

«ΔΗΛΩΣΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ»

Δρ. Ειρήνη Α. Λεϊμονή και Ελένη Ν. Τράπαλη
EUROMEDICA A.E., Κεντρικά Εργαστήρια, Ευριπίδου 4, Αγία Παρασκευή
ileimoni@euromedica.gr

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η διασφάλιση ποιότητας των εργαστηριακών διαδικασιών είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την εξαγωγή αξιόπιστων αριθμητικών αποτελεσμάτων, που θα βοηθήσουν τον ιατρό στην εκτέλεση του έργου του. Στη διαδικασία της διαπίστευσης των Κλινικών Εργαστηρίων κατά ISO 15189 η επικύρωση/επαλήθευση των αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται και η εκτίμηση της συνδυασμένης και διευρυμένης αβεβαιότητας των μετρήσεων αποτελούν αναγκαίες ενέργειες συμμόρφωσης προς τις απαιτήσεις του ανωτέρω προτύπου. Στον τομέα της Κλινικής Χημείας η διαδικασία της επικύρωσης των δοκιμών, που διενεργούνται, κυρίως, σε αυτοματοποιημένους αναλυτές, πραγματοποιείται από τις ίδιες τις κατασκευάστριες εταιρείες των αντιδραστηρίων. Συνεπώς, στο εργαστήριο μένει να επαληθεύσει αυτές τις αναλυτικές μεθόδους στο δικό του χώρο. Στην Κλινική Χημεία κατά τη διαδικασία της διερεύνησης των πηγών αβεβαιότητας μίας συγκεκριμένης παραμέτρου αναζητούνται παράγοντες που επηρεάζουν τόσο σε προαναλυτικό, όσο και σε αναλυτικό στάδιο. Το in vivo δείγμα, που αποτελεί το αντικείμενο μελέτης στο Κλινικό Εργαστήριο, παρουσιάζει διακυμάνσεις φυσιολογικών παραμέτρων και χαρακτηρίζεται από διαφορές σε εργαστηριακές μετρήσεις (CV), οι οποίες δεν σχετίζονται με προ-αναλυτική ή αναλυτική μεταβλητότητα. Οι διακυμάνσεις αυτές αποτελούν τη «βιολογική μεταβλητότητα», η οποία διακρίνεται σε ενδοατομική και δια-ατομική.

Μετά την επικύρωση/επαλήθευση των αναλυτικών μεθόδων και την εκτίμηση της συνδυασμένης και διευρυμένης αβεβαιότητας των μετρήσεων είναι πολύ σημαντικό το εργαστήριο να γνωρίζει τις επιθυμητές προδιαγραφές, ώστε να δηλώσει την καταλληλότητα ή μη, των αναλύσεων που ελέγχθηκαν. Κριτήρια της καταλληλότητας μίας μεθόδου αποτελούν τα δεδομένα επικύρωσης από την κατασκευάστρια εταιρεία των αντιδραστηρίων, το πιστοποιητικό των διαλυμάτων ελέγχου (controls), τα οποία, πιθανά, χρησιμοποιήθηκαν ως πειραματικό υλικό κατά τη διαδικασία της επικύρωσης/επαλήθευσης των δοκιμών, διεργαστηριακά προγράμματα ελέγχου και βιβλιογραφικά δεδομένα. Ένα από τα πλέον έγκυρα, αυτή τη στιγμή, δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία αποτελεί ο πίνακας με την ποσοτική εκτίμηση της ενδο-ατομικής και δια-ατομικής βιολογικής διακύμανσης των εργαστηριακών εξετάσεων ρουτίνας, που συνέταξαν η Dr. Cameron Ricos και οι συνεργάτες της από την Ισπανική Εταιρεία Κλινικής Χημείας.

Στη διαδικασία διαπίστευσης του εργαστηρίου μας κατά ISO 15189 ελέγχθηκε η καταλληλότητα 145 αναλυτικών μεθόδων κλινικής χημείας, χρησιμοποιώντας ως γνώμονα όλα τα παραπάνω κριτήρια.

