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

## ΕΣΥΔ ΚΟ-ΚΛΙΝΕΡΓ

**Έκδοση: 01**
**Αναθεώρηση: 03**
**Ημερομηνία Έκδοσης: 29-03-2006**
**Ημερομηνία Αναθεώρησης: 09-01-2024**
**Υπεύθυνος Έκδοσης: Διεύθυνση Διαπίστευσης Εργαστηρίων Ε.ΣΥ.Δ.**
**Υπεύθυνος Έγκρισης: Ο Πρόεδρος του Ε.ΣΥ.Δ.**

**Διεύθυνση Διαπίστευσης Εργαστηρίων Ε.ΣΥ.Δ.** **Ο Πρόεδρος του Ε.ΣΥ.Δ.**

## 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 ή για ερευνητική χρήση μόνο (In House ή Modified ή Research Use Only (RUO) 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. Εφαρμόζεται πλήρως για την αρχική αξιολόγηση και επέκταση (προσθήκες νέων μεθόδων ή αναλυτών, ή αλλαγή γενεάς υφιστάμενων μεθόδων ή αναλυτών) του πεδίου διαπίστευσης και γίνεται αναφορά για τις απαιτήσεις κατά την επαναξιολόγηση του πεδίου. Αφορά κάθε υπό διαπίστευση δοκιμή που επαληθεύεται για τη σκοπούμενη χρήση σε συγκεκριμένο αναλυτή (μηχάνημα), συγκεκριμένο κιτ προτυποποιημένης μεθόδου CE IVD και υπόστρωμα.

## 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. ΔΟΚΙΜΕΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗΣ ΣΕ ΑΥΤΟΜΑΤΟΥΣ ΑΝΑΛΥΤΕΣ
2.1 *Δοκιμές*
2.1.1 Επαλήθευση
2.1.2 Εκτίμηση της αβεβαιότητας
2.1.3 Διασφάλιση Ποιότητας
2.2 Επίχρισμα Περιφερικού Αίματος
2.2.1 Επαλήθευση
2.2.2 Διασφάλιση Ποιότητας

3. ΔΟΚΙΜΕΣ ΣΤΗΝ ΑΙΜΟΔΟΣΙΑ ΣΕ ΑΥΤΟΜΑΤΟΥΣ ΑΝΑΛΥΤΕΣ
3.1 *Ποιοτικές Δοκιμές*
3.1.1 Επαλήθευση
3.1.2 Εκτίμηση της αβεβαιότητας
3.1.3 Διασφάλιση Ποιότητας

4. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ
4.1 *Ποσοτικές δοκιμές*
4.1.1 Επαλήθευση
4.1.2 Εκτίμηση της αβεβαιότητας
4.1.3 Διασφάλιση Ποιότητας
4.2 *Ποιοτικές δοκιμές*
4.2.1 Επαλήθευση
4.2.2 Διασφάλιση Ποιότητας
4.3 *Μικροσκοπικές δοκιμές*

4.3.1 Επαλήθευση
4.3.2 Εκτίμηση της αβεβαιότητας
4.3.3 Διασφάλιση Ποιότητας

5. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ
5.1 Επαλήθευση ποιοτικών CE IVD δοκιμών
5.2 Επαλήθευση ποσοτικών CE IVD δοκιμών
5.3 Επικύρωση εσωτερικών (in-house) δοκιμών
5.4 Εκτίμηση της αβεβαιότητας
5.5 Διασφάλιση Ποιότητας
5.6 *Κυτταρογενετικές δοκιμές - Καρυότυπος & FISH*
5.6.1 Επαλήθευση
5.6.2 Εκτίμηση της αβεβαιότητας
5.6.2 Διασφάλιση Ποιότητας

6. ΔΟΚΙΜΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ
6.1 *Ποσοτικές δοκιμές*
6.1.1 Επαλήθευση
6.1.2 Εκτίμηση Αβεβαιότητας
6.1.3 Διασφάλιση Ποιότητας
6.2 *Ποιοτικές δοκιμές*
6.2.1 Επαλήθευση
6.2.2 Επικύρωση
6.2.3 Διασφάλιση Ποιότητας

7. ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ
7.1 Επαλήθευση
7.2 Εκτίμηση Αβεβαιότητας
7.3 Διασφάλιση Ποιότητας

8. ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ
8.1 Ιστοπαθολογική διάγνωση
8.2 Ανοσοϊστοχημικές δοκιμές
8.2.1 Επικύρωση / Επαλήθευση
8.2.2 Εκτίμηση Αβεβαιότητας
8.3 Διασφάλιση Ποιότητας

9. ΘΕΜΑΤΑ ΔΙΑΠΙΣΤΕΥΣΗΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ/ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ
9.1 Λήψη Πρωτογενούς Δείγματος
9.2 Διαπίστευση Εργαστηρίων Πολλαπλών Τοποθεσιών
9.3 Δοκιμές Παρά τη Κλίνη του Ασθενούς (POCT)
9.4 Τράπεζες Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος
9.5 Διαπίστευση Εργαστηρίων σε Ευέλικτο Πεδίο

10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

11. ΧΡΗΣΙΜΕΣ ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

## 1. ΔΟΚΙΜΕΣ ΠΟΥ ΕΚΤΕΛΟΥΝΤΑΙ ΣΕ ΑΥΤΟΜΑΤΟΥΣ ΑΝΑΛΥΤΕΣ

### 1.1 Ποσοτικές δοκιμές

Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται ενδεικτικά: βιοχημικές, ανοσοχημικές, ανοσολογικές, νεφελομετρικές, αιματολογικές, ορολογικές δοκιμές, ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, ανοσοκαθήλωση ανοσοσφαιρινών, 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 σε περίπτωση μη διαθεσιμότητας των παραπάνω, 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 (δείτε σχετικά την παρατήρηση 2):

Ορθότητα (trueness): Υπολογίζεται με πειράματα ανάκτησης (recovery) (ανάμιξη αφενός, βαθμονομητή (προτιμάται ανάλογα με τη περίπτωση) ή δείγματος ελέγχου ποιότητας, με αφετέρου δείγμα ρουτίνας γνωστής συγκέντρωσης και μέτρηση του δείγματος ανάμειξης 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. Εναλλακτική μέθοδος υπολογισμού ορθότητας (αποκλειστικά για δοκιμές που δεν μπορεί να εφαρμοστεί η ανάμειξη – δείτε παρατήρηση 1) είναι ο υπολογισμός του SD και CV% για την διαφορά "our result - group mean" από μια ικανή σειρά αποτελεσμάτων εξωτερικού ελέγχου ποιότητας (6-10 μετρήσεις) με βάση τις αναφορές του διοργανωτή του διεργαστηριακού σχήματος. Ο δείκτης “100 – μέσο Z-score μετρήσεων” αποτελεί ανεξάρτητο δείκτη ορθότητας % της μεθόδου.

Επαναληψιμότητα (repeatability): Τουλάχιστον έξι (6) μετρήσεις του ίδιου δείγματος ελέγχου, χωρισμένου σε μερίδια ή συνενωμένου δείγματος (pooled sample), χωρισμένου σε μερίδια. Να γίνεται χρήση τουλάχιστο 2 επιπέδων δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (ή περισσοτέρων αν είναι διαθέσιμα) ή συνενωμένων δειγμάτων. Σε περίπτωση που γίνεται χρήση συνενωμένων δειγμάτων (pool) κατά το δυνατό να είναι στα ίδια επίπεδα συγκέντρωσης με τα control της αναπαραγωγιμότητας. 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 κατά το δυνατό με χρήση τουλάχιστον δύο διαφορετικών παρτίδων αντιδραστηρίων του αναλυτή. Να γίνεται χρήση τουλάχιστο 2 επιπέδων δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (ή περισσοτέρων αν είναι διαθέσιμα) ή συνενωμένων δειγμάτων, κατά το δυνατό ίδιων επιπέδων συγκέντρωσης με εκείνα που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμασίες επαναληψιμότητας, ώστε να επιτρέπεται η άμεση σύγκριση μεταξύ $CV_r$% και $CV_R$%. 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. Εναλλακτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό τα διαγράμματα ανακρίβειας (διάγραμμα SD συναρτήσει συγκέντρωσης) και το τυπικό σφάλμα του intercept.

### 1.1.2 Εκτίμηση της Αβεβαιότητας

Εκτιμώνται οι συνιστώσες της αβεβαιότητας, ως:

Τύπου Α: Από την τυπική απόκλιση έξι (6) τουλάχιστον μετρήσεων υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, σε όλα τα επίπεδα συγκέντρωσης που εξετάσθηκαν κατά την επαλήθευση και από την τυπική απόκλιση έξι (6) μετρήσεων κάθε παραμέτρου από τα πειράματα ανάκτησης ή των διαφορών από τις συγκρίσεις του εξωτερικού ελέγχου ποιότητας (δείτε Ορθότητα).

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. Δύναται επίσης να συνεκτιμηθεί η αβεβαιότητα που σε κάποιες περιπτώσεις δίδεται από τους διοργανωτές σχημάτων εξωτερικού ελέγχου ποιότητας, ιδιαίτερα για εκείνες τις δοκιμές που δεν πραγματοποιείται βαθμονόμησή τους σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. 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.

Για την συνολική εκτίμηση της καταλληλότητας εφαρμογής της μεθόδου, πέρα από τη διευρυμένη αβεβαιότητα, προτείνεται η σύγκριση με τις τιμές που δίνονται από τον κατασκευαστή της συσκευής ή/και από τις τιμές που δίνονται από τη βιβλιογραφία για όλες τις παραμέτρους της επαλήθευσης της παραγράφου 1.1.1.

*ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ 1*: 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) (δείτε εναλλακτικούς τρόπους υπολογισμού ορθότητας).

*ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ 2*: Στην περίπτωση χρήσης Ανοσοχημικής ή Θολοσιμετρικής μεθόδου με CE-IVD κιτ (πχ ορολογικές εξετάσεις αντισωμάτων, εξετάσεις λοιμωδών νόσων, δοκιμές ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι του ιού COVID-19 κλπ) όπου τα χρησιμοποιούμενα αναλυτικά συστήματα ή μεθοδολογίες βασίζονται σε αριθμητικά-ποσοτικά δεδομένα (πχ μονάδες φωτομετρικές ή χημειοφωταύγειας) και ένα αριθμητικό όριο απόφασης (cut off) για την εξαγωγή του αποτελέσματος, εφαρμόζεται η παράγραφος 1.1 της παρούσας κατευθυντήριας οδηγίας για να διενεργήσει το εργαστήριο την επαλήθευση της μεθόδου (Analytical verification). Η παρακάτω παράγραφος 1.2 της παρούσας κατευθυντήριας οδηγίας για Ποιοτικές μεθόδους εφαρμόζεται ΜΟΝΟ στην περίπτωση που δεν ιχνηλατούνται αριθμητικά-ποσοτικά δεδομένα. Σε κάθε περίπτωση απαιτείται στις δοκιμασίες επαναληψιμότητας/αναπαραγωγιμότητας, και της ορθότητας να έχει χρησιμοποιηθεί επίπεδο που να είναι πλησίον του αριθμητικού ορίου απόφασης (cut off). Οι δοκιμασίες με επίπεδο πλησίον του αριθμητικού ορίου απόφασης (cut off) προτείνεται να χρησιμοποιούνται για να αντικαταστήσουν τα αρνητικά (negative) επίπεδα ορών ελέγχου ποιότητας εξετάσεων που αναφέρονται στην παρατήρηση αυτή, που, λόγω της αναλυτικής επίδοσης του δείγματος, δίδουν μη αποδεκτά αποτελέσματα επαλήθευσης.

*ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ 3*: Εάν το εργαστήριο επιθυμεί να περιλαμβάνονται στο Πεδίο Διαπίστευσης του επιπλέον υποστρώματα για την ίδια εξέταση στον ίδιο αναλυτή, σε δοκιμές όπου εφαρμόζεται, τότε απαιτείται να διενεργηθούν οι παραπάνω δοκιμασίες επαλήθευσης και υπολογισμού αβεβαιότητας σε όλα τα υποστρώματα (με την προϋπόθεση ότι προτείνονται για χρήση στο εσώκλειστο του κατασκευαστή).

*ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ 4*: Κατά την επαναξιολόγηση γίνεται τουλάχιστον επαναϋπολογισμός της αβεβαιότητας με αναπροσαρμογή της αναπαραγωγιμότητας με πρόσφατα δεδομένα, και κατά το δυνατό με πειράματα ορθότητας με ανάκτηση (η ορθότητα είναι συνιστώσα της αβεβαιότητας). Στον υπολογισμό της αβεβαιότητας θα πρέπει να γίνεται επικαιροποίηση της μετρολογικής ιχνηλασιμότητας, λαμβάνοντας υπόψη τις τρέχουσες διακριβώσεις και τα επικαιροποιημένα στοιχεία του κατασκευαστή για βαθμονομητές.

### 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. Το εργαστήριο θα πρέπει να επιλέξει υλικό IQC που είναι κατάλληλο για τον προορισμό του. Η διαδικασία εσωτερικού ελέγχου ποιότητας θα πρέπει να επιτρέπει την ανίχνευση, είτε από παρτίδα σε παρτίδα (lot to lot) αντιδραστηρίου, είτε παραλλαγής βαθμονομητή, είτε και των δύο, της μεθόδου εξέτασης. Η χρήση υλικού IQC τρίτου μέρους (ουδέτερου) θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη.

Εξωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

Απαιτείται ετήσια συμμετοχή για όλες τις δοκιμές του πεδίου σε κατάλληλα διεργαστηριακά σχήματα, με συχνότητα που θα ορίζεται συνεκτιμώντας τον όγκο εργασιών του εργαστηρίου. Τα προγράμματα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας που επιλέγονται πρέπει, στο μέτρο του δυνατού να είναι διαπιστευμένα κατά ISO/IEC 17043. Κατά την επιλογή προγραμμάτων, το εργαστήριο θα πρέπει να λάβει υπόψη τον τύπο της προσφερόμενης τιμής στόχου. Όταν ένα πρόγραμμα, είτε δεν είναι διαθέσιμο, είτε δεν θεωρείται κατάλληλο, το εργαστήριο πρέπει να χρησιμοποιεί εναλλακτικές μεθοδολογίες για την παρακολούθηση της απόδοσης της μεθόδου εξέτασης (πχ διεργαστηριακά σχήματα συγκρίσεων με τη συμμετοχή κατά το δυνατό τουλάχιστο τριών εργαστηρίων). Τα εργαστήρια στην αξιολόγηση του εξωτερικού ελέγχου ποιότητας θα πρέπει να λαμβάνουν υπόψη τα specifications - προδιαγραφές του αντιδραστηρίου για τη σκοπούμενη χρήση.

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

Στην περίπτωση υπολογιστικών παραμέτρων 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. Για τις υπολογιστικές παραμέτρους απαιτείται ωστόσο και δήλωση καταλληλότητας μετά από εφαρμογή του τύπου σε όλα τα στάδια της επαλήθευσης (επαναληψιμότητα, αναπαραγωγιμότητα και ορθότητα) όπου εφαρμόζονται, με τα αποτελέσματα της επαλήθευσης των επιμέρους εξετάσεων.

### 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 σε περίπτωση μη διαθεσιμότητας των παραπάνω, μειγμάτων που προκύπτουν από την ανάμιξη δειγμάτων ασθενών (pooled samples), σε διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης, ανάλογα με τα κρίσιμα, για τη λήψη ιατρικών αποφάσεων, όρια της μετρούμενης παραμέτρου (δείτε σχετικά την παρατήρηση 2 παρ. 1.1.2).

Η επαλήθευση συνίσταται στην αξιολόγηση των κάτωθι αναλυτικών χαρακτηριστικών:

Ορθότητα (trueness)**:** Ανάλυση τουλάχιστον έξι (6) αρνητικών και 6 (έξι) θετικών γνωστών δειγμάτων (αν δεν διατίθενται θετικά και αρνητικά δείγματα, τότε για κάθε κατηγορία δειγμάτων που είναι διαθέσιμα). 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. Να γίνεται χρήση τουλάχιστο 2 επιπέδων δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (ή περισσοτέρων αν είναι διαθέσιμα) ή συνενωμένων δειγμάτων.

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. Να γίνεται χρήση τουλάχιστο 2 επιπέδων δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (ή περισσοτέρων αν είναι διαθέσιμα) ή συνενωμένων δειγμάτων, κατά το δυνατό ίδιων με εκείνα που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμασίες επαναληψιμότητας. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και τα πειράματα της ορθότητας στην περίπτωση μόνο ανάλυσης εις διπλούν επί έξι (6) ημέρες και για τουλάχιστο 2 επίπεδα συγκεντρώσεων.

Όριο ανίχνευσης (LOD): Για καθαρά ποιοτικές δοκιμές απαιτείται σειρά αραιώσεων γνωστού πρότυπου δείγματος, μέτρηση σε κάθε αραίωση 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 άγνωστων 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 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. (Δείτε και απαιτήσεις της §1.1.3 όπου εφαρμόζονται).

Εξωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

Ισχύουν οι απαιτήσεις της §1.1.3.

*ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ*: Σε περίπτωση χρήσεως περισσοτέρων του ενός αναλυτών για την εκτέλεση των ίδιων δοκιμών απαιτείται τεκμηρίωση ισοδυναμίας / συγκρισιμότητας αποτελεσμάτων με ανάλυση κατά προτίμηση πραγματικών δειγμάτων σε ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων ή εναλλακτικά επί αδυναμίας συλλογής των παραπάνω, δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, και στατιστική επεξεργασία τους (δοκιμασίες t-test και συσχέτιση). Επίσης, με ανάλυση των διεργαστηριακών δειγμάτων αποδεικνύεται η ισοδυναμία των αναλυτών.

## 2. ΔΟΚΙΜΕΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗΣ ΣΕ ΑΥΤΟΜΑΤΟΥΣ ΑΝΑΛΥΤΕΣ

### 2.1 Δοκιμές

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει τις δοκιμές:

Γενικής αίματος (πχ WBC, RBC, Hb, HCT, MCV, MCH, MCHC, PLTs, RDW, MPV και Λευκοκυτταρικός τύπος με # (απόλυτο αριθμό) Πολυμορφοπυρήνων, Λεμφοκυττάρων, Μεγάλων Μονοπυρήνων, Ηωσινοφίλων, Βασεοφίλων)

και

Αιμόστασης (σε sec, % και μονάδες μέτρησης).

### 2.1.1 Επαλήθευση

Η επαλήθευση πραγματοποιείται, είτε με τη χρήση εμπορικών δειγμάτων ελέγχου (control samples), είτε με τη χρήση υλικών αναφοράς CRM (Certified Reference Materials), ή σε περίπτωση μη διαθεσιμότητας των παραπάνω, μειγμάτων που προκύπτουν από την ανάμιξη δειγμάτων ασθενών (pooled samples), σε δύο τουλάχιστον επίπεδα συγκέντρωσης,

εντός και πάνω από τα όρια αναφοράς (normal – abnormal ή High) και εντός και κάτω από τα όρια αναφοράς (normal – subnormal ή Low), ανάλογα με τα κρίσιμα για τη λήψη ιατρικών αποφάσεων όρια της μετρούμενης παραμέτρου.

Ορθότητα (trueness): Υπολογίζεται με πειράματα ανάκτησης (recovery) (ανάμιξη αφενός, βαθμονομητή ή δείγματος ελέγχου ποιότητας, με αφετέρου δείγμα ρουτίνας γνωστής συγκέντρωσης) και μέτρηση του δείγματος ανάμειξης 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.

Μία εναλλακτική μέθοδος υπολογισμού ορθότητας (αποκλειστικά για δοκιμές που δεν μπορεί να εφαρμοστεί η ανάμειξη) είναι ο υπολογισμός του SD και CV% για την διαφορά "our result - group mean" από μια ικανή σειρά αποτελεσμάτων εξωτερικού ελέγχου ποιότητας (6-10 μετρήσεις) με βάση τις αναφορές του διοργανωτή του διεργαστηριακού σχήματος. Ο δείκτης “100 – μέσο Z-score μετρήσεων” αποτελεί ανεξάρτητο δείκτη ορθότητας % της μεθόδου.

Δεύτερη εναλλακτική υπολογισμού της ορθότητας είναι χρησιμοποιώντας τον ορό ελέγχου με μετρήσεις 6 φορές μέσα στην ίδια ημέρα .Τα αποτελέσματα θα ελεγχθούν με την τιμή στόχο του ορού ελέγχου (%ορθότητα = $\frac{C}{\mu} x100$ όπου C= η τιμή της παραμέτρου στον ορό ελέγχου για κάθε μέτρηση που έγινε και μ= η τιμή στόχος του ορού ελέγχου όπως ορίζεται από τον κατασκευαστή). Η Ορθότητα θα εκτιμηθεί σε τουλάχιστον 2 επίπεδα.

Επαναληψιμότητα (repeatability): Τουλάχιστον έξι (6) μετρήσεις του ίδιου δείγματος ελέγχου, χωρισμένου σε μερίδια ή συνενωμένου δείγματος (pooled sample), χωρισμένου σε μερίδια. Να γίνεται χρήση τουλάχιστο 2 επιπέδων δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (ή περισσοτέρων αν είναι διαθέσιμα) ή συνενωμένων δειγμάτων. Σε περίπτωση που γίνεται χρήση συνενωμένων δειγμάτων (pool) κατά το δυνατό να είναι στα ίδια επίπεδα συγκέντρωσης με τα control της αναπαραγωγιμότητας. 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 κατά το δυνατό με χρήση τουλάχιστον δύο διαφορετικών παρτίδων αντιδραστηρίων του αναλυτή. Να γίνεται χρήση τουλάχιστο 2 επιπέδων δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (ή περισσοτέρων αν είναι διαθέσιμα) ή συνενωμένων δειγμάτων, κατά το δυνατό ίδιων με εκείνα που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμασίες επαναληψιμότητας, ώστε να επιτρέπεται η άμεση σύγκριση μεταξύ $CV_r$% και $CV_R$%. Επίσης, μπορεί να γίνει χρήση των αποτελεσμάτων από τα διαγράμματα εσωτερικού ελέγχου ποιότητας (QC). Υπολογίζεται το $CV_R$% των μετρήσεων.

*ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ*: Κατά την επαναξιολόγηση τα εργαστήρια θα πρέπει να επαναϋπολογίζουν, τουλάχιστον, την αβεβαιότητα με αναπροσαρμογή της αναπαραγωγιμότητας και κατά το δυνατό να γίνονται πειράματα ορθότητας με ανάκτηση (η ορθότητα είναι συνιστώσα της αβεβαιότητας). Στον υπολογισμό της αβεβαιότητας θα πρέπει να γίνεται επικαιροποίηση της μετρολογικής ιχνηλασιμότητας, λαμβάνοντας υπόψη τις τρέχουσες διακριβώσεις και τα επικαιροποιημένα στοιχεία του κατασκευαστή για βαθμονομητές.

