

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΥ ΜΗΤΡΑΣ (MATRIX EFFECT) ΣΤΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΕΞΩΤΕΡΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

¹Α. ΕΥΑΓΓΕΛΟΠΟΥΛΟΣ, ¹Π. ΚΟΛΛΗΜΕΝΟΥ, ²Ν. ΒΑΛΛΙΑΝΟΥ,
³Π. ΚΑΡΚΑΛΟΥΣΟΣ

¹ROCHE DIAGNOSTICS (HELLAS) S.A.

²ΓΝΑ ΠΟΛΥΚΛΙΝΙΚΗ – ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

³ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΒΡΑΧΕΙΑΣ ΝΟΣΗΛΕΙΑΣ – 3^ο ΘΕΡΑΠΕΥΤΗΡΙΟ ΙΚΑ

Εισαγωγή – Ο εξωτερικός έλεγχος ποιότητας

Ο διεργαστηριακός έλεγχος (interlaboratory comparison) είναι η διαδικασία που ελέγχει την ακρίβεια (accuracy) και αναπαραγωγιμότητα (reproducibility) των εργαστηριακών αποτελεσμάτων. Η ακρίβεια αναφέρεται στη διαφορά των αποτελεσμάτων από την πραγματική τιμή και η αναπαραγωγιμότητα, στην περίπτωση των διεργαστηριακών ελέγχων, αναφέρεται στην εγγύτητα μεταξύ αποτελεσμάτων που αναλύθηκαν σε διαφορετικά εργαστήρια. Στο χώρο της κλινικής χημείας ο διεργαστηριακός έλεγχος είναι γνωστός ως εξωτερικός έλεγχος ποιότητας (external quality control).

Ο εξωτερικός έλεγχος ποιότητας ξεκίνησε να εφαρμόζεται στα τέλη της δεκαετίας του 1940 στις Ηνωμένες Πολιτείες. Διαδόθηκε όμως ταχύτατα όταν από την δεκαετία του 1960 άρχισε η αυτοματοποίηση των αναλύσεων με την μεγάλη ανάπτυξη των μικροϋπολογιστών και κατά συνέπεια των αυτόματων αναλυτών. Στην Ελλάδα δεδομένου ότι η εισαγωγή αυτής τεχνολογίας άργησε τα σχήματα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας εμφανίστηκαν την δεκαετία του 1990. Σήμερα στην Ελλάδα υπάρχουν σχήματα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας (external quality schemes) που οργανώνονται από επιστημονικές εταιρείες (π.χ. τα προγράμματα της Ελληνικής Εταιρείας Κλινικής Χημείας και της Αιματολογικής Εταιρείας) από πολυεθνικές εταιρείες που εμπορεύονται τέτοια προγράμματα (π.χ. Randox, Biorad) καθώς και από εταιρείες παρασκευής αναλυτών και αντιδραστηρίων (π.χ Roche, Sysmex).

Κάθε σχήμα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Τα σχήματα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας που διοργανώνονται από τις εταιρείες κατασκευής αναλυτών έχουν τα πλεονεκτήματα του μηδενικού κόστους για τον καταναλωτή καθώς επίσης και το γεγονός ότι εξασφαλίζουν μεγάλη αξιοπιστία στις συγκρίσεις τους επειδή λαμβάνουν υπόψη τους τις ιδιομορφίες των μηχανημάτων και των υλικών τους. Επιπλέον έχουν το πλεονέκτημα της πληρέστερης ομαδοποίησης των αποτελεσμάτων ανά αναλυτική μέθοδο και αναλυτή. Το μειονέκτημα αυτών των σχημάτων είναι ότι το εργαστήριο στερείται την δυνατότητα να συγκρίνει τις τιμές του με άλλα εργαστήρια που διαθέτουν διαφορετικό εξοπλισμό. Ωστόσο υπάρχουν και πιο ανοιχτά προγράμματα από εταιρείες παρασκευής αναλυτών και αντιδραστηρίων, που επιτρέπουν τη συμμετοχή εργαστηρίων με διαφορετικούς αναλυτές και η ομαδοποίηση γίνεται βάσει της μεθοδολογίας προσδιορισμού.

Τα δείγματα ελέγχου και βαθμονόμησης

Η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων δεν εξασφαλίζεται μόνο με τον διεργαστηριακό έλεγχο αλλά και με τον καθημερινό εσωτερικό έλεγχο ποιότητας μέσα στο εργαστήριο.