Λέξεις-Κλειδιά: επικύρωση 1, αβεβαιότητα 2, κλινικές δοκιμές 1, βιολογική μεταβλητότητα 2, δήλωση καταλληλότητας 3.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στον τομέα της Κλινικής Χημείας η διαδικασία της επικύρωσης των αναλυτικών μεθόδων, που διενεργούνται στους αυτοματοποιημένους αναλυτές κυρίως, πραγματοποιείται από τις ίδιες τις κατασκευάστριες εταιρείες των αντιδραστηρίων. Συνεπώς, στο εργαστήριο μένει να επαληθεύσει τις μεθόδους αυτές, δηλαδή να ελέγξει αν είναι αξιόπιστες ή σύμφωνες με τις «προδιαγραφές» της εταιρείας στον δικό τους χώρο. Αυτές τις πληροφορίες ζητά και ο φορέας της Διαπίστευσης από τα υποψήφια κλινικά εργαστήρια. Συγκεκριμένα, ο φορέας της Διαπίστευσης ελέγχει κατ' αρχήν την Πιστότητα (Precision) μίας μεθόδου, όπως αυτή εκφράζεται από την επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητά της. Επιπρόσθετα, ελέγχει την Ακρίβεια (Accuracy) της μεθόδου, όπως αυτή ευρίσκεται από την ανάλυση δειγμάτων ελέγχου (controls) ή την ανάκτηση (recovery) από ενίσχυση δειγμάτων (spiking). Τέλος, ζητά τους υπολογισμούς των ορίων ανίχνευσης (Limit of Detection) και ποσοτικοποίησης (Limit of Quantitation) για κάθε παράμετρο, που θα διαπιστευθεί.

ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ (PRECISION)

Η πιστότητα είναι το πλέον χρησιμοποιούμενο (και μερικές φορές το αποκλειστικό) χαρακτηριστικό ποιότητας μίας αναλυτικής μεθόδου.

Ως μέτρο της πιστότητας χρησιμοποιείται η τυπική απόκλιση (SD), καθώς και η σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation, RSD) ή συντελεστής μεταβλητότητας ή διακύμανσης (coefficient of variation, CV), που είναι καθαρός αριθμός:

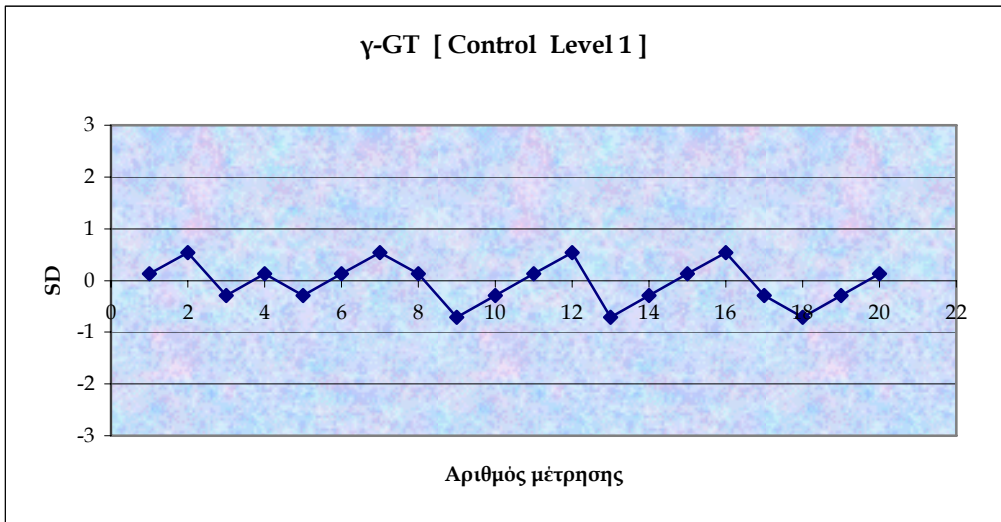
$$\%RSD = CV = 100 \times \frac{SD}{\bar{x}}$$

Η πιστότητα σχετίζεται και με τον όρο **uncertainty (αβεβαιότητα)**, που χαρακτηρίζει τη διασπορά των τιμών που μπορούν λογικά να αποδοθούν στο προσδιοριζόμενο συστατικό.

