

ZAMYŠLENÍ NAD POSUZOVÁNÍM KVALITY IVD

**Petr Šmíd
Immunotech a.s.**

ZÁKLADNÍ ÚDAJE O FUNKČNÍ ZPŮSOBILOSTI

- **Citlivost**
 - analytická
 - funkční
- **Opakovatelnost**
 - intra-assay
- **Reprodukovatelnost**
 - inter-assay
- **Správnost**
- **Specificita (anal.)**
 - zkřížené reakce
- **Rozsah stanovení**
- **Omezení metody**
- **Kontrola interferencí**
- **Zacházení se vzorkem**
- **Kontrola 'hook' efektu**
- ...

MOTTO

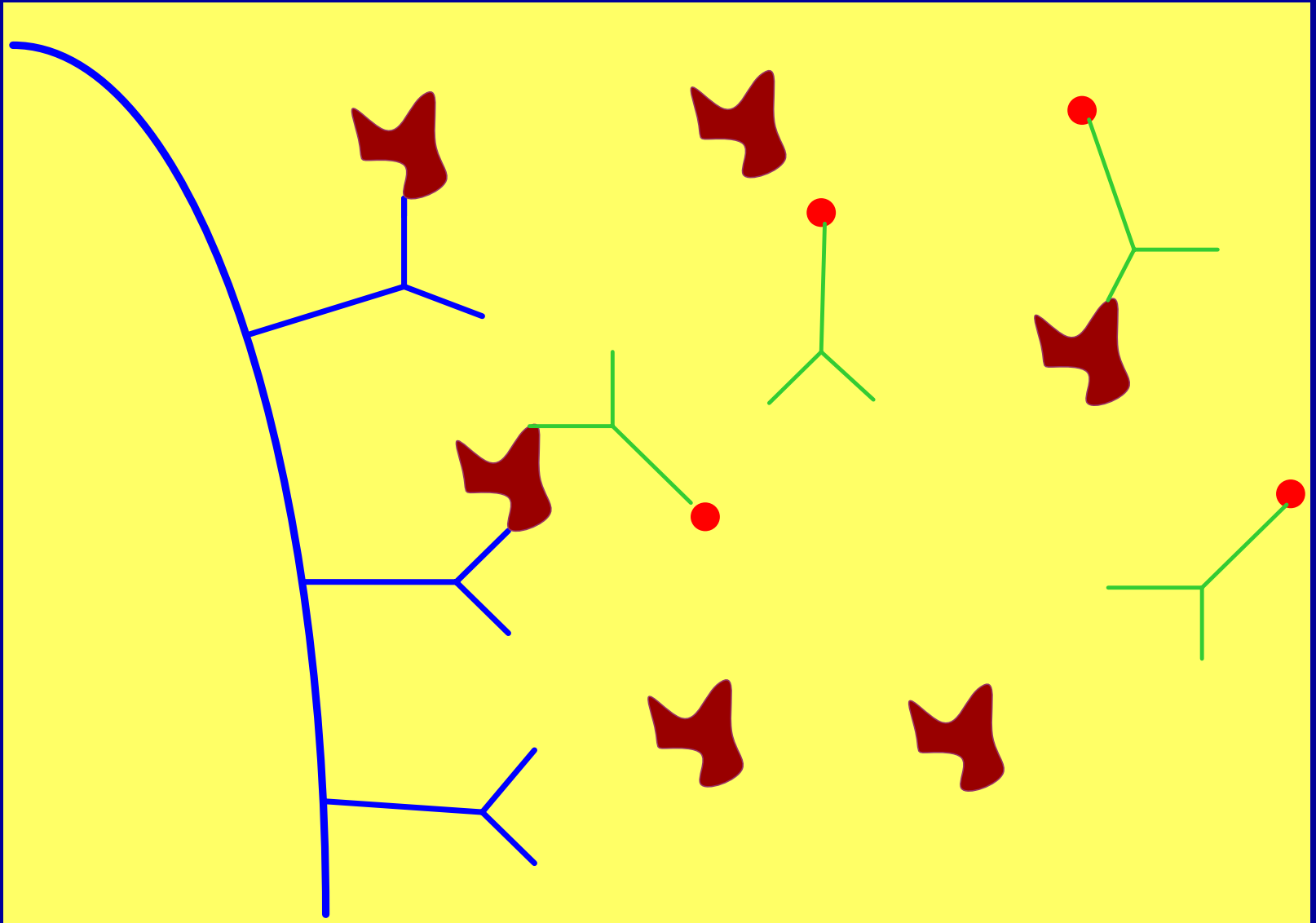
„Klidně můžeme porovnávat hrušky s jablky,
ale při použití korektních nástrojů
zůstanou hrušky hruškami a jablka jablky.“

