Harmonizace

a klinické laboratoře

B. Friedecký, J. Kratochvíla
SEKK Pardubice
www.sekk.cz

Ekvivalence výsledků měření

- Výsledky měření různými metodami a v různých laboratořích jsou ekvivalentní, pokud leží uvnitř intervalu maximální akceptovatelné nejistoty U_{max} udané výrobcem respektive požadované pro zamyšlené použití, zde pro diagnostiku nebo terapii
- U programů EHK znamená ekvivalence výsledek měření uvnitř intervalu APS

$$X_1 - X_2 \leq U_{max} \text{ nebo APS}$$

- ***APS –analytical performance specification***
  (kontrolní meze, limity akceptovatelnosti)

Definice harmonizace dle ISO 21151:2020

3.3
harmonisation
harmonised
achievement of equivalent measured quantity values (within clinically meaningful limits) for human samples examined for a stated measurand among two or more IVD MDs by applying an international consensus protocol in their calibration hierarchies when fit-for-purpose higher order reference materials or reference measurement procedures are not available

Note 1 to entry: Harmonisation is one of the calibration hierarchy models described in ISO 17511:2020 to achieve metrologically traceable quantity values for human samples.

Note 2 to entry: Harmonisation is a special case of non-SI traceable standardization where the calibration of two or more IVD MDs is traceable to an international harmonisation protocol that defines the highest level of metrological traceability for the stated measurand, but with no traceability to SI.

Standardizace a harmonizace dva nástroje dosažení ekvivalence výsledků

Standardizace-dosažení ekvivalence výsledků měření cestou metrologické návaznosti, referenčního systému, kalibrační hierarchie.

Vztahuje se k analytickému postupu měření.

Harmonizace-dosažení ekvivalence výsledků i bez existence metrologické návaznosti a referenčního systému.

Vztahuje se k celému postupu získání výsledku pacientského vzorku, včetně preanalytické a postanalytické fáze.

Normy - zdroje základních informací o návaznosti a harmonizaci IVD MD

- **ISO 17511:2020 popis** metrologické návaznosti IVD(In vitro medical devices)
- **VIM 3- Metrologický slovník -** pojmy a názvosloví
- **GUM:2008** – Pokyn pro vyjádření nejistot měření chyb a nejistot (česky TNI 014109-3)
- **ISO/TS 90214:2019** Výpočet nejistot ve zdravotnických laboratořích
- **ISO CD 21151:2020** norma pro mezinárodní harmonizaci a tvorbu harmonizačních protokolů
- ***Čerstvě inovovaná Doporučení k vyjadřování nejistot a validaci a verifikaci jsou odvozena z těchto norem (www.cskb.cz/doporučení/)***

Harmonizace-shrnutí

- **Podléhají jí všechny (preanalytické, analytické, postanalytické) postupy při získání výsledků měření**
- **Dosažení ekvivalence výsledků měření pro různé analyty a parametry, testovací soupravy a přístrojové platformy**
- **Podmínka prediktivní, precizní a personalizované medicíny**

- ***B. Friedecký, J. Kratochvíla: Harmonizace v klinických laboratořích. Klin Biochem Metab 2019, 27/3:116-123.***

Harmonizační protokol podle ISO CD 21151:2020

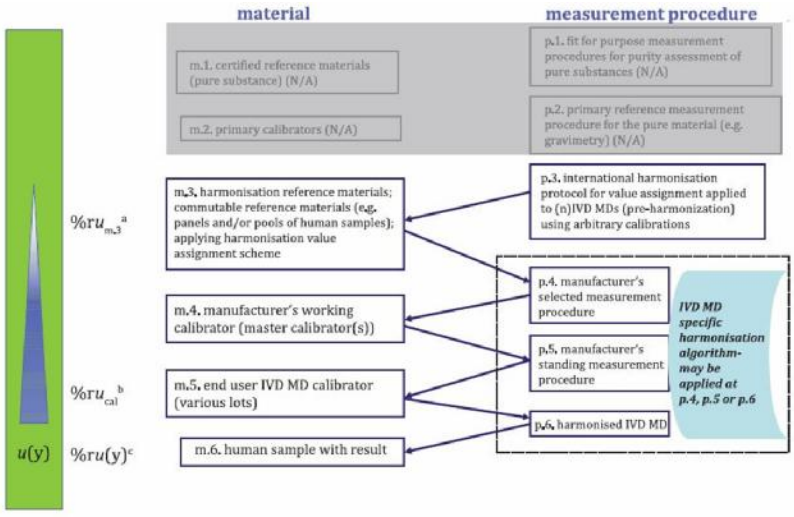
(In vitro diagnostic medical devices - Measurement in samples of biological origin. Requirements for international harmonisation protocols establishing metrological traceability of values assigned to calibrators and human samples) **shrnuje hlavní rysy požadavků na IVD produkty-**

- Maximální ohled na klinické požadavky
- Referenční a kalibrační materiály s validovanou komutabilitou
- Nejistoty hodnot vždy vyjádřeny jako nejistoty a ne jinak
- Kriteria pro akceptování/odmítnutí IVD v laboratoři
- Harmonizační protokoly by měly být součástí pracovní dokumentace
- Dostatečné a transparentní informace výrobců uživatelům
- Verifikace hodnot kalibrátorů
- Materiály ke kontrole stavu harmonizace: **komutabilní** (buď lidská matrice bez úprav a spikování aditiv nebo **s verifikací komutability** po těchto úpravách

- ***Reálná situace je velmi vzdálená od požadavků, příliš velkou roli hrají komerční zájmy výrobců a nedostatečná profesionalita pracovníků laboratoří.*** *V případě pandemie COVID-19 to byla navíc nutnost rychlosti zásahů a pominutí jejich odbornosti*

Schéma harmonizačního protokolu (ISO 21151).

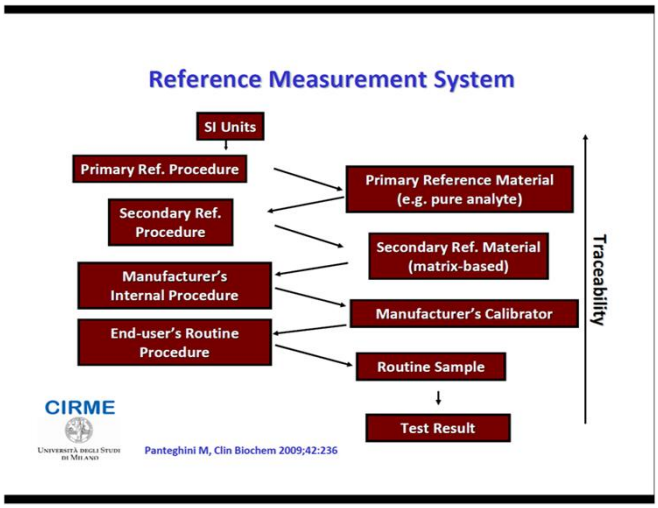
Kalibrační hierarchie IVD MD je nástroj. **Ekvivalentní výsledky jsou cílem.**



