

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΔΟΚΙΜΕΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Δρ. Ειρήνη Α. Δειμονή, Ελένη Τράπαλη
EUROMEDICA A.E., Κεντρικά Εργαστήρια, Ευριπίδου 4, Αγία Παρασκευή
ileimoni@gmail.com

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το αποτέλεσμα μίας μέτρησης, δηλαδή η εκτίμηση της πραγματικής (αληθούς) τιμής, δεν μπορεί ουσιαστικά να αξιοποιηθεί αν δεν συνοδεύεται από μία κατάλληλη δήλωση της αβεβαιότητάς του. Στη διαδικασία διαπίστευσης του εργαστηρίου μας κατά ISO 17025 εκτιμήθηκε η συνδυασμένη και διευρυμένη αβεβαιότητα 113 δοκιμών κλινικής χημείας, οι οποίες κατανέμονται σε: βιοχημικές, ανοσοχημικές και αιματολογικές. Στην πορεία εκτίμησης της αβεβαιότητας των παραπάνω δοκιμών πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση των πηγών αβεβαιότητας, ποσοτικοποίηση της αβεβαιότητας κάθε πηγής, υπολογισμός της συνδυασμένης και της διευρυμένης αβεβαιότητας [1]. Ο ακριβής προσδιορισμός των παραμέτρων κλινικής χημείας εξαρτάται από πλήθος παραγόντων, προ-αναλυτικών και αναλυτικών. Στους προ-αναλυτικούς περιλαμβάνονται οι παράγοντες που επενεργούν τη στιγμή της δειγματοληψίας: μέθοδος δειγματοληψίας, συνθήκες συλλογής του δείγματος, θέση του ασθενούς, αλλά κυρίως οι βιολογικοί παράγοντες, οι οποίοι ευθύνονται για τη διατομική και ενδοατομική μεταβλητότητα των τιμών. Στους προ-αναλυτικούς παράγοντες κατατάσσονται επίσης, η φυγοκέντριση, η μεταφορά και αποθήκευση του δείγματος, η ετερογένεια του βιολογικού υλικού και το φαινόμενο μήτρας (matrix) [2,3]. Η αναλυτική αβεβαιότητα εξαρτάται από την αναλυτική μέθοδο, δηλαδή την αβεβαιότητα του βαθμονομητή, τη σταθερότητα του αντιδραστηρίου και τη συμβολή του αυτόματου αναλυτή (βραχίονες ογκομέτρησης και διανομής δείγματος/αντιδραστηρίου, τη μονάδα ανίχνευσης, τη θερμοκρασία αντίδρασης και γενικότερα την κατάσταση συντήρησης του αναλυτή) [4]. Αν οι κανόνες που αφορούν στη συλλογή και διαχείριση του δείγματος, καθώς και στην αναλυτική διαδικασία τηρηθούν αυστηρά, οι κυριότεροι παράγοντες για την εκτίμηση της αβεβαιότητας των κλινικών δοκιμών είναι η βιολογική μεταβλητότητα και η αναλυτική επαναληψιμότητα/αναπαραγωγιμότητα [3]. Στο εργαστήριό μας πραγματοποιήθηκε σειρά μετρήσεων των προς διαπίστευση δοκιμών στη διάρκεια μίας ημέρας (within day) και μεταξύ διαδοχικών ημερών (between days) με στόχο τον προσδιορισμό της αναλυτικής επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας (πιστότητα) και ορθότητας των κλινικών παραμέτρων. Επιπλέον, προσδιορίστηκε το όριο ανίχνευσης και το όριο ποσοτικοποίησης όλων των κλινικών δοκιμών που επαληθεύθηκαν.

Λέξεις-Κλειδιά: *αβεβαιότητα 1, ορθότητα 2, πιστότητα 3, μεταβλητότητα 4, κλινικές δοκιμές 1.*

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ποιότητα των εργαστηριακών διαδικασιών είναι βασική απαίτηση για τη σωστή ιατρική ερμηνεία των εργαστηριακών αποτελεσμάτων. Η εγκυρότητα των εργαστηριακών αναλύσεων διασφαλίζεται με την ταυτοποίηση, ποσοτικοποίηση και έλεγχο των πηγών αβεβαιότητας, που επηρεάζουν τις κλινικές δοκιμές. Το αποτέλεσμα μίας μέτρησης δεν

μπορεί ουσιαστικά να αξιοποιηθεί, αν δεν συνοδεύεται από μία κατάλληλη δήλωση της αποδεκτής αβεβαιότητάς του. Για παράδειγμα, όταν μία μέτρηση πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό συγκεκριμένης δοσολογίας φαρμάκου σε ασθενείς, ο ρόλος της αβεβαιότητας εμφανίζεται ιδιαίτερα κρίσιμος [5].