Ο εσωτερικός έλεγχος ποιότητας (internal quality control) ελέγχει την πιστότητα (precision) των αναλύσεων. Μέτρα της πιστότητας είναι η επαναληψιμότητα που αναφέρεται σε πειράματα εντός της σειράς ή εντός της ημέρας (within run ή within day), δηλαδή σε αυστηρά καθορισμένες συνθήκες (ίδιος αναλυτής και χειριστής) και η αναπαραγωγιμότητα (reproducibility), που αναφέρεται σε πειράματα μεταξύ ημερών (between days).

Τόσο ο εσωτερικός και εξωτερικός έλεγχος ποιότητας διενεργούνται με την βοήθεια δειγμάτων ελέγχου. Τα δείγματα ελέγχου (control samples) είναι βιολογικά δείγματα αντίστοιχα με τα δείγματα των ασθενών που αναλύονται (π.χ. ορός, ολικό αίμα, ούρα κ.λ.π.).

Τα δείγματα ελέγχου στον εσωτερικό έλεγχο ποιότητας περιέχουν γνωστές ουσίες των οποίων οι συγκεντρώσεις τους έχουν υπολογιστεί από επαναλαμβανόμενες μετρήσεις των δειγμάτων αυτών σε εργαστήρια αναφοράς. Για κάθε ουσία έχει υπολογιστεί το επιτρεπτό εύρος διακύμανσης. Πέρα από αυτό το εύρος ανάλυση χαρακτηρίζεται από αναλυτικό σφάλμα.

Αντίθετα στον εξωτερικό έλεγχο ποιότητας τα δείγματα ελέγχου αν και ίδιας κατασκευής με τον εσωτερικό συνήθως είναι άγνωστης συγκέντρωσης. Οι συγκεντρώσεις αυτές θα υπολογιστούν μετά την μέτρηση των δειγμάτων στα συνεργαζόμενα εργαστήρια για αυτό και ονομάζονται τιμές συναίνεσης (consensus mean).

Για την εξασφάλιση της καλής ποιότητας των αποτελεσμάτων δεν χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ελέγχου αλλά και δείγματα αναφοράς ή βαθμονομητές. Οι βαθμονομητές είναι δείγματα γνωστής συγκέντρωσης με τις οποίες κατασκευάζονται οι καμπύλες αναφοράς που εξασφαλίζουν την ταύτιση των φυσικοχημικών μεγεθών μέτρησης (π.χ. απορρόφηση, σκέδαση, φωταύγεια) με την συγκέντρωση των ουσιών μέσα στο δείγμα.

Τόσο τα δείγματα ελέγχου όσο και τα υλικά βαθμονόμησης μπορεί να είναι υγρής ή λυοφιλοποιημένης μορφής. Τα υλικά λυοφιλοποιημένης μορφής διατηρούνται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από τα υλικά υγρής μορφής έχουν όμως μικρότερη διάρκεια από αυτά μετά την ανασύστασή τους. Για την διατήρηση της σύστασής τους σταθερής όσο το δυνατόν περισσότερο και τα δύο υλικά αυτά περιέχουν συντηρητικά και αντιβιοτικές ουσίες. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα η σύστασή τους να διαφέρει σημαντικά από τα βιολογικά δείγματα. Περισσότερο αλλοιωμένα από αυτή την άποψη είναι τα υλικά βαθμονόμησης.

Σε κάθε περίπτωση όμως η βασική τους ουσία η ουσία δηλαδή που προσδιορίζεται θα πρέπει να μένει χημικά σταθερή. Στην διεθνή βιβλιογραφία η βασική ουσία ονομάζεται **matrix**.

Το πρόγραμμα QCS (Quality Control Scheme) της εταιρείας Roche

Η εταιρεία Roche διοργανώνει το δικό της σχήμα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας, τόσο για αναλύσεις κλασικής κλινικής χημείας (γλυκόζη, ουρία, ένζυμα κ.α.), όσο και για ορμόνες και καρκινικούς δείκτες. Το σχήμα αυτό ονομάζεται QCS (Quality Control Scheme) και συνδυάζει εσωτερικό και εξωτερικό έλεγχο ποιότητας.

Το πρόγραμμα που αφορά ορμόνες και καρκινικούς δείκτες ξεκίνησε το Σεπτέμβριο του 2006 στην Ελλάδα και αναφέρεται στους αναλυτές Elecsys (Roche/Hitachi Elecsys 1010 και 2010) που χρησιμοποιούν την τεχνολογία της ηλεκτροχημειοφωταύγειας.

