

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



VELIMIR BELČIĆ

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2018

I

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



VELIMIR BELČIĆ

DIAGNOSTIČNA UPORABNOST IN ANALITIČNA VERIFIKACIJA PREISKAV OB
BOLNIKU ZA MERJENJE PROTROMBINSKEGA IN AKTIVIRANEGA
PARCIALNEGA TROMBOPLASTINSKEGA ČASA NA ODDELKIH INTENZIVNE
NEGE

DIAGNOSTIC UTILITY AND ANALYTICAL VERIFICATION OF POINT OF CARE
TESTING FOR MEASUREMENT OF PROTHROMBIN AND ACTIVATED PARTIAL
THROMBOPLASTIN TIME AT INTENSIVE CARE UNITS

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2018

Diplomsko delo sem opravil v okviru izmenjave CEEPUS na Fakulteti za farmacijo in biokemijo Univerze v Zagrebu v obdobju od 01. 03. 2016 do 31. 05. 2016. Praktični del sem opravil na Kliničnem zavodu za laboratorijsko diagnostiko Medicinske fakultete, Univerze v Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc in somentorstvom prof. dr. Dunje Rogić.

ZAHVALA

Zahvaljujem se vsem, ki so mi pomagali pri izdelavi magistrske naloge, zlasti mentorici prof. dr. Janji Marc in somentorici prof. dr. Dunji Rogić, ki sta mi dali priložnost izvedbe izmenjave na KZLD UKC Zagreb. Ivani Baršić Lapić, spec. med. biokem. in Samyju Tayfouru, mag. med. biokem. se zahvaljujem za vso pomoč, potrpežljivost in nasvete. Velika hvala tudi moji družini in prijateljem za podporo in motivacijo tekom mojega študija v Ljubljani.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelal samostojno pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc in somentorstvom prof. dr. Dunje Rogić.

Velimir Belčić

Ljubljana, 2018

Komisija za zagovor:

Predsednik:izr. prof. dr. Tomaž Vovk

Mentorica: prof. dr. Janja Marc

Somentorica: prof. dr. Dunja Rogić

Članica: doc. dr. Urša Pečar Fonović

Kazalo vsebine

1. UVOD.....	1
1.1. Preiskave ob bolniku	1
1.2. Uporaba naprav POCT	5
1.3. Preiskave POCT in bolniku prilagojena medicina	7
1.4. Kontrola kakovosti preiskav POCT.....	8
1.5. Validacija in verifikacija laboratorijske preiskave	11
2. NAMEN DELA.....	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1. Odvzem vzorcev	17
3.2. Opis metod, uporabljenih v raziskavi	17
3.2.1. Naprava POCT	17
3.2.2. Test POCT za določanje protrombinskega časa (PČ)	17
3.2.3. Test POCT za določanje aktiviranega delnega tromboplastinskega časa (APTČ)	20
3.2.4. Merjenje PČ in APTČ na analizatorju v medicinskem laboratoriju.....	22
3.2.5. Reagenti	25
3.3. Natančnost in točnost	27
3.4. Primerjava metod.....	28
3.5. Statistična obdelava podatkov	28
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	30
4.1. Verifikacija natančnosti meritev POCT	30
4.2. Verifikacija točnosti meritev POCT	34
4.2.1. Ugotavljanje odklonov od pravih vrednosti	34
4.2.2. Primerjava metod.....	36

5. SKLEPI.....	45
6. LITERATURA.....	46

Kazalo slik

Slika 1: Idealna naprava POCT	2
Slika 2: Napredek pri povezavi naprav POCT	6
Slika 3: Preventivna medicina izvedena s pomočjo zgodnjega odkrivanja kroničnih bolezni	7
Slika 4: Testni trakovi za določanje PČ.....	19
Slika 5: Passing-Bablokova regresijska analiza primerjave metod za merjenje PČ.....	39
Slika 6: Passing-Bablokova regresijska analiza primerjave metod za določanje INR.	40
Slika 7: Bland-Altmanova analiza primerjave rezultatov (absolutne vrednosti) PČ dobljenih na napravi POCT in analizatorju.	40
Slika 8: Bland-Altmanova analiza primerjave rezultatov (v odstotkih) PČ dobljenih na napravi POCT in analizatorju.	41
Slika 9: Bland-Altmanova analiza primerjave rezultatov (absolutnih vrednosti) INR dobljenih na napravi POCT in analizatorju.	41
Slika 10: Bland-Altmanova analiza primerjave rezultatov (v odstotkih) INR dobljenih na napravi POCT in analizatorju.	42
Slika 11: Wilcoxonov test o pomembnosti razlike parnih meritev za parameter APTČ.....	42

Kazalo preglednic

Tabela I: Prednosti in slabosti preiskav ob bolniku.....	3
Tabela II: Pregled segmentov kontrole kakovosti za naprave POCT.....	8
Tabela III: Posebnosti kontrolnih materialov, namenjenih POCT	10
Tabela IV: Interference testa CoaguChek PT.....	18
Tabela V: Intermediarna natančnost (vmesna natančnost) in ponovljivost.....	19
Tabela VI: Interference testa CoaguChek aPTT.....	20
Tabela VII: Referenčne vrednosti in ponovljivost za aPTT	21
Tabela VIII: Ponovljivost CoaguChek aPTT testa – kontrolni vzorci	22
Tabela IX: Biološki referenčni intervali.....	23
Tabela X: Uporabljeni reagenti pri verifikaciji naprave.....	26
Tabela XI: Loti kontrolnih raztopin, ki so bile uporabljene pri verifikaciji naprave CoaguChek Pro II.	27
Tabela XII: Prikaz meritev kontrolnih vzorcev (PČ - Nivo 1).....	32
Tabela XIII: Prikaz meritev kontrolnih vzorcev (PČ – Nivo 2).....	32
Tabela XIV: Prikaz meritev kontrolnih vzorcev (APTČ - Nivo 1).....	33
Tabela XV: Prikaz meritev kontrolnih vzorcev (APTČ - Nivo 2).....	33
Tabela XVI: Natančnost meritev POCT.....	34
Tabela XVII: Srednja vrednost komercialnih vzorcev.....	35
Tabela XVIII: Točnost meritev POCT.....	35
Tabela XIX: Primerjava meritev za parameter: Protrombinski čas (PČ) – PČ.....	36
Tabela XX: Primerjava meritev za parameter: Protrombinski čas (PČ) – PČ/INR.....	37
Tabela XXI: Regresijska analiza Passing-Bablok.....	39

Tabela XXII: Vpliv heparina na določanje APTČ (občutljivost metode)	43
---	----

Kazalo enačb

Enačba 1: Standardni odklon.....	12
Enačba 2: Koeficient variacije (S_r).....	12
Enačba 3: Skupni standardni odklon.	13
Enačba 4: Standardna aritmetična sredina.	13
Enačba 5: Vmesna natančnost.	13
Enačba 6: Koeficient variacije (S_b).	13
Enačba 7: Znotraj laboratorijska natančnost.	13
Enačba 8: Koeficient variacije (S_l).....	13
Enačba 9: Odstopanje (Bias).	14
Enačba 10: Odstopanje rezultata v odstotku.....	14

POVZETEK

Preiskave ob bolniku ali preiskave POCT so preiskave, ki se izvajajo izven medicinskega laboratorija in predstavljajo obliko izvedbe in uporabe laboratorijskih preiskav, ki močno prispevajo k decentralizaciji laboratorijskih preiskav. Njihova prednost sta enostavna izvedba in hiter rezultat analize, slabost pa visoka cena. Pri preiskavah POCT se najpogosteje analizira vzorec polne krvi, kar bistveno zmanjša čas priprave vzorca in čas celotne analize. Razvoj in uporaba naprav POCT pa bo najverjetneje pomembno prispevala tudi k osebnemu in preventivnemu zdravljenju bolnikov v prihodnosti. Na področju spremljanja oralne antikoagulantne terapije se uporablja več različnih vrst naprav POCT. S postopki verifikacije je potrebno pred uvedbo preiskav in analizne opreme v rutinsko prakso preveriti podatke, ki jih za določen test oz. napravo navaja proizvajalec. Namen naše magistrske naloge je bil verificirati napravo POCT za merjenje protrombinskega časa (PČ) in aktiviranega parcialnega tromboplastinskega časa (APTČ) na oddelkih intenzivne nege in preveriti njeno uporabnost v rutinskem delu na Kliniki za bolezni srca in ožilja UKC Zagreb. Natančnost smo določili s testom ponovljivosti po priporočilih CLSI, z uporabo kontrolnih vzorcev dveh koncentracijskih stopenj. Točnost smo ocenili s primerjavo povprečne vrednosti niza meritev komercialnih kontrolnih vzorcev ter s primerjavo rezultatov analiz 40 vzorcev, pridobljenih s standardnim analizatorjem. Rezultati testov natančnosti so pokazali, da vse vrednosti izpolnjujejo zahtevana merila CLSI. Z regresijo Passing-Bablok in analizo Bland-Altman za PČ in mednarodno normalizirano razmerje (INR) in z uporabo Wilxonovega testa, ko gre za rezultate APTČ smo ocenili rezlike med meritvami POCT in standardnim analizatorjem ter ugotovili, da obstaja sorazmerno in konstantno odstopanje med vrednostmi za INR ter sorazmerno odstopanje meritev PČ, medtem ko je Bland-Altmanova analiza potrdila, da je navedeno odstopanje statistično pomembno, kar pa ne pomeni, da je tudi klinično pomembno. Test APTČ se priporoča za spremljanje učinkovitosti zdravljenja le v primeru, ko se čas strjevanja podaljša sorazmerno z nivojem heparina. Na osnovi rezultatov primerjave meritev na dveh aparataturah, ki sicer uporabljajo drugačno metodo merjenja, se je pokazalo, da bo potrebno vzpostaviti različne referenčne intervale za APTČ in vnos dobljenih rezultatov v ločeno bazo podatkov. Na osnovi naših rezultatov lahko zaključimo, da rezultati analiz POCT značilno odstopajo od rezultatov na standardnih analizatorjih za vse

tri parametre: PČ, INR ter APTČ in da je uvedba naprave POCT za preiskave ob bolniku, možna samo v primeru predhodnega usposabljanja zdravstvenega osebja.

ABSTRACT

Point of care testing (POCT) is a laboratory medicine method, and an example of decentralized laboratory testing performed next to the patient. Their advantage is simple implementation and quick result of analysis, weakness is high price. In POCT a full blood sample is most often analyzed, which significantly reduces the time from sampling to obtaining the final result. The development and use of the POCT devices will most likely also contribute significantly to personalized and preventive treatment of patients in the future. There are several different types of POCT devices used to monitor oral anticoagulant therapy (OAT). When introducing a new method in the routine work of the laboratory, it is necessary to carry out a validation or verification process to test the analytical features of the device spelled out by the manufacturer. The aim of our thesis was to verify the POCT device for measuring prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) and to assess the potential for its implementation in routine work as well as clinical utility at the Clinic for heart and blood diseases – intensive unit (University Hospital Centre Zagreb). By means of the verification experiment, total laboratory precision was determined via repeatability (intermediate precision) and reproducibility from repeated measurements. The precision of the method was assessed according to CLSI protocol, using control samples at two concentration levels. Accuracy was estimated by comparing the mean value of a series of measurements of commercial control samples with the declared value of the producer. The comparison of methods was performed by analyzing 40 patient samples on the coagulation device. The results of the assessment of precision test showed that all the obtained values meet the given criteria. With Passing-Bablok regression, and Bland-Altman analysis for PT and INR parameters, and by using Wilcoxon's test for the importance of differential parity measurement in aPTT results we evaluated the differences between the POCT measurements and the standard analyzer and found that there was a proportional and constant deviation for the INR parameter, and a proportional deviation for the PT parameter, while Bland-Altman analysis found that the deviation was statistically but not clinically significant. The aPTT test is recommended for monitoring the efficacy of therapy only when the prolonged coagulation time is proportional to heparin levels. Comparing the devices using different measurement methods shows that there is a need to establish different reference intervals for the aPTT parameter, and the ability to input the obtained results into separate databases for POCT

and routine coagulation methods. On the basis of our results, we can conclude that the results of POCT measurements typically deviate from the results on standard analyzers for all three parameters (PT/INR, aPTT) and that introduction of POCT device is possible only with a prior training of clinical staff.

KLJUČNE BESEDE

verifikacija, preiskave ob bolniku, protrombinski čas, aktivirani delni tromboplastinski čas, oddelek intenzivne nege.

KEY WORDS

verification, point of care testing, prothrombin time, activated partial thromboplastin time, intensive care department.

SEZNAM KRATIC

APA - antifosfolipidna protitelesa

APTČ – aktivirani parcialni tromboplastinski čas

b - sistematična napaka in/ali odstopanje (angl. bias)

BIS – bolnišnični informacijski sistem

CE – Certifikat o evropski skladnosti (angl. Europe Union's Certificate of conformity)

CLIA – Spremembe in dopolnila namenjena izpopolnitvam v kliničnem laboratoriju (angl. Clinical Laboratory Improvement Amendments)

CLSI – Inštitut za klinične in laboratorijske standarde (angl. Clinical and Laboratory Standards Institute)

CLSI POCT07-A – Inštitut za klinične in laboratorijske standarde, Upravljanje kakovosti: Pristopi, ki zmanjšujejo možnost napak pri izvedbi POCT (angl. Quality Management: Approaches to reducing Errors at the Point of care)

CLSI POCT09-A – Inštitut za klinične in laboratorijske standarde, Merila za izbor POCT aparata (angl. Selection criteria for Point of care Testing Devices)

CLSI/NCCLS – Inštitut za klinične in laboratorijske standarde EP15-A2 Verifikacija izvedb natančnosti in točnosti (angl. Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee on Clinical Laboratory Standards EP15-A2 – User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline-Second edition.)