Στη διαρκώς αυξανόμενη ανάγκη για διαπίστευση των κλινικών εργαστηρίων κατά ISO 17025 και 15189, η εκτίμηση της διευρυμένης αβεβαιότητας των δοκιμών αποτελεί σημαντικό και απαραίτητο στοιχείο της όλης διαδικασίας. Επίσημες οδηγίες γενικά για την εκτίμηση της αβεβαιότητας μίας μέτρησης έχουν δοθεί στον «Οδηγό για την έκφραση της αβεβαιότητας μίας μέτρησης» (Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement – GUM) [6]. Ειδικότερα στο πεδίο της αναλυτικής χημείας τέτοιου είδους οδηγίες έχουν δοθεί από την EURACHEM. Το έτος 2000 δημοσιεύθηκε με μεγάλη επιτυχία η δεύτερη έκδοση του «Οδηγού για την ποσοτικοποίηση της αβεβαιότητας μετρήσεων αναλυτικής χημείας» (Guide on Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement – QUAM) [7], καλύπτοντας θέματα που αφορούν στην αναλυτική χημεία. Σε κανένα όμως επίσημο οδηγό δεν γίνεται ειδική αναφορά σε δοκιμές κλινικής χημείας. Σε άρθρα των Kristiansen και Christensen (2), Kristiansen και συν. [8] υπάρχουν αναφορές στην εφαρμογή των επίσημων οδηγιών της GUM στην κλινική χημεία. Συγκεκριμένα, στη δεύτερη επιστημονική εργασία εκτιμήθηκε η αβεβαιότητα κατά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης μολύβδου σε ολικό αίμα με τη μέθοδο της φασματομετρίας ατομικής απορρόφησης. Το 2004 οι Patriarca και συν. [9] επικύρωσαν μέθοδο προσδιορισμού πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων μολύβδου (<150 µg/L) σε ανθρώπινο αίμα, εκτιμώντας τη συνδυασμένη αβεβαιότητα των μετρήσεων με τη νέα μεθοδολογία. Οι Kallner και Walderstrom [10] εκτίμησαν την αβεβαιότητα της μέτρησης γλυκόζης σε ολικό αίμα και σχολίασαν τα αποτελέσματα σε σχέση με τα κριτήρια διάγνωσης σακχαρώδους διαβήτη. Παρόλα αυτά κανένα από τα παραπάνω παραδείγματα δεν αναφέρεται σε μία γενική διαδικασία, που θα μπορούσε να εφαρμοστεί στο ευρύ πεδίο μετρήσεων κλινικής χημείας. Από τα στοιχεία αυτά θα μπορούσε κανείς να επισημάνει την αναγκαιότητα σύνταξης ενός επίσημου οδηγού, στον οποίο να εμπεριέχονται, τόσο τα απαραίτητα θεωρητικά στοιχεία, όσο και κατευθυντήριες οδηγίες για την πρακτική εφαρμογή τους στα εργαστήρια δοκιμών κλινικής χημείας.

Στην κλινική χημεία κατά τη διαδικασία ταυτοποίησης των πηγών αβεβαιότητας μίας συγκεκριμένης παραμέτρου αναζητούνται παράγοντες που επηρεάζουν σε προ-αναλυτικό και αναλυτικό στάδιο. Στο εργαστήριό μας εκτιμήθηκε η συνδυασμένη και διευρυμένη αβεβαιότητα 113 δοκιμών κλινικής χημείας. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε σειρά μετρήσεων των προς διαπίστευση δοκιμών στη διάρκεια μίας ημέρας (within day) και μεταξύ διαδοχικών ημερών (between days) με στόχο την επαλήθευσή τους.

ΠΡΟ-ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑ

Στην κλινική χημεία το υπό μελέτη σύστημα, πολύ συχνά, είναι το ολικό αίμα των ασθενών σε συνθήκες ζωής (in vivo), σε συγκεκριμένη στιγμή κατά τη διάρκεια του 24ώρου (χρόνος δειγματοληψίας) [5]. Αυτό το δείγμα αμέσως μετά την αιμοληψία αρχίζει να διαφοροποιείται από την κατάστασή του in vivo, επηρεαζόμενο, τόσο από ενδογενείς, όσο και εξωγενείς παράγοντες και χαρακτηρίζεται ως δείγμα σε συνθήκες εργαστηρίου (in vitro).

Το in vivo δείγμα παρουσιάζει διακυμάνσεις φυσιολογικών παραμέτρων και χαρακτηρίζεται από διαφορές σε εργαστηριακές μετρήσεις (CV) που δεν σχετίζονται με προ-αναλυτική ή αναλυτική μεταβλητότητα. Οι διακυμάνσεις αυτές αποτελούν τη «βιολογική μεταβλητότητα» (3,17,18). Η βιολογική μεταβλητότητα διακρίνεται σε

ενδοατομική μεταβλητότητα (inter-individual biological variation) και διατομική μεταβλητότητα (intra-individual biological variation).

Η ενδοατομική βιολογική μεταβλητότητα είναι αποτέλεσμα της εγγενούς μεταβλητότητας των βιοχημικών μηχανισμών κάθε οργανισμού και χαρακτηρίζεται από ρυθμούς:

- Κιρκάδιους (διαφορετικές συγκεντρώσεις ουσιών, ανάλογα με την ώρα)
- Φυσιολογικούς (κύκλος εμμήνου ρύσεως, εγκυμοσύνη, εμμηνόπαυση)
- Εποχικούς (διαφορετικές συγκεντρώσεις ουσιών, ανάλογα με την εποχή)
- Ηλικίας (διαφορετικές συγκεντρώσεις ουσιών, ανάλογα με την ηλικία)

Η διατομική βιολογική μεταβλητότητα παρουσιάζεται συνήθως σαν σύνολο διαφορών μεταξύ πληθυσμών, που εμφανίζουν διάφορα χαρακτηριστικά, όπως:

- Φύλο
- Εθνικότητα
- Περιβαλλοντικοί παράγοντες
- Σωματομετρικά χαρακτηριστικά
- Γενετικοί παράγοντες
- Κοινωνικοοικονομικοί παράγοντες
- Διατροφικές και άλλες συνήθειες

Στο *in vitro* δείγμα με την πάροδο του χρόνου σε πολλές περιπτώσεις παρατηρείται μεταβολή της συγκέντρωσης των υπό μελέτη παραμέτρων, η οποία μπορεί να οφείλεται, είτε σε ενδογενείς παράγοντες, π.χ. πρωτεόλυση, εάν πρόκειται για βιολογικά μακρομόρια, είτε σε διαφόρων τύπων επιμολύνσεις (εξωγενείς παράγοντες). Επίσης, η συγκέντρωση πολλών παραμέτρων επηρεάζεται δραματικά από τον τρόπο της αιμοληψίας, δηλαδή τη θέση αιμοληψίας [3,11,16] και την ταχύτητα ροής του φλεβικού αίματος (π.χ. ασβέστιο, θυροξίνη) [11,12]. Επειδή ο όγκος του πλάσματος είναι μεγαλύτερος κατά 12-15% σε άτομα που βρίσκονται σε ύπτια θέση για μερικές ώρες, όταν η θέση αιμοληψίας αλλάζει από ύπτια σε όρθια, παρατηρείται αύξηση των τιμών σε: αιμοσφαιρίνη (Hb), ερυθρά αιμοσφαίρια, αιματοκρίτη (Hct), κάλιο, φώσφορο, γλουταμινική οξαλοξική τρανσαμινάση (AST), ασβέστιο κ.α. Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι περίδεση που εφαρμόζεται για χρόνο μεγαλύτερο από 1 min οδηγεί σε αύξηση των λευκωμάτων (5%), του σιδήρου (6,7%), της AST (9,3%), της χοληστερίνης (5%) και σε μείωση του καλίου (5%) και της κρεατινίνης (2,3%) [16].

Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση βιολογικών μορίων των οποίων η συγκέντρωση μεταβάλλεται στο χρόνο που μεσολαβεί μεταξύ της αιμοληψίας και της φυγοκέντρωσης, είτε λόγω καταβολισμού, π.χ. η γλυκόζη κατά τη διαδικασία της γλυκόλυσης, είτε λόγω βιοχημικής μετατροπής, όπως η κρεατινίνη σε κρεατίνη, είτε λόγω μετακίνησης από το εσωτερικό των κυττάρων του αίματος στο εξωκυττάριο υγρό (πλάσμα), όπως συμβαίνει για παράδειγμα με τα ιόντα καλίου, περίπου 4 ώρες μετά την αιμοληψία [16].

Οι συνθήκες φυγοκέντρωσης (διάρκεια και ταχύτητα), καθώς και τυχαία φαινόμενα, όπως για παράδειγμα η ετερογένεια των βιολογικών δειγμάτων (υγρών ή στερεών) αποτελούν επιπρόσθετες πηγές αβεβαιότητας σε προ-αναλυτικό στάδιο. Βέβαια, η μη ομοιογένεια του υλικού (π.χ. αίμα, ούρα, σίελος, ιστοί) αυξάνει λιγότερο την αβεβαιότητα της μέτρησης κάποιας παραμέτρου στην περίπτωση των υγρών υλικών, παρά στα στερεά υλικά (ιστοί).

Οποιαδήποτε προ-αναλυτική επεξεργασία του δείγματος (π.χ. αραιώση, εκχύλιση) αποτελεί επίσης πηγή αβεβαιότητας της τελικής μέτρησης.

Η κατάσταση του υπό μελέτη βιολογικού υλικού, δηλαδή εάν είναι λιπαιμικό, ικτερικό ή σε κάποιο βαθμό αιμολυμένο (φαινόμενα μήτρας-matrix) επιδρά στην τελική

εκτίμηση της αβεβαιότητας κάθε μετρούμενης ποσότητας. Στην περίπτωση του αιμολυμένου δείγματος σημειώνεται ψευδής αύξηση της συγκέντρωσης πολλών βιοχημικών παραμέτρων, όπως π.χ. κάλιο, μαγνήσιο, αλκαλική φωσφατάση, γλουταμινική πυροσταφυλική τρανσαμινάση (GPT), AST, γαλακτική δεϋδρογενάση (LDH) κ.α.

Μετά τον εντοπισμό των πηγών αβεβαιότητας πολύ δύσκολη είναι η διαδικασία της ποσοτικοποίησης των επιμέρους αβεβαιοτήτων. Σε ελάχιστες περιπτώσεις είναι εφικτό να πραγματοποιηθούν πειράματα προσομοίωσης τέτοιων φαινομένων σε εργαστηριακές συνθήκες, ούτως ώστε να επιτευχθεί η διεξοδική μελέτη της επίδρασής τους. Έτσι για παράδειγμα, με επαναλαμβανόμενη δειγματοληψία είναι δυνατόν να ποσοτικοποιηθεί η αβεβαιότητα λόγω της ετερογένειας του δείγματος [5]. Με πειράματα ανάκτησης, προσθέτοντας συγκεκριμένη ποσότητα ερυθρών αιμοσφαιρίων σε ορό ή πλάσμα έχει μελετηθεί η επίδραση διαφόρων βαθμών αιμόλυσης στην μέτρηση κάποιας παραμέτρου [2].