Οι συμμετέχοντες προμηθεύονται από την κατασκευάστρια εταιρεία υλικά ελέγχου με σταθερό αριθμό παρτίδας για ένα ημερολογιακό έτος. Το κάθε εργαστήριο τα χρησιμοποιεί καθημερινά στον εσωτερικό έλεγχο ποιότητας. Τα αποτελέσματα εισάγονται σε ειδικό λογισμικό που χορηγεί η εταιρεία, το QCS Easy 4.

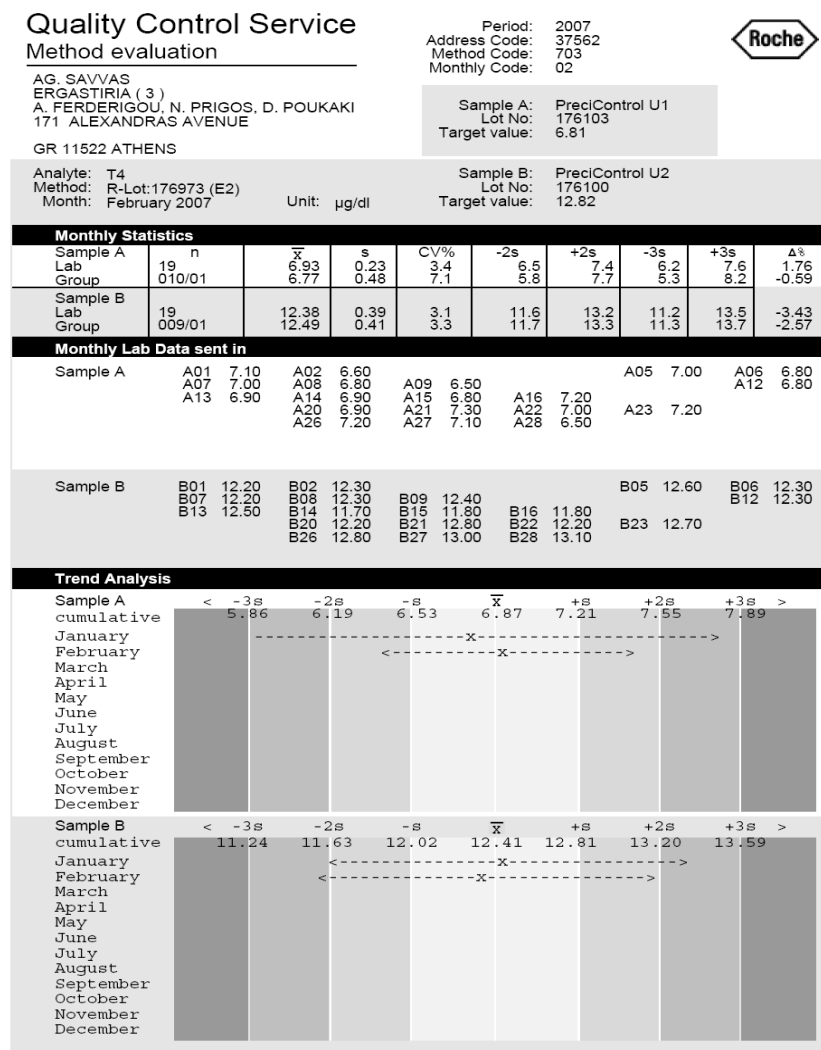
Sera	Analyte	Method	Unit	Reagent Mfr	Instrument
UNI	ACP-T	1-NAPHT. PHOS. 37°C (H)	U/l	ROCHE	RD/ HITACHI 912
UNI	ALB	BCG ALB PLUS (H)	g/dl	ROCHE	RD/ HITACHI 912
UNI	ALP	IFCC LIQUID 37°C (H)	U/l	ROCHE	RD/ HITACHI 912
UNI	AMYL	IFCC LIQUID 37°C (H)	U/l	ROCHE	RD/ HITACHI 912
LIP	APOA1	IMM TURB TEST VER 2 (H)	mg/dl	ROCHE	RD/ HITACHI 912
LIP	APO B	IMM TURB TEST VER 2 (H)	mg/dl	ROCHE	RD/ HITACHI 912
PROT	ASLO	PART ENH IMM TURB/ CFAS PAC (H)	IU/ml	ROCHE	RD/ HITACHI 912
UNI	Ca	O-CRESOLPHT. COMP. (H)	mg/dl	ROCHE	RD/ HITACHI 912
UNI	CHOL	CHOD-PAP ID/MS (H,I)	mg/dl	ROCHE	RD/ HITACHI 912
UNI	CK	IFCC LIQUID 37°C (H)	U/l	ROCHE	RD/ HITACHI 912
UNI	CREA	JAFFE RATE BL AND COMP (H)	mg/dl	ROCHE	RD/ HITACHI 912
PROT	CRP	LX WIDE RANGE (H)	mg/dl	ROCHE	RD/ HITACHI 912
UNI	BIL-D	JENDRASSIK-GROF (H)	mg/dl	ROCHE	RD/ HITACHI 912
UNI	Fe	FERROZINE W/O DEPR. (H,I)	µg/dl	ROCHE	RD/ HITACHI 912
UNI	GGT	LIQUID STAND. SZASZ 37°C (H)	U/l	ROCHE	RD/ HITACHI 912
UNI	GLU	HEXOKINASE/GOD-PAP/GDH (H,I)	mg/dl	ROCHE	RD/ HITACHI 912
UNI	GOT	IFCC W/O PYP 37°C (H,I)	U/l	ROCHE	RD/ HITACHI 912
UNI	GPT	IFCC W/O PYP 37°C (H)	U/l	ROCHE	RD/ HITACHI 912
LIP	HDL-C	HOM. HDL-C PLUS GEN.2 (H)	mg/dl	ROCHE	RD/ HITACHI 912
UNI	LDH	OPT.DGKC 37°C (H,I)	U/l	ROCHE	RD/ HITACHI 912
UNI	Mg	XYLIDYL BLUE METHOD (H)	mg/dl	ROCHE	RD/ HITACHI 912

