

**ΔΙΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΜΕΤΑΞΥ ΜΕΤΡΟΛΟΓΙΚΩΝ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΩΝ
ΩΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΞΑΣΦΑΛΙΣΗΣ ΙΧΝΗΛΑΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ**

**Κακουλίδης Ηλίας, Αλεξόπουλος Χαράλαμπος, Λαμπή Ευγενία
Εργαστήριο Χημικής Μετρολογίας (ΕΧΗΜ/ΓΧΚ-ΕΙΜ)
Ε΄ Χ.Υ. Αθηνών, Γενικό Χημείο του Κράτους, Αν. Τσόχα 16, 115 21 Αθήνα
e-mail: i.kakoulidis@gcsl.gr**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εξασφάλιση ιχνηλασιμότητας στις χημικές μετρήσεις αποτελεί στοιχειώδη προϋπόθεση για την παροχή αξιόπιστων και συγκρίσιμων αναλυτικών αποτελεσμάτων και εργαστηριακών δεδομένων ανεξάρτητα από τη μέθοδο μέτρησης, το χρόνο και το χώρο που χρησιμοποιούνται για τη συλλογή και την καταγραφή τους. Ιδιαίτερα στο χώρο της υγείας, η απαίτηση για ιχνηλασιμότητα είναι θεμελιώδης, καθώς αφορά στην ποιότητα των πληροφοριών που παράγονται από τις κλινικές μετρήσεις. Στα πλαίσια αυτά, η ψήφιση της Οδηγίας που αφορά στις *in-vitro* διαγνωστικές συσκευές (98/79/ΕΚ) θέτει συγκεκριμένες απαιτήσεις όσον αφορά στην ιχνηλασιμότητα των μετρήσεων σε μεθόδους αναφοράς ανώτατης μετρολογικής ποιότητας. Η παρούσα εργασία αναφέρεται στη συμμετοχή του Εθνικού Εργαστηρίου Χημικής Μετρολογίας στη σύγκριση-κλειδί CCQM-K.80 (προσδιορισμός κρεατινίνης σε ορό αίματος), η οποία αποτελεί συστατικό στοιχείο για την επίτευξη ιχνηλασιμότητας στο σύστημα SI για τις κλινικές μετρήσεις. Συγκεκριμένα, παρουσιάζονται η μεθοδολογία μέσω τεχνικών ισοτοπικής αραίωσης, η ιχνηλασιμότητα σε πρωτεύοντα πρότυπα και η εκτίμηση της αβεβαιότητας.

Λέξεις-Κλειδιά: συγκρίσεις-κλειδιά, εργαστηριακή ιατρική, ιχνηλασιμότητα, κρεατινίνη.

Κακουλίδης Ηλίας, Αλεξόπουλος Χαράλαμπος, Λαμπή Ευγενία
Γενικό Χημείο του Κράτους
Διεργαστηριακές Δοκιμές Μεταξύ Μετρολογικών Ινστιτούτων ως Μηχανισμός Εξασφάλισης
Ιχνηλασιμότητας στην Εργαστηριακή Ιατρική

4^ο Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας
Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου
Αθήνα, 3-4 Φεβρουαρίου 2012

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Δεν έχουν περάσει πολλά χρόνια από τότε που στο χώρο της κλινικής χημείας διατυπώθηκε η άποψη ότι η ακρίβεια των μετρήσεων στα κλινικά εργαστήρια δεν έχει προσελκύσει την προσήκουσα σημασία, αν και αποτελεί το συστατικό τους πυρήνα [Tietz, 1994]. Η κατάσταση αυτή έχει ουσιαστικά μεταμορφωθεί σήμερα. Αιτία αποτέλεσε η υιοθέτηση της κοινοτικής οδηγίας 98/79/EK, η οποία επέφερε σημαντικές αλλαγές στις διαδικασίες που ακολουθούνται όχι μόνο από τα κλινικά εργαστήρια, αλλά και από τους κατασκευαστές σχετικού εξοπλισμού και αντιδραστηρίων [Greenberg, 2001]. Η κινητοποίηση ήταν τέτοια που οδήγησε τη Συμβουλευτική Επιτροπή για την Ποσότητα της Ουσίας (CCQM - *Comité Consultatif pour la Quantité de Matière* – CCQM) και τη Διεθνή Ομοσπονδία Κλινικής Χημείας και Εργαστηριακής Ιατρικής (*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* - IFCC) στη σύσταση της Κοινής Επιτροπής για την Ιχνηλασιμότητα στην Εργαστηριακή Ιατρική (JCTLM: *Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine*). Στόχο της JCTLM αποτελεί η ανάπτυξη και η υιοθέτηση κατάλληλων μεθόδων και υλικών αναφοράς για την εξασφάλιση της ορθότητας και της ιχνηλασιμότητας στις μετρήσεις των κλινικών εργαστηρίων (Armbruster & Miller, 2007).

Στα πλαίσια της μετρολογικής κοινότητας, αυτό επιτυγχάνεται με τη διοργάνωση διεθνών διεργαστηριακών συγκρίσεων στο ανώτατο μετρολογικό επίπεδο (*key comparisons*), οι οποίες για τα ινστιτούτα που συμμετέχουν αποτελούν τεκμήριο αλλά και προϋπόθεση για την εξασφάλιση ικανοτήτων βαθμονόμησης και μέτρησης (*calibration and measurement capabilities* - CMCs). Αντικείμενο της παρούσας εργασίας αποτελεί η παρουσίαση της συμμετοχής του EXHM στην πιο πρόσφατη σύγκριση για τον προσδιορισμό κρεατινίνης σε ορό αίματος. Η σύγκριση συντονίστηκε στην Ευρώπη από το LGC (*Laboratory of the Government Chemist*, Μ. Βρετανία) και το PTB (*Physikalisch-Technische Bundesanstalt*, Γερμανία) για λογαριασμό της EURAMET, τον Ευρωπαϊκό Μετρολογικό Οργανισμό που ανέλαβε τη διοργάνωση της σύγκρισης (CCQM-K80) στην Ευρώπη και διεξήχθη σε δύο κλάδους: ο ένας είχε σκοπό την αξιολόγηση ενός ευρύτερου συνόλου πιστοποιημένων υλικών αναφοράς [Dodder et al., 2007; Dai et al., 2010], ενώ ο άλλος αποσκοπούσε στην αξιολόγηση της επίδοσης των ευρωπαϊκών μετρολογικών εργαστηρίων που συμμετείχαν αλλά και των εργαστηρίων αναφοράς της IFCC.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Πρωτόκολλο και δείγματα της σύγκρισης

