2).

Although there are reference publications (EURACHEM and I-12 RENAR) (2, 3), some specialists from medical laboratories believe that they don’t have to validate their methods before use as they have purchased them from the manufacturer or take them from literature, where they were already validated (2). Even though the methods used are published in literature or in the protocols of other laboratories, the methods should be verified in each laboratory before use (2, 4). This does not suggest that we are questioning the validation of the manufacturer’s method, but each medical laboratory should verify whether similar performances to those of the manufacturer’s are achieved using personal conditions (qualified personnel, equipment, reagents, reference and control materials, other supplies) and in compliance with the limits approved by specialized literature (CLIA – *Clinical Laboratory Improvement Amendments* and Westgard) (5, 6). In addition, the laboratory

Introducere

Una dintre cerințele SR EN ISO 15189:2007 (*Laboratoare medicale. Cerințe particulare pentru calitate și competență*) este validarea metodelor analitice (1). De aceea toate laboratoarele medicale acreditate au obligația și responsabilitatea să-și valideze metodele de analiză înainte de utilizarea lor.

Ghidul EURACHEM - *The Fitness for Purpose of Analytical Methods* (2) prezintă regulile generale, obligatoriu de urmat, pentru validarea metodei. Conform EURACHEM, validarea este “confirmarea prin examinare și furnizare de dovezi obiective că cerințele specificate sunt îndeplinite” (2). Validarea metodei este procesul prin care (i) laboratorul își stabilește caracteristicile de performanță și limitele metodei și (ii) sunt identificați factorii care influențează aceste caracteristici, precum și gradul de influență al acestora (2). Acești parametri sunt stabiliți pentru a demonstra că metoda implementată în laboratorul medical este „adecvată scopului propus” (2).

Deși există publicații de referință (EURACHEM și I-12 RENAR) (2, 3), unii specialiști din laboratoarele medicale consideră că nu trebuie să valideze metodele înainte de utilizare, deoarece le achiziționează de la producător sau le preiau din literatura de specialitate gata validate (2). Deși metodele utilizate sunt publicate în literatură sau în protocoalele altor laboratoare, metodele trebuie să fie verificate în fiecare laborator înainte de utilizare (2, 4). Acest fapt nu înseamnă că este pusă la îndoială validarea metodei realizată de producător, dar fiecare laborator medical are responsabilitatea să verifice dacă în condițiile proprii (personal calificat, echipament, reactivi, materiale de referință și de control, alte consumabile) obține performanțe apropiate de cele ale producătorului, în limite acceptate de literatura de specialitate (CLIA - *Clinical Laboratory Improvement Amendments* și Westgard) (5, 6). Totodată, laboratorul are și responsabilitatea să identifice factorii care influențează ca-

also has the responsibility to take into account the factors influencing performance parameters as well as their degree of influence (2).

At least 3 criteria should be taken into account when selecting performance parameters used for method validation:

1. method specificity

- quantitative determination (one should take into account whether the measured analyte is either a *major component* or *traces* in the analysed biological material)

- qualitative determination (the quantification limit should be checked)

2. the client's requirements (providing a reliable result is essential);

3. the results delivered should be in accordance with those achieved by similar methods in the same laboratory or in others.

The aim of the study

The authors present a complete validation model of a quantitative analytical method for determining serum glucose in a medical test laboratory: GOD/PAP method. We chose this method because serum glucose determination by GOD/PAP method represents a common method used in most medical laboratories from Romania. We mention that the stages of the validation process for GOD/PAP method described in this material may be used / adjusted for any other analytical method in a medical test laboratory.

Material and methods

The method validated in this paper is a quantitative method for determining a major serum component: glucose. To achieve this, we employed reagents, reference material and control sera from RANDOX Laboratories, UK. Repeated determinations of 4 randomly chosen patient samples, with values higher than the calibrator's, were performed to evaluate the linearity of measurements above the maximum calibration point. The serum glucose determinations were carried out on the automated biochemistry analyzer BT 3000 Plus (Biotecnica Instrument, Italy).

racteristicile de performanță, precum și gradul de influență al acestor factori (2).

În alegerea parametrilor de performanță utilizați în validarea metodei ar trebui să ținem cont de cel puțin 3 criterii:

1. specificul metodei

- determinare cantitativă (trebuie ținut cont dacă analitul măsurat este o *componentă majoră* sau se găsește sub formă de *urme* în materialul biologic de analizat)

- determinare calitativă (trebuie verificată limita de cuantificare)

2. cerințele clientului (primordial: oferirea unui rezultat credibil);

3. rezultatele eliberate să fie în concordanță cu cele obținute prin metode similare utilizate în același laborator sau în alte laboratoare.

Scopul studiului

Autorii prezintă un model complet de validare a unei metode analitice cantitative pentru determinarea glucozei serice într-un laborator de analize medicale: metoda GOD/PAP. Am ales aceasta metodă deoarece dozarea glucozei serice prin metoda GOD/PAP este o metodă de rutină utilizată în majoritatea laboratoarelor medicale din România. Menționăm că etapele procesului de validare prezentate pentru metoda GOD/PAP în acest material pot fi utilizate / adaptate pentru orice altă metodă analitică în cadrul unui laborator de analize medicale.

Material și metodă

Metoda validată în lucrarea de față este o metodă cantitativă pentru determinarea unei componente majore din ser, glucoza. Pentru aceasta am utilizat reactivi, material de referință și seruri de control de la RANDOX Laboratories, UK. Pentru verificarea linearității măsurătorilor deasupra punctului maxim de calibrare au fost realizate măsurători repetate a 4 probe de pacient alese în mod aleator, cu valori mai mari decât valoarea calibratorului. Măsurătorile de glucoză serică au fost efectuate pe analizorul automat de biochimie BT 3000 Plus (Biotecnica Instrument, Italia).

The validation process of GOD/PAP method for serum glucose concentration quantitative determination requires the development of **a documented method validation plan** which includes:

1. the validation procedure (describes the modality of performing method validation under specific laboratory conditions and the validation report model)
2. drawing up the statement on the method's fitness for purpose
3. setting the revalidation date.

