

Vurdering av analysekvalitet (og preanalytiske faktorer) i forbindelse med innføring av NORIP referanseintervall;

(Forslag utarbeidet av Heidi Steensland i samarbeid med Pål Rustad og Petter Urdal)

Som kjent har Norsk Selskap for Klinisk Kjemi og Klinisk Fysiologi anbefalt laboratoriene å innføre NORIP-intervallene i løpet av våren 2004, og det antas at laboratoriene er i ferd med forberedelsene.

NFKK Reference Serum X er fremstilt for å kunne teste rutinemethoders riktighet og mulighet for å kunne benytte NORIP-referanseintervallene. X er et poole, umodifisert normalserum som skal gi samme verdier på de aktuelle komponentene som et tilsvarende pasientserum, - det vil si at det skal være fritt for matrix-effekter som vi vanligvis har i prosesserte kalibratører og kontrollmaterialer. Det foreligger tillagte *certifiserte* verdier sporbare til referansemetoder på 13 av de komponentene som inngår i NORIP og tillagte *veiledende* verdier på de resterende 12 komponentene (studer sertifikatet!).

For beregning av NORIP-referanseintervallene er det for alle komponenter unntatt enzymene benyttet et tilsvarende serum, CAL, som "kalibrator". Det innebærer altså at alle laboratorienes måleresultater først er "rekalibrert" med CAL, deretter er referanseintervallene beregnet. Derfor kan vi si at de enkelte NORIP-referanseintervallene er "sporbare" til den respektive CAL-verdien. Senere er det så overført tilsvarende referansemetode-verdier til X, det vil igjen si at laboratorienes analyseresultater bør være i overensstemmelse med de oppgitte verdiene for X for å kunne benytte NORIP-intervallene.

Mange laboratorier har nå fått tilsendt X og er forhåpentligvis i ferd med å teste rutinemethodenes overensstemmelse med de tillagte verdiene for dermed å kunne vurdere om laboratoriet uten videre kan innføre NORIP referanseintervallene.

Dette notatet er en utdypning av problemstillinger som kan oppstå, og det er gitt noen vurderinger som kanskje kan være avklarende. Men til syvende og sist må det enkelte laboratorium, evt sammen med samarbeidende laboratorier ta en selvstendig avgjørelse **om** og **hvordan** NORIP-referanseintervallene for de enkelte serumkomponenter kan innføres.

Sammendrag

- ✚ Analyser X iflg regnearket og konsentrer det videre arbeidet om eventuelle komponenter der du påviser bias som overskrider de foreslåtte kvalitetsmålene.
- ✚ Vurder usikkerheten i tillagt verdi av X og andre forhold som indikerer usikkerhet.
- ✚ Vurder om bias-målene virker urimelig strenge.
- ✚ Vurder også laboratoriets resultater fra andre riktighetsstudier
- ✚ Vurder om eventuell påvist bias overskrider den usikkerheten produsenten oppgir
- ✚ Vurder om du har å gjøre med en varig feil, eller om den er temporær
- ✚ Skaff rede på om andre laboratorier med samme analysesystem finner samme feil i forhold til tillagt verdi av X
- ✚ Anmod eventuelt produsenten å analysere X i sitt referansesystem, og diskuter resultatene
- ✚ Avgjør om det er gode holdepunkter for å innføre en justering av resultatene
- ✚ Fastsett eventuell justering ved hjelp av referansematerialer som sikrer riktighet over hele måleområdet
- ✚ Hvis laboratoriet ikke ønsker å innføre en justering av måleresultatene, vurder om det kan være et alternativ å gjøre en forsiktig justering av NORIP referanseintervallet for de(n) aktuelle komponenten(e)
- ✚ Vurder om eventuell dårlig reproducerbarhet bør medføre øket range for ref.intervallet
- ✚ Vurder preanalytiske betingelser – klarer laboratoriet å oppfylle dem etter NORIP's retningslinjer?

Bruk av Pål Rustads regneark

Det anbefales at du benytter Pål Rustads regneark for X der fremgangsmåte for analysering og vurdering av resultatene er beskrevet. To versjoner av regnearket kan lastes ned:

- Norsk versjon fra NKK's nettside (www.legeforeningen.no/nkk)
- Engelsk versjon fra NORIP's nettside (www.furst.no/norip/).

Alle NORIP-komponentene er tatt med i regnearket, men de komponentene som er oppført med sertifiserte verdier bør tillegges mest vekt. Komponentene med veiledende verdier bør vurderes mer individuelt.