NENÍ ANALYT JAKO ANALYT

Analyt	Hodnocení výkonnosti
TSH	+++++
Free T4	+++
Anti-hTg	+

Stanovení TSH

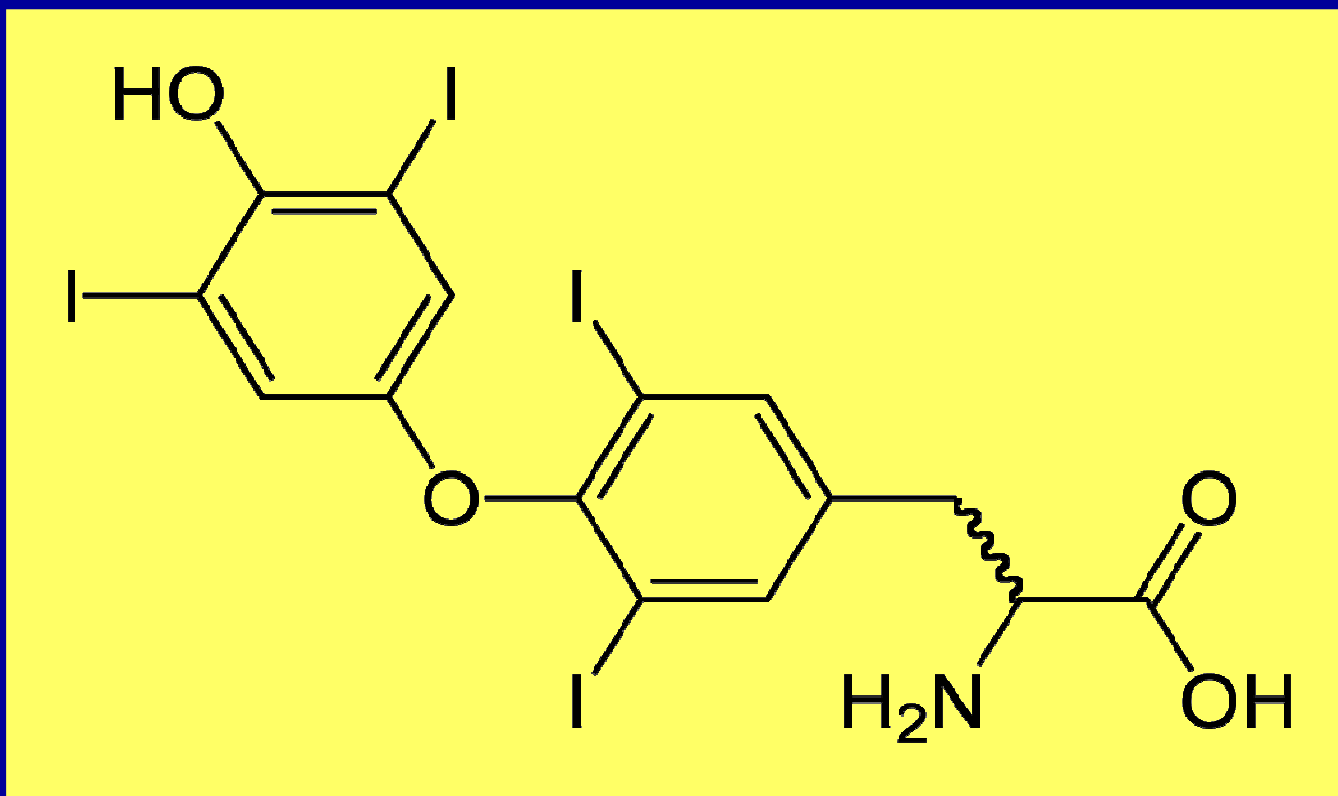
- **Velmi citlivé stanovení (< 1 nM)**
 - ➔ **Dobře definovaný antigen (+)**
 - ➔ **Zanedbatelná variabilita (+)**
 - ➔ **Dostatečný výběr vhodných protilátek (+)**