Results and discussion

A medical test laboratory uses only one validation process, but the validation of each analysis method is followed by drafting a specific validation report (which complies with the structure established during the process). The validation process includes performance parameter evaluation by repeated determinations and interpretation of results obtained according to the set acceptability criteria (the values of performance parameters achieved under specific laboratory conditions should be lower or rather similar to those of the manufacturer or of the reference literature – CLIA and Westgard) (5, 6).

The validation report includes: the conditions under which validation is performed (specifying the method, the person in charge with validating the method, environment conditions, equipment, reagents, calibrator, control sera) and checking performance parameters (linearity, measuring range, range of normal values, analytical specificity, interferences, minimum limit of detection, minimum quantification limit, precision/ imprecision, accuracy/inaccuracy and uncertainty of measurement). The validation report is completed with a clear conclusion on the method's performances under the specific laboratory conditions.

The statement on the fitness for purpose and the schedule for the method's revalidation are annexed to the validation report.

Procesul de validare a metodei GOD/PAP pentru determinarea cantitativă a concentrației de glucoză în ser presupune întocmirea unui **plan documentat de validare a metodei** care cuprinde:

1. procedura de validare (descrie modul de desfășurare a validării metodelor în condițiile proprii de laborator și modelul raportului de validare).
2. redactarea declarației privind adecvarea la scop a metodei
3. stabilirea datei de revalidare

Rezultate și discuții

Procedura de validare este una singură pentru același laborator de analize medicale, dar validarea fiecărei metode de analiză se concretizează cu întocmirea unui raport specific de validare (care respectă formatul stabilit în procedură). Procedura de validare presupune verificarea parametrilor de performanță prin măsuratori repetate și interpretarea rezultatelor obținute în funcție de criteriile de acceptabilitate stabilite (valorile parametrilor de performanță obținute în condiții proprii de laborator să fie mai mici sau sensibil apropiate de cele ale producătorului sau cele din literatura de specialitate de referință – CLIA și Westgard) (5, 6).

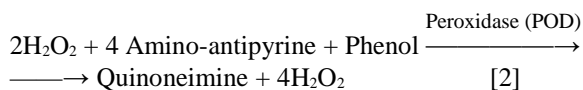
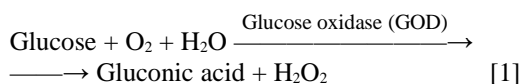
Raportul de validare cuprinde: condițiile în care se desfășoară validarea (specificarea metodei, responsabilul cu validarea metodei, condiții de mediu, echipament, reactivi, calibrator, seruri de control) și verificarea parametrilor de performanță (liniaritatea, domeniul de măsurare, intervalul de valori normale, specificitatea analitică, interferențe, limita minimă de detecție, limita minimă de cuantificare, precizia/imprecizia, acuratețea/inacuratețea și incertitudinea de măsurare). Raportul de validare se finalizează printr-o concluzie explicită privind performanțele metodei în condițiile specifice ale laboratorului.

Declarația privind adecvarea la scop și stabilirea revalidării metodei în cauză însoțesc raportul de validare.

Method specification

GOD/PAP method was developed for the quantitative determination of glucose in human serum (but also in other biological liquids) in both healthy persons and in those with carbohydrate metabolism disorders.

The GOD/PAP method has the following measurement principle: the glucose from the studied sample is hydrolyzed in the presence of glucose oxidase (GOD, enzyme component of R1 reagent) forming gluconic acid and peroxide [1]. The latter, in the presence of phenol and aminophenazone and under the action of peroxidase (POD, the 2nd enzyme of R1 reagent) creates a red-colored compound (quinoneimine) [2]. The optical density reading of the colored compound is 505 nm and is in direct proportion with the glucose amount from the sample.



The results are calculated by the formula:

$$y \text{ (mg/dL glucose)} = \frac{\text{OD}_{\text{sample}}}{\text{OD}_{\text{calibrator}}} \times \text{calibrator concentration}$$

[3], where

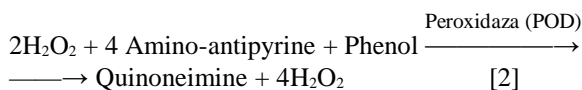
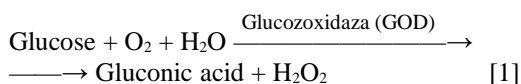
y = concentration of glucose; OD_{sample} = optical density of analyzed sample; OD_{calibrator} = optical density of the calibrator.

The person in charge with method validation is competent, has specialist training and experience in laboratory analytical determinations. The person in charge should have advanced knowledge about the principle of the determination method and the information regarding the performances achieved by the manufacturer during method validation. Moreover, the person in charge decides which method performance parameters shall be verified to demonstrate the method's fitness for purpose. Other tasks assigned are the scheduling of the revalidation date

Specificarea metodei

Metoda GOD/PAP a fost dezvoltată pentru determinarea cantitativă a glucozei în serul uman (dar și în alte lichide biologice) la persoane sănătoase sau cu tulburări ale metabolismului glucidic.

Metoda GOD/PAP are următorul principiu de măsurare: glucoza din proba de analizat este hidrolizată în prezența glucoză-oxidazei (GOD, enzimă componentă în reactivul R1) cu formare de acid gluconic și peroxid de hidrogen [1]. Acesta, în prezența fenolului și aminofenazonei și sub acțiunea peroxidazei (POD, a 2-a enzimă din reactivul R1) formează un compus colorat în roșu (quinoneimina) [2]. Densitatea optică a compusului colorat format este direct proporțională cu cantitatea de glucoză din probă și este măsurată la 505 nm.



Rezultatele se calculează după formula:

$$y \text{ (mg/dL glucose)} = \frac{\text{OD}_{\text{sample}}}{\text{OD}_{\text{calibrator}}} \times \text{calibrator concentration}$$

[3], unde

y = concentrația de glucoză; DO_{proba} = densitatea optică a probei de analizat; DO_{calibrator} = densitatea optică a calibratorului.