ISO 17511:2020 a popis kalibrační hierarchie

- **S metrologickou návazností**
- Odvození rutinní kalibrace od RMP a CRM (základní analyty séra)
- Odvození od exaktně popsané RMP (enzymy)
- Odvození od dokonale definované složky analytu (peptidu, epitopu) HbA_{1c}
- **Bez metrologické návaznosti (5.6 – harmonizace)**
- Zde se rutinní kalibrace odvozuje z vnitřních standardů výrobce
- Vnitřní standardy různých výrobců neposkytují ekvivalentní výsledky měření (závislost na metodě/přístrojové platformě zůstává, požadavek metrologické návaznosti plněn jen formálně)

Schéma metrologické návaznosti. Kalibrace je odvozena z jednotky měření pomocí referenčních materiálů.Rutinní metody odvozeny z referenčních metod. **Ekvivalentní výsledky jsou cílem.**



Zásadní znaky ISO 17511-2020

- Vyžaduje validaci komutability u referenčních materiálů
- Nezná pojem chyby měření a pracuje důsledně s pojmem nejistoty
- Popisy různých typů metrologické návaznosti (annex 5.1 až 5.6) a výpočty nejistot u nich

Jednotky měření - základ metrologické návaznosti a exaktního měření

- Molární
- Hmotnostní
- Početní (např. kopie DNA-RNA/µl)

- *Nesrovnatelnost číselných hodnot výsledků vlivem použití různých jednotek je zejména v imunochemii častá (i 5 až 7 různých výsledků u různých metod/platforem). Je častým zdrojem chyb a chybějící ekvivalence výsledků u různých metod a laboratoří*
- ***Při harmonizaci jednotek měření by měly hrát programy EHK klíčovou roli***

Redefinice jednotek měření od května 2019 BIPM - Mezinárodní úřad pro míry a váhy

• **Jednotka**	**Princip definice**
• Čas	Frekvence záření 133 Cs
• Délka	Rychlost světla
• Látkové množství	Avogadrova konstanta
• Teplota	Boltzmannova konstanta
• Hmotnost	Planckova konstanta

- **Zásada definicí jednotek měření - fyzikální konstanty s hodnotami nejistot, blížících se nule**
- Podrobnosti velmi instruktivně zpracované na https://www.bipm.org/en/measurement-units

Zásady harmonizace podle International Consortium for Harmonization of Clinical Laboratory Results ICHHCLR- společný podnik AACC, IFCC www.harmonization.net

- **Preferovat standardizaci všude, kde je to možné**
- **Komutabilní vzorky v EHK všude, kde je to možné (EHK „1 kategorie“)**
- **Harmonizace jednotek měření**
- **Harmonizace referenčních intervalů**
- **Harmonizace hodnot APS v EHK (patří sem i D_{max} SEKK)**

- *Tyto zásady jsou nezbytné pro efektivitu klinických laboratoří a pro medicínu, založenou na důkazech. Pandemie COVID-19 a problematičnost spolehlivosti statistických hodnot při jejím řešení je dostatečným příkladem potřeby celosvětové harmonizace*

Stav harmonizace u jednotlivých analytů podle ICHCRL je popsán na www.harmonization.net

- **Abecední seznam analytů a stav jejich harmonizace**
- **Stupeň harmonizace je vyjádřen slovně:**
- **Není (needed)**
  Nehotová (incomplet)
  Adekvátní / udržovaný (appropriate/sufficient)

- ***V seznamu jsou i údaje o příslušných odpovědných institucích***

Pracovní skupiny EFLM pro harmonizaci
(*V současnosti je typická velmi nízká účast českých pracovníků na jejich činnostech***)**

APS	kontrolní meze/limity programů EHK
PRE	harmonizace preanalytické fáze
PFML (patients focused LM) - digitalizace, telemedicína	
EuBIVAS	Biologické variability

Chyba nebo nejistota?

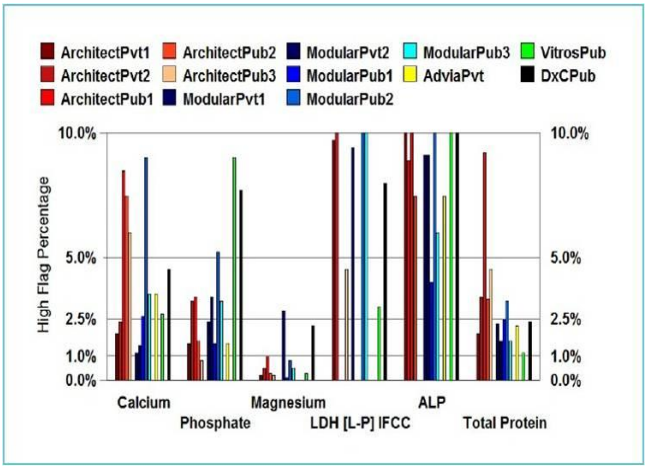
- Chyba není předmětem normy ISO 17511 i když se v praxi používá (zejména u hodnocení EHK):
- *TE = z . SD+ b (z = 1,65 nebo 1,96)*
- ISO 17511 pracuje zásadně jen s pojmem nejistoty a používá různých modifikací jejího výpočtu podle GUM a ISO 20914
- Základní princip výpočtu kombinované nejistoty měření je popsaný rovnicí

Uc^2 = u(referenční materiál)^2+ u (preciznost)^2

Důsledky absence harmonizace (EFLM 2018)

- Problémy s referenčními intervaly a rozhodovacími limity
- Desinterpretace diferencí mezi metodami, obvykle z komerčních důvodů ve prospěch výrobců
- Chronologické chyby u kumulativních nálezů
- Chybná nebo neoptimální volba méně kvalitních metod a analytických platforem při jejich pořizování

Procenta výsledků měření nad zvolenou kritickou hodnotou jako indikátor harmonizace. Ukazuje významné rozdíly mezi IVD soupravami



JCTLM

- **Joint Committee on Traceability in Laboratory Medicine** Mezinárodní společná komise pro návaznost v laboratorní medicíně (BIPM-JCTLM)
- Součást mezinárodního ústavu pro míry a váhy BIPM (Sévres)
- Referenční metody, referenční materiály, metrologická návaznost výsledků měření získaných použitím IVD, registrace a kontrola referenčních laboratoří, spravuje databázi referenčních materiálů a referenčních metod
- Weby:
- https://www.bipm.org/en/committees/jc/jctlm/
- https://www.bipm.org/en/about-us/
- https://www.ifcc.org
- https://www.aacc.org/

JCTLM a příklad dokumentace metrologické návaznosti (ALT) na webu: https://www.bipm.org/en/committees/jc/jctlm/

