



ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2009

ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟ ΤΕΥΧΟΣ 1



ΕΝΗΜΕΡΩΤΙΚΟ ΔΕΛΤΙΟ



ΠΡΑΚΤΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΟΥ



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ - ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
Αλωπεκής 47 - 106 76 Αθήνα - τηλ.: 210 3645751
www.eekx-kb.gr

ΔΙΑΠΙΣΤΕΥΣΗ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΚΑΤΑ ISO 15189

Χ. Κρούπης

Λέκτορας Κλινικής Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας,
Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών, Π.Γ.Ν. «Αττικόν»

Το ακρωνύμιο της παγκόσμιας οργάνωσης-δικτύου για την προτυποποίηση (International Organization for Standardization) είναι για όλες τις γλώσσες το ίδιο και είναι το ISO, το οποίο προήλθε από την ελληνική λέξη «ίσος». Είναι δε ενδεικτικό του στόχου αυτού του παγκόσμιου φορέα, ο οποίος ιδρύθηκε το 1946 και έχει ως μέλη εθνικούς οργανισμούς τυποποίησης: να εκδίδει -μέσω τεχνικών επιτροπών- πρότυπα για την εναρμόνιση των προϊόντων και υπηρεσιών σε διάφορους τομείς της οικονομίας σε όλα τα κράτη-μέλη [1].

Η εφαρμογή προτύπων και στα κλινικά εργαστήρια προέκυψε από την ανάγκη για τεκμηρίωση και αμοιβαία αναγνώριση των εργαστηριακών αποτελεσμάτων που διακινούνται και παρέχονται παγκοσμίως. Στη σύγχρονη ιατρική πρακτική, ο ρόλος του κλινικού εργαστηρίου και ασφαλώς και του εργαστηρίου Μοριακής Διαγνωστικής γίνεται ολοένα και πιο σημαντικός για τη διάγνωση, πρόγνωση, παρακολούθηση και θεραπευτική αγωγή των ασθενών. Η απαίτηση συνεπώς για εργαστηριακά αποτελέσματα ακριβή και αξιόπιστα είναι προφανής και αναγκαία [2,3].

Το κατάλληλο πρότυπο για τα κλινικά εργαστήρια είναι το ISO 15189, το οποίο αρχικά συντάχθηκε από την τεχνική επιτροπή 212 το 2003 για να αναθεωρηθεί στη συνέχεια στη τελική του μορφή το 2007 [4]. Για κάποιο διάστημα υπήρξε διχογνωμία κατά πόσον το πρότυπο αυτό «ταιριάζει» στα εργαστήρια γενετικής ωστόσο αυτό ξεπεράστηκε και μάλιστα αναμένεται ότι στην επόμενη αναθεώρηση του προτύπου -πιθανότατα κατά το 2010-θα ληφθούν ιδιαίτερες μέριμνες για «ευαίσθητα» θέματα που αφορούν τα εργαστήρια αυτά (π.χ. χρήση-φύλαξη του γενετικού υλικού, έγγραφη συγκατάθεση των ασθενών, σύνδεση με γενετική συμβουλευτική, οδηγίες για τη σωστή σύνταξη της έκθεσης αποτελεσμάτων κ.λπ.).

Η επίσημη αναγνώριση από αρμόδιο φορέα ότι ένα εργαστήριο είναι «τεχνικά επαρκές» να διεξάγει συγκεκριμένες δοκιμασίες καλείται διαπίστευση (accreditation) και μόνο ένας αρμόδιος φορέας διαπίστευσης λειτουργεί ανά χώρα. Στην Ελλάδα είναι το Ε.ΣΥ.Δ., (Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης) το οποίο συμμετέχει σε συμφωνίες αμοιβαίας αναγνώρισης με πολλούς αντίστοιχους εθνικούς φορείς άλλων χωρών, αλλά και με ανώτερους διακρατικούς οργανισμούς, όπως η EA (European co-operation for Accreditation) και η ILAC (International Laboratory Accreditation Cooperation) [5]. Σε πολλά Ευρωπαϊκά κράτη είναι υποχρεωτική η διαπίστευση στα εργαστήρια που

παρέχουν γενετικά αποτελέσματα ενώ σε άλλα αναμένεται να γίνουν με τη πάροδο του χρόνου.