Responsabilul cu validarea metodei este o persoană competentă cu studii de specialitate și experiență în măsurătorile analitice de laborator. Responsabilul de validare trebuie să cunoască foarte bine principiul metodei de analiză și datele privind performanțele obținute în timpul validării metodei de către producător. De asemenea, responsabilul de validare stabilește care dintre parametrii de performanță ai metodei vor fi verificați pentru a demonstra adecvarea la scop a metodei. Tot în atribuțiile acestuia intră și

and the implementation of the validated method.

The GOD/PAP method does not require **special environment conditions**. The reactions during the determination occur on automatic equipment fitted with a heat control system. The environmental operating conditions are the following: temperature of $21 \pm 2^\circ\text{C}$ and humidity of 40-60 %. The analyzer is used in compliance with the manufacturer's recommendations on daily and periodical maintenance.

In the validation report there are also data on the **equipment**. The information presented in this paper was obtained by means of the automated biochemistry analyzer BT 3000 Plus, series XXXXXXXX, manufacturer: Biotecnica Instrument (Italy). The equipment was calibrated by INM Bucharest. The maintenance records confirm the performance of maintenance operations according to the manufacturer's instructions.

To verify performance parameters we used the **mono-reagent R1** GOD/PAP (RANDOX Laboratories, UK) "ready to use", stored in stability conditions ($2-8^\circ\text{C}$) and within the validity period. The reagent was chosen taking into account the adjustable working protocol provided by the manufacturer for the equipment employed during this study.

The reference material (calibrator) was the Randox Calibration Serum, code CAL 2351, level 3 (7). In the calibrator's traceability certificate it is stated the traceability of the gluc-

stabilirea termenului de revalidare precum și implementarea metodei validate.

Metoda GOD/PAP nu presupune **con-diții de mediu speciale**. Reacțiile din timpul măsurătorii se desfășoară pe echipament automat dotat cu sistem de termoreglare. Condițiile ambientale de lucru sunt: temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$ și umiditate 40 - 60%. Analizorul este utilizat cu respectarea indicațiilor producătorului privind mentenanța zilnică și periodică.

În raportul de validare sunt incluse și datele privind **echipamentul**. Datele prezentate în acest material au fost obținute utilizând analizorul automat de biochimie BT 3000 Plus, seria XXXXXXXX, producător: Biotecnica Instrument (Italia). Echipamentul a fost etalonat de INM București. Înregistrările de mentenanță atestă executarea operațiunilor de întreținere conform recomandărilor producătorului.

Pentru verificarea parametrilor de performanță a fost utilizat **monoreactivul R1** GOD/PAP (RANDOX Laboratories, UK) „ready to use” păstrat în condiții de stabilitate ($2-8^\circ\text{C}$) și în termen de valabilitate. Reactivul a fost ales deoarece există protocol de lucru adaptabil, oferit de producător, pe echipamentul utilizat în cadrul acestui studiu.

Materialul de referință (calibrator) folosit a fost Serul de Calibrare Randox, cod CAL 2351, level 3 (7). În certificatul de trasabilitate al calibratorului se precizează trasabilitatea

Table 1. Excerpt from the traceability certificate of the calibration serum Randox, code CAL 2351, level 3, where it is noticed the traceability of the glucose value to the reference material and the total measurement uncertainty.

Analyte	Traceable to reference material		
GLDH	Internal Master		
Glucose GOD	NIST917b / NIST965a		
Glucose Hex	NIST917b / NIST965a		

	Target value	Total Uncertainty	% Uncertainty
Albumin BCG	29.1 g/L	0.83 g/L	2.8%
Glucose GOD	15.1 mmol/L	0.6 mmol/L	4.0%
Glucose Hex	15.1 mmol/L	0.36 mmol/L	2.4%

conversion factor: glucose mmol/L x 18.016 = glucose mg/dL

ose concentration to the certified reference material (NIST 917b/NIST965a) and the total uncertainty of measurement (see *Table 1*).

We used Randox Human Assayed multi-sera **control serums** (with human matrix and measured values). Usually, only 2 concentration levels of control serums with relevance in clinical decision are used in medical laboratories for biochemical analytical determinations. We selected the control serum with normal ranges (Level 2 HN 1530) (8) and the control serum with pathologically high levels (Level 3 HE 1532) (9) because of the very low incidence of patient samples with pathologically low glucose levels (according to Westgard) (6).

The first **performance parameter evaluated** was **linearity**. By linearity of measurement we understand the ability to obtain a test result (for example: color intensity/ absorbance change) proportional with the analyte concentration/activity in the measured sample. The serum glucose determinations were performed on a calibration curve generated by a RANDOX calibrator of 272.04 mg/dL. The calibrator used is NIST traceable and has a total uncertainty (extended) of 10.80 mg/dL. The calibration factor is automatically generated by the analyzer by measuring the calibrator at a given level. The line is graphically represented between 0 and the set point 272.04 mg/dL (*Figure 1*). For checking linearity along the calibration range we proceeded to the analysis of calibrator's dilutions 1/1.5, 1/2 and 1/4. We noticed that linearity is established on the calibration range [0 – 272.04 mg/dL], thus the linearity parameter was checked under the specific laboratory conditions (*Figure 1*).

The measuring range represents the range between the lowest and the highest analyte concentration of the measured sample, for which it was showed that the analytical process has an acceptable precision, accuracy and linearity level (10). When evaluating the measuring range we took into account the information of the GOD/PAP method manufacturer who sets 450 mg/dL as **maximum limit**

valorii de glucoză la materialul de referință certificat (NIST 917b/NIST965a) și incertitudinea de măsurare totală (*Tabel 1*).

Am utilizat **serurile de control** Randox Human Assayed multi-sera (cu matrice umană și cu valori măsurate). În laboratoarele medicale pentru determinările biochimice analitice se utilizează în general numai 2 nivele de concentrație pentru serurile de control care au relevanță în decizia clinică. Am ales serul de control cu valori normale (Level 2 HN 1530) (8) și serul de control cu valori patologic crescute (Level 3 HE 1532) (9) deoarece frecvența probelor de pacient cu valori patologic scăzute de glucoză este foarte mică (6).