JCTLM

List of reference measurement services

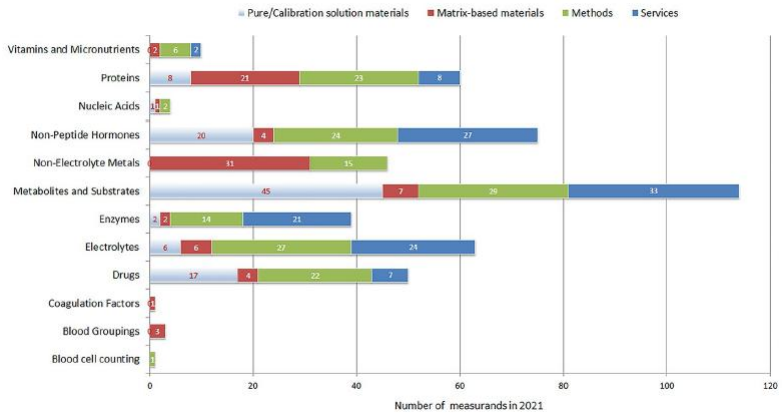
This file was created on 04 November 2010 from the JCTLM-DB website (http://www.bipm.org/jctlm/)
Your search criteria: Reference measurement services; Analyte: ALT; Analyte category: Enzymes; Matrix category: Blood serum

CIRME, Italy	
Phone : +39 02 3904 2806 Fax : +39 02 5031 9835	Contact person : Prof. Mauro Panteghini Email : mauro.panteghini@unimi.it
Analyte	alanine aminotransferase (ALT)
Material or matrix	blood serum, blood plasma
Applicable material or matrix	human serum or plasma (heparin); lyophilized, fresh, or frozen
Quantity	Catalytic activity concentration
Service measurement range	0.063 µkat/l to 4.17 µkat/l The conversion factor for enzyme catalytic activity concentrations: 1 U/L = 0.01667 µkat/L
Expanded uncertainty (level of confidence 95%)	(not available) to 2.3% The uncertainty of the lower limit of the measurement range is not available as this enzyme value is clinically unrelevant
Interlaboratory comparison results	RELA - IFCC External Quality assessment scheme for Reference Laboratories in Laboratory Medicine at http://www.dgkl-rfb.de.81/index.shtml Siekmann et al., *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2002, **40**, 739-745
Measurement principle	Kinetic spectrophotometry
JCTLM reference measurement method/procedure	IFCC reference measurement procedure (37 °C) for ALT

CIRME
Università degli Studi di Milano

JCTLM Databáze RM (duben 2021)

257 záznamů; 180 analytů a parametrů; 213 referenčních metod; 203 referenčních měření. Rutinní analyty klinické biochemie vykazují již nižší než 50 % podíl



Vybrané matricové referenční materiály SRM NIST a ERM v laboratorní medicíně

Nr.	Analyt	Referenční metoda
927	Albumin	**Biuretová metoda**
956	Elektrolyty (Na, K, Ca, Mg, Li, P, iCa)	**ID-ICP-MS,ICP-OES, I-ISE**
965 a	Glukóza	**ID GC MS**
971	Steroidní hormony	**ID LC-MS/MS**
972 a	Vitamin D a metabolity	**ID-LS-MS/MS**
1051c	Lipidy (chol, HLD, LDL)	**ID GC-MS/MS**
967a	Kreatinin	**ID-LC/MS**
471 (ERM-DA)	Cystatin C	**ID-MS**
2658a (SRM-NIST)	pO_2	**Tonometrie**

Certifikované evropské referenční materiály ERM

- ERM DA 470 k — Proteiny
- ERM DA 471/IFCC — Cystatin C
- ERM DA 472 — CRP

- ERM DA 452-457 — Sérové enzymy

Reference **M**ethod **P**rocedures

IFCC primární referenční metody pro enzymy

ALT, AST, α-AMS, GGT, CK, LD, ALP

IFCC referenční metody pro HbA_{1c}

ESI – HPLC - CE
ESI – HPLC - MS

Ukázka harmonizace stanovení albuminu a kreatininu pomocí výsledků měření UK NEQAS

ICHCLR www.harmonization.net

Albumin v séru – není harmonizován

Kreatinin v séru -- akceptovatelná harmonizace

UK NEQAS: komutabilní kontrolní materiály

	BCP (g/l)	**BCG (g/l)**
Albumin	40,9 ± 0.9	43,5 ± 1,4
	45,4 ± 1,0	47,6 ± 1,4
	50,1 ± 1,0	51,1 ± 1,7
$eGFR_{crea}$ (bias v %)	Enzymaticky	Jaffé s korekcí
•	-8 % až -5 %	-10 % až -8 %

- Lepší volba metody (BCP pro albumin a enzymatická pro eGFR) **by zlepšila celkovou úroveň harmonizace**
- ***Sledování koncentrace albuminu v séru u pacientů s COVID-19 podtrhlo důležitost zvýšené harmonizace***

Harmonizace stanovení albuminu v moči

Liu Q: IDMS method for the Urine Albumin. EQA program JCTLM Meeting 2019 (Sévres)

Metoda: LC-IDMS/MS

Vnitřní standard : ^{15}C-Albumin

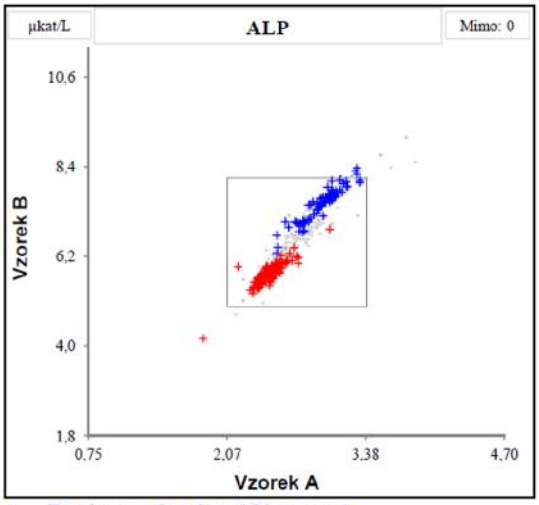
Materiál: verifikovaný na komutabilitu

Kalibrátor: (1) peptid po digesci albuminu,		(2) CRM 470
CV	1,0	1,6
Recovery (%)	96,4	103,2

Demonstrace, jak je možné, ale i náročné vytvořit komutabilní certifikovaný referenční materiál pro kalibraci a EHK programy

Nedostatek harmonizace – stanovení ALP - (AKS 2019 - SEKK)

- Referenční metoda IFCC 2011
- N = 383
- **D_{max}**= 24 % až 28 %
- Bias (Roche): **-17 %**
- Bias (Olympus) **+14 %**
- **Kalibrace pomocí referenční metody IFCC 2011 neproběhla dostatečně**



+ ... Beckman Coulter (Olympus)
+ ... Roche

Nedůsledná standardizace základních sérových analytů

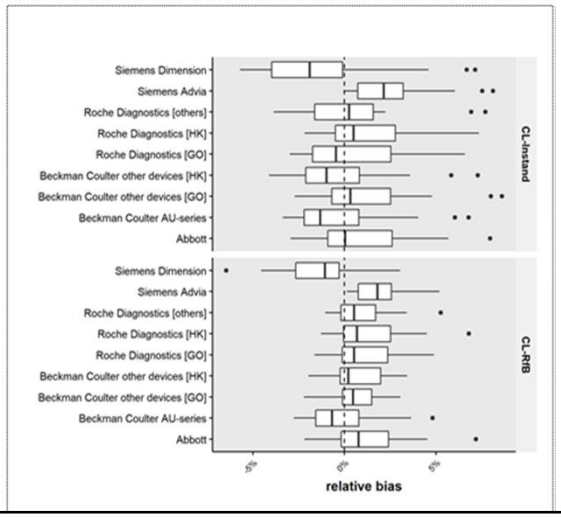
- Albumin — Preference BCP před BCG
- Kreatinin — Bez metody Jaffé, jen enzymaticky
- ALP — Nedostačující, neřešená, standardizace dle metody IFCC 2011
- ALT/AST — bez přídavku pyridoxal-5-fosfátu
- a-AMS — Problémy s metodami se substrátem G3