Η λειτουργία ενός συστήματος ποιότητας κατά το πρότυπο ISO 15189 ασφαλώς απαιτεί γραφειοκρατική εργασία κατά την εγκατάστασή του αλλά και κατά τη διατήρησή του. Η κάλυψη των απαιτήσεων του προτύπου επιφέρει αρχικά οικονομικό «κόστος ποιότητας» στο εργαστήριο, ωστόσο εκτιμάται ότι μέσω των μειωμένων επαναλήψεων των εργαστηριακών εξετάσεων, των μειωμένων άστοχων ενεργειών του εργαστηρίου, αλλά και της αυξημένης ικανοποίησης των ιατρών και των ασθενών, η οποία δημιουργεί αυξημένο κύρος στο εργαστήριο, μακροπρόθεσμα δημιουργούνται οικονομικά οφέλη.

Τα πέντε σημεία τα οποία είναι και τα πιο δύσκολα αλλά και πιο σημαντικά για την αναγνώριση της «τεχνικής επάρκειας» κάθε κλινικού εργαστηρίου (ανάμεσά τους και τα εργαστήρια Μοριακής Διαγνωστικής) είναι τα ακόλουθα:

Α) Υποδομή εργαστηρίου: Το προσωπικό πρέπει να είναι επαρκές σε αριθμό και γνώσεις και να ακολουθεί πρόγραμμα συνεχιζόμενης εκπαίδευσης. Οι εγκαταστάσεις πρέπει να είναι άριστες ως προς την άνεση και την ασφάλεια χώρου και φιλικές ως προς το περιβάλλον (κατάλληλη διαχείριση βιολογικών αποβλήτων). Ο εξοπλισμός πρέπει να είναι ο ενδεδειγμένος και να ακολουθείται απαρέγκλιτα συντήρηση (maintenance) σύμφωνα με καταγεγραμμένο πρόγραμμα.

Β) Επιλογή των κατάλληλων εργαστηριακών μεθόδων για τις υπό διαπίστευση παραμέτρους (scope of accreditation) με βάση τη βιβλιογραφία και συγκεκριμένους στόχους (π.χ. ελάττωση του εργαστηριακού σφάλματος, κλινική χρησιμότητα). Οι μέθοδοι πρέπει να περιγράφονται επαρκώς στο Εγχειρίδιο των μεθόδων και να ακολουθεί σύνταξη τυποποιημένων οδηγιών (SOPs, Standard Operating Procedures) για την κατάλληλη εφαρμογή τους από το προσωπικό του εργαστηρίου. Η πιστή εκτέλεση των ανωτέρω μεθόδων αλλά και των κανόνων της ορθής εργαστηριακής πρακτικής (GLP, Good Laboratory Practice) πρέπει να είναι αντικείμενο συχνών εσωτερικών επιθεωρήσεων (internal audits). Πρέπει να γίνεται προσπάθεια μείωσης της προ-αναλυτικής διακύμανσης με κατάλληλες οδηγίες προς το προσωπικό, τους «χρήστες» (ιατρούς) και τους «πελάτες» (ασθενείς). Επίσης να ελέγχονται και οι μετα-αναλυτικές διαδικασίες και ως τελικό προϊόν να εκδίδεται μια εμπειριστατωμένη έκθεση αποτελεσμάτων.

Γ) Επικύρωση ή επαλήθευση μεθόδων αναλόγως του εάν είναι εσωτερική (in house) μέθοδος ή προτυποποιημένη μέθοδος κατασκευαστή (kit). Να αποδεικνύεται όπου είναι δυνατόν η ιχνηλασιμότητα (traceability) των μετρήσεων με μεθόδους αναφοράς και πιστοποιημένα υλικά αναφοράς (CRM, certified reference materials).

Δ) Εσωτερικός έλεγχος ποιότητας εργαστηριακών δοκιμασιών με την ενδεδειγμένη συχνότητα και τη χρήση κατάλληλων δειγμάτων ελέγχου (internal QC controls).

Ε) Εξωτερικός έλεγχος ποιότητας (external QC) εργαστηριακών δοκιμασιών με συμμετοχή σε διεργαστηριακά σχήματα για τις δοκιμασίες υπό διαπίστευση.

Η μη επιτυχής επίδοση του εργαστηρίου σε οποιονδήποτε από τους ανωτέρω τομείς οι οποίοι αποτελούν τους «πυλώνες της ποιότητας» αποτελεί σοβαρή μη συμμόρφωση (non conformity) και μπορεί να αποτελέσει αιτία για τη μη απονομή ή απώλεια της διαπίστευσης του, είτε κατά την αρχική αξιολόγηση είτε και κατά την ετήσια επιτήρηση ή την επαναξιολόγηση ανά τετραετία, αντίστοιχα.

