

**ΚΑΤΕΥΘΥΝΤΗΡΙΑ ΟΔΗΓΙΑ  
ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΠΙΣΤΕΥΣΗ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ  
ΚΑΤΑ ΕΛΟΤ ΕΝ ISO 15189**

**ΕΣΥΔ ΚΟ-ΚΝΙΝΕΡΓ**

**Έκδοση: 01**

**Αναθεώρηση: 02**

**Ημερομηνία Έκδοσης: 29-03-2006**

**Ημερομηνία Αναθεώρησης: 30-01-2014**

**Υπεύθυνος Έκδοσης: Ο Υπεύθυνος Διαχείρισης της Ποιότητας**

**Υπεύθυνος Έγκρισης: Ο Προϊστάμενος του Ε.ΣΥ.Δ.**

**Ο Υπεύθυνος Διαχείρισης Ποιότητας**

**Ο Προϊστάμενος του Ε.ΣΥ.Δ.**

# **Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης**

## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Η Οδηγία αυτή αφορά στις απαιτούμενες διαδικασίες για τη Διαπίστευση των Ιατρικών/Κλινικών Εργαστηρίων που εφαρμόζουν, είτε εγκεκριμένες προτυποποιημένες μεθόδους (CE IVD), οπότε και απαιτείται η επαλήθευσή τους από το Εργαστήριο, είτε εσωτερικά ανεπτυγμένες ή τροποποιημένες εγκεκριμένες (in house ή modified methods), οπότε και απαιτείται η αναλυτική επικύρωσή τους και η κλινική επαλήθευση.

Η επαλήθευση των εφαρμοζόμενων μεθόδων για κάθε υπό διαπίστευση παράμετρο, συνίσταται στην αξιολόγηση συγκεκριμένων αναλυτικών χαρακτηριστικών ως προς την καταλληλότητα της μεθόδου.

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

1. ΔΟΚΙΜΕΣ ΠΟΥ ΕΚΤΕΛΟΥΝΤΑΙ ΣΕ ΑΥΤΟΜΑΤΟΥΣ ΑΝΑΛΥΤΕΣ
  - 1.1 *Ποσοτικές δοκιμές*
    - 1.1.1 Επαλήθευση
    - 1.1.2 Εκτίμηση της αβεβαιότητας
    - 1.1.3 Διασφάλιση Ποιότητας
  - 1.2 *Ποιοτικές μέθοδοι*
    - 1.2.1 Επαλήθευση
    - 1.2.2 Εκτίμηση της αβεβαιότητας
    - 1.2.3 Διασφάλιση Ποιότητας
  
2. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ
  - 2.1 *Ποσοτικές και ημιποσοτικές δοκιμές*
    - 2.1.1 Επαλήθευση
    - 2.1.2 Εκτίμηση της αβεβαιότητας
  - 2.2 *Ποιοτικές δοκιμές*
    - 2.2.1 Επαλήθευση
    - 2.2.2 Διασφάλιση Ποιότητας
  
3. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ
  - 3.1 Επαλήθευση ποιοτικών CE IVD δοκιμών
  - 3.2 Επαλήθευση ποσοτικών CE IVD δοκιμών
  - 3.3 Επικύρωση εσωτερικών (in-house) δοκιμών
  - 3.4 Εκτίμηση της αβεβαιότητας
  - 3.5 Διασφάλιση Ποιότητας
  
4. ΔΟΚΙΜΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ
  - 4.1 *Ποσοτικές δοκιμές*
    - 4.1.1 Επαλήθευση
    - 4.1.2 Εκτίμηση Αβεβαιότητας
    - 4.1.3 Διασφάλιση Ποιότητας
  - 4.2 *Ποιοτικές δοκιμές*
  
5. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ
  - 5.1 Επαλήθευση
  - 5.2 Εκτίμηση Αβεβαιότητας
  - 5.3 Διασφάλιση Ποιότητας
  
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
  
7. ΧΡΗΣΙΜΕΣ ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

## **Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης**

### **1. ΔΟΚΙΜΕΣ ΠΟΥ ΕΚΤΕΛΟΥΝΤΑΙ ΣΕ ΑΥΤΟΜΑΤΟΥΣ ΑΝΑΛΥΤΕΣ**

#### **1.1 Ποσοτικές δοκιμές**

Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται ενδεικτικά: βιοχημικές, ανοσοχημικές, ανοσολογικές, νεφελομετρικές, αιματολογικές δοκιμές κ.α.

##### **1.1.1 Επαλήθευση**

Η επαλήθευση πραγματοποιείται, είτε με τη χρήση εμπορικών δειγμάτων ελέγχου (control samples), είτε με τη χρήση υλικών αναφοράς CRM (Certified Reference Materials), ή μειγμάτων που προκύπτουν από την ανάμιξη δειγμάτων ασθενών (pooled samples), σε δύο τουλάχιστον επίπεδα συγκέντρωσης, εντός και πάνω από τα όρια αναφοράς (normal – abnormal) και εντός και κάτω από τα όρια αναφοράς (normal – subnormal), ανάλογα με τα κρίσιμα για τη λήψη ιατρικών αποφάσεων όρια της μετρούμενης παραμέτρου:

Ορθότητα (trueness): Υπολογίζεται με πειράματα ανάκτησης (ανάμιξη δείγματος ελέγχου ή βαθμονομητή δείγματος ρουτίνας διαφορετικών συγκεντρώσεων) και μέτρηση δείγματος γνωστής συγκέντρωσης έξι (6) φορές τουλάχιστον, εντός της ίδιας ημέρας. Υπολογίζεται η % ανάκτηση (%R) και το %σφάλμα (bias), αντίστοιχα. Συμπληρώνεται και παρακολουθείται με τη συμμετοχή σε σχήματα δοκιμών ικανότητας.

Επαναληψιμότητα (repeatability): Τουλάχιστον έξι (6) μετρήσεις του ίδιου δείγματος ελέγχου, χωρισμένου σε μερίδια ή συνενωμένου δείγματος (pooled sample), χωρισμένου σε μερίδια. Οι μετρήσεις πρέπει να καλύπτουν όλη τη χρονική διάρκεια της ημερήσιας λειτουργίας του εργαστηρίου. Μεταξύ των έξι μετρήσεων, απαιτείται η ύπαρξη χρόνου αναμονής, τουλάχιστον 15 min. Υπολογίζεται το  $CV_r\%$  των μετρήσεων.