Tyto příklady ilustrují velký nedostatek kooperace metrologických institucí s výrobci IVD a preferenci komerčních zájmů výrobců před principy metrologie

Harmonizované rozhodovací meze.
Ukázky z mezinárodních lékařských doporučení (diabetes, dyslipidémie, chronická renální choroba)

Glukóza 5,1 gestační DM
5,6 prediabetes
7,0 diabetes
oGTT 2 hod glukóza 11,1 mmol/l
HbA1c 42 mmol/mol bez DM,
48 mmol/mol kompenzace DM
54 mmol/mol změna terapie
eGFR 1,0 ml/s non CKD
< 1 ml/s **klasifikace** 5 stadií CKD)
LDL-C 1,8 mmol/l riziko KV
2,6 mmol/l **cíl léčby**
TG 1,7 mmol/l na lačno
Viz příslušná doporučení na webu ČSKB

Harmonizace znamená nízký bias a z toho plynoucí vysokou shodu diagnostických klasifikací (glukóza v programech EHK RfB a Instand v období 10 let)



Pojem komutability

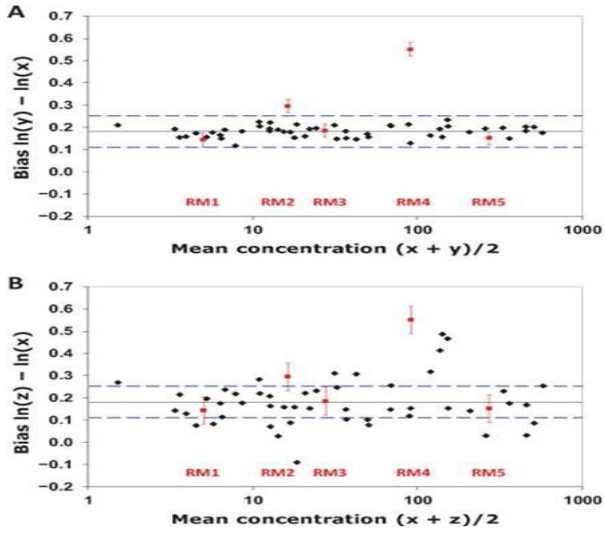
- Rozdíly mezi vzorky klinických a referenčních materiálů jsou statisticky nevýznamně rozdílné u různých metodických postupů
- Za kriterium komutability lze považovat akceptovatelné hodnoty nejistot U_{max} (ISO 17511), nebo hodnoty požadovaných TE nebo APS.

Význam komutability

- **Je to kritická vlastnost pro kvalitu:**
- Kalibrátorů rutinních metod
- Kontrolních materiálů pro stanovení bias, chyby a nejistoty měření

- Komutabilita je dána dostatečnou podobností matricí
- Nejblíže komutability jsou vzorky pacientů (třeba z biobank)

Grafické znázornění vyhodnocení komutability- dle pracovní skupiny IFCC (červené body - ref. materiály, černé body - pacienti). Referenční hodnota a meze akceptance komutability vyznačeny čárami



Harmonizace a chronická ledvinová choroba CKD

- **KDIGO 2012**
- Metrologická návaznost měření kreatininu a cystatinu C
- Harmonizace výpočtů eGFR
- Harmonizace rozhodovacích dg. mezí

- *Eliminace neselektivní metodiky s alkalickým pikrátem při stanovení kreatininu, harmonizace pracovních kalibrátorů IVD při stanovení cystatinu C jsou okamžitým dostupným cílem*

Harmonizace a akutní infarkt myokardu

- Analytické charakteristiky kardiálních markerů shrnuty na webu IFCC WG C-CB
- https://www.ifcc.org v oddíle EMD Committee (Clinical Applications of Cardiac Biomarkers (C-CB) v šesti tabulkách:

- hs cTn
- non hs cTn
- POCT cTn
- BNP, NT-pro BNP, pro-ANP
- interference u cTn
- interference u natriuretických peptidů

Harmonizace a akutní infarkt myokardu

Charakteristiky kardiálních markerů shrnuty na webu IFCC WG C-CB v tabulkách

Základní parametry

- Genderový charakter 99 percentilů
- Metody typu hs cTn (>50 % kvantifikace vzorků v intervalu LoD-99 percentil)
- Preciznost (≤ 10 %)
- IQC (minimálně 1 vzorek s hodnotou kolem 99 percentilu)

Harmonizace a diabetes

Pozitiva harmonizace

- Metrologicky návazné stanovení glukózy, HbA_{1c}, albuminu v moči a dalších analytů a parametrů a existence komutabilních kalibrátorů a kontrolních materiálů
- precizní definice diagnostických rozhodovacích mezí

Problémy harmonizace

- Preference kontrolních materiálů z plné krve pro lepší komutabilitu u glykovaného hemoglobinu HbA_{1c},
- Problémy kontrolních materiálů u kontroly glukometrů
- Nutnost trvalého hodnocení ve skupinách (peer groups) u glukometrů
- Nerozvinutý systém analytické kontroly u CGM (continuous glucose monitoring) - ***jediným nástrojem kontroly je zatím měření HbA_{1c}***

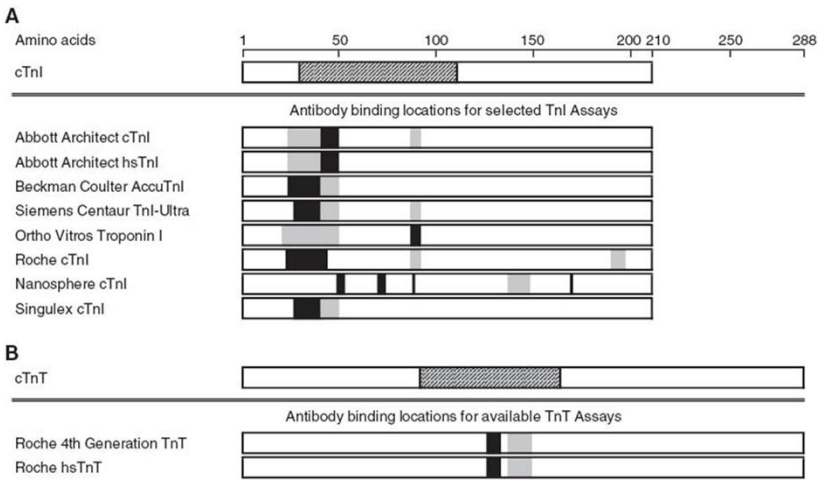
Harmonizace ukazatelů CGM

- Diabetes mellitus - laboratorní diagnostika a sledování stavu diabetu. Doporučení ČSKB a CDS: https://www.cskb.cz/doporuceni/
- V kapitole 3.3.1 popsána harmonizace ambulantního glukózového profilu (AGP) a trendy vývoje CGM
- V kapitole 3.3.3. popsána konektivita glukometrů