Ας δούμε στη συνέχεια την εφαρμογή των ανωτέρω στα εργαστήρια Μοριακής Διαγνωστικής:

A) Υποδομή εργαστηρίου

Είναι ο πυλώνας της ποιότητας που δεν υπόκειται σε απόλυτα αντικειμενικά κριτήρια αναφορικά με το προσωπικό, τις εγκαταστάσεις και τον εξοπλισμό. Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την ασφάλεια του προσωπικού από δυνητικά επικίνδυνα αντιδραστήρια -που χρησιμοποιούνται κατά κόρον στη Μοριακή Βιολογία (π.χ. EtBr)- και τα οποία πρέπει να απενεργοποιούνται πριν την απόρριψή τους στα οικιακά λήμματα. Έχουν αναγραφεί στην βιβλιογραφία πολλές οδηγίες για τον διαχωρισμό των χώρων και μάλιστα έχει προταθεί ιδανικά η διαίρεση σε τέσσερις περιοχές [6] είτε με διαφορετικά δωμάτια με κατάλληλη διάταξη και ελεγχόμενη πίεση του αέρα είτε με θαλάμους νηματικής ροής ή απαγωγούς (cabinets, hoods) [7]. Ωστόσο τουλάχιστον πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για τον διαχωρισμό των pre-PCR διαδικασιών από τις post-PCR διαδικασίες και επίσης πρέπει ο κάθε χώρος να έχει τον δικό του εξοπλισμό (π.χ. πιπέττες, vortex) ώστε να μη γίνονται μετακινήσεις μικροεξοπλισμού. Ο κρίσιμος εξοπλισμός για τη λειτουργία ενός εργαστηρίου Μοριακής Διαγνωστικής (PCR μηχανήματα, microarrays, φασματοφωτόμετρα για τη μέτρηση συγκέντρωσης του γενετικού υλικού, υδατόλουτρα ή thermo blocks ή επωαστικοί κλίβανοι εάν χρησιμοποιούνται, πιπέττες κ.λπ.) πρέπει να διακριβώνεται για την ορθή λειτουργία του. Ψυγεία, καταψύκτες, φυγόκεντροι, vortex, ζυγοί και πεχαμετρικές συσκευές πρέπει να καθαρίζονται και να συντηρούνται σε τακτική βάση.

B) Επιλογή μεθόδων - Καλή εργαστηριακή πρακτική (GLP)

Η επιλογή της μεθόδου από ένα εργαστήριο Μοριακής Διαγνωστικής γίνεται με βάση:

1. Τα πρακτικά χαρακτηριστικά της εφαρμογής της (application characteristics): είδος και ποσότητα

δείγματος, ταχύτητα προσδιορισμού και χρόνος απόκρισης του εργαστηρίου, είδος δοκιμασίας (π.χ. screening test), απαιτούμενοι χειρισμοί του δείγματος, απαιτούμενες γνώσεις από το προσωπικό, κόστος, συχνότητα βαθμονόμησης εξοπλισμού και μεθόδου, διαθεσιμότητα υλικών ελέγχου ποιότητας (QC controls), δυνατότητα αποθήκευσης του δείγματος κ.λπ.

2. Τα αναλυτικά χαρακτηριστικά (analytical characteristics):

i) Μεθοδολογικά χαρακτηριστικά (methodology characteristics) όπως: αναλυτική ευαισθησία και αναλυτική ειδικότητα (analytical sensitivity and specificity).

ii) Χαρακτηριστικά επίδοσης (performance characteristics) της μεθόδου όπως: πιστότητα (precision), ορθότητα (trueness, bias), ακρίβεια (accuracy), όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης (limit of detection and quantitation), γραμμικότητα (linearity) και αναλυτικό εύρος μέτρησης (range), ανάκτηση (recovery), παρεμβολή (interference), υπολογισμός αβεβαιότητας (uncertainty), ανθεκτικότητα (robustness) και αντοχή (ruggedness) της μεθόδου, όρια αναφοράς του πληθυσμού (reference values) [8,9].

3. Τα κλινικά χαρακτηριστικά: η μοριακή μέθοδος προς διαπίστευση πρέπει να δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα ως προς την κλινική αξιολόγηση (clinical validation) σε σχέση με το νόσημα (διαγνωστική κλινική ευαισθησία και ειδικότητα, αρνητική και θετική προβλεπτική αξία). Επίσης, να έχει κλινική αξία (clinical utility) δηλαδή να είναι χρήσιμη στη διάγνωση και θεραπεία του ασθενούς και όχι να έχει απλά ερευνητική χρήση [10].

Τα ανωτέρω χαρακτηριστικά αξιολογούνται με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα, οδηγίες που έχουν εκδοθεί από τις διάφορες επιστημονικές ενώσεις ή ομάδες εργασίας πάνω σε ένα κλινικό πρόβλημα (βλέπε παρακάτω) ή από δεδομένα που παρέχουν οι κατασκευαστές διαγνωστικών αντιδραστηρίων ή κιτς.