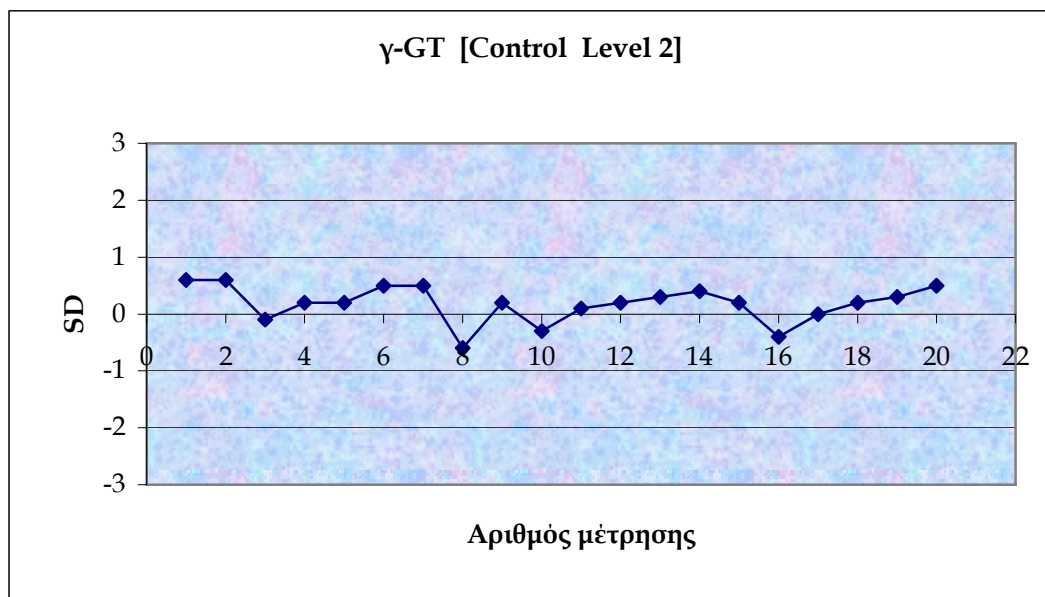
Στην πράξη, για τον έλεγχο της πιστότητας των προς επαλήθευση αναλυτικών μεθόδων στο κλινικό εργαστήριο πραγματοποιούνται μεταξύ ημερών (between days) και στη διάρκεια της ίδιας ημέρας (within day) δέκα μετρήσεις διαλυμάτων ελέγχου ή μείγματος (pool) ορών ή γενικότερα βιολογικών υγρών ασθενών δύο και τριών επιπέδων. Από τις μετρήσεις αυτές υπολογίζεται η τυπική απόκλιση (SD) και ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV).

Ένας άλλος τρόπος ελέγχου της πιστότητας μίας αναλυτικής μεθόδου μπορεί να βασιστεί στα αποτελέσματα του συστήματος ελέγχου ποιότητας, που καθημερινά λειτουργεί σε ένα κλινικό εργαστήριο. Κάθε ημέρα αναλύονται συνήθως δύο οροί ελέγχου διαφορετικών επιπέδων (εντός και εκτός των ορίων αναφοράς) και οι λαμβανόμενες τιμές αποτυπώνονται σε διαγράμματα Levey-Jennings (Σχήμα 1 και 2).

Η επίδοση κάθε αναλυτικής μεθόδου περιγράφεται από τα αποτελέσματα της επαλήθευσής της στο χώρο του εργαστηρίου.



Σχήμα 1. Διάγραμμα Levey-Jennings του διαλύματος ελέγχου, χαμηλού επιπέδου για την ανάλυση γ-GT.



Σχήμα 2. Διάγραμμα Levey-Jennings του διαλύματος ελέγχου, υψηλού επιπέδου για την ανάλυση γ-GT.

ΑΚΡΙΒΕΙΑ (ACCURACY)

Η έννοια της ακρίβειας είναι ένα από τα πλέον δύσκολα θέματα και αυτό γιατί δεν είναι μόνον ο ορισμός ασαφής και δύσκολος στην ερμηνεία του, αλλά επίσης το θεωρητικό υπόβαθρο των μεθόδων για τον υπολογισμό της ακρίβειας είναι πολύπλοκο, ασαφές και όχι γενικά αποδεκτό. Ένας από τους ορισμούς της ακρίβειας είναι ο εξής:

« Η ακρίβεια αναφέρεται στη διαφορά (σφάλμα, error ή bias) μεταξύ του μέσου όρου \bar{x} (mean), μιας σειράς μετρήσεων και της αληθούς τιμής μ , (true/correct) της μετρούμενης ποσότητας».

Το σφάλμα μίας μέτρησης έχει δύο συνιστώσες:

A) το τυχαίο σφάλμα ($x_i - \bar{x}$) (random error), όπου x_i μεμονωμένη μέτρηση και

B) το συστηματικό σφάλμα ($\bar{x} - \mu$) (bias).

Στο κλινικό εργαστήριο χρησιμοποιούνται συνήθως επικυρωμένες μέθοδοι από την κατασκευάστρια εταιρεία. Θεωρητικά, δεν πρέπει να υπάρχει συστηματικό σφάλμα, ωστόσο ένα μικρό συστηματικό σφάλμα είναι συνήθως αποδεκτό.

Ελλείψει συστηματικού σφάλματος, η ακρίβεια της μεθόδου εκφράζεται μόνο από το τυχαίο σφάλμα, δηλαδή τον συντελεστή διακύμανσης CV (Πιστότητα). Παρουσία συστηματικού σφάλματος, δηλαδή ($\bar{x} - \mu$) \gg SD, το σφάλμα αποδίδει το μέτρο της Ορθότητας (Trueness) της μεθόδου.

