

# ΠΡΟΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΝΑΡΜΟΝΙΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ

Παπανδρέου Α., Μπένου Ν., Κούρτη Ν., Λυκόκα Ε., Πιπεράκη Κ., Πρίγκος Ν., Γαρουφαλή Α. και Πουλάκη Ε.

Βιοχημικό – Ορμονολογικό εργαστήριο, ΓΑΟΝΑ «ο Άγιος Σάββας», Αθήνα  
e-mail: zispap@tee.gr

## Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια, τα κλινικά εργαστήρια όλο και συχνότερα στρέφουν την προσοχή τους στο θέμα της ιχνηλασιμότητας των αποτελεσμάτων τους και της προτυποποίησης των μεθόδων τους. Κι αυτό, γιατί η εφαρμογή των κλινικών οδηγιών τόσο για διαγνωστικούς όσο και για θεραπευτικούς σκοπούς είναι δυνατή, μόνο όταν τα αποτελέσματα διαφορετικών εργαστηρίων, για την ίδια παράμετρο, είναι συγκρίσιμα. Στην παρούσα εργασία, θα παρουσιαστούν παραδείγματα για ένα ευρύ φάσμα μετρήσεων στο κλινικό εργαστήριο, στο ένα άκρο του οποίου βρίσκονται ουσίες που η μέτρησή τους μπορεί να προτυποποιηθεί, καθώς έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι αναφοράς και υπάρχουν πρότυπα υλικά. Στο άλλο άκρο του φάσματος, είναι δύσκολη ακόμα και η εναρμόνιση των μετρήσεων διαφορετικών εργαστηριακών διεργασιών, επειδή είτε υπάρχουν προβλήματα στον ορισμό της μετρούμενης παραμέτρου, είτε η αναλυτική ειδικότητα είναι περιορισμένη, είτε τέλος, η συμπεριφορά των υλικών αναφοράς διαφέρει από εκείνη των βιολογικών δειγμάτων.

Η εναρμόνιση των μετρήσεων είναι μια πρόκληση που απαιτεί συνεργασία, σε διεθνές επίπεδο, επιστημονικών εταιρειών, κατασκευαστών in vitro διαγνωστικών, κλινικών εργαστηρίων, ινστιτούτων μετρολογίας και ρυθμιστικών οργάνων, ώστε να δημιουργηθεί η κατάλληλη υποδομή που θα επιτρέπει την επιλογή των παραμέτρων στις οποίες θα δοθεί προτεραιότητα και θα εξασφαλίζει το συντονισμό των προσπαθειών προς την κατεύθυνση της προτυποποίησης ή εναρμόνισης των μετρήσεων τους

*Λέξεις-κλειδιά: προτυποποίηση, εναρμόνιση, ιχνηλασιμότητα, κλινική χημεία*

## Abstract

Over the last few years there is much concern about traceability and method standardization in clinical chemistry. This is because the generation of analytical results that are comparable and independent of the measurement system will allow the formation of general guidelines for disease diagnosis and patient management.

Standardization has already been accomplished for several analytes for which reference measurement systems exist but for the majority of the measurands in clinical chemistry even the harmonization is problematic.

Standardization-harmonization is a challenge for clinical and laboratory organizations, regulatory bodies, government agencies and in vitro diagnostic manufacturers to create an infrastructure for the more systematic identification and prioritization of the measurands to be standardized and for the management of the technical implementation on a global basis.