CRM - certificirani referenčni material (angl. Certified Reference Material)

Cusum test – test linearnosti (angl. cumulative sum)

DIK – diseminirana intravaskularna koagulacija

ECCLS Document - dokument Evropskega odbora za standarde v klinični kemiji (angl. European Committee on Clinical Laboratory Standards)

ECMO - zunajtelesna membranska oksigenacija (angl. extracorporeal membrane oxygenation)

EIT – enote intenzivne terapije

EQC – zunanje ocenjevanje kakovosti

GUM – Navodila za izražanje nezanesljivost meritev (angl. Guide to the Expression of Uncertainty Measuremen)

INR - mednarodno normalizirano razmerje (angl. international normalized ratio)

IQC – notranja kontrola kakovosti

ISI - mednarodni indeks občutljivosti (angl. International Sensitivity Index)

ISO 15189 – ISO standard za medicinske laboratorije – zahteve za kakovost in usposobljenost (angl. Medical laboratories – requirements for quality)

ISO 22870 – ISO standard za preiskave ob bolniku (POCT) – Zahteve za kakovost in usposobljenost (angl. Point of Care testing (POCT) – Requirements for quality and competence)

IUPAC – Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo (angl. International Union of Pure and Applied Chemistry)

LA – lupus antikoagulant

LIS – laboratorijski informacijski sistem

LMWH – nizko molekularni heparin (angl. low molecular weight heparin)

MP – medlaboratorijska primerjava

NPT - preiskave v bližini bolnika (angl. near patient testing)

OAT – oralna antikoagulacijska terapija

PČ – protrombinski čas

POCT - preiskave ob bolniku (angl. point of care testing)

r - Pearsonov koeficient korelacije

rTF - rekombinantni tkivni faktor

S_b – validacijska vmesna natančnost - med serijami (angl. between run)

S_1 – znotraj laboratorijska natančnost (angl. within - laboratory)

S_r - skupni standardni odklon (angl. S_d run, average)

TAT - čas od vzorčenja do končnega rezultata (angl. turnaround time)

UCI – zgornji interval zaupanja (angl. upper confidence interval)

UFH - nefrakcionirani heparin (angl. unfractionated heparin)

VIM – Mednarodni slovar za meroslovje (angl. International Vocabulary of Metrology)

WLAN - brezžična povezava z omrežjem (angl. wireless local area network)

1. UVOD

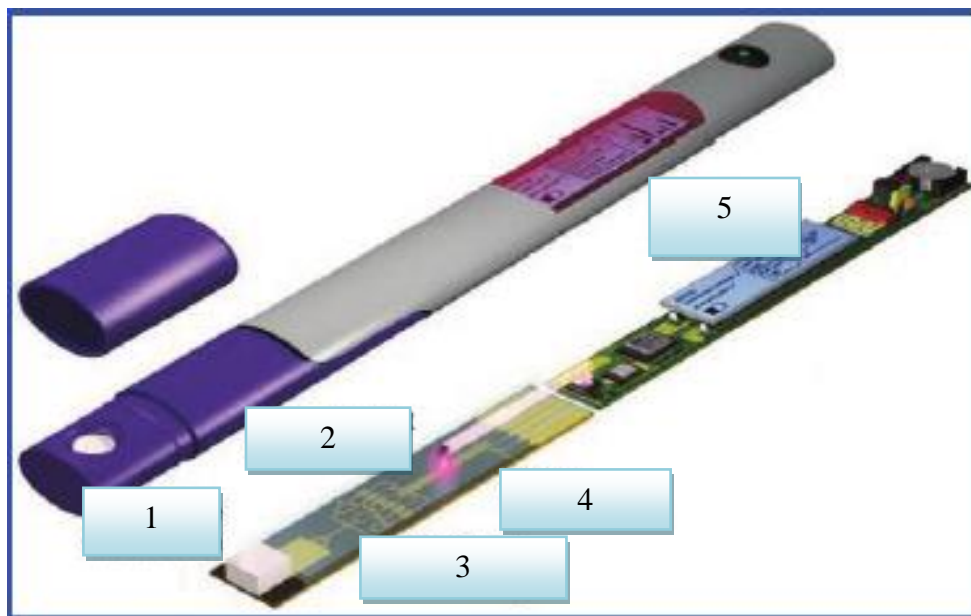
1.1. Preiskave ob bolniku

Preiskave ob bolniku (angl. point of care testing, POCT) in preiskave v bližini bolnika (angl. near patient testing, NPT) uporabljamo kot sinonima za analize, ki jih izven laboratorija lahko izvaja medicinsko osebje klinične stroke (najbolj pogosto medicinske sestre), ali ne laboratorijsko osebje in celo bolnik sam. Z namestitvijo naprave v bližino bolnika dosežemo hitrejšo analizo vzorcev, s tem pa prej dostopne rezultate preiskav v primerjavi z rezultati, dobljenimi v laboratoriju. Hitro dostopni rezultati preiskav so velikokrat izredno pomembni, zlasti v nujnih primerih in tako pomagajo zdravniku pri izbiri ustreznega ukrepanja oziroma zdravljenja. Cilj številnih laboratorijskih preiskav je točna postavitve klinične diagnoze in spremljanje določene terapije. Laboratorijska medicina je torej ena izmed glavnih temeljev diferencialne klinične diagnoze, kot tudi splošne medicine. Sodobna oblika uporabe laboratorijske medicine je deloma povezana tudi z decentralizacijo laboratorijskih preiskav, ki se na podlagi tega izvajajo neposredno ob bolniku (1).

Naprave POCT imajo navadno vgrajene biosenzorje in glede na opredelitev Mednarodne zveze za čisto in uporabno kemijo (angl. International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC), je biosenzor naprava za analizo, ki je namenjen zaznavanju analita, sestavljenega iz biološke in fizikalno-kemične komponente. Sam proces zaznavanja poteka v malih sistemih, kjer so biološke komponente vpete v stacionarno fazo (trdno površino). Takšne interakcije je mogoče zaznati z uporabo elektrokemijskih ali optičnih metod. Naprave POCT, ki so trenutno na voljo, lahko razvrstimo glede na vrsto senzorja, metodo merjenja, princip detekcije signala in/ali vrsto vzorca (2).

Idealna naprava POCT je sestavljena iz: 1 – področja za nanos vzorca, 2 – dela (enote) za prepoznavanje analita, 3 – mikropretočnega sistema za obdelavo vzorca, 4 – dela (enote) za pretvorbo signala in 5 – elektronske izhodne enote (Slika 1). Naprava omogoča analizo vzorca izredno majhnega volumna (od nekaj 100 nL do ~ 1 mL) in analizo analitov zelo nizkih koncentracij v kompleksnih bioloških vzorcih, od femtomolarnih do milimolarnih koncentracij. Za tovrstne naprave POCT je še posebej pomembna sprejemljiva cena. Na trgu obstajajo različne vrste naprav POCT, npr. reagentni trakovi ali zamenljivi dodatki, ki vsebujejo mikropretočne systemske komponente, ki obenem kontrolirajo pripravo vzorca, hitrost pretoka in mešanje uporabljenih reagentov v sistemu. Tako dosežemo učinkovito in pravočasno izvedbo laboratorijske preiskave. Prisotno je tudi odstranjevanje neanalitskih

komponent samega vzorca (matriksa). To omogoča bolj natančno in učinkovitejše merjenje vzorcev (3).



Slika 1: Idealna naprava POCT

[3].

Naprave POCT omogočajo analizo vzorcev izredno majhnega volumna. V večini primerov ni potrebna priprava vzorcev pred analizo. Pri navedenih napravah se največkrat uporablja vzorec polne krvi. S tem se izognemo pripravi seruma ali plazme in centrifugiranju vzorcev, kar občutno zmanjša čas od vzorčenja do končnega rezultata (angl. turnaround time, TAT). Uporaba diagnostike POCT prinaša številne znane klinične prednosti: hitreje pridemo do rezultatov analize, kar omogoča krajši čas, potreben za triažo in zdravljenje bolnikov. Manj je bolnišničnih sprejemov (pri preiskavah POCT za samokontrolo), krajše pa je tudi trajanje njihovega bivanja ter postoperacijsko okrevanje bolnikov, kar omogoča njihovo optimalno terapijo. Te prednosti omogočajo optimizacijo porabljenega časa, povečanje učinkovitosti in zadovoljstva, tako zdravstvenega osebja, kot tudi bolnikov (4). Seveda pa k zdravljenju lahko prispevajo le, če uporaba preiskav POCT daje zanesljive rezultate, ki so primerljivi z rezultati iz laboratorija, pridobljenih z analizami na klasičnih (standardnih) analizatorjih. Naprave POCT imajo poleg prednosti tudi številne pomanjkljivosti, ki nastajajo ob uvajanju naprav brez ustreznega preverjanja analitskih ali kliničnih pomanjkljivosti, neprimerne usposabljanja osebja in slabe kakovosti testov (reagentov). Pomanjkljivosti lahko pripeljejo do nepravilnih rezultatov in neposredne škode za bolnike (Preglednica I). Težave pri izvajanju analize lahko nastanejo

zaradi omejenih tehničnih lastnosti naprave, kar lahko vpliva na pravilnost in zanesljivost dobljenih rezultatov preiskav. Na ta način lahko neposredno vplivajo na varnost bolnika. Napake v predanalitični fazi niso redke, njihovo pogostost pa lahko zmanjšamo tako, da upoštevamo mednarodne smernice in priporočila, izdana s strani pristojnih strokovnih združenj¹. Da bi se lahko pravilno odločali o načinu izvedbe, potrebah in vrsti laboratorijskih preiskav, je za uvedbo preiskav POCT pomembno timsko delo zdravnikov in medicinskih biokemikov. Pozornost laboratorijskih strokovnjakov moramo osredotočiti na kontrolo kakovosti in nadaljnje izobraževanje nelaboratorijskega osebja izven laboratorija, ki preiskave izvaja, hkrati pa poiskati še več kliničnih dokazov, ki nam bodo pomagali pri upravičeni uporabi naprav POCT in dejanskemu prepoznavanju bolnikov, ki potrebujejo nujno diagnostiko (5) (6).

Tabela I: Prednosti in slabosti preiskav ob bolniku

(6).

Prednosti	Slabosti
S skrajšanjem predanalitske, analitske in postanalitske faze dosežemo krajši čas od vzorčenja do končnih rezultatov (TAT).	Izdaja napačnih izvidov zaradi nezadostnega izobraževanja nelaboratorijskega osebja, neizvajanje kontrole kakovosti in odkrivanja napak naprave ter napačnih rezultatov, kar lahko privede do napačne obravnave bolnika.
Skrajšanje časa od pridobljenih rezultatov do priporočene terapije za bolnika (terapevtski TAT), tj. hitrejša možnost zdravljenja.	Slaba primerljivost rezultatov, pridobljenih z različnimi metodami (laboratorijske metode glede na POCT).
Uspešno spremljanje nekaterih kliničnih stanj pri bolnikih, ki potrebujejo redne diagnostične preiskave (npr. diabetes in antikoagulantna terapija).	Nakup dodatne opreme, dragi reagenti in visoki stroški zunanje kontrole kakovosti (EQC).
Večja priročnost naprav POCT in večja dostopnost zdravstvenih storitev (npr. pri starejših bolnikih).	Napačno poročanje in dokumentiranje rezultatov POCT.

¹ISO 15189: Medical laboratories – requirements for quality; ISO 22870: Point of Care testing (POCT) – Requirements for quality and competence; CLSI POCT07-A: Quality Management: Approaches to reducing Errors at the Point of care; CLSI POCT09-A: Selection criteria for Point of care Testing Devices.

Prednosti	Slabosti
Za analizo so potrebni majhni volumni vzorca, zato so preiskave POCT manj invazivne.	Uvedba metod POCT lahko privede do preobremenjenosti kliničnega osebja.
Hitrejši rezultati zmanjšujejo zaskrbljenost bolnikov.	Namestitvev poškodovanih naprav za POCT ali neodkrivanje njihovih omejitev, povečuje tveganje pri določanju ustreznega bolnikovega zdravljenja.
Preiskave POCT so primerne za izvajanje presejalnih testiranj prebivalstva za odkrivanje bolezenskih kliničnih stanj v zgodnji fazi.	
Povečana možnost za opravljanje zdravstvenih storitev laboratorijskih preiskav na oddaljenih lokacijah in izven laboratorijskega delovnega časa.	

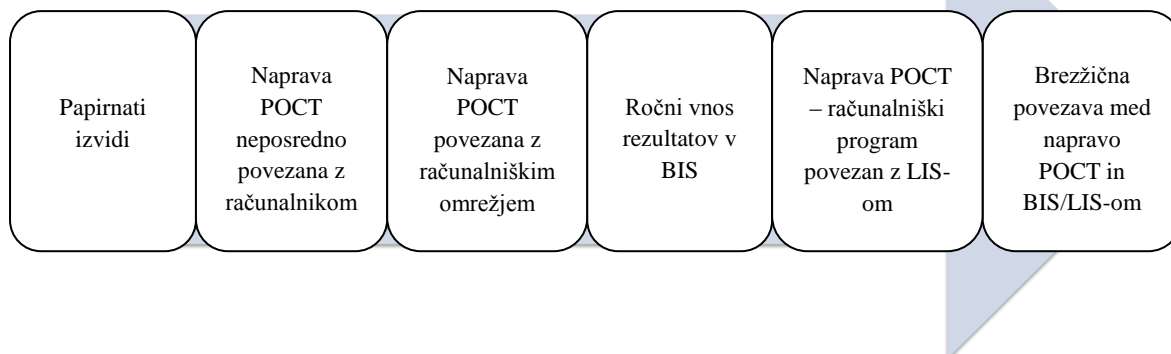
Veliko kazalcev nakazuje na to, da je širjenje zdravstvenih storitev povezano s povečanim povpraševanjem po diagnostičnih preiskavah, ki nudijo možnost napovedovanja in spremljanje terapije različnih bolezni, oziroma se jih lahko uporablja v presejalne namene. Pri bolj kompleksnih preiskavah pa klasične laboratorijske diagnostične metode pod določenimi pogoji niso kos tako obsežnim zahtevam. Klasična laboratorijska medicina potrebuje: kompleksno infrastrukturo, kontrolirane pogoje okolja (npr. temperatura in vlažnost), ustrezno laboratorijsko osebje in stabilno oskrbo (z reagenti, potrošnim materialom, elektriko, vodo itd.). Vendar pa nekatere izmed teh potreb niso vedno na voljo, zlasti na podeželju ali na območjih, ki so jih prizadele elementarne nesreče. Laboratorijske analize se običajno izvajajo v oddaljenih laboratorijih, kar za sistem zdravstvenega varstva predstavlja določeno stopnjo finančnega bremena, kot tudi morebitno neustrezno obravnavo skupin nekaterih bolnikov. Obstaja velika verjetnost, da bodo naslednje generacije naprav POCT, ki uporabljajo natančne biološke označevalce, omogočale uspešno spremljanje različnih bioloških procesov v telesu. Na ta način bodo izkoriščene izboljšave na področju nanotehnologije, mikropretočnih sistemov in brezžične povezave, kar pa lahko privede do znatnih izboljšav na področju zdravstvenih storitev (5).

1.2. Uporaba naprav POCT

Domnevajo, da naj bi vrednost svetovnega trga diagnostike POCT do konca leta 2022 znašala 38 milijard ameriških dolarjev. Do rasti trga je prišlo predvsem zaradi vse večjega števila bolnikov z nalezljivimi boleznimi v državah v razvoju. Današnji način življenja je privedel tudi do večje pojavnosti bolezni srca in ožilja ter sladkorne bolezni in drugih kroničnih bolezni. To je tudi razlog, da se je povečala potreba po uporabi bolj enostavnih, sodobnih in hitrejših (hišnih) naprav POCT za samotestiranje bolnikov (7).

V skladu s povečanjem tehnoloških inovacij v zdravstvu, ki vključujejo aplikacije za pametne telefone, biosenzorje (angl. lab on a chip) in prenosne naprave, so dosegli boljšo povezanost zdravnika in bolnika. Osnovno načelo novih tehnologij omogoča, da bodo preiskave ob bolniku bolj domače in razumljivejše, kar omogoča hitrejši prenos informacij od izvida do naročnika preiskav. Tehnologije POCT omogočajo hitrejšo sprejemanje kliničnih odločitev v bolnicah in ustrezno obravnavo bolnikov v ambulantah in izven njih. Namen preiskave ob bolniku je hitrejši rezultat analize, ki omogoča tudi hitrejšo klinično odločitev glede bolnikovega zdravljenja. Razvoj, uporaba in povezanost prenosnih naprav POCT bo v prihodnosti del uspešnega preobrata, s splošnega in konzervativnega, na osebno in preventivno zdravljenje bolnikov. Glede na to, da preiskave ob bolniku zahtevajo manj korakov v primerjavi z laboratorijskimi preiskavami (transport in predhodna obdelava vzorcev nista potrebna), lahko brez dvoma trdimo, da to pozitivno vpliva na krajšanje časovnega obdobja, ki je potrebno za pridobivanje izvidov laboratorijskih preiskav (4).

Zelo pomemben člen pri razvoju naprav POCT je njihovo vključevanje v laboratorijski informacijski sistem (LIS). Povezava naprav POCT omogoča elektronsko shranjevanje rezultatov analize, obenem pa so le-ti vidni v laboratorijskem in bolnišničnem informacijskem sistemu (BIS). Pri povezovanju naprave POCT z LIS in BIS je možna uporaba smernic Inštituta za klinične in laboratorijske standarde POCT 1-A2. Napredek v povezavi med napravo POCT in LIS ter BIS, bo privedla do bistvenih izboljšav pri izvedbi diagnostike POCT (Slika 2). Z elektronskim shranjevanjem rezultatov se bodo zmanjšale napake, nastale pri tiskanju, do katerih lahko pride pri ročnem načinu vnašanja rezultatov. Elektronski sistem bo v vsakem trenutku omogočil spremljanje, ali se kontrola kakovosti v celoti pravilno izvaja (8).



Slika 2: Napredek pri povezavi naprav POCT

[4].

Svetovni trg želi z vse bolj številnimi dokazi, ki govorijo v prid razvoju diagnostike POCT, dati na voljo še hitrejše, bolj preproste in zanesljive naprave, ki jih lahko razdelimo v več glavnih skupin:

- naprave POCT za določanje plinov/elektrolitov v krvi,
- naprave POCT za določanje srčnih markerjev,
- naprave POCT za določanje holesterola/lipidov,
- naprave POCT za spremljanje koagulacije,
- naprave POCT za testiranje psihotropnih snovi,
- testi POCT okultne krvavitve,
- testi POCT za kontrolo varnosti hrane,
- naprave POCT za spremljanje glukoze,
- naprave POCT za hematološke preiskave,
- naprave POCT za infekcijske bolezni,
- testi POCT za nosečnost in plodnost,
- testi POCT za tumorske označevalce,
- naprave POCT za analizo urina (4).