Έτσι, το ($\bar{x} - \mu$) εκφράζει την ορθότητα της μεθόδου και το ($x_i - \mu$) την ακρίβεια.

Δηλαδή:

$$\boxed{\text{Σφάλμα μετρήσεως} = \text{συστηματικό σφάλμα} + \text{τυχαίο σφάλμα}}$$

$$(x_i - \mu) = (\bar{x} - \mu) + (x_i - \bar{x})$$

$$\boxed{\text{ΑΚΡΙΒΕΙΑ} = \text{ΟΡΘΟΤΗΤΑ} + \text{ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ}}$$

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω στοιχεία, η ορθότητα αναφέρεται στη μέθοδο και στο μέσο όρο σειράς μετρήσεων και όχι σε μία μεμονωμένη μέτρηση ή προσδιορισμό. Είναι επίσης προφανές ότι, εάν γίνει ικανοποιητικός αριθμός μετρήσεων/προσδιορισμών, το τυχαίο σφάλμα εξαλείφεται και η ακρίβεια συμπίπτει με την ορθότητα. Τέλος, εάν σε μία μέθοδο δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα, η έννοια της ακρίβειας εκφράζεται από την πιστότητα.

Σήμερα ο όρος αξιοπιστία και αξιόπιστη μέθοδος δεν χρησιμοποιείται μόνο για να συνδυάσει τους όρους ακρίβεια και πιστότητα, αλλά για να εκφράσει και άλλα χαρακτηριστικά ποιότητας (ειδικότητα κ.λπ.) έτσι, ώστε με τον όρο αξιόπιστη να υπονοείται μία μέθοδος κατάλληλη για τον σκοπό αυτό.

Αν και η ακρίβεια δεν μπορεί να ποσοτικοποιηθεί, παρά μόνο με πολύπλοκους υπολογισμούς, είναι δυνατόν να μετρηθούν κάποιες ιδιότητες που σχετίζονται με την ιδέα της ακρίβειας. Στην ανάλυση συχνά η μόνη απαίτηση για ένα αποτέλεσμα είναι να είναι συγκρίσιμο με άλλα αποτελέσματα. Έτσι, κατά κανόνα τα αποτελέσματα μίας ανάλυσης συγκρίνονται με τα αποτελέσματα που λαμβάνονται

από την ανάλυση προτύπων (standards) ή υλικών αναφοράς (reference materials), δηλαδή υλικών με γνωστές ή αποδεκτές συγκεντρώσεις.

Με την ακρίβεια της αναλυτικής μεθόδου σχετίζεται και η έννοια της **ανάκτησης (recovery)**, η οποία υπολογίζεται με την εφαρμογή της μεθόδου σε εμβολιασμένο (spiked), λευκό ή θετικό δείγμα. Η ανάκτηση υπολογίζεται ως το % κλάσμα $[\Delta C_{\text{ευρεθέν}}/\Delta C_{\text{προστεθέν}}]$.

Στα κλινικά εργαστήρια για τον προσδιορισμό της ανάκτησης γίνεται ανάμειξη σε ίσες ποσότητες (1:1) ενός δείγματος γνωστής συγκέντρωσης (C_0) ως προς μία παράμετρο με βαθμονομητή υψηλής συγκέντρωσης (C_{ST}) της παραμέτρου αυτής. Στη συνέχεια πραγματοποιείται μέτρηση της συγκέντρωσης ($C_{\text{τελ}}$) της παραμέτρου στο προκύψαν δείγμα. Η ανάκτηση υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\text{Ανάκτηση} = \frac{C_{\text{τελ.}} - [C_0 / 2]}{[C_{\text{st}}/2]}$$

Άλλος τρόπος εκτίμησης της ακρίβειας των αναλυτικών μεθόδων που εφαρμόζονται σε ένα κλινικό εργαστήριο είναι ο εξής:

Εκτελούνται μεταξύ 10 διαδοχικών ημερών και στη διάρκεια της ίδιας ημέρας 10 μετρήσεις διαλυμάτων ελέγχου (π.χ. ορός ή ούρα) δύο και τριών επιπέδων με γνωστή τιμή – στόχο (μ) και SD. Υπολογίζεται η ανάκτηση με τον μαθηματικό τύπο:

$$\text{Ανάκτηση} = \frac{\bar{x}}{\mu} \times 100$$

Όπου \bar{x} ο μέσος όρος των μετρήσεων.