*Keywords: standardization, harmonization, traceability, clinical chemistry*

## 1. Εισαγωγή

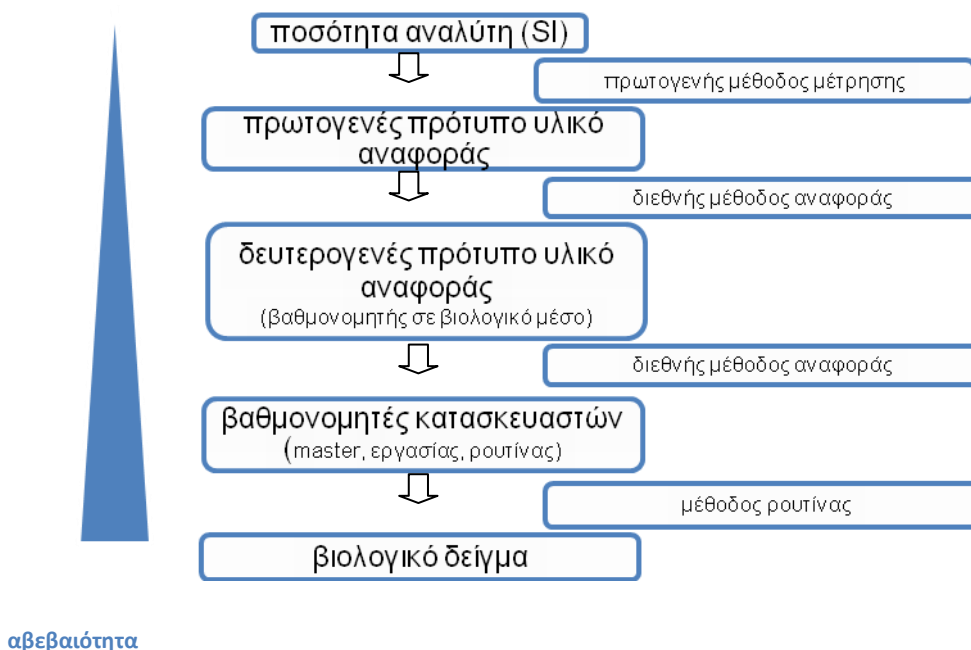
Τις τελευταίες δεκαετίες η αυτοματοποίηση των τεχνικών συστημάτων οδήγησε την εργαστηριακή ιατρική σε μια εξαιρετική ανάπτυξη των δυνατοτήτων της, έτσι ώστε το κλινικό εργαστήριο να έχει ένα ρόλο κομβικό στη διάγνωση της ασθένειας αλλά και στη διαχείριση της. Επομένως, η ακρίβεια και ειδικότερα η ορθότητα των αποτελεσμάτων των εργαστηριακών μετρήσεων αποκτά ιδιαίτερη σημασία.

Στην πραγματικότητα όμως, εμφανίζεται συχνά το φαινόμενο διαφορετικές μέθοδοι μετρήσεως μιας ποσότητας να παράγουν διαφορετικά αποτελέσματα, τα οποία είναι δυνατό να εκτιμηθούν μόνο μέσα στο πλαίσιο που ορίζουν οι τιμές αναφοράς που αντιστοιχούν στη μέθοδό τους (Thienpont et al, 2003). Χάνεται έτσι η δυνατότητα να αξιοποιηθούν η εμπειρία και τα συμπεράσματα διεθνών κλινικών μελετών για να δημιουργηθούν κατάλληλα πρωτόκολλα και οδηγίες κλινικής πρακτικής. Ακόμα χειρότερα, η άγνοια για αυτή την απόκλιση των αποτελεσμάτων διαφορετικών τεχνικών μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένες διαγνωστικές ή θεραπευτικές αποφάσεις.

Το αίτημα για συγκρίσιμα αποτελέσματα στην κλινική χημεία μπορεί να ικανοποιηθεί με την εφαρμογή διαδικασιών προτυποποίησης στα συστήματα αναφοράς των μετρήσεων. Στην προσπάθεια αυτή εμπλέκονται κρατικοί φορείς, ινστιτούτα μετρολογίας, διεθνείς οργανισμοί προτυποποίησης, επιστημονικές εταιρείες και φυσικά, η βιομηχανία των *in vitro* διαγνωστικών.

## 2. Προτυποποίηση ή εναρμόνιση

Η πορεία προς την προτυποποίηση ξεκινά με την εφαρμογή βασικών αρχών της μετρολογίας στα μετρητικά συστήματα της κλινικής χημείας. Ένα σύστημα μετρήσεων βασισμένο στις αρχές της ιχνηλασιμότητας και της ιεράρχησης των αναλυτικών τεχνικών, όπως αυτό που παρουσιάζεται στην Εικόνα 1, εξασφαλίζει την αξιόπιστη μεταφορά των



Εικόνα 1. Ιεράρχηση των μεθόδων και των βαθμονομητών και ιχνηλασιμότητα στο SI

τιμών που λαμβάνονται σε ένα ανώτερο ιεραρχικά επίπεδο προς τις μεθόδους ρουτίνας των κλινικών εργαστηρίων (Müller, 2000). Σημεία-κλειδιά ενός τέτοιου συστήματος είναι η ανάπτυξη προτύπων υλικών και μεθόδων αναφοράς καθώς και η δημιουργία ενός δικτύου εργαστηρίων αναφοράς που λειτουργούν ως συνδετικός κρίκος των εργαστηρίων ρουτίνας με τον κόσμο των προτύπων υλικών και μεθόδων.