### 2.1.2 Εκτίμηση της Αβεβαιότητας

Εκτιμώνται οι συνιστώσες της αβεβαιότητας, ως:

Τύπου Α: Από την τυπική απόκλιση έξι (6) τουλάχιστον μετρήσεων υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, σε όλα τα επίπεδα συγκέντρωσης που εξετάσθηκαν κατά την επαλήθευση και από την τυπική απόκλιση έξι (6) μετρήσεων κάθε παραμέτρου από τα πειράματα ανάκτησης ή των διαφορών από τις συγκρίσεις του εξωτερικού ελέγχου ποιότητας (δείτε Ορθότητα).

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. Δύναται επίσης να συνεκτιμηθεί η αβεβαιότητα που σε κάποιες περιπτώσεις δίδεται από τους διοργανωτές σχημάτων εξωτερικού ελέγχου ποιότητας, ιδιαίτερα για εκείνες τις δοκιμές που δεν πραγματοποιείται βαθμονόμησή τους σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. 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.

Για την συνολική εκτίμηση της καταλληλότητας εφαρμογής της μεθόδου, πέρα από τη διευρυμένη αβεβαιότητα, προτείνεται η σύγκριση με τις τιμές που δίνονται από τον κατασκευαστή της συσκευής ή/και από τις τιμές που δίνονται από τη βιβλιογραφία για όλες τις παραμέτρους της επαλήθευσης της παραγράφου 2.1.1.

### 2.1.3. 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. Το εργαστήριο θα πρέπει να επιλέξει υλικό IQC που είναι κατάλληλο για τον προορισμό του. Η διαδικασία εσωτερικού ελέγχου ποιότητας θα πρέπει να επιτρέπει την ανίχνευση, είτε από παρτίδα σε παρτίδα (lot to lot) αντιδραστηρίου, είτε παραλλαγής βαθμονομητή, είτε και των δύο, της μεθόδου εξέτασης. Η χρήση υλικού IQC τρίτου μέρους (ουδέτερου) θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη.

Εξωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

Απαιτείται ετήσια συμμετοχή για όλες τις δοκιμές του πεδίου σε κατάλληλα διεργαστηριακά σχήματα, με συχνότητα που θα ορίζεται συνεκτιμώντας τον όγκο εργασιών του εργαστηρίου. Τα προγράμματα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας που επιλέγονται πρέπει, στο μέτρο του δυνατού να πληρούν τις απαιτήσεις του ISO/IEC 17043. Κατά την επιλογή προγραμμάτων, το εργαστήριο θα πρέπει να λάβει υπόψη τον τύπο της προσφερόμενης τιμής στόχου. Όταν ένα πρόγραμμα, είτε δεν είναι διαθέσιμο, είτε δεν θεωρείται κατάλληλο, το εργαστήριο πρέπει να χρησιμοποιεί εναλλακτικές μεθοδολογίες για την παρακολούθηση της απόδοσης της μεθόδου εξέτασης (πχ διεργαστηριακά σχήματα συγκρίσεων). Τα εργαστήρια στην αξιολόγηση του εξωτερικού ελέγχου ποιότητας θα πρέπει να λαμβάνουν υπόψη τα specifications - προδιαγραφές του αντιδραστηρίου για τη σκοπούμενη χρήση.

Στην περίπτωση υπολογιστικών παραμέτρων (π.χ. Hct, INR κ.α.) 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. Για τις υπολογιστικές παραμέτρους απαιτείται ωστόσο και δήλωση καταλληλότητας μετά από εφαρμογή του τύπου σε όλα τα στάδια της επαλήθευσης (επαναληψιμότητα, αναπαραγωγιμότητα και ορθότητα) όπου εφαρμόζονται, με τα αποτελέσματα της επαλήθευσης των επιμέρους εξετάσεων.

### 2.2 Επίχρισμα Περιφερικού Αίματος

α. Λευκοκυτταρικός τύπος % ποσοστό και απόλυτος αριθμός: Πολυμορφοπυρήνων, Λεμφοκυττάρων, Μεγάλων Μονοπυρήνων, Ηωσινοφίλων και Βασεοφίλων

β. Μορφολογία Ερυθρών, Λευκών και Αιμοπεταλίων

#### 2.2.1.Επαλήθευση

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

Διαγνωστική επαναληψιμότητα: Ο κάθε διαγνώστης (μικροσκοπιστής) μικροσκοπεί 3 επιχρίσματα (1κφ και 2 παθολογικά). Το κάθε επίχρισμα εξετάζεται τουλάχιστον δύο φορές από κάθε διαγνώστη. Υπολογίζεται ο Λευκοκυτταρικός τύπος και σημειώνονται οι υπάρχουσες αλλοιώσεις των 3 αιμοποιητικών σειρών (Λευκή, Ερυθρά, Αιμοπετάλια).

Όσον αφορά τον Λευκοκυτταρικό τύπο (έχουμε απόλυτο αριθμό ή %) να υπολογίζεται Mean, SD και CV%.

Οι μορφολογικές αλλοιώσεις εκτιμώνται από την συμμετοχή σε διεργαστηριακό σχήμα.

#### 2.2.2. Διασφάλιση Ποιότητας

Εσωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

Εσωτερικός έλεγχος ποιότητας (2 ή 3 επιπέδων) πραγματοποιείται πάντα για τις παραμέτρους για τις οποίες εκτελούνται εξετάσεις σε δείγματα εξεταζόμενων και βασίζεται στις οδηγίες του κατασκευαστή, τη μεθοδολογία, τη βιολογική και αναλυτική διακύμανση.

Να γίνεται αναδρομική επαναμικροσκόπηση ανά δίμηνο (για όλους τους διαγνώστες που εντάσσονται στο προσωπικό του εργαστηρίου: 2 επιχρίσματα, 1 φυσιολογικό και 1 παθολογικό).

Εξωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

Απαιτείται ετήσια συμμετοχή για όλες τις δοκιμές του πεδίου σε κατάλληλα διεργαστηριακά σχήματα, με συχνότητα που θα ορίζεται συνεκτιμώντας τον αριθμό των διαγνωστών και τον καθημερινό όγκο εργασιών του εργαστηρίου. Απαιτείται η συμμετοχή όλων των διαγνωστών και, ο κάθε διαγνώστης να μετέχει τουλάχιστον 1 φορά / έτος σε εξωτερικό έλεγχο ποιότητας.

## 3. ΔΟΚΙΜΕΣ ΣΤΗΝ ΑΙΜΟΔΟΣΙΑ ΣΕ ΑΥΤΟΜΑΤΟΥΣ ΑΝΑΛΥΤΕΣ

### 3.1 Ποιοτικές δοκιμές

Πριν την πρώτη χρήση κάποιου νέου αναλυτή / νέας μεθόδου / νέας εξέτασης, η Μονάδα Αιμοδοσίας προχωρά σε αξιολόγηση των χαρακτηριστικών επίδοσης της μεθόδου και επαλήθευση ότι πληρούνται οι σχετικές προδιαγραφές, όπως αυτές καθορίζονται από τον κατασκευαστή τους.

Πέραν της αρχικής επιβεβαίωσης της ορθής εφαρμογής της μεθόδου, διενεργείται τουλάχιστον 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.

### 3.1.1 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 σε περίπτωση μη διαθεσιμότητας των παραπάνω, με τη χρήση γνωστών δειγμάτων.

Η επαλήθευση συνίσταται στην αξιολόγηση των κάτωθι αναλυτικών χαρακτηριστικών:

Ορθότητα (trueness): Ο έλεγχος της Ορθότητας γίνεται με τη χρήση εμπορικών δειγμάτων ελέγχου (control samples) ή γνωστών δειγμάτων/υλικών αναφοράς (reference materials) και από τα αποτελέσματα της συμμετοχής σε σχήματα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας. Πραγματοποιείται πάντα για τις παραμέτρους για τις οποίες εκτελούνται εξετάσεις σε δείγματα εξεταζόμενων και βασίζεται στις οδηγίες του κατασκευαστή και τη μεθοδολογία.

Ειδικότερα για τον έλεγχο ορθότητας των αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού ομάδας αίματος ABO & RHESUS D απαιτείται η ανάλυση τουλάχιστον τεσσάρων (4) δειγμάτων για την τυποποίηση ομάδων αίματος του συστήματος ABO / RhD για όλες τις κατηγορίες, ανάστροφης, φαινοτύπων του συστήματος Rh (C, c, E, e), Kell με δείγματα ελέγχου συμβατά με όλες τις μεθόδους (γέλη, μικροσφαρίδια, μικροπλάκες). Επιπροσθέτως διενεργείται η ανάλυση 6 γνωστών δειγμάτων για τη δοκιμασία έμμεσης Coombs (3 θετικά / 3 αρνητικά δείγματα), 6 γνωστών δειγμάτων για τη δοκιμασία άμεσης Coombs (3 θετικά / 3 αρνητικά δείγματα) καθώς και η δοκιμασία ανίχνευσης και ταυτοποίησης αλλοαντισωμάτων.

Επαναληψιμότητα εντός της ίδιας ημέρας (within day repeatability): Τουλάχιστον έξι (6) μετρήσεις του ίδιου δείγματος ελέγχου για όλες τις κατηγορίες αναλύσεων. Συγκεκριμένα για:

- Καθορισμό ομάδος αίματος ABO και RhD σε συνδυασμό με ανάστροφη ομάδα (reverse grouping)
- Δοκιμασία έμμεσης Coombs (θετικό και αρνητικό δείγμα)
- Δοκιμασία άμεσης Coombs (θετικό και αρνητικό δείγμα)
- Δοκιμασία διασταύρωσης με την έμμεση δοκιμασία Coombs (IAT) και ενζύμου (συμβατή και ασύμβατη)

Διενεργούνται κατ' ελάχιστον 6 επαναλήψεις στο ίδιο δείγμα ελέγχου, χρησιμοποιώντας τα ίδια αντιδραστήρια, τον ίδιο αναλυτή, και το ίδιο προσωπικό.

Συστήνεται στις δοκιμασίες επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας (δείτε επόμενη παράγραφο) να τεκμηριώνεται η συμμετοχή κατά το δυνατό όλου του εμπλεκόμενου στη διενέργεια των εξετάσεων προσωπικού (ονομαστικά).

Ενδοεργαστηριακή Αναπαραγωγιμότητα (reproducibility): Απαιτείται ανάλυση όλων των κατηγοριών ελέγχου (τυποποίηση ομάδων αίματος ABO/Rh με διαφορετικό συνδυασμό, ανάστροφης, φαινοτύπων του συστήματος Rh, έμμεσης Coombs (θετικό/αρνητικό δείγμα), άμεσηςCoombs (θετικό/αρνητικό δείγμα), δοκιμασία συμβατότητας από διαφορετικούς αναλυτές σε έξι (6) διαφορετικές ημέρες και, κατά το δυνατό με χρήση τουλάχιστον δύο διαφορετικών παρτίδων αντιδραστηρίων του αναλυτή.

Όριο Ανίχνευσης (Limit of Detection): Ο έλεγχος του ορίου ανίχνευσης (Limit of Detection) διενεργείται μόνο για τις εξετάσεις όπου αυτό είναι κρίσιμο για την εξαγωγή συμπερασμάτων από την εξεταζόμενη παράμετρο. Εκτίμηση του ορίου ανίχνευσης διενεργείται με εξέταση γνωστού πρότυπου δείγματος / in house quality control στο οποίο εφαρμόζεται σειρά αραιώσεων σε συγκεκριμένη αναλογία με το κατά περίπτωση κατάλληλο αραιωτικό μέσο όπως καθορίζει η κατασκευάστρια εταιρεία. Η δοκιμή επαναλαμβάνεται σε κάθε αραίωση και εκτιμάται το επίπεδο πάνω από το οποίο το δείγμα χαρακτηρίζεται ως θετικό.

Στην Υπηρεσία Αιμοδοσίας εφαρμόζεται στην τιτλοποίηση αντισωμάτων κυρίως στις ακόλουθες καταστάσεις :

- Εγκυμοσύνη/Αιμολυτική νόσος εμβρύου και νεογνού
- ABO Ασύμβατη μεταμόσχευση νεφρού
- Μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων

### 3.1.2 Εκτίμηση της Αβεβαιότητας

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

### 3.1.3 Διασφάλιση Ποιότητας

Εσωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

Ο εσωτερικός έλεγχος ποιότητας στους αναλυτές του ανοσοαιματολογικού εργαστηρίου της Αιμοδοσίας πραγματοποιείται, με τη χρήση εμπορικών δειγμάτων ελέγχου (control samples). Πραγματοποιείται πάντα για τις παραμέτρους για τις οποίες εκτελούνται εξετάσεις σε δείγματα εξεταζόμενων και οφείλει να γίνεται πριν την ανάλυση δειγμάτων ασθενών. Συγκεκριμένα για τους αναλυτές του εργαστηρίου της Αιμοδοσίας τα controls samples θα πρέπει να εξασφαλίζουν τον έλεγχο για την τυποποίηση ομάδων αίματος ABO/Rh με διαφορετικό συνδυασμό, ανάστροφης, φαινοτύπων του συστήματος Rh, έμμεσης Coombs (θετικό/αρνητικό δείγμα), άμεσης Coombs (θετικό/αρνητικό δείγμα), ανίχνευση και ταυτοποίηση αντιερυθροκυτταρικών αντισωμάτων σε χαμηλούς τίτλους, δοκιμασία συμβατότητας.

*ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ*: Σε περίπτωση χρήσεως περισσοτέρων του ενός αναλυτών για την εκτέλεση των ίδιων δοκιμών απαιτείται τεκμηρίωση ισοδυναμίας / συγκρισιμότητας αποτελεσμάτων με ανάλυση κατά προτίμηση πραγματικών δειγμάτων σε ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων. Επίσης, με ανάλυση των διεργαστηριακών δειγμάτων αποδεικνύεται η ισοδυναμία των αναλυτών.

Εξωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

Απαιτείται ετήσια συμμετοχή για όλες τις δοκιμές του πεδίου σε κατάλληλα διεργαστηριακά σχήματα. Ο οργανισμός που θα διενεργεί τον εξωτερικό έλεγχο ποιότητας να είναι ανεξάρτητος, να είναι διαπιστευμένος ως προς την διενέργεια σχημάτων εξωτερικής

αξιολόγησης ποιότητας με τις απαιτήσεις του προτύπου EN ISO / IEC 17043. Η εταιρεία να προσφέρει ολοκληρωμένη σειρά προγραμμάτων εξωτερικού ελέγχου ποιότητας, να παρέχει επιστημονική ερμηνεία στην περίπτωση παρέκκλισης αποτελεσμάτων και τα δείγματα να είναι συμβατά με τους αναλυτές και τις μεθόδους. Σε περίπτωση μη διαθεσιμότητας προγραμμάτων εξωτερικού ελέγχου ποιότητας το εργαστήριο πρέπει να χρησιμοποιεί εναλλακτικές μεθοδολογίες για την παρακολούθηση της απόδοσης της μεθόδου εξέτασης (πχ διεργαστηριακά σχήματα συγκρίσεων).

Τα Προγράμματα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας στην Αιμοδοσία περιλαμβάνουν :

- Τυποποίηση ομάδων αίματος του συστήματος ABO και RhD, ευθείας και ανάστροφης προαναλυτικής, αναλυτικής και μετά αναλυτικής φάσης
- Πλήρη φαινότυπο Rhesus CDE, Kell
- Έμμεση Coombs
- Άμεση Coombs
- Δοκιμασία Συμβατότητας
- Ταυτοποίηση αντιερυθροκυτταρικών αλλοαντισωμάτων με πάνελ φαινοτυπημένων ερυθρών και ερυθρών επεξεργασμένων με ένζυμο
- Πλήρη φαινότυπο ερυθρών ως προς τα αντιγονικά συστήματα: Kell, Duffy, Kidd, MNS

*ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ*: Σε περίπτωση που κάποια από τις παραπάνω μεθόδους διενεργείται και με χειροκίνητη μέθοδο, πέραν του αυτόματου αναλυτή, και με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή, απαιτείται να γίνουν ξεχωριστά όλες οι δοκιμασίες επαλήθευσης όπως αναφέρονται παραπάνω, και να τεκμηριώνεται εσωτερικός και εξωτερικός έλεγχος ποιότητας για τις χειροκίνητες μεθόδους.

## 4. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

Η επικύρωση / επαλήθευση των μικροβιολογικών δοκιμών πρέπει να γίνεται σε ένα ή περισσότερους αντιπροσωπευτικούς μικροοργανισμούς για κάθε ομάδα 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 φυσικά ή τεχνητά μολυσμένων βιολογικών υλικών.

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

Πέραν της αρχικής επιβεβαίωσης της ορθής εφαρμογής της μεθόδου, διενεργείται τουλάχιστον 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.

Στην επαναξιολόγηση, προτείνεται να γίνεται επανάληψη όλων των δοκιμών που απαιτήθηκαν στην αρχική επιβεβαίωση της ορθής εφαρμογής της μεθόδου.

### 4.1 Ποσοτικές δοκιμές

Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται δοκιμές που είτε εκτελούνται είτε δεν εκτελούνται σε αυτόματους αναλυτές, όπως είναι η ποσοτική καλλιέργεια ούρων κ.ά.

#### 4.1.1 Επαλήθευση

Ορθότητα (trueness): Η εκτίμηση της ορθότητας γίνεται με τη χρήση υλικών αναφοράς CRM (Certified Reference Materials / πρότυπα στελέχη) και από αποτελέσματα της συμμετοχής σε σχήματα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας ή εναλλακτικά σε σχήμα διεραστηριακών συγκρίσεων (όπως § 2.2.2).

Επαναληψιμότητα (repeatability): Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας απαιτούνται τουλάχιστον έξι (6) μετρήσεις ανά μικροοργανισμό και υπόστρωμα. Εκτιμάται η τυπική απόκλιση και ο συντελεστής μεταβλητότητας (% $CV_r$) των μετρήσεων.

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

Α’ μέθοδος: Χρησιμοποιούνται δύο έως τρία επίπεδα τεχνητά μολυσμένων δειγμάτων (spiked samples). Γίνονται τουλάχιστον έξι (6) μετρήσεις για κάθε δείγμα κατά το δυνατόν σε διαφορετικές ημέρες, με διαφορετικούς χειριστές ή με διαφορετικά αντιδραστήρια.

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

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

Η Πιστότητα μιας μεθόδου είναι ικανοποιητική, όταν η σχετική τυπική απόκλιση (% CV) είναι μικρότερη από 10%.

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), εντός της ίδιας ημέρας. Ο μικρότερος αριθμός μικροοργανισμών που είναι δυνατό να ανιχνευθεί αποτελεί το όριο ανίχνευσης της μεθόδου.

#### 4.1.2 Εκτίμηση Αβεβαιότητας

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 έξι (6) δειγμάτων.

Η παράμετρος αυτή πρέπει να αντιμετωπίζεται με σαφές πρωτόκολλο για το μέγεθος του δείγματος και την επεξεργασία του (κατάλληλο / μη κατάλληλο δείγμα): Ανάλυση έξι (6) διαφορετικών δειγμάτων (i) (τεχνητά μολυσμένων) σε διάφορα επίπεδα, σε δύο συνθήκες, αναπαραγωγιμότητα Α και Β (π.χ. δύο χειρισμοί δείγματος, διαφορετικές παρτίδες αντιδραστηρίων κ.λπ.), εύρεση του αριθμού μικροβίων/cfu για XiA και XiB και υπολογισμός διευρυμένης αβεβαιότητας.

*ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ :*Σε περίπτωση ποσοτικών μικροβιολογικών δοκιμών που εκτελούνται σε αυτόματους αναλυτές (π.χ. βιοχημικές παράμετροι βιολογικών υγρών, όπως είναι τα ούρα και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό) ακολουθούνται οι οδηγίες §1.1.1 και §1.1.2 όπου εφαρμόζονται.

**4.1.3 Διασφάλιση Ποιότητας**

Εσωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

Το εργαστήριο θα πρέπει να επιλέξει υλικό IQC που είναι κατάλληλο για τον προορισμό του. Στην περίπτωση ποσοτικής καλλιέργειας ούρων, ο IQC διενεργείται με τη χρήση υλικών αναφοράς CRM (Certified Reference Materials / πρότυπα στελέχη).

Εξωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

Απαιτείται κατ΄ ελάχιστον ετήσια συμμετοχή για όλες τις δοκιμές του πεδίου σε κατάλληλα διεργαστηριακά σχήματα. Τα προγράμματα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας που επιλέγονται πρέπει, στο μέτρο του δυνατού να πληρούν τις απαιτήσεις του ISO/IEC 17043. Το εργαστήριο επί απουσίας των παραπάνω είναι δυνατό να χρησιμοποιεί εναλλακτικές μεθοδολογίες για την παρακολούθηση της απόδοσης της μεθόδου εξέτασης (π.χ. διεργαστηριακά σχήματα συγκρίσεων).

**4.2 Ποιοτικές δοκιμές**

Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται μέθοδοι που είτε εκτελούνται είτε δεν εκτελούνται σε αυτόματους αναλυτές, όπως αιμοκαλλιέργεια, ταυτοποίηση μικροοργανισμών, έλεγχος ευαισθησίας μικροοργανισμών σε αντιμικροβιακούς παράγοντες, έλεγχος αντισωμάτων/αντιγόνων για παθογόνους μικροοργανισμούς, με ποιοτικό αποτέλεσμα π.χ. ανιχνεύσιμο ή μη ανιχνεύσιμο, θετικό ή αρνητικό, ευαίσθητο, ανθεκτικό ή άλλη κατηγορία (π.χ. ευαίσθητο σε αυξημένη έκθεση στο αντιβιοτικό / αντιμυκητικό).

**4.2.1 Επαλήθευση**

Η επαλήθευση των ποιοτικών μεθόδων πραγματοποιείται με τη χρήση υλικών αναφοράς CRM (Certified Reference Materials / πρότυπα στελέχη) όπως προσδιορίζονται από τη μέθοδο. Είναι δυνατό να γίνεται έλεγχος επαναληψιμότητας / αναπαραγωγιμότητας στα ετησίως παραληφθέντα δείγματα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας γνωστού αποτελέσματος. Σε σπάνιους μικροοργανισμούς, ο έλεγχος επαναληψιμότητας / αναπαραγωγιμότητας δυνατόν να περιλαμβάνει στελέχη συλλεγμένα σε βάθος πενταετίας.

Ορθότητα (trueness): Εκτιμάται μέσω της συμμετοχής του Εργαστηρίου σε εξωτερικό έλεγχο ποιότητας / διεργαστηριακά σχήματα.