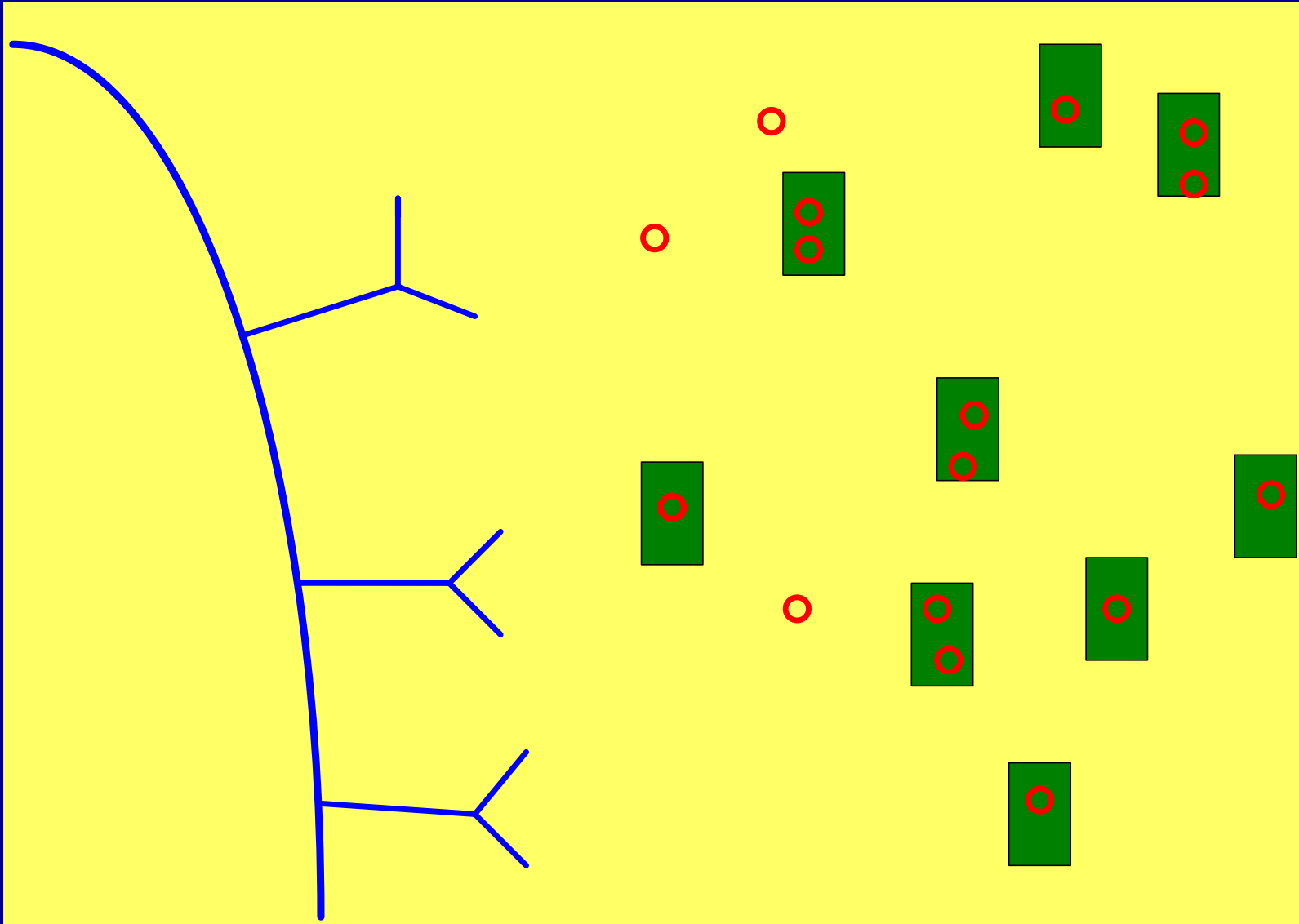


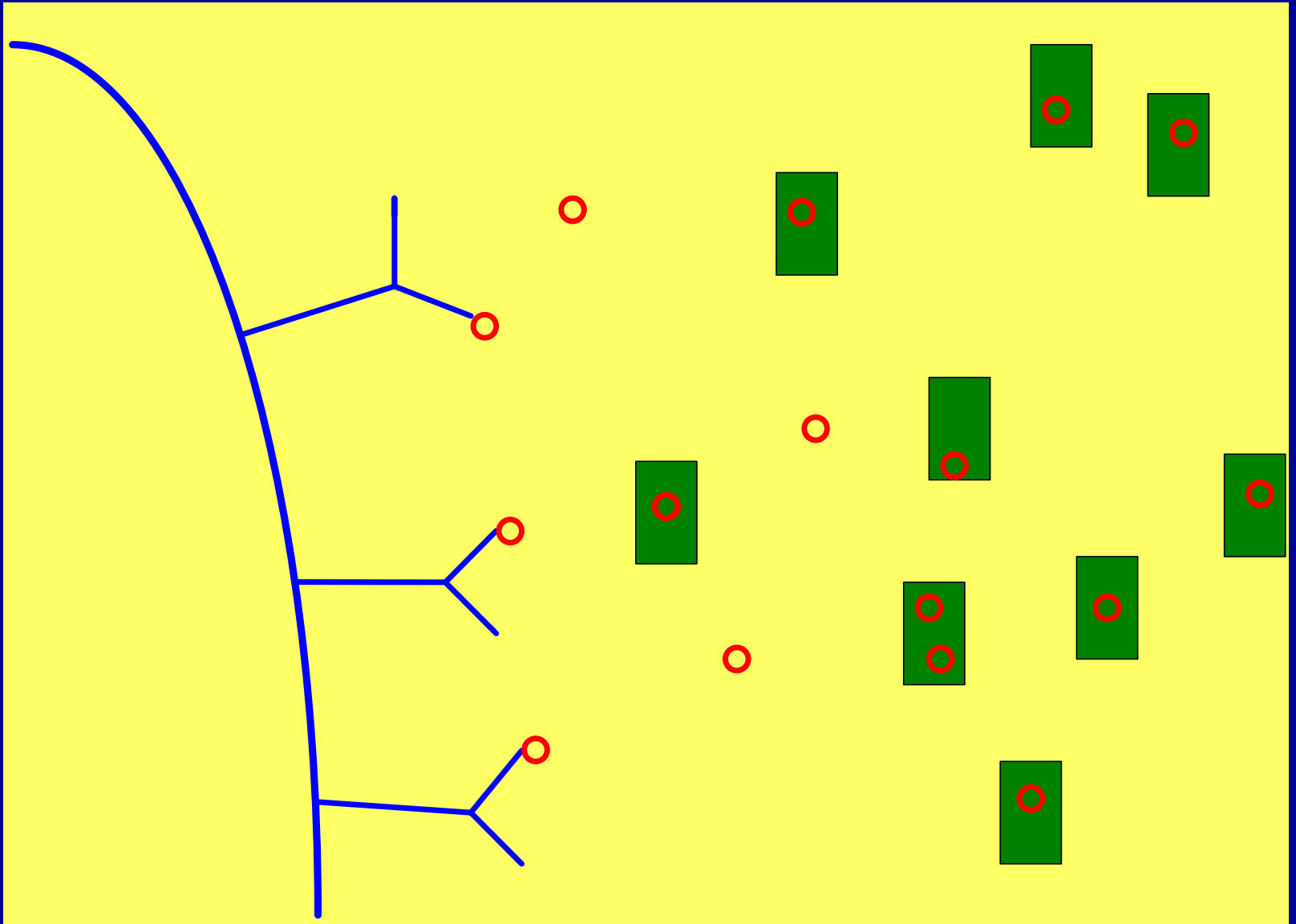
Stanovení FT4

- **Extrémně citlivé stanovení (< 1 pM)**
- ➔ **Dobře definovaný antigen (+)**
- ➔ **Vázaná (99,97 %) a volná forma (-)**
 - analytický systém je ve stálé nerovnováze (-)
 - individuální variabilita vazebných proteinů (-)

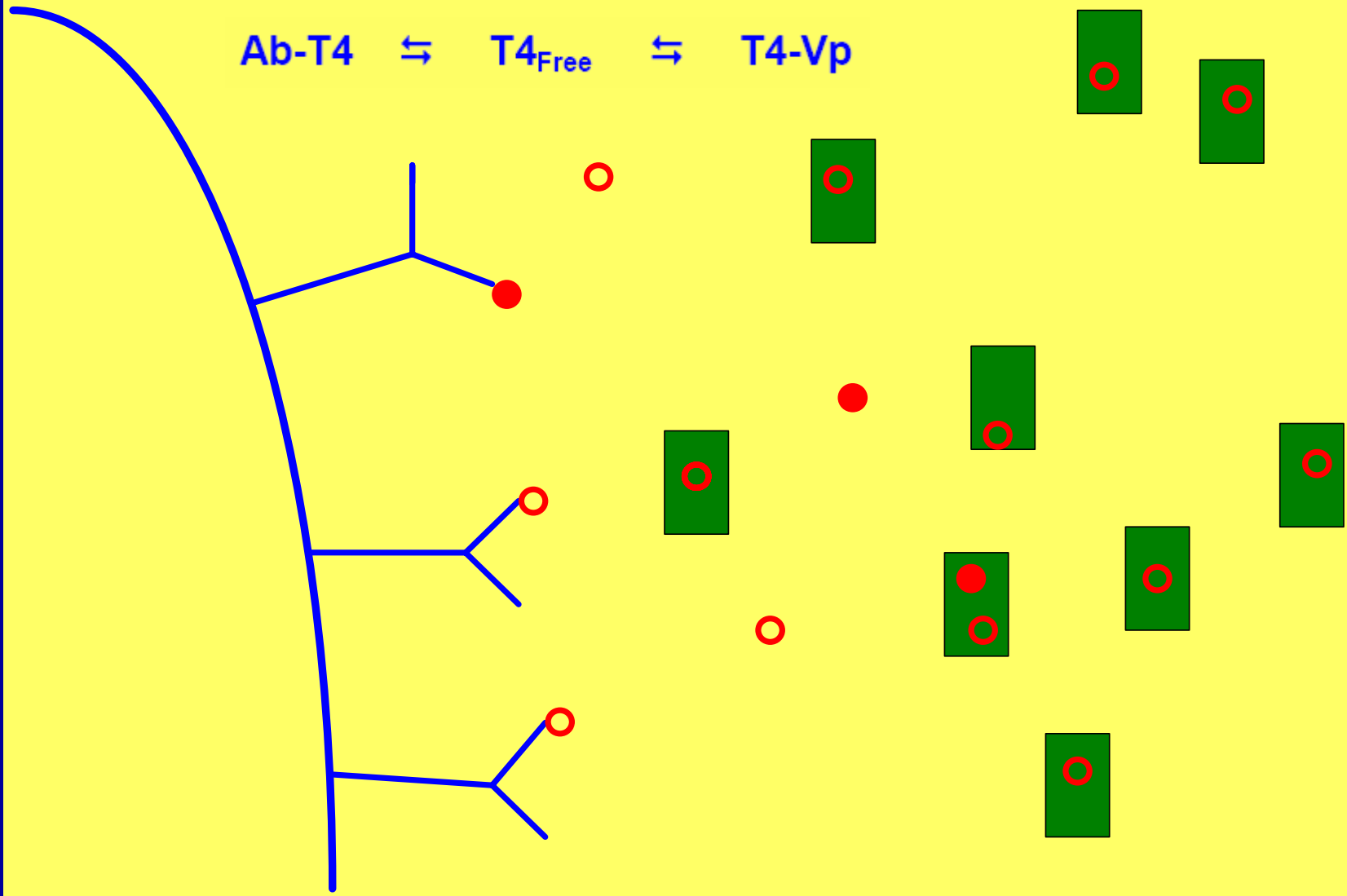
Tyroxin ($M_R = 777$) (3,5,3',5' tetrajodtyronin)