Οι κλινικές δοκιμές που εκτελούνται στη Μοριακή Διαγνωστική θα μπορούσαν να ταξινομηθούν σε 3-4 τομείς όπως είναι:

1. Η Μοριακή Μικροβιολογία (ανίχνευση ή μη μικροοργανισμών, τυποποίηση-φυλογενετική ανάλυση, ποσοτικοποίηση μικροοργανισμού),
2. Η Μοριακή Γενετική (ανίχνευση κληρονομούμενων μεταλλάξεων στους φορείς, στην προγεννητική και προεμφυτευτική διάγνωση, μέτρηση του αριθμού CGG τριπλετών στη 5'-UTR του *FMR1* γονιδίου στο εύθραυστο X),

3. Η Ανίχνευση ταυτότητας (στα εγκληματολογικά εργαστήρια) ή πατρότητας με πολυμορφισμούς μεγέθους σε διάφορα STRs στο γενετικό υλικό καθώς και
4. Η Γενική Μοριακή Βιολογία κυρίως σε καρκίνους όπως είναι η ανίχνευση σωματικών μεταλλάξεων, η ποσοτικοποίηση γονιδίων (gene dosage) ή χρωμοσωμάτων (ανευλοειδίες) ή μεταγράφων στην ανίχνευση κακοηθειών ή ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου (minimal residual disease).

Οι περισσότερες από τις δοκιμασίες που εκτελούνται στη Μοριακή Διαγνωστική έχουν ως βάση τους την αντίδραση PCR, ωστόσο πέραν των PCR μεθοδολογιών ή των παραγώγων τους (nested, multiplex, real-time, PCR-RFLP, ARMS, ASO κ.λπ.) χρησιμοποιούνται και άλλες μεθοδολογίες όπως υβριδισμού κατά Southern blot, ISH (πιο συχνά η FISH), NASBA, TMA, LCR κ.λπ. Ειδικά για τις PCR μεθοδολογίες πρέπει να ακολουθούνται σχολαστικά οδηγίες καλής εργαστηριακής πρακτικής [6,11,12] σχετικά με:

α) Την αποφυγή επιμολύνσεων στην υπερευαίσθητη αυτή μεθοδολογία (αποστείρωση διαλυμάτων, συχνή χρήση και αλλαγή γαντιών, αποφυγή aerosols με χρήση ειδικών πιπετών ή ρυγχών με φίλτρο, UV ακτινοβολία χώρων κ.λπ.) και

β) Τον έλεγχο ψευδώς αρνητικών ή θετικών αποτελεσμάτων (έλεγχος ειδικότητας PCR προϊόντος, χρήση αρνητικού-θετικού μάρτυρα [control] και τυφλού [blank] σε κάθε PCR αντίδραση, έλεγχος των κρίσιμων αντιδραστήριων primers/probes και βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης, αντιδράσεις εις διπλούν, έλεγχος ποιότητας και ποσότητας DNA/RNA, έλεγχος με ανθρώπινα γονίδια αναφοράς, έλεγχος για αναστολείς της αντίδρασης PCR κ.λπ.). Ειδικά στη Μοριακή Μικροβιολογία σε μη κυτταροβριθή δείγματα (π.χ. ENY) απαιτείται η προσθήκη DNA ακοουθίας ώστε να γίνεται ο κατάλληλος έλεγχος της αναστολής της PCR αντίδρασης (inhibition controls) [13].

Έχουν εκδοθεί οδηγίες για τις μοριακές μεθοδολογίες SSCP, DGGE, Heteroduplex analysis, PTT [14], DNA Sequencing [15], DHPLC [16], real-time qPCR [17-19], Ampio-PCR και FISH [20], MLPA, και αυτοματοποιημένη απομόνωση DNA στο δικτυακό τόπο της Eurogentest (www.eurogentest.org) κ.λπ. Επίσης, έχουν εκδοθεί και γενικές οδηγίες για μοριακή διάγνωση μολυσματικών [13,21] και γενετικών νοσημάτων [13,22,23] αλλά και ειδικές οδηγίες -κριτήρια για συγκεκριμένα νοσήματα όπως ο κληρονομούμενος καρκίνος μαστού και ωοθηκών (γονίδια *BRCA1/2*) [24], η κυστική ίνωση [25,26], οι αιμοσφαιρινοπάθειες [27], η θρομβοφιλία και η μετάλλαξη Factor V Leiden, η μυϊκή δυστροφία, η χορεία του Huntington, η αιμοχρωμάτωση, η συγγενής κώφωση, τα σύνδρομα Εύθραουστου

Χ, Marfan, Noonan, Angelman (στο δικτυακό τόπο της Eurogentest) κ.λπ.