Σε μια πολυπαραμετρική μεθοδολογία, όπως είναι η ταυτοποίηση μικροοργανισμών, η έλεγχος θα πρέπει να εκτείνεται σε ικανό αριθμό, κατ΄ ελάχιστον 20, πρότυπων στελεχών και / ή γνωστών στελεχών από σχήματα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας.

Επαναληψιμότητα (repeatability) / Ενδιάμεση πιστότητα (intermediate precision)/ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (reproducibility): Απαιτείται ανάλυση τουλάχιστον έξι (6) θετικών και αρνητικών δειγμάτων ανά μικροοργανισμό και υπόστρωμα από τους αναλυτές του εργαστηρίου. Απαιτείται ο έλεγχος της επαναληψιμότητας με τρεις (3) μετρήσεις δειγμάτων ελέγχου, σύμφωνα με τις απαιτήσεις της εκάστοτε μεθοδολογίας, και της αναπαραγωγιμότητας με έξι (6) μετρήσεις σε διαφορετικές συνθήκες. Ο αριθμός των

δειγμάτων ελέγχου που θα αναλυθεί εξαρτάται από τις απαιτήσεις κλινικής αξιολόγησης (ασθενείς κοινότητας, ασθενείς σε επίπεδο δευτεροβάθμιου, τριτοβάθμιου, τεταρτοβάθμιου νοσηλευτικού ιδρύματος κ.τ.λ.).

Όριο ανίχνευσης (LOD): Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου, εφόσον προκύπτει από τις μελέτες επικύρωσης της μεθόδου ή από τη σχετική βιβλιογραφία, 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 ανάλογα με τις απαιτήσεις κλινικής αξιολόγησης (ασθενείς κοινότητας, ασθενείς νοσηλευόμενοι σε δευτεροβάθμιο, τριτοβάθμιο, τεταρτοβάθμιο νοσοκομείο κ.τ.λ.). Στην περίπτωση ημι-ποσοτικών μεθόδων με ποιοτική τελική έκφραση απαιτείται η επιβεβαίωση του Ορίου Ανίχνευσης (Limit of Detection) η οποία γίνεται με ανάλυση έξι (6) δειγμάτων (υλικό αναφοράς ή control που παρέχει ο κατασκευαστής) αραιωμένο στην περιοχή του ήδη γνωστού Ορίου Ανίχνευσης (έως και +20% LOD).

Ευαισθησία (Sensitivity) και Ειδικότητα (Specificity): Είναι δυνατόν η ευαισθησία να υπολογίζεται από τον λόγο: ορθά θετικά αποτελέσματα / σύνολο θετικών αποτελεσμάτων και η ειδικότητα από τον λόγο: ορθά αρνητικά αποτελέσματα / σύνολο αρνητικών αποτελεσμάτων, εφόσον δεν προκύπτει από μελέτες επικύρωσης.

### 4.2.2 Διασφάλιση Ποιότητας

Εσωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

Το εργαστήριο θα πρέπει να επιλέξει υλικό IQC π.χ. CRM (Certified Reference Materials/πρότυπα στελέχη) όπως προσδιορίζονται από τη μέθοδο. Είναι δυνατό να περιλαμβάνει στελέχη εξωτερικού ελέγχου ποιότητας γνωστού αποτελέσματος. Το είδος και ο αριθμός των ελεγχόμενων στελεχών προσδιορίζεται ανάλογα με τη μέθοδο όπως προκύπτει από τη σχετική βιβλιογραφία. Η συχνότητα εκτέλεσης αυτών των ελέγχων προσδιορίζεται σύμφωνα με το είδος των εξετάσεων, τη συχνότητα εκτέλεσης των δοκιμών 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 1:* Οι ορολογικές δοκιμασίες περιλαμβάνουν μεθόδους αναζήτησης αντισωμάτων, αναζήτησης αντιγόνου, αναζήτησης βιοδεικτών κλπ. Μπορεί να είναι ποσοτικές (δείτε § 4.1), ημι-ποσοτικές ή ποιοτικές (δείτε § 4.2).

*ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ 2:* Σε περίπτωση χρήσης περισσοτέρων του ενός αναλυτών για την εκτέλεση των ίδιων δοκιμών απαιτείται τεκμηρίωση ισοδυναμίας αποτελεσμάτων με ανάλυση κατά προτίμηση πραγματικών δειγμάτων ή εναλλακτικά επί αδυναμίας συλλογής των παραπάνω,

δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, και στατιστική επεξεργασία τους (δοκιμασίες t-test και συσχέτιση). Επίσης, με ανάλυση των διεργαστηριακών δειγμάτων αποδεικνύεται η ισοδυναμία των αναλυτών. Στην περίπτωση ένταξης στο πεδίο νέου αναλυτή ή νέας μεθοδολογίας απαιτείται τεκμηρίωση συγκρισιμότητας αποτελεσμάτων. Προτείνεται η ανάλυση μεγάλου αριθμού (≥ 100) μη επιλεγμένων δειγμάτων.

*ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ 3:* Στην περίπτωση ελέγχου ευαισθησίας σε αντιμικροβιακούς παράγοντες, η ισοδυναμία αναλυτών / συγκρισιμότητα μεθόδων θα πρέπει να περιλαμβάνει ≥ 35 δείγματα γνωστής ανθεκτικότητας. Κατά περίπτωση, προτείνεται να αναζητείται πιστότητα ουσιώδους συμφωνίας ή συμφωνία κατηγοριών.

*ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ 4:* Οι αναλύσεις ούρων περιλαμβάνουν μεθόδους και τεχνικές, όπως είναι οι αναλύσεις βιοχημικών παραμέτρων των ούρων που εκτελούνται σε αυτόματο αναλυτή, οι εμβαπτιζόμενες ταινίες εξέτασης ούρων (αυτοματοποιημένες ή μη) για φυσικούς και χημικούς χαρακτήρες, μέτρηση έμμορφων στοιχείων των ούρων με αυτόματο αναλυτή, η ψηφιακή μικροσκόπηση ούρων, η μικροσκόπηση με οπτικό μικροσκόπιο ιζήματος ούρων. Οι αναλύσεις βιοχημικών παραμέτρων των ούρων είναι ποσοτικές δοκιμές (δείτε §4.1). Οι εμβαπτιζόμενες ταινίες εξέτασης ούρων (αυτοματοποιημένες ή μη) για φυσικούς και χημικούς χαρακτήρες είναι ποιοτικές δοκιμασίες (δείτε §4.2). Η μέτρηση έμμορφων στοιχείων των ούρων με αυτόματο αναλυτή μπορεί να δίνει αποτελέσματα ποσοτικά ή με ποιοτική έκφραση (δείτε §4.1, §4.2). Η ψηφιακή μικροσκόπηση ούρων δίνει αποτελέσματα ημι-ποσοτικά με ποιοτική τελική έκφραση (δείτε Παρατήρηση 5). Η μικροσκόπηση με οπτικό μικροσκόπιο ιζήματος ούρων δίνει αποτελέσματα ημι-ποσοτικά με ποιοτική τελική έκφραση (δείτε § 4.1, § 4.2).

*ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ 5:* Στην ψηφιακή μικροσκόπηση ούρων μπορεί να ελεγχθεί μόνον η ορθότητα που εκτιμάται μέσω της συμμετοχής του Εργαστηρίου σε εξωτερικό έλεγχο ποιότητας που προσφέρει ψηφιακές απεικονίσεις οπτικών πεδίων.

*ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ 6:* Η μέτρηση έμμορφων στοιχείων των ούρων με αυτόματο αναλυτή προσφέρει αποδεκτή ακρίβεια αποτελεσμάτων για τα αρνητικά δείγματα. Τα δείγματα με παθολογικά ευρήματα σκόπιμο είναι να ελέγχονται με άλλη μέθοδο του πεδίου, όπως η μικροσκόπηση (μέθοδος αναφοράς). Προτείνεται να γίνεται τεκμηρίωση συγκρισιμότητας αποτελεσμάτων μεταξύ των μεθόδων με ανάλυση πραγματικών, μη επιλεγμένων δειγμάτων, αρνητικών και παθολογικών, ή εναλλακτικά με ανάλυση δειγμάτων διεργαστηριακού ελέγχου.

*ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ 7:* Για τον έλεγχο ποιότητας του συνόλου, κατά το δυνατόν, των παραμέτρων του πεδίου που εξετάζονται στην ανάλυση ούρων προτείνεται τόσο στον εσωτερικό όσο και στον εξωτερικό έλεγχο ποιότητας να περιλαμβάνονται δείγματα που να μπορούν να επεξεργαστούν σύμφωνα με τις εφαρμοζόμενες στο εργαστήριο τεχνικές που αναφέρονται στο πεδίο. Εναλλακτικά, μπορούν, για τη μικροσκόπηση, να χρησιμοποιηθούν ψηφιακές απεικονίσεις οπτικών πεδίων από εξωτερικό έλεγχο ποιότητας.

*ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ 8:* Στον εσωτερικό έλεγχο ποιότητας της ανάλυσης ούρων, προτείνεται σε πραγματικά, μη επιλεγμένα δείγματα να γίνεται αντιστοίχιση των φυσικών και χημικών παραμέτρων με την παρουσία έμμορφων στοιχείων των ούρων για τον έλεγχο ταυτότητας του εκάστοτε δείγματος.

**4.3 Μικροσκοπικές δοκιμές**

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν δοκιμές, όπως είναι η άμεση μικροσκοπική παρατήρηση υποστρωμάτων με ή χωρίς συμπύκνωση (π.χ. ούρα, σπέρμα) και η παρατήρηση

μονιμοποιημένων παρασκευασμάτων, από υποστρώματα ή καλλιέργειες μικροβίων, κεχρωσμένων με χρώση κατά Gram, οξεάντοχη χρώση κ.λπ.

### 4.3.1. Επαλήθευση

Η επαλήθευση των μικροβιολογικών μικροσκοπικών δοκιμών γίνεται με προσδιορισμό της διαγνωστικής αναπαραγωγιμότητας - επαναληψιμότητας.

Διαγνωστική αναπαραγωγιμότητα - επαναληψιμότητα: Εκτιμάται με τυχαίο έλεγχο από τον ίδιο ή από διαφορετικούς διαγνώστες (μικροσκοπιστές) ενός αντιπροσωπευτικού ποσοστού δειγμάτων, ανάλογου του φόρτου εργασίας του εργαστηρίου, και μέτρηση διαπαρατηρητικής και ενδοπαρατηρητικής συμφωνίας (δείτε *ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ 1*, *ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ 2*).

### 4.3.2 Εκτίμηση της Αβεβαιότητας

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

### 4.3.3 Διασφάλιση Ποιότητας

Εσωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

Ο εσωτερικός έλεγχος ποιότητας στην άμεση μικροσκοπική παρατήρηση υποστρωμάτων πραγματοποιείται με έλεγχο από τον ίδιο ή διαφορετικούς διαγνώστες (μικροσκοπιστές) ενός αντιπροσωπευτικού ποσοστού δειγμάτων σε τακτά χρονικά διαστήματα.

Ο εσωτερικός έλεγχος ποιότητας στην παρατήρηση κεχρωσμένων παρασκευασμάτων πραγματοποιείται σε επιχρίσματα από διαφορετικά υποστρώματα ή αποικίες μικροβίων, αμιγείς ή μικτές, που προέρχονται από τον εσωτερικό έλεγχο ποιότητας των καλλιεργειών / αντιβιογραμμάτων. Ως μέτρο εσωτερικού ελέγχου ποιότητας προτείνεται ο τυχαίος επανέλεγχος, στον οποίο οι διαγνώστες (μικροσκοπιστές) ανασκοπούν ένα αντιπροσωπευτικό ποσοστό δειγμάτων, ανάλογο του φόρτου εργασίας του εργαστηρίου (μέτρηση διαπαρατηρητικής και ενδοπαρατηρητικής συμφωνίας), καθώς και η σύγκριση αποτελεσμάτων μικροσκόπησης κεχρωσμένων παρασκευασμάτων με τα αντίστοιχα αποτελέσματα ταυτοποίησης από τον αυτόματο αναλυτή (υπολογισμός π.χ. επί τοις εκατό συμφωνίας).

*ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ*: Στην περίπτωση εσωτερικού ελέγχου ποιότητας κεχρωσμένων παρασκευασμάτων έμμεσου ανοσοφθορισμού, ο έλεγχος πραγματοποιείται στο ίδιο υπόστρωμα κατά την ημέρα της πραγματοποίησης της εξέτασης με την χρήση θετικών και αρνητικών ορών ελέγχου του εμπορίου ή δειγμάτων με γνωστά αποτελέσματα. Σε περιπτώσεις όπου μπορεί να παρατηρηθεί σημαντικός βαθμός αυτοφθορισμού του υποστρώματος, μπορεί να χρησιμοποιούνται για τον σκοπό αυτό παράλληλα με τα δείγματα και τους ορούς ελέγχου και φρεάτια χωρίς δείγμα ή ορό ελέγχου.

Εξωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

Η συμμετοχή του Εργαστηρίου σε προγράμματα συγκριτικών δοκιμών ικανότητας θα πρέπει να είναι τουλάχιστον ετήσια, διασφαλίζοντας κατά το δυνατό τη συμμετοχή όλων των διαγνωστών (μικροσκοπιστών).

*ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ 1:* Στην άμεση μικροσκοπική παρατήρηση υποστρωμάτων, η μέτρηση διαπαρητηρητικής συμφωνίας μπορεί να γίνεται με τυφλό έλεγχο από τους διαγνώστες (μικροσκοπιστές) των ίδιων, τουλάχιστον δύο (2) την κάθε φορά, μεμονωμένων ή συνενωμένων (pooled) δειγμάτων με παθολογικά ευρήματα, σε τακτά χρονικά διαστήματα, ανάλογα με τον φόρτο εργασίας του εργαστηρίου. Προτείνεται, κατά καιρούς, έλεγχος και ενός (1) δείγματος χωρίς παθολογικά ευρήματα. Τα δείγματα εξετάζονται στο ίδιο, κάθε φορά, οπτικό μικροσκόπιο. Η μέτρηση ενδοπαρατηρητικής συμφωνίας μπορεί να γίνεται με τυφλό έλεγχο από κάθε διαγνώστη (μικροσκοπιστή) τουλάχιστον δύο (2) μεμονωμένων ή συνενωμένων (pooled) δειγμάτων με παθολογικά ευρήματα. Προτείνεται έλεγχος και ενός (1) δείγματος χωρίς παθολογικά ευρήματα. Το κάθε δείγμα εξετάζεται τρεις (3) φορές στο ίδιο οπτικό μικροσκόπιο.

*ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ 2:* Στην παρατήρηση κεχρωσμένων παρασκευασμάτων, η μέτρηση διαπαρητηρητικής συμφωνίας γίνεται με τυφλό έλεγχο από τους διαγνώστες (μικροσκοπιστές) των ίδιων, τουλάχιστον δύο (2) την κάθε φορά, παρασκευασμάτων, π.χ. ένα (1) με Gram-θετικό βακτήριο και ένα (1) με Gram-αρνητικά βακτήριο, σε τακτά χρονικά διαστήματα, ανάλογα με τις απαιτήσεις και τον φόρτο εργασίας του εργαστηρίου. Η μέτρηση ενδοπαρατηρητικής συμφωνίας γίνεται με τυφλό έλεγχο από κάθε διαγνώστη (μικροσκοπιστή) τριών (3) παρασκευασμάτων από διαφορετικά υποστρώματα ή αποικίες μικροβίων, αμιγείς ή μικτές. Το κάθε παρασκεύασμα εξετάζεται τρεις (3) φορές.

## 5. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

### 5.1 Επαλήθευση CE IVD ποιοτικών δοκιμών

Ορθότητα (Trueness): Ο έλεγχος της Ορθότητας γίνεται με τη χρήση πιστοποιημένων υλικών αναφοράς (certified reference materials - CRMs), ή διαγνωσμένων δειγμάτων από τα σχήματα EQA με αποτελέσματα από διεργαστηριακά σχήματα (δείγματα EQA).

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 δέκα (10) μετρήσεις control δειγμάτων (CRMs ή δείγματα EQA) σε ένα επίπεδο θετικότητας (με κλινική αξία στη διάγνωση) στο ίδιο πειραματικό run και της αναπαραγωγιμότητας με είκοσι (20) μετρήσεις control δειγμάτων σε διαφορετικές συνθήκες (διαφορετικά runs διαφορετικών ημερών).

Σε δοκιμές γενετικής αλληλούχισης (NGS, Sanger, MLPA, FA, WGS, WES, CES, ddPCR) απαιτείται ο έλεγχος της επαναληψιμότητας με τρεις (3) μετρήσεις δύο (2) control δειγμάτων (CRMs ή δείγματα EQA) στο ίδιο πειραματικό run και της αναπαραγωγιμότητας με τέσσερις (4) μετρήσεις τριών (3) control δειγμάτων σε διαφορετικές συνθήκες (διαφορετικά runs διαφορετικών ημερών).

Θα πρέπει να ακολουθεί κατάλληλη στατιστική ανάλυση των πειραμάτων αυτών. Εναλλακτικά, μετρήσεις για τον εσωτερικό έλεγχο ποιότητας (πχ Διάγραμμα Levey Jennings) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό της αναπαραγωγιμότητας.

Όριο Ανίχνευσης (LOD): Σε περιπτώσεις προσδιορισμού παραμέτρων με κλινική σημασία, απαιτείται η επιβεβαίωση του Ορίου Ανίχνευσης (Limit of Detection) με 95% επίπεδα εμπιστοσύνης η οποία γίνεται με ανάλυση τουλάχιστον 5 control δειγμάτων (CRMs ή δείγματα EQA) αραιωμένα στην περιοχή του Ορίου Ανίχνευσης.

Συμβατότητα αντιδραστηρίων: Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την Real-time PCR, το NGS, τον γενετικό αναλυτή ή λοιπό αναλυτικό εξοπλισμό θα πρέπει να συμβατά με τον εκάστοτε εξοπλισμό στον οποίο διενεργείται η προς διαπίστευση εξέταση. Σε αντίθετη περίπτωση, ακολουθείται η διαδικασία της επικύρωσης όπως στις εσωτερικές (in house) δοκιμές (§5.3).

Τα παραπάνω ισχύουν για όλες τις CE IVD ποιοτικές δοκιμές που διενεργούνται σε αυτόματους παρακλίνιους μοριακούς αναλυτές (molecular point-of-care analyzers).

**5.2 Επαλήθευση CE IVD ποσοτικών δοκιμών**

Επιπλέον των απαιτήσεων της §5.1, απαιτείται έλεγχος γραμμικότητας της καμπύλης βαθμονόμησης 3 φορές με χρήση 4 τουλάχιστον σημείων (εις διπλούν) εφόσον είναι διαθέσιμα τα πρότυπα.

Επαναληψιμότητα/Αναπαραγωγιμότητα: Σε ποσοτικές μοριακές μεθόδους απαιτείται ο έλεγχος της επαναληψιμότητας με δέκα (10) μετρήσεις control δειγμάτων (CRMs ή δείγματα EQA) σε ένα επίπεδο θετικότητας (ασθενώς θετικό κοντά στο όριο ανίχνευσης της μεθόδου) στο ίδιο πειραματικό run και της αναπαραγωγιμότητας με είκοσι (20) μετρήσεις σε διαφορετικές συνθήκες (διαφορετικά runs διαφορετικών ημερών). Οι μετρήσεις θα πρέπει να υπολογίζουν εκτός από τιμές Ct και τις τελικές συγκεντρώσεις.

Θα πρέπει να ακολουθεί κατάλληλη στατιστική ανάλυση των πειραμάτων αυτών. Εναλλακτικά, μετρήσεις για τον εσωτερικό έλεγχο ποιότητας (πχ Διάγραμμα Levey Jennings) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό της αναπαραγωγιμότητας.

Τα παραπάνω ισχύουν για όλες τις CE IVD ποσοτικές δοκιμές που διενεργούνται σε αυτόματους παρακλίνιους μοριακούς αναλυτές (molecular point-of-care analyzers).

**5.3 Επικύρωση εσωτερικών (in-house) δοκιμών**

Οι in-house μεθοδολογίες και οι για ερευνητική χρήση δοκιμές (Research Use Only) 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).

Απαιτήσεις όσον αφορά στην επικύρωση των εσωτερικών μεθόδων αποτελούν:

Ορθότητα (Trueness): Ο έλεγχος της Ορθότητας γίνεται με τη χρήση control δειγμάτων (CRMs ή δείγματα EQA).

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 του ίδιου του εργαστηρίου ή του εργαστηρίου που έχει ορισθεί ως Β΄ γνώμης, σε 20 δείγματα

(π.χ. 10 αρνητικά και 10 θετικά για ποιοτικές παραμέτρους, 10 αρνητικά και 10 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 ένα ικανοποιητικό πάνελ (τουλάχιστον το 50% των παθογόνων που ανήκουν στο πάνελ ανίχνευσης της δοκιμής ή το σύνολο των γονιδίων-στόχων που αναλύονται στις περιπτώσεις που αυτά αποτελούν ένα μικρό ποσοστό ενός πολυγονιδιακού πάνελ) control δειγμάτων με π.χ. τουλάχιστον τις πιο συχνές μεταλλάξεις/πολυμορφισμούς για κάθε γονίδιο στον Ελληνικό χώρο ή τους πιο συχνά ανιχνευόμενους μικροοργανισμούς στο ανθρώπινο μικροβίωμα ώστε να επικυρώσει την ορθότητα της μεθόδου που χρησιμοποιεί.

Επαναληψιμότητα (repeatability)/ Ενδιάμεση πιστότητα (intermediate precision)/ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (reproducibility):: Για την Επαναληψιμότητα/Αναπαραγωγιμότητα ισχύει ότι ορίζεται για τις αντίστοιχες CE-IVD δοκιμές. 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 η εξέταση σειράς πέντε αραιώσεων (με ονομαστικές συγκεντρώσεις στο αναμενόμενο ή απαιτούμενο όριο ανίχνευσης) υλικού αναφοράς (CRM) σε 3 διαφορετικές ημέρες (εκτελέσεις) με 8-10 επαναλήψεις. Ο προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης με όρια εμπιστοσύνης 95% γίνεται με γραφική αναπαράσταση της ανάλυσης probit. Στις πολυπαραμετρικές μεθοδολογίες η διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε στόχο που ανιχνεύει η μέθοδος.

Όριο Ποσοτικοποίησης (LOQ) στις ποσοτικές μεθόδους: Σύμφωνα με τη σχέση LOQ=3xLOD.