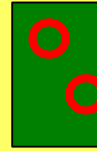
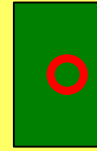
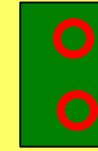
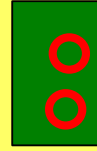
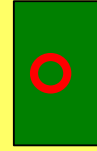
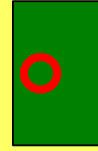
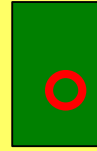
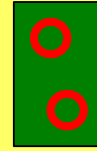
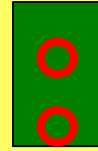
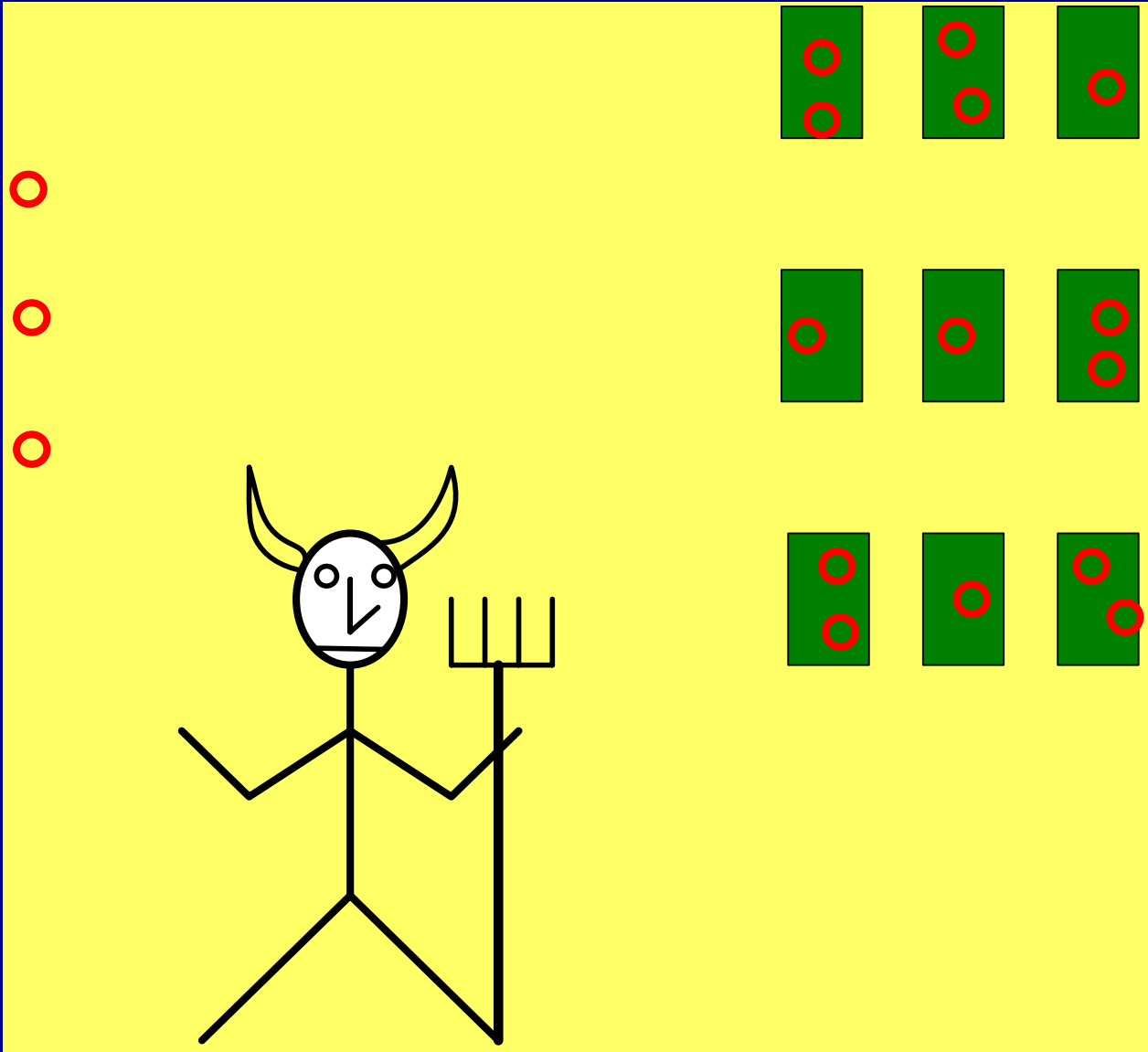






Ab-T4 \rightleftharpoons T4_{Free} \rightleftharpoons T4-Vp





Stanovení anti-hTg

- **Citlivost stanovení není kritická**
- ➔ **„Vágně“ definovaný analyt (-)**
- ➔ **Individuální „pool“ protilátek (-)**
 - limitovaná doba assaye **vs.** řádově delší čas působení v organismu (-)
 - variabilní antigen – hTg – (-)

KONTROLA VÝROBCŮ A VÝROBKŮ?