Και στη Μοριακή Διαγνωστική οι προ-αναλυτικές διαδικασίες είναι σημαντικές: η σωστή προετοιμασία του ασθενούς για την δειγματοληψία στο σωστό χρονικό σημείο αναφορικά με τη πορεία της νόσου (specimen timing), η σωστή επιλογή αντιπηκτικού για το σωληνάριο δειγματοληψίας, η σωστή ταυτοποίηση του δείγματος, ο σωστός χειρισμός και η ταχεία μεταφορά του δείγματος, η θερμοκρασία μεταφοράς και αποθήκευσής του έως την ώρα του προσδιορισμού, η σωστή φυγοκέντρηση (για κυτταρολογικό υλικό) κ.λπ. Επί αρχικού υλικού RNA, απαιτείται είτε άμεση και γρήγορη απομόνωση και αποθήκευσή του στους -80°C είτε προσθήκη κατάλληλων σταθεροποιητών (π.χ. RNAlater) [6,11]. Επίσης, ο τρόπος λύσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων ή ο τρόπος μονιμοποίησης (π.χ. στα δείγματα από ιστούς έκλειστους σε παραφίνη) είναι παράμετροι στην κατεργασία για την απομόνωση DNA/RNA που μπορεί να οδηγήσει σε μεταβλητότητα του δείγματος προς μοριακή ανάλυση (αναστολή της αντίδρασης PCR).

Οι μετα-αναλυτικές διαδικασίες αφορούν τη σωστή μεταφορά των αποτελεσμάτων (π.χ. ιδανικά μέσω Laboratory Information System), την τήρηση των χρονικών διαστημάτων για τη φύλαξη των πρωτογενών δειγμάτων, των απομονωθέντων DNA/RNA και των ληφθέντων δεδομένων και τέλος τον σωστό τρόπο παρουσίασης στην έκθεση των αποτελεσμάτων (report). Οι οδηγίες που προαναφέρθηκαν για τα γενετικά νοσήματα παραπέμπουν στη σωστή αναγραφή των μεταλλάξεων [28,29]. Η αξιολόγηση παθολογικών γενετικών μεταλλάξεων γίνεται στα πλαίσια γενετικής συμβουλευτικής σε συνδυασμό με υπάρχουσα πληροφορία που υπάρχει είτε σε βάσεις δεδομένων μεταλλάξεων [30] είτε στη βάση γενετικών νοσημάτων OMIM [31].

Γ) Επικύρωση ή επαλήθευση μεθόδων

Το εργαστήριο καλείται απλά να επαληθεύσει (verification) τις μεθόδους που επιλέγει όταν αυτές είναι πρότυπες μέθοδοι αναφοράς ή αποδεκτές προτυποποιημένες (π.χ. εγκεκριμένες από το FDA με IVD/CE αντιδραστήρια ή κιτς), δηλαδή καλείται να αποδείξει ότι στα «δικά του χέρια», στις δικές του εργασιακές συνθήκες, με το δικό του προσωπικό και εξοπλισμό, μπορεί να επιτύχει τα ίδια ή καλύτερα αποτελέσματα στα χαρακτηριστικά επίδοσης από αυτά που αναφέρει ο κατασκευαστής.

Εάν επιλέξει να αναπτύξει δική του εσωτερική in-house μέθοδο με αντιδραστήρια που προς το παρόν είναι για ερευνητική χρήση (π.χ. RUO), πρέπει να διεξάγει πειράματα βελτιστοποίησης (optimization) και τα καταγράψει κατάλληλα (documentation) και στη συνέχεια:

1. Να επικυρώσει (analytical validation) τη μέθοδο, διαδικασία που απαιτεί και την τεκμηρίωση των μεθοδολογικών χαρακτηριστικών πέραν των χαρακτηριστικών επίδοσης,
2. Να αποδείξει ότι η μέθοδος δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα ως προς την κλινική αξιολόγηση και αξία και συνεπώς κατάλληλη για τη χρήση της (fit for purpose),
3. Να τη συγκρίνει με μια πρότυπη μέθοδο αναφοράς (reference method) και
4. Εάν παρέχει όρια αναφοράς στην έκθεση αποτελεσμάτων, τότε να πραγματοποιήσει μελέτη σε ένα μεγάλο αριθμό τεκμηριωμένα φυσιολογικών ατόμων, ισορροπημένο όσον αναφορά την ηλικία και το φύλο.