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 5 τουλάχιστον σημείων (εις τριπλούν) με αραίωση κατάλληλου CRM 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), ή παρόμοιων γενετικά οργανισμών ή οργανισμών που ανευρίσκονται συχνά στα δείγματα που αναλύει το εργαστήριο, ή ψευδογονιδίων ή ομόλογων περιοχών ανάλογα με την προς διαπίστευση δοκιμή.

### 5.4 Εκτίμηση Αβεβαιότητας

Όπως §1.1.2

### 5.5 Διασφάλιση Ποιότητας

Εσωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

- Σε συμβατική/Q-PCR: χρησιμοποιείται πάντα λευκό (no DNA / blank), 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. Συνιστάται η απομόνωση γενετικού υλικού να περιλαμβάνει μάρτυρα ποιότητας αυτής (ενδογενές control κάποιου housekeeping γονιδίου ή εξωγενές control του κατασκευαστή).

- 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.

- Τα controls θα πρέπει να είναι είτε διαγνωσμένα δείγματα από σχήματα EQA ή κάποιο CRM και όχι τα control δείγματα που παρέχει στο εκάστοτε κιτ ο κατασκευαστής.

- Συνιστάται τα εργαστήρια να επιλέγουν CRMs από εταιρείες/φορείς που είναι διαπιστευμένοι κατά το ISO 17034 και να συνοδεύονται από διαπιστευτήρια ιχνηλασιμότητας κατά ILAC P10.

Ο εσωτερικός έλεγχος ποιότητας θα πρέπει να διενεργείται ανά τακτά χρονικά διαστήματα ή ανάλογα με τη μεθοδολογία και τις υποδείξεις του κατασκευαστή σε κάθε run αν αυτό είναι εφικτό, (με συχνότητα που θα ορίζεται συνεκτιμώντας είτε τον όγκο εργασιών του εργαστηρίου πχ κατ' ελάχιστο κάθε 50 δείγματα, ή τα χρονικά διαστήματα εκτέλεσης πχ κατ' ελάχιστο κάθε τρίμηνο ή τετράμηνο), και να αναλύεται σε διαγράμματα ελέγχου (Levey-Jennings) και η αξιολόγηση αυτών να βασίζεται στα κριτήρια Westgard που έχει εντάξει το εργαστήριο στο ΣΔΠ.

Ισχυρή σύσταση να διενεργείται, στο πλαίσιο των εσωτερικών επιθεωρήσεων και των ανασκοπήσεων της καταλληλότητας των δοκιμών, εξέταση ήδη αναλυθέντων δειγμάτων με συχνότητα που βασίζεται στη σταθερότητα και τη στιβαρότητα της μεθόδου εξέτασης και στον κίνδυνο βλάβης στον ασθενή από εσφαλμένο αποτέλεσμα, και να αναλύεται σε διαγράμματα ελέγχου (Levey-Jennings).

Ισοδυναμία εξοπλισμού: Σε περίπτωση που η προς διαπίστευση εξέταση βασίζεται στη χρήση εναλλακτικών παρεμφερών μονάδων εξοπλισμού (π.χ. αυτόματα συστήματα απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων, θερμοκυκλοποιητές Real-time PCR, γενετικοί αναλυτές) τότε θα πρέπει να πραγματοποιείται μελέτη ισοδυναμίας όλων των σχετικών μονάδων που χρησιμοποιούνται για την διενέργεια της προς διαπίστευση δοκιμής, με χρήση των ίδιων control δειγμάτων (CRMs ή δείγματα EQA).

Στις δοκιμές γενετικής αλληλούχισης:

1) Θα πρέπει να αναφέρονται τα κριτήρια αποδοχής: α) του πρωτογενούς δείγματος, όπως % καρκινικών κυττάρων, ποσότητα κτλ., β) των συγκεντρώσεων και της καθαρότητας των προϊόντων εκχύλισης (DNA, RNA) για τη διενέργεια PCR-sequencing/FA/MLPA ή, στην περίπτωση NGS, των βιβλιοθηκών (ποσοτικοποίηση και έλεγχος ποιότητας, όπως μέγεθος γενομικών περιοχών που περιλαμβάνονται στις βιβλιοθήκες, καθώς και ποσοτικοποίηση και έλεγχος ποιότητας του τελικού προϊόντος πριν την αλληλούχιση), γ) Τα κριτήρια για την ευαισθησία (Limit of detection), το κατάλληλο βάθος ανάγνωσης και την κάλυψη μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με τους παράγοντες-στόχους (πχ βακτήρια), τη μέθοδο και το σκοπό της δοκιμής αλληλούχισης (π.χ. δοκιμή αντοχής σε φάρμακα (drug resistance testing), γονοτύπιση/ υποτυποποίηση).

2) Στις ευρέως χρησιμοποιούμενες πλατφόρμες αλληλούχισης τύπου short-read, συνιστάται τα τμήματα DNA μεταξύ των adapters να είναι μήκους 100 έως 500 bp (αν αυτές διαφοροποιούνται ή δεν ορίζονται στο πρωτόκολλο ανάλυσης). Το Εργαστήριο θα πρέπει να ορίσει τις αποδεκτές τιμές συγκέντρωσης των βιβλιοθηκών που έχουν συντεθεί πριν

ακολουθήσουν τα επόμενα πειραματικά βήματα (και να αιτιολογεί την επιλογή των συγκεκριμένων κριτηρίων).

3) Για την αποφυγή των αστοχιών κατά το διαχωρισμό των προϊόντων αλληλούχισης σε διαφορετικά δείγματα (demultiplexing) οφείλουν να αναπτυχθούν στρατηγικές όπως η χρήση dual indexing.

4) Οι αλληλουχίες προς ενίσχυση κατά τη Whole exome ή genome αλληλούχιση θα πρέπει εκτός από τις περιοχές των αντίστοιχων εξονίων να συμπεριλαμβάνουν τουλάχιστον τις περιοχές -1 έως -16 και +1 έως +5 των γειτονικών ιντρονίων.

5) Το Εργαστήριο θα πρέπει να ορίζει δείκτες ποιότητας όπως Phred quality score, LOD, εκτίμηση του (συνολικού) λάθους της διαδικασίας NGS (ή τουλάχιστον της αλληλούχισης), το ελάχιστο βάθος ανάγνωσης και το % των υπό διερεύνηση βάσεων που έχουν αλληλουχηθεί με το ελάχιστο απαιτούμενο βάθος (depth), το συνολικό αριθμό των «target reads» που καλύπτουν την περιοχή, στην οποία εντοπίζεται μία γενετική αλλαγή, καθώς και τον αριθμό των “reads” που φέρουν αυτήν την αλλαγή.

6) Προτείνεται γενικά ως ελάχιστη απαίτηση Q score≥20 (long reads), και Q score≥30 (short reads), ενώ το απαιτούμενο βάθος κυμαίνεται ανάλογα με το είδος των δειγμάτων και των υπό διερεύνηση στόχων (depth>=15x).

7) Τα δείγματα που χρησιμοποιούνται για την προτυποποίηση της μεθόδου δεν πρέπει να είναι τα ίδια με αυτά που θα χρησιμοποιηθούν για την επικύρωση. Μπορούν όμως να συμβάλουν στον καθορισμό των κριτηρίων αποδοχής / απόρριψης δειγμάτων.

8) Τα παθολογικά ευρήματα θα πρέπει να επαληθεύονται με συμπληρωματική μεθοδολογία (πχ αλληλούχιση κατά Sanger, MLPA, realtime PCR κτλ.) ή και συνδυασμό μεθόδων εάν το φορτίο των αλληλόμορφων αναμένεται χαμηλό (targeted mutation analysis).

9) Όταν χρησιμοποιείται εμπορικά διαθέσιμο λογισμικό βιοπληροφορικής ανάλυσης θα πρέπει το εργαστήριο να διαθέτει όλα τα αρχεία και δεδομένα επικύρωσης που παρέχονται από την κατασκευάστρια. Διαδικασία επικύρωσης απαιτείται για λογισμικά που έχουν δημιουργηθεί in-house από το εργαστήριο (με 10 τουλάχιστον δείγματα controls τα οποία θα αναλυθούν και θα συγκριθούν με άλλο εμπορικά διαθέσιμο λογισμικό ή θα αναλυθούν με άλλη μέθοδο η οποία θα επιβεβαιώσει το αποτέλεσμα π.χ. Sanger Sequencing ) έτσι ώστε να τεκμηριωθεί η καταλληλότητά τους για κλινική χρήση. Στην περίπτωση της άμεσης αλληλούχισης (Sanger): θα πρέπει να ορίζεται το λογισμικό για την ανάλυση και την αποδοχή ή μη των τμημάτων προς αλληλούχιση (base calling) και να δίνονται οι δείκτες ποιότητας (Phred Qscore ≥20). Θα πρέπει να αναφέρονται τα κριτήρια με τα οποία αξιολογούνται/κατηγοριοποιούνται οι γενετικές αλλαγές.

<u>Εξωτερικός Έλεγχος Ποιότητας</u>

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 ή πενταετίας 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 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 1ο κύκλο διαπίστευσης (4 ή 5ετία) 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 ομάδας αξιολόγησης.

Συνιστάται τα εργαστήρια να επιλέγουν φορείς που διενεργούν σχήματα EQA που είναι διαπιστευμένοι κατά το ISO 17043.

Αν δεν υπάρχει εμπορικά διαθέσιμο σχήμα Εξωτερικού Ελέγχου Ποιότητας για κάποια παράμετρο (παθογόνο ή μετάλλαξη) που ανιχνεύει η προς διαπίστευση δοκιμή ή για κάποιο υπόστρωμα που αναλύει η προς διαπίστευση δοκιμή, τότε το Εργαστήριο οφείλει να συμμετέχει σε διεργαστηριακή σύγκριση τουλάχιστον 15 δειγμάτων για Real-time PCR και τουλάχιστον 8 δειγμάτων για γενετική αλληλούχιση με ομοειδές διαγνωστικό εργαστήριο ετησίως.

Σε κάθε περίπτωση σε πολυπαραγοντικές δοκιμές θα αναγράφονται στο ΕΠΕΔ μόνο οι παράμετροι της δοκιμής για τις οποίες το Εργαστήριο εφαρμόζει Εξωτερικό Έλεγχο Ποιότητας είτε από επίσημο φορέα είτε, ελλείψει αυτού, σε συνεργασία με ομοειδή διαγνωστικά εργαστήρια.

### 5.6 Κυτταρογενετικές δοκιμές - Καρυότυπος & FISH

#### 5.6.1 Επαλήθευση

Η επαλήθευση αυτής της κατηγορίας 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 αυτές 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.

Διαγνωστική αναπαραγωγιμότητα-επαναληψιμότητα: Εκτιμάται με:

-Ανάλυση κάθε δείγματος από δύο ανεξάρτητους αναλυτές, τουλάχιστον ένας από τους οποίους να έχει κατάλληλη εμπειρία στην κυτταρογενετική ανάλυση των εν λόγω δειγμάτων (π.χ. διερεύνηση αιματολογικών κακοηθειών).

-Τυχαίο επανέλεγχο από τον ίδιο ή από διαφορετικούς αναλυτές ενός αντιπροσωπευτικού ποσοστού δειγμάτων, ανάλογου του φόρτου εργασίας του εργαστηρίου (τουλάχιστον 1 δείγμα το μήνα).

Επιπλέον στην περίπτωση FISH (fluorescence in situ hybridization) οποιοσδήποτε νέος επισημασμένος εμπορικός ιχνηθέτης (IVD) που εισάγεται στη διάγνωση απαιτεί επαλήθευση (έλεγχο επαναληψιμότητας, αναπαραγωγιμότητας, ορθότητας και προσδιορισμό ορίου ανίχνευσης) σχετικά με την απόδοσή του πριν τη διαγνωστική χρήση. Η επαλήθευση απαιτεί επίσης δοκιμή για την εξειδίκευση του στόχου ως προς την αναλυτική ευαισθησία και ειδικότητα (κατά προτίμηση σε φυσιολογικά -controls και παθολογικά περιστατικά, τα οποία είναι θετικά προς τον ιχνηθέτη που δοκιμάζεται). Η ευαισθησία και η ειδικότητα πρέπει να είναι υψηλή για να αποφευχθεί η λανθασμένη διάγνωση. Τα κατώτατα όρια και τα όρια εμπιστοσύνης (thresholds and confidence limits) πρέπει να είναι καθορισμένα για όλους τους ιχνηθέτες και τα σετ ιχνηθετών FISH. Για να οριστούν τα cut-off κάθε ιχνηθέτη θα πρέπει να αναλυθούν τουλάχιστον 5 φυσιολογικά και 2 παθολογικά δείγματα από τουλάχιστον 2 αναλυτές. Όπου μπορεί να εφαρμοστεί, κάθε φορά που γίνεται υβριδισμός θα πρέπει να μπαίνουν και οι αντίστοιχοι ιχνηθέτες σε δείγματα μάρτυρες.

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

### 5.6.2 Εκτίμηση της Αβεβαιότητας

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

### 5.6.3 Διασφάλιση Ποιότητας

<u>Εσωτερικός Έλεγχος Ποιότητας</u>

Ως μέτρα εσωτερικού ελέγχου ποιότητας απαιτούνται η λήψη σωστού δείγματος (π.χ. για μυελογενείς λευχαιμίες: μυελός των οστών ή περιφερικό αίμα όταν υπάρχουν στο περιφερικό αίμα βλάστες >10%), αξιολόγηση βάσει καταγεγραμμένων κριτηρίων αποδοχής/απόρριψης δειγμάτων (μεταφορά σε κατάλληλα στείρα δοχεία συλλογής και σε κατάλληλες συνθήκες, μακροσκοπική αξιολόγηση της ποιότητας και ποσότητας του δείγματος κ.ά.) και εφαρμογή πολιτικής ελαχιστοποίησης κινδύνων.

α) Κυτταροκαλλιέργειες-Προγεννητικός έλεγχος (αμνιακό υγρό, χοριακές λάχνες): Τουλάχιστον 2 ανεξάρτητες καλλιέργειες σε διαφορετικούς κλιβάνους. Για δείγματα χοριακών λαχνών (CVS) καθιέρωση και ανάλυση μακροχρόνιων καλλιέργειών (κύτταρα τροφοβλάστης και μεσεγχυματικά κύτταρα). Οι εφεδρικές καλλιέργειες των προγεννητικών δειγμάτων θα πρέπει να διατηρούνται μέχρι την σύνταξη της τελικής έκθεσης αποτελέσματος και, όταν είναι πρακτικό, και, όπου υπάρχει δυνατότητα, να γίνεται κατάψυξη βιώσιμων κυττάρων, καθώς και μονιμοποιημένων κυττάρων για περιπτώσεις που μπορεί να απαιτηθούν περαιτέρω κυτταρογονιδιωματικές ή μοριακές αναλύσεις.

β) Κυτταροκαλλιέργειες-Μεταγεννητικός έλεγχος: Για τον συστατικό καρυότυπο περιφερικού αίματος, 2 ανεξάρτητες καλλιέργειες 48 ή/και 72 ωρών. Για τα αιματολογικά-ογκολογικά δείγματα (καρυότυπος για επίκτητες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις): τουλάχιστον 2 ανεξάρτητες καλλιέργειες 24 και 48 ή/και 72 ή 96 ωρών ανάλογα με το είδος της νεοπλασίας.

γ) Ζωνοποίηση με χρήση τεχνικών ζώνωσης. Για χρήση διαφορετικών τεχνικών ζώνωσης θα πρέπει να διενεργούνται δοκιμές ισοδυναμίας. Η συντριπτική πλειοψηφία των δειγμάτων απαιτεί πλήρη ανάλυση του προτύπου ζώνωσης για όλα τα χρωμοσώματα. Το ISCN (2020) ορίζει πέντε επίπεδα ζωνών. Για αιματολογικές κακοήθειες ή συμπαγείς όγκους, δεν μπορεί να ορισθεί ένα ελάχιστο επίπεδο ανάλυσης ζώνωσης. Τα εργαστήρια θα πρέπει να είναι σε θέση να έχουν όσο το δυνατό μεγαλύτερο επίπεδο ανάλυσης (300-550 bphs) και να

αναλύουν κύτταρα με διαφορετικά επίπεδα ανάλυσης ζώνωσης χρωμοσωμάτων και κύτταρα διαφορετικής ποιότητας προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η πιθανότητα ανίχνευσης νεοπλασματικού κλώνου. Όπου απαιτούνται πρόσθετες δοκιμές για την αποσαφήνιση των χρωμοσωμικών ανωμαλιών, μπορεί να γίνει συμπληρωματικά FISH ή μοριακή ανάλυση. Θα πρέπει να ορίζεται ελάχιστο επίπεδο ανάλυσης ζώνωσης συστατικού καρυοτύπου (minimum G-banding quality, QAS-score) ανάλογα με την αιτία παραπομπής.

δ) Ανάλυση και αξιολόγηση:

i) Καρυότυπος ή FISH από 2 τουλάχιστον ανεξάρτητους αναλυτές.

ii) Συστατικός καρυότυπος: έλεγχος τουλάχιστον 15 μεταφάσεων (εκ των οποίων 5 πλήρως αναλυμένες). Για αποκλεισμό μωσαϊκισμού, έλεγχος τουλάχιστον 30 μεταφάσεων.

iii) Καρυότυπος αιματολογικών νεοπλασιών: Σε περίπτωση φυσιολογικού καρυοτύπου θα πρέπει να εξεταστούν τουλάχιστον 20 μεταφάσεις για να αποκλεισθεί η παρουσία ενός χρωμοσωμικά ανώμαλου κλώνου. Αν ένα φυσιολογικό αποτέλεσμα βασίζεται σε εξέταση λιγότερων από 20 μεταφάσεων, στην έκθεση αποτελέσματος αναγράφεται ότι δεν μπορεί να αποκλειστεί η παρουσία κυτταρικού κλώνου. Όταν διαπιστωθεί μια κλωνική ανωμαλία κατά τη διάγνωση συστήνεται η ανάλυση 20 μεταφάσεων, όπου είναι δυνατόν για ταυτοποίηση πιθανού επιπρόσθετου μικρού κλώνου. Αν υπάρχει υποψία αλλοίωσης που ανήκει στο συστατικό καρυότυπο πρέπει να γίνεται έλεγχος συστατικού καρυοτύπου.

iv) Σύγκριση του καρυοτύπου με τα αποτελέσματα λοιπών βοηθητικών διαγνωστικών τεχνικών, όπως FISH, μοριακός καρυότυπος, μοριακή ανάλυση για μεταλλάξεις.

v) FISH για συγγενείς αλλοιώσεις: Σε περίπτωση ακαλλιέργητων κυττάρων έλεγχος σε ≥50 κύτταρα και σε περίπτωση μωσαϊκισμού σε ≥100 κύτταρα για κάθε ιχνηθέτη. Σε περίπτωση καλλιεργημένων κυττάρων επιπλέον έλεγχος τουλάχιστον 5 μεταφάσεων. Τα αποτελέσματα FISH συστήνεται να συνοδεύονται από ανάλυση καρυότυπου.

vi) FISH σε αιματολογικές κακοήθειες:

-Διαγνωστικά δείγματα: Ανάλυση τουλάχιστον 100 μεσοφασικών πυρήνων και επιπλέον έλεγχος τουλάχιστον 5 μεταφάσεων σε περίπτωση καλλιεργημένων κυττάρων, εφόσον υπάρχει δυνατότητα.

-Για παρακολούθηση ασθενών (follow-up) που στη διάγνωση είχε βρεθεί κλωνική ανωμαλία: ανάλυση τουλάχιστον 200 μεσοφασικών πυρήνων και επιπλέον έλεγχος τουλάχιστον 5 μεταφάσεων σε περίπτωση καλλιεργημένων κυττάρων αν υπάρχουν.

-Όπου υπάρχει υποψία έλλειψης ή αναδιάταξης, η επάρκεια στην αποτελεσματικότητα υβριδισμού μπορεί να επιβεβαιωθεί είτε με την παρουσία φυσιολογικού δεύτερου σήματος στο υβριδοποιημένο κύτταρο πχ σε περίπτωση αναδιάταξης, είτε με τη παρουσία εσωτερικού μάρτυρα στον χρησιμοποιούμενο ιχνηθέτη όπως πχ σε περίπτωση έλλειψης.

ε) Κυτταρογενετικές εκθέσεις αποτελέσματος: Ο καρυότυπος περιγράφεται σύμφωνα με την πιο πρόσφατη έκδοση του διεθνούς συστήματος ονοματολογίας της Κυτταρογενετικής του ανθρώπου (ISCN). Τα ονόματα γονιδίων πρέπει να γράφονται σύμφωνα με την ονοματολογία HUGO. Τα μη φυσιολογικά αποτελέσματα FISH θα πρέπει πάντα να αναφέρονται χρησιμοποιώντας το πιο πρόσφατο ISCN.

στ) FISH σε τομές παραφίνης: Σε περίπτωση διαγνωστικών δειγμάτων η επιλογής της τομής και της περιοχής υβριδισμού θα πρέπει να υποδεικνύεται από Παθολογοανατόμο:

- η τομή παραφίνης πρέπει να έχει πάχος 3,5-5μm
- η ανάλυση πρέπει να γίνεται σε τουλάχιστον 60 κύτταρα. Σε περίπτωση που δεν δύνανται να αναλυθούν 60 κύτταρα αυτό αναγράφεται ως σχόλιο στα αποτελέσματα.

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

Εξωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

Συμμετοχή του Εργαστηρίου σε διεργαστηριακά προγράμματα συγκριτικών δοκιμών ικανότητας (τουλάχιστο ετήσια για καρυότυπο και FISH), διασφαλίζοντας τη συμμετοχή όλων των μελών του Εργαστηρίου.

## 6. ΔΟΚΙΜΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ

### 6.1 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)). Οι παρακάτω προτάσεις βασίζονται και στο Validation of assays performed by flow cytometry (CLSI H62).

#### 6.1.1 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. Για την ορθότητα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και τα αποτελέσματα τουλάχιστο τριετούς συμμετοχής στον εξωτερικό έλεγχο ποιότητας της ΕΕΚ.

Επαναληψιμότητα (repeatability): Τουλάχιστον έξι (6) μετρήσεις του ίδιου δείγματος ελέγχου. Υπολογίζεται το % CVr των μετρήσεων. Εναλλακτικά, μπορεί να αναλυθούν 3 δείγματα, 2 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 $CV_R$% των μετρήσεων (μπορεί να εξαχθεί και από τα αποτελέσματα των control charts εντός 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 βιβλιογραφία με μεγάλο αριθμό δειγμάτων σε καυκάσιο πληθυσμό (ιδιαίτερα για παιδιατρικά δείγματα). Αν είναι δυνατόν γίνεται επιβεβαίωση με 20 φυσιολογικά άτομα.

### 6.1.2 Εκτίμηση Αβεβαιότητας

Όπως §1.1.2.