Επειδή σε ένα διαγνωστικό κέντρο είναι χρονοβόρες και δαπανηρές τέτοιου είδους μελέτες, προσπαθήσαμε να βελτιστοποιήσουμε κατά το δυνατόν τις συνθήκες δειγματοληψίας, μεταφοράς, φυγοκέντρισης, επεξεργασίας και φύλαξης όλων των βιολογικών υλικών, που διαχειριζόμαστε στο εργαστήριό μας. Έχοντας μελετήσει τις επίσημες οδηγίες του Διεθνούς Οργανισμού Υγείας (World Health Organization-WHO) [13], στις οποίες περιγράφεται ο χρόνος ζωής (σταθερότητα) σε συγκεκριμένη θερμοκρασία περιβάλλοντος των περισσοτέρων βιολογικών μορίων, που προσδιορίζουμε στην κλινική χημεία, συντάχθηκαν οδηγίες εργασίας, οι οποίες αφορούν στον χρόνο και στον τρόπο αιμοληψίας, στον επιτρεπτό μεταξύ αιμοληψίας και φυγοκέντρισης μεσολαμβάνοντα χρόνο, καθώς και στις συνθήκες συντήρησης των δειγμάτων πριν και μετά την αναλυτική διαδικασία.

ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑ

Η αναλυτική αβεβαιότητα εξαρτάται από την αναλυτική μέθοδο, δηλαδή την αβεβαιότητα του βαθμονομητή, τη σταθερότητα του αντιδραστηρίου και τη συμβολή του αυτόματου αναλυτή.

Σήμερα πλέον οι περισσότερες κατασκευάστριες εταιρείες και ιδιαίτερα οι πιο μεγάλες στο χώρο της κλινικής χημείας, δηλώνουν την αβεβαιότητα των βαθμονομητών σε ειδικά έντυπα. Σημαντικού βαθμού αβεβαιότητα συνεισφέρουν στη συνδυασμένη και διευρυμένη αβεβαιότητα της μέτρησης τα φαινόμενα μήτρας (matrix) μεταξύ του υλικού του βαθμονομητή και του δείγματος. Καταβάλλονται εντατικές προσπάθειες από τις κατασκευάστριες εταιρείες, ώστε οι βαθμονομητές να προέρχονται από υλικά που προσομοιάζουν τα βιολογικά υγρά. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα της χρήσης, στο κοντινό παρελθόν, υδατικών βαθμονομητών κατά τη μέτρηση ιόντων σε ορό ασθενών με τη μέθοδο της άμεσης ποτενσιομετρίας. Σήμερα πλέον, πολλές εταιρείες χρησιμοποιούν ορό βοός για την παρασκευή του βαθμονομητή κατά τον προσδιορισμό ιόντων.

Οι ανοσοχημικές δοκιμές στηρίζονται στην αντίδραση μεταξύ αντισώματος-αντιγόνου σε ένα περιβάλλον, το οποίο διαφοροποιείται σε κάθε προσδιορισμό. Η σχηματιζόμενη ποσότητα του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος προσδιορίζεται ποσοτικά και βρίσκεται σε ισορροπία με τις ελεύθερες ποσότητες αντιγόνου και αντισώματος. Στη δημιουργία του συμπλόκου αυτού εμπλέκονται ηλεκτροστατικές δυνάμεις, υδρόφοβοι δεσμοί, δεσμοί υδρογόνου και δυνάμεις van der Waals. Οι δυνάμεις αυτές επηρεάζονται από περιβαλλοντικές συνθήκες που αφορούν στο pH, στη θερμοκρασία, στην ιονική ισχύ, στη συγκέντρωση λιπιδίων και πρωτεϊνών, στη συγκέντρωση του απορρυπαντικού που χρησιμοποιείται στη μεθοδολογία και στα

προϊόντα μεταβολισμού από διασταυρούμενες αντιδράσεις. Είναι φανερό ότι οι συνθήκες αυτές δεν μπορεί να είναι πανομοιότυπες στις μετρήσεις που πραγματοποιούνται καθημερινά στα κλινικά εργαστήρια, τα οποία χρησιμοποιούν μεν τους βαθμονομητές των εταιρειών, αλλά και δείγματα ασθενών (ολικό αίμα, ορός, πλάσμα, ούρα), που διαφοροποιούνται μεταξύ τους ως προς την ιδιοσύστασή τους. Έτσι, εισάγουμε επιπρόσθετη αβεβαιότητα στην τελική μέτρηση [14].

Η σταθερότητα του αντιδραστηρίου αποτελεί μία επιπρόσθετη πηγή αβεβαιότητας, που συνεισφέρει στην αναλυτική διαδικασία. Οι κατασκευάστριες εταιρείες προσπαθούν να διασφαλίσουν βραχυπρόθεσμα τη σταθερότητα των αντιδραστηρίων τους, αλλά και μακροπρόθεσμα, κατά την αλλαγή του χαρακτηριστικού κωδικού της παρτίδας (lot number). Συγκεκριμένα, ελέγχεται η αναλυτική επαναληψιμότητα των μετρήσεων και η ανάκτηση, χρησιμοποιώντας διάλυμα ελέγχου ή σταθερό μείγμα ορού, καλύπτοντας τουλάχιστον τρεις διαφορετικές παρτίδες αντιδραστηρίου [14].