Primul **parametru de performanță verificat** a fost **linearitatea**. Prin linearitate de măsurare înțelegem abilitatea de a obține un rezultat (de exemplu: intensitate de culoare /modificare de absorbantă) direct proporțional cu concentrația /activitatea analitului din proba măsurată. Măsurătorile de glucoză serică au fost efectuate pe o dreaptă de calibrare trasată cu calibrator RANDOX de concentrație 272,04 mg/dL. Calibratorul utilizat este trasabil NIST și are o incertitudine totală (extinsă) de 10,80 mg/dL. Dreapta de calibrare este generată automat de către autoanalizor prin analizarea calibratorului de concen-

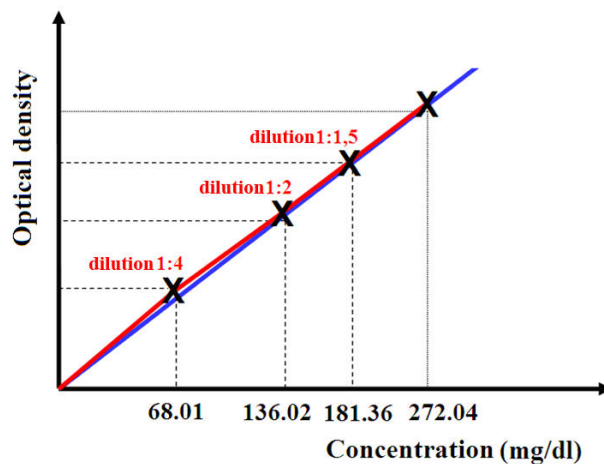


Figure 1. The calibration curve of 272.04 mg/dL traced with RANDOX calibrator and the measurement of 1/1.5, 1/2 and 1/4 dilutions of the calibrator.

of linearity for serum glucose measurements. We checked the measuring range by repeatability tests on the patient samples with higher serum glucose concentrations than the calibrator's (Table 2). We randomly selected 3 patient samples with values higher than 272.04 mg/dL (concentration of the calibrator) and lower than 450 mg/dL (maximum limit of linearity according to manufacturer's insert) and a sample with a concentration higher than 450 mg/dL. We performed 5 measurements for each sample.

The statistical calculation shows an acceptable precision for values up to 450 mg/dL with a coefficient of variation (CV%) of 0.84% (for the sample with an average value of 371.17 mg/dL), 0.89% (for the sample the average value of 410.17 mg/dL) and respectively 0.73 % (for the sample with an average value of 437.33 mg/dL). For the specimen with an average value of 457.56 mg/dL, the CV% was 11.05 % higher than the acceptable limit, according to CLIA. Thus, under specific laboratory conditions, the measuring range of serum glucose up to the value of 450 mg/dL serum glucose is verified.

The **range of normal values (biological reference values)** represents the central range for 95% of a reference lot's results. The range of reference was taken exclusively from the manufacturer, because the evaluation of this performance parameter in the medical laboratory is hard to achieve (the selection of the reference lot and costs involved) (11). The range of normal values is established by means of measurements made on a significant reference lot conducted by na-

trație cunoscută și unește punctul 0 și punctul „set-point” 272,04 mg/dL (Figura 1). Pentru verificarea linearității pe tot intervalul de calibrare am procedat la măsurarea diluțiilor de 1/1,5, 1/2 și 1/4 din calibrator. Am constatat că se respectă linearitatea pe intervalul de calibrare [0-272,04 mg/dL], deci parametrul de linearitate s-a verificat în condițiile proprii de laborator (Figura 1).

Domeniul de măsurare reprezintă intervalul cuprins între cea mai mică și cea mai mare concentrație a analitului din probele măsurate pentru care a fost demonstrat că procedura analitică are un nivel acceptabil de precizie, acuratețe și linearitate (10). În verificarea domeniului de măsurare am ținut cont de informația producătorului metodei GOD/PAP, care precizează valoarea de 450mg/dL drept **limită maximă a linearității** pentru măsurătorile de glucoză din ser. Am verificat domeniul de măsurare prin teste de repetabilitate pe probele de pacient cu concentrații ale glucozei serice mai mari decât valoarea calibratorului (Tabel 2). Au fost alese aleator 3 probe de pacient cu valori mai mari de 270,04 mg/dL (concentrația calibratorului) dar mai mici decât 450mg/dL (limita maximă a linearității conform insertului de la producător) și o probă cu valoare mai mare de 450 mg/dL. Au fost efectuate încă 5 măsuratori pentru fiecare probă.

Calculul statistic arată o precizie acceptabilă pentru valori de până la 450 mg/dL cu un coeficient de variație (CV%) de 0,84% (pentru proba cu valoarea medie de 371,17mg/dL), 0,89% (pentru proba cu valoarea medie de 410,17mg/dL) și respectiv 0,73% (pentru proba

Table 2. Results achieved by repeated measurements of the glucose concentration in patient samples higher than the calibrator's value.

Patient value (mg/dL glucose)	Number of measurements 6 replicates	Average value \bar{X}	Standard deviation (SD)	Coefficient of variation (CV) %
370	368, 376, 372, 368, 370, 373	371.17	3.12	0.84
408	408, 411, 404, 414, 411, 413	410.17	3.66	0.89
436	436, 432, 437, 440, 441, 438	437.33	3.20	0.73
482	482, 526, 421, 531, 417, 413	457.67	50.59	11.05

tional and international organizations (12).

The **analytical specificity** represents the ability of a method to accurately determine a certain analyte in the presence of other components in a sample matrix under the stated conditions (2). In our case, we did not check the analytical specificity, because glucose-oxidase has glucose as basis.

The method's insert provides information on **measurement interferences**, therefore the values of serum glucose obtained on haemolyzed, icteric or hyperlipemic sera are cautiously notified and are accompanied by further details about the serum's aspect in the analysis report (haemolyzed, icteric, lipemic serum).

The **minimum limit of detection** is the smallest amount of analyte that can be differentiated from blank (14). This performance parameter is relevant only for qualitative methods and this is the reason why it was not evaluated during the validation process (GOD/PAP is a quantitative method) (14). We took into account the information provided by the manufacturer that the minimum limit of detection for serum glucose by GOD/PAP method is 2.88 mg/dL.