Pri vpeljavi uporabe naprav POCT, nikakor ne smemo pozabiti na pomembnost izobraževanja vsega laboratorijskega in kliničnega osebja. Izobraževanje mora vsebovati vse glavne točke v zvezi z njegovo uporabo:

- osnovne lastnosti in funkcije naprave POCT,
- vrsto vzorca, ki se uporablja v preiskavi,
- način izvedbe preiskave,

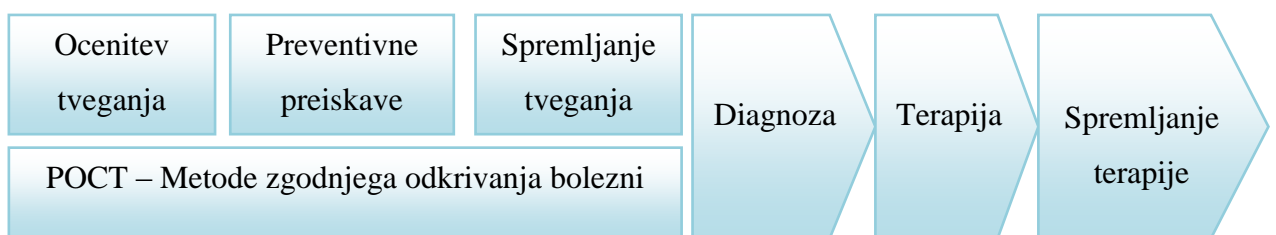
motnje, ki lahko bistveno vplivajo na rezultat analize (spremembe),
osnovno vzdrževanje naprave,
način shranjevanja rezultatov,

podatki o primerljivosti pridobljenih rezultatov z rezultati iz glavnega laboratorija.

Ravno to, da je usposabljanje vsega osebja dobro načrtovano in izvedeno, je ključnega pomena za zanesljivo uporabo diagnostike POCT.

1.3. Preiskave POCT in bolniku prilagojena medicina

Število bolnikov, ki potrebujejo bolnišnično zdravljenje, kot tudi čas njihovega bivanja v bolnišnici, se bosta v bližnji prihodnosti močno zmanjšala. To pa vodi do večjega števila izven ambulantnih zdravljenj in kontrole bolnikov na njihovih domovih. Po pričakovanjih, naj bi se razvoj diagnostike POCT znatno povečal na področjih zdravljenj, kjer so potrebne trenutne odločitve o nadaljni diagnostiki in zdravljenju bolnikov. Z rastjo obstoječih preiskav, npr. za glukozo, protrombinski čas in mednarodno normalizirano razmerje, je za zdravnike v praksi zelo pomembna tudi diagnostika nalezljivih bolezni. Na ta način bo hišna oskrba bolnika daljša in popolnejša (Slika 3). Vsa prizadevanja v zvezi z zdravljenjem, bodo šla v smeri t.i. „personalizirane medicine“² oz. „bolniku prilagojene medicine“. „Telemedicina“³ je pri tovrstni laboratorijski diagnostiki zelo uporabna. Ta naj bi omogočala sprotno izmenjavo podatkov med merilno napravo POCT, ki se uporablja za spremljanje/kontrolo bolnika in lečečim zdravnikom. Tako bi bilo zagotovljeno pravočasno terapevtsko ukrepanje. Na ta način se izboljšujeta učinkovitost in varnost spremljanja/kontrole bolnika, predvsem v izven bolnišničnem zdravljenju (2).



Slika 3: Preventivna medicina izvedena s pomočjo zgodnjega odkrivanja kroničnih bolezni [2].

²Pristop terapevtskega modela, ki je osredotočen na vsakega bolnika posebej, kar omogoča bistveno boljše končne rezultate zdravljenja.

³Zagotavljanje zdravstvenega varstva in izmenjava informacij v zvezi z omogočanjem zdravstvene oskrbe na daljavo, s pomočjo telekomunikacijske tehnologije. Pravilnik o pogojih, organizaciji in metodah izvajanja telemedicine ("Narodne Novine", broj 138/2011. i 110/12.).

1.4. Kontrola kakovosti preiskav POCT

Kontrola kakovosti pri testiranju POCT pomeni nadzor vsakega dela analize, ki bi lahko vplival na končni rezultat. Testiranje POCT ima kot vsako drugo laboratorijsko testiranje svojo predanalitično, analitično in postanalitično fazo. Novejše naprave POCT omogočajo samodejno shranjevanje rezultatov že v času izvajanja preiskav in prenos podatkov v računalniški program POCT ali LIS. Uvedba skupnega standarda, namenjenega povezavam, kot je POCT1-A (CLSI), omogoča skupno povezovanje različnih naprav, kar pomeni, da si delijo isti programski vmesnik. Na ta način se zagotavlja nujen nadzor nad napravami POCT izven laboratorija ter njihova povezanost z odgovornim medicinskim laboratorijem skupne baze podatkov in kontrola kakovosti, kar omogoča zmanjšanje stroškov pri vpeljavi novih naprav POCT. Na primer, z uporabo zahtev CLIA⁴, je kontrolo kakovosti treba usmeriti na celoten postopek testiranja, od zdravnikove zahteve, predanalitske faze zbiranja vzorcev, upravljanja aparata, ustrezne usposobljenosti laboratorijskega osebja, do poročanja in interpretacije končnih rezultatov (Preglednica II) (9). Mednarodni standard ISO 22870 opredeljuje kakovost sistema POCT na podoben način.

Tabela II: Pregled segmentov kontrole kakovosti za naprave POCT
[10] [11].

Spremljanje kakovosti POCT
<ul style="list-style-type: none">• Skladnost s predpisi CLIA
<ul style="list-style-type: none">• Usposabljanje in ustrezna dokumentacija za vse izobražene uporabnike
<ul style="list-style-type: none">• Pregled kalibratorja, zagotavljanje kontrole kakovosti
<ul style="list-style-type: none">• Preverjanje rezultatov pred izdajanjem
<ul style="list-style-type: none">• Sistem naročanja, poročanja in shranjevanja rezultatov
<ul style="list-style-type: none">• Samodejno shranjevanje informacij o stroških

⁴CLIA '88 (angl. Clinical Laboratory Improvement Amendments, 1988) je združenje federalnih zakonov, ki regulirajo laboratorijsko testiranje. Ustanovljeni so bili z namenom zagotavljanja kakovostnih, zanesljivih, varnih in točnih testiranj, v vseh vrstah laboratorijev Združenih držav Amerike.

Spremljanje kakovosti POCT

- Spremljanje elektronske povezave v laboratorijskem informacijskem sistemu (LIS)

V laboratorijih se analitska kontrola izvaja preko notranjega (IQC) in zunanjega ocenjevanja kontrole kakovosti (EQC) in medlaboratorijske primerjave (MP). Cilj stalnega izvajanja kontrole so stabilni analitski merilni sistemi, ki dajejo zanesljive rezultate. Naprave POCT omogočajo samodejno notranjo kontrolo kakovosti, saj imajo že vgrajene dodatke, ki so namenjeni kontroli. Realizacija samodejne notranje kontrole analize, je možna z vgrajenimi kontrolnimi materiali, ki se znotraj naprave avtomatsko obdelujejo po že vnaprej definiranih časovnih intervalih. Te določi proizvajalec same naprave ali operater, saj je uporaba regulacijskih postopkov nujna. Takšna vrsta avtomatskega nadzora je lahko izdelana zato, da preveri vse ali le nekatere komponente analitičnih naprav, lahko pa se uporabi tudi v kombinaciji s komercialnimi kontrolnimi materiali. Z uporabo takšnih notranjih kontrolnih materialov, se potreba po posredovanju operaterja lahko bistveno zmanjša ali v celoti odpravi. Elektronske kontrole omogočajo spremljanje temperature, časa inkubacije, ustreznosti vzorčnega volumna ali volumna reagentov, kakovosti vzorca (prisotnost strdkov) in obveščajo operaterja o neskladnostih, ki se lahko pojavijo pri analizi. Naprave, ki uporabljajo testne trakove, vsebujejo vse komponente za merjenje v samih testnih trakovih, ti pa so največkrat povezani s kalibracijo serijske proizvodnje.

Kalibracijski parametri se vnesejo v napravo s pomočjo mikročipa ali čitalnika črtne kode in tako ne obstaja možnost za posamezno kalibracijo. Glede na to, da tak enostavnejši tip naprave nima vgrajenih kalibratorjev in kontrolnih vzorcev v testnih trakovih, bi moral imeti v primerjavi z ostalimi napravami POCT (npr. tistimi, ki uporabljajo nadomestljive dodatke), bolj stroge zahteve glede IQC. Testni trakovi se na začetku vsake uporabe preverjajo s kontrolnimi vzorci na različnih stopnjah. IQC se izvaja vsakodnevno, saj takšne naprave nimajo vgrajenih kontrolnih delov.

Da bi bil mednarodni standard ISO 22870, ki določa uporabo naprav POCT izpolnjen, je treba vse naprave POCT vključiti v EQC. Le-to je osnova cikla, ki pomeni nenehno izboljševanje, nudi pa informacije o ocenitvi glede pravilnosti rezultatov in primerjave z drugimi napravami iz iste skupine. Takšen način spremljanja analitskega sistema, ocenjuje kakovost analitske izvedbe in usposobljenost uporabnikov v določenem časovnem obdobju. Poročila oz. rezultati EQC-a predstavljajo laboratorijske sisteme, ki so izven meja

sprejemljivosti, ti pa so dolžni odkriti vzroke in ustrezne rešitve za izvajanje korektivnih ukrepov. Dober program EQC obsega primerljive, stabilne in homogene kontrolne materiale istega biološkega vzorca (matriksa) s klinično značilnimi koncentracijami, ciljne vrednosti pa morajo biti določene z referenčnimi metodami (Preglednica III) (12).

Tabela III: Posebnosti kontrolnih materialov, namenjenih POCT [13].

Lastnosti idealnega kontrolnega materiala	
1.	Primerljivost – obnašanje materialov na način, ki je enak vzorcem pacientov
2.	Homogenost – značilnost, ki se nanaša na enakomernost izmerjenih vrednosti iz istega kontrolnega materiala.
3.	Stabilnost materiala (najbolje, da gre za isto serijsko številko) za daljše obdobje njegove uporabe.
4.	V primeru kliničnih odločitev, bi ciljne vrednosti, dobljene z analizo kontrolnih materialov, morale biti v okviru zelenih vrednosti, kar zagotavlja njihovo veljavnost.
5.	Ciljne vrednosti, ki so pridobljene v referenčnem laboratoriju.
6.	Zadostna količina.
7.	Preprosta uporaba.
8.	Sprejemljiva cena.

Naprave POCT, s katerimi analiziramo vzorce polne krvi lahko merijo signal na različne načine. Na podlagi tega se določi vrsta uporabljene delovne kontrole. Na primer, princip, po katerem koagulacijske naprave POCT odkrivajo nastanek strdka je amperometrična (elektrokemična) meritev trombinske aktivnosti. Primeren kontrolni material je liofilizirana plazma. Vrednosti INR stabilnih pacientov, naj bi se med preiskavami POCT in laboratorijem razlikovale za 0,5 enot. Takšno kontrolo kakovosti bi morali ponavljati vsakih 6 mesecev. Testni trakovi v napravi imajo vgrajeno funkcijo notranje kontrole kakovosti, ki po nanosu vzorca, omogoča nadzor nad pravilnostjo naše preiskave. Kakovost dobljenih rezultatov INR v laboratorijih pogosto niha. Obstajajo

razlike v preiskavah med POCT in rutinskimi metodami, toda ni nujno, da je to posledica težav naprave POCT. Znano je, da prihaja do neskladnosti med metodami za določanje INR, predvsem v primeru nestabilne OAT (oralna antikoagulacijska terapija) in pri vrednostih, ki so večje od 4,5. (1)

1.5. Validacija in verifikacija laboratorijske preiskave

Odgovornost analitikov je, da pred uvedbo novih delovnih metod izvedejo validacijo metode. Cilj validacije je določitev parametrov, na podlagi katerih izvajalec zagotavlja, da metoda daje zanesljive rezultate meritev. Validacija nekega elementa (npr. merilnega postopka, metode) je zagotavljanje objektivnih dokazov, da ta element izpolnjuje zahteve. Meritveni pristop mora zagotoviti sledljivost rezultatov in vrednotenje nezanesljivosti meritev, kar pa je predpogoj za pridobitev zanesljivih, verodostojnih in mednarodno sprejetih rezultatov laboratorijskih preiskav po mednarodnem standardu ISO 15189. Nezanesljivost meritev je značilnost izmerjenega rezultata in ne metode ali merilnega postopka (14). Validacija merilnega postopka je osnova za oceno kakovosti izvedene preiskave in zagotovi zanesljivost rezultatov in tudi indikator večine pomanjkljivosti preučevane metode (15). Postopek CLSI/NCCLS⁵ omogoča standardiziran in enostaven postopek z zmanjšanim obsegom analitične validacije, oziroma verifikacije kvantitativnih metod in je nasledil dokument Evropskega odbora za standarde v klinični kemiji⁶ (16, 17). Postopek EP15-A2 se uporablja za že preverjene analitične metode s strani proizvajalca (v državah Evropske unije vsi medicinsko-diagnostični pripomočki nosijo oznako CE) in služi kot orientacija laboratorijskim strokovnjakom, preden se začne metoda uporabljati v klinične namene. Namen verifikacije metode je pokazati, da le-ta dosega analitske lastnosti, ki jih navaja proizvajalec (18).

Postopek verifikacije je sestavljen iz 5 delov:

- spoznavanje analitskega sistema,
- ocena natančnosti meritev,
- ocena točnosti meritev,

⁵ Smernice Inštituta za klinične in laboratorijske standarde: postopek EP15-A2 (angl. Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI: EP15-A2 – User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline. 2nd ed.).

⁶ Dokument Evropskega odbora za standarde v klinični kemiji (angl. European Committee on Clinical Laboratory Standards, ECCLS), zvezek 3, številka 2, leto 1986. Uporabljena je terminologija iz Mednarodnega slovarja za meroslovje VIM 3 (angl. International Vocabulary of Metrology), ki je v skladu z najnovejšimi strokovnimi priporočili in zahtevami akreditacije. Slovar je uspel povezati in uskladiti terminologijo na vseh področjih laboratorijske medicine in drugih kemičnih meritev.

preverjanje linearnosti/merilnega območja analizne metode,
preverjanje referenčnih intervalov.

Da bi pridobili dovolj izkušenj za uspešno izvedbo verifikacijskega eksperimenta, se moramo v skladu z zahtevami standarda ISO 15189 seznaniti z obravnavanim analitičnim sistemom. Pri tem ovrednotimo uporabnost, tehnične lastnosti (volumen vzorcev, hitrost vzorčenja, poraba reagentov) ter kalibracijske parametre metode in izvedemo IQC. Pomembno je, da razumemo uporabljeni računalniški sistem in postopke vzdrževanja analitičnega sistema (naprave POCT) in drugih aktivnosti, ki so v skladu z zahtevami za zagotavljanje kakovosti (18).

Postopki verifikacije zajemajo vsa vrednotenja merilne natančnosti oziroma velikost naključne napake, ki izhaja iz večinoma neznanih vzrokov, posledica katerih pa so pozitivna in negativna odstopanja od povprečne vrednosti. Razlog naključne napake leži v vsaki izvedbi analitskega postopka in njegovi ponovljivosti, ki ni popolna. Izražena je s standardnim odklonom (S_d) (Enačba 1) ali koeficientom variacije (KV) (Enačba 2).