Για να είναι αποδεκτή η ακρίβεια της αναλυτικής μεθόδου πρέπει να ισχύει:

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

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

Ως παράδειγμα αναφέρεται ο έλεγχος της ακρίβειας μεθόδου προσδιορισμού προγεστερόνης. Ως πειραματικό υλικό χρησιμοποιείται διάλυμα ελέγχου τριών επιπέδων συγκέντρωσης, διαφορετικής εταιρείας από την κατασκευάστρια. Πραγματοποιούνται 10 μετρήσεις, τόσο στη διάρκεια της ίδιας ημέρας, όσο και μεταξύ 10 διαδοχικών ημερών. Για το μεσαίο επίπεδο συγκέντρωσης υπολογίζονται οι παράμετροι:

\bar{x} :	7,091 ng/ml
μ :	7,3 ng/ml
% ανάκτηση:	97,14
SD <small>διαλύματος ελέγχου</small> :	0,88
z-score:	-0,2

Μία αναλυτική μέθοδος κρίνεται αποδεκτή όταν $|z| \leq 2$. Επομένως η ανωτέρω μέθοδος είναι αποδεκτή.

ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΟΡΙΟ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ

Το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection) ή Αναλυτική ευαισθησία (Analytical Sensitivity) μιας μεθόδου είναι η ελαχίστη συγκέντρωση μιας παραμέτρου που μπορεί να ανιχνευθεί «αξιόπιστα» από τη μέθοδο αυτή. Ή αλλιώς μπορούμε να ορίσουμε ότι το όριο ανίχνευσης ενός συστατικού με μία μέθοδο είναι η συγκέντρωση για την οποία η απόκριση της μεθόδου διαφέρει από την απόκριση του τυφλού κατά το τριπλάσιο της τυπικής απόκλισης του μέσου όρου του τυφλού.

Το όριο ποσοτικοποίησης (Limit of Quantitation) ή Λειτουργική ευαισθησία (Functional Sensitivity) είναι η ελαχίστη συγκέντρωση της μετρούμενης παραμέτρου, που μπορεί να ποσοτικοποιηθεί (να προσδιορισθεί ποσοτικά) με αποδεκτή ακρίβεια και επαναληψιμότητα.

Συγκεκριμένα, για τις ανοσοχημικές μεθόδους, αραιώνεται ορός ασθενούς με βαθμονομητή μηδενικής συγκέντρωσης ή κατάλληλο αραιωτικό, σε τέτοιο βαθμό, ώστε ο συντελεστής διακύμανσης (CV), ο οποίος προκύπτει από είκοσι μετρήσεις, που πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια της ίδιας ημέρας να είναι ίσος με την τιμή 20.

Στην πράξη, για τον προσδιορισμό του Ορίου Ανίχνευσης των βιοχημικών κλινικών δοκιμών, των οποίων η καμπύλη βαθμονόμησης είναι γραμμική, χρησιμοποιείται ως πειραματικό υλικό αραιωμένος ορός ελέγχου χαμηλής συγκέντρωσης και εκτελούνται τουλάχιστον 15 μετρήσεις μεταξύ διαδοχικών ημερών. Υπολογίζεται η τυπική απόκλιση των μετρήσεων και το όριο ανίχνευσης (LOD) από τον μαθηματικό τύπο:

$$(LOD)=3 \cdot SD, \text{ για επίπεδο εμπιστοσύνης } 99,87\% \text{ ή}$$

$$(LOD)=2 \cdot SD, \text{ για επίπεδο εμπιστοσύνης } 95\%.$$

Το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ)

δίδεται από τον τύπο:

$$LOQ=10 \cdot SD$$

Έτσι, για τον υπολογισμό του ορίου ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μεθόδου προσδιορισμού κρεατινίνης σε κλινικό εργαστήριο, χρησιμοποιείται ως πειραματικό υλικό ορός ελέγχου της κατασκευάστριας εταιρείας, αραιωμένος κατάλληλα, ώστε η μετρούμενη συγκέντρωση του παρασκευασθέντος υλικού να πλησιάζει το προτεινόμενο από την κατασκευάστρια εταιρεία όριο ποσοτικοποίησης.