The **minimum limit of quantification** represents the smallest amount of analyte that may be determined with an acceptable degree of precision and accuracy (15). The literature (14) states that the limit of quantification is verified during the validation process only in the case of quantitative methods by which major components are determined in small concentrations (traces). By means of the GOD/PAP method we determine significant concentrations of a major human serum component, glucose, for which the minimum limit of quantification with clinical relevance, according to CLIA, is 50 mg/dL.

This parameter is also present in the Validation instruction I-12 provided by RENAR where it is stated that "...if an automated analyzer is used, than the minimum limit of quantification obtained in the laboratory is given by the minimum limit of the calibration curve. If the minimum limit of the calibration curve is given

cu valoarea medie de 437,33mg/dL). Pentru proba cu valoarea medie de 457,56 mg/dL, CV% a fost de 11,05%, mai mare decât limita acceptabilă după CLIA. Deci, în condițiile proprii de laborator, domeniul de măsurare a glucozei serice se verifică până la concentrația de 450 mg/dL glucoză serică.

Intervalul de valori normale (valori biologice de referință) este intervalul central în care se situează 95% din rezultatele unui lot de referință. Intervalul de referință a fost preluat exclusiv de la producător, deoarece verificarea acestui parametru de performanță în laboratorul medical este dificil de realizat (alegerea lotului de referință și costurile pe care le implică) (11). Intervalul de valori normale este stabilit prin măsuratori efectuate pe un lot semnificativ de referință de către organizații naționale sau internaționale (12).

Specificitatea analitică este capacitatea unei metode de a determina cu acuratețe un anumit analit în prezența altor componente dintr-o matrice dată în condițiile specificate (2). În cazul de față nu am verificat specificitatea analitică, deoarece glucoză-oxidaza are specificitate absolută de substrat.

Insertul metodei ne oferă informații privind **interferențele de măsurare**, de aceea valorile glucozei serice obținute pe seruri hemolizate, icterice sau hiperlipemice sunt comunicate cu prudență și însoțite de precizări suplimentare în buletinul de analiză privind aspectul serului (ser hemolizat, icteric, lipemic).

Limita minimă de detecție este cea mai mică concentrație a unui analit care poate fi diferențiată de blanc (14). Acest parametru de performanță are relevanță doar pentru metodele calitative, de aceea nu a constituit obiectul verificării în timpul procesului de validare (metoda GOD/PAP este o metoda cantitativă) (14). Reținem informația de la producător că limita minimă de detecție a glucozei serice prin metoda GOD/PAP este de 2,88 mg/dL.

Limita minimă de cuantificare este cea mai mică cantitate a unui analit care poate fi determinată cu un grad acceptabil de precizie și

by the 0 value of the concentration than the minimum limit of measurement of the analyte shall be most likely higher than 0 (that is higher than the minimum limit of the calibration curve) and should be determined in the laboratory ... if this limit is relevant from a clinical point of view” (3). Taking into account the fact that the minimum limit with clinical relevance for serum glucose is much higher than 0 mg/dL (50 mg/dL, according to CLIA) (6), we did not evaluate this parameter in the GOD/PAP method validation.

Precision/ imprecision of measurement represents the degree of closeness between the quantitative values of an analyte, is obtained by repeated measurements under the stated conditions (16) and is expressed by the standard deviation of the mean result and the coefficient of variation (standard deviation).

The **precision of repeatability (intra-assay, intra-run, intra-day precision)** expresses precision under the same measurement conditions in a short period of time.

The **precision of reproducibility (inter-assay, inter-run, inter-day precision)** expresses precision under the same measurement conditions in a short period of time.

Intermediary precision expresses precision of measurement in the case of minor changes of the measuring system (analyst etc). If automatic equipment is used, the change of the operator does not significantly influence the precision of measurement.

We checked the precision of repeatability by repeated determinations of serum glucose on the same day, in the control serums Level 2 and Level 3. In *Table 3* we show in parallel the statistical data of our results and the results achieved by the manufacturer. The coefficients of variation achieved by determinations conducted on the two levels of the control serum (0.84% and respectively 0.80 %) are lower than the manufacturer's coefficients of variation (1.48% and 0.85%). Westgard shows that maximum allowed imprecision (I%) of serum glucose measurement is 2.9% (see *Table 4*). The

acuratețe (15). Literatura de specialitate (14) arată că limita de cuantificare se verifică în timpul procesului de validare doar în cazul metodelor cantitative prin care se determină componente majore în concentrații mici (traces). Prin metoda GOD/PAP determinăm concentrații semnificative ale unui component major al serului uman, glucoza, pentru care limita minimă de cuantificare cu relevanță clinică, conform CLIA, este stabilită la 50 mg/dL.

Acest parametru este prezentat și în Instrucțiunea de validare I-12 oferită de RENAR unde se arată că “...dacă se utilizează un analizor automat, atunci limita minimă de cuantificare pe care o poate obține laboratorul este dată de limita minimă a curbei de calibrare. Dacă limita minimă a curbei de calibrare este dată de valoarea 0 a concentrației, atunci limita minimă de măsurare a analitului va fi foarte probabil mai mare decât 0 (n.n. deci mai mare decât limita minimă a curbei de calibrare) și trebuie determinată de laborator ... dacă această limită este relevantă din punct de vedere clinic” (3). Ținând cont de faptul că, pentru glucoza serică limita minimă relevantă clinic este mult mai mare de 0 mg/dL (50mg/dL, după CLIA) (6) în validarea metodei GOD/PAP nu am verificat acest parametru.

Precizia/Imprecizia de măsurare reprezintă gradul de apropiere între valorile cantitative ale unui analit obținute prin măsuratori repetate în condiții specificate (16) și se exprimă prin deviația standard a valorii medii și coeficientul de variație (deviația standard procentuală).

Precizia de repetabilitate (intra-assay, intra-run, intra day precision) exprimă precizia în aceleași condiții de măsurare într-un interval scurt de timp.