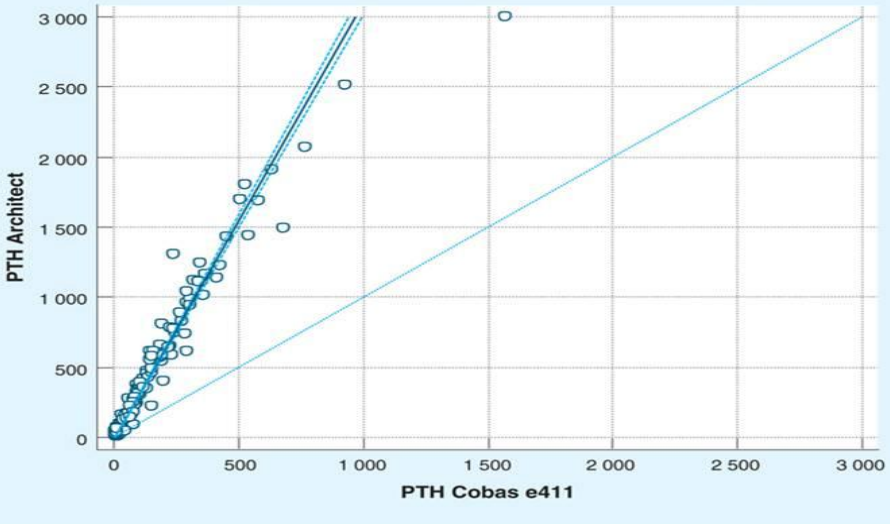
Imunochemie a harmonizace

- **Metody jsou nestandardizované a neharmonizované a většinou produkují číselně nesrovnatelné výsledky**
- Harmonizaci lze dosáhnout jen pomocí referenčních intervalů, specifikovaných pro metody, dg. situace, věk, pohlaví

Nedostatečná definice analytu při imunostanoveních, překážka harmonizace. Různost záchytných a reagenčních protilátek u různých metod měření cTnI/T



Intaktní PTH Abbott vs biointaktní 1-84 PTH Roche Cobas. Příklad fatální neekvivalence při imunostanoveních, kde je velmi častá. Tato prezentace uvedena na workshopu IFCC (Budapešť listopad 2018)



Vitamin D-Mezinárodní program standardizace VDSP

- Referenční metody LC-MS/MS
- Metrologická návaznost - SRM NIST 972a, SRM-NIST 2973
- Programy EHK/PT DEQAS, CAP ABVD
- Problém interferencí metabolitů u imunochemických metod
- Problém nízké analytické selektivity imunochemických metod
- Problém nekomutability kontrolních materiálů v mnoha programech EHK včetně SEKK

Externí hodnocení kvality. Princip „third party“ = nezávislost kontroly

EHK hraje důležitou roli jako „třetí strana" v procesu řízení kvality.Bez ní se výrobce kontroluje sám

- 1 výrobce 2 laboratoř 3. EHK/PT

Programy EHK mohou odhalit nedokonalost metrologické návaznosti u souprav. Různá úroveň návaznosti u různých metod cystatinu C, kvantifikovaná hodnotami bias.

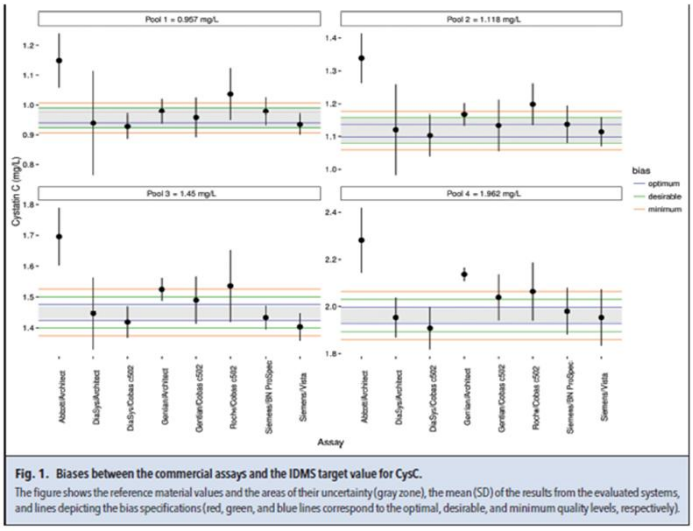


Fig. 1. Biases between the commercial assays and the IDMS target value for CysC.
The figure shows the reference material values and the areas of their uncertainty (gray zone), the mean (SD) of the results from the evaluated systems, and lines depicting the bias specifications (red, green, and blue lines correspond to the optimal, desirable, and minimum quality levels, respectively).

Je efektivita standardizace u rutinních analytů v Evropě dostatečná? (Studie INPUtS, CV % v 5 evropských zemích ukazují nemalé diference mezi zeměmi a výrobci IVD).

Analyt (CV %)	Celkem	Země	IVD
Draselný kation	6,1	4,7 - 7,6	3,3 – 7,8
Glukóza	7,5	6,7 - 8,3	2,9 – 8,7
Cholesterol	7,9	7,1 - 10	4,9 – 10
ALT	31	8 - 38	20 - 39

Stav u stanovení ALT je způsoben častou absencí pyridoxal-5-fosfátu v činidle. Stav v programu SEKK-srovnatelné výsledky u elektrolytů a substrátů, podstatně lepší stav u enzymů, díky velmi vysokému stupni standardizace v laboratořích účastníků

Komutabilní kontrolní materiál s referenční hodnotou posoudí kvalitu laboratoře i metody (HbA_{1c})

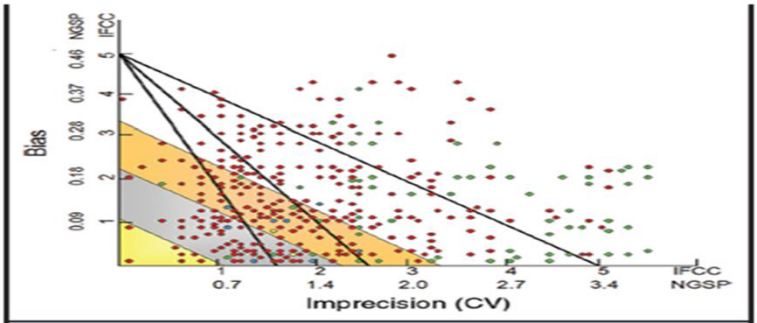


Fig. 3. Models applied to 342 individual laboratories.
Each dot represents an individual laboratory: red, HPLC; green, immunoassay; yellow, affinity chromatography; blue, capillary electrophoresis. For simplicity, only 2σ, 4σ, and 6σ limits for TAE = 5 mmol/mol (0.46%) of the SM model are shown. Yellow, gray, and amber are the limits of optimum, desirable, and minimum performance of the biological variation model. Data from the shared 2013 EQA program in Belgium, the Netherlands, Greece, and Finland.