De to versjonene er noe forskjellige med hensyn til vurdering av usikkerhet:

Aktuelle usikkerhetsfaktorer

Ved vurderinger som her bør man så langt det er praktisk mulig ta i betraktning usikkerhetene i de tall man legger til grunn for oppgitte verdier som benyttes:

- Usikkerhet i analysesystemets kalibratorverdi: Den engelske versjonen av regnearket gir anledning til å legge inn usikkerhet i den aktuelle brukskalibratoren hvis produsenten har oppgitt disse verdiene. (Det er produsentene nå pliktige til i følge IVD-direktivet!)
- Usikkerhet i målingene: Denne er tatt med i beregningene i begge versjoner, men må antas å være svært liten når det benyttes mange replikater av så vel kalibrator som kontrollmateriale innen *en* serie.
- Usikkerhet i den tillagte verdien i X (oppført i sertifikatet for X): Denne er tatt med i beregningen i begge versjoner av regnearket.

Kanskje kan det være illustrerende å stille opp viktige usikkerheter for hver komponent og vurdere dem mot de foreslåtte bias-målene, for eksempel:

Komponent.....

	Tillagt verdi	Angitt usikkerhet, $k=2$	Foreslått bias-mål, regnearket	
			Angitt i %	Angitt i målenh.
Produsentens brukskalibrator				
X				

Mål for tillatt bias (systematisk feil) i regnearket

I regnearket er det valgt et sett med *mål for tillatt bias* (systematisk avvik) som er basert på biologisk variasjon beregnet ut fra NORIP-resultatene. Laboratoriet kan velge å akseptere disse eller sette egne mål. I enkelte tilfeller kan mål som er basert på biologisk variasjon virke strenge, og det kan være medisinske eller andre grunner til å redusere kravene. Man skal imidlertid være oppmerksom på at godkjenning av avvik utover de biasmål som er foreslått i regnearket kan medføre at mer enn 5.6% eller mindre enn 1.0% av "normale" svar faller utenfor hver referansegrense i stedet for ideelt 2.5%. I forklaringen til regnearket kan du lese hvordan du eventuelt kan endre bias-målene.

Problemstillinger ved påvist systematisk feil (bias)

For de fleste komponentene vil ditt analysesystem sannsynligvis tilfredsstille de foreslåtte målene, men det kan være unntak for en eller flere komponenter der du finner at det i følge målene du benytter synes å være et systematisk avvik (bias), som det er grunn til å vurdere nærmere.

1. *Hvis en vurderer analyseresultatene for vedkommende komponent(er) over tid,*
 - *har feilen vært tilstede over et lengre tidsrom og*
 - *er feilen av en slik størrelse at overskrider den kvaliteten produsenten garanterer?*

Her kan laboratoriet ha tidligere analyseresultater å støtte seg til:

- NORIP-arbeidet (2000-2001), CAL og X
- Den Nordiske riktighetsstudien (vår 2003), CAL og X
- Mai 2003-utsendelsen av CAL i klinisk kjemi-programmet

Flere laboratorier har deltatt i ett eller flere av disse arbeidene og kan dermed lage seg summariske oversikter og vurdere om eventuelle avvik er persistente, eller om man registrerer endringer over tid. Oppdatert regneark med tillagte verdier for CAL finner du også på NKK's nettside. Vær oppmerksom på at ved de siste to studiene ble seraene sendt i flytende form uten temperaturkontroll (dvs ca 2 døgn ved inntil 20°C).

Laboratoriet har også data fra intern kvalitetskontroll og ekstern kvalitetsvurdering, samt kanskje ekstern langtidskontroll (HK02) som indikatorer på variasjoner over tid.

Tips: Det kan være fornuftig å sørge for at du inkluderer fremtidig batch av eget kontrollmateriale når du analyserer X.

Hvis det er holdepunkter for at den påviste feilen er vedvarende og at den overskrider den usikkerheten som produsenten garanterer, kan det være aktuelt å undersøke:

2. *Er den påviste feilen lokal eller samsvarer dine funn med andre laboratorier som benytter samme analysesystem?*

For å finne ut av dette bør man kunne forhøre seg med andre laboratorier som benytter samme analysesystem, og eventuelt sammenlikne resultater fra et antall pasientsera med ulike konsentrasjoner der man også tar X (evt CAL) med i prøverekken.