Precizia de reproductibilitate (inter-assay, inter-run, inter-day precision) exprimă precizia în aceleași condiții de măsurare într-un interval lung de timp.

Precizia intermediară exprimă precizia de măsurare în cazul unor schimbări minore ale sistemului de măsurare (analistul etc). Atunci când se utilizează un echipament automat,

coefficients of variation achieved under repeatability conditions compared to the manufacturer's data and to the information from literature reveal a precision of repeatability within acceptable limits under specific laboratory conditions.

The precision of reproducibility (inter-assay, inter day precision) was evaluated by daily glucose measurements on the 2 control sera during the period 01-31.03.2010. The statistical data for the values obtained as well as those of the manufacturer can be found in *Table 5*. The coefficient of variation achieved for an average value of 116 mg/dL glucose is 0.95% and is lower than the one specified by the manufacturer of 1.21%. In the case of serum glucose determinations with pathological values (with an average value of 291 mg/dL) we achieved a coefficient of variation of 1.92 %, slightly similar to the manufacturer's CV of 1.88%. Taking into account the maximum allowed imprecision (I%) of 2.9% for serum glucose measurement, according to Westgard (*Table 4*) (6), our determinations showed an acceptable precision for serum glucose measurements under reproducibility conditions.

schimbarea operatorului nu influențează semnificativ precizia de măsurare.

Am verificat precizia de repetabilitate prin măsuratori repetate a glucozei serice în aceeași zi, în serurile de control Level 2 și Level 3. În *Tabelul 3* sunt prezentate comparativ datele statistice ale rezultatelor proprii și rezultatele obținute de producător. Coeficienții de variație obținuți pe măsuratori efectuate pe cele 2 nivele ale serului de control (0,84% și respectiv 0,80%) sunt mai mici decât coeficienții de variație ai producătorului (1,48% și respectiv 0,85%). Westgard arată că imprecizia (I%) maxim admisă pentru măsuratoarea serică de glucoză este de 2,9% (vezi *Tabelul 4*). Coeficienții de variație obținuți în condiții de repetabilitate comparați cu datele producătorului și datele din literatura de referință relevă o precizie de repetabilitate în limite acceptabile în condițiile noastre de laborator.

Precizia de reproductibilitate (inter-assay, inter-day precision) a fost verificată prin măsurătorile de glucoză din cele 2 seruri de control în fiecare zi în perioada 01 - 31.03.2010. Datele statistice ale valorilor obținute și cele ale

Table 3. Statistical data of own results and manufacturer's results for repeatability precision (intra-assay, intra-run, intra-day precision).

CONTROL SERUM	Level II		Level III	
	Own result *	Manufacturer result	Own result *	Manufacturer result
Number of measurements	10	20	10	20
Average (mg/dL)	109	119.6	287	316.7
Standard deviation (mg/dL)	0,92	1.7	2,3	2.3
Coefficient of variation (%)	0.84	1.48	0.8	0.85

* data obtained in 17.03.2010

Tabel 4. Maximum allowed imprecision (I%) for serum glucose measurement after Westgard.

Analyte	Biological variation		Desirable specification		
	CVw	CVg	I (%)	B(%)	TE(%)
Glucose	5.7	6.9	2.9	2.2	6.9

CVw = within-subject biologic variation; CVg = between-subject biologic variation; I = desirable specification for imprecision; B = desirable specification for inaccuracy; TE = desirable specification for allowable total error (6).

Accuracy/inaccuracy represents the degree of closeness between a measured value or the mean results and the true value of an analyte (1). It is expressed by Bias, the difference between the measured value or the mean of results and the true value (2). **Intra-laboratory accuracy** was evaluated by daily glucose measurements on the 2 control sera during the period 01-31.03.2010. The Bias value is of 1.75% for a mean glucose value of 116 mg/dL and respectively 2.10 % for a mean glucose value of 291 mg/dL (Table 6). Both Bias values are lower than the maximum allowed Bias of 2.2%, according to Westgard.

The checking of measurements' accuracy by **inter-laboratory comparisons** is showed in Table 7. The reports from the participations to the external quality control from November 2009 and February 2010 indicate a Z score smaller than 2 in the case of 2 glucose samples (with normal and pathologically in-

producătorului se regăesc în Tabelul 5. Coeficientul de variație obținut pentru o valoare medie de glucoză de 116 mg/dL este de 0,95%, mai mic decât cel indicat de producător de 1,21%. În cazul măsurătorilor de glucoză serică cu valori patologice (cu o valoare medie de 291 mg/dL) s-a obținut un coeficient de variație de 1,92%, sensibil apropiat de CV al producătorului de 1,88%. Având în vedere imprecizia (I%) maxim admisă pentru măsurătoarea serică de glucoză este de 2,9% după Westgard (Tabel 4) (6) măsurătorile efectuate de noi au demonstrat o precizie acceptabilă pentru măsurătorile de glucoză serică în condiții de reproductibilitate.

Acuratețea/ Inacuratețea reprezintă gradul de apropiere dintre valoarea măsurată sau media valorilor și valoarea adevărată a unui analit (1). Se exprimă prin Bias, diferența dintre valoarea măsurată sau media valorilor și valoarea adevărată (2). **Acuratețea intralaborator** a fost

Table 5. Statistical data of own results and manufacturer's results for reproducibility precision (inter-assay, inter-day precision)

CONTROL SERUM	Level II		Level III	
	Own result *	Manufacturer result	Own result *	Manufacturer result
Number of measurements	23	20	23	20
Average (mg/dL)	116	121.1	291	320.3
Standard deviation (mg/dL)	1.1	1.5	5.6	5.9
Coefficient of variation (%)	0.95	1.21	1.92	1.88

* measurements during the period 01 – 31.03.2010

Table 6. Statistical calculation for the evaluation of intra-laboratory accuracy by daily glucose measurements in the 2 control sera during the period 01 – 31.03.2010

CONTROL SERUM	Level II		Level III	
	Average of measured values*	Target value	Average of measured values*	Target value
	116	114	291	285
Bias = Average – Target value	116 - 114 = +2		291 - 285 = +6	
Bias % = Bias / Target value x100	2 / 114 *100 = 1.75		6 / 285 *100 = 2.10	
<i>Bias% after Westgard (table 4)</i>			2.2	

* measurements during the period 01 – 31.03.2010

creased level). The Z score in a range of [+2, -2] points out an accuracy of measurement within acceptable limits. The results of intra-laboratory Bias and of Z score from the external control show an acceptable accuracy for serum glucose measurement by GOD/PAP method under specific laboratory conditions.