Η αλυσίδα ιχνηλασιμότητας της Εικόνας 1 προϋποθέτει τη διαθεσιμότητα υλικών και μεθόδων αναφοράς. Στην κλινική χημεία κι ακόμα περισσότερο στο γενικότερο πεδίο της εργαστηριακής ιατρικής, η κατάσταση αυτή αποτελεί μάλλον την εξαίρεση. Έτσι, ανάλογα με την περίπτωση, πρέπει να σχηματιστούν εναλλακτικές αλυσίδες ιχνηλασιμότητας. Υπάρχουν 5 διαφορετικές εκδοχές για τα διάφορα συστήματα μετρήσεων όπως συνοψίζονται στο πρότυπο ISO 17511:2003 (Πίνακας 1).

Στην πρώτη περίπτωση, οι φυσικές και χημικές ιδιότητες της μετρούμενης ουσίας είναι γνωστές και υπάρχουν τόσο πρωτογενή πρότυπα όσο και μέθοδος αναφοράς για την ανάλυσή της. Οι μετρήσεις είναι ιχνηλάσιμες σε κάποια μονάδα του SI. Παραδείγματα τέτοιων αναλυτών είναι οι ηλεκτρολύτες, η γλυκόζη, η χοληστερόλη, η κορτιζόλη και ορισμένα φάρμακα.

Στην δεύτερη περίπτωση δεν υπάρχει πρωτογενές υλικό αναφοράς για τη μετρούμενη παράμετρο, όμως, έχει συμφωνηθεί σε διεθνές επίπεδο ποιο θα είναι το δευτερογενές υλικό αναφοράς και ποια η μετρητική διαδικασία αναφοράς. Τυπικό παράδειγμα είναι η ολική αιμοσφαιρίνη, της οποίας το κυανιούχο παράγωγο προσδιορίζεται φωτομετρικά με βαθμονομητή το CRM 522, ένα πιστοποιημένο υλικό αναφοράς που έχει παρασκευαστεί με πρώτη ύλη βόειο αίμα.

Για τις μετρήσεις που αντιστοιχούν στην τρίτη κατηγορίας του Πίνακα 1 έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι αναφοράς που είναι γενικά αποδεκτές, όμως δεν υπάρχει διεθνώς συμφωνία ως προς το πρότυπο που θα χρησιμοποιηθεί ως βαθμονομητής. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι ο προσδιορισμός της ενεργότητας ενζύμων όπως η γαλακτική αφυδρογονάση (LDH), η ασπαρτική αμινοτρανσφεράση (AST) και η κινάση της κρεατίνης (CK). (Infusino et al, 2007) Η Διεθνής Ομοσπονδία Κλινικής Χημείας (IFCC) έχει εποπτεύσει την ανάπτυξη τεχνικών μέτρησης τις οποίες προτείνει, παράλληλα όμως, υπάρχουν και εφαρμόζονται κι άλλες μέθοδοι.

Η τέταρτη κατηγορία περιλαμβάνει μετρούμενες ποσότητες για τις οποίες είναι διαθέσιμο τουλάχιστον ένα πρότυπο υλικό χωρίς να υπάρχει διεθνώς αναγνωρισμένη μέθοδος αναφοράς. Στο πρότυπο υλικό αποδίδεται, κατά σύμβαση, μια τιμή η οποία εκφράζεται σε αυθαίρετες μονάδες (π.χ. Διεθνείς μονάδες). Η β-χοριακή γοναδοτροπίνη και το ειδικό προστατικό αντιγόνο είναι παραδείγματα τέτοιων ουσιών.

Πίνακας 1. Κατηγορίες συστημάτων αναφοράς σύμφωνα με το πρότυπο ISO 17511:2003

Κατηγορία	Μέθοδος μέτρησης αναφοράς	Πρωτογενές υλικό αναφοράς	Δευτερογενές υλικό αναφοράς
1	Ναι	Ναι	Πιθανόν
2	Ναι	Όχι	Πιθανόν
3	Ναι	Όχι	Όχι
4	Όχι	Όχι	Ναι
5	Όχι	Όχι	Όχι

Στην πέμπτη κατηγορία τέλος, ανήκουν αναλύτες για τους οποίους δεν υπάρχουν ούτε πρότυπα ούτε μέθοδοι αναφοράς. Κάθε κατασκευαστής επιλέγει με τα δικά του κριτήρια το πρότυπο υλικό που θα χρησιμοποιήσει ως βαθμονομητή, οπότε τα αποτελέσματα διαφορετικών μεθόδων είναι ιχνηλάσιμα σε πολύ διαφορετικά αρχικά υλικά και γι αυτό είναι δυνατό να αποκλίνουν πολύ το ένα από το άλλο.