Komutabilní kontrolní materiál s referenční hodnotou dovolí porovnat kvalitu v různých zemích a u různých metod (HbA_{1c})

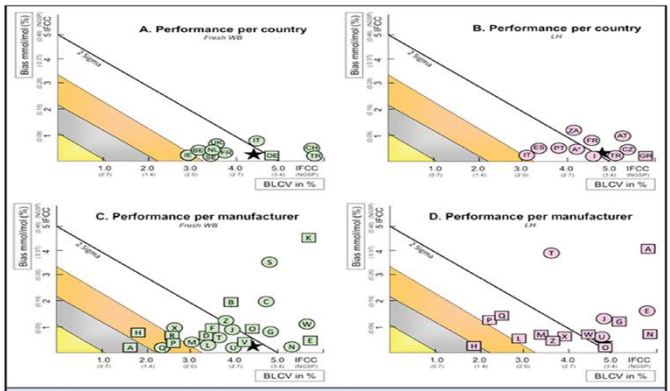


Fig. 2. Performance per country (A and B) and per manufacturer (C and D).
Mean BLCV is on the horizontal axis; mean absolute bias is on the vertical axis. The black star represents the overall performance of all laboratories. In A and B, the circles and squares represent the countries (for abbreviations, see legend of Fig. 1; A* is Austria without Abbott enzymatic test users). In C and D, the circles and squares represent the manufacturers: Abbott Architect Enzymatic test (A), Abbott Architect Immunochemical test (B), Abbott test not specified (C), Alere Afinion (D), Beckman Coulter AU systems (E), Beckman Coulter Unicell DxC systems (F), Bio-Rad D10 (G), Bio-Rad D100 (H), Bio-Rad Variant II (J), Medinor (K), Menarini-ARKRAY HA-8160 (L), Menarini-ARKRAY HA-8180 (M), not specified methods (N), Roche (O), Sebia Capillarys 2 Flex Piercing (P), Sebia Capillarys 3 Tera (Q), Sebia MiniCap (R), Siemens Advia (S), Siemens DCA/Vantage (T), Siemens Dimension (U), Siemens not specified (V), Tosoh G7 (W), Tosoh G8 (X), Trinity Biotech Premier Hb9210 (Z). The bias on the *y* axis is absolute; to differentiate positive and negative bias, circles and squares represent positive and negative bias, respectively.

Harmonizace a APS u standardizovaných postupů

- **Tři metody ustanovení APS podle pracovní skupiny WG APS EFLM (Milano 2014)**
- **Klinické požadavky dle mezinárodních Doporučení a mezinárodních pracovních skupin (např. WG IFCC či WG EFLM)**
- **Biologické variability (databáze EuBIVAS)**
- **State of the art (organizátoři programů EHK)**

Požadavky na kvalitu laboratorních metod v EHK (APS) nejsou dosud důsledně harmonizované. (HbA_{1c})

- Požadavek kliniků 2018 ≤ 10 %
- CLIA USA ≤ 10 %
- Výpočet z biol. variabilit ≤ 5 %
- RfB kriterium do roku 2019 ≤ 18 %
- RfB od roku 2020 (Rilibäk) ≤ 8 %
- NGSP USA ≤ 6 %
- EQA Italy ≤ 6 %
- SEKK CZ (2021) ≤ 13 %

Programy EHK s kalibrací na vnitřní standard výrobce

- Jde často jen o paradoxní potvrzování závislosti výsledků měření na postupech a výrobcích IVD
- Referenční hodnoty jsou dány středními hodnotami skupin IVD

- ***Výměna generací souprav IVD u výrobce neznamená dvě referenční hodnoty ani dva typy souprav s neekvivalentními výsledky na trhu!***
- ***Tento požadavek je nutno považovat za minimum požadované harmonizace***

Podle IVD ISO 17511 mají být v dokumentaci výrobce uvedené nejistoty pracovních kalibrátorů. Tabulka ukazuje, jak má situace k harmonizaci daleko

5 globálních výrobců
Analyt: Kreatinin
20 pracovních kalibrátorů
Dokumentace: 16x udáno, 4x neudáno
Hodnoty u(c) uvedené v dokumentaci výrobců: 0,3 až 5,1 %
Experimentem v laboratoři verifikované hodnoty u(c)= 1,5 až 2,8 %
Referenční laboratoře RELA IFCC 2018 u(c) = 1 až 5 %

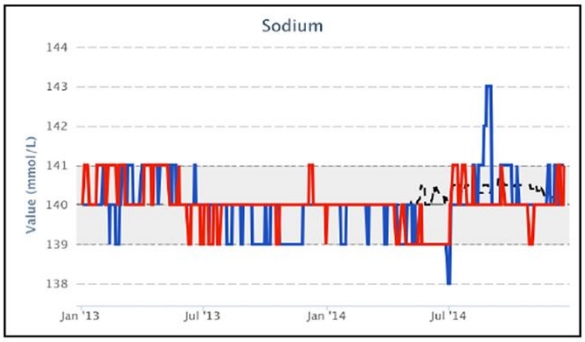
Žádná harmonizace tam, kde není žádná reference (autoprotilátky). Komutabilní materiál nepomůže, EHK jen konstatuje stav (AT 2/19)

576) Anti-mikrosomy (TPO)

A1	(1) Abbott	±	9	Negativní	4,7%
		±	6	Neprůkazný výsledek (hraniční)	3,1%
		±	32	Pozitivní	17%
	(12) Beckman Coulter	>>>	16	Negativní	8,3%
			2	Neprůkazný výsledek (hraniční)	1,0%
	(15) bioMérieux	>>>	1	Negativní	0,52%
	(25) TOSOH	>>>	5	Negativní	2,6%
			2	Neprůkazný výsledek (hraniční)	1,0%
	(29) Siemens (DPC)	>>>	25	Negativní	13%
			1	Pozitivní	0,52%
	(36) Immunotech	>>>	2	Negativní	1,0%
			1	Neprůkazný výsledek (hraniční)	0,52%
	(49) BioVendor	>>>	1	Negativní	0,52%
	(59) PHARMACIA Diagnostics	>>>	1	Negativní	0,52%
	(60) Roche	>>>	58	Negativní	30%
			1	Neprůkazný výsledek (hraniční)	0,52%
	(135) OrgenTec	>>>	2	Negativní	1,0%
	(148) Aesku.lab Diagnostika	>>>	1	Negativní	0,52%
	(149) Siemens (Dade)	>>>	2	Negativní	1,0%
	(164) DiaSorin		1	Neprůkazný výsledek (hraniční)	0,52%
	(179) Siemens (Bayer)	>>>	21	Negativní	11%
			1	Neprůkazný výsledek (hraniční)	0,52%
			1	Pozitivní	0,52%