- ⇒ **Vládní agentury (Competent Authorities)**
(v ČR je to Ministerstvo zdravotnictví a SÚKL)
- ⇒ **Notifikované osoby (Notified Bodies) – Příloha 2**
(řada právnických osob uznaných EU s působností v celé unii)

**Vládní agentury mohou sledovat
kvalitu IVD ve své kompetenci.**

Systemy EHK

(externí hodnocení kvality)

- **Hodnocení kvality práce laboratoří**
- **‘Comp. Authorit.’ při hodnocení IVD**
výsledky EHK nepoužívají (alespoň v
případě immunochemických stanovení)
- **Pro kontrolu kvality IVD je možno**
použít pouze opět IVD (CE) nebo
referenční materiál / metodu (Směrnice 98/79/ES)

Systemy EHK

(externí hodnocení kvality)

„... umělé, analyticky irelevantní a s koncepcí návaznosti nekonsistentní dělení referenčních materiálů na materiály, které jsou součástí Směrnice ... a na materiály, které do sféry zájmů Směrnice nepatří ...“

**Metrologie chemických měření v laboratorní medicíně,
str. 16, ČSKB ČLS JEP & SEKK, Praha, 2006**

CO JE TO KOMUTABILITA

NEBOLI

„MATRIČNÍ PŘIMĚŘENOST ?“

commutability [eng.]

zaměnitelnost [č. j.]

„Schopnost referenčního materiálu (kalibrátoru, kontrolního materiálu) vykazovat při měření stejné chování jako reálné vzorky.“

Metrologie chemických měření v laboratorní medicíně,
str. 69, ČSKB ČLS JEP & SEKK, Praha, 2006

KOMUTABILNÍ

Postup Vzorek	Referenční metoda	Rutiní metoda
Kalibrátor nebo kontrolní vzorek	52,3 nM	51,8 nM
Pacientský vzorek	51,2 nM	52,7 nM

NEKOMUTABILNÍ

Postup Vzorek	Referenční metoda	Rutiní metoda
Kalibrátor nebo kontrolní vzorek	52,3 nM	28,9 nM
Pacientský Vzorek	51,2 nM	52,7 nM

KDY NEMÁ SMYSL ZKOUMAT KOMUTABILITU ?

Metrologie chemických měření v laboratorní medicíně,
str. 51 – 52, ČSKB ČLS JEP & SEKK, Praha, 2006

„Vychýlení odhadnuté Bland-Altmanovým diagramem:

Změřením 80 nativních krevních sér pacientů. Jako „referenční metoda“ zvolen analytický systém Roche Elecsys pro CA 19-9. Vůči němu pak:“

Analytický systém	Průměr [%]	Rozsah [%]
Architect Abbott	7,1	87 až 101
DiaSorin	38	54 až 130

„Vychýlení odhadnuté z výsledků EHK SEKK

Cykly TM v roce 2004 a 2005 (celkem 16 vzorků). Jako „referenční metoda“ zvolen analytický systém Roche Elecsys. Vůči němu pak bias:“

	Architect Abbott	DiaSorin
Bias \pm 2SD	9,6 \pm 36,4	69 \pm 98,4
Interval EHK	-54,4 až +60,5	0 až +158,9
Dle Bland-Altmana	-101 až +87,1	-130 až +54

KDY NEMÁ SMYSL ZKOUMAT KOMUTABILITU ?

Metrologie chemických měření v laboratorní medicíně,
str. 51 – 52, ČSKB ČLS JEP & SEKK, Praha, 2006

„Závěr

Obrovské rozdíly v hodnotách vychýlení jsou prakticky totožné pro kalibrátory a kontrolní séra. Zde při hodnocení případných rozdílů u výsledků EHK není smysluplné argumentovat nekomutabilitou kontrolních materiálů – disparátnost vychýlení koresponduje spíše s disparátností hodnot kalibrátorů, než s matričními problémy. Ty, pokud se zde vyskytují, jsou zřejmě dokonale překryty. Problémem, který naprosto dominuje, je velmi nízká úroveň harmonizace analytických postupů, začínající zjevně již od velmi pochybené definice měřené veličiny (neznáme dostatečně strukturu měřeného analytu, nemáme k dispozici škálu exaktních měřících jednotek).“

- 1) Neexistuje referenční materiál/metoda.
- 2) Výrobci upozorňují, že výsledky nejsou srovnatelné s jinými systémy.

CO NA TAKOVOUTO SITUACI LEGISLATIVA ?

(Směrnice 98/79/ES)

- Výrobek musí být „state-of-art“
- Prospěch pacienta musí převažovat nad rizikem spojeným s používáním výrobku
- Neexistuje-li referenční materiál, musí být popsán způsob kalibrace
- Výrobce musí upozornit na omezení spojená s užíváním výrobku

JSOU „ARTIFICIÁLNÍ“ VZORKY DOSTATEČNĚ KOMUTABILNÍ ?

Metrologie chemických měření v laboratorní medicíně, str. 52, ČSKB ČLS JEP & SEKK, Praha, 2006

„Stupeň komutability souvisí s úrovní standardizace měření. Porovnání prováděno na analytických systémech 10 výrobců, produkujících celkem 24 vlastních „subsystémů“ (Směrnice IVD 98/79 vyžaduje srovnatelnost subsystémů minimálně v rámci jednoho výrobce analytického systému).

Rozsah vychýlení (nativní vs. umělé) uvádí tabulka:“

Analyt	Nativní vzorky [%]	Umělé vzorky [%]
TSH	-13,4 až +21,0	-12,6 až +23,7
tT4	-9,4 až +11,4	-8,4 až +5,2
fT4	-21,7 až +15,3	-23,5 až +45,2
tT3	-7,8 až +9,8	-15,7 až +50,8
fT3	-21,2 až +16,4	-19,9 až +96,7

JAKÉ VYCHÝLENÍ JE PŘI STANOVENÍ KONKRÉTNÍHO ANALYTU ADEKVÁTNÍ ?