Συγκεκριμένα:

Μέσος όρος:	0,22	mg/dl
SD:	0,025	mg/dl
LOD:	0,08	mg/dl, για επίπεδο εμπιστοσύνης 99,87%
LOQ:	0,25	mg/dl

Άλλος τρόπος προσδιορισμού του ορίου ποσοτικοποίησης για τις αναλύσεις που οι καμπύλες αναφοράς τους δεν είναι γραμμικές (π.χ. ανοσοχημικές) είναι ο εξής:

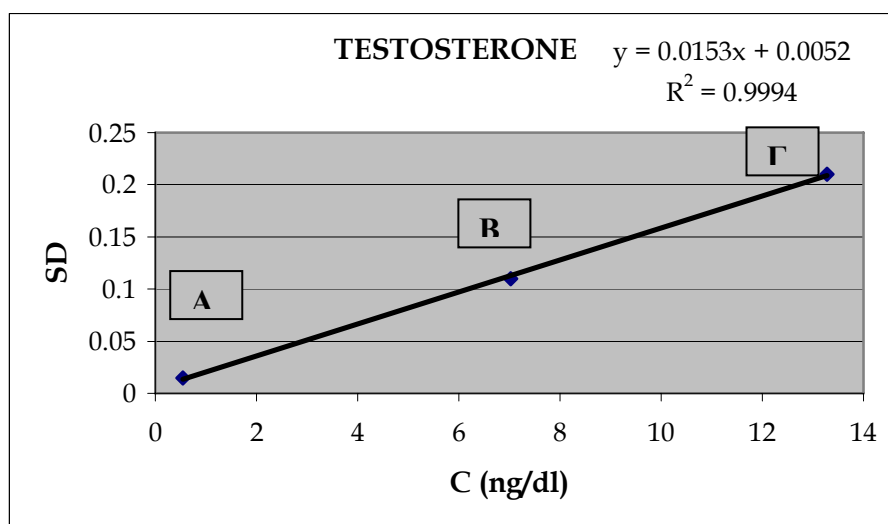
- Πραγματοποιούνται 10 μετρήσεις των παρεχομένων βαθμονομητών, στα χαμηλότερα διαθέσιμα επίπεδα συγκεντρώσεων και υπολογίζεται η μέση τιμή \bar{x} και η τυπική απόκλιση SD ανά επίπεδο.

- Τα αποτελέσματα τοποθετούνται σε διάγραμμα δύο αξόνων. Στον άξονα των x εμφανίζονται οι τιμές των συγκεντρώσεων και στον άξονα των y οι τιμές της τυπικής απόκλισης.

- Υπολογίζεται με τη βοήθεια της μεθόδου ελαχίστων τετραγώνων η εξίσωση γραμμικής καμπύλης της μορφής $y=ax+\beta$ και προσδιορίζεται η τιμή της τυπικής απόκλισης για μηδενική συγκέντρωση ($y=\beta$).

- Το όριο ανίχνευσης προκύπτει από την εξίσωση $LOD=3 \cdot SD$, για επίπεδο εμπιστοσύνης 99,87% ή $LOD=2 \cdot SD$, για στάθμη εμπιστοσύνης 95%.
- Το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) προκύπτει από το μαθηματικό τύπο: $LOQ = 10 \cdot SD$.

Αναφέρεται ως παράδειγμα ο προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της ολικής τεστοστερόνης (Σχήμα 3).



Σχήμα 3. Υπολογισμός του ορίου ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της ολικής τεστοστερόνης.

Όπου για το βαθμονομητή χαμηλής συγκέντρωσης ο μέσος όρος 10 μετρήσεων είναι 0,548 ng/ml και η τυπική απόκλιση είναι 0,015 ng/ml (Σημείο A).

Για το βαθμονομητή μεσαίας συγκέντρωσης ο μέσος όρος 10 μετρήσεων είναι 7,02 ng/ml και η τυπική απόκλιση είναι 0,11 ng/ml (Σημείο B).

Για το βαθμονομητή υψηλής συγκέντρωσης ο μέσος όρος 10 μετρήσεων είναι 13,28 ng/ml και η τυπική απόκλιση είναι 0,21 ng/ml (Σημείο Γ).

Το όριο ανίχνευσης της αναλυτικής μεθόδου προκύπτει από την εξίσωση της καμπύλης $y=0,0153x+0,0052$, ως το γινόμενο: $(3 \times \beta)$, όπου $\beta=0,0052$, δηλαδή $(3 \times 0,0052)=0,02$ ng/ml.

Το όριο ποσοτικοποίησης προκύπτει από το γινόμενο: $(10 \times \beta)$, δηλαδή $(10 \times 0,0052)=0,05$ ng/ml.

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ

Στην κλινική χημεία κατά τη διαδικασία ταυτοποίησης των πηγών αβεβαιότητας μίας συγκεκριμένης παραμέτρου αναζητούνται παράγοντες που επηρεάζουν σε προ-αναλυτικό, αναλυτικό και μετααναλυτικό στάδιο.

Οι πηγές αβεβαιότητας μπορούν να περιγραφούν από αυτό, το οποίο αναφέρεται διεθνώς στη βιβλιογραφία ως «ψαροκόκκαλο» (fishbone).