Κακουλίδης Ηλίας, Αλεξόπουλος Χαράλαμπος, Λαμπή Ευγενία
Γενικό Χημείο του Κράτους
Διεργαστηριακές Δοκιμές Μεταξύ Μετρολογικών Ινστιτούτων ως Μηχανισμός Εξασφάλισης
Ιχνηλασιμότητας στην Εργαστηριακή Ιατρική

4^ο Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας
Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου
Αθήνα, 3-4 Φεβρουαρίου 2012

Ο σκοπός της σύγκρισης CCQM-K.80 ήταν να επιτρέψει σε εθνικά μετρολογικά ινστιτούτα (NMIs) που δεν συμμετείχαν στις προηγούμενες συγκρίσεις να επιδείξουν την ικανότητά τους στο να χαρακτηρίσουν ορούς αίματος ως προς τη συγκέντρωση της κρεατινίνης (2-αμινο-3-μεθυλο-4H-ιμιδαζολ-5-όνη) σε περιοχή τιμών 1 - 100 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Στη σύγκριση χρησιμοποιήθηκαν δύο λυοφιλιωμένα δείγματα ορού που παραχωρήθηκαν από το Σχήμα Εξωτερικού Ελέγχου των Εργαστηρίων Αναφοράς (RELA - REference LAboratories) της IFCC. Στους συμμετέχοντες δεν υποδείχτηκε κάποιο εύρος τιμών για τα δύο υλικά, παρά μόνο ότι στο ένα η συγκέντρωση της κρεατινίνης θα κυμαίνεται σε φυσιολογικά επίπεδα για ενήλικες και παιδιά, ενώ στο άλλο σε υψηλά επίπεδα για τους ενήλικες, ώστε να καλυφθεί ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων που θα είναι αντιπροσωπευτικό τόσο φυσιολογικών όσο και παθολογικών καταστάσεων. Οι συμμετέχοντες στη σύγκριση-κλειδί ήταν υποχρεωμένοι να χρησιμοποιήσουν μεθόδους ισοτοπικής αραίωσης για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης, δηλαδή τεχνικές αέριας ή υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (GC-IDMS ή LC-IDMS).

Ζητήθηκε να υποβληθούν δύο τιμές για τη συγκέντρωση της κρεατινίνης για κάθε ένα από τα τρία φιαλίδια των δύο υλικών σε κάθε επίπεδο, καθώς και ένα αποτέλεσμα για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης (δηλαδή ένα αποτέλεσμα ως συνδυασμός των τριών φιαλιδίων κάθε επιπέδου).

Τα εργαστήρια που συμμετείχαν θα έπρεπε επίσης να αναφέρουν,

- το κλάσμα μάζας της κρεατινίνης σε ανασυσταμένο ορό (σε $\mu\text{g/g}$)
- πλήρες ισοζύγιο αβεβαιότητας
- την προέλευση και σχετικές πληροφορίες για τα υλικά αναφοράς που χρησιμοποίησαν
- την προέλευση και σχετικές πληροφορίες για επισημασμένα υλικά που χρησιμοποίησαν
- μια σύνοψη της μεθοδολογίας, την πλήρη εξίσωση υπολογισμού και μια επεξήγηση για την εκτίμηση της αβεβαιότητας που υπέβαλαν

Τα υλικά διανεμήθηκαν από τη RELA στις 28-02-2011 και ως καταληκτική ημερομηνία για την υποβολή των αποτελεσμάτων ορίστηκε η 1η Απριλίου 2011. Σύμφωνα με τις οδηγίες του διοργανωτή, τα υλικά παρέμειναν σε ψυγείο στους 4 °C ώσπου να αναλυθούν και για τις ανάγκες της σύγκρισης ανασυστάθηκαν με 5 g νερό.

2.2 Αντιδραστήρια

υπερκαθαρό νερό αγωγιμότητας 18,2 MΩ (Elix5/MilliQ Element, Millipore)

οξικό αμμώνιο (LC-MS grade, Fluka)

αιθανόλη (99,9%, BDH)

Κακουλίδης Ηλίας, Αλεξόπουλος Χαράλαμπος, Λαμπή Ευγενία

Γενικό Χημείο του Κράτους

Διεργαστηριακές Δοκιμές Μεταξύ Μετρολογικών Ινστιτούτων ως Μηχανισμός Εξασφάλισης

Ιχνηλασιμότητας στην Εργαστηριακή Ιατρική

4^ο Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας

Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου

Αθήνα, 3-4 Φεβρουαρίου 2012

2.3 Υλικά Αναφοράς & Πιστοποιημένα Υλικά Αναφοράς

SRM 967a (NIST, Gaithersburg, ΗΠΑ)

BCR 575 (IRMM, Geel, Βέλγιο)

κρεατινίνη 99,8% (Sigma Aldrich, ΗΠΑ)

κρεατινίνη- d3, 99% (IsoTech, ΗΠΑ)

2.4 Πειραματική Διαδικασία

2.4.1 Προκατεργασία

Για την προκατεργασία του δείγματος ακολουθήθηκε η πορεία καταβύθισης των πρωτεϊνών [Stokes & O'Connor, 2003]. Συγκεκριμένη ποσότητα δείγματος (~1 g) ζυγίστηκε σε αναλυτικό ζυγό με ακρίβεια 0,01 mg σε φιαλίδιο φυγοκέντρησης. Στο φιαλίδιο προστέθηκαν 3 mL αιθανόλης στην οποία είχε προηγουμένως διαλυθεί κατάλληλη ποσότητα επισημασμένης κρεατινίνης ώστε το αρχικό δείγμα να εμβολιαστεί σε επίπεδο $40 \mu\text{g g}^{-1}$ και ξαναζυγίστηκε. Το αιώρημα αναδεύτηκε επί 30 s σε ταχυναδευτήρα (IKA) και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στις 4000 rpm στους 4°C για 10 min. Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκε ποσοτικά σε φιαλίδια των 10 mL και ξηράνθηκε σε ρεύμα αζώτου. Στη συνέχεια, ανασυστάθηκε με 1 mL υπερκαθαρού νερού και αφού διηθήθηκε από φίλτρα 0,45 μm , οδηγήθηκε σε δειγματοφιαλίδια 1,5 mL για την ανάλυσή του.