Ut fra en slik studie kan det gjøres en korrelasjonsberegning (for eksempel med bruk av Passing Bablok regresjon i Analyse-it), som vil kunne gi et estimat av eventuell slope og intercept. Punktet for X (evt CAL) bør nå ligge på den beregnede regresjonslinjen!

Hvis feilen ligger i eget laboratorium, bør det være mulig å finne årsaken og rette den opp.

Hvis feilen samsvarer med andre laboratorier som benytter samme analysesystem, kommer spørsmålet:

3. *Er det aktuelt å korrigere resultatene for å kunne innføre NORIP-intervallene?*

Her bør laboratoriene kunne gå sammen om felles sak og ta den opp og samarbeide med leverandøren :

- Vær omhyggelig med å gi entydig og god dokumentasjon på problemet (sammen med kopi av sertifikatet for X).
- Det beste er om produsenten selv kan analysere X i sitt referansesystem slik at resultatene kan diskuteres med laboratoriene og en hensiktsmessig plan kan legges. Flere produsenter er i gang med dette. Produsentene kan henvende seg til DEKS om dette.
- Eventuelt bør laboratoriene kunne anmode leverandøren om å få tilstillet et sett med referansematerialer på ulike konsentrasjonsnivå slik at disse kan testes mot X og egne lots av brukskalibratører (helst flere lots!). Et slikt arbeid bør kunne gjøres ved ett laboratorium etter en protokoll man er blitt enige om, og funnene bør kunne anvendes ved samarbeidende laboratorier etter en enkel verifisering. Slikt arbeid bør gjøres i forståelse med produsenten.
- Hvis laboratoriet, etter å ha samlet tilstrekkelig informasjon, skulle velge å innføre en korleksjon av resultatene, bør man gjennomgå dataene og ta stilling til om riktigheten best kan opprettes ved innføring av *slope* og/eller *intercept*. En eventuell korrigerings må sikre riktigheten i *hele* måleområdet.

(OBS! Det advares mot bruk av brukskalibratører fra andre produsenter på grunn av at slike materialer ofte er beheftet med matrix-effekter og derfor kun gjelder for de analysesystem produsenten garanterer)

Eventuelt, - hvis man har tilgang til et analysesystem som tilfredsstillende bias-målene for vedkommende analyse. kan det være interessant å sammenlikne resultater fra et antall pasientsera ved forskjellige konsentrasjonsnivå og på denne måten finne ut hvordan riktighetene kan sikres.

Hvis alle funn tyder på at analysesystemet har en vedvarende systematisk feil i forhold til den tillagte verdien av X (evt også CAL) som laboratoriet er lite lysten på å justere ved å legge inn en fast slope/intercept, kan et alternativ være å justere det foreslåtte NORIP referanseintervall istedet, slik at analysenivå og referanseintervall stemmer overens. Det skulle i tilfellet bare være tale om en mindre justering av det aktuelle referanseintervall, slik at intensjonene med harmonisering av referanseintervall innen Norden likevel er tilstede.

Bruk av X for vurdering av Vitros-systemene.

Selv om X er et poolet pasientserum, kan Vitrossystemene gi tilsynelatende avvik for enkelte analytter. Dette kan skyldes at pH er en tanke endret ved at CO₂ har unnsloppet. For eksempel er kalsium svært følsom for pH-endringer (uten at dette kan påvises i NORIP: Forskjellen mellom middelverdi av korrigerede referanseverdier for Vitros og våtkjemi var 0.3% dvs. 0.007 mmol/L). Ved tvil bør Vitrosinstrumentene testes med ferske pasientsera mot et analysesystem der bias-målene er tilfredsstillende.

Komponenter som kan kreve ekstra oppmerksomhet

Kreatinin. Den oppgitte verdien på X er sporbar til IDMS som er referansemetoden for kreatinin. NORIP referanseintervall er også sporbare til samme. Det har vist seg at den enzymatiske metoden (våtkjemi) gir godt overensstemmende resultater med referansemetoden (skaff evt dokumentasjon fra produsenten). Overgang til enzymatisk kreatininmetode er å anbefale selv om dette ikke er noen betingelse for å bruke NORIP referanseintervaller.”

Derimot eksisterer det et velkjent problem med Jaffe kreatinin, som er en uspesifikk metode som også medbestemmer såkalte ”pseudokreatininer”. Det kan se ut som om de forskjellige Jaffemetodene er korrigert for pseudokreatinier i ulik grad, og derfor kan gi ulik verdi på ett og samme serum. Dette fenomenet er illustrert for CAL på NORIP’s nettside (under Preliminary project data/Compiled data for each component/Creatinin) og er for øvrig omtalt i Klinisk kjemi brevet for desember 2003).