Η σύγκριση (method comparison) πρέπει να γίνει με ικανοποιητικό αριθμό δειγμάτων, (συνήθως 40), τα οποία πρέπει να καλύπτουν όλο το αναλυτικό εύρος μέτρησης και να μετρηθούν και με τις δύο μεθόδους εις διπλούν και σε βάθος χρόνου. Όταν εκτελείται η μία μέθοδος με ένα δείγμα, τότε πρέπει σε σύντομο χρονικό διάστημα ή παράλληλα να εκτελείται και η δεύτερη μέθοδος. Ακολουθεί στατιστική επεξεργασία των δεδομένων [32]. Εάν τα αποτελέσματα είναι ποιοτικά, πάλι επιλέγονται 40 δείγματα που να είναι ανήκουν και στις τρεις κατηγορίες (αρνητικά, ασθενώς θετικά, θετικά) και εξετάζεται η συμφωνία των μεθόδων (concordance) με υπολογισμό του ποσοστού συμφωνίας, αλλά και με στατιστικό τρόπο (McNemar's test). Ενίοτε ένα εργαστήριο απλά τροποποιεί ελαφριά μια πρότυπη μέθοδο (assay modification): σε αυτή τη περίπτωση, πάλι απαιτείται σύγκριση των μεθόδων πέραν της επαλήθευσης.

Στοιχεία Μετρολογίας

Για την κατανόηση εννοιών σε σχέση με το αναλυτικό σφάλμα και την επαλήθευση ή επικύρωση μεθόδων και προς αποφυγή συγχύσεων, στη συνέχεια παρατίθενται ορισμοί σε θεμελιώδεις έννοιες της Μετρολογίας έτσι όπως χρησιμοποιούνται στο πρότυπο ISO 15189 [4].

Πιστότητα (Precision): εκφράζει τη διασπορά (dispersion) των αποτελεσμάτων όταν η μεθοδολογία επαναλαμβάνεται στο ίδιο δείγμα λόγω του τυχαίου σφάλματος (random error) που μπορεί να οφείλεται στην ογκομέτρηση, στο χειριστή κ.λπ. Διακρίνεται σε επαναληψιμότητα (repeatability), όταν οι μετρήσεις είναι εντός της ίδιας σειράς ή σε βραχύ χρονικό διάστημα ή εντός της ίδιας μέρας (within run ή within day) και σε αναπαραγωγιμότητα (reproducibility) όταν οι μετρήσεις είναι μεταξύ ημερών (between days) και καλλίτερα σε βάθος χρόνου και με μετρήσεις που εκτελούνται από όλο το εμπλεκόμενο προσωπικό. Μέτρα της πιστότητας ή καλλίτερα της μη-πιστότητας (imprecision) για τις ποσοτικές μεθόδους αποτελούν η τυπική απόκλιση (SD) και η σχετική τυπική απόκλιση ή συντελεστής μεταβλητότητας (coefficient of

variation, CV). Η SD της αναπαραγωγιμότητας είναι πάντοτε μεγαλύτερη της SD της επαναληψιμότητας.

Ορθότητα (trueness, bias): εκφράζει τη διαφορά του μέσου όρου των μετρήσεων από την αληθή τιμή όπως αυτή καθορίστηκε από τη σύγκριση με μέθοδο αναφοράς που χρησιμοποιεί ως βαθμονομητές πρότυπα υλικά ή μια τιμή-στόχο (consensus) και ουσιαστικά αποτελεί το συστηματικό σφάλμα (systematic error) που είναι ενδογενές συστατικό της μεθόδου. Μέτρο του είναι η απόλυτη διαφορά, το B% και το z-score (ή το SDI όταν πρόκειται για διεργαστηριακό σχήμα).

Ακρίβεια (accuracy) ή ορθότερα ανακρίβεια ή έλλειψη ακρίβειας (inaccuracy): περιλαμβάνει για μια τυχαία μέτρηση την πιστότητα και την ορθότητα.

Ιχνηλασιμότητα (traceability): από μετρολογική σκοπιά ορίζεται ως ιδιότητα του αποτελέσματος μιας μέτρησης ή της τιμής ενός βαθμονομητή (calibrator) να συσχετισθεί με γνωστά υλικά αναφοράς, συνήθως διεθνή πρότυπα, μέσω μιας άρρηκτης αλυσίδας συγκρίσεων που έχουν όλα γνωστές αβεβαιότητες [33]. Ο όρος ιχνηλασιμότητα ενίοτε αναφέρεται και στη δυνατότητα να βρίσκεται στο σύστημα ποιότητας του εργαστηρίου ανά πάσα στιγμή το ποιος, πότε, που, έκανε κάτι κατά την προ-αναλυτική, αναλυτική και μετα-αναλυτική φάση μιας κλινικής δοκιμής.