Ενδιάμεση πιστότητα (intermediate precision)/ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (reproducibility): Τουλάχιστον έξι (6) μετρήσεις του ίδιου δείγματος ελέγχου υπό διαφορετικές συνθήκες, π.χ. διαφορετικές ημέρες και με χρήση τουλάχιστον δύο διαφορετικών παρτίδων αντιδραστηρίων του αναλύτη. Επίσης, μπορεί να γίνει χρήση των αποτελεσμάτων από τα διαγράμματα εσωτερικού ελέγχου ποιότητας (QC). Υπολογίζεται το  $CV_R\%$  των μετρήσεων.

Υπολογισμός του Ορίου Ανίχνευσης (LOD) και του Ορίου Ποσοτικοποίησης (LOQ), όταν είναι κρίσιμα για την εξαγωγή συμπερασμάτων από την εξεταζόμενη παράμετρο. Τα χαρακτηριστικά υπολογίζονται με εξαπλή μέτρηση αραιωμένου δείγματος κοντά στο δηλωμένο από τον κατασκευαστή όριο ποσοτικοποίησης εντός της ίδιας ημέρας. Ιδιαίτερα, στην περίπτωση ανοσοχημικών τεχνικών μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαγράμματα ανακρίβειας (διάγραμμα SD συναρτήσεως συγκέντρωσης).

##### **1.1.2 Εκτίμηση της Αβεβαιότητας**

Εκτιμώνται οι συνιστώσες της αβεβαιότητας, ως:

Τύπου A: Από την τυπική απόκλιση έξι (6) τουλάχιστον μετρήσεων υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, σε όλα τα επίπεδα συγκέντρωσης που εξετάστηκαν κατά την επαλήθευση και από την τυπική απόκλιση έξι (6) μετρήσεων κάθε παραμέτρου από τα πειράματα ανάκτησης (βλέπε Ορθότητα).

## **Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης**

Τύπου Β: Εκτιμώνται οι πηγές αβεβαιότητας από τους χρησιμοποιούμενους βαθμονομητές του αυτόματου αναλυτή. Εφόσον πραγματοποιείται ανασύσταση του βαθμονομητή, μπορεί να εκτιμηθεί και η συνεισφορά από την αβεβαιότητα του χρησιμοποιούμενου ογκομετρικού εξοπλισμού. Εν γένει όλες οι πηγές της αβεβαιότητας τύπου Β καταγράφονται και δίνονται οδηγίες για τον περιορισμό της συνεισφοράς τους στο τελικό αποτέλεσμα (εξοπλισμός, δειγματοληψία, μεταφορά δειγμάτων, προ-αναλυτική ετοιμασία του δείγματος κ.α.).

Η συνδυασμένη αβεβαιότητα υπολογίζεται από το νόμο διάδοσης των αβεβαιοτήτων. Για την εκτίμηση της καταλληλότητας εφαρμογής της μεθόδου από το εργαστήριο, η διευρυμένη αβεβαιότητα συγκρίνεται με τις τιμές που δίνονται από τον κατασκευαστή της συσκευής ή/και από τις τιμές που δίνονται από τη βιβλιογραφία.

**ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ:** Η διαδικασία της ανάμιξης και υπολογισμού της ανάκτησης δεν μπορεί να εφαρμοσθεί στις περιπτώσεις των ελεύθερων μορφών παραμέτρων, όπως των fT3 και fT4. Για τον υπολογισμό της ορθότητας των παραμέτρων αυτών, κατά την επαλήθευση, χρησιμοποιούνται μόνο η ανάλυση ορών ελέγχου και τα αποτελέσματα από συμμετοχές σε διεργαστηριακά σχήματα ελέγχου ικανότητας (εξωτερικός έλεγχος ποιότητας).

### **1.1.3 Διασφάλιση Ποιότητας**

#### Εσωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

Εσωτερικός έλεγχος ποιότητας πραγματοποιείται πάντα για τις παραμέτρους για τις οποίες εκτελούνται εξετάσεις σε δείγματα εξεταζομένων και βασίζεται στις οδηγίες του κατασκευαστή, τη μεθοδολογία, τη βιολογική και αναλυτική διακύμανση.

#### Εξωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

Απαιτείται ετήσια συμμετοχή για όλες τις δοκιμές του πεδίου σε κατάλληλα διεργαστηριακά σχήματα.

Για τις κλινικές δοκιμές που εφαρμόζονται και σε υποστρώματα εκτός του περιφερικού αίματος (π.χ. ούρα ή ENY) απαιτείται μία τουλάχιστον συμμετοχή σε κατάλληλο διεργαστηριακό σχήμα και για τα υπόλοιπα υποστρώματα, εντός της τετραετίας.

Στην περίπτωση υπολογιστικών παραμέτρων (π.χ. LDL) δεν απαιτείται συμμετοχή σε διεργαστηριακό σχήμα υπό την προϋπόθεση ότι υπάρχει συμμετοχή για τις παραμέτρους που χρησιμοποιούνται κατά τον υπολογισμό, έχοντας ορίσει ως αποδεκτή τιμή z-score το εύρος -2 έως +2 και εντός του εύρους συγκεντρώσεων που ισχύει η σχετική εξίσωση.

### **1.2 Ποιοτικές μέθοδοι**

Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται μέθοδοι με ποιοτικό αποτέλεσμα θετικό π.χ. ανιχνεύσιμο ή μη ανιχνεύσιμο, θετικό ή αρνητικό.

#### **1.2.1 Επαλήθευση**

Η επαλήθευση των ποιοτικών μεθόδων πραγματοποιείται, είτε με τη χρήση εμπορικών δειγμάτων ελέγχου (control samples), είτε με τη χρήση υλικών αναφοράς CRM (Certified Reference Materials), ή μειγμάτων που προκύπτουν από την ανάμιξη δειγμάτων

## **Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης**

ασθενών (pooled samples), σε διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης, ανάλογα με τα κρίσιμα, για τη λήψη ιατρικών αποφάσεων, όρια της μετρούμενης παραμέτρου.

Η επαλήθευση συνίσταται στην αξιολόγηση των κάτωθι αναλυτικών χαρακτηριστικών:

**Ορθότητα (trueness):** Ανάλυση τουλάχιστον έξι (6) αρνητικών και 6 (έξι) θετικών γνωστών δειγμάτων. Από το λόγο [ορθά θετικά + ορθά αρνητικά] / [συνολικός αριθμός δειγμάτων] υπολογίζεται η %ορθότητα της μεθόδου. Εάν το kit περιέχει ένα αρνητικό και ένα θετικό δείγμα ελέγχου, μπορούν να αναλυθούν εις διπλούν επί έξι (6) ημέρες. Στην περίπτωση ημι-ποσοτικών μεθόδων με ποιοτική τελική έκφραση θα πρέπει να μετρηθούν γνωστά πρότυπα δείγματα (σε διάφορα επίπεδα συγκέντρωσης) με γνωστό μέγεθος μετρούμενης παραμέτρου και να υπολογισθεί το %σφάλμα (bias) ή η %ανάκτηση (recovery).