Μια φορά κάθε μήνα τα αποτελέσματα από το QCS Easy 4 μεταφέρονται σε κοινή βάση δεδομένων, όπου γίνεται στατιστική επεξεργασία στα πλαίσια διεργαστηριακού ελέγχου δηλαδή εξωτερικού ελέγχου ποιότητας.

Για κάθε προσδιοριζόμενη παράμετρο το εργαστήριο λαμβάνει μια έκθεση αξιολόγησης που περιλαμβάνει τέσσερα τμήματα:

- Γενικό τμήμα, με πληροφορίες για το εργαστήριο και τη χρονική περίοδο που γίνεται η μελέτη, τα χρησιμοποιούμενα διαλύματα ελέγχου και την εφαρμοζόμενη μεθοδολογία, καθώς και την τιμή στόχο (target value) όπως έχει προσδιοριστεί από την κατασκευάστρια εταιρεία.

- Μηνιαία στατιστικά (Monthly statistics), όπου αναφέρονται στατιστικά δεδομένα του εργαστηρίου και της ομάδας των εργαστηρίων που συμμετέχουν στο πρόγραμμα.
- Δεδομένα που απεστάλησαν τον συγκεκριμένο μήνα (Monthly Lab Data sent in).
- Ανάλυση τάσεων (Trend analysis) όπου αναδυόμενα προβλήματα μπορούν να εντοπιστούν έγκαιρα και να ληφθούν τα κατάλληλα διορθωτικά μέτρα.



Με την εφαρμογή του QCS το εργαστήριο έχει τα παρακάτω οφέλη:

- Τήρηση ηλεκτρονικού αρχείου στο εργαστήριο με στατιστική ανάλυση και διαγράμματα ελέγχου Shewhart (στην κλινική χημεία ονομάζονται Levey-Jennings).
- Εμπιστευτικότητα των εκθέσεων αξιολόγησης. Πρόσβαση με μοναδικό κωδικό και χρήση της τεχνολογίας SSL (Secure Sockets Layer Technology).

- Πληροί τις προδιαγραφές των: ISO 13485:2003, ISO 9001:2000 και τις ακόλουθες ρυθμιστικές απαιτήσεις:
 - 21 CFR Part 820 (cGMP Requirements of the Quality System Regulation)
 - 21 CFR Part 11 (Electronic Records, Electronic Signatures)
 - General Principles of Software Validation: Final guidance for Industry and FDA Staff EU GMP Guideline: Annex 11
- Απαλλαγή από το άγχος των προθεσμιών για την υποβολή των αποτελεσμάτων (οποιαδήποτε ημέρα του μήνα X+1 για τα αποτελέσματα του μήνα X).
- Ταχύτατη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων (1-2 εργάσιμες ημέρες).
- Δυνατότητα παρακολούθησης των αποτελεσμάτων μέσω του διαδικτύου (www2.qcs-net.com). – on the spot documentation.
- Προετοιμασία για πιστοποίηση/διαπίστευση σύμφωνα με τις απαιτήσεις των προτύπων ISO 15189 και ISO 17025.
- Λήψη συνοπτικών εκθέσεων αξιολόγησης με εύκολη ερμηνεία.