### 6.1.3 Διασφάλιση Ποιότητας

Εσωτερικός Έλεγχος 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+). Στην περίπτωση της μεθόδου 2 συνιστάται υποχρεωτική χρήση δείγματος ελέγχου την ημέρα της μέτρησης δείγματος (όταν δεν γίνεται συνεχής χρήση της μεθόδου – τότε δεν απαιτείται εβδομαδιαία χρήση).

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

Α. Καθημερινή χρήση (ή με κάθε άνοιγμα του μηχανήματος) σφαιριδίων ευθυγράμμισης (τύπου Ι), 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 Levey Jennings μέσα στον κυτταρομετρητή.

Β. Εβδομαδιαία χρήση σφαιριδίων επιβεβαίωσης της επαναλήψιμης μέτρησης του κάθε φθορισμού (τύπου 2), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Απαιτείται η φύλαξη των αντίστοιχων διαγραμμάτων Levey Jennings μέσα στον κυτταρομετρητή ή η απεικόνιση σε αντίστοιχα διαγράμματα από το εργαστήριο σε περίπτωση που ο κυτταρομετρητής δεν τα αποθηκεύει αυτόματα.

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 (παραγωγή γραμμικής καμπύλης αναφοράς για κάθε ανιχνευτή φθορισμού). Συνιστάται και η εκτίμηση του carryover: μετρώνται 3 επαναληπτικά δείγματα (Α1, Α2, Α3) με υψηλό αριθμό ενός πληθυσμού που ακολουθούνται από 3 επαναληπτικά χωρίς τον πληθυσμό (Β1, Β2, Β3) και υπολογίζεται το carryover από την εξίσωση carryover%= [(B1-B3)/(A3-B3)]*100.

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 την ημέρα μέτρησης δείγματος (όταν η εξέταση δεν γίνεται συχνά) χρήση εμπορικού δείγματος μονιμοποιημένου αίματος ή αντιστοίχου εμπορικού δείγματος ελέγχου για τη μέτρηση των CD34+ κυττάρων ως δείγματος εσωτερικού ελέγχου ποιότητας.

Εξωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

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

**6.2 Ποιοτικές δοκιμές**

Οι δοκιμές που αφορούν τα panels τυποποίησης οξείας λευχαιμίας, Νυχτερινή Παροξυσμική Αιμοσφαιρινουρία (PNH) και λεμφοϋπερπλαστικών συνδρόμων μπορούν να θεωρηθούν ποιοτικές ή ημι-ποσοτικές δοκιμές, αφού ο κάθε δείκτης απαιτείται να χαρακτηρίζεται ως θετικός ή αρνητικός. Εφαρμόζονται οι απαιτήσεις της §1.2.

**6.2.1. Επαλήθευση μεθόδου**.

Η επαλήθευση μεθόδου αφορά στο συγκεκριμένο υλικό για το οποίο εφαρμόζεται (π.χ. περιφερικό αίμα). Σε περίπτωση που εφαρμόζεται σε άλλο βιολογικό υλικό θα πρέπει η επαλήθευση (πιθανά να χρειάζεται επικύρωση μεθόδου) να πραγματοποιείται με το συγκεκριμένο βιολογικό δείγμα (π.χ. ΕΝΥ, Μυελός οστών, BAL κ.α.).

Κατά τα άλλα η επαλήθευση είναι ίδια με τις ποσοτικές δοκιμές (παρ. 4.1.1).

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, και γενικά σε κάποιο μετρήσιμο χαμηλό επίπεδο εντός της ίδιας ημέρας. Το όριο ανίχνευσης είναι 3,3 φορές την τυπική απόκλιση (SD).

Ειδικά για την μέτρηση ελάχιστης υπολειμματικής νόσου, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη και οι οδηγίες υπολογισμού (Guidelines) που δίνονται από τις επιστημονικές ομάδες: ελάχιστο όριο LOD 20 events και ελάχιστο όριο LOQ 30-50 events. Να αναφέρονται στο τελικό αποτέλεσμα μαζί με το συνολικό αριθμό των κυττάρων (events) που αναλύθηκαν και τον αριθμό των υπό διερεύνηση που ανακτήθηκαν.

LOB (Limit of Blank): ορίζεται ως η ανάλυση δείγματος χωρίς τον υπό ανίχνευση πληθυσμό (π.χ. φυσιολογικός μυελός) μέχρι 10 events (κύτταρα) στην περιοχή που αναμένεται να ανιχνευθεί ο παθολογικός πληθυσμός. Μπορεί να προσδιοριστεί και από πειράματα προσδιορισμού cut off σε FMOs δείγματα. Το LLOD μπορεί να υπολογιστεί ως LOB+1,645SD, ή mean of the blank +3SD.

Απαραίτητο είναι να προσδιοριστεί και το όριο των events (κυττάρων)/run που θα αναλύονται σε κάθε τεχνική.

**6.2.2. Επικύρωση μεθόδου**

Οι δοκιμές αυτές για τις οποίες δεν υπάρχουν kit και χρησιμοποιούνται in house πρωτόκολλα – panel, συνδυασμοί δηλαδή αντιδραστηρίων, κύρια, αλλά όχι μόνο CE-IVD, απαιτείται επικύρωση εκτός από την επαλήθευση.

Προτείνεται σαν επικύρωση της μεθόδου η χρήση FMO (fluorescence minus one) για ένα τουλάχιστον πρωτόκολλο (ένα κύριο πρωτόκολλο ενός panel). Αυτό μας δίνει και ένδειξη του LOB για το δείκτη που λείπει και επαναληψιμότητα για τους άλλους δείκτες.

Μπορούν επίσης να προσδιορισθούν «κενές περιοχές» (empty spaces) με χρήση φυσιολογικών δειγμάτων ή δειγμάτων χωρίς τη νόσο ή και δειγμάτων με αναγεννώμενο μυελό στην περίπτωση MRD.

Για τη σταθερότητα δείγματος ισχύει ό,τι προτείνεται σε οδηγίες στη διεθνή βιβλιογραφία: 72 ώρες για το πλήρες αίμα και 48 ώρες για το μυελό των οστών, εκτός αν έχουν γίνει πειράματα σταθερότητας που επιτρέπουν ή όχι την αλλαγή των χρόνων.

Η σταθερότητα επεξεργασμένου δείγματος στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές θα μπορούσε να εκτιμηθεί, διότι δεν επιβαρύνει σημαντικά το εργαστήριο.

### 6.2.3 Διασφάλιση Ποιότητας

Εσωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

Σημαντική στην κυτταρομετρία είναι η χρήση των εσωτερικών controls (internal controls).

Προκειμένου για εξετάσεις όπως λευχαιμίες και λεμφώματα, πληθυσμοί μέσα στο δείγμα, που είναι γνωστό ότι δεν εκφράζουν το συγκεκριμένο αντιγόνο μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν αρνητικά controls και για τον προσδιορισμό του ορίου θετικού-αρνητικού καθώς και το βαθμό αυτοφθορισμού. Στα δείγματα ανοσοφαινότυπου λευχαιμίας / λεμφώματος τα εσωτερικά controls μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ταυτοποιηθούν εναπομείναντα φυσιολογικά κύτταρα μέσα στο δείγμα, να βοηθήσουν για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, να ταυτοποιήσουν φυσιολογικά έναντι παθολογικών δειγμάτων, και να διασφαλίσουν την λειτουργία των αντιδραστηρίων. Θα ήταν καλό να χρησιμοποιείται ο ίδιος κυτταρικός τύπος σαν κύτταρο στόχος για τα εσωτερικά controls, διότι ορισμένοι κυτταρικοί τύποι έχουν υψηλό αυτοφθορισμό (μονοκύτταρα, κοκκιοκύτταρα). Παράδειγμα αρνητικού πληθυσμού είναι τα Β λεμφοκύτταρα για το CD3 και τα Τ λεμφοκύτταρα για το CD19. Σχετικό SOP μπορεί να τεκμηριώσει την αναμενόμενη χρήση των εσωτερικών controls.

Εξωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

Απαιτείται η συμμετοχή σε κατάλληλο Φορέα Διεργαστηριακών Σχημάτων με τουλάχιστον 2 δείγματα, κατά έτος, όπου και όπως διατίθεται.

## 7. ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

Ο εξοπλισμός του κυτταρολογικού εργαστηρίου δεν απαιτεί βαθμονόμηση. Το σύνολο των προαναλυτικών διαδικασιών που αφορούν στη χρώση των πλακιδίων πρέπει να επαληθεύεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα με χρήση δειγμάτων ελέγχου.

Ο ιατρός Κυτταρολόγος πρέπει κατά την έκδοση του πορίσματος να συσχετίζει τα κλινικά με τα μικροσκοπικά ευρήματα και να ακολουθεί ένα εθνικά παραδεκτό σύστημα ταξινόμησης των κυτταρολογικών αποτελεσμάτων (διαγνωστική ορολογία). Η χρησιμοποιούμενη διαγνωστική ορολογία πρέπει να είναι σύμφωνη με την τρέχουσα διεθνή βιβλιογραφία, τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ελληνικής Εταιρείας Κλινικής και Μοριακής Κυτταρολογίας, της

Επιτροπής Ποιότητας του Υπουργείου Υγείας και των Διεθνών Επιστημονικών Εταιρειών (π.χ. College of American Pathologists).

Το εργαστήριο πρέπει να τηρεί και να εφαρμόζει κριτήρια καταλληλότητας των δειγμάτων, σύμφωνα με την τρέχουσα διεθνή βιβλιογραφία, τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ελληνικής Εταιρείας Κλινικής και Μοριακής Κυτταρολογίας, της Επιτροπής Ποιότητας του Υπουργείου Υγείας και των Διεθνών Επιστημονικών Εταιρειών (π.χ. College of American Pathologists).

Το ποσοστό των ανεπαρκών ή μη διαγνωστικών δειγμάτων, πρέπει να παρακολουθείται με σκοπό να γίνεται περιοδική ανατροφοδότηση του προσωπικού – εξωτερικών συνεργατών που είναι εξουσιοδοτημένοι να εκτελούν τις δειγματοληψίες.

Προηγούμενα κυτταρολογικά δείγματα από ασθενείς με παθολογικά ευρήματα πρέπει να ανασκοπούνται. Σε περίπτωση απόκλισης- διαφωνίας με προηγούμενη κυτταρολογική διάγνωση από το εργαστήριο, θα πρέπει να γίνεται ανασκόπηση των προηγούμενων κυτταρολογικών και ιστολογικών αποτελεσμάτων.

Το εργαστήριο πρέπει να ορίσει κριτήρια ανασκόπησης κυτταρολογικών περιστατικών (τα οποία μπορούν να αποτελούν επικουρικούς δείκτες ποιότητας του παραγόμενου διαγνωστικού έργου). Τα κριτήρια πρέπει να είναι σύμφωνα με την τρέχουσα ελληνική και διεθνή βιβλιογραφία και τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ελληνικής Εταιρείας Κλινικής και Μοριακής Κυτταρολογίας, της Επιτροπής Ποιότητας του Υπουργείου Υγείας και των Διεθνών Επιστημονικών Εταιρειών (π.χ. College of American Pathologists).

Πρέπει να γίνεται καταγραφή του όγκου διαγνωστικού έργου που φέρει σε πέρας κάθε ιατρός Κυτταρολόγος. Το εργαστήριο πρέπει να επιβάλλει όρια διαγνωστικού έργου που πρέπει να φέρει σε πέρας κάθε διαγνώστης ιατρός. Τα όρια διαγνωστικού έργου ποικίλουν ανά είδος εξέτασης και πρέπει να συμφωνούν με τα προτεινόμενα από την τρέχουσα διεθνή βιβλιογραφία, τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ελληνικής Εταιρείας Κλινικής και Μοριακής Κυτταρολογίας, της Επιτροπής Ποιότητας του Υπουργείου Υγείας και των Διεθνών Επιστημονικών Εταιρειών (π.χ. College of American Pathologists).

Όλες οι κυτταρολογικές απαντήσεις πρέπει να εκδίδονται μέσα σε εύλογο χρονικό διάστημα που δεν θα θέτει σε καμία περίπτωση σε κίνδυνο την εξέλιξη της υγείας του ασθενούς. Το εργαστήριο πρέπει να διαθέτει και να εφαρμόζει διαδικασίες παρακολούθησης του χρόνου μεταξύ εξέτασης και έκδοσης αποτελέσματος (turn around times).

Το κυτταρολογικό πόρισμα θα πρέπει να συντάσσεται σύμφωνα με τις απαιτήσεις που προκύπτουν από τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ελληνικής Εταιρείας Κλινικής και Μοριακής Κυτταρολογίας, της Επιτροπής Ποιότητας του Υπουργείου Υγείας και των Διεθνών Επιστημονικών Εταιρειών (π.χ. College of American Pathologists) και πρέπει να περιλαμβάνει οπωσδήποτε τα εξής:
α) Περιγραφή-Έκθεση των κυτταρολογικών ευρημάτων και επάρκειας υλικού
β) Συμπέρασμα
γ) Σχόλια-Συστάσεις (όταν κρίνεται απαραίτητο)

Όλα τα παραπεμπτικά σημειώματα πρέπει να διατηρούνται σε έντυπη ή ηλεκτρονική μορφή για εύλογο χρονικό διάστημα ανάλογο της κλινικής σημασίας της εξέτασης και οπωσδήποτε όχι μικρότερο του 1 έτους. Επιπλέον θα πρέπει να φυλάσσονται οι απαντήσεις (διαγνώσεις) που δόθηκαν στους ενδιαφερόμενους. Αυτό μπορεί να γίνεται σε έντυπη ή ηλεκτρονική μορφή. Αυτό το αρχείο δεν καταστρέφεται ποτέ. Όλα τα πλακίδια θα πρέπει να διατηρούνται σε ειδικές αρχειοθήκες για εύλογο χρονικό διάστημα ανάλογο της κλινικής σημασίας της εξέτασης και οπωσδήποτε όχι μικρότερο των 3 ετών.

Για ειδικούς τύπους δειγμάτων μπορεί να τηρούνται ιδιαίτερες προδιαγραφές αρχειοθέτησης. Συνολικά η αρχειοθέτηση πρέπει να είναι σύμφωνη με την ισχύουσα εθνική και κοινοτική νομοθεσία και τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ελληνικής Εταιρείας Κλινικής και Μοριακής Κυτταρολογίας, της Επιτροπής Ποιότητας του Υπουργείου Υγείας και των Διεθνών Επιστημονικών Εταιρειών (π.χ. College of American Pathologists).

### 7.1 Επαλήθευση

Η διαγνωστική επαλήθευση των αποτελεσμάτων των κυτταρολογικών δοκιμών γίνεται με προσδιορισμό ειδικών στατιστικών δεικτών.

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- Positive Predictive Value (PPV), και της Προγνωστικής Αξίας των Αρνητικών αποτελεσμάτων- Negative Predictive Value (NPV) της κυτταρολογικής εξέτασης 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' όψη και οι κατευθυντήριες οδηγίες των εγκύρων διεθνών επιστημονικών εταιρειών.

### 7.2 Εκτίμηση της Αβεβαιότητας

Οι κυτταρολογικές δοκιμές ανήκουν στην κατηγορία εκείνων των δοκιμών, που δεν μπορούν να συμπεριλάβουν αυστηρούς μετρολογικούς και στατιστικούς υπολογισμούς της αβεβαιότητας. Οι κυτταρολογικές δοκιμές είναι ποιοτικές δοκιμές, οι οποίες δύνανται σε πολλές περιπτώσεις να μετατραπούν σε ημι-ποσοτικές προς χάρη στατιστικής εκμετάλλευσης των εξαγόμενων αποτελεσμάτων.

### 7.3 Διασφάλιση Ποιότητας

Εσωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

Τα εργαστήρια πρέπει να παρακολουθούν την επίδοσή τους, συνολικά, αλλά και του κάθε Ιατρού Κυτταρολόγου ξεχωριστά. Η εφαρμογή μέτρων εσωτερικού ελέγχου ποιότητας είναι απαραίτητη και προτείνεται η χρήση ενός ή περισσοτέρων από τα παρακάτω:

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

γ) Μηχανικός επανέλεγχος κυτταρολογικών δειγμάτων από ειδικούς σαρωτές (imagers). (μέτρηση διαπαρατηρητικής και ενδοπαρατηρητικής συμφωνίας – κ στατιστική παράμετρος).

δ) Στοχευμένος επανέλεγχος κυτταρολογικών δειγμάτων με παθολογική διάγνωση ή με διάγνωση ατυπίας: (μέτρηση διαπαρατηρητικής και ενδοπαρατηρητικής συμφωνίας – κ στατιστική παράμετρος).

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

στ) Σύγκριση της κυτταρολογικής διάγνωσης με τα αποτελέσματα λοιπών βοηθητικών διαγνωστικών τεχνικών, όπως ηλεκτρονική μικροσκόπηση, ανοσοκυτταροχημεία, μοριακή κυτταρολογία, ανάλυση εικόνας, κυτταρομετρία ροής, κυτταρογενετικές εξετάσεις.

ζ) Χρήση ειδικών στατιστικών δεικτών με σκοπό την παρακολούθηση της γενικής επίδοσης του εργαστηρίου. Ενδεικτικά αναφέρονται το ποσοστό των μη διαγνωστικών δειγμάτων, η περιοδική ανασκόπηση της ποιότητας των χρησιμοποιούμενων χρώσεων, η καταγραφή του χρόνου TAT, το ποσοστό θετικών δειγμάτων, το ποσοστό δειγμάτων ASCUS, ASC-H και HSIL, ο δείκτης ASC/SIL. Επίσης, λαμβάνονται υπ' όψη και οι κατευθυντήριες οδηγίες των εγκύρων διεθνών επιστημονικών εταιρειών.

<u>Εξωτερικός Έλεγχος Ποιότητας</u>

Ο εξωτερικός έλεγχος ποιότητας των κυτταρολογικών εξετάσεων επιτυγχάνεται μέσω συγκριτικών δοκιμών ικανότητας. Τα προγράμματα συγκριτικών δοκιμών ικανότητας πρέπει κατά το δυνατόν να ελέγχουν το σύνολο των προαναλυτικών, αναλυτικών και μετα-αναλυτικών διαδικασιών και να μην αφορούν αποκλειστικά στην επιβεβαίωση της κυτταρολογικής διάγνωσης. Τα δείγματα που χρησιμοποιούνται για εξωτερικό έλεγχο ποιότητας πρέπει κατά το δυνατόν να μιμούνται τα δείγματα ρουτίνας ως προς τον τρόπο εισαγωγής, εξέτασης και διάγνωσής τους από το εργαστήριο.

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 ή 5ετίας.

Τα εργαστήρια πρέπει να παρακολουθούν την επίδοσή τους, συνολικά, αλλά και του κάθε Ιατρού Κυτταρολόγου ξεχωριστά. Η εφαρμογή μέτρων εξωτερικού ελέγχου ποιότητας είναι απαραίτητη και προτείνεται η χρήση ενός ή περισσοτέρων από τα παρακάτω:

α) Συμμετοχή σε πρόγραμμα διεργαστηριακών δοκιμών (μέτρηση διαπαρατηρητικής και ενδοπαρατηρητικής συμφωνίας – κ στατιστική παράμετρος). Το πρόγραμμα διεργαστηριακών δοκιμών πρέπει κατά το δυνατόν να είναι διαπιστευμένο κατά EN ISO 17043.

β) Συμμετοχή σε πρόγραμμα περιοδικής ανταλλαγής πλακιδίων με άλλα κυτταρολογικά εργαστήρια (μέτρηση διαπαρατηρητικής και ενδοπαρατηρητικής συμφωνίας – κ στατιστική παράμετρος).

γ) Συμμετοχή σε πρόγραμμα περιοδικής εξέτασης πρότυπων δειγμάτων από αρχείο Εργαστηρίων Αναφοράς ή Επιστημονικών Εταιρειών (μέτρηση διαπαρατηρητικής και ενδοπαρατηρητικής συμφωνίας – κ στατιστική παράμετρος).

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

## 8. ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

Οι παθολογοανατομικές δοκιμές διακρίνονται αδρά σε τρεις κατηγορίες:

1. Ιστοπαθολογική (μορφολογική) διάγνωση
2. Επικουρικές διαγνωστικές δοκιμές (ανοσοϊστοχημικές και ιστοχημικές δοκιμές)
3. Δοκιμές με Προβλεπτική Σημασία (ανοσοϊστοχημικές και μοριακές δοκιμές)

### 8.1 Ιστοπαθολογική διάγνωση

Η ιστοπαθολογική διάγνωση αποτελεί ποιοτική δοκιμή και βασίζεται στην εκτίμηση, με βάση την εκπαίδευση και εμπειρία του παθολογοανατόμου, των μορφολογικών αλλοιώσεων ιστών και κυττάρων σε επίπεδο οπτικού μικροσκοπίου.

Το διαγνωστικό υλικό επί του οποίου εφαρμόζεται η δοκιμή είναι ιστολογικές τομές επιστρωμένες σε πλακίδια (slides) και χρωσμένες με την βασική χρώση της αιματοξυλίνης–ηωσίνης (H&E). Οι τομές αυτές παράγονται κατά τη μικροτόμηση (sectioning) κύβων παραφίνης (blocks) που περιέχουν εγκλεισμένο (embedded) ιστό που προέρχεται από τη δειγματοληψία που διενεργείται κατά τη διάρκεια της μακροσκοπικής προπαρασκευής (Grossing) των ιστολογικών δειγμάτων (συνήθως βιοψίες και χειρουργικές εκτομές). Των παραπάνω διαδικασιών προηγούνται οι προ αναλυτικοί χειρισμοί και η επεξεργασία (processing) των ιστών προκειμένου να επιτευχθεί η σταθεροποίηση / μονιμοποίηση (fixation) τους και να σταματήσουν οι αυτολυτικές διεργασίες που ξεκινούν άμεσα μετά τη διακοπή της αιματικής κυκλοφορίας.

Η μέθοδος της επεξεργασίας των ιστών αποτελεί κρίσιμη διαδικασία που επηρεάζει, σε άλλοτε άλλο βαθμό, όλες τις κατηγορίες των παθολογοανατομικών και μοριακών δοκιμών που εκτελούνται σε ιστολογικά δείγματα.

Σήμανση των προϊόντων προπαρασκευής του ιστολογικού υλικού (κύβοι παραφίνης και ιστολογικά πλακίδια) (Blocks και Slides): Η τυποποιημένη, παραμετροποιημένη, και ασφαλής σήμανση των κύβων παραφίνης και των ιστολογικών πλακιδίων προάγει την ασφάλεια, διασφαλίζοντας πως όλα τα παράγωγα προϊόντα από τους ιστούς των ασθενών, ταυτοποιούνται με μοναδικό τρόπο και συνδέονται με συγκεκριμένο ασθενή. Το Κολλέγιο Αμερικανών Παθολογοανατόμων έχει δημοσιεύσει σχετική κατευθυντήρια οδηγία η οποία και πρέπει να αποτελεί οδηγό για τη συγκεκριμένη διαδικασία.