2.4.2 Αναλυτική διαδικασία

Τα δείγματα αναλύθηκαν σε διάταξη υγρής χρωματογραφίας – φασματομετρίας μάζας ακριβούς μάζας (LC-MS/MS) της Thermo Finnigan, το οποίο αποτελείται από την αντλία Surveyor MS Pump Plus, τον αυτόματο δειγματολήπτη Surveyor Autosampler Plus Lite και το φασματόμετρο μάζας TSQ Quantum Ultra AM.

Το φασματόμετρο μάζας ήταν εξοπλισμένο με θερμαινόμενη διάταξη ηλεκτροψεκασμού (heated ESI) και διάταξη τριπλού τετράπολου. Το δυναμικό εκνέφωσης τέθηκε στα 4 kV, η θερμοκρασία ψεκασμού στους 130°C και η θερμοκρασία του αγωγού μεταφοράς ιόντων στους 300°C , ενώ η παροχή του αερίου εκνέφωσης ήταν $0,4 \text{ L min}^{-1}$. Οι τιμές του δυναμικού του φακού εστίασης (*tube lens*) και της ενέργειας σύγκρουσης (*collision energy*) που μεγιστοποιούν το σήμα των ανιχνευτών του φασματόμετρου στο πρώτο και το τρίτο τετράπολο προσδιορίστηκαν σε κατάλληλα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε υδατικά διαλύματα κρεατινίνης και κρεατινίνης-d3 συγκέντρωσης $\sim 10 \mu\text{g g}^{-1}$. Η παροχή του αργού ως αερίου κρούσης στο δεύτερο τετράπολο τέθηκε στα 2 bar. Παρακολούθηθηκαν οι μεταπτώσεις των ιόντων με m/z 114 και 117, αντίστοιχα, στα ιόντα με m/z 86 και 89 με τη βοήθεια της ρουτίνας παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων (*multiple reaction monitoring*).

Για το χρωματογραφικό διαχωρισμό των ουσιών χρησιμοποιήθηκε στήλη XTerra-MS C-18 (2,1 mm x 150 mm x 3,5 μm) και ως κινητή φάση ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου 10 mM με ροή $200 \mu\text{L min}^{-1}$. Ο όγκος ένεσης του δειγματολήπτη τέθηκε στα 5 μL .

2.4.3 Προκαταρκτική ανάλυση – μέθοδος εξωτερικού προτύπου

Κακουλίδης Ηλίας, Αλεξόπουλος Χαράλαμπος, Λαμπή Ευγενία

Γενικό Χημείο του Κράτους

Διεργαστηριακές Δοκιμές Μεταξύ Μετρολογικών Ινστιτούτων ως Μηχανισμός Εξασφάλισης

Ιγνηλασιμότητας στην Εργαστηριακή Ιατρική

4^ο Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας

Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου

Αθήνα, 3-4 Φεβρουαρίου 2012

Το σύστημα LC-MS/MS βαθμονομήθηκε με διαλύματα κρεατινίνης σε υπερκάθαρο νερό στην περιοχή συγκεντρώσεων 1 - 50 $\mu\text{g g}^{-1}$, τα οποία είχαν παρασκευαστεί σταθμικά σε ζυγό ακρίβειας 0,1 μg (Metler Toledo UMX 5 mass comparator).

2.4.4 Τελική ανάλυση - ισοτοπική αραιώση με ακριβή αντιστοίχιση (*exact matching isotope dilution*)

Αφού η συγκέντρωση των δειγμάτων εκτιμήθηκε από την καμπύλη αναφοράς, ποσότητα ~ 2.2 g των προς ανάλυση δειγμάτων και των υλικών αναφοράς εμβολιάστηκαν με κατάλληλη ποσότητα επισημασμένης κρεατινίνης-d3 ώστε να επιτευχθούν (κατά το δυνατό) ισομοριακοί λόγοι των δύο ενώσεων. Τα δείγματα παρέμειναν στο ψυγείο για 24 ώρες και στη συνέχεια αναλύθηκαν όπως προηγουμένως, με τη διαφορά ότι οι πρωτεΐνες καταβυθίστηκαν με καθαρή αιθανόλη, καθώς τα δείγματα είχαν ήδη εμβολιαστεί. Κατά τον ίδιο τρόπο αναλύθηκαν και τα πρότυπα υλικά αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν (NIST 967a και IRMM).

2.4.5 Έλεγχος ποιότητας

Για τον έλεγχο ποιότητας χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα κρεατινίνης – επισημασμένης κρεατινίνης στο ίδιο επίπεδο συγκέντρωσης με το πιστοποιημένο υλικό αναφοράς NIST SRM 967a. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης παρεμβλήθηκαν 20 ανάλογα διαλύματα, η συγκέντρωση των οποίων εκτιμήθηκε με βάση τη συγκέντρωση του πιστοποιημένου υλικού αναφοράς.