Metrologie chemických měření v laboratorní medicíně,
str. 52, ČSKB ČLS JEP & SEKK, Praha, 2006

„5.4. ZÁVĚR

Významnou část příčin neadekvátně vysokého vychýlení při stanovení analytů a parametrů můžeme v klinické laboratoři hledat už v hodnotách a matriční přiměřenosti pracovních kalibrátorů výrobců. Aplikace Směrnice 98/79/EC musí věnovat z výšenou péči harmonizaci mezi kalibrátory různých výrobců a šarží.“

- 1) Adekvátnost vychýlení závisí, kromě jiného, na nejistotách výsledků získávaných konkrétní analytickou metodou.
- 2) V případě určitých typů stanovení je zdroj rozdílů zejména v samém principu metody.

JAKÉ VYCHÝLENÍ JE PŘI STANOVENÍ KONKRÉTNÍHO ANALYTU ADEKVÁTNÍ ?

Metrologie chemických měření v laboratorní medicíně,
str. 52, ČSKB ČLS JEP & SEKK, Praha, 2006

Analyt	Nativní vzorky [%]	Artificiální vzorky [%]
TSH	-13,4 až +21,0	-12,6 až +23,7
tT4	-9,4 až +11,4	-8,4 až +5,2
fT4	-21,7 až +15,3	-23,5 až +45,2
tT3	-7,8 až +9,8	-15,7 až +50,8
fT3	-21,2 až +16,4	-19,9 až +96,7

JAKÉ JSOU KOMBINOVANÉ ROZŠÍŘENÉ NEJISTOTY NĚKTERÝCH STANOVENÍ ?

Stanovení kortisolu (10^1 nM): 4,0 %

Zpráva k ERM DA451 / IFCC (metoda ID-GC-MS), 2004

Stanovení kortisolu (10^1 nM): 18 – 22 %

Imunochemická stanovení

Stanovení cholesterolu (1 mM): 6,7 %

Metrologie chemických měření v laboratorní medicíně,
str. 55, ČSKB ČLS JEP & SEKK, Praha, 2006

Stanovení TSH, Immulite (< 1 nM): 14,4 %

Metrologie chemických měření v laboratorní medicíně,
str. 55, ČSKB ČLS JEP & SEKK, Praha, 2006

Stanovení TSH, IRMA (< 1 nM): 14,8 %

Immunotech, nepublikované výsledky

Stanovení PSA, IRMA (< 10 pM): 13,2 %

Immunotech, nepublikované výsledky

Stanovení FT4, RIA (< 1 pM): 14,6 %

Immunotech, nepublikované výsledky

JAKÉ JSOU KOMBINOVANÉ ROZŠÍŘENÉ NEJISTOTY NĚKTERÝCH STANOVENÍ ?

Nejistota kalibrátorů [%]	Nejistota reprodukovatelnosti [%]	Kombinovaná rozšířená nejistota [%]
1,9	4,6	10,0
3,2	6,5	14,5
5,0	8,7	20,0



Není to tak špatné !

Analyt	Nativní vzorky [%]	Artificiální vzorky [%]
TSH	-13,4 až +21,0	-12,6 až +23,7
tT4	-9,4 až +11,4	-8,4 až +5,2
fT4	-21,7 až +15,3	-23,5 až +45,2
tT3	-7,8 až +9,8	-15,7 až +50,8
fT3	-21,2 až +16,4	-19,9 až +96,7

JAKÉ JSOU ROZDÍLY NEJISTOT STANOVENÍ RŮZNÝMI TECHNIKAMI ?

Stanovení kortisolu (10^1 nM):

4,0 %

Zpráva k ERM DA451/IFCC (metoda ID GC-MS), 2004

1. Přídavek vnitřního standardu ke vzorku - [$1\alpha,2\alpha\text{-}^2\text{H}_2$]-kortisol
2. Alkalizace
3. Extrakce séra CH_2Cl_2
4. Odpaření
5. Rozpuštění
6. Purifikace na Sephadexu LH20
7. Odpaření frakce obsahující kortisol
8. Derivatizace HFB ($\text{CF}_3\text{CF}_2\text{CF}_2\text{COO}^-$) nebo MOX-TMS [$(\text{CH}_3)_3\text{SiCH}=\text{NOH}$]
9. ID GC-MS

Stanovení kortisolu (10^1 nM):

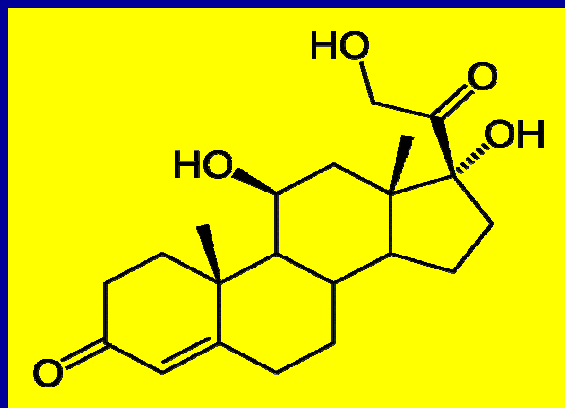
20,6 %

RIA, manuální

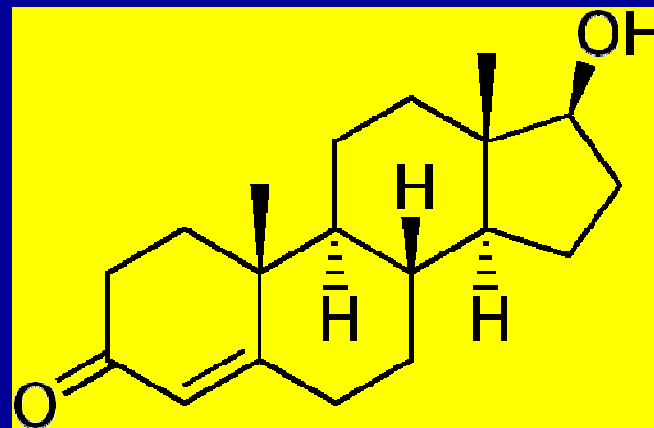
1. 50 μL vzorku + 500 μL radioindikátoru
2. 60 min. inkubace při třepání
3. Odsátí
4. Měření na γ -čítači

STANOVENÍ STEROIDŮ

Kortisol ($M_R = 362,5$)