Roche har lansert en ny metodevariant, ”Jaffe compensated” som skal gi god overensstemmelse med HPLC-metoden. Resultat fra Roche ”Jaffe compensated” bør stemme overens med den tillagte verdien for X, - innenfor den angitte usikkerheten. Men laboratorier som benytter andre Jaffe metoder bør nok teste egen metode mot enzymatisk metode og kanskje i fellesskap med andre laboratorier med samme analysesystem etablere omregning ved hjelp av slope og intercept. Her er det viktig å forvise seg om at overensstemmelsen gjelder også ved høyere konsentrasjonsnivå.

Equalis har fremstilt et kreatininfritt serum som kan benyttes til å korrigere for ”pseudokreatininer”, les evt mer om dette på nettsiden www.equalis.se/NORIP.htm, EQALIS kreatininfria serum, [analyscertifikat \(pdf\)](#). Norge har fått anledning til å kjøpe 15 glass (à 1 ml) av den første batchen av serumet, - ny batch er under produksjon. Prisen er ca 450 + frakt. Eventuelle interesserte kan bestille gjennom NKK, som vil formidle serumet så langt beholdningen rekker.

Som Vitros-brukerne vil vite, er Vitros’ kreatininmetode enzymatisk, og metoden er i utgangspunktet sporbar til HPLC-metoden, men er kalibrert til å gi resultater i overensstemmelse med en Jaffe metode. Ortho har nylig frigitt formelen som gjør det mulig å korrigere resultatene tilbake til opprinnelige nivå:

$$\text{Serum/plasma: Vitros HPCL-nivå } \mu\text{mol/l} = (\text{Vitros} - 8)/0,98 \mu\text{mol/l}$$

Det anbefales at Vitrosbrukerne innhenter dokumentasjonen fra Ortho og at en eller flere representanter for Vitrosbrukerne likevel tester metodens overensstemmelse mot enzymatisk våtkjemi ved hjelp av pasientsera med ulike konsentrasjonsnivå. (Tillagt verdi for CAL er 70.6 $\mu\text{mol/l}$ mens middelverdien for Vitros i NORIP korrigert med den angitte formelen gir 73.0 $\mu\text{mol/l}$).

Albumin er en analytt som også kan gi uoverensstemmelse med referansemetodeverdien for X. Fargemetodene som benyttes for rutineanalyser i serum, - bromkresol- grønt eller purpur, er primitive metoder som kan gi tydelige metodeforskjeller. Her kan usikkerheten overstige målene:

- Brukskalibrator: verdi 36,3 g/l, usikkerhet (k=2) 0,3 g/l (eksempel fra en av produsentene)
- X : Certifisert verdi 41,5 g/l, usikkerhet (k=2) 2,7 g/l
- Godkjennelsesmål for X, regnearket: 2.1% (0,9 g/l)!

Vurderingen for albumin kan være vanskelig, her er noen momenter:

- Den oppførte usikkerheten for den tillagte verdien for X er høy, - og eventuelle avvik fra denne tillagte verdien som laboratoriet måtte få bør vurderes ut fra usikkerheten i den tillagte verdien. Ikke desto mindre er det altså denne verdien som er i overensstemmelse med beregnede referanseintervallet, fordi den tillagte verdien av X er avledet av CAL-verdien!
- På NORIP’s nettside er det lagt inn informative data for de ulike metode-variantene (under Preliminary project data/Compiled data for each component/Albumin). Grafer viser utslag av metodeforskjeller i CAL samt og kumulativ fordeling av referansegrenser. Her kan det være interessant å vurdere beliggenheten av egen metode i forhold til beliggenhet av korrigerte verdier.
- I tilfellet albumin kan det tenkes at bias-målet er noe strengt og at det er grunn til å endre dette.
- Hvis det viser seg at laboratoriets metode har en reproducerbar, systematisk feil i forhold til den tillagte verdien for X, kan en vei ut av uføret være å justere NORIP-referanseområdet tilsvarende

Kolesterol. Dette er eneste komponent der bias-målet IKKE er basert på biologisk variasjon, men på en internasjonal anbefaling. Det er kjent at våtkjemi rutinesystemene ofte har en positiv systematisk feil i

størrelsesorden 1-3 %, varierende med analysesystemene. Den tillagte verdien for X er basert på IDMS og usikkerheten i den tillagte verdien er liten. Om laboratoriet påviser en utilfredsstillende bias for kolesterol, bør en kunne be om at produsenten dokumenterer metodens riktighet, for så å vurdere ut fra dette.