Το προαναλυτικό σκέλος συνίσταται στο εκτός του εργαστηρίου και εντός αυτού. Οι εκτός εργαστηρίου πηγές αβεβαιότητας είναι π.χ.

- Προετοιμασία του ασθενούς
- Δειγματοληψία
- Βιολογική διακύμανση
- Ταυτοποίηση δείγματος
- Μεταφορά στο εργαστήριο

Οι πηγές αβεβαιότητας του προαναλυτικού σταδίου εντός του εργαστηρίου είναι ενδεικτικά οι:

- Ταυτοποίηση του δείγματος
- Διαχωρισμός ορού ή πλάσματος με φυγοκέντριση
- Φύλαξη των δειγμάτων σε κατάλληλες συνθήκες
- Μεταφορά των δειγμάτων στους αυτόματους αναλυτές.

Οι παράγοντες αυτοί ελέγχονται πλήρως από το εργαστήριο αλλά επίσης, δεν ποσοτικοποιούνται.

Για την καθεαυτή αναλυτική διαδικασία αναφερόμαστε στην αναλυτική αβεβαιότητα, η οποία επηρεάζεται από ένα σύνολο παραγόντων. Οι παράγοντες αυτοί εξαρτώνται από τον κατασκευαστή του αυτοματοποιημένου αναλυτού και ως τέτοιοι ενδεικτικά αναφέρονται: η αβεβαιότητα στην τιμή των διαλυμάτων βαθμονόμησης, η μεταβλητότητα του αντιδραστηρίου από μία σειρά παραγωγής σε μία άλλη, οι προδιαγραφές του αυτοματοποιημένου αναλυτού κ.α. Μερικοί παράγοντες ελέγχονται από το εργαστήριο, όπως π.χ. η συντήρηση του αυτοματοποιημένου αναλυτού και η εμπειρία των χειριστών, η ανασύσταση διαλυμάτων βαθμονόμησης και ορών ελέγχου κ.α.

Στο μετααναλυτικό σκέλος οι κύριες πηγές αβεβαιότητας είναι το σύστημα ηλεκτρονικής ή χειρόγραφης μεταφοράς των αποτελεσμάτων στο σύστημα μηχανογραφήσεως, στην καρτέλα ή το απαντητικό έντυπο του ασθενούς. Τέλος, ιδιαίτερα σημαντικός είναι ο έλεγχος των αποτελεσμάτων, ο οποίος γίνεται ως εξής:

- Έλεγχος βάσει αρχείου (ηλεκτρονικού ή μη) του ασθενούς, το οποίο τηρείται από το εργαστήριο.
- Έλεγχος των τιμών των προσδιοριζόμενων παραμέτρων σε σχέση με υπάρχουσες τιμές πανικού.
- Έλεγχος για ασύμβατες μεταξύ τους τιμές.
- Σφραγίδα και υπογραφή του ελέγξαντος.

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). 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). Και τα δύο δείγματα (in vivo και in vitro) μεταβάλλονται σε σχέση με το χρόνο.

Συγκεκριμένα, το in vivo δείγμα μεταβάλλεται λόγω της ενδοατομικής βιολογικής μεταβλητότητας. Πολλά είναι τα βιολογικά μόρια που στη διάρκεια του 24ώρου χαρακτηρίζονται από καλά μελετημένες αυξομειώσεις της συγκέντρωσής τους μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό (κirkάδιοι ρυθμοί). Πρόκειται για τους

βιολογικούς κύκλους ενδογενών συστατικών, όπως της γλυκόζης, της φλοιοτρόπου ορμόνης (Α.Σ.Τ.Η.), του σιδήρου, της κορτιζόλης και πολλών άλλων.

ΔΗΛΩΣΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται στο εργαστήριο από τη διαδικασία της επαλήθευσης μίας μεθόδου συγκρίνονται με τα υπάρχοντα από την επικύρωσή της από την κατασκευάστρια εταιρεία ή από το πιστοποιητικό των διαλυμάτων ελέγχου ή από βιβλιογραφικά δεδομένα, ή τέλος από τα δεδομένα των διεργαστηριακών προγραμμάτων ελέγχου ποιότητας.