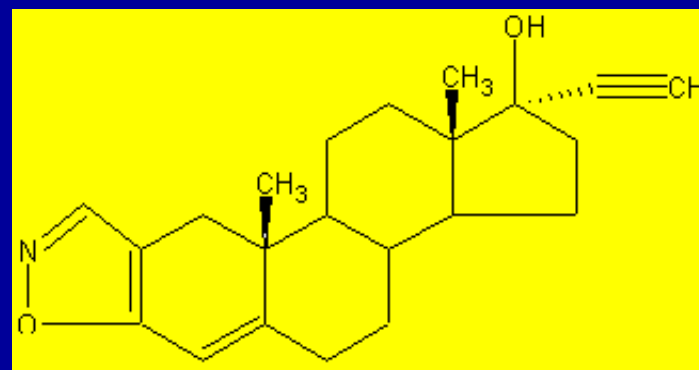
Testosteron ($M_R = 288,4$)



Estradiol ($M_R = 272,4$)



Danazol ($M_R = 337,5$)



ZÁKLADNÍ ÚDAJE O ZKŘÍŽENÝCH REAKCÍCH

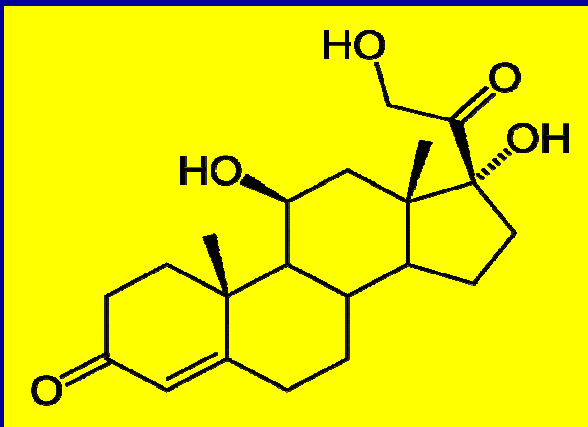
1) Cortisol	100	17) 6b-Hydroxycortisol	0.27
2) 11-Desoxycortisol	18	18) 6a-ethylprednisolone	<0.1
3) Corticosterone	8.4	19) b-Cortolone	<0.1
4) 21-Desoxycortisol	7.5	20) 20a-Dihydrocortisol	<0.1
5) Desoxycorticosterone	7.3	21) Tetrahydrocortisone	<0.1
6) Prednisolone	6.0	22) b-Cortol	<0.1
7) 17a-hydroxyprogesterone	3.5	23) Substance U	<0.1
8) Dihydrocortisol	2.4	24) Tetrahydrocortisol	<0.1
9) 5a-Dihydrocortisone	2.3	25) Tetrahydro-11desoxycortisol	<0.1
10) 5b-Dihydrocortisone	<0.1	26) Dexamethasone	<0.1
11) Progesterone	1.8	27) Substance E	<0.1
12) Cortisone	1.5	28) a-Cortolone	<0.1
13) Pregnenolone	1.1	29) Hydrocortisone-21-sulfate	<0.1
14) Allotetrahydrocortisone	0.8	30) Cholesterol	<0.1
15) 21-Desoxycortisone	0.13	31) Etiocholanolone	<0.1
16) Prednisone	<0.1	32) 11b-Hydroxyetiocholanolone	<0.1

ZÁKLADNÍ ÚDAJE O ZKŘÍŽENÝCH REAKCÍCH

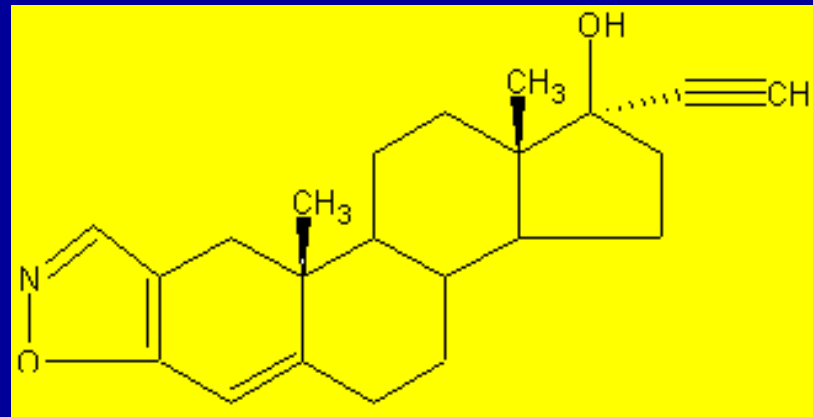
33)	Prégnenolone sulfate	<0.1
34)	Estradiol	<0.1
35)	Estriol	<0.1
36)	Estrone	<0.1
37)	DHEA-sulfate	<0.1
38)	Androstenedione	<0.1
39)	Spironolactone	<0.1
40)	18-ydroxycorticosterone	<0.1
41)	Aldosterone	<0.1
42)	Danazol	<0.1
43)	5a-Dihydrotestosterone	<0.1
44)	19-Norethisteron	<0.1
45)	Testosterone	<0.1

UVOLNĚNÍ KORTISOLU Z VAZEBNÝCH PROTEINŮ

Kortisol



Danazol



Výsledná koncentrace v reakční směsi

$10^0 - 10^2$ nM

cca $3 \cdot 10^3$ nM

MÁME NA VÝBĚR !!!

Stanovení kortisolu (10^1 nM):

4,0 %

Zpráva k ERM DA451/IFCC (metoda ID GC-MS), 2004

1. Přídavek vnitřního standardu ke vzorku - [$1\alpha,2\alpha\text{-}^2\text{H}_2$]-kortisol
2. Alkalizace
3. Extrakce séra CH_2Cl_2
4. Odpaření
5. Rozpuštění
6. Purifikace na Sephadexu LH20
7. Odpaření frakce obsahující kortisol
8. Derivatizace HFB [$\text{CF}_3\text{CF}_2\text{CF}_2\text{COO}^-$] nebo MOX-TMS [$(\text{CH}_3)_3\text{SiCH=NOH}$]
9. ID GC-MS

Stanovení kortisolu (10^1 nM):

20,6 %

RIA, manuální

1. 50 μL vzorku + 500 μL radioindikátoru
2. 60 min. inkubace při třepání
3. Odsátí
4. Měření na γ -čítači

PROBLÉM MĚŘENÍ V OBLASTI MEDICÍNY

Metrologie chemických měření v laboratorní medicíně,
str. 22, ČSKB ČLS JEP & SEKK, Praha, 2006

„Odkakživa platí ve fyzice jako samozřejmost, že způsob provedení experimentu nesmí ovlivňovat jeho výsledek. Srovnatelnost výsledků je tedy jejich klíčovou vlastností umožňující smysluplné porovnání výsledků, vlastností a jevů bez ohledu na to, kde byly pozorovány, měřeny a získány (čas, hmotnost, délka aj.).