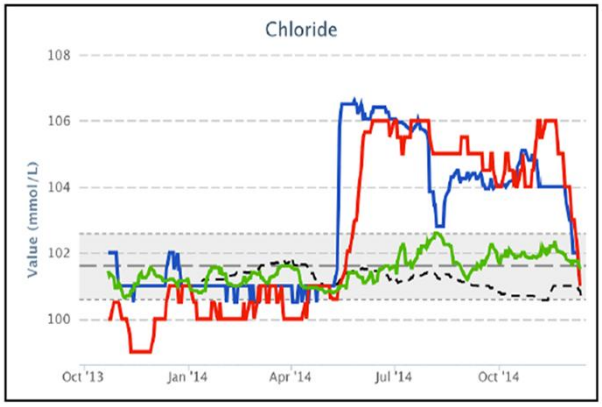
Sledování PBRTQC (patient-based real-time quality control) -robustnost měření Na ISE v čase je veliká; střední hodnoty výsledků pacientů – omezující meze

Supplemental Figure 1 Time course of the sodium moving median in a laboratory with a 2-year lasting "1 mmol/L stability" and excellent instrument comparability



PBRTQC - robustnost měření chloridů v ISE čase je problematická

Supplemental Figure 3 Time course of the chloride moving median in a laboratory with robustness problems of the ion selective electrode



Počet kontrolních stanovení POCT u prakt. lékařů (EQA NOKLUS)

(Sandberg S. et al.: Clin Chem 2016 in press)

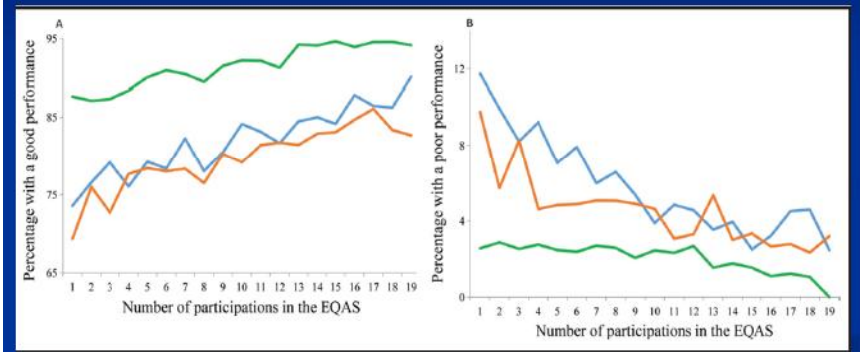


Fig. 1. Percentage of participants exhibiting good performance (A) and poor performance (B) related to the number of times they participated in the CRP (blue line), glucose (orange line), and Hb (green line) EQASs.
The number of participants participating 1 and 19 times were for CRP 2698 and 162, for glucose 2787 and 156, and for Hb 2694 and 324.

Cesty k harmonizaci POCT I

- **Provést validaci a získat certifikaci (clearance) FDA USA (NGSP)**
- Příklady:
- Abbott iSTAT8^{+} (**elektrolyty, glukóza, urea, kreatinin)**
- Afinion Abbott ALERE; Siemens DCA Vantage (**HbA_{1c}**)
- MiniCAP Sebia CE (**proteiny, CDT, HbA_{1c}**)

Cesty k harmonizaci POCT II

- **Harmonizace cestou úspěšné účasti v programu EHK**
- Příklady
- *Program* **HbA_{1c}** *Noklus (plnohodnotný cyklus s referenčními hodnotami a s APS o hodnotách, identických s centrálními klinickými laboratořemi*
- *Národní program EHK použitelný i pro* ***elektrolyty a krevní obraz*** *(SEKK)*

Cesty k harmonizaci POCT III

- U infekčních chorob (AIDS, syfilis, malárie, Ebola, Zika)
- Zajištění validace výsledků měření POCT přes mezinárodní referenční laboratoře a programy EHK
- Spojení s kontinuální edukací a certifikací personálu

Cesty k harmonizaci POCT IV

- Jen masivní propagace všemi prostředky
- Zatím bez jakýchkoliv analytických dat a znaků analytických metod, jen reklama.
- Chybí validace/verifikace, potvrzení ekvivalence výsledků
- Typická je absence programů EHK

Aktuální přístup k harmonizaci POCT

Riziko inflace notifikačních procesů (několik set souprav k stanovení SARS-CoV-2 a anti-SARS-CoV-2 se značkami EUA a/nebo CE

Harmonizace odběru vzorků zahrnuje

- Typ zkumavek-jejich značení
- Závislost na výrobci
- Antikoagulancia
- Separační gely

- ***Moderní sekvenační metody DNA a metody hmotnostní spektrometrie jsou na podmínky odběru mimořádně citlivé. Na separační gely, hemolýzu, rozdíly plasma/sérum, trombocyty, dobu skladování…***

Harmonizace barevného značení odběrových nádobek

- Více než 7 výrobců
- Více než 10 typů vzorků
- Ani jeden případ plné shody
- V Německu snaha dosáhnout harmonizace odběrových zkumavek a systémů v roce 2020

- *První standard (ISO) pochází z roku **1981.***
- *Colour coding for blood collection tube. cclm **2015** 53:371-376.*
- *Harmonisierung der Farbcodierung von Blutentnahmesystemen. DG Mitteilungen **2019**, 2:155-158.*

Odběr venózní krve-doporučení EFLM
PRE (CCLM 2018, 56/12:2015-2018)

- **Identifikace pacienta**
- **Identifikace vzorku**
- **Odběr od turniketu přes vpich až po promíchání vzorku ve zkumavce**

Preanalytika - hemolýza

- Doporučení EFLM-WG-PRE
- Asi 60 % vzorků je odmítnuto právě kvůli hemolýze
- Asi 3 až 3,5 hemolýz je „in vivo“
- Stanovení draselného kationtu - nástroj monitorování preanalytické kvality

Harmonizace sérových indexů (SI)

- Hlavní SI jsou hemolytický, ikterický a lipemický
- Nesrovnatelnost jejich hodnot u výrobců
- Nedostatečná kontrola kvality v klinických laboratořích

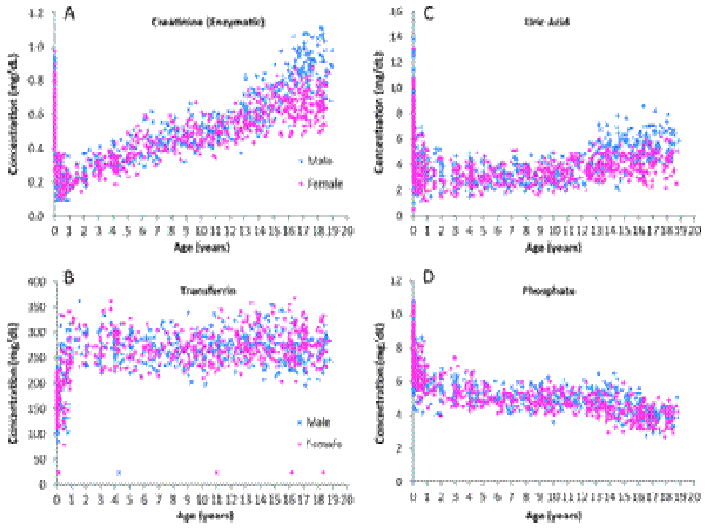
- ***European survey. Biochem Med (Zagreb) 2019, 29(2):020705***

Biobanky, možnost dodatečné harmonizace laboratorních dat, získaných v preharmonizační éře. Zdroj materiálu k vědecké práci a budoucnost EHK