Για την πρώτη, δεύτερη και τρίτη κατηγορία, η ύπαρξη καθιερωμένων μεθόδων αναφοράς διευκολύνει την προτυποποίηση, δηλ. τη δημιουργία συνολικά μετρητικών συστημάτων αναφοράς. Στις τελευταίες δυο κατηγορίες ο μόνος εφικτός στόχος είναι η εναρμόνιση (harmonization) των μετρήσεων. Με τον όρο εναρμόνιση χαρακτηρίζεται η ισοδυναμία των αποτελεσμάτων είτε μέσω της ιχνηλασιμότητας σε ένα πρότυπο υλικό είτε μέσω μιας προσέγγισης με την οποία γίνεται συμφωνία να αποδοθεί στο υλικό που θα χρησιμεύσει ως πρότυπο ένας μέσος όρος όλων των μεθόδων.

Τόσο η προτυποποίηση όσο και η εναρμόνιση αποβλέπουν στην παραγωγή συγκρίσιμων αποτελεσμάτων. Η διαφορά τους βρίσκεται στο ότι ενώ με την προτυποποίηση τα αποτελέσματα είναι πολύ κοντά στην «αληθή» τιμή, όσον αφορά στην ορθότητά τους, η εναρμόνιση μπορεί να κρύβει μεγάλες σταθερές αποκλίσεις.

### **3. Προβλήματα στη διαδικασία προτυποποίησης**

Σε μια αλυσίδα ιχνηλασιμότητας κάθε συστατικό που χρησιμοποιείται και κάθε στάδιο που πραγματοποιείται πρέπει να καθορίζεται ακριβώς και να ακολουθεί καθιερωμένα πρότυπα και οδηγίες. Σε αυτή τη διαδικασία, είναι συχνό φαινόμενο τα προβλήματα να ξεκινούν με το πρώτο βήμα, που είναι ο ορισμός της μετρούμενης ποσότητας.

Από τους εκατοντάδες αναλύτες που μετριοούνται στην εργαστηριακή ιατρική αυτοί που αποτελούν καλά καθορισμένες χημικές οντότητες είναι περίπου 65 (Panteghini, 2007). Χαρακτηρίζονται αναλύτες τύπου A και ανήκουν στην περιοχή της κλασσικής κλινικής χημείας (ιόντα, μεταβολικά προϊόντα, στεροειδείς ορμόνες κα). Είναι ιχνηλάσιμοι στο SI και η μέτρηση τους μπορεί προτυποποιηθεί σχετικά εύκολα.

Στον αντίποδα βρίσκονται οι αναλύτες τύπου B οι οποίοι αντιπροσωπεύουν ουσίες των οποίων η σύσταση δεν είναι ακριβώς γνωστή. Πρόκειται συχνά για ετερογενή μίγματα ουσιών που η σύνθεσή τους είναι δυνατόν να διαφοροποιείται όχι μόνο από άτομο σε άτομο, αλλά ακόμη και στο ίδιο άτομο, ανάλογα με την κατάσταση της υγείας του. Επομένως, εξ ορισμού, τα υλικά αναφοράς που χρησιμοποιούνται στις βαθμονομήσεις προσεγγίζουν μόνο ως ένα βαθμό τις ιδιότητες των ενδογενών ουσιών στα βιολογικά δείγματα.

Επειδή πολλές ουσίες τύπου B είναι πολύ σημαντικές σε διάφορα πεδία της ιατρικής γίνεται πολύ εντατική έρευνα για την ανάπτυξη κατάλληλων υλικών αναφοράς. Ένα επιτυχημένο παράδειγμα τέτοιας προσέγγισης προέρχεται από το πρόγραμμα της IFCC για την προτυποποίηση των μετρήσεων της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c) (Hoelzel, Miedema, 1996). Ως μετρούμενη ποσότητα HbA1c ορίζεται εκείνο το μόριο που έχει στο αμινοτελικό άκρο της β- αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης ένα συγκεκριμένο γλυκωμένο εξαπεπτίδιο, οπότε παρακάμπτεται το πρόβλημα της ετερογένειας του υπόλοιπου μορίου.