Pracovníci zdravotnických laboratoří na tento princip, umožňující popsat a pochopit vlastnosti světa, často rezignovali a rezignují a považují za naprosto normální stav, kdy výsledek měření je závislý na způsobu, jakým byl získán – tedy na měřícím postupu / metodě. Jde o těžký duševní zkrat.“

Je to tak špatné ?





!!! NE !!!

- 1. Výsledek měření, přesněji řečeno jeho nejistota, je samozřejmě na postupu, jakým byl získán závislý.**
- 2. Laboratorní výsledek není konečný, resp. jediný vstup pro stanovení diagnózy či postupu léčení.**
- 3. „ ... odlišné postupy použité při měření stejné veličiny mohou ve skutečnosti u konkrétního vzorku nebo referenčního materiálu poskytovat různé výsledky.“ ISO 17511:2003**

LEGISLATIVNÍ ASPEKT KVALITY

„Kvalita“ IVD coby shodného výrobku spočívá v neposlední řadě v tom, že poskytuje uživateli právní oporu, neboť výrobce nese za výrobek „legislativní“ odpovědnost.

JAKÉ 'IVD' SE MOHOU POUŽÍVAT ?

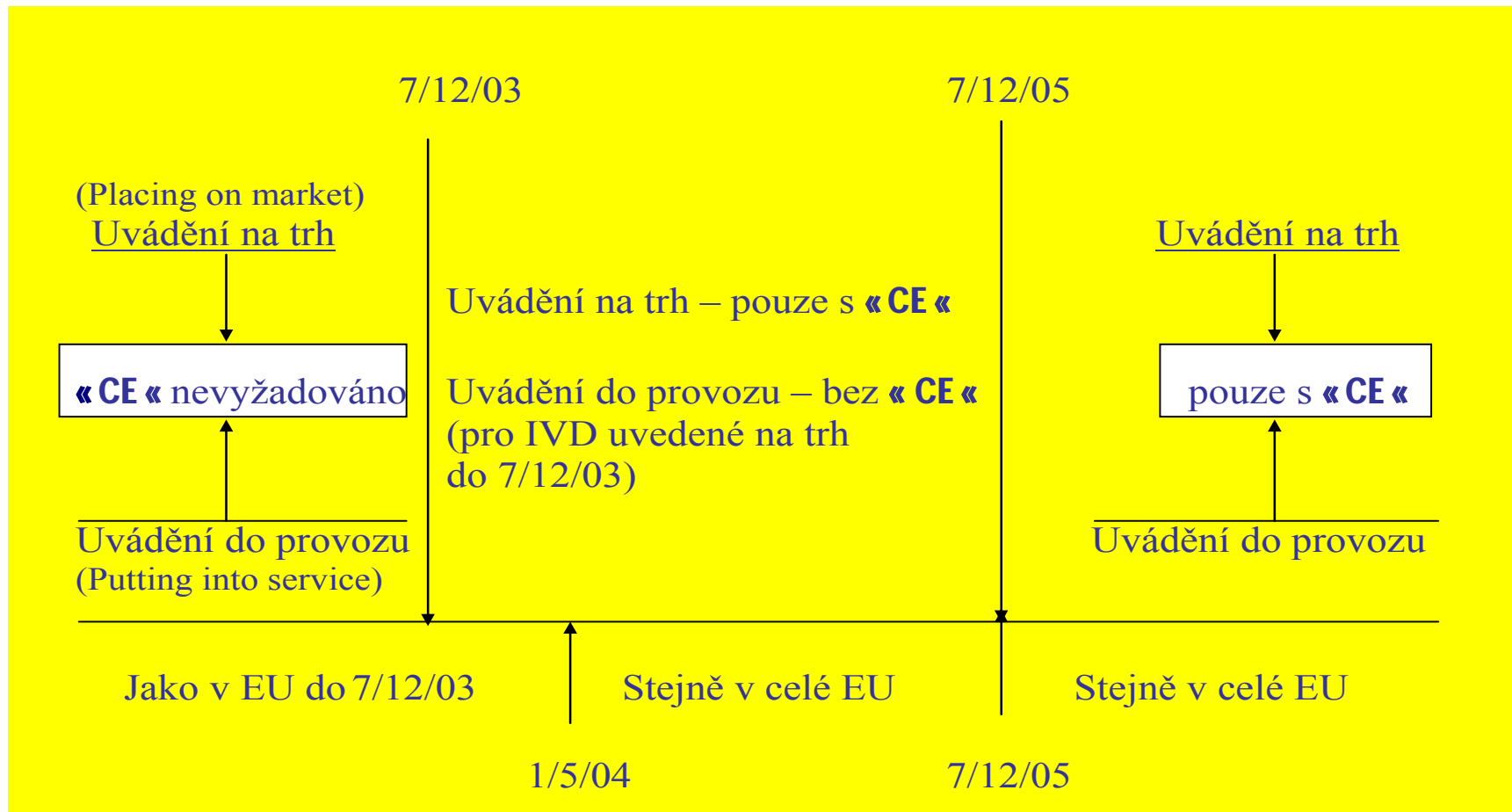
Metrologie chemických měření v laboratorní medicíně,
str. 68, ČSKB ČLS JEP & SEKK, Praha, 2006

„Poznámka: Od 7. 12. 2003 musí být pro zdravotnictví států EU dodávány nové výrobky pouze v souladu s příslušným zákonem a označeny vždy značkou CE. Od 7. 12. 2005 už musí být všechny výrobky in-vitro používané ve zdravotnictví států EU označeny CE.“

Toto tvrzení je naprosto chybné !!!

JAKÉ 'IVD' SE MOHOU SKUTEČNĚ POUŽÍVAT !

Zákon č. 123/2000 Sb., NV 453/2004 Sb. (Směrnice 98/79/ES)



**DĚKUJI
ZA
POZORNOST**