The validation of the method involves, as we have already mentioned, besides the evaluation of performance parameters, the identification of factors influencing these parameters and their degree of influence that is estimating the uncertainty of measurement.

The **measurement uncertainty (UM)** is the range for estimating with a certain probability, called level of confidence, the true value of the measurand (17, 18).

We estimated UM by the analytical method using it according to the Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM), because the reference material used is traceable to certified reference materials (MRC) (19). In the validation report we included the values estimated by us for $UM_{extended}$ (total error) for 2 levels of concentration of serum glucose (normal and pathologically high). The results of

verificată prin măsurătorile de glucoză din cele 2 seruri de control în fiecare zi din perioada 01 - 31.03.2010. Valoarea Bias este de 1,75% pentru o valoare medie a glucozei de 116 mg/dL și respectiv 2,10% pentru o valoare medie a glucozei de 291 mg/dL (Tabel 6). Ambele valori ale Bias-ului sunt mai mici decât valoarea Bias-ului maxim admis după Westgard de 2,2%.

Verificarea acurateții măsurătorilor prin **comparări interlaboratoare** este prezentată în Tabelul 7. Rapoartele de la participările la controlul extern de calitate din luna noiembrie 2009 și luna februarie 2010 arată un scor Z mai mic de 2 pentru analiza concentrațiilor serice de glucoză (cu nivel normal și patologic crescut). Scorul Z într-un interval de [+2, -2] evidențiază o acuratețe de măsurare în limite acceptabile. Valorile Bias-ului intralaborator și ale scorului Z din controlul extern arată o acuratețe acceptabilă pentru măsurarea de glucoză în ser prin metoda GOD / PAP în condiții proprii de laborator.

Validarea metodei presupune, așa cum a fost anterior menționat, pe lângă verificarea caracteristicilor de performanță și identificarea factorilor care influențează aceste caracteristici și gradul de influență al acestora, adică estima-

Table 7. Results of serum glucose determination obtained at the inter-laboratory comparisons from November 2009 and February 2010.

	Normal level of glucose	High level of glucose
Intercomparison report NOVEMBER - 2009	Obtained result =105 mg/dL Average of intercomparison = 95.57 mg/dL	Obtained result = 307 mg/dL Average of intercomparison = 283.8 mg/dL
Z Score	1.47	1.12
Intercomparison report FEBRUARY- 2010	Obtained result = 111mg/dL Average of intercomparison = 113.14 mg/dL	Obtained result = 285 mg/dL Average of intercomparison = 280.13mg/dL
Z Score	- 0.34	0.35
$Z \text{ score} = \frac{\text{obtained result} - \text{average of intercomparison}}{\text{Standard deviation of average of intercomparison}}$		
Z score: acceptable range [-2, +2]		

UM_{extended} are 9.48% (for a mean serum glucose concentration of 116 mg/dL) and respectively 5.35% (for a mean serum glucose concentration of 291 mg/dL). Both values of estimated UM_{extended} are lower than 10%, the maximum allowed value of CLIA (see Table 8).

In the **conclusion of the validation report** we mentioned that the results of serum glucose by GOD/PAP are credible, have acceptable precision and accuracy and are accompanied by a range of confidence within the limits accepted by specialized literature.

The report of GOD/PAP method validation in our laboratory is also accompanied by the **statement on the method's fitness for purpose**. We considered that the GOD/PAP method for serum glucose quantitative determination was fit for the purpose proposed under our specific laboratory conditions because:

- The personnel are competent as far as specialist training, skills and professional experience is concerned.
- The environment conditions from our laboratory (showed in the validation report) do not fluctuate during the process.
- The working equipment is calibrated (the calibration certificate is annexed to the validation report) and maintained according to the manufacturer's recommendations.
- Reagents are "ready to use" with suitable stability.
- The reference material is traceable to the certified reference material.
- The selected control sera have determinate values and human matrix.
- We evaluated the following performance parameters (according to EURACHEM) which

rea incertitudinii de măsurare.

Incetitudinea de măsurare (UM) este intervalul în care se estimează cu o anumită probabilitate, numită nivel de încredere, că se află valoarea adevărată a măsurandului (17, 18).

Am estimat UM prin metoda analitică utilizând metoda analitică după Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM), deoarece materialul de referință folosit este trasabil la materiale de referință certificate (MRC) (19). În raportul de validare am inclus valorile estimate de noi pentru UM_{extinsă} (eroare totală, TE) pentru 2 nivele de concentrație a glucozei în ser (normal și patologic crescut). Valorile UM_{extinsă} sunt de 9,48% (pentru o concentrație medie a glucozei serice de 116 mg/dL) și respectiv 5,35% (pentru o concentrație medie a glucozei serice de 291 mg/dL). Ambele valori ale UM_{extinsă} estimate sunt mai mici decât 10%, valoarea maximă admisă de CLIA (vezi Tabelul 8).

În **concluzia raportului de validare** am precizat că rezultatele de glucoză serică măsurate prin metoda GOD/PAP sunt credibile, au precizie și acuratețe acceptabile și sunt însoțite de un interval de încredere în limite admise de literatura de specialitate.

Raportul de validare a metodei GOD/PAP în laboratorul nostru este însoțit și de **declarația privind adecvarea la scop a metodelor**. Am considerat că metoda GOD/PAP pentru determinarea cantitativă a glucozei serice este adecvată scopului propus în condițiile noastre de laborator pentru că:

- Personalul este competent din punct de vedere atât al studiilor cât și al abilităților și experienței profesionale.
- Condițiile de mediu din laboratorul nos-

Table 8. Estimated values of UM_{extended} (total error) - (17) versus CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments) (5)

Control sera	Average of glucose values (mg/dL)	Estimated total error	CLIA acceptable performance for serum glucose
Level 2	116	±9.48%	± 10%
Level 3	291	±5.35%	

complied with the initially stated acceptability criteria: linearity, measurement range, precision of repeatability and reproducibility, intra-laboratory accuracy and inter-laboratory comparisons, measurement uncertainty (total error).