Natančnost se preverja prek serije vzorcev (ponovljivost) in dnevne natančnosti - iz dneva v dan («recovery»). Ponovljivost je izražena z vrednostjo skupnega standardnega odklona (S_r), ta pa je izračunana iz standardnih odklonov, ki jih dobimo vsakodnevno v času petih meritev (Enačba 3). Natančnost merjenja se določi z merjenjem dveh koncentracijskih območij, za vzorce pa lahko vzamemo: kontrolni material, standarde, predhodno analizirane vzorce pacientov ali ustrezne vzorce znanih vrednosti. Pri krajši analitski verifikaciji, določimo ponovljivost, vmesno natančnost in skupno laboratorijsko natančnost, iz manj številčnih meritev ($n=30$). Razlog za to je racionalna uporaba cenovno dragih reagentov (18, 19, 20).

Enačba 1: Standardni odklon.

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Enačba 2: Koeficient variacije (S_r).

$$KV \% = \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100$$

Enačba 3: Skupni standardni odklon.

$$S_r = \sqrt{\frac{S_{d1}^2 + S_{d2}^2 + S_{d3}^2 + S_{d4}^2 + S_{d5}^2}{D}}$$

Validacijska vmesna natančnost (S_b) je standardni odklon, ki se izračuna iz standardne aritmetične sredine vsakodnevnega določanja (medserijsko) (Enačbe 4, 5, 6).

Enačba 4: Standardna aritmetična sredina.

$$\bar{\bar{x}} = \frac{\bar{x}_{d1} + \bar{x}_{d2} + \bar{x}_{d3} + \bar{x}_{d4} + \bar{x}_{d5}}{D}$$

Enačba 5: Vmesna natančnost.

$$S_b = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D (\bar{x}_d - \bar{\bar{x}})^2}{D - 1}}$$

Enačba 6: Koeficient variacije (S_b).

$$KV \% = \frac{S_b}{\bar{\bar{x}}} \times 100$$

Znotraj laboratorijska natančnost (S_l) se nanaša na tiste vzorce, ki se v rutinskem laboratorijskem delu analizirajo brez ponavljanj in obsega napako ponavljanja ter vmesne natančnosti (Enačba 7, 8).

Enačba 7: Znotraj laboratorijska natančnost.

$$S_l = \sqrt{\frac{n-1}{n} \times s_r^2 + s_b^2}$$

Enačba 8: Koeficient variacije (S_l).

$$KV \% = \frac{S_l}{\bar{\bar{x}}} \times 100$$

Meje nenatančnosti so določene glede na biološke variacije določenih analitov. Podatki, ki določajo skupno laboratorijsko natančnost, so potrebni pri vrednotenju nezanesljivosti meritev v skladu z mednarodno usklajenimi smernicami⁷ (18, 19).

Z izrazom točnost opredelimo, kako blizu je rezultat, ki smo ga dobili pri meritvah določenega analita, v primerjavi z njegovo dejansko vrednostjo. Povezana je s sistematično napako, kar pomeni, da odstopanje vseh rezultatov analitskega postopka poteka v isti smeri. Ta na koncu tudi pokaže, v kolikšni meri odstopa rezultat od prave vrednosti, ki ga občasno označimo kot netočen. Točnost podajamo z znano sistematično napako b in/ali odstopanjem. Določi se s primerjavo vrednosti, pridobljenih z referenčno metodo ($x_{\text{referenčno (CRM)}}$) in z izmerjeno metodo (aritmetična sredina, $\bar{x}_{\text{izmerjeno}}$) (Enačba 9) ali kar je še bolj pogosto z analizo certificiranih referenčnih materialov (CRM) (14). Vrednosti biasa se lahko izrazijo v merskih enotah ali z odstotkom prave vrednosti (Enačba 10) (19, 21).

Enačba 9: Odstopanje (Bias).

$$bias = \bar{x}_{\text{izmerjeno}} - x_{\text{referenčno (CRM)}}$$

Enačba 10: Odstopanje rezultata v odstotku.

$$\% \text{ Odstopanja} = \frac{x_{\text{lab}} - x_{\text{ref}}}{x_{\text{ref}}} \cdot 100$$

Tako se izraža nezanesljivost meritev in beleži merilna sledljivost. Vrednotenje primerjave se izvaja s pomočjo analize na vzorcu 20 pacientov (enkratne meritve) s koncentracijskim območjem določenega analita preko celega linearnega področja. Preiskave izvedemo z uporabo dveh metod: z metodo iz verifikacijskega postopka in z referenčno metodo. Na ta način ugotovimo, ali obstaja bistvena razlika v rezultatih. Kako velika je sistematična napaka ugotovimo tako, da izračunamo odstopanje od pričakovane vrednosti CRM.

Vsaka kratka analitska verifikacija mora vsebovati poročilo o doseženih rezultatih. Poročilo obsega evalvacijo doseženih rezultatov in sklep o tem, ali izpolnjujejo merila. Pred izvedbo verifikacije je pomembno, da določimo meje sprejemljivosti. Poznamo kar nekaj strategij, namenjenih njihovem določanju, najširše sprejeta merila sprejemljivosti laboratorijskih preiskav pa so tista, ki temeljijo na biološki variabilnosti. Biološka merila

⁷Navodila za izražanje nezanesljivosti meritev (angl. Guide to the Expression of Uncertainty Measurement, GUM) izdanega leta 1993, korekcija pa leta 1995 v skladu z akreditacijsko zahtevo 5. 6. 2.

sprejemljivosti niso vedno dostopna, priporočljivo pa je, da se doseženi rezultati ocenijo s pomočjo meril, danih s strani proizvajalca reagentov, organizatorja EQC, podatkov iz ustrezne literature ali lastnih meril, na podlagi klinične osnove (18, 20).

Posebno pozornost v procesu verifikacije analitskih metod in naprav, je treba nameniti področju primerjave metod. Z regresijo Passing-Bablok ter z analizo Bland in Altman, pridemo do potrebnih informacij o ujemanju dveh metod in do morebitne prisotnosti sistematične napake med njima. Z izračunom Pearsonovega koeficienta korelacije (r) pridemo do podatka o korelaciji oz. povezanosti meritev (19). Pogoji za uporabo regresijskega modela so normalna porazdelitev podatkov in linearna korelacija med meritvenimi vrednostmi. Taka vrsta statistične obdelave omogoča preverjanje usklajenosti uporabljenih metod in prisotnost sistematične razlike v meritvah. Pri regresijski analizi Passing-Bablok so rezultati izraženi s pikčastim slikovnim prikazom (angl. scatter diagram) in regresijsko premico ter enačbo premice. Vrednost odseka pomeni konstantno, vrednost nagiba pa sorazmerno odstopanje od meritev. Na podlagi teh vrednosti pridemo do zaključka o ujemanju metod in morebitnem uvajanju korektivnih postopkov. Slikovni prikaz ubežnikov (angl. outliers) nam pokaže vrednosti, ki so izven sklopa podatkov ter možnost nelinearnega odnosa med obdelanimi podatki.

Linearnost podatkov se preverja s pomočjo testa linearnosti Cusum (angl. cumulative sum). Z določitvijo nelinearnega odnosa med podatki je izključena možnost sklepanja, da so metode usklajene (22). Korelacija preverja odnos med spremenljivkami, ne pa razliko, tako da na podlagi tega ni priporočljiva za primerjavo dveh metod. Obstaja alternativna statistična analiza Bland in Altman, ki temelji na kvantifikaciji ujemanja proučevanih merilnih metod. Ta določa srednjo vrednost na podlagi merilnih razlik. Za takšno statistično obdelavo je pomembna porazdelitev podatkov, ker se srednja vrednost merilnih razlik izraža samo pri nesorazmernih odstopanjih (v primeru normalne porazdelitve). Bland in Altmanov graf (angl. difference plot) izraža podatke glede ocenitve intervala zaupanja, v katerem je 95% razlik med meritvami. Podatke se da prikazati kot absolutne razlike, v merskih enotah ali v odstotku, kot odstopanje pri meritvah. Bland in Altmanov statistični prikaz določa interval ujemanja, meje sprejemljivosti pa je treba vnaprej določiti na podlagi kliničnih potreb, bioloških obravnav ali nekaterih drugih meril (23).

2. NAMEN DELA

Namen dela je izvesti verifikacijo naprave POCT za merjenje protrombinskega časa (PČ) in aktiviranega parcialnega tromboplastinskega časa (APTČ) ter preučiti, ali obstaja klinična uporabnost navedene naprave za oddelek intenzivne nege.

Pri verifikaciji naprave POCT smo preučevali pravilnost (Bias), natančnost in linearno območje metode. Natančnost bomo določili z določitvijo ponovljivosti v seriji in s ponovljivostjo iz dneva v dan. Pravilnost oz. točnost meritev bomo določili glede na primerljivost rezultatov POCT z referenčno metodo. Za preizkus pravilnosti in natančnosti smo uporabili komercialne vzorce na dveh stopnjah. Pri primerjavi rezultatov dveh metod smo uporabili vzorce bolnikov polne venske krvi. Rezultate preiskav smo statistično analizirali s programom MedCalc, z uporabo regresijske analize Passing-Bablok, analize Bland-Altman in Wilcoxonovega testa. Po vnaprej določenih merilih smo ocenili ali obstaja statistično in klinično pomembna razlika med proizvajalčevimi in dobljenimi vrednostmi.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Odvzem vzorcev

Pri preverjanju natančnosti smo za določanje PČ in APTČ uporabili komercialne kontrolne vzorce dveh koncentracijskih nivojev (nivo 1 in nivo 2). Na podlagi vrednosti, ki smo jih dobili, smo določili serijsko natančnost (ponovljivost) in natančnost iz dneva v dan (vmesna natančnost).

Za primerjavo metod smo uporabili vzorce polne venske krvi bolnikov, s Klinike za bolezni srca in ožilja – enota za intenzivno nego (N=40 (PČ/INR); N=40 (APTČ)). Vzorce smo iz osrednjih venskih katetrov zbrali v plastične brizgalke brez antikoagulantov in jih analizirali v roku 15 sekund od začetka vzorčenja. Hkrati smo v epruveto z antikoagulantom natrijevim citratom (Beckman Dickinson Vacutainer) opravili tudi vzorčenje krvi za laboratorij. Pred samim vzorčenjem smo izvedli vse potrebne ukrepe, da pri sami analizi ne bi prišlo do predanalitske napake (izpiranje osrednjih venskih katetrov in analiza na napravi CoaguChek Pro II po navodilih proizvajalca v roku 15 sekund od začetka vzorčenja).

3.2. Opis metod, uporabljenih v raziskavi

3.2.1. Naprava POCT

V nalogi smo za meritve PČ in APTČ uporabili napravo CoaguChek Pro II. To je naprava POCT, ki je namenjena preiskavam ob bolniku in se uporablja v bolnišnicah za določanje PČ in APTČ s pomočjo testnega traku kot reagenta. Signal zazna po principu amperometrične (elektrokemične) merilne metode. Ima omogočeno brezžično povezavo z omrežjem (WLAN), QR in 2-D kodni čitalnik za identifikacijo uporabnika, vzorcev pacientov in ustrezne kontrole. Nameščen ima tudi ustrezen komunikacijski protokol POCT1-A (24).

3.2.2. Test POCT za določanje protrombinskega časa (PČ)

CoaguChek PT je test, ki pri uporabi naprave CoaguChek Pro II določa protrombinski čas (PČ). Test se lahko izvede na vzorcih kapilarne, venske ali arterijske krvi.

Princip metode: Pri določanju protrombinskega časa (PČ) se doseže aktivacija koagulacije s človeškim rekombinantnim tkivnim faktorjem (rTF). Vsak testni trak ima testno polje za nanos vzorca, kjer se nahaja reagent protrombin. Le-ta reagira z rekombinantnim človeškim tkivnim faktorjem, ki je potreben za potek same reakcije. Čas vzorčenja je odvisen od vrste vzorca (15 sekund za kapilarno in 30 sekund za vensko, oziroma

arterijsko kri), volumen nanešenega vzorca pa je 8 μ L. Po nanosu vzorca krvi poteče kemijska reakcija med protrombinom in tkivnim faktorjem, pri kateri po aktivaciji koagulacije v plazmi nastane strdek. Produkt reakcije povzroči spremembo električnega toka v odvisnosti od napetosti, kar izmerimo kot signal. Elektrokemijski potencial delovne elektrode pri amperometriji je konstanten. Za nadzor potenciala se uporablja referenčna elektroda (najpogosteje kalomelova ali elektroda Ag/AgCl) s konstantnim potencialom (25). Rezultat preiskave PČ lahko prikažemo na več načinov: kot koagulacijski čas (v sekundah) ali kot normalizirano razmerje med bolnikovim in referenčnim PČ v enotah INR (Quickov čas).

Merilni interval testa (PČ):

SEC: 9,6 – 96

INR: 0,8 – 8,0

Relativno razmerje (%Quick): 5 - 120

Omejitve testa in vpliv interferenc:

Pri analiziranju hemoliziranih vzorcev do 0,62 mmol/L (1000 mg/dL) nismo zasledili nobenega vpliva le-te na dobljene rezultate.

Zanesljivi rezultati v vrednostnem območju hematokrita od 15 do 55%.

Proizvajalec navaja, da pri testiranju vzorcev krvi, kjer so bili prisotni analiti navedeni v preglednici IV, ni bilo pomembnejših vplivov na rezultate analize.

Tabela IV: Interference testa CoaguChek PT

[26].

Analit	Rezultat
Bilirubin	<513 μ mol/L (30 mg/dL)
Trigliceridi	<11,4 mmol/L (1000 mg/dL)
Askorbinska kislina	<513 μ mol/L (30 mg/dL)

Test ni občutljiv na nefrakcionirani in frakcionirani heparin do koncentracije 3 IU/mL. Vzorci pacientov, pri katerih se uporabi protamin sulfat, niso primerni za analizo s tem testom. Antifosfolipidna protitelesa (APA), kot je npr. lupus antikoagulant (LA) lahko namreč podaljšajo vrednosti PČ (26).

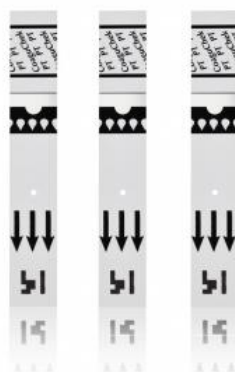
Natančnost, ki jo zagotavlja proizvajalec:

Intermediarno natančnost (vmesna natančnost) in ponovljivost iz dneva v dan, prikazano v preglednici V, navaja proizvajalec. Natančnost je zagotovljena z uporabo kontrolnih vzorcev CoaguChek PT na dveh nivojih, določena pa je v skladu s smernicami CLSI EP5-A2⁸ (27).

Tabela V: Intermediarna natančnost (vmesna natančnost) in ponovljivost.

Vrednosti INR, določene s testnimi trakovi CoaguChek PT na napravi CoaguChek Pro II, v okviru 4 različno kombiniranih raziskav [27].

Nivo kontrole CoaguChek®	N	Srednja vrednost INR	Intermediarna natančnost		Ponovljivost	
			SD	%KV (UCI)	SD	%KV (UCI)
Nivo 1	336	1,3	0,0	3,0 (3,2)	0,0	3,2 (3,6)
Nivo 2	336	3,0	0,1	2,3 (2,4)	0,1	3,1 (4,1)



Slika 4: Testni trakovi za določanje PČ
[28].

⁸Kontrole so se analizirale v obdobju 21 dni, z 2 meritvama dnevno, uporabo 2 ali 3 serij CoaguChek PT testnih trakov. SD=standardni odklon; UCI=zgornji interval zaupanja (95% CI); KV=koeficient variacije.

3.2.3. Test POCT za določanje aktiviranega delnega tromboplastinskega časa (APTČ)

CoaguChek aPTT je test za določanje aktiviranega parcialnega tromboplastinskega časa (APTČ) pri uporabi naprave CoaguChek Pro II. Preiskava APTČ se izvaja na vzorcih kapilarne, venske ali arterijske krvi.

Princip metode: Vsak testni trak ima testno polje za nanos vzorca, ki vsebuje reagent celit, potreben za potek reakcije. Po nanosu vzorca krvi na testni trak se celit sprosti in nastane strdek. Produkt reakcije povzroči spremembo električnega toka v odvisnosti od napetosti, kar izmerimo kot signal. Rezultat analize je prikazan na zaslonu in izražen v sekundah. Merilni interval je od 20 do 130 sekund in prikazuje linearno razmerje, glede na koncentracijo heparina do 1,0 IU/mL.