<u>Προ-Αναλυτικές παράμετροι</u>

Το Κολλέγιο Αμερικανών Παθολογοανατόμων έχει δημοσιεύσει σχετικές συστάσεις που αφορούν τις ενδεδειγμένες πρακτικές προκειμένου να διασφαλίζεται η μοριακή ακεραιότητα των δειγμάτων καρκίνου που πρόκειται να υποβληθούν σε μοριακό έλεγχο με σκοπό την εφαρμογή θεραπευτικών χειρισμών εξατομικευμένης ιατρικής.

Η πιστή τήρηση κατά την εφαρμογή και η καταγραφή των αποκλίσεων ως προς τις προ αναλυτικές παραμέτρους, όπως αυτές περιγράφονται για τους ιστούς, αποτελεί προ απαιτούμενο ποιότητας ολόκληρου του φάσματος των παθολογοανατομικών δοκιμών.

**8.2 Ανοσοϊστοχημικές δοκιμές**

**8.2.1 Επικύρωση / Επαλήθευση**

Η επιλογή επικύρωσης ή επαλήθευσης καθορίζεται από την κατηγοριοποίηση της ανοσοϊστοχημικής δοκιμής (Τύπος I Class I ή Τύπος II Class III κατά IVD) όπως αυτά προσδιορίζονται μέσα από τις οδηγίες χρήσης (instructions for use IFU) που διαχωρίζουν τις δοκιμές σε:

1. Τύπος I = CE-IVD με απαρέγκλιτη εφαρμογή των IFU's = Επαλήθευση
2. Τύπος II = CE-IVD με παρέκκλιση από οδηγίες χρήσης ή μη CE-IVD δοκιμή (LDT / RUO) = Επικύρωση

Η διαδικασία της επικύρωσης / επαλήθευσης εκτελείται υποχρεωτικά για κάθε μια δοκιμή που αναφέρεται στο Ε.Π.Ε.Δ. του εργαστηρίου πριν από την εισαγωγή των δοκιμών στην κλινική πράξη. Συνιστάται η κατάρτιση καταλόγου των διαπιστευμένων δοκιμών όπου κατ' ελάχιστο για κάθε μία θα περιγράφεται: 1. Το αντίσωμα και ο κλώνος, 2. Το υλικό αναφοράς, 3. Η/Οι σκοπούμενη/ες χρήση/εις.

Οι οδηγίες χρήσης των ανοσοΪστοχημικών δοκιμών πρέπει να περιλαμβάνουν τις ακόλουθες πληροφορίες:
- Προσδιορισμό του τύπου/ων δείγματος και σκοπούμενη χρήση της δοκιμής
- Σαφείς οδηγίες για:
    - Αποπαραφίνωση
    - Αποκάλυψη αντιγόνου (Pretreatment)
    - Αραίωση πρωτοταγούς αντισώματος (Dilution of Ab)
    - Χρόνοι επώασης αντισώματος (Incubation times Ab)
    - Σύστημα ανίχνευσης (Detection system)
    - Σύστημα ενίσχυσης (Enhancing step (linker))
    - Πλατφόρμα (συσκευή) εφαρμογής
    - Προγραμματισμένο (κλειδωμένο) πρωτόκολλο ή μέθοδος με πλήρη περιγραφή του πρωτοκόλλου εφαρμογής (Preprogrammed or full description of method)

Αντικειμενικά κριτήρια: Απαιτείται να επιδειχθούν και να καταγραφούν. Τα δεδομένα από την συγκριτική εκτίμηση των δειγμάτων της επικύρωσης / επαλήθευσης με τα δείγματα αναφοράς να μπορούν να ιχνηλατηθούν σε σχέση με χρώση, προκαθορισμένα χαρακτηριστικά επίδοσης και κριτήρια αποδοχής.

Χαρακτηριστικά επίδοσης (Performance characteristics): Προκειμένου να επιδειχθούν ή να επιβεβαιωθούν τα χαρακτηριστικά επίδοσης απαιτείται η σύγκριση της νέας δοκιμής με ένα συγκρίσιμο μέγεθος (comparator) ή σημείο αναφοράς/πρότυπο (reference/standard).

Στην ανοσοϊστοχημεία δεν έχουμε πρόσβαση σε πρότυπα υλικά βαθμονόμησης. Εκείνο στο οποίο έχουμε πρόσβαση είναι ιστοί. Ως εκ τούτου και σε σχέση με την επιλογή προτύπου αναφοράς θα πρέπει να αποφασίσουμε, για κάθε δοκιμή (αντίσωμα), με βάση τη διεθνή

βιβλιογραφία και/ή τυποποιημένους καταλόγους υλικών αναφοράς που υπάρχουν στις ιστοσελίδες των σχημάτων εξωτερικού ελέγχου ποιότητας, τι είδος ιστού θα χρησιμοποιήσουμε, ποια κύτταρα πρέπει να είναι θετικά, σε ποια ένταση χρώσης και σε ποιο αριθμό. Παραδειγματικά υλικά αναφοράς μπορούν να αποτελέσουν:

- Τύποι δειγμάτων με γνωστή μορφολογία και αντιγονική έκφραση (π.χ. iCAPS)
- Επιβεβαιωμένα δείγματα ιστών ή μάρτυρες (controls) χρωσμένα με ήδη επικυρωμένη ή επαληθευμένη μέθοδο (ενδο-εργαστηριακά ή σε άλλο εργαστήριο)
- Ιστοί με αναφορές στις οδηγίες χρήσης της δοκιμής που να αφορούν σε πρότυπα χρώσης, επίδοση κ.λ.π.
- Κυτταρικές σειρές με προ τυποποιημένη έκφραση χρώσης
- Δείγματα Εξωτερικού ελέγχου ποιότητας (EQA)

Α. Ακρίβεια (Accuracy) = Ορθότητα (Trueness) και Συνολική ακρίβεια (Precision)

Ορθότητα:
- Σύγκριση με γνωστά αποτελέσματα επικυρωμένων δοκιμών (δείγματα αναφοράς, δείγματα από επικυρωμένες δοκιμές (ενδο-εργαστηριακά ή σε άλλο εργαστήριο)
- Σύγκριση με άλλη επικυρωμένη δοκιμή (πχ in situ υβριδισμό, PCR), άλλη επικυρωμένη πλατφόρμα ή αντιδραστήρια άλλου κατασκευαστή
- Τριτοβάθμια σύγκριση - Δείγματα Εξωτερικού ελέγχου ποιότητας (EQA) ή Δι-εργαστηριακά
- Πληθυσμιακή μελέτη

Συνολική ακρίβεια (Precision)
- Επαναληψιμότητα: μέσα σε ομάδα δοκιμών (intra run).
- Ενδιάμεση ακρίβεια: ανάμεσα σε ομάδα δοκιμών.

Εφόσον χρησιμοποιούνται περισσότερες από μια πλατφόρμες (συσκευές) η συνολική ακρίβεια θα πρέπει να προσδιορισθεί για κάθε μία ξεχωριστά.

Β. Ευαισθησία (Sensitivity): Διαχωρίζεται σε:
- Αναλυτική (η δυνατότητα της δοκιμής να ανιχνεύει μικρές ποσότητες αντιγόνου (προσδιορίζει και το εύρος αραίωσης για το όριο ανίχνευσης)).
- Διαγνωστική: Εκτίμηση αληθούς θετικής (TP) χρώσης έναντι ψευδώς αρνητικής (FN) χρώσης. Ορίζεται ως Ευαισθησία: TP/(TP+FN).

Γ. Ειδικότητα (Specificity):
- Αναλυτική (η δυνατότητα της δοκιμής να ανιχνεύει το αντιγόνο χωρίς να επηρεάζεται από διασταυρούμενες αντιδράσεις).
- Διαγνωστική: Εκτίμηση αληθούς αρνητικής (TN) χρώσης έναντι ψευδώς θετικής (FP) χρώσης. Ορίζεται ως Ειδικότητα: TN/(TN+FP).

Δ. Συνολική συμφωνία (Overall concordance):
- Αναλυτική (Ο βαθμός συμφωνίας της νέας δοκιμής και της δοκιμής αναφοράς ± = Ορθότητα).
- Διαγνωστική: Εκτίμηση αληθούς θετικής και αρνητικής χρώσης έναντι του συνόλου των αληθώς και ψευδώς θετικών και αρνητικών χρώσεων. Ορίζεται ως Concordance: TP+TN/(TP+TN+FP+FN).

Ε. Αναπαραγωγιμότητα (Reproducibility)

ΣΤ. Στιβαρότητα (Robustness): Παράμετροι που επηρεάζουν το αναλυτικό αποτέλεσμα:
- Προ-αναλυτικοί: (Χρόνος ψυχρής ισχαιμίας – Χρόνος Μονιμοποίησης Πάχος τομής).

- Μετα-αναλυτικοί: (Σταθερότητα αντιγόνου - χρόνος και τρόπος αποθήκευσης τομών - χρόνος διατήρησης αραιωμένου αντισώματος / Άλλοι: (Αφαλάτωση)).

Ζ. Αξιολόγηση αποτελέσματος (Διάβασμα/Readout) από παθολογοανατόμο (αρχική επικύρωση/επαλήθευση):
- Εκπαίδευση: Παθολογοανατόμου στη χρήση συστήματος διαβάθμισης (από ειδικούς εφαρμογής δοκιμής του κατασκευαστή/προμηθευτή, από επαγγελματικούς/εκπαιδευτικούς οργανισμούς)
- Αξιολόγηση νέας δοκιμής από περισσότερους του ενός παθολογοανατόμους και σε σχέση με αναμενόμενα αποτελέσματα και γνωστά περιστατικά ή μάρτυρες που:
- Επικυρώθηκαν από ειδικούς εφαρμογής, ομάδα ειδικών
- Προσδιορισμός διαγνωστικής ευαισθησίας και ειδικότητας για τον κάθε παθολογοανατόμο
- Σύγκριση των αποτελεσμάτων των παθολογοανατόμων και αξιολόγηση έναντι διαμορφωμένων κριτηρίων αποδοχής (π.χ. 90% συμφωνία – ποσοστό εξαρτώμενο από τον αριθμό δειγμάτων επικύρωσης / επαλήθευσης)
- Βελτιστοποίηση της συμφωνίας ανάμεσα σε παρατηρητές στα πλαίσια: Εσωτερικού ελέγχου ποιότητας (IQC) και Εξωτερικού ελέγχου ποιότητας (EQC).

Η. Ποιότητα χρώσης: Απαιτείται η κατάρτιση ή υιοθέτηση συστήματος βαθμολογίας ως προς ενδεικτικά, ένταση χρώσης, ομοιομορφία, ειδικότητα, απουσία υποστρωματικής χρώσης, αντίχρωσης. Ιδιαίτερα για δοκιμές με προβλεπτική αξία όπου συγκεκριμένα χαρακτηριστικά χρώσης συνδέονται με ουδό/κατώφλι θετικότητας αυτό θα πρέπει να προσδιορίζεται και να βαθμολογείται ανάλογα (*Με τη διαδικασία αυτή αξιολογείται η «βασική» αναλυτική ειδικότητα και ευαισθησία).

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά επίδοσης που αξιολογούνται κατά την επαλήθευση ή επικύρωση

| | **Επαλήθευση** | **Επικύρωση** | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Χαρακτηριστικά επίδοσης** | **CE-IVD δοκιμή** | **LDT - "Off label με αναφορές σε οδηγίες"** | **LDT - "Off label χωρίς αναφορές σε οδηγίες"** | **LDT -RUO με αναφορές σε οδηγίες** | **LDT - ανεπτυγμένο στο εργαστήριο** |
| **Ακρίβεια /Ορθότητα** | x | x | x | x | x |
| **Συνολική ακρίβεια** | x | x | x | x | x |
| **Ευαισθησία** | | | x | x | x |
| **Ειδικότητα** | | | x | x | x |
| **Στιβαρότητα** | x* | x* | x* | x* | x* |
| **Ποιότητα Χρώσης** | x | x | x | x | x |
| **Συμφωνία ανάμεσα σε παθολογοανατόμους** | (x) | (x) | (x) | (x) | (x) |

Είδη δειγμάτων που χρησιμοποιούνται κατά την επικύρωση / επαλήθευση:

- Υλικά σχετιζόμενα με σκοπούμενη χρήση της δοκιμής (οδηγίες χρήσης)
- Μάρτυρες (προτιμώνται οι παρασκευασμένοι εντός του εργαστηρίου)
- Τομές από ήδη αξιολογημένα δείγματα
- Τομές από δείγματα με διαφορετικά επίπεδα έκφρασης (υψηλή, χαμηλή) και διαφορετικά είδη ιστών
- Όλα τα δείγματα θα πρέπει να έχουν προπαρασκευασθεί όπως και τα υλικά ρουτίνας του εργαστηρίου

Πίνακας 2. Αριθμός δειγμάτων που χρησιμοποιούνται κατά την επικύρωση / επαλήθευση

| **Τύπος δοκιμής** | **Μη προβλεπτική** | **Προβλεπτική** | **Κριτήρια** |
|---|---|---|---|
| CE/IVD με επακριβή τήρηση οδηγιών χρήσης (έκαστο αντίσωμα) | 10 (+) & 10 (-)<br>-ή -<br>Επιλογή αριθμού με αιτιολογημένη ευθύνη επιστημονικού Δντή | >20 (+) & 20 (-)<br>Να περιλαμβάνονται διαφορετικά επίπεδα έκφρασης<br>Κατευθυντήριες οδηγίες για ER/PR/HER-2 ή άλλους προβλεπτικούς βιοδείκτες | Accuracy<br>Precision<br>Reportable range<br>Overall concordance >90% |
| CE/IVD με τροποποιήσεις οδηγιών χρήσης, Μη CE/IVD (LDT, RUO) | 10 (+) & 10 (-)<br>-ή -<br>Επιλογή αριθμού με αιτιολογημένη ευθύνη επιστημονικού Δντή | ER/PR/HER-2 :<br>>40 (+) & 40 (-)<br>Άλλα :<br>20 (+) & 20 (-) | Accuracy<br>Precision<br>Analytic sensitivity<br>Analytic specificity |

Επανάληψη της επικύρωσης / επαλήθευσης εξαιτίας τροποποιήσεων της δοκιμής:

1. Τροποποιήσεις σχετιζόμενες με συγκεκριμένο αντίσωμα. Εύρος επαλήθευσης / επικύρωσης:

- Νέο Lot αντισώματος: Η επαλήθευση των αποτελεσμάτων επιτυγχάνεται με «τρέξιμο» ενός γνωστού θετικού και ενός γνωστού αρνητικού δείγματος.
- Αλλαγές σε: Αραίωση αντισώματος, Νέος προμηθευτής (Ίδιος κλώνος αντισώματος), Αλλαγές σε χρόνο επώασης αντισώματος ή χρόνο ανάκτησης αντιγόνου (ίδια μέθοδος ανάκτησης αντιγόνου): Η επαλήθευση των αποτελεσμάτων επιτυγχάνεται με «τρέξιμο» δύο γνωστών θετικών και δύο γνωστών αρνητικών δειγμάτων. Στις δύο παραπάνω περιπτώσεις συνιστάται το τρέξιμο επιπλέον δείγματος για την κατάδειξη του κατώτερου εύρους ευαισθησίας.
- Νέος κλώνος αντισώματος: Εκ νέου πλήρης διαδικασία επαλήθευσης / επικύρωσης.

2. Τροποποιήσεις που αφορούν στο σύνολο των αντισωμάτων:

- Τύπος μονιμοποιητικού
- Μέθοδος ανάκτησης αντιγόνου: Αλλαγές στο pH, Αλλαγές στον τύπο ρυθμιστικού διαλύματος (buffer), Αλλαγές στον τύπο θέρμανσης
- Αλλαγές σε σύστημα ανίχνευσης αντιγόνου
- Αλλαγές σε συσκευές προπαρασκευής ιστών (ιστοκινέτες)
- Αλλαγές σε περιβαλλοντικές συνθήκες: Μετακίνηση εργαστηρίου σε άλλο χώρο, Αλλαγή παροχής νερού.

Επιλογή αντιπροσωπευτικού αριθμού δοκιμών που τρέχουν στο εργαστήριο και σύγκριση ανάμεσα σε δείγματα που «έτρεξαν» μετά τις τροποποιήσεις με δείγματα που «έτρεξαν» με τις πρωτότυπες συνθήκες.

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

### 8.2.2 Εκτίμηση της Αβεβαιότητας

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

### 8.3 Διασφάλιση Ποιότητας

Εσωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

Ιστολογική εξέταση

Προ-αναλυτικό στάδιο, ελέγχονται:

- Κατάσταση δειγμάτων (πχ. ακατάλληλα ή μη συμμορφούμενα δείγματα).
- Τήρηση Προ αναλυτικών παραμέτρων επεξεργασίας των ιστών. Καταγραφή χρόνου ψυχρής ισχαιμίας (εφόσον υπάρχει η πληροφορία), είδος μονιμοποιητικού, συνολικός χρόνος μονιμοποίησης, πάχος τομής, συνθήκες αποθήκευσης blocks.
- Πληρότητα συνοδών εγγράφων (πχ παραπεμπτικού σημειώματος, επάρκεια στοιχείων ταυτοποίησης).
- Ορθότητα καταχώρησης δείγματος στο μητρώο του εργαστηρίου (ηλεκτρονικό LIS σύστημα με πιστοποίηση κατά ISO 27001, προτιμώμενο) και απόδοση μοναδικού αναγνωριστικού.

Εφαρμόζεται διαχείριση επικινδυνότητας στα παραπάνω και καταγραφή των ενεργειών σε περίπτωση απόκλισης από τις προβλεπόμενες διαδικασίες.

Αναλυτικό Στάδιο

Οι εσωτερικοί έλεγχοι ποιότητας των ιστολογικών δοκιμών διενεργούνται σύμφωνα με τις περιγραφές θέσεων εργασίας και τα εγχειρίδια λειτουργίας των τμημάτων με σκοπό τη διασφάλιση της ορθής εκτέλεσης των δοκιμών. Ο αριθμός και η συχνότητα των ανασκοπούμενων δοκιμών ανά κατηγορία ελέγχου προσδιορίζεται ως ποσοστό του συνολικού αριθμού των δοκιμών που διενεργούνται στο εργαστήριο. Οι ανασκοπήσεις δοκιμών χωρίζονται ενδεικτικά στις παρακάτω κατηγορίες:

Α. Ανασκόπηση Δι-εγχειρητικής Διαβούλευσης (Ταχείας Βιοψίας): Οι περιπτώσεις ταχειών βιοψιών ανασκοπούνται σε προκαθορισμένα διαστήματα από τον Επιστημονικό Υπεύθυνο και αξιολογούνται ως προς τη συμφωνία με την τελική διάγνωση (επί μονίμων τομών) και σε σύγκριση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα.

Β. Τυχαιοποιημένη Ανασκόπηση Ιστολογικών Περιστατικών: Τα ιστολογικά περιστατικά ανασκοπούνται σε προκαθορισμένα διαστήματα ως προς τα εξής κριτήρια:

- Κλινικό ιστορικό
- Μακροσκοπική περιγραφή
- Φωτογραφίες μακροσκοπικού (εφόσον υπάρχουν)
- Δειγματοληψία
- Ποιότητα ιστολογικών πλακιδίων (σήμανση, χρώση H&E, κάλυψη)
- Ορθότητα ιστολογικής διάγνωσης
- Σημειώσεις (εφόσον υπάρχουν)
- Κρίσιμα δεδομένα (για νεοπλάσματα με βάση CAP)
- Ειδική επεξεργασία (εφόσον υπάρχει)
- Χρόνο διεκπεραίωσης

Γ. Ανασκόπηση με βάση Κλινικούς Δείκτες: Ο εντεταλμένος υπεύθυνος προσδιορίζει το είδος του δείγματος ή το νόσημα που θα μελετηθεί. Η επιλογή για παράδειγμα μπορεί να αφορά:

- Είδος ιστολογικού δείγματος ανεξαρτήτως διάγνωσης (π.χ. Μαστός)
- Συγκεκριμένη νοσολογική οντότητα (π.χ. Καρκίνωμα του παχέος εντέρου)

Κατά τη διαδικασία ανασύρονται σε προκαθορισμένα διαστήματα από το αρχείο τα πορίσματα από όλα τα συνεχόμενα περιστατικά που αντιστοιχούν στο υπό μελέτη είδος δείγματος / νοσολογική οντότητα. Τα πορίσματα αξιολογούνται ως προς την πληρότητα, ακρίβεια και συνέπεια συγκρινόμενα με μια προκαθορισμένη λίστα απαιτούμενων δεδομένων (πχ πρότυπο πορίσματος Κολλεγίου Αμερικανών Παθολογοανατόμων CAP).

Δ. Μέτρηση διαπαρατηρητικής και ενδοπαρατηρητικής συμφωνίας: Ανασκόπηση αντιπροσωπευτικού ποσοστού δειγμάτων ( υπολογισμός – κ στατιστικής παραμέτρου).

Ε. Εφαρμογή τακτικών κλινικο-παθολογοανατομικών συζητήσεων είτε στα πλαίσια προκαθορισμένης περιοδικής συνάντησης ομάδας πολλαπλών ειδικοτήτων (MDT) είτε στα πλαίσια των ογκολογικών συμβουλίων (Tumor Boards) όπου παρουσιάζονται, συζητούνται, αναλύονται κριτικά και συσχετίζονται τα κλινικά, και απεικονιστικά, ευρήματα με τα αντίστοιχα παθολογοανατομικά και άλλα μικροσκοπικά δεδομένα. Τα συμπεράσματα καταγράφονται και καταχωρούνται ως αποδεικτικά εσωτερικού ελέγχου.

Σε κάθε περίπτωση λαμβάνονται υπ’ όψη και οι κατευθυντήριες οδηγίες των εγκύρων διεθνών επιστημονικών εταιρειών.