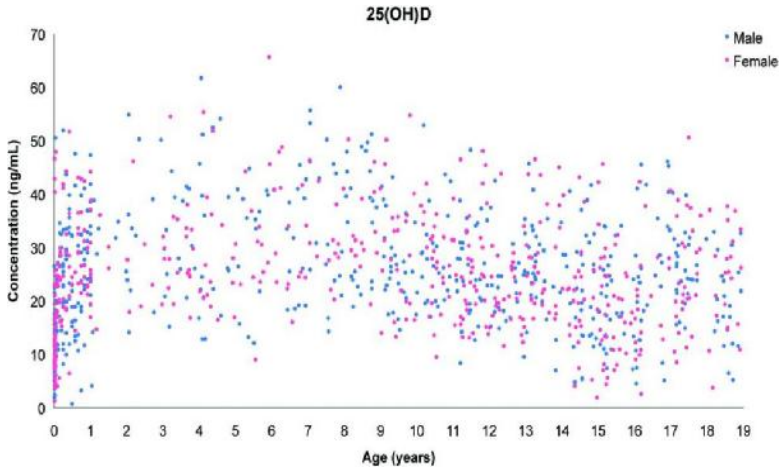
Big data a referenční intervaly

- **Experiment Number Holandsko 2018**
- 18 referenčních intervalů z asi 7,6 milionu výsledků z 16 laboratoří
- Základní analyty krevního séra, standardizované, metrologicky návazné k referencím
- Dobře srovnatelná data s výsledky „referenční populace“

Big data a referenční intervaly u dětí (Caliper Kanada)



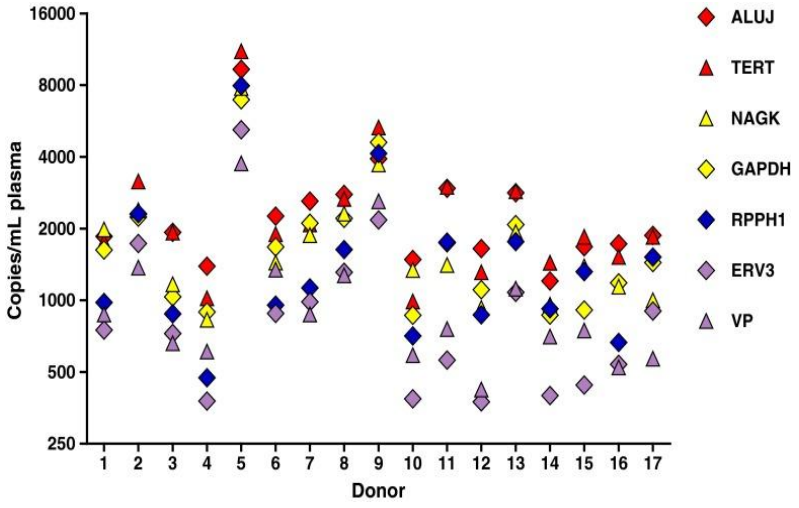
Vitamin D u dětí a adolescentů Caliper Kanada. Přístup big dat (věk a pohlaví)-personalizovaný vhled do problému



Ukázky certifikovaných referenčních materiálu v genomice

- SRM 1950 Metabolity
- SRM 2373 HER 2
- SRM 8375 DNA sequencing
- SRM 2372 Set DNA Quantification
- SRM 8321 Peptide proteomics
- SRM 2365 BK virus
- SRM 2366 CMV DNA
- ***Referenční metody: qPCR, dPCR, ddPCR***

cf DNA („kapalná biopsie“) u malignit a problém referenčních genů (7 referenčních genů-diference signifikantní). Principiálně jde o stejný problém jako u rutinních analytů

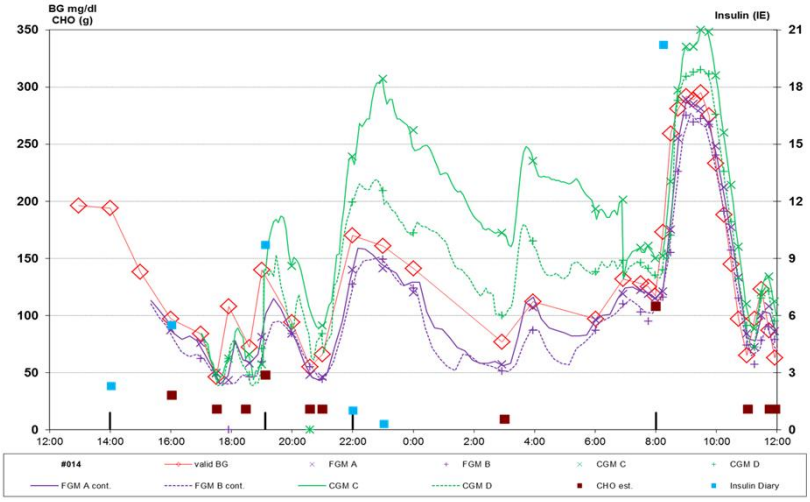


Testování referenčního materiálu metabolomiky SRM NIST 1950; Multicentrická studie (Siskos a spol.)

- 189 hodnocených analytů
- CV medián 6,7 %
- Recovery medián 107 %

- 85 % laboratoří s mezilaboratorní precizností CV < 20 %
- Nezbytný nástroj k dosažení harmonizace metabolomických měření v laboratořích

4 typy CGM u jednoho pacienta. Lepší harmonizace měření = lepší harmonizace terapie diabetu (dávkování inzulinu) = vyšší komfort pacienta (harmonizace počtu alarmů)



Harmonizace a COVID-19

- EHK jako nástroje dosažení harmonizace stanovení SARS-CoV-2 (Instand, QCMD, RfB-DGKL, RCPA-QAP)
- Neinvazivní matrice (sliny, nos, dech)
- Kvantifikace SARS-CoV-2 (ddPCR)
- Kvantifikace anti -SARS-CoV-2 a korelace s neutralizačními protilátkami
- Optimalizace četnosti měření u Ag testování
- **Validace** Ag testování před doporučením k použití!
- Velký problém v jednotkách při stanovení mezí detekce
- NIST a COVID-19 (http://www.nist.gov)

Uroveň standardizace analytických měření očima EHK první kategorie

Programy mezinárodní, s komutabilními materiály, hodnotami analytů, odvozenými od referenčních metod, s hodnotami APS, odvozenými z biologických variabilit a dle milánské konference

EurA1c, INPUtS, SKML, NOKLUS-Nordkem, SEQCML, UK NEQAS, CAP, DEQAS

Elektrolyty, lipidy, organické substráty vykazují dobrou srovnatelnost

HbA_{1c} ukazuje akceptovatelnou srovnatelnost

Enzymy ukazují velmi problematickou srovnatelnost

Úroveň u vitaminu D lze posoudit pouze komutabilními kontrolními materiály, obvyklé komerční kontrolní materiály nedovolí žádné racionální závěry o úrovni

Někteří výrobci kontrolních materiálů s hodnotami, získanými prostým, statistickým, podle metod a platforem rozděleným zpracováním výsledků svých zákazníků označují občas z reklamních důvodů své produkty za NEZÁVISLÉ.