Omejitve testa – interference:

Pri analiziranju hemoliziranih vzorcev do 0,24 mmol/L (400 mg/dL) nismo zasledili nobenega vpliva le-te na dobljene rezultate.

Zanesljivi rezultati v vrednostnem območju hematokrita 15-55%.

Pri testiranju vzorcev krvi, kjer so bili prisotni analiti navedeni v preglednici VI, ni bilo pomembnejših vplivov na rezultate analize.

Tabela VI: Interference testa CoaguChek aPTT [29].

Analit	Rezultat
Bilirubin	<342 µmol/L (20 mg/dL)
Trigliceridi	<11,4 mmol/L (1000 mg/dL)
Askorbinska kislina	<50 mg/L

Test CoaguChek aPTT ni občutljiv na nizko molekularni heparin (LMWH) do 0,5 IU/mL in se zato ne bi smel uporabljati v okviru tovrstnih antikoagulantnih terapij. Vzorcev pacientov, pri katerih smo uporabili protamin sulfat, tudi ne smemo analizirati s tem testom. Antifosfolipidna protitelesa (APA), kot je npr. lupus antikoagulant (LA) lahko podaljšajo vrednosti APTČ glede na vrsto in koncentracijo protiteles APA. Antikoagulantna zdravila, razen nefrakcioniranega heparina (npr. hirudin in drugi inhibitorji trombina, antagonisti vitamina K, direktni inhibitorji faktorja Xa), podaljšajo

APTČ. Glede na to, da test CoaguChek aPTT ni kalibriran za uporabo s tovrstnimi antikoagulantni, se ne sme uporabljati pri pacientih, zdravljenih s tovrstnimi zdravili. Glede na to, da APTČ ni standardiziran test, se rezultati ne morejo primerjati z drugimi testi APTČ. Referenčni in terapevtski intervali testa CoaguChek aPTT so lahko drugačni od tistih, opravljenih v laboratoriju (29).

Natančnost, ki jo je določil proizvajalec:

Ponovljivost testa CoaguChek aPTT in interval referenčnih vrednosti, prikazanih v preglednici VII, sta določena na podlagi 141 vzorcev, polne venske krvi. Rezultati so izraženi v sekundah.

Tabela VII: Referenčne vrednosti in ponovljivost za aPTT [29].

N	Mediana (s)	2,5 th percentil (s)	97,5 th percentil (s)
141	31,5	24,8	38,3
Ponovljivost			
Interval (s)	Število ponavljanj analize	SD (s)	CV (%)
≤38,3	61	0,8	2,4
>38,3≤47,1	65	0,7	1,5
>47,1	66	1,3	2,1

Ponovljivost testa CoaguChek aPTT, prikazana v preglednici VIII, je izračunana od proizvođača in določena s pomočjo kontrolnih vzorcev na 4 različnih zunanjih lokacijah. Kontrole so se izvajale v obdobju 21 dni z dvema merjenjema dnevno in z uporabo 2 ali 3 serij na eno lokacijo. Ponovljivost so izračunali s testom ANOVA (analiza variance), rezultati pa so prikazani v sekundah (29).

Tabela VIII: Ponovljivost CoaguChek aPTT testa – kontrolni vzorci [29].

Ponovljivost			
aPTT QC nivo	Srednja vrednost (s)	SD (s)	KV (%)
Nivo 1	46,6	2,4	5,1
Nivo 2	66,4	4,4	6,6

3.2.4. Merjenje PČ in APTČ na analizatorju v medicinskem laboratoriju

BCS XP je samodejna naprava za koagulacijske preiskave, ki uporablja optično denzitometrijo za merjenje signala. Izvor svetlobe je žarnica, ki s pomočjo optičnega filtra oddaja svetlobo točno določenih valovnih dolžin (340, 405 ali 570 nm). Reakcija poteka v kivetu, sprememba v prepustnosti svetlobe pa se določi s pomočjo foto detektorja, ki se nahaja za kiveto. Analogni izmerjeni signal se pretvori v digitalni in tako dobimo izračunano absorbanco (30).

Merjenje PČ z analizatorjem

Uporabili smo reagent Dade Innovin, ki je pripravljen iz prečiščenega rekombinantnega človeškega tkivnega faktorja (rTF), pridobljenega iz *E. coli*. Reagent aktivira sistem strjevanja krvi, preko zunanje in skupne koagulacijske poti.

Področje uporabe testa:

Reagent Dade Innovin za PČ se uporablja kot: hitri presejalni test v odsotnosti enega ali več dejavnikov, ki sodelujejo pri strjevanju krvi na zunanji poti (dedne pridobljene motnje strjevanja krvi, bolezni jeter ali pomanjkanje vitamina K), test v okviru oralne antikoagulantne terapije z antagonisti vitamina K ali kot test za specifične koagulacijske faktorje.

Reagent Dade Innovin je proizveden z uporabo rekombinantnega človeškega tkivnega faktorja (rTF) in sintetičnega fosfolipida, ki ne vsebuje drugih koagulacijskih faktorjev, kot so: protrombin, FVII in FX. Zaradi tega ima test izredno visoko občutljivost na znižane vrednosti faktorjev strjevanja krvi, tudi pri vzorcih plazme pacientov, ki so na OAT. Dovzetnost reagenta Dade Innovin je zelo podobna referenčnemu človeškemu možganskemu tromboplastinu Svetovne zdravstvene organizacije (angl. World Health Organization, WHO). Reagent ni občutljiv na terapevtske odmerke heparina. Zaradi svoje

visoke občutljivosti na koagulacijske faktorje in neobčutljivosti na terapevtske odmerke heparina, se uporablja za spremljanje OAT z antagonisti vitamina K (Preglednica IX).

Princip metode:

Koagulacijska kaskada je aktivirana z inkubacijo plazme, skupaj z ustrezno količino tromboplastina in kalcija. Čas strjevanja krvi se meri v sekundah, ki pa je odvisen od aktivacije faktorja FX s pomočjo tromboplastina v prisotnosti faktorja FVII. Hitrost reakcije je odvisna od lastnosti in koncentracije tromboplastina ter od koncentracije ostalih faktorjev strjevanja krvi. Čas, ki ga izmerimo ustreza določenemu odstotku aktivnosti v normalni plazmi, katera se izračuna iz kalibracijske krivulje.

Potrebni reagenti:

Dade Innovin, kalibrator (PT Multi Calibrator), kontrolni vzorec liofilizirane plazme zdravih dajalcev, stabiliziran s pufrom (Control Plasma N), kontrolni vzorec liofilizirane plazme s patološkimi vrednostmi (Control Plasma P) (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Nemčija).

Tabela IX: Biološki referenčni intervali.

	Starost	Rezultat
Otroci	<5 dni	>0,65
	1-6 mesecev	>0,70
	>6 mesecev	≥0,70
Odrasli		≥0,70
Terapijski interval (INR)		2,00-3,50

Omejitve testa – interference:

Nekatera zdravila lahko vplivajo na rezultate testov PČ. Nepričakovane ali nenormalne izvide, ki ne ustrezajo klinični sliki je treba preveriti z dodatnimi koagulacijskimi testi. Motnost lipemičnih vzorcev, npr. zaradi parenteralne prehrane, lahko omeji pravilnost računske metode, ki določa fibrinogen iz dobljene vrednosti PČ. V primeru izmerjenih previsokih absorbanc vzorcev se PČ izmeri še pri drugi valovni dolžini (570 nm) z ustreznim programom, kjer sledeče interference nimajo vpliva: trigliceridi do koncentracije 5,12 mmol/L, hemoglobin do koncentracije 8 g/L in bilirubin do koncentracije 205,2 µmol/L. Reagent Dade Innovin ni občutljiv na koncentracije nefrakcioniranega heparina do ~2,0 IU/mL. Inhibitorji, kot npr. lupus antikoagulant lahko vplivajo na pravilnost

doseženih rezultatov PČ oziroma INR. Hirudin ali drugi direktni inhibitorji trombina v terapevtskih odmerkih povzročajo daljši PČ (31).

Merjenje APTČ z analizatorjem

Področje uporabe testa:

Dade Actin FS Activated PTT Reagent je tekoči, prečiščeni pripravek sojinih fosfolipidov v površinskem aktivatorju ($1,0 \times 10^{-4}$ M elaginske kisline) z aktivatorjem plazme, in se uporablja za določanje aktiviranega parcialnega tromboplastinskega časa (APTČ). Aktivirani reagent je še dodatno občutljiv na inhibitorje, ki so podobni lupusu. APTČ se primarno uporablja v evaluaciji nepravilnosti koagulacije notranje poti. Prav tako ima vlogo pri odkrivanju težjih funkcionalnih pomanjkljivosti faktorjev II, V, X in fibrinogena. APTČ se pogosto uporablja v okviru učinkovitosti terapije UFH, kjer se čas strjevanja krvi podaljša sorazmerno z odmerkom heparina. Pri bolnikih, ki prejemajo OAT so vrednosti faktorjev II, VII, IX in X zmanjšane in je pričakovano daljši tudi APTČ. APTČ pa lahko podaljša tudi prisotnost nespecifičnih inhibitorjev, kot je na primer LA.

Princip metode:

Faktorji strjevanja krvi notranje poti v plazmi se aktivirajo po inkubaciji z ustrežno količino fosfolipidov in površinskega aktivatorja (elaginske kisline). Ko kalcijevi ioni aktivirajo proces koagulacije, se izmeri čas, potreben za tvorbo strdka.

Vzorci plazme se analizirajo po izvedbi analitske kontrole, katera je opisana v navodilih za uporabo. Postopek merjenja APTČ je v celoti avtomatiziran.

Potrebni reagenti:

Dade Actin FS Activated PTT Reagent, CaCl₂, kontrolni vzorec liofilizirane plazme zdravih dajalcev, stabilizirane s pufrom HEPES (Control Plasma N), kontrolni vzorec liofilizirane plazme s patološkimi vrednostmi (Control Plasma P) (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Nemčija).

Biološki referenčni intervali:

24,0 – 33,0 s

Merilni interval testa:

18,0 – 150,0 s

Rezultati, katerih vrednosti presegajo 150 s, se izdajo kot rezultat >150 s z opozorilom *heparin ?*.

Omejitve testa – interference:

Z določanjem APTČ je zajet celoten proces strjevanja krvi, od kontaktne aktivacije do nastajanja fibrina. To je razlog, da je sam test bolj občutljiv na spremembe in omejitve v primerjavi s specifičnimi testi koagulacije, kar pa zahteva posebno kontrolo samega vzorca plazme. Če vzorci niso shranjeni v hladilniku, lahko pride do hitrejšje razgradnje le-teh. Morali bi se izogibati uporabi zelo majhnega volumna vzorca plazme, zaradi fizioloških sprememb vrednosti pH plazme. Takšne spremembe lahko pripeljejo do razgradnje posameznih komponent koagulacijskega sistema v plazmi. Znižane vrednosti APTČ so povezane z uporabo konjugirane estrogenske terapije pri moških in oralne kontracepcije pri ženskah. Razširjene vrednosti APTČ smo dobili pri uporabi naslednjih zdravil: difenilhidantoina, heparina, varfarina, naloksona in nanašanja radiografskih zdravil. Terapevtski odmerki hirudina ali drugih direktnih inhibitorjev trombina lahko podaljšajo čas strjevanja krvi. Tudi izbira antikoagulanta (npr. natrijev citrat ali oksalat) in stanje vzorca (npr. hemoliza, lipemija, parenteralna prehrana, itd.), lahko vplivajo na dosežene rezultate (32).

3.2.5. Reagenti

Reagent CoaguChek PT, oziroma sam testni trak vsebuje protrombin, rekombinantni človeški tkivni faktor (rTF) kot aktivator, stabilizatorje, konzervanse ter dodatke. Hranimo ga pri temperaturi od 2 °C do 30 °C. Testni trakovi se lahko uporabljajo do datuma veljavnosti, ki je odtisnjen na škatli (26).

Testni trak CoaguChek aPTT oz. reagent vsebuje celit, ki služi kot aktivator koagulacijskega sistema, fosfolipide kot nadomestilo za trombocite, kateri so potrebni za merjenje notranje poti koagulacije, stabilizatorje, konzervanse in dodatke. Hranimo ga pri temperaturi od 2 °C do 30 °C. Testni trak se lahko uporablja do datuma veljavnosti, ki je odtisnjen na škatli (29).

CoaguChek PT Controls so kontrolni vzorci dveh nivojev za določanje PČ. Kontrolni vzorec vsebuje 307 mg zajčje plazme in 3 mg dodatkov. Poleg se nahaja tudi raztopina za rekonstitucijo kontrolnega vzorca (topilo), ki vsebuje 13,6 mmol kalcijevega klorida, konzervanse in dodatke. Raztopljena kontrolna raztopina je stabilna 30 minut. Z njimi preverjamo ali gre pri meritvah PČ za pravilno delovanje naprave CoaguChek Pro II (33).

CoaguChek aPTT Controls so kontrolni vzorci dveh nivojev za določanje APTČ, s katerimi preverjamo ali gre pri meritvah APTČ za pravilno delovanje naprave CoaguChek Pro II. Kontrolni vzorec vsebuje 450 µl zajčje plazme in 3 mg dodatkov. Poleg se nahaja

tudi raztopina za rekonstitucijo kontrolnega vzorca (topilo), ki vsebuje 13,6 mmol kalcijevega klorida, konzervanse in dodatke. Raztopljena kontrolna raztopina je stabilna 5 minut (34).

Reagent Dade Innovin je v liofilizirani obliki in vsebuje rekombinantni človeški tkivni faktor (rTF), sintetične fosfolipide (tromboplastin), ione kalcija, sredstvo za nevtraliziranje - heparin, pufer HEPES in stabilizatorje (goveji serumski albumin). Reagent shranjujemo pri temperaturi od 2 °C do 8 °C. Pri tej temperaturi se reagent iz neodprte stekleničke lahko uporablja do konca roka uporabe, ki je naveden na steklenički. Raztopljeni reagent je stabilen: hranjen pri 2 °C do 8 °C 10 dni, hranjen pri 15 °C do 25 °C 5 dni in hranjen pri 37 °C 24 ur v zaprti steklenički (32).

Reagent Dade Actin FS Activated PTT Reagent se uporablja za določanje APTČ. Vsebuje prečiščeni pripravek sojinih fosfolipidov in zajčje možganske fosfolipide v $1,0 \times 10^{-4}$ M elagični kislini, z dodanimi pufri, stabilizatorje in konzervanse. Za prečiščene fosfatide nimamo določenega in sprejetega primarnega standarda. Reagent je potrebno pred uporabo 5-8 krat previdno premešati. Po uporabi reagent hranimo v zaprti steklenički pri temperaturi 2 °C do 8 °C. Tako shranjen se lahko uporablja do konca roka uporabe. Po odprtju je reagent pri temperaturi od 2 °C do 15 °C stabilen 7 dni in se ga ne sme zamrzniti. Če stoji nekaj časa, se lahko pojavi zelena usedlina, ki vsebuje elaginsko kislino in lipide, zato ga moramo pred uporabo premešati (33).

V preglednici X in XI so opisani reagenti in kontrolni vzorci dveh koncentracijskih nivojev, uporabljeni v postopku verifikacije naprave POCT CoaguChek Pro II.

Tabela X: Uporabljeni reagenti pri verifikaciji naprave.

Reagent	Lot	Rok trajanja
CoaguChek PT Test - CoaguChek Pro II	29397114	28. 2. 2017
CoaguChek aPTT Test - CoaguChek Pro II	29396011	31. 1. 2017
CoaguChek PT Controls	12785200	31. 1. 2017
CoaguChek aPTT Controls	16319600	31. 1. 2017

Tabela XI: Loti kontrolnih raztopin, ki so bile uporabljene pri verifikaciji naprave CoaguChek Pro II.