Οι ορμόνες και οι καρκινικοί δείκτες στις οποίες απευθύνεται το σχήμα δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

PreciControl Universal (PCU)	Precicontrol Tumor Marker (PCTM)
a1-fetoprotein	a1-fetoprotein
Cortisol	Cancer antigen 15-3
Dehydroepiandrosterone sulfate	Cancer antigen 19-9
Estradiol	Cancer antigen 125
Follicle stimulating hormone	Carcinoembryonic antigen
Free triiodothyronine	Cytokeratin 19 fragment
Human chorionic gonadotropin STAT	Ferritin
Human chorionic gonadotropin+β	Free prostate specific antigen
Immunoglobulin E	Human chorionic gonadotropin+β
Insulin	Neuron specific enolase
Luteinizing hormone	Total prostate specific antigen
Progesterone	Thyroglobulin
Prolactin	
Human sex hormone-binding globulin	
Testosterone	
Triiodothyronine	
Thyroxine	
Thyrotropin	
T uptake	
Thyroglobulin	

Το φαινόμενο μήτρας (matrix effect)

Στα σχήματα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας που αφορούν εξετάσεις κλασικής κλινικής χημείας κατά κανόνα η ανάλυση είναι ανεξάρτητη από την παρτίδα των αντιδραστηρίων εφόσον τηρούνται σχολαστικά οι ίδιες φυσικοχημικές συνθήκες κατά την αντίδραση (π.χ. pH, θερμοκρασία). Δε συμβαίνει όμως το ίδιο και με τις ορμόνες και τους καρκινικούς δείκτες.

Οι ουσίες αυτές είναι πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους στις οποίες η πρωτοταγής, δευτεροταγής, τριτοταγής και τεταρτοταγής δομή ρυθμίζουν, στο μέτρο που τους αναλογεί, τη χημική τους συγγένεια με τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο της ηλεκτροχημειοφωταύγειας.

Η χημική συγγένεια όμως μπορεί να επηρεαστεί σε μικρό ή μεγάλο βαθμό από μια σειρά από φυσικοχημικούς παράγοντες. Ο επηρεασμός αυτός στο σύνολό του προκαλεί το λεγόμενο φαινόμενο μήτρας (matrix effect). Οι παράγοντες αυτοί είναι:

1. Η οξύτητα του διαλύματος (pH).
2. Η θερμοκρασία της αντίδρασης.
3. Η παρουσία συντηρητικών ή άλλων χημικών ουσιών που προστίθενται στα αντιδραστήρια.
4. Η ίδια η συγκέντρωση της πρωτεΐνης.
5. Οι διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλα αντισώματα που υπάρχουν στα δείγματα των ασθενών.
6. Και τέλος η ακριβής δομή των σημασμένων αντισωμάτων που απαρτίζουν τα αντιδραστήρια των αναλυτών. Τα αντισώματα αυτά λόγω μικρών μεταβολών στην δομή τους είναι δυνατόν να μην ενώνονται επακριβώς με τα αντιγόνα τους.

Το matrix effect επομένως είναι πρακτικά αδύνατο να παρακαμφθεί. Λόγω του matrix effect μπορεί να παρατηρηθούν διαφορές στα αποτελέσματα των αναλύσεων οι οποίες αν και μικρές αποτελούν μερικές φορές υπολογίσιμο αναλυτικό σφάλμα.

Οι ενέργειες της Roche για την αντιμετώπιση των επιπτώσεων του φαινομένου μήτρας (matrix effect)

Η εξουδετέρωση του matrix effect ως προς τα πρωτογενή του αίτια είναι πρακτικά αδύνατη. Για το λόγο αυτό το βάρος δίνεται στην αντιμετώπιση των επιπτώσεων από αυτό δηλαδή στην εξασφάλιση καλής ποιότητας αποτελεσμάτων στα δείγματα των ασθενών.