Τέλος, ο αυτόματος αναλυτής και η κατάσταση συντήρησής του συνεισφέρουν στην αναλυτική αβεβαιότητα του προσδιορισμού των παραμέτρων. Έτσι, οι βραχίονες ογκομέτρησης και διανομής δείγματος/αντιδραστηρίου, η μονάδα ανίχνευσης, και η θερμοκρασία αντίδρασης αποτελούν σημαντικές πηγές αβεβαιότητας. Η συμβολή της αβεβαιότητας από τον αναλυτή πρέπει να εκτιμηθεί σε μακροπρόθεσμη μελέτη ενός διαλύματος ελέγχου ή σταθερό μείγμα δειγμάτων, καλύπτοντας όλες τις δυνατές καταστάσεις συντήρησης του αυτόματου αναλυτή. Φυσικά ελέγχεται και βραχυπρόθεσμα η αναλυτική επαναληψιμότητα των μετρήσεων.

Στις περιπτώσεις που οι μετρήσεις γίνονται με μη αυτοματοποιημένη μέθοδο, σημαντική πηγή αβεβαιότητας αποτελεί ο εκτελεστής / πειραματιστής των δοκιμών. Με επαναλαμβανόμενα πειράματα εκτιμάται η αναπαραγωγιμότητα των μετρήσεων.

Κατά τη διαδικασία της διαπίστευσης κατά ISO 17025, στο εργαστήριό μας, εκτιμήσαμε τη συνδυασμένη και διευρυμένη αβεβαιότητα 113 δοκιμών κλινικής χημείας. Για την εκτίμηση της αβεβαιότητας τύπου A πραγματοποιήθηκαν μεταξύ ημερών (between days) 10 μετρήσεις διαλυμάτων ελέγχου (controls) από εταιρεία ανεξάρτητη εκείνης του προς διαπίστευση αυτόματου αναλυτή, προκειμένου να υπολογιστεί η τυπική αβεβαιότητα, λόγω ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας. Για τον έλεγχο της αναλυτικής επαναληψιμότητας πραγματοποιήθηκαν στη διάρκεια της ίδιας ημέρας (within day) 10 μετρήσεις διαλυμάτων ελέγχου. Για τις μετρήσεις μας χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα ελέγχου δύο και τριών επιπέδων συγκέντρωσης, προκειμένου να εκτιμηθεί η αβεβαιότητα των παραμέτρων στις συνήθεις συγκεντρώσεις (εντός των ορίων των τιμών αναφοράς), αλλά και σε παθολογικές περιοχές (χαμηλές και υψηλές συγκεντρώσεις).

Με τη χρήση διαλυμάτων ελέγχου, που προσομοιάζουν, όσο είναι εφικτό, τα ανθρώπινα υγρά, εξασφαλίζεται η απουσία μη επιθυμητών παραγόντων από το πειραματικό μας υλικό, ώστε να εκτιμηθεί αποκλειστικά η αναλυτική αβεβαιότητα της μεθόδου. Επιπλέον, στα εμπορικά διαθέσιμα διαλύματα ελέγχου είναι εύκολη η ανεύρεση σκευασμάτων με υψηλές και χαμηλές συγκεντρώσεις πολλών κλινικών παραμέτρων. Από την άλλη πλευρά όμως, το μειονέκτημα της χρήσης του συγκεκριμένου πειραματικού υλικού είναι ότι όσο και αν προσπαθούν οι κατασκευάστριες εταιρείες, τα διαλύματα ελέγχου δεν έχουν ακριβώς την ίδια συμπεριφορά με τα ανθρώπινα υλικά.

Για την εκτίμηση της αβεβαιότητας τύπου B συνυπολογίστηκαν οι πληροφορίες που δόθηκαν: α) από τα πιστοποιητικά διακρίβωσης των ογκομετρικών συσκευών (γυάλινα ογκομετρικά σιφόνια, αυτόματες πιπέτες), που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανασύσταση των λυοφιλωμένων σκευασμάτων και β) από τις κατασκευάστριες εταιρείες για τις αβεβαιότητες των βαθμονομητών στις ήδη επικυρωμένες μεθόδους ανάλυσης.

Τέλος, έχοντας εκτιμήσει τις τυπικές αβεβαιότητες τύπου A και B, εύκολα προβήκαμε στην εκτίμηση της συνδυασμένης και διευρυμένης τυπικής αβεβαιότητας.

Κατά τη διαπίστευση του εργαστηρίου μας ασχοληθήκαμε με την επαλήθευση ήδη επικυρωμένων μεθόδων μέτρησης. Έτσι, δεν χρειάστηκε η εκτίμηση της αβεβαιότητας από την καμπύλη βαθμονόμησης ή από τη σύγκριση των υπό μελέτη μεθόδων με τις αντίστοιχες πρότυπες μεθόδους αναφοράς.