Ένα άλλο ζήτημα που ανακύπτει στις μετρήσεις της κλινικής χημείας είναι η διαφορά στη «συμπεριφορά» προτύπων υλικών και βιολογικών δειγμάτων (Vesper et al, 2007). Ακόμη κι όταν υπάρχουν υλικά πιστοποιημένης καθαρότητας το πρωτογενές υλικό αναφοράς της Εικόνας 1 είναι υδατικό διάλυμα. Κατά κανόνα οι ιδιότητες υδατικών διαλυμάτων είναι διαφορετικές από αυτές των φυσικών δειγμάτων κα γιαυτό τα υλικά αυτά δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν απ'ευθείας για τη βαθμονόμηση των μεθόδων ρουτίνας. Μια πιθανή λύση στο πρόβλημα είναι να χρησιμοποιηθεί υλικό βιολογικής

προέλευσης ως υπόβαθρο για την παραγωγή του δευτερογενούς προτύπου (Thienpont et al 2002).

Τέλος, στην προσπάθεια προτυποποίησης των μετρήσεων δεν πρέπει να παραγνωρίζεται η συμμετοχή τόσο της προαναλυτικής όσο και της μετααναλυτικής φάσης, κατά την οποία ερμηνεύονται και αξιολογούνται τα αποτελέσματα. Δεν είναι τυχαίο ότι μεγάλα εθνικά προγράμματα όπως το CDC Cholesterol Standardization Program και το National Kidney Disease Education Program τοποθετούν μέσα στο πλαίσιο και όρους για την αποτελεσματικότητα της προτυποποίησης προαναλυτικών και μετααναλυτικών παραμέτρων.

#### **4. Συμπέρασμα**

Καθώς η ανάπτυξη ορθών και από μετρολογική άποψη συστημάτων αναφοράς στην εργαστηριακή ιατρική είναι μια πολύπλοκη και ακριβή διαδικασία, είναι φανερό πως ο στόχος της προτυποποίησης μπορεί να επιτευχθεί μόνο μέσα από διεθνή συνεργασία όσο το δυνατόν περισσότερων παραγόντων από αυτούς που δραστηριοποιούνται στο χώρο.

Έτσι, το 2002 σχηματίστηκε η Επιτροπή Συνεργασίας για την Ιχνηλασιμότητα στην Εργαστηριακή Ιατρική (Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine) με την υποστήριξη του Διεθνούς Γραφείου Μέτρων και Σταθμών (BIPM), της Διεθνούς Ομοσπονδίας Κλινικής Χημείας και Εργαστηριακής Ιατρικής (IFCC) και της Διεθνούς Συνεργασίας για τη Διαπίστευση Εργαστηρίων (ILAC) (Armbruster and Miller, 2007). Σκοπός της είναι να προωθήσει την προσέγγιση κρατικών φορέων, επιστημονικών εταιρειών και κατασκευαστών *in vitro* διαγνωστικών με απώτερο στόχο την αξιοπιστία και ισοδυναμία των αποτελεσμάτων των κλινικών εργαστηρίων.

#### **5. Βιβλιογραφία**

Armbruster D, Miller RR "The Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine: A Global Approach to Promote the Standardization of Clinical Laboratory Test Results" *Clin Biochem Rev* 2007;28:105-113

Hoelzel W, Miedema K "Development of a reference system for the international standardization of HbA1c/glycohemoglobin determinations" *J Int Fed Clin Chem* 1996;9: 62-67

Infusino I, Bonora R, Panteghini M "Traceability in Clinical Enzymology" *Clin Biochem Rev* 2007;28: 155-161

Müller M Implementation of Reference Systems in Laboratory Medicine, *Clin Chem* 2000;46 (12): 1907-1909

Panteghini M "Traceability, Reference Systems and Result Comparability" *Clin Biochem Rev* 2007; 28: 97-104

Thienpont LM, Stöckl D, Kratochvila J, Friedecky B, Budina M "Pilot external quality assessment survey for post-market vigilance of *in vitro* diagnostic medical devices and investigation of trueness of participants' results" *Clin Chem Lab Med* 2003;41: 183-186

Thienpont LM, Van Uytendange K, De Leenheer AP "Reference measurement systems in clinical chemistry" *Clin Chim Acta* 2002;323: 73-87

Vesper HW, Miller WG, Myers GL "Reference materials and commutability" *Clin Biochem Rev* 2007;28: 139-147