Με βάση την ενδοατομική βιολογική μεταβλητότητα (διακύμανση) μπορούμε να ορίσουμε τα κριτήρια της ορθής αναλυτικής εργαστηριακής πρακτικής, ώστε να ικανοποιούνται γενικά οι ιατρικές ανάγκες. Ο πλέον έγκυρος πίνακας με την ποσοτική εκτίμηση της ενδο-ατομικής και δια-ατομικής βιολογικής διακύμανσης των εργαστηριακών εξετάσεων ρουτίνας είναι αυτός που συνέταξαν η Dr. Cameron Ricos και οι συνεργάτες της από την Ισπανική Εταιρεία Κλινικής Χημείας. Επιπλέον, στον Πίνακα αυτόν αναφέρονται οι κανόνες ποιότητας, που προτείνονται προς χρήση κυρίως στον Ευρωπαϊκό χώρο, αλλά και στις Η.Π.Α. Δηλαδή:

- Το CV (το τυχαίο αναλυτικό σφάλμα) κάθε εξέτασης πρέπει να είναι μικρότερο ή ίσο με το ήμισυ της ενδοατομικής βιολογικής μεταβλητότητας (διακύμανσης). Δηλαδή:

$$CV \leq 0,5 CV_w$$

όπου CV_w οι τιμές της ενδοατομικής μεταβλητότητας, όπως αυτές προέρχονται από τον Πίνακα της Ισπανικής ομάδας.

- Το αναλυτικό συστηματικό σφάλμα ($B=Bias$) μίας μεθόδου πρέπει να είναι:

$$B < 0,25 \sqrt{CV_w^2 + CV_g^2}$$

Όπου CV_w και CV_g η ενδο- και διαατομική βιολογική μεταβλητότητα αντίστοιχα.

- Το ολικό σφάλμα

$$TE < k \cdot 0,5CV_w + 0,25 \sqrt{CV_w^2 + CV_g^2}$$

Όπου $k=1,65$ για επίπεδο εμπιστοσύνης 95% με $\alpha=0,05$ ή αλλιώς:

$$\text{Ολικό Σφάλμα} < 1,65 (\text{τυχαίο σφάλμα}) + (\text{συστηματικό})$$

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Μ. ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ, «ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ-ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΑ», Πανεπιστημιακές Σημειώσεις.
2. ΕΝΟΡΓΑΝΗ ΑΝΑΛΥΣΗ, Θ. Π. ΧΑΤΖΗΩΑΝΝΟΥ, Μ. Α. ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ, Αθήνα 2003.
3. «Πιστοποίηση-Διαπίστευση Κλινικών Εργαστηρίων». Ε.Χ. Λυκόκα, Ε. Πουλάκη, Ν. Πρίγκος, Κ. Πιπεράκη, Α. Σταθάκη-Φερδερίγου. 1^ο Σεμινάριο Συνεχιζόμενης Εκπαίδευσης – Ελληνική Εταιρεία Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας.
4. «Πιστοποίηση-Διαπίστευση Κλινικών Εργαστηρίων». Α. Σταθάκη-Φερδερίγου, Ε. Πουλάκη, Ν. Πρίγκος, Ε.Χ. Λυκόκα, Κ. Πιπεράκη. 1^ο Σεμινάριο Συνεχιζόμενης Εκπαίδευσης – Ελληνική Εταιρεία Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας.
5. EURACHEM/CITAC Guide, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 2nd edition, 2000.
6. ISO GUIDE 43-1, “Development and Operation of Laboratory Proficiency testing”, Second Edition, 1997.
7. ISO GUIDE 43-2, “Selection and Use of Proficiency Testing Schemes by Laboratory Accreditation Bodies”, First Edition, 1997.
8. «Διεργαστηριακές συγκρίσεις και σχήματα δοκιμών ικανότητας»
Ε. Λαμπή, «Μετρολογία-Διαπίστευση Εργαλεία για την Επίτευξη της Εργαστηριακής Αξιοπιστίας», 3^ος Κύκλος, Εκπαιδευτικό Σεμινάριο της HellasLab.
9. Statistics for analytical chemistry, J. C. Miller and J. N. Miller.
10. K. Linnet and M. Kondratovich, Clinical Chemistry 2004; 50: 732-740.
11. A. Taylor, J. Angerer, F. Claeys, J. Kristiansen, O. Mazarrasa, A. Menditto, M. Patriarca, A. Pineau, I. Schoeters, C. Sykes, S. Valkonen and C. Weykamp, Clinical Chemistry, 2002; 48: 2000-2007.
12. R. Ekins and P. Edwards, Clinical Chemistry, 1997; 43:1824-1831.
13. H. L. Pardue, Clinical Chemistry, 1997; 43: 1831-1837.
14. Compendium of analytical nomenclature definitive rules, IUPAC, 1987, p. 114- 7.
15. Ricos C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario JV, Hernandez A, Jimenez CV, Minchinela J, Perich C, Simon M., Scand J Clin Lab Invest 1999;59:491-500.
16. M. Rynning, T. Wentzel-Larsen, B. J. Bollan, Clinical Chemistry 2007 Jul;53(7);1343-1348