Kalsium og Kalium. For kalsium og kalium er de anbefalte referanseintervallene snevrere enn man er vant med, spesielt er øvre referansegrense lavere. Dette kan skyldes at NORIP krevde en nøye standardisert prøvetaking (men dog i overensstemmelse med vanlige anbefalinger) og nøye nivåsetting av analysene. Til daglig har laboratoriene vansker med å opprettholde så høy kvalitet. Det enkelte laboratorium kan derfor måtte vurdere å utvide sitt referanseintervall noe ut fra den kvaliteten på prøvetaking og målinger som de er i stand til å holde.

Andre komponenter. Blant de øvrige komponentene er noen oppgitt med overførte referansemetodeverdier fra CAL mens andre er konsensus middelveidier fra rutinemetoder beregnet ut fra NORIP-dataene. For *protein, fosfat og bilirubin* er de tillagte verdiene i sertifikatet for X basert på referansemetodeverdier overført fra CAL, og NORIP referanseintervallene er også sporbare til disse. For bilirubin er imidlertid konsentrasjonsnivået så lavt at laboratoriene bør verifisere riktighet for egen metode på annen måte. For *HDL og transferrin* er de tillagte veiledende verdiene basert på konsensusverdier fra rutinemetodene, og NORIP referanseintervallene er basert på disse konsensusverdiene.

For enzymene minner vi om at de beregnede referanseintervallene ikke er basert på rekalkibrering med CAL. Her er referanseintervallene som kjent basert direkte på resultatene fra ”godkjente” analysesystem.

OBS! For CK, GT og ALAT er det i regnearket likevel lagt inn overførte referansemetodeverdier, mens de laboratorier som ble benyttet i beregningen av referanseintervallene hadde middelveidier for X som angitt i tabellen nedenfor:

	Tillagt verdi	Middel, alle	Middel, våtkjemi	Middel, Vitros
CK, U/l	133	122	121	129
GT, U/l	35,4	35,8	36,4	34,0
ALAT, U/l	24,2	26,3	25,6	29,1

Hvis man ønsker å vurdere hvilke analysesystem som veier tungt i beregningen av middelveidene ovenfor kan nedenstående tabell illustrere dette.

Number of enzyme results grouped according to the analysis systems used for the measurements.

Hentet fra: *Reference intervals for eight enzymes in blood of adult females and males measured in accordance with the IFCC reference system at 37 °C - A part of the Nordic Reference Interval Project. J.H. Stromme, P.Rustad, H.Steensland, L.Theodorsen, P.Urdal. (under trykking i SJICLI)*

Enzyme	1	2	3	4	5	6	7	Wet chem. Sum 1-7	Dry chem. 8
ALT	72	175		114	57	574	670	1661	639
AST	65	175	59	120	34	503	655	1633	407
CK	51	36		174	52	511	529	1318	531
LD							459	459	
ALP							459	459	495
GT			59	94	34		659	845	536
AMY-P						105	392	497	
AMY					33	382	304	719	

- | | | |
|---------------------------|------------------------|---------------------------|
| 1. Bayer Axon, Opera | 4. Konelab | 7. Roche Hitachi |
| 2. Beckman Coulter | 5. Olympus | 8. Ortho (Vitros 250/950) |
| 3. Dade Behring Dimension | 6. Roche Cobas Integra | |

Som det fremgår av tabellen er det en produsent som dominerer og som for en stor del er ”ansvarlig” for sporbarheten av referanseintervallene for enzymene. (Unntak er ALP der den tillagte verdien er basert på 3 laboratorier som benyttet Roche Modular og 20 laboratorier som benyttet Vitros). Laboratorier som har analysesystem som man mistenker ikke gir korrekt ”IFCC-nivå” er blitt anbefalt først og fremst å kreve dokumentasjon fra produsenten, dernest å gjøre en sammenliknende studie med et analysesystem fra denne produsenten!

Enzymaktiviteter i normalsera som CAL og X er generelt lave. Vær derfor klar over at målte avvik beregnet som % lett kan bli høye uten at dette nødvendigvis bør få noen avgjørende betydning.