Parameter	Naziv kontrolne raztopine	Lot	Razpon vrednosti		Ciljna vrednost	
			Nivo 1	Nivo 2	Nivo 1	Nivo 2
Protrombinski čas (PČ)	CoaguChek PT Controls	12785200	0,61-1,10	0,16-0,29	0,86	0,23
INR			0,9-1,3	2,0-3,0	1,1	2,5
			61-110%	16-29%	85,5%	22,5%
Aktivirani parcialni tromboplastinski čas (APTČ) (s)	CoaguChek aPTT Controls	16319600	40,9-58,9	80,7-120,6	49,9	100,7

3.3. Natančnost in točnost

Vrednotenje natančnosti metode smo izvedli po protokolu CLSI (angl. User Verification of Performance for Precision and Trueness) z uporabo komercialnih kontrolnih vzorcev dveh koncentracijskih nivojev. Analizirali smo jih na napravi POCT CoaguChek Pro II (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemčija), v treh ponovitvah v obdobju petih dni. Skupno laboratorijsko natančnost smo določili z verifikacijskim eksperimentom, s pomočjo ponovljivosti oz. serijske natančnosti, vmesno natančnost pa iz ponovljenih meritev. Na podlagi rezultata, dobljenega z verifikacijskim postopkom smo določili natančnost, prikazano kot standardni odklon (S_d) in koeficient variacije (KV). Natančnost, ki smo jo dobili ponazarja odstotek ujemanja s pričakovanim rezultatom in smo jo za posamezni parameter primerjali z vnaprej določenimi merili sprejemljivosti.

3.4. Primerjava metod

Točnost smo ocenili s primerjavo srednje vrednosti meritev komercialnih vzorcev (dnevno preverjanje natančnosti) z vrednostjo, ki jo je določil proizvajalec. Istočasno smo analizirali vzorce 40 bolnikov na napravi POCT CoaguChek Pro II in na koagulacijski napravi Behring Coagulation System Xpand - BCS XP (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Nemčija), ki se uporablja pri rutinskem delu v laboratoriju. Merili smo parametre PČ/INR in APTČ.

3.5. Statistična obdelava podatkov

Statistično analizo pridobljenih podatkov smo izvedli v računalniškem programu Microsoft Office Excel[®] 2010 in statističnem programu MedCalc[®] (različica 17.2, MedCalc Software bvba, Ostend, Belgija; <http://www.medcalc.org>; 2017), vrednost $P < 0,05$ pa smo vzeli kot statistično pomembno. Z uporabo programa Microsoft Office Excel 2010[®] smo obdelali podatke, potrebne za vrednotenje analitskih lastnosti naprave (natančnosti in točnosti) in nadalje primerjavo zadanih meril sprejemljivosti. Merilo sprejemljivosti za ocenitev natančnosti (serijske in dnevne) je vrednost koeficienta variacije $< 5,00\%$, za ocenitev točnosti, pa odstopanje srednje izmerjene vrednosti od določene vrednosti $< 10,00\%$.

Računalniški program MedCalc[®] je omogočil statistično obdelavo rezultatov, ki smo jih dobili na napravah CoaguChek Pro II in BCS XP, ob uporabi regresijske analize Passing-Bablok, analize Bland-Altman in Wilxonovega testa o pomembnosti razlik pri parnih meritvah. Na podlagi grafov smo ugotovili, da (ne)obstajajo konstantne in/ali sorazmerne razlike izmerjenih vrednosti, dobljenih z napravo POCT CoaguChek Pro II, v primerjavi s koagulacijsko napravo BCS XP. Regresijska analiza Passing-Bablok kaže na razmerje dveh metod v obliki premice z ustrezno enačbo, ki določa vrednosti odseka in nagib premice. Regresijo uporabljamo izključno za spremenljivke, med katerimi obstaja linearno razmerje in visoka raven korelacije. Za prikaz ujemanja obeh metod smo uporabili Bland Altmanovo analizo. Pri opazovanju srednjih vrednosti vseh merilnih razlik lahko trdimo, ali obstaja statistično pomembna razlika med dvema merilnima metodama. Če merilnih razlik ni, bo srednja vrednost vseh merilnih razlik znašala 0. Pri normalni porazdelitvi se 95% merilnih razlik nahaja v področju $\pm 1,96$ SD. Da bi podali končni sklep o tem, ali obstajajo razlike med metodama, je treba ovrednotiti, ali so srednje vrednosti vseh merilnih razlik vključene v interval zaupanja. Če interval vsebuje število 0, sklepamo, da razlika ni

statistično pomembna, torej ni nobene razlike. V nasprotnem primeru, če interval zaupanja ne vsebuje števila 0, obstaja statistično pomembna razlika med meritvami.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

Pri uvajanju novih metod v rutinsko delo je treba opraviti postopek validacije ali verifikacije. Cilj je bil, da se med izvedbo verifikacije naprave POCT (CoaguChek Pro II) ugotovi tako njegova potencialna uporaba pri rutinskem delu, kot tudi njegova klinična uporabnost na Kliniki za bolezni srca in ožilja – enota intenzivne nege (UKC Zagreb). Zato so bili vsi vzorci za analize odvzeti pri bolnikih iz navedenega oddelka.

4.1. Verifikacija natančnosti meritev POCT

Preiskave POCT na področju koagulacije

Pri bolnikih s potencialno motnjo sekundarne hemostaze se uporabljajo testi koagulacije za preverjanje funkcije hemostaze, ne glede na to ali gre za dedno (npr. hemofilija) ali pridobljeno (npr. diseminirana intravaskularna koagulacija - DIK, lupusni antikoagulant – LA) motnjo v strjevanju krvi. Testi protrombinskega časa (PČ/INR) in aktiviranega parcialnega tromboplastinskega časa (APTČ) se pravzaprav mnogo pogosteje uporabljajo pri spremljanju antikoagulantne terapije, kot pa pri sami diagnostiki oz. preverjanju sekundarne hemostaze. PČ oziroma INR se uporabljata za spremljanje terapije z antagonisti vitamina K, APTČ pa za spremljanje terapije z nefrakcioniranim heparinom (UFH).

APTČ se običajno izvaja kot presejalna preiskava za vrednotenje vseh hemostatičnih funkcij, zlasti pri kirurških pacientih, ali v okviru terapije z nefrakcioniranim heparinom. Pridobljeni rezultati APTČ so lahko zanesljivi in potencialno koristni za številne diagnostične postopke, toda obvezno je potrebno preveriti klinično in diagnostično uporabnost takšne naprave.

O morebitnih vplivih, ki jih lahko povzročijo zdravila, ki se uporabljajo v intenzivnih enotah ali v času operacij, na test CoaguChek aPTT ni dovolj podatkov. Uporaba tega testa pri pacientih z boleznijo jeter, lahko povzroči podaljšane vrednosti APTČ. Nepričakovane vrednosti APTČ moramo vedno dodatno preveriti z dodatnimi testiranjmi, da ugotovimo razlog takšnih rezultatov. Obravnava rezultatov v diagnostične namene mora biti vedno povezana z bolnikovo preteklostjo bolezni, kliničnim pregledom in drugimi izvidi.

Uporaba diagnostike POCT lahko delno nadomesti metodološke omejitve standardnih laboratorijskih testov koagulacije. Tudi čas preiskave POCT je bistveno krajši (20-25 min) v primerjavi z običajno uporabljenimi laboratorijskimi testi koagulacije, ki imajo TAT med 40 in 90 min. Počasnejša obdelava krvnih vzorcev lahko namreč da rezultate, ki ne

odražajo pravega stanja v sistemu koagulacije. To pa lahko privede do napačnega razumevanja rezultatov in neustreznega zdravljenja bolnikov.

Preiskave POCT na oddelkih intenzivne nege

V enotah intenzivne terapije prihaja do podaljšanega zadrževanja bolnikov, zaradi njihovega vse večjega števila. Vsesplošno mnenje je, da daljši TAT izvidov iz laboratorija vpliva na kvaliteto nadaljnje oskrbe bolnikov v nujnih primerih. Vpeljava diagnostike POCT za ciljne preiskave lahko bistveno izboljša in pospeši zdravljenje v intenzivnih enotah. Zaradi pogoste navzočnosti terapij z antikoagulanti in obsežnih kirurških posegov, kjer se uporabljajo velike količine intravenoznih tekočin, prihaja do motenj strjevanja krvi. Ne glede na to, kako pomembna je hitrost in razpoložljivost preiskav POCT v intenzivnih enotah, je potrebna tudi natančna razlaga rezultatov s strani kliničnega osebja ter pravočasna in pravilna presoja stanja in zdravljenja bolnikov.

Področje uporabe preiskave PČ in APTČ (POCT)

Preiskava PČ se lahko uporablja za določanje protrombinskega časa pri pacientih, pri katerih obstaja dvom, da gre za pomanjkanje dejavnikov zunanje in skupne koagulacijske poti, z izjemo fibrinogena in pri pacientih, ki imajo nadzorovano oralno antikoagulantno terapijo z antagonisti vitamina K.

Preiskava APTČ pa se lahko uporablja: v okviru terapije z nefrakcioniranim heparinom, za določanje APTČ pri pacientih, za katere sumimo, da imajo pomanjkanje dejavnikov notranje in skupne koagulacijske poti, z izjemo fibrinogena.

Vrednosti za natančnost (ponovljivost v seriji in ponovljivost iz dneva v dan oz. vmesna natančnost) smo pridobili tako, da smo izvedli analize komercialnih kontrolnih vzorcev dveh koncentracijskih nivojev ter izračunali koeficiente variacije (Preglednica XII – XV). Že pred oceno natančnosti preiskav POCT smo si postavili ciljno (željeno) vrednost za natančnost meritev POCT, ki je za vse parametre znašala pod 5% (Preglednica XVI).

Tabela XII: Prikaz meritev kontrolnih vzorcev (PČ - Nivo 1).

Preiskava	PČ/INR				
Naziv kontrole	CoaguChek PT Controls				
Lot	12785200				
Rok trajanja	31. 1. 2017				
1. PONOVLJIVOST (PRECIZNOST V SERIJI)					
D=5 dni; n=3 (triplikat)	1.dan (02.05.2016.)	2.dan (03.05.2016.)	3.dan (04.05.2016.)	4.dan (05.05.2016.)	5.dan (06.05.2016.)
	L1	L1	L1	L1	L1
Meritev 1	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10
Meritev 2	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10
Meritev 3	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10
Aritmetička sredina	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10
Sd	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabela XIII: Prikaz meritev kontrolnih vzorcev (PČ – Nivo 2).

Preiskava	PČ/INR				
Naziv kontrole	CoaguChek PT Controls				
Lot	12785200				
Rok trajanja	31. 1. 2017				
1. PONOVLJIVOST (PRECIZNOST V SERIJI)					
D=5 dni; n=3 (triplikat)	1.dan (02.05.2016.)	2.dan (03.05.2016.)	3.dan (04.05.2016.)	4.dan (05.05.2016.)	5.dan (06.05.2016.)
	L2	L2	L2	L2	L2
Meritev 1	2,30	2,30	2,20	2,30	2,20
Meritev 2	2,30	2,30	2,20	2,30	2,30
Meritev 3	2,30	2,30	2,10	2,30	2,20
Aritmetička sredina	2,30	2,30	2,17	2,30	2,23
Sd	0,00	0,00	0,06	0,00	0,06

Tabela XIV: Prikaz meritev kontrolnih vzorcev (APTČ - Nivo 1).

Preiskava	APTČ (s)				
Naziv kontrole	CoaguChek aPTT Controls				
Lot	16319600				
Rok trajanja	31. 1. 2017				
1. PONOVLJIVOST (PRECIZNOST V SERIJI)					
D=5 dni; n=3 (triplikat)	1.dan (02.05.2016.)	2.dan (03.05.2016.)	3.dan (04.05.2016.)	4.dan (05.05.2016.)	5.dan (06.05.2016.)
	L1	L1	L1	L1	L1
Meritev 1	52,90	53,80	54,90	52,20	53,00
Meritev 2	54,10	54,10	53,30	50,90	51,10
Meritev 3	53,90	53,70	53,70	50,90	51,20
Aritmetička sredina	53,63	53,87	53,97	51,33	51,77
Sd	0,64	0,21	0,83	0,75	1,07

Tabela XV: Prikaz meritev kontrolnih vzorcev (APTČ - Nivo 2).

Preiskava	APTČ (s)				
Naziv kontrole	CoaguChek aPTT Controls				
Lot	16319600				
Rok trajanja	31. 1. 2017				
1. PONOVLJIVOST (PRECIZNOST V SERIJI)					
D=5 dni; n=3 (triplikat)	1.dan (02.05.2016.)	2.dan (03.05.2016.)	3.dan (04.05.2016.)	4.dan (05.05.2016.)	5.dan (06.05.2016.)
	L2	L2	L2	L2	L2
Meritev 1	104,20	113,50	104,30	104,70	100,60
Meritev 2	105,80	112,60	104,10	102,80	99,50
Meritev 3	106,80	113,60	103,00	103,90	99,80
Aritmetička sredina	105,60	113,23	103,80	103,80	99,97
Sd	1,31	0,55	0,70	0,95	0,57

Tabela XVI: Natančnost meritev POCT.

Merjeni parametri	CoaguChek Pro II			
	Serijska natančnost (ponovljivost)		Dnevna natančnost (vmesna natančnost)	
	<i>KV (%)</i>	<i>KV (%)</i>	<i>KV (%)</i>	<i>KV (%)</i>
	(\bar{x})	(\bar{x})	(\bar{x})	(\bar{x})
	<i>Nivo 1</i>	<i>Nivo 2</i>	<i>Nivo 1</i>	<i>Nivo 2</i>
PČ	2,23 (0,87)	2,84 (0,24)	1,90	4,20
INR	0,00 (1,1)	1,62 (2,3)	0,00	2,64
APTČ (s)	1,43 (52,9)	0,82 (105,9)	2,38	4,65

Rezultati testov natančnosti so prikazani kot serijska natančnost in dnevna natančnost in potrjujejo, da vse vrednosti, ki smo jih dobili, izpolnjujejo zahtevana merila. Zaključimo lahko, da je metoda verifikacije naprave POCT potrdila zadovoljivo ponovljivost (serijsko natančnost) in vmesno natančnost (dnevno natančnost).

4.2. Verifikacija točnosti meritev POCT

Točnost smo ocenili na dva načina: na osnovi odklona od prave vrednosti (Bias) ter na osnovi primerjave rezultatov analize POCT z rezultati analize istih vzorcev z našo primerjalno metodo določanja PČ in APTČ na analizatorju, ki se dnevno uporablja v medicinskem laboratoriju.

4.2.1. Ugotavljanje odklonov od pravih vrednosti

»Prave« vrednosti je podal proizvajalec. Izmerjeno vrednost pa smo določili tako, da smo isti vzorec analizirali 15-krat z napravo POCT ter izračunali srednjo vrednost. Srednja vrednost meritev POCT komercialnih vzorcev je znašala:

Tabela XVII: Srednja vrednost komercialnih vzorcev.

Merjeni parametri	<i>Nivo 1</i> (izmerjeno s POCT) (\bar{x})	<i>Nivo 1</i> (Prava) (\bar{x})	<i>Nivo 2</i> (izmerjeno s POCT) (\bar{x})	<i>Nivo 2</i> (Prava) (\bar{x})
PČ	0,87	0,86	0,24	0,23
INR	1,1	1,1	2,3	2,5
APTČ (s)	52,9	49,9	105,9	100,7

Na koncu smo z namenom verifikacije izvedli še primerjavo naših podatkov z določeno vrednostjo proizvajalca. Pri analizi točnosti preiskav POCT smo dobili sledeče rezultate:

Tabela XVIII: Točnost meritev POCT.

Merjeni parametri	CoaguChek Pro II			
	<i>Bias (%)</i>	<i>Točnost (%)</i>	<i>Bias (%)</i>	<i>Točnost (%)</i>
	<i>Nivo 1</i>	<i>Nivo 1</i>	<i>Nivo 2</i>	<i>Nivo 2</i>
PČ	1,2	98,8	4,35	95,75
INR	0,00	100	-8,00	92
APTČ (s)	6,01	93,99	5,16	94,84

Pri vseh navedenih parametrih je odklon od prave vrednosti (Bias) znotraj analitičnega cilja <10,00%, ki smo ga določili predhodno. Ocenjena točnost naprave POCT je primerljiva s podatkom, ki ga navaja proizvajalec.