3. Υπολογισμοί

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της κρεατινίνης στα δείγματα της σύγκρισης, αλλά και για την επιβεβαίωση των τιμών των πιστοποιημένων υλικών αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση της ισοτοπικής αραιώσης [Burke & Mackay, 2008]:

$$w_s = w_c \frac{m_c}{m_s} \frac{m_i}{m_{ic}} \frac{R_s}{R_c}$$

- όπου:
- w_s η συγκέντρωση της κρεατινίνης στο δείγμα
 - w_c η συγκέντρωση της κρεατινίνης στο διάλυμα βαθμονόμησης
 - m_c η μάζα της κρεατινίνης στο διάλυμα βαθμονόμησης
 - m_s η μάζα του δείγματος
 - m_i η μάζα του επισημασμένου διαλύματος που προστίθεται στο δείγμα
 - m_{ic} η μάζα του επισημασμένου διαλύματος που προστίθεται στο βαθμονομητή
 - R_s ο ισοτοπικός λόγος στο δείγμα
 - R_c ο ισοτοπικός λόγος στο βαθμονομητή

Ο υπολογισμός της αβεβαιότητας πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις απαιτήσεις που έχουν τεθεί από τη μετρολογική κοινότητα [JCGM 100, 2008]. Το ισοζύγιο είναι απλό, καθώς η αβεβαιότητα των μετρήσεων είναι συνάρτηση της ακρίβειας των μετρήσεων, της αβεβαιότητας των υλικών αναφοράς και των ζυγίσεων που πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια των αναλύσεων:

Κακουλίδης Ηλίας, Αλεξόπουλος Χαράλαμπος, Λαμπτή Ευγενία
Γενικό Χημείο του Κράτους
Διεργαστηριακές Δοκιμές Μεταξύ Μετρολογικών Ινστιτούτων ως Μηχανισμός Εξασφάλισης
Ιχνηλασιμότητας στην Εργαστηριακή Ιατρική

4^ο Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας
Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου
Αθήνα, 3-4 Φεβρουαρίου 2012

$$u = w_s \sqrt{\left(\frac{u_{mp}}{w_s}\right)^2 + \left(\frac{uw_c}{w_c}\right)^2 + \left(\frac{um_s}{m_s}\right)^2 + \left(\frac{um_i}{m_i}\right)^2 + \left(\frac{um_c}{m_c}\right)^2 + \left(\frac{um_{ic}}{m_{ic}}\right)^2}$$

όπου η αβεβαιότητα που προκύπτει από τη μέθοδο είναι $u_{mp} = \frac{SD}{\sqrt{n}}$, όπου n οι επαναλήψεις.

4. Συζήτηση και Αποτελέσματα

Η κρεατινίνη αποτελεί τον πλέον διαδεδομένο δείκτη για την αξιολόγηση της νεφρικής λειτουργίας [Lamb & Price, 2008]. Πρόκειται για ένα προϊόν του μεταβολισμού των πρωτεϊνών, το οποίο σχηματίζεται από την αυθόρμητη κυκλοποίηση της κρεατίνης. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της κρεατινίνης στον ορό αίματος πραγματοποιείται με σκοπό την αξιολόγηση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης (*glomerular filtration rate* - eGFR). Υψηλές συγκεντρώσεις αποτελούν ένδειξη χρόνιων νεφρικών νοσημάτων που ενδέχεται να οδηγήσουν σε νεφρική ανεπάρκεια. Στην καθημερινή πρακτική, στα κλινικά εργαστήρια η παράμετρος αυτή ελέγχεται χρησιμοποιώντας αναλυτικές προσεγγίσεις που κάνουν χρήση της αντίδρασης Jaffe, κατά την οποία η κρεατινίνη αντιδρά με πικρικές ενώσεις προς το σχηματισμό συμπλόκων ερυθρού χρώματος, η ένταση του οποίου προσδιορίζεται με φωτομετρικές τεχνικές. Οι προσεγγίσεις αυτές είναι προβληματικές, καθώς έχει αποδειχθεί ότι η αντίδραση δεν είναι εκλεκτική και επηρεάζεται από πληθώρα παραγόντων (π.χ. το επίπεδο συγκέντρωσης πρωτεϊνών, γλυκόζης και χολερυθρίνης) [Spencer, 1986]. Πρόσφατα, ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της κρεατινίνης σε ορό αίματος πραγματοποιείται με ενζυμικές μεθόδους, οι οποίες φαίνεται να μην παρουσιάζουν προκατάληψη (*bias*) έναντι της πρωτεύουσας μεθόδου [Panteghini, 2008]. Κατά συνέπεια, υπάρχει ανάγκη για την ανάπτυξη υλικών και μεθόδων αναφοράς για να εκτιμηθεί η ακρίβεια των μετρήσεων κρεατινίνης.

Η κρεατινίνη αποτελεί μία από τις δεκάδες παραμέτρους που προσδιορίζονται καθημερινά από τα κλινικά εργαστήρια σε όλο τον κόσμο. Όπως προαναφέρθηκε, η ακρίβεια των εν λόγω μετρήσεων δεν είχε τύχει της απαραίτητης προσοχής, γεγονός που βρίσκεται σε πλήρη αντιδιαστολή με τη σημασία τους για την ανθρώπινη υγεία. Το γεγονός αυτό καταδείχτηκε πρόσφατα με τη διεργαστηριακή μελέτη IMEP-17 που πραγματοποιήθηκε με ευθύνη του IRMM (Κοινοτικό Ινστιτούτο Υλικών και Μεθόδων Αναφοράς), όταν για αρκετές από τις παραμέτρους που μετρήθηκαν σε ορό αίματος παρουσίασαν αποκλίσεις της τάξης του 100% σε σχέση με τις τιμές αναφοράς, αρκετές από τις οποίες ήταν στα όρια λήψης ιατρικών αποφάσεων (!). Η εφαρμογή της οδηγίας 98/79/EK ήρθε να εξομαλύνει την κατάσταση, απαιτώντας από τους παραγωγούς εξοπλισμού και αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται από κλινικά εργαστήρια να ιχνηλατούν τα προϊόντα τους σε πρότυπα και μεθόδους της ανώτατης μετρολογικής τάξης [ISO 17511; CLSI, 2006; Armbruster, 2009].