**Επαναληψιμότητα (repeatability)** Τουλάχιστον έξι (6) μετρήσεις του ίδιου δείγματος ελέγχου (θετικού και αρνητικού) χωρισμένου σε μερίδια ή συνενωμένου δείγματος (pooled sample, θετικού και αρνητικού), χωρισμένου σε μερίδια. Οι μετρήσεις πρέπει να καλύπτουν όλη τη χρονική διάρκεια της ημερήσιας λειτουργίας του εργαστηρίου. Μεταξύ των μετρήσεων, απαιτείται η ύπαρξη χρόνου αναμονής, τουλάχιστον 15 min.

**Ενδιάμεση πιστότητα (intermediate precision)/ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (reproducibility):** Για καθαρά ποιοτικές δοκιμές απαιτείται ανάλυση των αρνητικών και θετικών δειγμάτων από διαφορετικούς αναλυτές και σε έξι (6) διαφορετικές ημέρες. Στην περίπτωση ημι-ποσοτικών μεθόδων με ποιοτική τελική έκφραση απαιτείται ανάλυση δειγμάτων (γνωστών ή αγνώστων) μεταξύ ημερών και υπολογισμός του συντελεστή μεταβλητότητας (%CV) των μετρήσεων. Οι μετρήσεις πρέπει να γίνουν σε επίπεδα συγκέντρωσης της παραμέτρου με κλινική σημασία. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και τα πειράματα της ορθότητας.

**Όριο ανίχνευσης (LOD):** Για καθαρά ποιοτικές δοκιμές απαιτείται σειρά αραιώσεων γνωστού πρότυπου δείγματος, μέτρηση σε κάθε αραιώση και προσδιορισμός του επιπέδου συγκέντρωσης πάνω από το οποίο το δείγμα χαρακτηρίζεται ως θετικό με αξιοπιστία (επαναλαμβανόμενες μετρήσεις). Στην περίπτωση ημι-ποσοτικών μεθόδων με ποιοτική τελική έκφραση απαιτείται η ανάλυση πρότυπων ή αγνώστων θετικών δειγμάτων χαμηλής συγκέντρωσης και υπολογισμός της τυπικής απόκλισης SD πολλαπλών μετρήσεων (π.χ. 6). Το όριο ανίχνευσης είναι 3,3 φορές την τυπική απόκλιση (SD). Επίσης, είναι δυνατό να απαιτηθεί ο προσδιορισμός της CUT OFF VALUE (COV) και μιας περιοχής γύρω από αυτή για την οποία το αποτέλεσμα είναι αμφίβολο (Unreliability Region, από το επίπεδο με False Positive Rate έως το επίπεδο με False Negative Rate).

### **1.2.2 Εκτίμηση της Αβεβαιότητας**

Οι ποιοτικές δοκιμές ανήκουν στην κατηγορία εκείνων των δοκιμών, που δεν μπορούν να συμπεριλάβουν αυστηρούς μετρολογικούς και στατιστικούς υπολογισμούς της αβεβαιότητας. Για τις ημιποσοτικές μεθόδους που καταλήγουν σε ποιοτικό αποτέλεσμα, απαιτείται ο υπολογισμός αβεβαιότητας (όπως §1.1.2).

### **1.2.3 Διασφάλιση Ποιότητας**

#### **Εσωτερικός Έλεγχος Ποιότητας**

Ο εσωτερικός έλεγχος ποιότητας για τις ποιοτικές δοκιμές πραγματοποιείται με ανάλυση θετικών και αρνητικών δειγμάτων ελέγχου (controls), πριν την ανάλυση δειγμάτων

## **Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης**

ασθενών. Επιπλέον, σύμφωνα με τα πρότυπα ποιότητας που χρησιμοποιούνται (π.χ. CLSI), οι διαδικασίες αυτές πρέπει, όπου απαιτείται, να ενσωματώνονται στο καθημερινό πρόγραμμα εκτέλεσης των εξετάσεων.

### Εξωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

Ισχύουν οι απαιτήσεις της §1.1.3.

**ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ:** Σε περίπτωση χρήσεως περισσότερων του ενός αναλυτών για την εκτέλεση των ίδιων δοκιμών απαιτείται τεκμηρίωση ισοδυναμίας αποτελεσμάτων με ανάλυση δειγμάτων ελέγχου ή πραγματικών δειγμάτων σε ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων και στατιστική επεξεργασία τους (δοκιμασίες t-test και συσχέτιση). Επίσης, με ανάλυση των διεργαστηριακών δειγμάτων αποδεικνύεται η ισοδυναμία των αναλυτών.

## **2. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ**

Η επικύρωση / επαλήθευση των μικροβιολογικών δοκιμών πρέπει να γίνεται για κάθε «κύριο» μικροοργανισμό που προσδιορίζεται, μέσω της συγκεκριμένης εξέτασης και για κάθε υπόστρωμα, στο οποίο διενεργείται η συγκεκριμένη εξέταση. Επιπρόσθετα, πρέπει να περιλαμβάνει όλα τα στάδια της εξέτασης με τη χρήση φυσικών ή τεχνητά μολυσμένων βιολογικών υλικών.

Οι χρησιμοποιούμενες μέθοδοι πρέπει να είναι κατάλληλες για τις εξετάσεις τις οποίες διενεργεί το εργαστήριο, ανάλογα με τις απαιτήσεις κλινικής αξιολόγησης (ασθενείς κοινότητας, νοσοκομειακοί ασθενείς κ.τ.λ.), οι οποίες υποδεικνύονται από τους κατασκευαστές των αναλυτών ή / και βασίζονται σε μεθόδους που έχουν καθοριστεί από διεθνείς επιστημονικούς οργανισμούς.

Πέραν της αρχικής επιβεβαίωσης της ορθής εφαρμογής της μεθόδου, διενεργείται τουλάχιστο μία φορά ανά έτος, εκ νέου αξιολόγηση της ικανότητας του Εργαστηρίου να εκτελεί ορθά τις συγκεκριμένες μεθόδους. Η ετήσια ανασκόπηση της ικανότητας του Εργαστηρίου διενεργείται μέσω της ανάλυσης και συστηματικής αξιολόγησης του συνόλου των δεδομένων από τους εσωτερικούς και εξωτερικούς ελέγχους ποιότητας.

### **2.1 Ποσοτικές και ημιποσοτικές δοκιμές**

#### **2.1.1 Επαλήθευση**

Ορθότητα (trueness): Η εκτίμηση της ορθότητας γίνεται με τη χρήση υλικών αναφοράς και από αποτελέσματα της συμμετοχής σε σχήματα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας.