Τέλος, η αναπαραγωγικότητα των μετρήσεων δεν είχε νόημα να ελεγχθεί με τη μέθοδο αλλαγής του πειραματιστή, αφού διαπιστεύθηκαν δοκιμές, που εκτελούνται σε αυτόματους αναλυτές. Έτσι, η επίδραση του εκάστοτε χειριστή είναι αμελητέα, με την προϋπόθεση βέβαια ότι όλο το εμπλεκόμενο προσωπικό έχει εκπαιδευτεί άριστα από τις αντίστοιχες κατασκευάστριες εταιρείες των αυτόματων αναλυτών.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗΣ ΔΟΚΙΜΩΝ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ

Για τον έλεγχο της πιστότητας των προς επαλήθευση παραμέτρων πραγματοποιήθηκαν μεταξύ ημερών (between days) και στη διάρκεια της ίδιας ημέρας (within day) δέκα μετρήσεις διαλυμάτων ελέγχου δύο και τριών επιπέδων. Στις βιοχημικές δοκιμές ελέγχθηκαν δύο επίπεδα, ενώ στις ανοσοχημικές και αιματολογικές χρησιμοποιήθηκαν τρία επίπεδα. Από τις μετρήσεις αυτές υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση (SD) και ο συντελεστής μεταβλητότητας (%CV).

Επειδή όλες οι μέθοδοι έχουν επικυρωθεί από τις αντίστοιχες κατασκευάστριες εταιρείες, προχωρήσαμε στη σύγκριση των βιβλιογραφικών πληροφοριών για την προτεινόμενη αναλυτική επαναληψιμότητα (within day μετρήσεις) και αναπαραγωγικότητα (between days μετρήσεις) σε σχέση με αυτήν που ενδοεργαστηριακά προέκυψε.

ΟΡΘΟΤΗΤΑ

Εκτελέστηκαν μεταξύ 10 διαδοχικών ημερών (between days) και στη διάρκεια της ίδιας ημέρας (within day) 10 μετρήσεις διαλυμάτων ελέγχου δύο και τριών επιπέδων. Υπολογίστηκε η % ανάκτηση των συγκεντρώσεων/παραμέτρων των διαλυμάτων και συγκρίθηκε με τα παρεχόμενα από τις παρασκευάστριες εταιρείες, βιβλιογραφικά δεδομένα. Για να είναι αποδεκτή η ορθότητα της μεθόδου θα πρέπει το ποσοστό της ανάκτησης να συμφωνεί με την αντίστοιχη τιμή που παρέχεται από την βιβλιογραφία, ή να ικανοποιείται η σχέση:

$$|\bar{x} - \mu| < 2 \cdot SD \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow \mu - 2 \cdot SD < \bar{x} < \mu + 2 \cdot SD$$

όπου: \bar{x} = η πειραματική μέση τιμή των μετρήσεων του υλικού αναφοράς,
 μ = η αποδεκτή μέση τιμή της υπό εξέτασης παραμέτρου για το υλικό αναφοράς,
SD = η τυπική απόκλιση των μέσων όρων των μετρήσεων όλων των εργαστηρίων, που συμμετείχαν στην διεργαστηριακή εξέταση για τον προσδιορισμό της τιμής του υλικού αναφοράς.

Για την περίπτωση εταιρειών που δεν δίνουν πληροφορίες για την αποδεκτή ανάκτηση των διαλυμάτων ελέγχου τους, υπολογίστηκε το z-score των μετρήσεων.

$$z\text{-score} = (\text{Result}-\text{Target})/SD_{\text{control}}$$

Για τις παραμέτρους εκείνες για τις οποίες δεν υπάρχουν στην αγορά διαθέσιμα διαλύματα ελέγχου, η ορθότητα ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας διάλυμα ελέγχου υψηλής συγκέντρωσης της κατασκευάστριας εταιρείας, το οποίο αραιώθηκε με κατάλληλο διαλύτη και ακολούθως διενεργήθηκε πείραμα ανάκτησης.

ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΟΡΙΟ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ

Για τις βιοχημικές κλινικές δοκιμές των οποίων η καμπύλη βαθμονόμησης είναι γραμμική, χρησιμοποιήθηκε ως πειραματικό υλικό αραιωμένος ορός ελέγχου της εταιρείας και εκτελέστηκαν 15 μετρήσεις μεταξύ διαδοχικών ημερών (between days). Υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση (SD) των μετρήσεων και το όριο ανίχνευσης (LOD) από τον μαθηματικό τύπο $LOD=3 \cdot SD$

Για τις αναλύσεις που οι καμπύλες αναφοράς τους δεν είναι γραμμικές (ανοσοχημικές) πραγματοποιήθηκαν 10 μετρήσεις των παρεχομένων βαθμονομητών, στα χαμηλότερα διαθέσιμα επίπεδα συγκεντρώσεων και υπολογίστηκε η μέση τιμή \bar{x} και η τυπική απόκλιση SD ανά επίπεδο. Στη συνέχεια τα αποτελέσματα τοποθετήθηκαν σε διάγραμμα δύο αξόνων στο οποίο ο άξονας xx' εμφάνιζε τιμές συγκεντρώσεων και ο άξονας yy' τιμές τυπικής απόκλισης. Υπολογίστηκε με τη βοήθεια της μεθόδου ελαχίστων τετραγώνων εξίσωση γραμμικής καμπύλης της μορφής $Y=aX+\beta$ και προσδιορίστηκε η τιμή της τυπικής απόκλισης για μηδενική συγκέντρωση ($Y=\beta$). Το όριο ανίχνευσης προκύπτει από την εξίσωση $LOD=3 \cdot SD$.

Το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) προκύπτει από τον μαθηματικό τύπο $LOQ=10 \cdot SD$.