Το θέμα άρχισε δειλά να απασχολεί πλέον πολύ σοβαρά την παγκόσμια κοινότητα των κλινικών δοκιμών [Franzini & Ceriotti, 1998; Kenny et al., 1999], με αποτέλεσμα τη στιγμή αυτή να έχει συγκεντρωθεί αρκετή και σημαντική βιβλιογραφία [Siekman 2007; Panteghini, 2007 & 2009; Vesper & Thienpont, 2009]. Όπως εύστοχα αναφέρει η Thienpont: «καιρός ήταν να ξυπνήσει με ένα φιλί η ωραία κοιμωμένη» [2008]. Η ευρωπαϊκή οδηγία οδήγησε σύντομα στην ανάπτυξη υλικών και μεθόδων [Dybkaer, 2001; Bunk, 2007] για την υποστήριξη των κλινικών μετρήσεων, αλλά και διεθνών προτύπων για τη διαχείρισή τους [ISO 15191 έως ISO 15195]. Το θέμα φαίνεται

Κακουλίδης Ηλίας, Αλεξόπουλος Χαράλαμπος, Λαμπή Ευγενία

Γενικό Χημείο του Κράτους

Διεργαστηριακές Δοκιμές Μεταξύ Μετρολογικών Ινστιτούτων ως Μηχανισμός Εξασφάλισης

Ιχνηλασιμότητας στην Εργαστηριακή Ιατρική

4^ο Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας

Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου

Αθήνα, 3-4 Φεβρουαρίου 2012

να είναι ανεξάντλητο, καθώς η αυξανόμενη εμπλοκή βιολογικών παραμέτρων στα υπό μελέτη συστήματα δίνει πλειάδα κατευθύνσεων προς αναζήτηση. Η επιστημονική κοινότητα έχει θέσει ως βασική επιταγή την εφαρμογή ενός εναρμονισμένου πλαισίου για την αξιοπιστία στις κλινικές δοκιμές [Miller et al., 2011].

Θεμελιώδης προϋπόθεση για την επίτευξη συγκρίσιμων εργαστηριακών αποτελεσμάτων στις κλινικές δοκιμές ιχνηλάσιμων στο Διεθνές Σύστημα μονάδων αποτελεί η διερεύνηση της ισοδυναμίας των διαθέσιμων υλικών αναφοράς και των αναλυτικών μεθοδολογιών στο ανώτατο μετρολογικό επίπεδο. Αυτό επιτυγχάνεται με την υλοποίηση διεργαστηριακών συγκρίσεων μεταξύ μετρολογικών ινστιτούτων και γνωστοποιημένων εργαστηρίων (*key comparisons*). Για το σκοπό αυτό, και όσον αφορά στον προσδιορισμό της κρεατινίνης, υπό την αιγίδα της CCQM έχουν ήδη διεξαχθεί δύο συγκρίσεις-κλειδιά οι οποίες συντονίστηκαν από το Εθνικό Ινστιτούτο Προτύπων και Τεχνολογίας των ΗΠΑ (NIST, *National Institute for Standards and Technology*), για τον προφανή λόγο της ανάπτυξης κατάλληλων υλικών αναφοράς (NIST SRM 914 - κρεατινίνη, και NIST SRM 967: κρεατινίνη σε ορό αίματος). Η πρώτη διεργαστηριακή σύγκριση πραγματοποιήθηκε σε πιλοτικό επίπεδο το 2000 (CCQM-P.9) και η δεύτερη το 2003 (CCQM-K.12). Τα αποτελέσματα που υπέβαλαν τα μετρολογικά ινστιτούτα υπέδειξαν ότι υπάρχει άριστη συμφωνία, καθώς όλες οι τιμές που αναφέρθηκαν περιείχαν την τιμή αναφοράς για τη σύγκριση-κλειδί (KCRV: *key comparison reference value*) εντός του διαστήματος των αβεβαιοτήτων τους. Η σύγκριση-κλειδί CCQM-K.80 πραγματοποιήθηκε με σκοπό να καλυφθούν οι ανάγκες που προέκυψαν από τη διάθεση νέων πιστοποιημένων υλικών αναφοράς στην αγορά.

Στη σύγκριση αυτή, τα μετρολογικά ινστιτούτα κλήθηκαν να εφαρμόσουν πρωτεύουσες μεθόδους, όπως ακριβώς υπαγορεύει η ευρωπαϊκή οδηγία. Η φασματομετρία μάζας με χρήση τεχνικών ισοτοπικής αραίωσης (IDMS) έχει χρησιμοποιηθεί ως τεχνική υψηλής αξιοπιστίας, ιδιαίτερα σε σχέση με τον προσδιορισμό της ποσότητας στοιχείων [Heumann, 1982]. Έχει αναγνωριστεί ως μια πρωτεύουσα μέθοδος αναλογιών που έχει τη δυνατότητα παροχής μετρήσεων ιχνηλάσιμων στο Διεθνές Σύστημα Μονάδων [Milton & Wielgosz, 2000]. Την τελευταία δεκαετία η τεχνική βρίσκει ευρεία εφαρμογή στον προσδιορισμό οργανικών ενώσεων [Sargent et al., 2002], ενώ χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο στον τομέα της κλινικής χημείας [Chase, 2001; Garg & Hammett-Stabler, 2009]. Η τεχνική της ακριβούς αντιστοίχισης (*exact matching*) βελτιώνει την αξιοπιστία της μεθόδου [Henrion, 1994; Thienpont et al., 1998]. Η τεχνική έχει στόχο να μειώσει την αβεβαιότητα των λόγων της έντασης του σήματος του αναλύτη ως προς εκείνο της επισημασμένης ουσίας, με τη χρήση ισομοριακών ποσοτήτων της τελευταίας ως εσωτερικού προτύπου στη διεξαγωγή της ανάλυσης.

Στον Πίνακα I παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στα πιστοποιημένα υλικά αναφοράς, στο υλικό ελέγχου ποιότητας αλλά και στα δοκίμια που αποτέλεσαν αντικείμενο της σύγκρισης-κλειδί CCQM-K.80. Όπως φαίνεται από τα δεδομένα που παρουσιάζονται στον πίνακα, η επαναληψιμότητα της μεθόδου είναι ικανοποιητική. Παράλληλα, αποδεικνύεται η καταλληλότητα της μεθόδου για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης σε ορό αίματος, καθώς η ανάλυση των δύο υλικών έδωσε αποτελέσματα εντός των ορίων των πιστοποιητικών τους.