Οι ποσοτικές μοριακές αναλύσεις απαιτούν βαθμονομητή για την κατασκευή προτύπου καμπύλης. Βεβαίως, κρίσιμα μεγέθη όπως η θερμοκρασία μιας επώασης, ο όγκος και η μάζα που ογκομετρούνται ή ζυγίζονται για μια μοριακή μέθοδο είναι ιχνηλάσιμα μεγέθη ως προς πρότυπα που φυλάσσονται στο Διεθνές Γραφείο Μέτρων και Σταθμών, για αυτό και οι συσκευές που χρησιμοποιούνται για τον σκοπό αυτό (πιπέττες, ζυγοί, θερμομόμετρο επωαστήρα) πρέπει να διακριβώνονται.

Αβεβαιότητα (uncertainty): πρόκειται για ένα σχετικά νέο όρο στη Μετρολογία και ορίζεται από τη EURACHEM ως μία παράμετρος που συνδέεται με το αποτέλεσμα της ποσοτικής μέτρησης και χαρακτηρίζει τη διασπορά των τιμών που λογικά μπορούν να αποδοθούν στη προσδιοριζόμενη παράμετρο [34]. Οι όροι αβεβαιότητα και σφάλμα δεν είναι συνώνυμοι. Ονομάζεται τυπική αβεβαιότητα όταν εκφράζεται ως τυπική απόκλιση ή σχετική τυπική αβεβαιότητα όταν εκφράζεται ως CV και δεν έχει μονάδες. Η συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα είναι ο συνδυασμός των επιμέρους τυπικών αβεβαιότητων και υπολογίζεται μαθηματικά με τον νόμο διαδόσεως των σφαλμάτων. Τα συστατικά της αβεβαιότητας ταξινομούνται σε τύπου A και τύπου B. Η τύπου A αβεβαιότητα υπολογίζεται με στατιστικούς τρόπους και συνηθέστερα από τα πειράματα επαλήθευσης της μεθόδου (αναπαραγωγιμότητα). Η τύπου B αβεβαιότητα είναι δύσκολο να

υπολογισθεί επακριβώς, καθώς περιλαμβάνει και το προαναλυτικό μέρος ενός προσδιορισμού, απλά εκτιμάται από διάφορες πηγές και παράπλευρη πληροφορία, όπως αυτή που παρέχεται από τη διακρίβωση των βαθμονομητών (εάν υπάρχουν), τον υπολογισμό του σφάλματος της καμπύλης και του εξοπλισμού (π.χ. πιπέττας). Έχει υπολογισθεί ότι το προαναλυτικό μέρος ενός προσδιορισμού εκτός και εντός ενός εργαστηρίου μπορεί να συνεισφέρει έως και στο 57% της αβεβαιότητας μιας μέτρησης [35].

Η αβεβαιότητα μιας μέτρησης δεν υπονοεί την αμφιβολία για την αξιοπιστία του αποτελέσματος, αλλά αυξημένη σιγουριά για το εύρος στο οποίο ευρίσκεται η πραγματική τιμή. Για να γίνει καλλίτερα αντιληπτός ο παραπάνω ισχυρισμός, ας υποθέσουμε ότι σε μια μόλυνση με ιό η κρίσιμη κλινική απόφαση να αρχίσει η θεραπεία είναι μόνο όταν ανιχνευθούν πάνω από 400 αντίγραφα του ιού/μλ. Δύο εργαστήρια Μοριακής Διαγνωστικής δίνουν στο ίδιο αίμα ασθενούς τα παρακάτω αποτελέσματα για το ιικό φορτίο:

Εργαστήριο 1: 450 με αβεβαιότητα ± 100 αντίγραφα/μλ (δηλαδή 350 έως 550 αντίγραφα/μλ)

Εργαστήριο 2: 410 με αβεβαιότητα ± 9 αντίγραφα/μλ (δηλαδή 401 έως 419 αντίγραφα/μλ)

Το αποτέλεσμα του εργαστηρίου 1 δεν προσδίδει σιγουριά για το εάν το αποτέλεσμα είναι πάνω από το κρίσιμο όριο των 400 αντιγράφων/μλ ενώ το αποτέλεσμα του εργαστηρίου 2 αν και μικρότερο από αυτό του εργαστηρίου 1, έχει μικρότερη αβεβαιότητα και κατά συνέπεια προσδίδει σιγουριά στον κλινικό ιατρό ότι ο ασθενής του πρέπει να ξεκινήσει θεραπευτική αγωγή.