Επαναληψιμότητα (repeatability): Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας απαιτούνται τουλάχιστον έξι (6) μετρήσεις ανά μικροοργανισμό, ανάλογα με τη δυσκολία και την επικινδυνότητα του μικροοργανισμού και το υπόστρωμα σε δύο έως τρία επίπεδα εμβολιασμένων δειγμάτων. Εκτιμάται η τυπική απόκλιση και ο συντελεστής μεταβλητότητας (% CV<sub>r</sub>) των μετρήσεων.

Ενδιάμεση πιστότητα (intermediate precision)/ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (reproducibility):

Α' μέθοδος: Χρησιμοποιούνται δύο έως τρία επίπεδα εμβολιασμένων δειγμάτων (spiked samples). Γίνονται τουλάχιστον δέκα μετρήσεις για κάθε δείγμα σε διαφορετικές ημέρες (αν είναι σταθερό το δείγμα) ή με διαφορετικούς χειριστές ή με διαφορετικά αντιδραστήρια.

## **Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης**

Β' μέθοδος: Από διαγράμματα ελέγχου ποιότητας (control charts) σε διάστημα ενός χρόνου.

Γ' μέθοδος: Από παραγοντικό πειραματικό σχεδιασμό πολλαπλών μετρήσεων του ίδιου δείγματος σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες. Εφαρμογή one – way ανova για τον υπολογισμό της  $SD_R$ .

Η Πιστότητα μιας μεθόδου είναι ικανοποιητική, όταν η σχετική τυπική απόκλιση (% CV) είναι μικρότερη από 10% ή από το αποδεκτό όριο που καθορίζεται από τη σχετική βιβλιογραφία.

Όριο ανίχνευσης (LOD): Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου προσδιορίζεται με την εξέταση τεχνητά επιμολυσμένων δειγμάτων, που αποτελούν προϊόν διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων του υπό εξέταση μικροοργανισμού. Ο αρχικός αριθμός cfu θα πρέπει να είναι γνωστός. Τα δείγματα που αναλύονται είναι τουλάχιστον έξι (6), από τους αναλυτές του Εργαστηρίου σε συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας. Ο μικρότερος αριθμός μικροοργανισμών που είναι δυνατό να ανιχνευθεί αποτελεί το όριο ανίχνευσης της μεθόδου. Ο αριθμός των δειγμάτων που θα αναλυθεί εξαρτάται από τον μικροοργανισμό και τα υποστρώματα με αιτιολόγηση του αριθμού από το εργαστήριο.

### **2.1.2 Αβεβαιότητα**

Η εκτίμηση της αβεβαιότητας βασίζεται σε στοιχεία αναπαραγωγιμότητας και σε στοιχεία συστηματικών σφαλμάτων (Bias), όπως αυτά προσδιορίζονται από τα αποτελέσματα σχημάτων δοκιμών ικανότητας. Για την εκτίμηση της αβεβαιότητας απαιτείται η εξέταση τουλάχιστον δέκα (10) δειγμάτων.

Ειδικό στοιχείο αξιολόγησης, πρέπει να είναι η επιθυμητή ομοιογένεια του δείγματος, ανάλογα με το βιολογικό υλικό, σε σχέση και με το είδος και τον αριθμό των μικροοργανισμών που περιέχει. Η παράμετρος αυτή πρέπει να αντιμετωπίζεται με σαφές πρωτόκολλο για το μέγεθος του δείγματος και την επεξεργασία του (κατάλληλο / μη κατάλληλο δείγμα).

- Ανάλυση 10 διαφορετικών δειγμάτων (i) (πραγματικών ή εμβολιασμένων) σε διάφορα επίπεδα, σε δύο συνθήκες, αναπαραγωγιμότητα A και B (π.χ. δύο αναλυτές, διαφορετικές παρτίδες αντιδραστηρίων κ.λπ.)
- Εύρεση του αριθμού μικροβίων /cfu $\chi$ iA και  $\chi$ iB
- Υπολογισμός  $\log_{10}(\chi$ iA) και  $\log_{10}(\chi$ iB)

## **2.2. Ποιοτικές δοκιμές**

### **2.2.1 Επαλήθευση**

Επαναληψιμότητα (repeatability) / Ενδιάμεση πιστότητα (intermediate precision)/ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (reproducibility): απαιτείται ανάλυση τουλάχιστον 6 θετικών και αρνητικών δειγμάτων ανά μικροοργανισμό και υπόστρωμα από τους αναλυτές του εργαστηρίου. Ο αριθμός των δειγμάτων που θα αναλυθεί, εξαρτάται από τον μικροοργανισμό και τα υποστρώματα με αιτιολόγηση του αριθμού από το εργαστήριο.

Ευαισθησία (Sensitivity) και Ειδικότητα (Specificity): Η ευαισθησία υπολογίζεται από τον λόγο: ορθά θετικά αποτελέσματα / σύνολο θετικών αποτελεσμάτων και η ειδικότητα από τον λόγο: ορθά αρνητικά αποτελέσματα / σύνολο αρνητικών αποτελεσμάτων.

## **Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης**

Όριο ανίχνευσης (LOD): Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου προσδιορίζεται με την εξέταση τεχνητά επιμολυσμένων δειγμάτων, που αποτελούν προϊόν διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων του υπό εξέταση μικροοργανισμού. Τα δείγματα που αναλύονται είναι τουλάχιστον έξι (6), από τους αναλυτές του Εργαστηρίου, σε συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας. Ο μικρότερος αριθμός μικροοργανισμών που είναι δυνατό να ανιχνευθεί αποτελεί το όριο ανίχνευσης της μεθόδου. Ο αριθμός των δειγμάτων που θα αναλυθεί εξαρτάται από τον μικροοργανισμό και τα υποστρώματα με αιτιολόγηση του αριθμού από το εργαστήριο.

Το ποσοστό των «θετικών» αποτελεσμάτων δεν θα πρέπει να αποκλίνει από το αναγνωρισμένο ποσοστό ευαισθησίας της μεθόδου, που προκύπτει από τις μελέτες επικύρωσης της μεθόδου ή από τη σχετική βιβλιογραφία.

### **2.2.2 Διασφάλιση Ποιότητας**

#### Εσωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

Για τις μικροβιολογικές δοκιμές, πρέπει να περιλαμβάνει ειδικά υλικά αναφοράς, φυσικά ή τεχνητά μολυσμένα δείγματα. Η συχνότητα εκτέλεσης αυτών των δοκιμών προσδιορίζεται σύμφωνα με το είδος των εξετάσεων, τη συχνότητα εκτέλεσής τους και το καθημερινό πρόγραμμα του Εργαστηρίου.

#### Εξωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

Απαιτείται τουλάχιστον ετήσια συμμετοχή ή συχνότερα, σύμφωνα με το πρόγραμμα του διοργανωτή του διεργαστηριακού και για όλες τις δοκιμές, σε αναγνωρισμένο διεργαστηριακό πρόγραμμα (Proficiency Testing) και σε περίπτωση απουσίας αυτού σε σχήμα διεργαστηριακών συγκρίσεων του οποίου ο πάροχος συμμορφώνεται με συγκεκριμένες απαιτήσεις και αξιολογείται βάσει αυτών από τους συμμετέχοντες (ΕΣΥΔ ΠΔΙ).

*ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ*: Για τις μικροσκοπικές δοκιμές η επαλήθευση, η εκτίμηση της αβεβαιότητας και ο έλεγχος ποιότητας των μικροσκοπικών δοκιμών στη μικροβιολογία (νωπά δείγματα βιολογικών υγρών και εκκρίματων, κεχρωσμένα παρασκευάσματα) γίνονται όπως αναφέρεται στο εδάφιο 5.

## **3. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ**

### **3.1 Επαλήθευση CE IVD ποιοτικών δοκιμών**

Ορθότητα (Trueness): Ο έλεγχος της Ορθότητας γίνεται με τη χρήση δειγμάτων ελέγχου (controls) που παρέχονται από εταιρείες, υλικών αναφοράς (reference materials), με αποτελέσματα από διεργαστηριακά σχήματα και πειραμάτων ανάκτησης.

Στις πολυπαραμετρικές μεθοδολογίες, όπου με μία τεχνική ανιχνεύονται περισσότερα του ενός μικροοργανισμοί/γονίδια/μεταλλάξεις/πολυμορφισμοί, δεν είναι πάντα εύκολο να ελεγχθούν όλα (π.χ. οι 32 μεταλλάξεις στην CFTR), ιδιαίτερα, εάν είναι πολλά. Ωστόσο, το εργαστήριο πρέπει να διαθέτει ένα ικανοποιητικό πάνελ control δειγμάτων με π.χ. τουλάχιστον τις πιο συχνές μεταλλάξεις/πολυμορφισμούς στον Ελληνικό χώρο ώστε να επαληθεύσει την ορθότητα του kit που χρησιμοποιεί.

Επαναληψιμότητα/Αναπαραγωγιμότητα: Σε ποιοτικές μοριακές μεθόδους απαιτείται ο έλεγχος της επαναληψιμότητας με 3 μετρήσεις control δειγμάτων (όπως τα

## **Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης**

προαναφερόμενα) και της αναπαραγωγιμότητας με έξι (6) μετρήσεις σε διαφορετικές συνθήκες.

Όριο Ανίχνευσης (LOD): Σε περιπτώσεις προσδιορισμού παραμέτρων με κλινική σημασία, απαιτείται η επιβεβαίωση του Ορίου Ανίχνευσης (Limit of Detection) η οποία γίνεται με ανάλυση 5 δειγμάτων (υλικό αναφοράς ή control που παρέχει ο κατασκευαστής) αραιωμένο στην περιοχή του Ορίου Ανίχνευσης (έως και +20% LOD).

### **3.2 Επαλήθευση CE IVD ποσοτικών δοκιμών**

Επιπλέον των απαιτήσεων της §3.1, απαιτείται έλεγχος γραμμικότητας της καμπύλης βαθμονόμησης 3 φορές με χρήση 4 τουλάχιστον σημείων (εις διπλούν) εφόσον είναι διαθέσιμα τα πρότυπα.

### **3.3 Επικύρωση εσωτερικών (in-house) δοκιμών**

Οι in-house μεθοδολογίες επικυρώνονται κατ' αντιστοιχία όπως επικυρώνει τις CE-IVD μεθοδολογίες ο κατασκευαστής τους. Στην περίπτωση διαπίστευσης σύμφωνα με το ISO 15189, επιπλέον της αναλυτικής επικύρωσης, απαιτείται και κλινική επικύρωση (διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα, NPV, PPV, ενδείξεις κλινικής χρησιμότητας).

Για ερευνητική χρήση δοκιμών (Research Use Only) το Εργαστήριο μπορεί να διαπιστευθεί σύμφωνα με το ISO 17025, χωρίς να απαιτείται κλινική επικύρωση.

Απαιτήσεις όσον αφορά στην επικύρωση των εσωτερικών μεθόδων αποτελούν:

Ορθότητα (Trueness): Ο έλεγχος της Ορθότητας γίνεται με τη χρήση δειγμάτων ελέγχου (controls) που παρέχονται από εταιρείες, υλικών αναφοράς (reference materials), με αποτελέσματα από διεργαστηριακά σχήματα και πειραμάτων ανάκτησης.

Επιπλέον, ο έλεγχος ορθότητας γίνεται:

- *Με σύγκριση μεθόδου*: Για in-house μεθοδολογία, απαιτείται η σύγκριση της μεθόδου με CE-IVD kit (ή όταν δεν υπάρχει, με άλλο εμπορικό kit ή άλλη εγκατεστημένη μεθοδολογία) σε 40 δείγματα (π.χ. 20 αρνητικά και 20 θετικά για ποιοτικές παραμέτρους, 10 αρνητικά και 30 θετικά με μεγάλο εύρος τιμών σε ποσοτικές παραμέτρους) και κατάλληλη στατιστική επεξεργασία.

Στις πολυπαραμετρικές μεθοδολογίες, όπου με μία τεχνική ανιχνεύονται περισσότερα του ενός: μικροοργανισμοί/γονίδια/μεταλλάξεις/πολυμορφισμοί, το εργαστήριο οφείλει να διαθέτει πλήρες πάνελ control δειγμάτων ώστε να επικυρώσει την ορθότητα της μεθόδου που χρησιμοποιεί.

Επαναληψιμότητα (repeatability)/ Ενδιάμεση πιστότητα (intermediate precision)/ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (reproducibility): Τουλάχιστον δέκα (10) μετρήσεις δειγμάτων ελέγχου σε τουλάχιστον 2 επίπεδα (αρνητικό/ασθενώς θετικό 2-3 X LOD) σε διαφορετικές ημέρες και με χρήση διαφορετικών παρτίδων αντιδραστηρίων. Υπολογίζεται το CV% των μετρήσεων (μπορεί να εξαχθεί και από τα αποτελέσματα των control charts εντός 3μήνου ή 6μήνου).