Κακουλίδης Ηλίας, Αλεξόπουλος Χαράλαμπος, Λαμπή Ευγενία
Γενικό Χημείο του Κράτους
Διεργαστηριακές Δοκιμές Μεταξύ Μετρολογικών Ινστιτούτων ως Μηχανισμός Εξασφάλισης
Ιχνηλασιμότητας στην Εργαστηριακή Ιατρική

4^ο Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας
Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου
Αθήνα, 3-4 Φεβρουαρίου 2012

Πίνακας I: Αναλυτικά δεδομένα από την εφαρμογή της τεχνικής IDMS σε πιστοποιημένα και πρότυπα υλικά καθώς και στα δείγματα της σύγκρισης-κλειδί CCQM-K.80.

υλικό	‘αποδιδόμενη’ τιμή	αβεβαιότητα	αριθμός επαναλήψεων	πειραματική τιμή	% RSD
SRM 967a	37,90 mg g ⁻¹	0,82	14	38,17 mg g ⁻¹	1,92
ERM 575	404,1 μmol L ⁻¹	7,1	3	402,5 μmol L ⁻¹	1,82
in-house	39,15 mg L ⁻¹	-	20	39,39 mg L ⁻¹	1,79
RELA A	-	-	9	56,521 mg g ⁻¹	1,87
RELA B	-	-	9	39,379 mg g ⁻¹	1,83

Στο Σχήμα 1 παρατίθεται ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα ανάλυσης κρεατινίνης. Πρόκειται για την ανάλυση του πραγματοποιήθηκε στο πιστοποιημένο υλικό αναφοράς NIST SRM 967a. Στο άνω μέρος του σχήματος καταγράφεται το χρωματογράφημα του συνολικού σήματος (TIC), ενώ στο μέσο και το κάτω μέρος του τμήματος φαίνονται τα χρωματογραφήματα της κρεατινίνης και της επισημασμένης κρεατινίνης, αντίστοιχα. Όπως φαίνεται, ο λόγος των εμβαδών του αναλύτη και του εσωτερικού προτύπου είναι πολύ κοντά στη μονάδα.

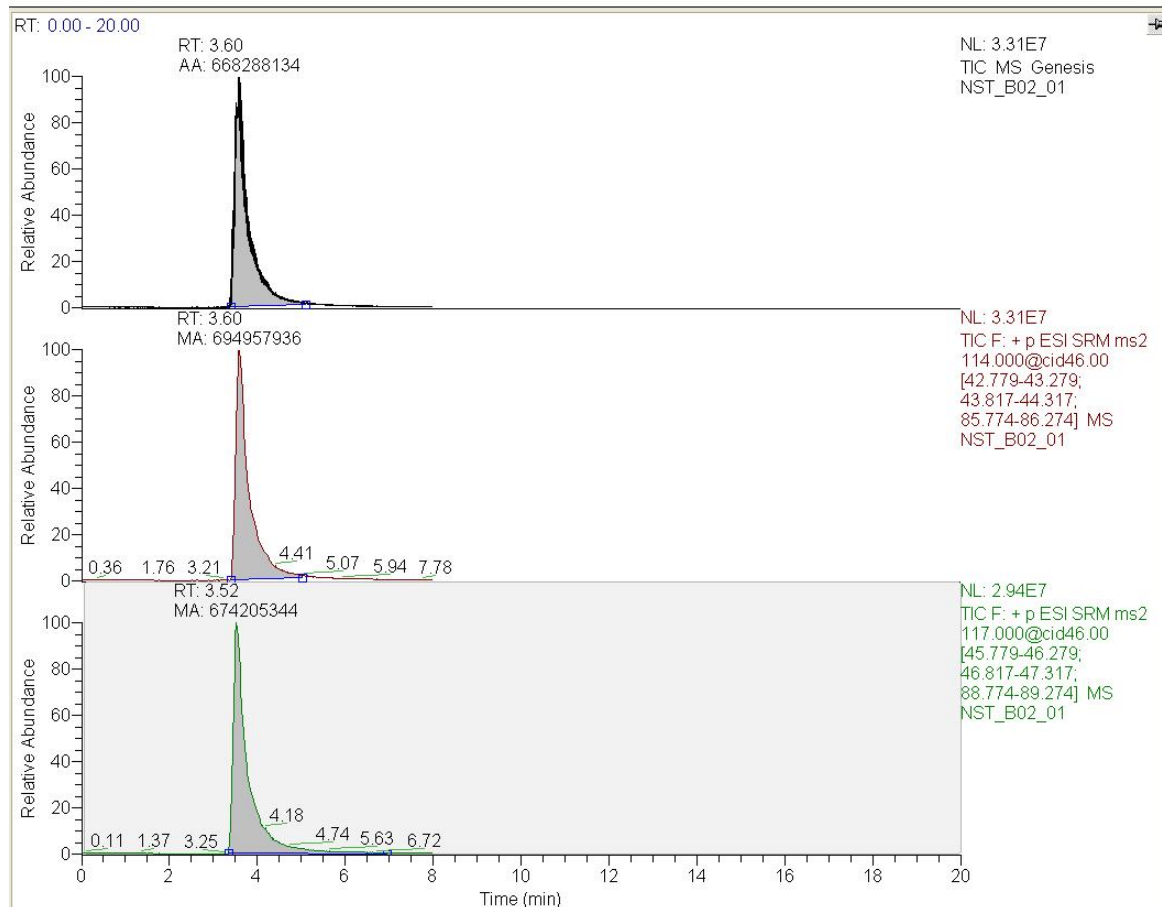
Κακουλίδης Ηλίας, Αλεξόπουλος Χαράλαμπος, Λαμπή Ευγενία
 Γενικό Χημείο του Κράτους
 Διεργαστηριακές Δοκιμές Μεταξύ Μετρολογικών Ινστιτούτων ως Μηχανισμός Εξασφάλισης
 Ιχνηλασιμότητας στην Εργαστηριακή Ιατρική