Ένας άλλος τρόπος προσδιορισμού του ορίου ανίχνευσης των κλινικών δοκιμών είναι η αραιώση ορού ασθενούς, καλά συντηρημένου, με βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης, σε τέτοιο βαθμό, ώστε ο συντελεστής μεταβλητότητας (%CV) είκοσι μετρήσεων, που πραγματοποιούνται την ίδια ημέρα (within day), να είναι μεγαλύτερος της τιμής 20. Η συγκέντρωση αυτή του αραιωμένου ορού αντιστοιχεί στη μικρότερη ποσότητα που μπορεί να διακρίνει η μέθοδος από το μηδέν (LOD) [15].

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Ο έλεγχος ποιότητας αποσκοπεί στη διασφάλιση της σταθερότητας των αποτελεσμάτων από μέρα σε μέρα, καθώς και στη συμμόρφωσή τους με καθορισμένα κριτήρια. Συγκεκριμένα:

Σε καθημερινή βάση όλες οι αναλύσεις ελέγχονται με όλα τα διαθέσιμα (από την εταιρεία) επίπεδα των διαλυμάτων ελέγχου (ημερήσιος έλεγχος ποιότητας).

Στη συνέχεια, το εργαστήριο, μία ή δύο φορές το μήνα, συμμετέχει σε ειδικά προγράμματα διεργαστηριακού ελέγχου ποιότητας. Έτσι, ελέγχονται οι τάσεις όλων των αναλύσεων, μακροπρόθεσμα.

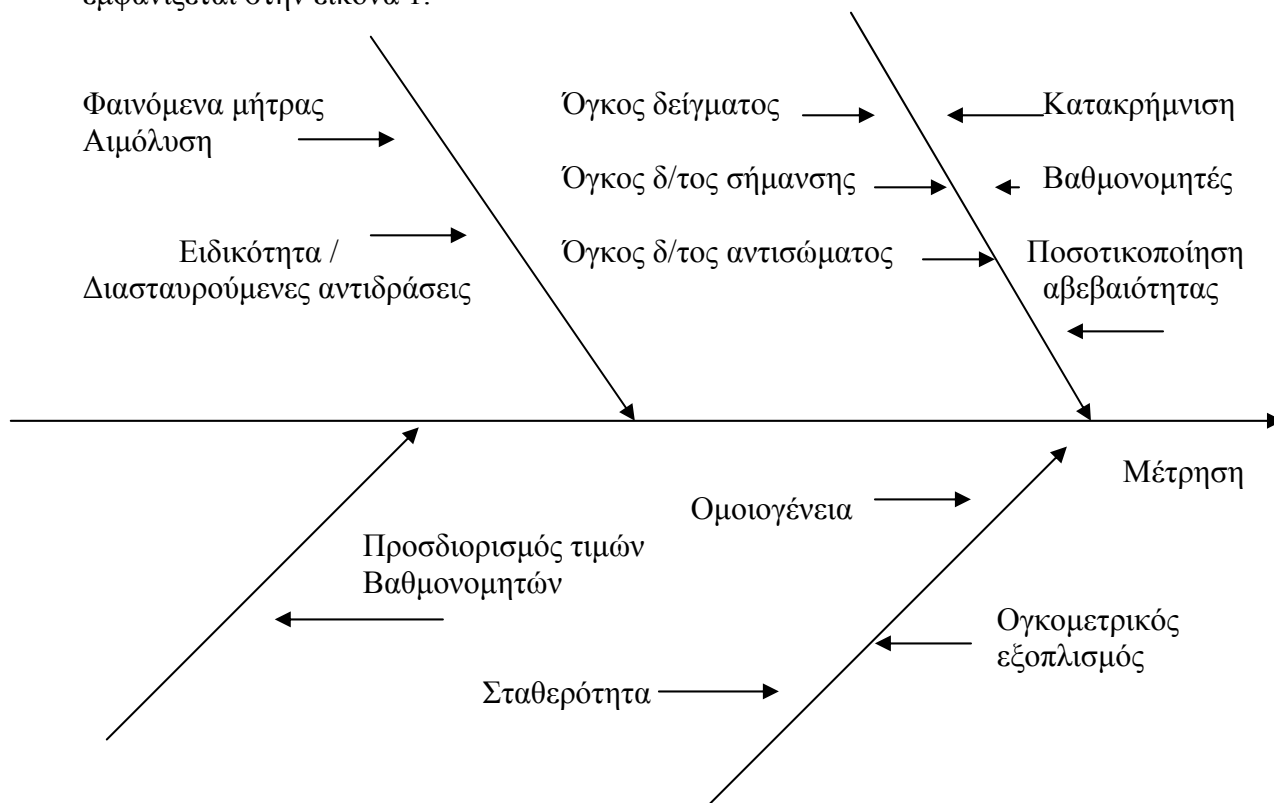
Συμπληρωματικά στοιχεία για την αξιοπιστία των κλινικών δοκιμών συλλέγονται με μετρήσεις ουδέτερου διαλύματος ελέγχου ανεξάρτητης εταιρείας, οι οποίες διεξάγονται μία φορά την εβδομάδα (εβδομαδιαίος έλεγχος ποιότητας).

Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από τις μετρήσεις των διαλυμάτων ελέγχου παρακολουθούνται στατιστικά με τη βοήθεια διαγραμμάτων ελέγχου (όπως διαγράμματα μέσης τιμής Levey-Jennings, αθροιστικά διαγράμματα Cusum και δίδυμα διαγράμματα Youden). Με όλους αυτούς τους τρόπους ελέγχονται οι τάσεις του εργαστηρίου βραχυπρόθεσμα και μακροπρόθεσμα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Είναι φανερό ότι στα εργαστήρια κλινικών δοκιμών κατά την εκτίμηση της συνδυασμένης αβεβαιότητας της μέτρησης, που δίδεται προς αξιολόγηση στους κλινικούς ιατρούς, συνεκτιμάται η αβεβαιότητα που προέρχεται από τον προσδιορισμό των τιμών των βαθμονομητών και την αναλυτική μέθοδο. Αν οι κανόνες που αφορούν στη συλλογή και διαχείριση του δείγματος, καθώς και στην αναλυτική διαδικασία τηρηθούν αυστηρά, οι κυριότεροι παράγοντες για την εκτίμηση της αβεβαιότητας των κλινικών δοκιμών είναι η βιολογική μεταβλητότητα και η αναλυτική επαναληψιμότητα.

Έχει μεγάλη σημασία η λεπτομερής ταυτοποίηση όλων των πηγών αβεβαιότητας σε προ-αναλυτικό και αναλυτικό στάδιο. Το διάγραμμα που αντιπροσωπευτικά χαρακτηρίζει το στάδιο της ταυτοποίησης καλείται «ψαροκόκκαλο» (fish-bone) [5] και εμφανίζεται στην εικόνα 1.



Εικόνα 1. Διάγραμμα «ψαροκόκκαλο» (fish-bone) για τον προσδιορισμό των παραγόντων που συνεισφέρουν στη συνδυασμένη αβεβαιότητα μέτρησης στην κλινική χημεία.

Το δυσκολότερο σημείο της όλης διαδικασίας είναι η ποσοτικοποίηση όλων των πηγών αβεβαιότητας που συνεισφέρουν στη διακύμανση της αληθούς τιμής. Δυστυχώς στο πεδίο της κλινικής χημείας είναι πολλοί οι παράγοντες των οποίων η αβεβαιότητα δεν

μπορεί να ποσοτικοποιηθεί. Πιο έντονα εμφανίζεται το φαινόμενο αυτό στην προ-αναλυτική φάση. Αυτός είναι και ο λόγος άλλωστε που χρησιμοποιούμε τον όρο «εκτίμηση» και όχι «προσδιορισμό» της αβεβαιότητας.

Η έννοια της αβεβαιότητας της μέτρησης είναι πολύ καινούργια στον χώρο της κλινικής χημείας. Είναι σημαντική λοιπόν η ενημέρωση πρώτα των κλινικών χημικών και στη συνέχεια των κλινικών ιατρών, με σκοπό τη σωστή αξιολόγηση και εκτίμηση της πληροφορίας αυτής στη διάγνωση ασθενειών και την προτεινόμενη θεραπευτική αγωγή. Η χρησιμότητα της αβεβαιότητας πρέπει να περάσει από την θεωρία στην πράξη. Είναι φανερό άλλωστε ότι ένα κλινικό εργαστήριο πρέπει να μάθει να ζει με την αβεβαιότητα και όχι στην αβεβαιότητα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Εκτίμηση αβεβαιότητας στις χημικές μετρήσεις, Ν.Σ. Θωμαΐδης.
- [2] J. Kristiansen and J.M. Christensen, *Ann. Clin. Biochem.*, No. 35, 1998.
- [3] Εκτίμηση διαγνωστικής αξίας εργαστηριακών ευρημάτων. Α. Διονυσίου-Αστερίου
- [4] J. Kristiansen, *Clin. Chem.* 49, No. 11, 2003.
- [5] J. Kristiansen, *Clin. Chem. Lab Med.*, No. 39 (10), 2001.
- [6] ISO Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, Geneva, Switzerland, 1993.
- [7] EURACHEM/CITAC Guide, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 2nd edition, 2000.
- [8] J. Kristiansen, J.M. Christensen and J.L. Nielsen, *Mikrochim. Acta*, No 123, 1996
- [9] M. Patriarca, M. Castelli, F. Corsetti and A. Menditto, *Clin. Chem.*, No 50, 2004
- [10] A. Kallner, J. Waldenstrom, *Clin. Chem. Lab. Med.*, No 37, 1999
- [11] Οδηγός Προαναλυτικών παραγόντων που επηρεάζουν τις τιμές των Εργαστηριακών εξετάσεων, Δρ. Ευάγγελος Δ. Βογιατζάκης
- [12] B.B. Jacobsen, B. Petersen and H. Andersen, *Acta Endocrinol.*, 1977
- [13] Use of Anticoagulants in diagnostic laboratory investigations, WHO, 2002
- [14] Standards, Standardization, Feasibility in Heterogeneous Immunoassays from Roche Diagnostics, C. Berding, T. Ciesiolka, B. Zawta, 2003
- [15] Compendium of analytical nomenclature definitive rules, IUPAC, 1987, p. 114- 7
- [16] A manual of laboratory and diagnostic tests, Frances Talaska Fiscbach, p. 39
- [17] Ricos C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario JV Hernandez A, Jimenez CV, Minchinela J, Perich C, Simon M., *Scand. J. Clin. Lab Inest.*, No 59, 1999
- [18] Στόχοι ποιότητας στην κλινική χημεία, Σ. Μητρόπουλος