Όριο Ανίχνευσης (Limit of Detection): Απαιτείται επικύρωση ανίχνευσης LOD με probit ανάλυση σε 5 επίπεδα συγκεντρώσεων του υλικού αναφοράς περί του LOD (έκαστο επίπεδο με 8-10 δείγματα) και επαλήθευση στη συνέχεια με δείγματα -20% LOD και

## **Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης**

+20% LOD (5 φορές). Στις πολυπαραμετρικές μεθοδολογίες η διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε αναλύτη που ανιχνεύει η μέθοδος.

Όριο Ποσοτικοποίησης (LOQ) στις ποσοτικές μεθόδους: το σημείο όπου ξεκινάει να υπάρχει ικανοποιητικό CV% (π.χ. 20%).

Έλεγχος Γραμμικότητας και προσδιορισμός εύρους μετρήσεων (Measuring Range) στις ποσοτικές μεθόδους: Για in-house Q-PCR μεθοδολογία καθώς δύναται να μετρήσει σε εύρος 10 log, η χρήση 7 τουλάχιστον σημείων (εις τριπλούν) με αραίωση κατάλληλου υλικού αναφοράς είναι απαραίτητη για κατασκευή καμπύλης αναφοράς (n=5) και έλεγχο γραμμικότητας (οι αραιώσεις να καλύπτουν τουλάχιστον 5 log).

Έλεγχος Αναλυτικής Ειδικότητας: έλεγχος με ηλεκτροφόρηση και με DNA Sequencing του PCR προϊόντος που λαμβάνεται (και Tm σε Q-PCR), έλεγχος για ουσίες που παρεμποδίζουν ή αναστέλλουν τη μέτρηση (π.χ. αιμοσφαιρίνη, ηπαρίνη κλπ), στη Μοριακή Μικροβιολογία έλεγχος με παρουσία παρόμοιων γενετικά οργανισμών ή οργανισμών που ανευρίσκονται συχνά στα δείγματα που αναλύει το εργαστήριο, στη Μοριακή Βιολογία/Γενετική επιπλέον έλεγχος ψευδογονιδίων ή ομόλογων περιοχών.

### **3.4 Εκτίμηση Αβεβαιότητας**

Όπως §1.1.2

### **3.5 Διασφάλιση Ποιότητας**

#### Εσωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

- Σε συμβατική/Q-PCR: χρησιμοποιείται πάντα λευκό (no DNA), αρνητικό και θετικό control (στη Μοριακή μικροβιολογία και ανίχνευση σωματικών μεταλλάξεων πρέπει να χρησιμοποιείται weak positive στη θέση του θετικού π.χ. 2-3 x LOD), στη Μοριακή Γενετική πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον δύο δείγματα ελέγχου (controls): λευκό και μεταλλαγμένο.

- Σε high complexity testing (π.χ. microarrays) τα οποία εμπεριέχουν αρκετούς τρόπους ελέγχου (controls) της μεθόδου ή της απομόνωσης DNA: χρησιμοποιείται 1 θετικός ή αρνητικός μάρτυρας ανά kit 20-40 δειγμάτων και τουλάχιστον ανά μήνα στις περιπτώσεις Εργαστηρίων με μικρό αριθμό δειγμάτων.

#### Εξωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

Ειδικά για τις δοκιμές Μοριακής Διαγνωστικής, κατά τη συμμετοχή του Εργαστηρίου σε Εξωτερικό Έλεγχο Ποιότητας για μια κατηγορία δοκιμών:

- Στην αρχική αξιολόγηση και σε κάθε επέκταση του πεδίου διαπίστευσης, το εργαστήριο πρέπει να έχει επιτυχημένα αποτελέσματα διεργαστηριακών από όλες τις δοκιμές στις οποίες αιτείται διαπίστευση. Στη συνέχεια, μπορεί να ομαδοποιήσει με βάση την παράμετρο και την τεχνική/εξοπλισμό και να εναλλάσσει σε ετήσια βάση. Εντός της τετραετίας πρέπει να καλύπτεται όλο το πεδίο διαπίστευσης (υπόστρωμα/δοκιμή/τεχνική).

- Στη μοριακή ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών ή σωματικών μεταλλάξεων επιβάλλεται να είναι πιο απαιτητικός ο εξωτερικός έλεγχος ποιότητας ώστε να ελέγχει την ευαισθησία της μεθόδου (να περιλαμβάνει σπάνια στελέχη ή πολύ αραιά δείγματα). Στη μοριακή ανίχνευση κληρονομούμενων μεταλλάξεων σε γονίδια με πλειάδα

## **Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης**

μεταλλάξεων συνιστάται ο εξωτερικός έλεγχος ποιότητας να περιλαμβάνει το εύρος αυτών των μεταλλάξεων που αναγράφονται στο ΕΠΕΔ (και όχι μόνο συγκεκριμένες) ή συνδυασμούς αυτών.

- Μετά τον 1<sup>ο</sup> κύκλο διαπίστευσης (4ετία) και εφόσον το εργαστήριο επιδείξει άριστα αποτελέσματα στον εξωτερικό έλεγχο ποιότητας, η συχνότητα διεργαστηριακού μπορεί να μειωθεί στη 2ετία, ανά ομάδα παραμέτρων και τεχνικών/εξοπλισμού, κατόπιν σχετικής αξιολόγησης των επιδόσεων του εργαστηρίου από την Υπηρεσία του Ε.ΣΥ.Δ. και της σύμφωνης γνώμης της ομάδος αξιολόγησης.

### **4. ΔΟΚΙΜΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ**

#### **4.1 Ποσοτικές Δοκιμές**

Δύο είναι οι τυποποιημένες μέθοδοι Κυτταρομετρίας Ροής:

1. υπολογισμός υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων
2. υπολογισμός των CD34+ αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων

και οι δύο ανήκουν στον υπολογισμό ανοσολογικά προσδιοριζόμενων κυτταρικών πληθυσμών με Κυτταρομετρία Ροής (CLSI former NCCLS H42-A2 (vol 27 No 16)).

##### **4.1.1 Επαλήθευση**

Όλες οι εφαρμοζόμενες μέθοδοι πρέπει να επαληθεύονται στα υπάρχοντα μηχανήματα στο χώρο του εργαστηρίου. Η επαλήθευση πραγματοποιείται με τη χρήση εμπορικών δειγμάτων ελέγχου μονιμοποιημένου πλήρους αίματος (control samples) σε δύο τουλάχιστον επίπεδα συγκέντρωσης, όπου είναι διαθέσιμα. Η επαλήθευση των εφαρμοζόμενων μεθόδων για κάθε υπό διαπίστευση παράμετρο, συνίσταται στην αξιολόγηση των κάτωθι αναλυτικών χαρακτηριστικών:

Ορθότητα (trueness): Παρακολουθείται με τη συμμετοχή σε διεργαστηριακά προγράμματα.