4^ο Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας
 Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου
 Αθήνα, 3-4 Φεβρουαρίου 2012

Σχήμα 1: Προσδιορισμός κρεατινίνης με τη μέθοδο LC-ID-MS/MS

C:\xcaliburA... \201110331_02\NST_B02_01

1/4/2011 5:21:28 am



Χαρακτηριστικό της τεχνικής και των πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει έναντι των καθιερωμένων τεχνικών φασματομετρίας μάζας αποτελεί το γεγονός ότι το πηλίκιο των ισοτοπικών λόγων τείνει στη μονάδα, με αποτέλεσμα η τεχνική να καθίσταται λιγότερο εξαρτημένη από τη συμπεριφορά των αναλυτών στο φασματόμετρο μάζας. Το γεγονός αυτό αποτυπώνεται στο ισοζύγιο αβεβαιοτήτων που παρατίθεται στον Πίνακα II.

Πίνακας II: Ισοζύγιο αβεβαιοτήτων για τον προσδιορισμό κρεατινίνης σε ορό αίματος στα δείγματα RELA A και RELA B.

	παράγοντας αβεβαιότητας	RELA A	RELA B
τυπική	ακρίβεια μεθόδου (n = 9)	0,0062	0,0062
	w_c	0,0106	0,0106
	m_c	< 0,0001	< 0,0001
	m_s	< 0,0001	< 0,0001
	m_i	< 0,0001	< 0,0001

Κακουλίδης Ηλίας, Αλεξόπουλος Χαράλαμπος, Λαμπή Ευγενία

Γενικό Χημείο του Κράτους

Διεργαστηριακές Δοκιμές Μεταξύ Μετρολογικών Ινστιτούτων ως Μηχανισμός Εξασφάλισης

Ιχνηλασιμότητας στην Εργαστηριακή Ιατρική

4^ο Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας

Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου

Αθήνα, 3-4 Φεβρουαρίου 2012

	m_{ic}	< 0,0001	< 0,0001
	μάζα νερού ανασύστασης	< 0,0001	< 0,0001
	μάζα λυοφιλωμένου ορού	< 0,0001	< 0,0001
	συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα, mg g^{-1}	0,6937	0,4807
	διευρυμένη τυπική αβεβαιότητα ($k=2$), mg g^{-1}	1,3873	0,9614

5. Συμπεράσματα

Αν και η έκδοση της τελικής έκθεσης αξιολόγησης εκκρεμεί από το NIST, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μετρήσεων, το EXHM έχει τη δυνατότητα να υποβάλει στοιχεία για την αναγνώριση του πρώτου συνόλου ικανοτήτων βαθμονόμησης και μέτρησης (CMCs) μεγεθών για την ποσότητα της ουσίας (κρεατινίνη) σε ένα ευρύτατο επίπεδο τιμών. Σε συνδυασμό με τις διαδικασίες διαπίστευσής του ως παραγωγού υλικών αναφοράς σύμφωνα με τον οδηγό ISO Guide 34 έχει τη δυνατότητα να αναπτύξει κατάλληλα πιστοποιημένα υλικά αναφοράς για την υποστήριξη της εγχώριας αγοράς, αλλά και της αγοράς της νοτιοανατολικής Ευρώπης. Ακόμη, έχει τη δυνατότητα να παρέχει τιμές αναφοράς στις διεργαστηριακές δοκιμές που διοργανώνονται από την Ελληνική Αιματολογική Εταιρία με απευθείας ιχνηλάτισή τους στο Διεθνές Σύστημα Μονάδων.

Καθώς η τάση στην παγκόσμια μετρολογική κοινότητα έχει στραφεί σαφώς προς την υποστήριξη των δραστηριοτήτων που αφορούν σε κλινικές δοκιμές, ένα σεβαστό κομμάτι των εργασιών του EXHM θα ήταν σκόπιμο να στραφεί προς την κατεύθυνση αυτή, με σκοπό την ανάπτυξη υπηρεσιών που θα υποστηρίζουν τη μετρολογική διάσταση των κλινικών μετρήσεων στη χώρα μας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ: Οι συγγραφείς επιθυμούν να ευχαριστήσουν όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Κλινικής Χημείας του Νοσοκομείου Άγιος Σάββας και ιδιαίτερος τη διευθύντριά του κα. Δρ. Α. Φρεδερίγου για την υποστήριξη και τις συμβουλές που προσέφεραν.

6. Βιβλιογραφία

- Armbruster, D. (2009): Measurement traceability and US IVD manufacturers: the impact of metrology. *Accred. Qual. Assur.*, 14, 393.
- Armbruster, D.; Miller, R.R. (2007): The Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM): a global approach to promote the standardization of clinical laboratory test results. *Clin. Biochem. Rev.*, 28, 105.
- Bunk, D.M. (2007): Reference Materials and Reference Measurement Procedures: An Overview from a National Metrology Institute. *Clin. Biochem. Rev.*, 28, 131.
- Burke, D.G.; Mackay, L.G. (2008): Complete equation for the measurement of organic molecules using stable isotope labeled internal standards, exact matching and mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 80, 5071.

Κακουλίδης Ηλίας, Αλεξόπουλος Χαράλαμπος, Λαμπή Ευγενία
Γενικό Χημείο του Κράτους
Διεργαστηριακές Δοκιμές Μεταξύ Μετρολογικών Ινστιτούτων ως Μηχανισμός Εξασφάλισης
Ιχνηλασιμότητας στην Εργαστηριακή Ιατρική

4^ο Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας
Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου
Αθήνα, 3-4 Φεβρουαρίου 2012