Ανοσοϊστοχημικές δοκιμές

Στα πλαίσια του εσωτερικού ελέγχου ποιότητας και για την ανίχνευση αστοχιών στις δοκιμές ανοσοϊστοχημείας εφαρμόζεται η χρήση μαρτύρων (controls). Οι μάρτυρες αυτοί μπορεί να είναι ιστοί ή κυτταρικές σειρές και η χρήση τους έχει στόχο να διερευνά συγκεκριμένα χαρακτηριστικά επίδοσης των μεμονωμένων δοκιμών. Η επιλογή των μαρτύρων για κάθε συγκεκριμένη δοκιμή προκύπτει από την δημοσιευμένη βιβλιογραφία. Οι μάρτυρες εφαρμόζονται, ανάλογα με τις ποιοτικές απαιτήσεις, είτε σε κάθε μεμονωμένο πλακίδιο ασθενούς είτε σε πλακίδιο που «τρέχει» στα πλαίσια ομαδοποιημένων ομοειδών δοκιμών για διαφορετικούς ασθενείς. Οι μάρτυρες τρέχουν για κάθε δοκιμή σε ημερήσια βάση. Διαχωρίζονται σε θετικούς και αρνητικούς.

Ο θετικός μάρτυρας (τομή επιλεγμένου ιστού) δίνει τις εξής πληροφορίες:

Α) Εφόσον ο εξωτερικός (χωριστός από το δείγμα του ασθενούς) μάρτυρας είναι αληθώς θετικός αποτελεί ένδειξη ότι η μέθοδος δουλεύει:

- Ελέγχει την ειδική αντιδραστικότητα του πρωτοταγούς αντισώματος.
- Το εύρος των επιπέδων έκφρασης της χρώσης βοηθά στον καθορισμό της ευαισθησίας.
- Ελέγχει το σύστημα ανίχνευσης.

Β) Εφόσον είναι αρνητικός αποτελεί ένδειξη ότι τμήμα της μεθόδου αστόχησε:

- Δεν εντοπίζει ωστόσο το τμήμα που αστόχησε.

Γ) Εσωτερικός (ενσωματωμένος στην τομή από το δείγμα του ασθενούς) μάρτυρας:

- Αποτελεί ένδειξη αληθούς θετικής χρώσης.
- Αποτελεί ένδειξη ποιότητας του ιστού ως προς την τήρηση των προ αναλυτικών και των παραμέτρων αποθήκευσης των δειγμάτων.

Ο αρνητικός μάρτυρας (τομή ιστού χωρίς εφαρμογή πρωτοταγούς αντισώματος) δίνει τις εξής πληροφορίες:

Α) Αποτελεί ένδειξη της ειδικότητας του πρωτοταγούς αντισώματος (διασταυρούμενη αντιδραστικότητα).

Β) Αποτελεί ένδειξη αστοχίας του συστήματος ανίχνευσης (υποστρωματική χρώση).

Αστοχίες που εντοπίζονται στα αποτελέσματα του εσωτερικού ελέγχου ποιότητας της ανοσοϊστοχημείας καταγράφονται και ιχνηλατούνται τάσεις αστοχιών με βάση τις οποίες εφαρμόζονται διορθωτικές ενέργειες.

Εξωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

Η συμμετοχή του Εργαστηρίου σε προγράμματα συγκριτικών δοκιμών ικανότητας ως προς την ιστολογική διάγνωση θα πρέπει να γίνεται σε συχνότητα που προσδιορίζεται από το εκάστοτε πρόγραμμα διασφαλίζοντας ταυτόχρονα τη συμμετοχή όλων των παθολογοανατόμων που ασκούν διαγνωστικό έργο στο εργαστήριο.

Η συμμετοχή του Εργαστηρίου σε προγράμματα εξωτερικού ελέγχου για τις ανοσοϊστοχημικές δοκιμές θα πρέπει να γίνεται σε συχνότητα που προσδιορίζεται από το εκάστοτε πρόγραμμα διασφαλίζοντας ότι καλύπτονται όλες οι δοκιμές του πεδίου διαπίστευσης (στο σύνολό τους στην περίπτωση αρχικής αξιολόγησης ή επέκτασης και στη συνέχεια για όλες τις δοκιμές του πεδίου σε βάθος 4ετίας/5ετίας ανάλογα με τη διάρκεια ισχύος του πιστοποιητικού διαπίστευσης). Για τις ανοσοϊστοχημικές δοκιμασίες η συμμετοχή με ομαδοποίηση ομοειδών εξετάσεων (modules) προσδιορίζεται από τα διαθέσιμα σχήματα EQA.

Συνιστάται η συμμετοχή σε σχήματα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας διαπιστευμένα σύμφωνα με το πρότυπο κατά ISO:17043.

## 9. ΘΕΜΑΤΑ ΔΙΑΠΙΣΤΕΥΣΗΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ/ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

### 9.1 Λήψη Πρωτογενούς Δείγματος (Primary Sample Collection)

Νομική Οντότητα: Σύμφωνα με τις απαιτήσεις του κανονισμού ΚΑΔ του ΕΣΥΔ και του προτύπου 15189 περί νομικής οντότητας, το σημείο λήψης πρωτογενούς δείγματος πρέπει να εκπληρώνει τις νομικές απαιτήσεις. Η ομάδα αξιολόγησης σημειώνει την εκπλήρωση αυτών χωρίς να τις αξιολογεί. Σύμφωνα με τον Νόμο 4461/2017, δεν επιτρέπεται η λειτουργία χώρων διενέργειας αιμοληψιών εκτός της εγκατάστασης των ιδιωτικών διαγνωστικών εργαστηρίων βιολογικών υλικών.

Σύστημα Διαχείρισης Ποιότητας: Η διατήρηση της ακεραιότητας του δείγματος σε όλα τα στάδια συλλογής, χειρισμού, μεταφοράς στο κύριο εργαστήριο και επεξεργασίας, διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο για τη διασφάλιση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων των δοκιμών. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να διασφαλίζεται η ποιότητα στα σημεία λήψης του πρωτογενούς δείγματος.

Ως σημεία λήψης του πρωτογενούς δείγματος ορίζονται τα:

- Σημεία λήψης που ανήκουν στο Εργαστήριο ή τον μητρικό οργανισμό του και το προσωπικό είναι υπάλληλοι του εργαστηρίου (δείτε Διαπίστευση Πολλαπλών Τοποθεσιών).
- Σημεία λήψης που δεν ανήκουν στο Εργαστήριο αλλά υπάρχει σύμβαση/συμφωνία για τη συλλογή του δείγματος και την ανάλυση του στο Εργαστήριο.

Πέρα από τα παραπάνω, το εργαστήριο θα δηλώνει λεπτομέρειες για όλες τις άλλες πηγές συλλογής δειγμάτων, πχ κατ' οίκον αιμοληψίες. Το εργαστήριο θα διασφαλίζει την ακεραιότητα των δειγμάτων από αυτές τις πηγές.

Οι οδηγίες για τη σωστή συλλογή και τον χειρισμό των δειγμάτων στο σημείο λήψης πρωτογενούς δείγματος και τη μεταφορά τους στο Εργαστήριο, θα τεκμηριώνονται σε ένα εγχειρίδιο πρωτογενούς συλλογής δειγμάτων, που θα αποτελεί μέρος του συστήματος ποιότητας του Εργαστηρίου και θα είναι άμεσα διαθέσιμο στο σημείο λήψης πρωτογενούς δείγματος.

Το Εργαστήριο θα διαθέτει πολιτικές και διαδικασίες για να διασφαλίζει τη διατήρηση της σωστής υγιεινής, των περιβαλλοντικών συνθηκών και της άνεσης και ιδιωτικότητας των ασθενών στα σημεία πρωτογενούς δειγματοληψίας, τα οποία θα πρέπει να έχουν επαρκή χώρο για την αποφυγή επιμολύνσεων.

Το Εργαστήριο θα τεκμηριώνει πως δεν επηρεάζεται η ακεραιότητα των δειγμάτων κατά τη συλλογή, αποθήκευση και μεταφορά. Κατά τη μεταφορά δειγμάτων θα εξασφαλίζεται η διατήρηση της σταθερότητας της απαιτούμενης θερμοκρασίας (συνιστάται η παρακολούθηση αυτής και η καταγραφή των χρόνων μεταφοράς), και η ασφάλεια του μεταφορέα. Τονίζεται η σημασία της ακεραιότητας των ευαίσθητων στη θερμοκρασία παραμέτρων κατά τη μεταφορά των δειγμάτων. Συνιστάται η χρήση κατάλληλων περιεκτών / τσαντών μεταφοράς βιολογικού υλικού. Για τη μεταφορά των δειγμάτων Μικροβιολογίας, Παθολογικής Ανατομικής και Κυτταρολογίας θα πρέπει να ακολουθούνται οι κατευθυντήριες οδηγίες των εγκύρων διεθνών επιστημονικών εταιρειών.

Το Εργαστήριο θα διασφαλίζει πως τα σημεία λήψης πρωτογενούς δείγματος απορρίπτουν τα μολυσματικά απόβλητα σύμφωνα με την εθνική νομοθεσία.

Για τα δείγματα που χρήζουν διαχωρισμού, το Εργαστήριο θα διασφαλίζει πως το προσωπικό είναι επαρκώς και κατάλληλα εκπαιδευμένο, και πως ο απαιτούμενος εξοπλισμός είναι κατάλληλος, συντηρείται ή/και διακριβώνεται. Θα διασφαλίζεται η αξιολόγηση της εκπαίδευσης που παρέχεται στο προσωπικό στα σημεία λήψης πρωτογενούς δείγματος και θα τηρούνται τα σχετικά αρχεία.

Το Εργαστήριο θα προγραμματίζει και θα διενεργεί εσωτερικές επιθεωρήσεις των σημείων πρωτογενούς δειγματοληψίας, οι οποίες θα περιλαμβάνονται στην ετήσια ανασκόπηση από τη διοίκηση.

Αν η λήψη του πρωτογενούς δείγματος πραγματοποιείται σε πολλαπλές τοποθεσίες που ανήκουν σε μια ενιαία νομική οντότητα, αυτές οι συγκεκριμένες τοποθεσίες και η δραστηριότητα που εκτελείται σε κάθε τοποθεσία, θα αναφέρονται στο πεδίο εφαρμογής της διαπίστευσης.

### 9.2 Διαπίστευση Εργαστηρίων Πολλαπλών Τοποθεσιών (Multisite Accreditation)

Διαπίστευση πολλαπλών τοποθεσιών είναι η διαπίστευση εργαστηρίου υπό μια ενιαία νομική οντότητα για δραστηριότητες που πραγματοποιούνται σε περισσότερες από μία τοποθεσίες (δείτε τη Διαδικασία ΕΣΥΔ ΔΔΕΠΤ). Η διαδικασία ΕΣΥΔ ΔΔΕΠΤ πρέπει να έχει ενταχθεί στα έγγραφα εξωτερικής προέλευσης.

Απαραίτητη προϋπόθεση για διαπίστευση πολλαπλών τοποθεσιών είναι ότι όλα τα τμήματα του εργαστηρίου υπόκεινται σε ένα και μοναδικό σύστημα διαχείρισης ποιότητας, το οποίο πρέπει να συμμορφώνεται σε όλες τις πτυχές του με τις απαιτήσεις του προτύπου διαπίστευσης.

Εργαστήρια τα οποία διαθέτουν τμήματα σε διαφορετικές τοποθεσίες πρέπει να τεκμηριώνουν πλήρως τις σχέσεις μεταξύ των τμημάτων τους που βρίσκονται σε διαφορετικές τοποθεσίες καθώς και το βαθμό αλληλοεπικάλυψης αυτών (π.χ. κατανομή εργασιών, μεταφορά δειγμάτων μεταξύ των διαφορετικών τοποθεσιών, μετακίνηση προσωπικού και/ή εξοπλισμού, αξιολόγηση και έκδοση αποτελεσμάτων).

Τα εργαστήρια πρέπει να διασφαλίζουν και να τεκμηριώνουν την ενημέρωση των πελατών τους και των υποψηφίων πελατών τους σχετικά με το καθεστώς της διαπίστευσης τους.

### 9.3 Δοκιμές Παρά τη Κλίνη του Ασθενούς (POCT)

Ως πάροχος ορίζεται εκείνος που διενεργεί τις παρακλίνιες διαγνωστικές εξετάσεις.

Νομική Οντότητα: Πρέπει να ορίζεται με σαφήνεια ποιος έχει τη νομική ευθύνη (υπεύθυνο νομικό πρόσωπο) για τις δραστηριότητες και τα αποτελέσματα του POCT, συμπεριλαμβανομένης της ευθύνης για τη συμμόρφωση με όλες τις απαιτήσεις του προτύπου ΕΝ ISO 15189.

Το πρότυπο ΕΝ ISO 15189 εφαρμόζεται για POCT δοκιμές, όταν πραγματοποιείται σε νοσοκομείο, κλινική και από οργανισμό υγειονομικής περίθαλψης που παρέχει περιπατητική φροντίδα. Δεν προορίζεται για αυτοέλεγχο ασθενών σε οικιακό ή κοινοτικό περιβάλλον. Μόνο τα ιατρικά εργαστήρια μπορούν να διαπιστευθούν ως πάροχοι POCT.

Ρόλοι και Ευθύνες:

Σύστημα διαχείρισης ποιότητας (σύμφωνα με τις απαιτήσεις του Προτύπου ISO 15189): Ο πάροχος POCT πρέπει να διαθέτει σύστημα διαχείρισης ποιότητας που πληροί τις απαιτήσεις του Προτύπου ΕΝ ISO 15189.

Έλεγχος εγγράφων, έλεγχος εγγραφής (σύμφωνα με τις απαιτήσεις του Προτύπου ISO 15189): Όλα τα έγγραφα που αναφέρονται και απαιτούνται στο σημείο της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνονται και να λαμβάνονται υπόψη στο ΣΔΠ της διαπιστευμένης οντότητας για να παρέχεται επαρκής έλεγχος.

Ικανότητα προσωπικού (σύμφωνα με τις απαιτήσεις του Προτύπου ISO 15189)

Εξοπλισμός (σύμφωνα με τις απαιτήσεις του Προτύπου ISO 15189): Ο πάροχος πρέπει να εφαρμόζει πολιτικές και διαδικασίες για να διασφαλίζει ότι όλος ο εξοπλισμός τίθεται σε λειτουργία πριν από τη χρήση και ότι συντηρείται ικανοποιητικά, μέσω της εφαρμογής ενός

προγράμματος προληπτικής συντήρησης. Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται από τους χειριστές POCT πρέπει να βαθμονομείται κατάλληλα από προσωπικό εξουσιοδοτημένο. Ο εξοπλισμός δεν πρέπει να μετακινείται τακτικά μεταξύ των περιοχών ώστε να αποφεύγεται όποια τυχαία διασταυρούμενη μόλυνση. Οι μελέτες συσχέτισης/ισοδυναμίας με τον αναλυτή του υπάρχοντος εργαστηρίου του παρόχου POCT είναι υποχρεωτικές για νέο εξοπλισμό. Επιθυμητή είναι η ηλεκτρονική σύνδεση του εξοπλισμού POCT με το εργαστηριακό πληροφοριακό σύστημα (π.χ. εντός νοσοκομειακού δικτύου), όπου ισχύει.

Συνθήκες εγκατάστασης και περιβάλλοντος (σύμφωνα με τις απαιτήσεις του Προτύπου ISO 15189): Ο πάροχος POCT καθορίζει και διαχειρίζεται το εργασιακό περιβάλλον που απαιτείται για την επίτευξη καλών συνθηκών εργασίας, της ιδιωτικής ζωής και της ασφάλειας των ασθενών, καθώς και για τη συμμόρφωση με τις απαιτήσεις POCT και τις συστάσεις των κατασκευαστών της συσκευής. Ανάλογα με τον τύπο του POCT που εκτελείται, η πρόσβαση θα πρέπει να περιορίζεται σε εξουσιοδοτημένο προσωπικό.

Ο χώρος πρέπει να είναι επαρκής για να επιτρέπει στους χώρους εργασίας να διατηρούνται καθαροί και τακτοποιημένοι. Ο απαιτούμενος χώρος θα πρέπει να είναι ανάλογος με τον όγκο των αναλύσεων που διεκπεραιώθηκαν και τη συνολική εσωτερική οργάνωση των χώρων (συμπεριλαμβανομένων των εγκαταστάσεων για το προσωπικό, τους ασθενείς και την αποθήκευση). Ο χώρος θα πρέπει να είναι όπως απαιτείται σύμφωνα με την εθνική νομοθεσία και τους κανονισμούς.

Θα πρέπει να εκπονείται κατάλληλο πρόγραμμα παρακολούθησης περιβαλλοντικών συνθηκών, ενώ θα πρέπει να δίδεται ιδιαίτερη προσοχή στη στειρότητα, τη σκόνη, τις ηλεκτρομαγνητικές παρεμβολές, την ακτινοβολία, την υγρασία, την ηλεκτρική παροχή, τη θερμοκρασία, τον ήχο και τους κραδασμούς, ανάλογα με τις σχετικές τεχνικές δραστηριότητες. Αυτό το πρόγραμμα παρακολούθησης θα σχεδιαστεί από τον πάροχο POCT και θα ακολουθηθεί από τις τοποθεσίες/οντότητες POCT.

Μέθοδοι εξέτασης (σύμφωνα με τις απαιτήσεις του Προτύπου ISO 15189): Η επικύρωση των μεθόδων POCT (συσκευές/εξοπλισμός) γίνεται και παρέχεται από τους κατασκευαστές τους, καθώς οι συγκεκριμένες μέθοδοι αφορούν κλειστά συστήματα.

Η επαλήθευση πρέπει να παρέχεται από το εργαστήριο. Η επαλήθευση γίνεται σε διαπιστευμένο ιατρικό εργαστήριο με εφαρμοσμένο ΣΔΠ κατά ISO 15189. Η επιλογή των παραμέτρων επαλήθευσης εξαρτάται από τη συγκεκριμένη μέθοδο POCT.

Διασφάλιση ποιότητας (σύμφωνα με τις απαιτήσεις του Προτύπου ISO 15189): Περιοδικά ο πάροχος POCT θα πρέπει να αξιολογεί τα αποτελέσματα POCT σε σχέση με αυτά του εργαστηρίου. Κάθε τοποθεσία θα συμμετέχει σε ένα πρόγραμμα EQA με κατάλληλη συχνότητα όπως ορίζεται από τον πάροχο. Το Πρότυπο ISO 15189 καθορίζει σαφείς απαιτήσεις για IQC και EQA. Για το IQC θα τηρούνται οι συστάσεις των κατασκευαστών συσκευών/εξοπλισμού POCT, εάν υπάρχουν (σύμφωνα με την οδηγία IVD EC για ιατροτεχνολογικά προϊόντα). Διαφορετικά, το σχέδιο διασφάλισης IQC/EQA βασίζεται σε ιατρικές εταιρείες, διεθνή βιβλιογραφία κλπ.

Προ-αναλυτικές διαδικασίες (σύμφωνα με το Πρότυπο ISO 15189): Ο πάροχος πρέπει να διασφαλίσει ότι οι προ-αναλυτικές διαδικασίες είναι κατάλληλες για τις POCT δοκιμές**.** Η ευθύνη για την καθιέρωση και την εφαρμογή των προαναλυτικών διαδικασιών ανήκει στο προσωπικό του εργαστηρίου. Για τις POCT δοκιμές συνήθως δεν γίνεται ειδική αποθήκευση και μεταφορά δειγμάτων (τα πρωτεύοντα δείγματα συνήθως τροφοδοτούνται απευθείας σε συσκευές POCT).

Μετα-αναλυτικές διαδικασίες, αναφορά αποτελεσμάτων (σύμφωνα με το Πρότυπο ISO 15189): Ο πάροχος POCT αναλαμβάνει τη νομική ευθύνη για τα αποτελέσματα που παράγονται. Όταν απαιτείται, ο πάροχος πρέπει να έχει την ικανότητα και το προσωπικό για να ερμηνεύει τα αποτελέσματα POCT. Ο πάροχος POCT είναι υπεύθυνος για την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων, λαμβάνοντας υπόψη τον έλεγχο ποιότητας, τη σωστή λειτουργία του εξοπλισμού και την κατάσταση εκπαίδευσης των χειριστών.

### 9.4 Τράπεζες Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος

Νομικές απαιτήσεις: Αδειοδότηση από το Υπουργείο Υγείας και τον Εθνικό Οργανισμό Μεταμοσχεύσεων (Αριθμ. Α3γ/οικ. 18092 ΦΕΚ 1005 /Β 24 Μαρτίου 2017). Η άδεια πρέπει να έχει δημοσιευτεί σε ΦΕΚ. Υπάρχει επίσημος κατάλογος στο ΥΥ με τις αδειοδοτημένες Τράπεζες ΟπΑ (Δημόσιες ή Ιδιωτικές).

Ισχυρή σύσταση, οι τράπεζες να αποκτήσουν διαπίστευση από τον Οργανισμό FACT-NETCORD μέσα σε διάστημα τεσσάρων (4) ετών από την έγκριση λειτουργίας τους.

Σύστημα Διαχείρισης Ποιότητας: Καλύπτει όλες τις πολιτικές και τις τυπικές διαδικασίες όλων των κρίσιμων πτυχών της λειτουργίας και της διαχείρισης της τράπεζας ομφαλοπλακουντιακού αίματος, συμπεριλαμβανομένων: το προσωπικό, την ασφάλεια, την επικύρωση/επαλήθευση των κρίσιμων μεθόδων, τον εσωτερικό και εξωτερικό έλεγχο ποιότητας, τις συμφωνίες με τα ενδιαφερόμενα μέρη, την συγκατάθεση του δότη (γονέα στην περίπτωση αυτή), την εμπιστευτικότητα, την ταυτοποίηση και παρακολούθηση των μονάδων ΟπΑ και βλαστικών κυττάρων, την τεκμηρίωση του χειρισμού, της επεξεργασίας του ΟπΑ, του ελέγχου και της φύλαξης των βλαστικών κυττάρων, τα συστήματα ηλεκτρονικής παρακολούθησης, τα σφάλματα, τις αποκλίσεις και τα ανεπιθύμητα συμβάντα, τον εξοπλισμό, τις κρίσιμες προμήθειες και τα αντιδραστήρια, τον έλεγχο της σταθερότητας της φύλαξης, το κλινικό αποτέλεσμα, τη συλλογή και διαχείριση των δεδομένων, την τακτική ανασκόπηση της ποιότητας και τις εσωτερικές επιθεωρήσεις.