Επαναληψιμότητα (repeatability): Τουλάχιστον έξι (6) μετρήσεις του ίδιου δείγματος ελέγχου. Υπολογίζεται το % CV<sub>r</sub> των μετρήσεων. Εναλλακτικά, μπορεί να αναλυθούν 3 δείγματα, 3 φορές έκαστο, στα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα.

Ενδιάμεση πιστότητα (intermediate precision)/ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (reproducibility): Τουλάχιστον έξι (6) μετρήσεις του ίδιου δείγματος ελέγχου σε διαφορετικές ημέρες. Υπολογίζεται το CV<sub>R</sub>% των μετρήσεων (μπορεί να εξαχθεί και από τα αποτελέσματα των control charts εντός 3μήνου ή 6μήνου).

Όριο Ανίχνευσης (LOD) και Όριο Ποσοτικοποίησης (LOQ), όταν είναι κρίσιμα για την εξαγωγή συμπερασμάτων από την εξεταζόμενη παράμετρο. Οι παράμετροι υπολογίζονται με εξαπλή μέτρηση αραιωμένου δείγματος σε συγκέντρωση παραπλήσια με το δηλωμένο από τον κατασκευαστή όριο ανίχνευσης, εντός της ίδιας ημέρας.

Καθορισμός των τιμών αναφοράς: Κατ' αρχήν γίνονται αποδεκτές αυτές που δίδονται από την κατασκευάστρια εταιρεία, αλλά συνιστάται ο έλεγχός τους με τον υπάρχοντα υγιή πληθυσμό (αριθμός δειγμάτων 20). Σε περίπτωση που υπάρχουν διαφορές, πρέπει να χρησιμοποιούνται οι ευρεθείσες τιμές από το εργαστήριο.

## **Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης**

### **4.1.2 Εκτίμηση Αβεβαιότητας**

Όπως §1.1.2.

### **4.1.3 Διασφάλιση Ποιότητας**

Απαιτείται εβδομαδιαία χρήση δείγματος εσωτερικού ελέγχου ποιότητας (μονιμοποιημένο δείγμα αίματος για τη μέθοδο 1, κατάλληλο δείγμα παρεχόμενο από τους κατασκευαστές για τη μέθοδο 2). Στην περίπτωση της μεθόδου 1 πρέπει να προσδιορίζονται όλοι οι κύριοι υποπληθυσμοί των λεμφοκυττάρων (CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+, CD3-CD16/56+).

#### Εσωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

Ο εσωτερικός έλεγχος ποιότητας περιλαμβάνει τον έλεγχο των μηχανημάτων και τον έλεγχο των μεθόδων. Συγκεκριμένα απαιτείται:

A. Καθημερινή χρήση (ή με κάθε άνοιγμα του μηχανήματος) σφαιριδίων ευθυγράμμισης (τύπου I), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο τεχνικός έχει ορίσει κατά την αρχική ρύθμιση παραμέτρων του μηχανήματος τα επιτρεπτά όρια, συνήθως για την ευθυγράμμιση CV < 2.5%. Απαιτείται η φύλαξη των αντίστοιχων διαγραμμάτων Levy Jennings μέσα στον κυτταρομετρητή.

B. Εβδομαδιαία χρήση σφαιριδίων επιβεβαίωσης της επαναλήψιμης μέτρησης του κάθε φθορισμού (τύπου 2), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Απαιτείται η φύλαξη των αντίστοιχων διαγραμμάτων Levy Jennings μέσα στον κυτταρομετρητή.

Γ. Ετήσια (ή μετά από κάθε σημαντική επισκευή) χρήση σφαιριδίων επικύρωσης της ευθυγράμμισης του οργάνου και υπολογισμού της ανταπόκρισης του οργάνου στα σήματα φθορισμού με ειδικά σφαιρίδια με διαφορετικές εντάσεις φθορισμού (παραγωγής γραμμικής καμπύλης αναφοράς για κάθε ανιχνευτή φθορισμού).

Δ. Έλεγχος αντιστάθμισης φθορισμού (compensation) με κατάλληλα σφαιρίδια ή με κατάλληλα κύτταρα. Προτείνεται ο έλεγχος να γίνεται όποτε προκύπτει σημαντική αλλαγή των PMTs και γενικότερα των ρυθμίσεων του οργάνου.

Ε. Τουλάχιστον σε εβδομαδιαία βάση ή για κάθε 20 δείγματα ασθενών χρήση εμπορικού δείγματος μονιμοποιημένου αίματος ή αντιστοίχου εμπορικού δείγματος ελέγχου για τη μέτρηση των CD34+ κυττάρων ως δείγματος εσωτερικού ελέγχου ποιότητας. Απαιτείται η κατασκευή διαγραμμάτων Levy Jennings.

#### Εξωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

Απαιτείται η συμμετοχή σε κατάλληλο Φορέα Διεργαστηριακών Σχημάτων με τουλάχιστον 4 δείγματα, κατά έτος και για τις δύο ανωτέρω δοκιμές.

### **4.2 Ποιοτικές δοκιμές**

Οι δοκιμές που αφορούν τα panels τυποποίησης οξείας λευχαιμίας και λεμφοϋπερπλαστικών συνδρόμων μπορούν να θεωρηθούν ποιοτικές δοκιμές, αφού ο κάθε δείκτης απαιτείται να χαρακτηρίζεται ως θετικός ή αρνητικός.

Εφαρμόζονται οι απαιτήσεις της §1.2.

### **5. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ**

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι μικροσκοπικές αιματολογικές, μικροβιολογικές, κυτταρολογικές και Παθολογοανατομικές δοκιμές.

#### **5.1 Επαλήθευση**

Η επαλήθευση των ανωτέρω δοκιμών γίνεται με προσδιορισμό της διαγνωστικής ακρίβειας και της διαγνωστικής αναπαραγωγιμότητας-επαναληψιμότητας.

Διαγνωστική ακρίβεια: προσδιορίζεται με τη βοήθεια ειδικών στατιστικών παραμέτρων όπως η ειδικότητα, η ευαισθησία, η θετική και η αρνητική προγνωστική αξία. Οι παράμετροι αυτοί αποτελούν μέτρο της αξιοπιστίας της διάγνωσης και μπορεί να διαφέρουν ανά υλικό και ανά εργαστήριο, ωστόσο πρέπει να κυμαίνονται σε επίπεδα αποδεκτά από τη διεθνή βιβλιογραφία.