Za primerjavo rezultatov obeh naprav smo rezultate testov PČ in INR obdelali z regresijsko analizo Passing-Bablok. Dobljeni 95% interval zaupanja, nam na odseku y in naklonu kaže, da je v primeru parametra PČ prisotna sorazmerna napaka, v primeru parametrov PČ in INR, pa je prisotna stalna in sorazmerna napaka (Preglednica XXI). Izračunani korelacijski koeficienti kažejo na zelo dobro povezavo med rezultati, pridobljenimi na napravi POCT in analizatorju v medicinskem laboratoriju. V sklopu regresijske analize Passing-Bablok smo opravili Cusumov test linearnosti, ki je za PČ in INR pokazal, da ni večjega odstopanja od linearnosti.

4.2.2. Primerjava metod

Zato da bi ocenili točnost preiskave POCT smo analizirali vzorce 40 bolnikov na napravi POCT in na koagulacijski napravi. V vseh vzorcih smo izmerili PČ in APTČ z metodo POCT in z našo primerjalno metodo na analizatorju, ki se rutinsko uporablja v medicinskem laboratoriju. Rezultate meritev prikazujejo preglednice XIX in XX. Primerjavo rezultatov PČ in INR smo izvedli s statističnimi testi Passing-Bablok in Bland-Altman. Za primerjavo rezultatov APTČ pa smo uporabili Wilcoxonov test, saj smo imeli manj kot 40 vzorcev.

Tabela XIX: Primerjava meritev za parameter: Protrombinski čas (PČ) – PČ.

N	CoaguChek Pro II	BCS XP	Δ	bias (%)
1	0,16	0,23	-0,07	-30,43
2	0,61	0,49	0,1	25,51
3	0,59	0,54	0,0	9,06
4	0,71	0,95	-0,2	-25,42
5	0,30	0,36	-0,1	-17,58
6	0,64	0,65	0,0	-1,99
7	0,35	0,44	-0,1	-19,54
8	0,64	0,80	-0,2	-19,60
9	0,30	0,34	0,0	-11,76
10	1,01	1,05	0,0	-4,17
11	0,82	1,18	-0,4	-30,39
12	0,56	0,61	-0,1	-8,65
13	1,02	1,25	-0,2	-18,33
14	0,73	0,69	0,0	5,19
15	0,85	1,22	-0,4	-30,33
16	0,85	1,01	-0,2	-16,09
17	0,91	1,22	-0,3	-25,41
18	0,41	0,48	-0,1	-14,58
19	0,20	0,29	-0,1	-31,97
20	0,94	1,14	-0,2	-17,76
21	1,02	1,07	-0,1	-4,67
22	0,09	0,15	-0,1	-40,00
23	0,99	1,11	-0,1	-10,57
24	0,96	1,37	-0,4	-30,08
25	0,92	1,14	-0,2	-19,30
26	0,82	1,11	-0,3	-26,13
27	0,51	0,43	0,1	19,16
28	0,89	1,12	-0,2	-20,61
29	0,54	0,44	0,1	23,57

N	CoaguChek Pro II	BCS XP	Δ	bias (%)
30	0,90	1,14	-0,2	-20,77
31	0,28	0,33	-0,1	-15,92
32	0,68	0,67	0,0	1,49
33	0,65	0,71	-0,1	-8,06
34	0,65	0,67	0,0	-2,55
35	0,67	0,75	-0,1	-10,31
36	0,69	0,78	-0,1	-10,97
37	0,66	0,81	-0,2	-18,52
38	0,67	0,71	0,0	-6,03
39	0,46	0,58	-0,1	-20,83
40	0,78	0,75	0,0	4,00

Legenda: CoaguChek Pro II - naprava POCT; BCS XP - analizator v medicinskem laboratoriju

Tabela XX: Primerjava meritev za parameter: Protrombinski čas (PČ) – PČ/INR.

N	CoaguChek Pro II	BCS XP	Δ	bias (%)
1	3,0	2,6	0,4	14,50
2	1,1	1,2	0,0	-4,35
3	1,3	1,4	-0,1	-9,09
4	1,3	1,3	0,0	-2,99
5	1,2	1,0	0,2	15,38
6	1,9	1,9	0,0	-1,04
7	1,3	1,2	0,1	7,44
8	1,8	1,6	0,2	13,21
9	1,3	1,1	0,2	16,07
10	2,0	2,0	0,0	-1,48
11	1,0	1,0	0,0	1,01
12	1,1	0,9	0,2	19,57
13	1,4	1,3	0,2	12,00
14	1,0	0,9	0,1	12,36
15	1,2	1,2	0,0	1,69
16	1,1	0,9	0,2	22,22
17	1,1	1,0	0,1	8,91
18	1,1	0,9	0,2	22,22
19	1,6	1,4	0,2	11,11
20	2,6	2,3	0,3	15,04
21	1,0	0,9	0,1	6,38
22	1,0	1,0	0,0	4,08
23	5,5	3,9	1,6	41,39
24	1,0	1,0	0,0	4,17
25	1,0	0,8	0,2	19,05

N	CoaguChek Pro II	BCS XP	Δ	bias (%)
26	1,1	0,9	0,2	17,02
27	1,1	1,0	0,1	14,58
28	1,4	1,6	-0,2	-14,11
29	1,1	1,0	0,2	15,79
30	1,4	1,6	-0,2	-11,95
31	1,1	0,9	0,2	17,02
32	2,0	2,1	-0,1	-2,91
33	1,2	1,2	0,0	0,84
34	1,3	1,2	0,1	11,11
35	1,3	1,2	0,1	8,33
36	1,2	1,2	0,1	4,35
37	1,2	1,1	0,1	6,19
38	1,2	1,1	0,1	8,11
39	1,2	1,2	0,0	2,56
40	1,5	1,3	0,2	16,28

Legenda: CoaguChek Pro II - naprava POCT; BCS XP - analizator v medicinskem laboratoriju

1. Primerjava metod pri meritvah PČ/INR

Meritve smo statistično analizirali z naslednjimi metodami: Passing-Bablok in Bland-Altman. Želeli smo ugotoviti primerljivost metod med seboj. Rezultate statistične analize Passing-Bablok prikazuje preglednica XXI.

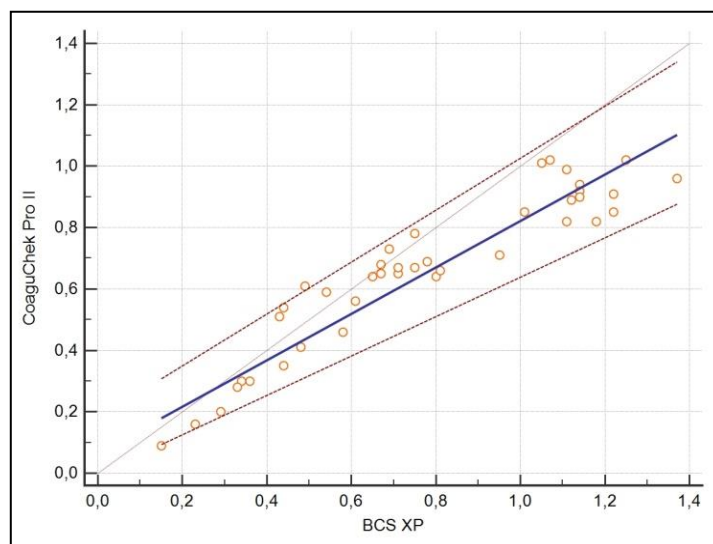
Za primerjavo obeh naprav, smo rezultate testa PČ in INR obdelali z regresijsko analizo Passing-Bablok. Dobljeni 95% interval zaupanja nam na odseku y in naklonu kaže, da je v primeru PČ meritev prisotna sorazmerna napaka, v primeru parametrov PČ in INR pa je prisotna stalna in sorazmerna napaka.

Izračunani korelacijski koeficienti kažejo na zelo dobro povezavo med rezultati, pridobljenimi na napravi POCT in analizatorju, in sicer znaša r^2 za PČ=0,94 in r^2 za INR=0,96. V sklopu regresijske analize Passing-Bablok smo opravili Cusumov test linearnosti, ki je za PČ in INR pokazal, da ni večjega odstopanja od linearnosti (Preglednica XXI).

Tabela XXI: Regresijska analiza Passing-Bablok.

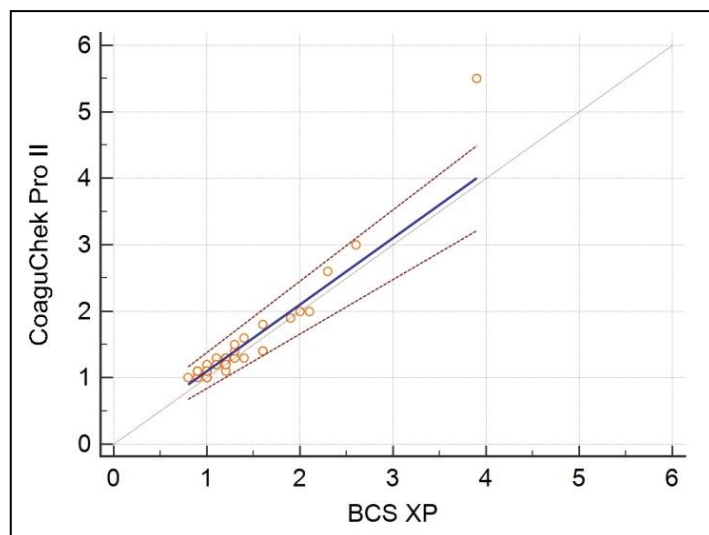
Merjeni parameter	Odsek na y-osi	95% interval zaupanja za odsek	Koeficient smeri premice	95% interval zaupanja za koeficient smeri premice	Koeficient korelacije	Razpon preiskovanih vrednosti
PČ	0,064	-0,00 - 0,18	0,758	0,64 - 0,85	0,94	0,15 – 1,37
INR	0,100	0,02 - 0,31	1,000	-0,38 - 0,38	0,96	0,80 – 3,90

Najmanjša dobljena absolutna razlika za vrednost PČ med rezultati, ki smo jih dobili na napravi POCT in analizatorju znaša 0,01, največja pa 0,37 (za območje vrednosti >0,70). Najmanjša dobljena absolutna razlika za vrednost INR med rezultati, ki smo jih dobili na napravi POCT in analizatorju, znaša 0,1, največja pa 1,6 (Slika 5 in 6).



Slika 5: Passing-Bablokova regresijska analiza primerjave metod za merjenje PČ.

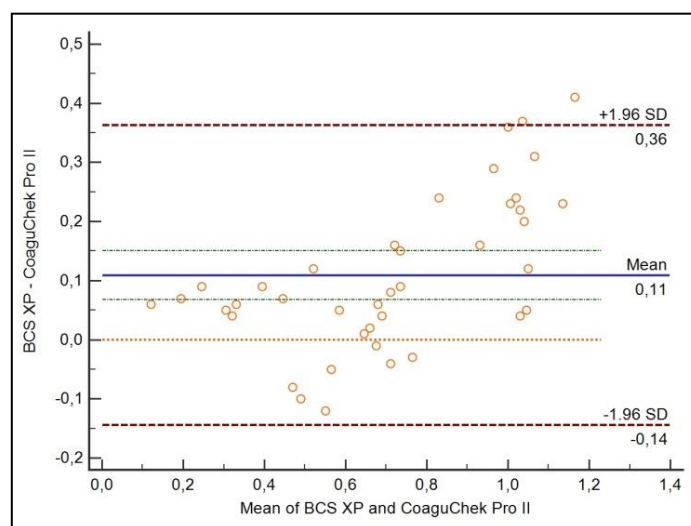
N=40; polna črta, temno modre barve – regresijska premica $y=0,0646970 + 0,757576 x$; črtkani črti, vijolične barve – interval zaupanja; svetlo pikčasta črta, vijolične barve – idealna premica $y=x$.



Slika 6: Passing-Bablokova regresijska analiza primerjave metod za določanje INR.

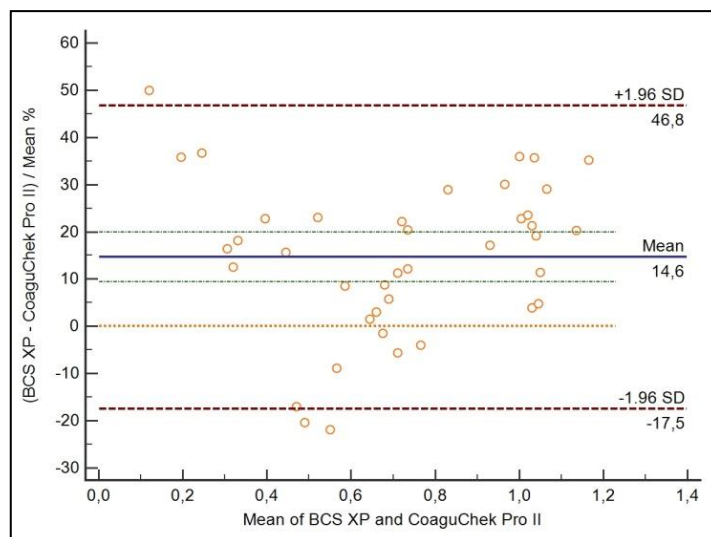
N=40; polna črta, temno modre barve – regresijska premica $y=0,100000+1,000000 x$; črtkani črti, vijolične barve – interval zaupanja; pikčasta črta, svetlo vijolične barve – idealna premica $y=x$.

Razlika med obema metodama je prikazana z Bland-Altmanovimi grafi, kot relativna in absolutna vrednost (delež in odstotek). Sliki 7 in 8 prikazujeta velikost konstantne (0,11) in sorazmerne napake (14,6%) za PČ, medtem ko sliki 9 in 10 prikazujeta velikost konstantne (-0,12) in sorazmerne napake (-7,7%) za INR.



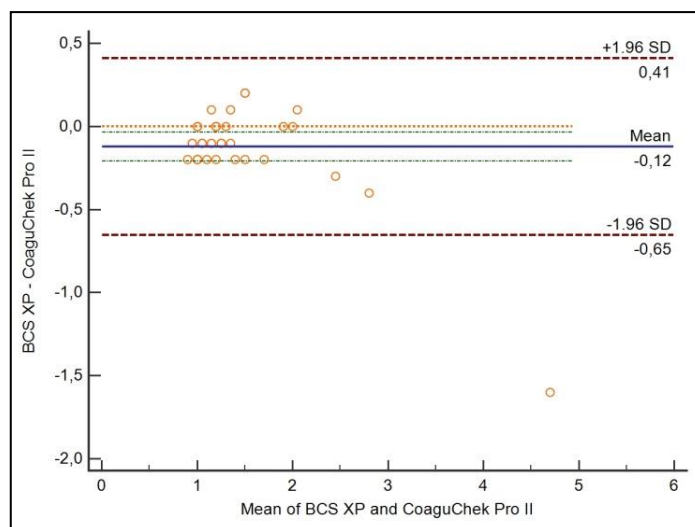
Slika 7: Bland-Altmanova analiza primerjave rezultatov (absolutne vrednosti) PČ dobljenih na napravi POCT in analizatorju.

N=40; polna črta – povprečno odstopanje (z merskimi enotami) med dvema metodama (0,11), prikaz konstantne napake; zeleni črti - 95 - odstotni interval zaupanja povprečnega odstopanja; temno rdeči črtkani črti - meje sprejemljivosti, ki obsegajo območje, opredeljeno s standardnim odklonom $\pm 1,96$; oranžna črta - vrednost 0.