Όταν παράγεται μια παρτίδα αντιδραστηρίων, ακολουθεί δοκιμή σε πραγματικές συνθήκες δηλαδή βαθμονόμηση και προσδιορισμός πραγματικών δειγμάτων ασθενών, σε μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων, που διατηρούνται σε συγκεκριμένες και αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες. Αν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με τις συγκεκριμένες παρτίδες αντιδραστηρίων δεν παρουσιάζουν μεγάλες διακυμάνσεις με τα αποτελέσματα που είχαν ληφθεί με προηγούμενες παρτίδες αντιδραστηρίων, τότε θεωρούνται κατάλληλα για την αγορά.

Παράλληλα στα εργαστήρια της Roche γίνονται εκτεταμένες μετρήσεις στα διαλύματα ελέγχου (controls) των εξετάσεων (PreciControls). Οι μέσες τιμές και τα εύρη αυτών των μετρήσεων καταχωρούνται στον γραμμωτό κώδικα της συσκευασίας των controls αλλά και αναγράφονται στα ένθετα φυλλάδια που συνοδεύουν το προϊόν.

Ωστόσο επειδή το κριτήριο απελευθέρωσης μιας παρτίδας αντιδραστηρίου στην αγορά είναι να μην υπάρχουν μεταβολές στα αποτελέσματα των ασθενών ενδέχεται, λόγω του φαινομένου μήτρας, δυο διαφορετικές παρτίδες αντιδραστηρίων ενώ δίνουν ίδια αποτελέσματα για πραγματικά δείγματα, να δίνουν διαφορετικές τιμές κατά τον προσδιορισμό των διαλυμάτων ελέγχου. Οι διαφορές αυτές είναι συνήθως αμελητέες αλλά σε μερικές περιπτώσεις και για συγκεκριμένους συνδυασμούς παρτίδων αντιδραστηρίων – διαλυμάτων ελέγχου μπορεί να είναι σημαντικές. Για τους λόγους αυτούς **συνιστάται στους ανοσοχημικούς προσδιορισμούς η ομαδοποίηση στα προγράμματα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας να γίνεται ανά μεθοδολογία, αριθμό παρτίδας διαλύματος ελέγχου (control) και αριθμό παρτίδας αντιδραστηρίου.**

Επειδή κατά την παραγωγή νέων παρτίδων αντιδραστηρίου οι συσκευασίες των PreciControls έχουν ήδη φύγει από το Τμήμα Παραγωγής είναι αδύνατον να συμπεριληφθούν οι ειδοποιήσεις για αλλαγές τιμών στα Controls. Κατά συνέπεια αυτές συμπεριλαμβάνονται στις νέες συσκευασίες των αντιδραστηρίων. Παράλληλα, και για διασφάλιση των χειριστών, αυτή η πληροφορία εγγράφεται και στα barcodes των αντιδραστηρίων.

Φαίνεται λοιπόν ότι, οι από πρώτη ματιά ενοχλητικές αλλαγές στις τιμές των controls, που πρέπει να παρακολουθούμε όταν αλλάζουμε παρτίδες αντιδραστηρίων, είναι αναπόφευκτες, αλλά παράλληλα είναι και αυτές που διασφαλίζουν την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων μας.

Βιβλιογραφία

1. International Organization for Standardization. Guide to the expression of uncertainty in measurement. Geneva: ISO, 1995:101pp.
2. Παναγιωτάκης Όθ. Διαγράμματα ελέγχου – Μέθοδοι ενός κριτηρίου. 2ο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο ΕΕΚΧ-ΚΒ, 2003: 26-36.
3. Παναγιωτάκης Όθ. Μέθοδοι πολλαπλών κριτηρίων- Μέθοδος Westgard. 2ο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο ΕΕΚΧ-ΚΒ, 2003: 37-42.
4. Leonhardt W., Zawta B. Quality Assurance: Introduction to Statistics and Important Definitions. 2000: 72 pp.
5. Χαλιάσος Αλ. Εξωτερικός Έλεγχος Ποιότητας. 2^ο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο ΕΕΚΧ-ΚΒ, 2003: 77-87.
6. Ευαγγελόπουλος, Α., Θωμαΐδης, Ν., & Κουτπάρης, Μ. Ιχνηλασιμότητα και αβεβαιότητα στο βιοχημικό εργαστήριο. Νέα θεώρηση κλασικών όρων. Δελτίο Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας, 2006: 51, 82 - 94.
7. Καρκαλούσος Π. Εισαγωγή στον καθημερινό έλεγχο ποιότητας των αναλυτών κλινικής χημείας, Αθήνα 2006.