The **revalidation of the method** was set by the validation manager and by the laboratory director for less than 1 year time (provided no major change occurs in the measurement system) because:

- The precision of reproducibility (CV%) for the measurements of serum glucose pathological values is acceptable compared to the manufacturer's performance (1.92 % *versus* 1.88%), but complies with the allowed limit according to Westgard (1.92% *versus* 2.9%) (6);

- UM_{extended} for normal serum glucose results is very close to the acceptable performance according to CLIA (9.48% *versus* 10%)

Conclusion

The management of the laboratory and the personnel involved in the validation of the method are liable to implement and use it until the revalidation date. The objective evidences, the printings with all the results achieved are stored in safe conditions until revalidation.

Acknowledgements. The researches were partially supported by funds from C.N.C.S.I.S. PN-II-ID-PCE-1273/2007 and C.N.C.S.I.S. PN-II-ID-PCE-2670/2008 grants.

References

1. International Organization of Standardization, ISO/TC 212. ISO 15189:2007, Medical laboratories – Particular requirements for quality and competence, 2nd Edition. Geneva, 2007: p37
2. EURACHEM Guide. The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 1998, p 2, 52-53, A33.1, A33.2.1 si A33.2.2.
3. The Romanian Accreditation Association (RENAR). Instruction for validation of methods used in medical laboratories, RENAR Code: I-12, First Edition, 2007: p 1-9
4. Scientific Working Group for the Analysis of Seized

tru (prezentate în raportul de validare) nu prezintă fluctuații în timpul lucrului.

- Echipamentul de lucru este etalonat (certificat de etalonare atașat la raportul de validare) întreținut conform recomandărilor producătorului.

- Reactivii sunt achiziționați “gata de utilizare” cu stabilitate adecvată.

- Materialul de referință este trasabil la materialul de referință certificat.

- Serurile de control alese au valori determinate și matrice umană.

- Au fost verificați următorii parametri de performanță (conform EURACHEM) care s-au încadrat în criteriile de acceptabilitate stabilite inițial: linearitate, domeniul de măsurare, precizia de repetabilitate și reproductibilitate, acuratețea intralaborator și din comparații interlaboratoare, incertitudinea de măsurare (eroarea totală).

Revalidarea metodei a fost stabilită de către responsabilul de validare și șeful de laborator la mai puțin de 1 an de zile (dacă nu au loc schimbări majore în sistemul de măsurare) deoarece:

- Precizia de reproductibilitate (CV%) pentru măsurătorile valorilor patologice de glucoză în ser este satisfăcătoare în raport cu performanța producătorului (1,92% *versus* 1,88%), dar se încadrează în limitele admise după Westgard (1,92% *versus* 2,9%) (6);

- $UM_{\text{extinsă}}$ pentru valorile normale de glucoză în ser este foarte apropiată de performanța acceptabilă după CLIA (9,48% *versus* 10%).

Concluzie

Conducerea laboratorului și personalul implicat în validarea metodei are responsabilitatea implementării și utilizării acesteia până în momentul revalidării. Dovezile obiective, imprimările cu toate rezultatele obținute sunt păstrate în condiții de siguranță până la data revalidării.

Mulțumiri. Studiul a fost parțial suportat din granturile C.N.C.S.I.S. PN-II-ID-PCE-1273/2007 și C.N.C.S.I.S. PN-II-ID-PCE-2670/2008

- Drugs (SWGDRUG). Validation of Analytical Methods. Forensic Science Communications 2005; 7(1).
5. Method Evaluation. Appendix B. Retrieved September 21, 2010 from <http://www.clinlabnavigator.com/Method-Evaluation/appendix-b.html>
 6. Desirable Specifications for Total Error, Imprecision, and Bias, derived from intra-and inter-individual biologic variation. Westgard QC (n.d.) Retrieved September 21, 2010 from <http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>
 7. Retrieved September 21, 2010 from <http://www.randox.com/Calibrator%20Kit%20Inserts.php?ID=29>
 8. Retrieved September 21, 2010 from <http://www.randox.com/QCSERA.php?ID=28>
 9. Retrieved September 21, 2010 from <http://www.randox.com/QCSERA.php?ID=29>
 10. ICH Harmonised Tripartite Guideline Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Drugs for Human Use, 2005: p5. Retrieved September 21, 2010 from <http://www.ich.org/cache/compo/363-272-1.html#Q2A>
 11. Sonntag O. Quality in the analytical phase. Biochemia Medica 2010;20(2):147-53
 12. ISO 3534-1:2006. Statistics –Vocabulary and symbols – Part 1: General statistical terms and terms used in probability, 2006
 13. Dybkaer R. Vocabulary for use in measurement procedures and description of reference materials in laboratory medicine. Clin Chem Clin Biochem 1997;35(2):141-173.
 14. Validation of Analytical Methods and Procedures. Labcompliance, 2007. Retrieved September 21, 2010 from <http://www.labcompliance.com/tutorial/methods>
 15. FDA. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, 2001, p23 Retrieved September 21, 2010 from <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>
 16. Glossary of QC terms. Retrieved September 21, 2010 from <http://www.westgard.com/glossary.htm>
 17. BIPM, IEC, IFCC, ILAC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML, The International Vocabulary of Metrology, Basic and General Concepts and Associated Terms – VIM, Joint Committee for Guides in Metrology- JCGM 200:2008 [ISO/IEC Guide 99]: p 21
 18. Gasljevic V. Method validation and measurement uncertainty. Biochemia Medica 2010;20(1):57-63.
 19. Dumitriu IL, Gurzu B, Slatineanu SM, Foia L, Mutiu T, Schiriac C, Achirecesei M, Enea M. A model for calculating measurement uncertainty in medical laboratories. Rom. Rev. Lab. Med. 2010;18(1): 65-77.