Προσωπικό:

- Ο Διευθυντής της Τράπεζας είναι ιατρός Αιματολόγος ή ιατρός Βιοπαθολόγος, ο οποίος πρέπει να έχει αποδεδειγμένη επαγγελματική και επιστημονική εμπειρία στον τομέα των Μεταμοσχεύσεων Αιμοποιητικών Κυττάρων τουλάχιστον πέντε (5) ετών.
- Ο Ιατρικός Διευθυντής είναι ιατρός Αιματολόγος με πενταετή τουλάχιστον εμπειρία στη μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων. Στην περίπτωση που ο Διευθυντής της Τράπεζας ΟπΑ είναι ιατρός Αιματολόγος, μπορεί να ασκεί και τα καθήκοντα του Ιατρικού Διευθυντή.
- Ο Βιολόγος (ένας (1) τουλάχιστον) έχει διετή τουλάχιστον εμπειρία σε θέματα ελέγχου, επεξεργασίας και κρυοσυντήρησης αιμοποιητικών μοσχευμάτων.
- Τεχνολόγος ιατρικών εργαστηρίων (ένας (1) τουλάχιστον).
- Ο Υπάλληλος/ Γραμματέας ασχολείται με την παραλαβή μοσχευμάτων και την παράδοση των υλικών συλλογής και ο ΙΤ με το πληροφοριακό πρόγραμμα της Τράπεζας ΟπΑ.

Είναι σαφής, τεκμηριωμένη και ενημερωμένη η περιγραφή και οι εξουσιοδοτήσεις του προσωπικού. Περιγράφεται με σαφήνεια ποια μέλη του προσωπικού ενημερώνουν τους γονείς, διεκπεραιώνουν τη διαδικασία συγκατάθεσής τους για τη συλλογή του ΟΠΑ και υλοποιούν αυτήν σε συνεργασία με τα μαιευτήρια. Η εκπαίδευση του προσωπικού είναι συνεχιζόμενη και τεκμηριωμένη. Η αξιολόγηση του προσωπικού περιγράφεται με σαφήνεια στο ΣΔΠ και εφαρμόζεται περιοδικά.

Περιεχόμενο Συναίνεσης ή Συμβολαίου με την οικογένεια για τη φύλαξη:

Τα απαιτούμενα στοιχεία της γονικής συναίνεσης ή του συμβολαίου θα πρέπει να περιλαμβάνουν:

- Δήλωση συναίνεσης (δηλαδή συγκατάθεση για χρήση σε μεταμόσχευση, έρευνα, εμπορευματοποίηση ή ποιοτικό έλεγχο)
- Ποιος μπορεί να υπογράψει τη συγκατάθεση ή τη σύμβαση
- Ο έλεγχος που πρέπει να γίνει στο αίμα του ομφάλιου λώρου και στο αίμα της μητέρας
- Η φύλαξη και η απόρριψη
- Πιθανά οφέλη
- Πιθανοί κίνδυνοι και ενοχλήσεις
- Εναλλακτικές λύσεις εκτός της φύλαξης
- Αποθήκευση προσωπικών στοιχείων του δότη/δωρητή
- Στοιχεία μελλοντικής επικοινωνίας (για αποτελέσματα δοκιμών και παρακολούθηση της κατάστασης της υγείας του μωρού)
- Κόστος και αποζημιώσεις
- Κριτήρια για ανάκληση συγκατάθεσης ή καταγγελία σύμβασης
- Συναίνεση μόνο για τη συλλογή (διαφορετικά θα πρέπει να περιλαμβάνεται άδεια χρήσης στην έρευνα ή εμπορευματοποίηση εάν η ταυτότητα είναι ανώνυμη ή πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο προσέγγισης της οικογένειας για πρόσθετη συναίνεση για άλλες χρήσεις του συλλεγόμενου υλικού αίμα ομφάλιου λώρου.

Θα πρέπει να εξασφαλιστεί πως οι πληροφορίες προς τους γονείς και τους παρόχους υγειονομικής περίθαλψης είναι δίκαιες, ισορροπημένες και τεκμηριωμένες. Απαγόρευση ψευδών δηλώσεων, παραλείψεων, αβάσιμων ισχυρισμών και συναισθηματικών εκκλήσεων που είναι πιθανό να παραπλανήσουν τους γονείς ή τους παρόχους υγειονομικής περίθαλψης.

Έλεγχοι και πληροφορίες για την προέλευση του ΟπΑ: Οι απαιτούμενοι έλεγχοι προαναλυτικού σταδίου θα πρέπει να περιλαμβάνουν πληροφορίες για τη μητέρα και το παιδί, όπως προσωπικές πληροφορίες και τρόπος ζωής (π.χ. χρήση ουσιών), ιατρικό ιστορικό, συμπεριλαμβανομένου του οικογενειακού ιστορικού, του ιστορικού κύησης και του τοκετού και της υγείας του μωρού, ιστορικό ταξιδιού καθώς θα μπορούσε να σχετίζεται με μεταδοτικές ασθένειες (π.χ. ελονοσία).

Η εργαστηριακή εξέταση του μητρικού αίματος θα πρέπει να γίνεται για τους ακόλουθους μολυσματικούς παράγοντες: HBV (HBsAg και HBV NAT), HCV (anti-HCV και HCV NAT), CMV (anti-CMV (IgG και IgM)), HIV (anti HIV 1 & 2 και HIV NAT), Σύφιλη (μη ειδικές ή/και ειδικές δοκιμασίες για Treponema pallidum). Δοκιμασίες ανίχνευσης αντισωμάτων HTLV-I/II διενεργούνται όταν οι γονείς του δότη κατοικούν ή προέρχονται από περιοχές με υψηλή επίπτωση της λοίμωξης. Πρέπει να έχουν γίνει 7 ημέρες πριν ή μετά την συλλογή της μονάδας ΟπΑ.

Συλλογή ΟπΑ: Η συλλογή αίματος ομφάλιου λώρου γίνεται βάσει των καταγεγραμμένων από το εργαστήριο οδηγιών και πραγματοποιείται από εκπαιδευμένο, εξειδικευμένο επαγγελματία υγείας σε εγκεκριμένο ή επικυρωμένο δοχείο (ασκούς) που περιέχει αντιπηκτικό.

Οι πληροφορίες προς το εργαστήριο αφορούν τη μέθοδο συλλογής αίματος ομφάλιου λώρου (π.χ. in utero έναντι ex utero), τον τύπο τοκετού (φυσιολογικός τοκετός ή καισαρική τομή), αν πρόκειται για μονήρη ή δίδυμη κύηση, τη χρονική πάροδο μεταξύ συλλογής αίματος ομφάλιου λώρου και κρυοσυντήρησης.

Η αποστολή αίματος ομφάλιου λώρου ή/και μητρικού αίματος πρέπει να γίνεται σε ισοθερμικό κυτίο (ειδικό κυτίο μεταφοράς) με παρακολούθηση θερμοκρασίας και να επιβεβαιώνεται ότι το δοχείο μπορεί να διατηρήσει την προβλεπόμενη θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της μεταφοράς των ασκών προς το εργαστήριο, η οποία δεν πρέπει να υπερβαίνει χρονικά τις 48 ώρες. Κάθε κυτίο μεταφοράς φέρει τη σήμανση Ομφαλοπλακουντιακό Αίμα, Εύθραυστο, Να Μην Ακτινοβοληθεί.

Εγκαταστάσεις: Διακριτοί χώροι παραλαβής, ελέγχου, επεξεργασίας (κατ' ελάχιστο 50τ.μ. έκαστος).

Στους χώρους επεξεργασίας των μονάδων ΟπΑ τηρούνται καταγεγραμμένες διαδικασίες ελέγχου της θερμοκρασίας χώρου, της υγρασίας, της ποιότητας του αέρα (μέτρηση σωματιδίων), της στειρότητας του εργαστηριακού χώρου.

Εξοπλισμός και Αντιδραστήρια: Η τακτική και η προληπτική συντήρηση του εξοπλισμού γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Για τον κρίσιμο εξοπλισμό (επεξεργασία, φύλαξη) τηρούνται αρχεία παρακολούθησης, προειδοποιήσεις, συστήματα συναγερμού, ώστε να εξασφαλίζεται η αδιάλειπτη λειτουργία για να αποφεύγονται προβλήματα στην συντήρηση των Μονάδων.

Η φύλαξη γίνεται σε ελεγχόμενα για θερμοκρασία και για στάθμη δοχεία υγρού αζώτου (ισχυρή σύσταση για φύλαξη μέσα στην υγρή φάση και όχι στην αέρια φάση του αζώτου). Υπάρχει συνεχής καταγραφή και έλεγχος της στάθμης του αζώτου με 24ωρη ειδοποίηση επί αστοχίας στάθμης και θερμοκρασίας στο εσωτερικό των δοχείων φύλαξης.

Προμήθειες, αντιδραστήρια και άλλα αναλώσιμα που έρχονται σε επαφή με το αίμα ομφάλιου λώρου πρέπει να είναι εγκεκριμένα για κλινική χρήση και να καταγράφονται σε μητρώα για κάθε αριθμό παρτίδας.

Αναλυτικές Διαδικασίες: Το εργαστήριο διαθέτει καταγεγραμμένες αναλυτικές Διαδικασίες Επεξεργασίας και Κρυοσυντήρησης, στις οποίες περιγράφονται ο όγκος της μονάδας (άνω των 60 ml), ο ολικός αριθμός εμπυρήνων, ο τύπος και η συγκέντρωση της κρυοπροστατευτικής ουσίας, ο τρόπος και ο ρυθμός κρυοκατάψυξης, η τελική θερμοκρασία φύλαξης.

Οι εργαστηριακές δοκιμές που απαιτούνται πριν και μετά από την επεξεργασία περιλαμβάνουν τη μέτρηση του ολικού αριθμού εμπύρηνων κυττάρων (TNCC), τη μέτρηση των CD34+ κυττάρων, τη μέτρηση της βιωσιμότητας των CD34+ κυττάρων, τον μικροβιολογικό έλεγχο για έλεγχο ανάπτυξης αερόβιων, αναερόβιων βακτηρίων και μυκήτων, τον προσδιορισμό ομάδων ABO και Rhesus, τον έλεγχο HLA-A και HLA-B, τον έλεγχο αιμοσφαιρινοπαθειών (συνιστάται ανάλογα με το οικογενειακό ιστορικό για αυτόλογη φύλαξη και απαιτείται για αλλογενή φύλαξη).

Κατά την επεξεργασία, απαιτείται η φύλαξη συνοδών φυαλιδίων (3 μικροδείγματα 100μl για HLA, 2 κρυοφιαλίδια πλάσματος σε θερμ. < -70°C για εργαστηριακές εξετάσεις).

Συνιστάται για τη φύλαξη του τελικού προϊόντος (βλαστικά κύτταρα) να διατίθενται προσαρτημένα φιαλίδια για επιπρόσθετες βοηθητικές δοκιμές (πχ για έλεγχο της βιωσιμότητας των κυττάρων σε τακτά χρονικά διαστήματα, όπως θα ορίζεται στις καταγεγραμμένες διαδικασίες του εργαστηρίου).

Η επαλήθευση, ο εσωτερικός και ο εξωτερικός έλεγχος ποιότητας ακολουθούν όλες τις προαναφερθείσες κατευθυντήριες οδηγίες για αιματολογικές δοκιμές, δοκιμές κυτταρομετρίας ροής και μικροβιολογικές δοκιμές.

Μετα-αναλυτικές Διαδικασίες: Το εργαστήριο διαθέτει καταγεγραμμένες αναλυτικές Διαδικασίες στις οποίες περιγράφονται ο έλεγχος πρόσβασης στον χώρο φύλαξης, η συνεχής ηλεκτρονική καταγραφή της θερμοκρασίας, της υγρασίας και της στάθμης του υγρού αζώτου και 24ωρη ηλεκτρονική ειδοποίηση επί αστοχιών.

Για δείγματα δυνητικών μολυσματικά, απαιτείται φύλαξη σε ειδικά δοχεία καραντίνας.

Το εργαστήριο διαθέτει καταγεγραμμένες διαδικασίες για την περίπτωση απόψυξης των κυττάρων και χρήσης τους για μεταμόσχευση. Θα πρέπει να γίνεται αναλυτική αναφορά σε όλες τις δοκιμές που πρέπει να διενεργηθούν ώστε να διασφαλιστεί πως το προς μεταμόσχευση φυλαχθέν προϊόν είναι βιώσιμο, επαρκές και κατάλληλο για μεταμόσχευση.

Το εργαστήριο θα πρέπει να διαθέτει καταγεγραμμένες διαδικασίες για τη διερεύνηση και αντιμετώπιση ανεπιθύμητων συμβάντων σχετικών με τη χορήγηση των βλαστικών κυττάρων καθώς και για τη διερεύνηση παραπόνων σχετικά με τη φύλαξη των βλαστικών κυττάρων.

### 9.5 Διαπίστευση Εργαστηρίων σε Ευέλικτο Πεδίο

Οι απαιτήσεις για το ευέλικτο πεδίο διαπίστευσης στα ιατρικά εργαστήρια και για όλους τους τομείς εξετάσεων χωρίζονται σε 2 κατηγορίες:

Α) τις οριζόντιες απαιτήσεις που αναφέρονται στην Κατευθυντήρια οδηγία του ΕΣΥΔ για την διαπίστευση των φορέων αξιολόγησης της συμμόρφωσης σε ευέλικτο πεδίο διαπίστευσης ΕΣΥΔ ΚΟ ΕΥΕΛ.

Β) τις ειδικές απαιτήσεις για την περιγραφή των πεδίων διαπίστευσης των ιατρικών εργαστηρίων, όπως αυτές αναφέρονται στο έγγραφο EA-4/17 M Description of scopes of accreditation for medical laboratories.

## 10. 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.

Prence 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.

Ajay S.S. et al (2011) Accurate and comprehensive sequencing of personal genomes. Genome Res. 2011 Sep;21(9):1498-505. doi: 10.1101/gr.123638.111. Epub 2011 Jul 19. PMID: 21771779; PMCID: PMC3166834.

Ambardar S. et al (2016) High Throughput Sequencing: An Overview of Sequencing Chemistry. Indian J Microbiol 56, 394–404 (2016). doi: 10.1007/s12088-016-0606-4.

AMP Validation Resources, http://www.amp.org/committees/clinical_practice/ ValidationResources.cfm

Ballester L.Y. et al (2016) Advances in clinical next-generation sequencing: target enrichment and sequencing technologies, Expert Review of Molecular Diagnostics, 16:3, 357-372, doi: 10.1586/14737159.2016.1133298

Bean, L.J.H. et al (2020) Diagnostic gene sequencing panels: from design to report—a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Genet Med 22, 453–461. doi: 10.1038/s41436-019-0666-z

Broeders S. et al (2014) Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods, Trends in Food Science & Technology,Volume 37, Issue 2,2014, Pages 115-126.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Genetic Testing Reference Materials (GeT-RM) Coordination Program, https://www.cdc.gov/labquality/get-rm/AboutGet-RM.html

Crooks K.R. et al (2023) Recommendations for Next-Generation Sequencing Germline Variant Confirmation. The Journal of Molecular Diagnostics, Volume 25, Issue 7, 411 – 427

Crossley B.M. et al (2020) Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 2020; 32(6) 767–775. Doi: 10.1177/1040638720905833

Ellard S. et al (2016) Practice guidelines for Sanger Sequencing Analysis and Interpretation. ACGS 2016

Gargis A.S. et al (2015) Good laboratory practice for clinical next-generation sequencing informatics pipelines. Nat Biotechnol. 2015 Jul;33(7):689-93. doi: 10.1038/nbt.3237. PMID: 26154004; PMCID: PMC6504172.

Gargis A.S. et al (2016) Assuring the Quality of Next-Generation Sequencing in Clinical Microbiology and Public Health Laboratories. J Clin Microbiol. 2016 Dec;54(12):2857-2865. doi: 10.1128/JCM.00949-16. Epub 2016 Aug 10. PMID: 27510831; PMCID: PMC5121372.

Gargis AS.. et al (2012) Assuring the quality of next-generation sequencing in clinical laboratory practice. Nat Biotechnol. 2012 Nov;30(11):1033-6. doi: 10.1038/nbt.2403. PMID: 23138292; PMCID: PMC3827024.

Grohmann L. et al (2016) Guidelines for the single-laboratory validation of qualitative real-time PCR methods.

Grohmann L. et al (2021) Guidance document on multiplex real-time PCR methods, EUR 30708 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2021

Hastings R. (2012) General Guidelines and Quality Assurance for Cytogenetics. A common European framework for quality assessment for constitutional, acquired and molecular cytogenetic investigations. E.C.A. Permanent Working Group for Cytogenetics and Society. E.C.A. - EUROPEAN CYTOGENETICISTS ASSOCIATION NEWSLETTER No. 29 January 2012

Jennings L et al (2017). Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing–Based Oncology Panels, The Journal of Molecular Diagnostics, Volume 19, Issue 3, 341 – 365

Kircher M et al (2012) Double indexing overcomes inaccuracies in multiplex sequencing on the Illumina platform, Nucleic Acids Research, Volume 40, Issue 1, Page e3, doi: 10.1093/nar/gkr771

Kozarewa I. et al (2015) Overview of target enrichment strategies. Curr. Protoc. Mol. Biol. 112: 7.21.1-7.21.23. doi: 10.1002/0471142727.mb0721s112

Li M. et al. (2017) Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer, The Journal of Molecular Diagnostics, Volume 19, Issue 1, 4 – 23

Lincoln SE et al (2019) A Rigorous Interlaboratory Examination of the Need to Confirm Next-Generation Sequencing-Detected Variants with an Orthogonal Method in Clinical Genetic

Testing. J Mol Diagn. 2019 Mar;21(2):318-329. doi: 10.1016/j.jmoldx.2018.10.009. Epub 2019 Jan 3. PMID: 30610921; PMCID: PMC6629256.

Mamanova L. et al (2010) Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. Nat Methods 7, 111–118 (2010). doi: 10.1038/nmeth.1419

McGowan-Jordan J. (2020) ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2020). Karger publication. AG. DOI: https://doi.org/10.1159/isbn.978-3-318-06867-2. Publication date: 2020

Molecular Diagnostic Assay Validation Update to the 2009 AMP Molecular Diagnostic Assay Validation White Paper Association for Molecular Pathology.

Petrackova A. (2019) Standardization of Sequencing Coverage Depth in NGS: Recommendation for Detection of Clonal and Subclonal Mutations in Cancer Diagnostics. Front. Oncol. 2019; 9:851. doi: 10.3389/fonc.2019.00851

Rack K.A. et al (2019) European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms. Leukemia. 2019 Aug;33(8):1851-1867. doi: 10.1038/s41375-019-0378-z. Epub 2019 Jan 29. PMID: 30696948; PMCID: PMC6756035.

Rehder C. et al (2021) ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Next-generation sequencing for constitutional variants in the clinical laboratory, 2021 revision: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Genet Med. 2021 Aug;23(8):1399-1415. doi: 10.1038/s41436-021-01139-4. Epub 2021 Apr 29. PMID: 33927380.

Silva M. (2018) European guidelines for constitutional cytogenomic analysis. Eur J Hum Genet. 2019 Jan;27(1):1-16. doi: 10.1038/s41431-018-0244-x. Epub 2018 Oct 1. PMID: 30275486; PMCID: PMC6303289.

Smith M. (2021) Validating Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Assays. Encyclopedia of Virology. 2021;35-44.

Stevens RC et al (2019) A novel CRISPR/Cas9 associated technology for sequence-specific nucleic acid enrichment. PLoS ONE 14(4): e0215441. doi: 10.1371/journal.pone.0215441

Toohey-Kurth K. et al (2020) Suggested guidelines for validation of real-time PCR assays in veterinary diagnostic laboratories. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2020;32(6):802-814.

Voelkerding K.V. et al (2009) JD. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. Clin Chem. 2009 Apr;55(4):641-58. doi: 10.1373/clinchem.2008.112789. Epub 2009 Feb 26. PMID: 19246620.

Summary of validation considerations with real-life examples using both qualitative and semiquantitative flow cytometry assays. Cytometry B Clin Cytom. 2023 Sep;104(5):374-391.

Uniform Labeling of Blocks and Slides in Surgical Pathology Guideline From the College of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality Center and the National Society for Histotechnology Arch Pathol Lab Med. 2015;139:1515–1524; doi:10.5858/arpa.2014-0340-SA

Preanalytics and Precision Pathology Pathology Practices to Ensure Molecular Integrity of Cancer Patient Biospecimens for Precision Medicine doi: 10.5858/arpa.2019-0009-SA

Principles of Analytic Validation of Immunohistochemical Assays, Guideline From the College of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality Center doi: 10.5858/arpa.2013-0610-CP

Principles of Analytic Validation of Clinical Immunohistochemistry Assays Adv Anat Pathol 2015;22:384–387

Analytic Validation of Immunohistochemistry Assays New Benchmark Data From a Survey of 1085 Laboratories Arch Pathol Lab Med. 2017;141:1255–1261; doi: 10.5858/arpa.2016-0559-CP

ISO 15189 assessment: a positive experience for immunohistochemistry, Pathology in practice February 2016

Evolution of Quality Assurance for Clinical Immunohistochemistry in the Era of Precision Medicine: Part 1: Fit-for-Purpose Approach to Classification of Clinical Immunohistochemistry Biomarkers Appl Immunohistochem Mol Morphol 2017;25:4–11

Evolution of Quality Assurance for Clinical Immunohistochemistry in the Era of Precision Medicine. Part 3: Technical Validation of Immunohistochemistry (IHC) Assays in Clinical IHC Laboratories Appl Immunohistochem Mol Morphol 2017;25:151–159

Institute CLS. Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays: Approved Guideline (CLSI Document I/LA28-A2), 2nd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.

Evolution of Quality Assurance for Clinical Immunohistochemistry in the Era of Precision Medicine – Part 2: Immunohistochemistry Test Performance Characteristics Appl Immunohistochem Mol Morphol 2017;25:79–85

Standardization of Positive Controls in Diagnostic Immunohistochemistry: Recommendations From the International Ad Hoc Expert Committee Appl Immunohistochem Mol Morphol Volume 23, Number 1, January 2015

Audit and internal quality control in immunohistochemistry, P. Maxwell and W G McCluggage, J Clin Pathol 2000 53: 929-932

Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update J Clin Oncol 38:1346-1366. © 2020 by American Society of Clinical Oncology

Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer Arch Pathol Lab Med—Vol 142, November 2018

Ackerman’s Surgical Pathology, J. Rosai editor, 8th ed. Vol., Appendix F

https://www.cap.org/protocols-and-guidelines/cancer-reporting-tools/cancer-protocol-templates

Evolution of Quality Assurance for Clinical Immunohistochemistry in the Era of Precision Medicine: Part 4: Tissue Tools for Quality Assurance in Immunohistochemistry Appl Immunohistochem Mol Morphol 2016;00:000–000)

Standardization of Negative Controls in Diagnostic Immunohistochemistry: Recommendations From the International Ad Hoc Expert Panel Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2014 April ; 22(4): 241–252.

Guidance for the Assessment of Laboratories against EN ISO 15189 and EN ISO 22870 Point-of-Care Testing (POCT), EA-4/20 G: 2021

## 11. 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: www.eurogentest.org/index.php?id=139

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

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

CAP: https://www.cap.org/apps/cap.portal