Η μέθοδος του υπολογισμού της ευαισθησίας, της ειδικότητας και της αναλογίας των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων της κυτταρολογικής εξέτασης γίνεται με χρήση της Ιστολογικής εξέτασης ως σταθερό πρότυπο (the gold standard). Η μέθοδος του υπολογισμού της Προγνωστικής Αξίας των Θετικών αποτελεσμάτων (PPV), και της Προγνωστικής Αξίας των Αρνητικών αποτελεσμάτων της κυτταρολογικής εξέτασης (NPV) γίνεται με χρήση της Ιστολογικής εξέτασης ως σταθερό πρότυπο (the gold standard).

Διαγνωστική αναπαραγωγιμότητα-επαναληψιμότητα: εκτιμάται με τυχαίο επανέλεγχο από τον ίδιο ή από διαφορετικούς διαγνώστες ιατρούς ενός αντιπροσωπευτικού ποσοστού δειγμάτων, ανάλογου του φόρτου εργασίας του εργαστηρίου (μέτρηση διαπαρατηρητικής και ενδοπαρατηρητικής συμφωνίας – κ στατιστική παράμετρος).

Επίσης, λαμβάνονται υπ όψιν και οι κατευθυντήριες οδηγίες των εγκύρων διεθνών επιστημονικών εταιρειών.

#### **5.2 Εκτίμηση της Αβεβαιότητας**

Οι μικροσκοπικές δοκιμές ανήκουν στην κατηγορία εκείνων των δοκιμών, που δεν μπορούν να συμπεριλάβουν αυστηρούς μετρολογικούς και στατιστικούς υπολογισμούς της αβεβαιότητας.

Η εκτίμηση της αβεβαιότητας βασίζεται σε στοιχεία επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας και κυρίως σε στοιχεία συστηματικών σφαλμάτων (Bias), όπως αυτά προσδιορίζονται από τα αποτελέσματα συγκριτικών σχημάτων δοκιμών ικανότητας.

Επίσης, λαμβάνονται υπ όψιν και οι κατευθυντήριες οδηγίες των εγκύρων διεθνών επιστημονικών εταιρειών.

#### **5.3 ΔΙΑΣΦΑΛΙΣΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ**

##### Εσωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

Ως μέτρα εσωτερικού ελέγχου ποιότητας απαιτούνται τα παρακάτω:

## **Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης**

α) Εφαρμογή τακτικών κλινικοπαθολογοανατομικών συζητήσεων (C. P. Conference). Συνιστάται η περιοδική συνάντηση των κλινικών ιατρών και παθολογοανατόμων-κυτταρολόγων-αιματολόγων, αλλά και εργαστηριακών ιατρών άλλων ειδικοτήτων, εάν απαιτείται, όλων των βαθμίδων όπου παρουσιάζονται, συζητούνται και αναλύονται κριτικά και συσχετίζονται όλα τα κλινικά, εργαστηριακά, απεικονιστικά, κυτταρολογικά, παθολογοανατομικά και άλλα μικροσκοπικά δεδομένα.

β) Τυχαίο επανέλεγχος: Το προσωπικό του εργαστηρίου ανασκοπεί ένα αντιπροσωπευτικό ποσοστό δειγμάτων, ανάλογο του φόρτου εργασίας του εργαστηρίου (μέτρηση διαπαρατηρητικής και ενδοπαρατηρητικής συμφωνίας – κ στατιστική παράμετρος).

γ) Σύγκριση της βιοψίας με την κυτταρολογική εξέταση (υπολογισμός ευαισθησίας, ειδικότητας, θετικής και αρνητικής προγνωστικής αξίας- χρήση ROC curve)

δ) σύγκριση της ιστολογικής- κυτταρολογικής διάγνωσης με τα αποτελέσματα λοιπών βοηθητικών διαγνωστικών τεχνικών, όπως ηλεκτρονική μικροσκόπηση, ανοσοκυτταροχημεία, μοριακή κυτταρολογία, ανάλυση εικόνας, κυτταρομετρία ροής κυτταρογενετικές εξετάσεις)

Επίσης, σε κάθε περίπτωση λαμβάνονται υπ όψιν και οι κατευθυντήριες οδηγίες των εγκύρων διεθνών επιστημονικών εταιρειών.

Η συμμετοχή του Εργαστηρίου σε προγράμματα συγκριτικών δοκιμών ικανότητας θα πρέπει να είναι τουλάχιστον ετήσια, διασφαλίζοντας τη συμμετοχή όλων των μελών του Εργαστηρίου.

Για αρχική αξιολόγηση και επέκταση απαιτείται η συμμετοχή για τις υπό διαπίστευση δοκιμές, ενώ για τη διατήρηση της διαπίστευσης του Εργαστηρίου πρέπει να καλύπτει όλο το Πεδίο δοκιμών (ΕΠΕΔ) εντός της 4ετίας,

Επίσης, λαμβάνονται υπ όψιν και οι κατευθυντήριες οδηγίες των εγκύρων διεθνών επιστημονικών εταιρειών.

## **6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Rabenau HF, Kessler HH, Kortenbusch M, Steinhorst A, Raggam RB, Berger A. Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. J Clin Virol 2007;40:93-8.

Mattocks CJ, Morris MA, Matthijs G, Swinnen E, Corveleyn A, Dequeker E, et al. A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. Eur J Hum Genet 2010;18:1276-88.

Kessler HH, Raggam RB. Quality assurance and quality control in the routine molecular diagnostic laboratory for infectious diseases. Clin Chem Lab Med. 2012;50:1153-9.

Burnett D, Blair C, Haeney MR, Jeffcoate SL, Scott KWM, Williams DL. Clinical pathology accreditation: standards for the medical laboratory. J Clin Pathol 2002. 55:729–733.

Prenc E.M. Genetic Testing, 1999; Vol 3, 201-205.

Requirements for a Pathology Laboratory. Discussion paper for European Society of Pathology Executive Committee, 1999.

Lynnette Savaloja, George Birdsong. Validating and verifying molecular tests in cytopathology., CAP, 2011.

Requirements for Pathology Laboratories, NPAAC, 2007.

William B. Hamlin. Requirements for Accreditation by the College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program. Arch Pathol Lab Med.1999;123:465–467.

Raymaekers M. et al. Reflections and proposals to assure quality in molecular diagnostics. Acta Clinica Belgica, 2011; 66-1.

Essential Procedures for Clinical Microbiology. ISENBERG H.D. ASM Press 2011.

## **7. ΧΡΗΣΙΜΕΣ ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ**

ΕΛΟΤ: <http://www.elot.gr/>

EPTIS: <http://www.eptis.bam.de/en/index.htm>

ISO: <http://www.iso.org/iso/home.html>

Eurogentest: <http://www.eurogentest.org/index.php?id=139>

IFCC: <http://www.ifcc.org/>

CLSI: <http://www.clsi.org/>

CAP: <http://www.cap.org/apps/cap.portal>