- Chase, D.H. (2001): Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory. Chem. Rev., 101, 445.
- CLSI (2006): Metrological traceability and its implementation. CLSI document X5-R. CLSI: Wayne, PA.
- Dai, X.; Fang, X.; Shao, M.; Li, M.; Huang, Z.; Li, H.; Jiang, Y.; Song, D.; He, Y. (2010): Certified reference materials (GBW09170 and 09171) of creatinine in human serum. J. Chrom. B, 879, 429.
- Directive 98/79/EC (1998) of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices. Official Journal of the European Communities, L 331, 1.
- Dodder, N.G.; Tai, S.C.S.; Sniegowski, L.T.; Zhang, N.F.; Welch, M.J. (2007): Certification of Creatinine in a Human Serum Reference Material by GC-MS and LC-MS. Clin. Chem., 53, 1694.
- Dybkaer R. (2001): Metrology in laboratory medicine - Reference measurement systems. Accred. Qual. Assur., 6, 16.
- EN ISO 15193 (2003): In vitro diagnostic medical devices - measurement of quantities in samples of biological origin - presentation of reference measurement procedures. ISO: Geneva.
- EN ISO 15194 (2003): In vitro diagnostic medical devices - measurement of quantities in samples of biological origin - description of reference materials. ISO: Geneva
- Franzini, C.; Ceriotti, F. (1998): Impact of reference materials on accuracy in clinical chemistry. Clin. Biochem. 31, 449.
- Garg, U.; Hammett-Stabler, C.A. [eds] (2009): Clinical Applications of Mass Spectrometry. Humana Press: New York, NY.
- Greenberg, N. (2001): Calibrator traceability: the industry impact of the IVD Directive's new requirements. IVD Technology, 7, 18.
- Henrion, A. (1994): Reduction of systematic errors in quantitative analysis by isotope dilution mass spectrometry (IDMS): an iterative method. Fresenius J. Anal. Chem., 350, 657.
- Heumann, K.G. (1982): Isotopic analyses of inorganic and organic substances by mass spectrometry. Int. J. Mass Spect. Ion Phys., 45, 87.
- ISO 17511 (2003) In vitro diagnostic medical devices - measurement of quantities in biological samples - metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials. ISO: Geneva.
- JCGM 100 (2008): Evaluation of Measurement Data - Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM), Joint Committee for Guides in Metrology, Sevres.
- Kenny, D.; Fraser, C.G.; Hyltoft Petersen, P.; Kallner, A. (1999): Strategies to set global analytical quality specifications in laboratory medicine. Consensus agreement. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 59, 475.
- Lamb, E.J.; Price, C.P. (2008): Creatinine, urea and uric acid. in: Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 6th Ed. Saunders: St Louis, MI, 363.
- Miller, W.G.; Myers, G.L.; Gantzer, M.L.; Kahn, S.E.; Schönbrunner, E.R.R.; Thienpont, L.M.; Bunk, D.M.; Christenson, R.H.; Eckfeldt, J.H.; Lo, S.F.; Nubling, C.M. Sturgeon, C.M. (2011): Κακουλίδης Ηλίας, Αλεξόπουλος Χαράλαμπος, Λαμπή Ευγενία
Γενικό Χημείο του Κράτους
Διεργαστηριακές Δοκιμές Μεταξύ Μετρολογικών Ινστιτούτων ως Μηχανισμός Εξασφάλισης
Ιχνηλασιμότητας στην Εργαστηριακή Ιατρική

- Roadmap for Harmonization of Clinical Laboratory Measurement Procedures. *Clin. Chem.*, 57, 1108.
- Milton, M.; Quinn, R. (2001): Primary methods for the measurement of amount of substance. *Metrologia*, 38, 289.
- Milton, M.; Wielgosz, R. (2000): Uncertainty in SI-traceable measurements of amount of substance by isotope dilution mass spectrometry. *Metrologia*, 37, 199.
- Panteghini, M. (2009): Traceability as a unique tool to improve standardization in laboratory medicine. *Clin. Biochem.*, 42, 236.
- Panteghini, M. (2008): Enzymatic assays for creatinine: time for action. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 46, 567.
- Panteghini, M. (2007): Traceability, Reference Systems and Result Comparability. *Clin. Biochem. Rev.*, 28, 97.
- Sargent, M.; Harrington, C.; Harte, R. (2002): Guidelines for Achieving High Accuracy in Isotope Dilution Mass Spectrometry. RSC: Cambridge
- Siekman, L. (2007): Requirements for Reference (Calibration) Laboratories in Laboratory Medicine. *Clin. Biochem. Rev.*, 28, 155.
- Spencer, K. (1986): Analytical reviews in clinical biochemistry: the estimation of creatinine. *Ann. Clin. Biochem.*, 23, 1.
- Simpson, K.L.; Whetton, A.D.; Dive, C. (2009): Quantitative mass spectrometry-based techniques for clinical use: Biomarker identification and quantification. *J. Chrom. B*, 877, 1240.
- Stokes, P.; O'Connor, P.G. (2003): Development of liquid chromatography-mass spectrometry method for the high-accuracy determination of creatinine in serum. *J. Chrom. B*, 794, 125.
- Thienpont, L.M. (2008): Accuracy in clinical chemistry: who will kiss Sleeping Beauty awake? *Clin. Chem. Lab. Med.*, 46, 1220.
- Thienpont, L.M.; Van Nieuwenhove, B.; Stockl, D.; De Leenheer, A.P. (1998): Calibration for Isotope Dilution Mass Spectrometry - Description of an Alternative to the Bracketing Procedure. *J. Mass Spectrometry*, 31, 1119.
- Thienpont, L.M.; Van Uytanghe, K.; De Leenheer, A.P. (2002): Reference measurement systems in clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta*, 323,73.
- Tietz, N.W. (1994): Accuracy in clinical chemistry - does anybody care? *Clin. Chem.*, 40, 859.
- Vesper, H.W.; Thienpont, L.M. (2009): Traceability in laboratory medicine. *Clin. Chem.*, 55, 1067.

Κακουλίδης Ηλίας, Αλεξόπουλος Χαράλαμπος, Λαμπτή Ευγενία
Γενικό Χημείο του Κράτους
Διεργαστηριακές Δοκιμές Μεταξύ Μετρολογικών Ινστιτούτων ως Μηχανισμός Εξασφάλισης
Ιχνηλασιμότητας στην Εργαστηριακή Ιατρική

4^ο Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας
Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου
Αθήνα, 3-4 Φεβρουαρίου 2012