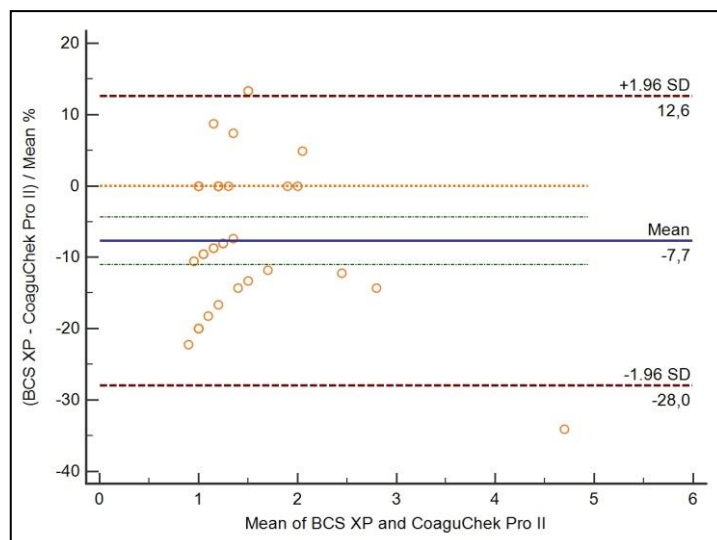
Slika 8: Bland-Altmanova analiza primerjave rezultatov (v odstotkih) PČ dobljenih na napravi POCT in analizatorju.

N=40; polna črta – povprečno odstopanje (v odstotkih) med dvema metodama (14,6%), prikaz sorazmerne napake; zeleni črti – 95 - odstotni interval zaupanja povprečnega odstopanja; temno rdeči črtkani črti - meje sprejemljivosti, ki obsegajo območje, opredeljeno s standardnim odklonom $\pm 1,96$; oranžna črta - vrednost 0.



Slika 9: Bland-Altmanova analiza primerjave rezultatov (absolutnih vrednosti) INR dobljenih na napravi POCT in analizatorju.

N=40; polna črta – povprečno odstopanje (z merskimi enotami) med dvema metodama (-0,12), prikaz konstantne napake; zeleni črti – 95 - odstotni interval zaupanja povprečnega odstopanja; temno rdeči črtkani črti - meje sprejemljivosti, ki obsegajo območje, opredeljeno s standardnim odklonom $\pm 1,96$; oranžna črta - vrednost 0.

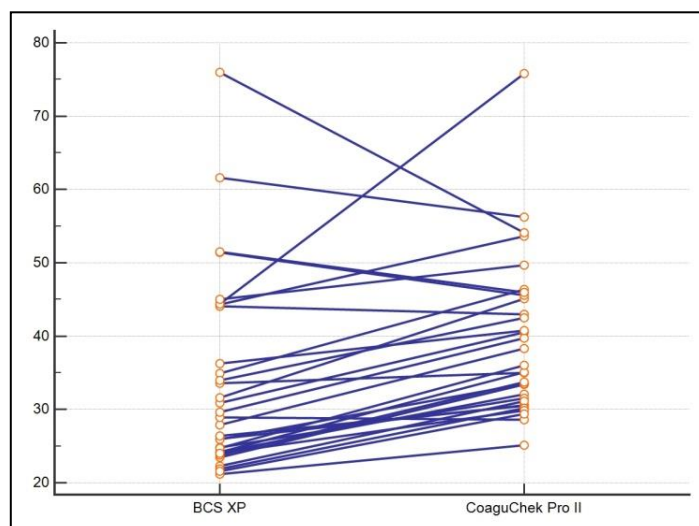


Slika 10: Bland-Altmanova analiza primerjave rezultatov (v odstotkih) INR dobljenih na napravi POCT in analizatorju.

N=40; polna črta – povprečno odstopanje (v odstotkih) med dvema metodama (-7,7%), prikaz sorazmerne napake; zeleni črti – 95 - odstotni interval zaupanja povprečnega odstopanja; temno rdeči črtkani črti - meje sprejemljivosti, ki obsegajo območje, opredeljeno s standardnim odklonom $\pm 1,96$; oranžna črta - vrednost 0.

2. Primerjava metod pri meritvah APTČ

Rezultate APTČ smo preverili z Wilcoxonovim testom (N=31). Za preiskavo APTČ smo ugotovili, da daje metoda 27,1% višje vrednosti in obstaja statistično pomembna razlika med metodama ($p=0,0003$) (Slika 11).



Slika 11: Wilcoxonov test o pomembnosti razlike parnih meritev za parameter APTČ.
Os y – prikaz vrednosti meritev v sekundah (preiskava APTČ); točke prikazujejo rezultate meritev, črte pa prikazujejo povezavo med razlikami parnih meritev, pridobljenih na napravi POCT in analizatorju v medicinskem laboratoriju.

Rezultati APTČ, ki smo jih dobili na vzorcih 9 bolnikov, niso bili vključeni v zgoraj navedeno statistično obdelavo podatkov. Gre za bolnike, ki smo jim določili visok odmerek heparina, zaradi zunajtelesne membranske oksigenacije (ECMO). Vrednosti teh vzorcev so presegale testno mejo linearnosti (>130 s). Vrednost APTČ je bila pri teh vzorcih, celo za 89,7 s nižja, glede na primerjalno metodo in to ravno zaradi različne občutljivosti testa na koncentracijo heparina v vzorcu (Preglednica XXII).

Tabela XXII: Vpliv heparina na določanje APTČ (občutljivost metode).

APTČ (s)	
CoaguChek Pro II	BCS XP
58,9	92,2
>130	>150
44,3	81,6
79,8	154,7
56,5	118,9
63,2	152,9
70,1	>160
62,1	>160
59,9	>150

Statistična analiza je pokazala, da metodi nista primerljivi in da so med njima statistično značilne razlike. Vrednosti izmerjene na napravi POCT se ne morejo primerjati z vrednostmi, dobljenimi v laboratoriju. Vzrok je najverjetneje v tem, da naprava POCT za interpretacijo vrednosti APTČ uporablja svoj referenčni interval, ki ga navaja proizvajalec in je drugačen od referenčnih intervalov, ki jih uporabljajo klinični laboratoriji (24,8 - 38,3 s). Uporabniki morajo biti pri uporabi naprave za merjenje APTČ seznanjeni z razliko v občutljivosti testa na koncentracijo heparina. Le-ta je drugačna od občutljivosti laboratorijskega testa na heparin, kar pri pacientih, ki dobivajo ECMO in pri bolnikih z visokimi odmerki heparina, povzroča v primerjavi z laboratorijsko vrednostjo, lažno nižje vrednosti APTČ. Pri teh bolnikih naprava ni primerna, saj lahko povzroči napačno klinično presojo. Merilne razlike med dvema napravama oz. primerjave metod so ponazorjene z regresijo Passing-Bablok in analizo Bland-Altman za PČ in INR ter uporabo Wilcoxonovog testa pomembnosti razlik pri parnih meritvah za rezultate APTČ. Passing-

Bablokova regresijska analiza je pokazala, da obstaja sorazmerno in konstantno odstopanje pri INR in sorazmerno odstopanje pri PČ, medtem ko je Bland-Altmanova analiza dokazala, da je navedeno odstopanje statistično pomembno, vendar ne tudi klinično pomembno (<15% glede na merila CLIA). Srednje odstopanje referenčne metode v primerjavi s srednjo vrednostjo testirane metode znaša 14,6% za PČ, medtem ko za INR znaša -7,7%. V postopek verifikacije niso bili vključeni bolniki, ki imajo oralno antikoagulantno terapijo. Priporočljivo pa je da se dodatno preuči primerljivost metod pri tovrstnih bolnikih, saj je naprava POCT namenjena zlasti takim bolnikom. S tem postopkom verifikacije smo potrdili podatek, ki ga navaja proizvajalec.

Z metodo verifikacije smo potrdili trditve proizvajalca, da je metoda za določanje APTČ na napravi POCT, do ravni 0,5 IU/mL neobčutljiva na nizko molekularni heparin (LMWH) in da se ne priporoča v okviru takšne vrste antikoagulacijske terapije. Uporaba testa APTČ se priporoča za spremljanje učinkovitosti terapije samo v tistem primeru, kjer se čas strjevanja podaljša sorazmerno s stopnjo heparina. Referenčni in terapevtski intervali za test APTČ (POCT) so lahko drugačni od tistih, ki se uporabljajo v laboratoriju. S primerjavo naprav, ki uporabljajo različne merilne metode je razvidno, da obstaja potreba po vzpostavljanju različnih referenčnih intervalov za test APTČ in možnost vnosa rezultatov, ki smo jih dobili v ločene baze podatkov za preiskave POCT in rutinske koagulacijske metode.

Da bi sprejeli pravo klinično odločitev glede uporabe naprave POCT, je zdravnikom v zvezi z verifikacijo in morebitno uvedbo metode, treba zagotoviti vse potrebne informacije o omejitvah, ki jih prinaša uporaba navedene naprave. Vse vzorce, pri katerih obstaja tudi najmanjša verjetnost o prisotnosti heparina ali druge vrste interference, je potrebno poslati v laboratorij na dodatno preverjanje. Ta raziskava nam je na koncu pokazala, da je uvedba naprave POCT v smislu naprave za preiskave ob bolniku, izvedljiva samo s predhodnim usposabljanjem kliničnega osebja.

5. SKLEPI

Naprava POCT je naprava za preiskave ob bolniku, ki ima preprost način upravljanja in je v našem primeru bila namenjena merjenju protrombinskega časa (PČ) in aktiviranega parcialnega tromboplastinskega časa (APTČ) iz polne venske, kapilarne ali arterijske krvi, vzete brez antikoagulantov.

Namestitev naprave na klinični oddelek pomeni, da je treba klinično osebje seznaniti z omejitvami uporabe le-te in zagotoviti ustrezno usposabljanje s strani laboratorija.

Namen naše naloge je bil verificirati preiskave POCT za merjenje PČ/INR in APTČ pred uvedbo v klinično prakso. Verificirali smo podatke proizvajalca glede natančnosti in točnosti. Na osnovi naših rezultatov lahko razljučimo:

1. Natančnost meritev POCT znaša: PČ, Nivo 1: KV=2,23; PČ, Nivo 2: KV=2,84; INR, Nivo 1: KV=0; INR, Nivo 2: KV=1,62; APTČ, Nivo 1: KV=1,43; APTČ, Nivo 2: KV=0,82 v seriji in PČ, Nivo 1: KV=1,90; PČ, Nivo 2: KV=4,20; INR, Nivo 1: KV=0; INR, Nivo 2: KV=2,64; APTČ, Nivo 1: KV=2,38; APTČ, Nivo 2: KV=4,65 med serijami in je skladna s podatkom, ki ga navaja proizvajalec.
2. Točnost preiskav POCT znaša: PČ, Nivo 1: 98,8; PČ, Nivo 2: 95,75; INR, Nivo 1: 100; INR, Nivo 2: 92; APTČ, Nivo 1: 93,99; APTČ, Nivo 2: 94,84 in je skladna s podatki proizvajalca.
3. Primerljivosti rezultatov POCT z rezultati, dobljenimi z redno uporabljeno metodo na analizatorju, nismo dokazali za PČ, INR niti za APTČ. V povprečju so odstopanja znašala 14,6% za PČ in -7,7% za INR. Za preiskavo APTČ smo ugotovili, da daje metoda 27,1% višje vrednosti in obstaja statistično pomembna razlika med metodama ($p=0,0003$).

S primerjavo ugotovljenih ocen za natančnost in točnost s prej postavljenimi zahtevami, ki pogojujejo uporabnost POCT v diagnostiki, smo ocenili uporabnost POCT. Dobljena vrednost natančnosti in točnosti za določanje PČ, INR in APTČ na napravi POCT izpolnjuje zahtevana merila. Pomembno je, da pri bolnikih vrednosti koagulacijskih parametrov vedno spremljamo z isto metodo. Moramo se zavedati, da vrednosti APTČ izmerjene na napravi POCT niso primerljive z vrednostmi iz laboratorija.

6. LITERATURA

1. Gardiner C, Machin S, Mackie I. Point of Care Testing in Hemostasis. V: Kitchen S, Olson JD, Preston EF. Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis. Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons Ltd, 2009: 72-80.
2. Luppia PB, Muller C, Schlichtiger A, Schlebusch H. Point-of-care testing (POCT): Current techniques and future perspectives. *TrAC* 2011;30: 887-898.
3. Gubala V, Harris LF, Ricco AJ, Tan MX, Williams DE. Point of Care Diagnostics: Status and Future. *Anal Chem* 2011:1-29.
4. Futrell K. Laboratory Point-of-Care Testing: A Future Outlook. Indiana: Orchard Software 2015.
5. Plebani M, Lippi G. Point of care testing: evolving scenarios and innovative perspectives. *Clin Chem Lab Med* 2014;52: 309-311.
6. Žic A. Smjernice i preporuke za POCT. V: Baršić I. Pretrage uz bolesnika - izazov za laboratorijsku medicinu. Zagreb: Medicinska naklada, 2016: 29-30.
7. Point of Care Testing – Global Analysis & Market Forecasts. DPI Research & Marketing Solutions, 2016.
8. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. Clinical chemistry: techniques, principles, correlations. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; Wolters Kluwer, 2010: 211-220.
9. Nichols JH. Quality in point of care testing. *Expert Rev Mol Diagn* 2003;3(5): 563-572.
10. Futrell K. Point-of-Care Testing: The Great Boom Ahead. Indiana: Orchard Software 2016.
11. Nichols JH. Point of Care Testing: Past Experience and Future Challenges. *Point of Care* 2015;14: 103-105.
12. Marijančević D. Osiguranje kontrole kvalitete. V: Baršić I. Pretrage uz bolesnika - izazov za laboratorijsku medicinu. Zagreb: Medicinska naklada, 2016: 17-28.
13. Posebnost kontrolnih materijalov namenjenih za POCT.
https://croqalm.hdmblm.hr/images/predavanja-prezentacije/02_Vlasic_Tanaskovic_ZNACAJKE-IDEALNOG-UZORKA-ZA-VANJSKU-PROCJENU-KVALITETE.pdf (Dostopno: 06. 04. 2017).
14. Gašljević V. Validacija i mjerna nesigurnost. *Biochem Med* 2010;20: 57-63.
15. Westgard JO. Basic method validation. 2. izd. Gray Fox Trail, Madison WI: Westgard QC, Inc, 2003.

16. User verification of performance for precision and trueness; Approved Guideline. 2. izd.; CLSI 2005;25:17 (EP15-A2).
17. Guidelines for the evaluation of analysers in clinical chemistry, ECCLS Document 1986; 3/2.
18. Flegar Meštrić Z. Postupci ispitivanja (5.5) – kratka analitička validacija. V: Galjanić S, Vukasović I, Flegar Meštrić Z. Akreditacija medicinsko-biokemijskog laboratorija. Zagreb: Medicinska naklada, 2010: 123-134.
19. Ćorić, J. Kontrola kvalitete rada u laboratorijskoj medicini. Sarajevo: Univerzitet u Sarajevu, Fakultet zdravstvenih studija u Sarajevu, 2014: 37-62, 85-102.
20. Tešija Kuna A. Verifikacija kvalitativnih postupaka ispitivanja. V: Vukasović I. Upravljanje kvalitetom u medicinskom laboratoriju, tumačenje zahtjeva u revidiranom upitniku za samoprocjenu. Zagreb: Medicinska naklada, 2016: 73-88.
21. Theodorsson E, Magnusson B, Leito I. Bias in clinical chemistry. Bioanalysis 2014: 1-38.
22. Bilić Zulle L. Usporedba metoda: Passing-Bablok regresija. Biochem Med 2011: 49-52.
23. Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. Biochem Med 2015: 141-51.
24. Roche. CoaguChek Pro II meter - Best in class.
25. Černe D, Ostanek B. Biomedicinska analitika I Učbenik za studente laboratorijske biomedicine. Ljubljana: Univerza v Ljubljani Fakulteta za farmacijo, 2012: 55-58.
26. Roche. CoaguChek PT Test.
27. Roche. Multicenter evaluation of the CoaguChek[®] Prothrombin Time (PT) Test on the CoaguChek[®] Pro II meter White paper.
28. Testni trakovi za določanje PČ. <http://www.mistrymedical.com/item/23910/roche-coaguchek-pt-test-strips-for-pro-ii--2-x-24---06688721019>. (Dostopno: 20. 03. 2018).
29. Roche. CoaguChek aPTT Test.
30. SIEMENS. Training Manual BCS[®] XP Revision: Version 2.0.
31. SIEMENS. SIEMENS Dade Innovin.
32. SIEMENS. Dade Actin FSL Activated PTT Reagent.
33. Roche. CoaguChek PT Controls.
34. Roche. CoaguChek aPTT Controls.