Η επαλήθευση μιας μοριακής μεθόδου, αλλά και ο εσωτερικός έλεγχος ποιότητας μεθόδων (βλέπε παρακάτω) στην Μοριακή Διαγνωστική θα ωφεληθεί πολύ από τη δημιουργία πιστοποιημένων υλικών αναφοράς [36]. Αυτά διατηρούν τις ιδιότητες τους για μεγάλο χρονικό διάστημα, είναι σταθερά σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιακών συνθηκών και έχουν συγκεκριμένες τιμές-στόχους και τυπικές αποκλίσεις και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως υλικά ελέγχου μιας μεθόδου. Όταν δεν υπάρχει τέτοιο υλικό αναφοράς θα πρέπει να χρησιμοποιούνται controls των κατασκευαστών ή υλικά από διεργαστηριακά σχήματα ή υλικά αποσταλλέντα από εργαστήριο αναφοράς.

Από τα όσα ελέγχθηκαν ανωτέρω, είναι φανερό πως θα ξεκινήσει ένα εργαστήριο Μοριακής Διαγνωστικής την επαλήθευση των μεθόδων του [37]. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο αριθμός των χαρακτηριστικών επίδοσης που απαιτούνται για την επαλήθευση ορίζεται από την ειδική τεχνική επιτροπή για τα κλινικά εργαστήρια του αρμόδιου εθνικού φορέα διαπίστευσης. Επίσης είναι εύκολα αντιληπτό ότι για τις ποιοτικές μέθοδοι απαιτούνται λιγότερα χαρακτηριστικά επαλήθευσης (επαναληψιμότητα, αναπαραγωγιμότητα, όριο ανίχνευσης).

Η επαναληψιμότητα μπορεί να υπολογισθεί εκτελώντας μερικές δοκιμές εντός μιας αναλυτικής σειράς ενώ για την αναπαραγωγιμότητα σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα δείγματα ελέγχου που χρησιμοποιεί το εργαστήριο (αριθμός δειγμάτων, $n=10-20$). Η ορθότητα μπορεί να υπολογισθεί, είτε από τα δείγματα ελέγχου ($n=20$), είτε από τη συμμετοχή σε διεργαστηριακά σχήματα, είτε από πειράματα ανάκτησης σε ενισχυμένο (spiked) λευκό ή θετικό δείγμα (π.χ. ανάμειξη 1:1 ενός υψηλού και ενός χαμηλού control). Η ανάκτηση είναι άριστη όταν οι τιμές κυμαίνονται από 95-105%.

Η γραμμικότητα της μεθόδου μπορεί να εξετασθεί σε τουλάχιστον 4 δείγματα τα οποία καλύπτουν το εύρος των συνήθων μετρήσεων –που μπορεί να προκύψουν από αραιώση ενός δείγματος ελέγχου με κατάλληλο αραιωτικό μέσο– όπου και θα εκτελεσθεί ο προσδιορισμός εις τριπλούν. Εν συνεχεία γίνεται στατιστικός έλεγχος της παλινδρόμησης όπου πρέπει $r^2 > 0,95$ και η κλίση μεταξύ 0,95 και 1,05 για να είναι γραμμική η μέθοδος. Η μέθοδος παύει να είναι γραμμική όταν σε δύο συνεχόμενα σημεία παρουσιάζει μεγάλη απόκλιση από την αναμενόμενη τιμή.

Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (LOD, limit of detection) υπολογίζεται όπου είναι απαραίτητο και ορίζεται μετρολογικά ως η συγκέντρωση εκείνη για την οποία η απόκριση της μεθόδου διαφέρει από την απόκριση του λευκού διαλύματος (blank) κατά το τριπλάσιο της τυπικής απόκλισης του μέσου όρου του λευκού [8]. Στη Μοριακή Διαγνωστική ουσιαστικά είναι η λειτουργική ευαισθησία δηλαδή η συγκέντρωση της μετρούμενης παραμέτρου η οποία μπορεί να μετρηθεί στο 95% των μετρήσεων (19 στις 20 προσπάθειες) [17].

Το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου (LOQ, limit of quantitation), είναι η ελάχιστη συγκέντρωση της μετρούμενης παραμέτρου όπου ο συντελεστής μεταβλητότητας CV είναι 20%. Το εύρος μετρήσεων ορίζεται ως: LOQ-Max τιμή.

Εάν το εργαστήριο παρέχει όρια αναφοράς, πρέπει να επαληθεύσει τις παρεχόμενες τιμές του κατασκευαστή συγκρίνοντας τη μέση τιμή με τη μέση τιμή μικρού αριθμού ($n=20$) δειγμάτων φυσιολογικού πληθυσμού (t-test).

Δ) Εσωτερικός έλεγχος ποιότητας

Άλλο πολύ σημαντικό τμήμα του εσωτερικού ελέγχου ποιότητας είναι η χρήση των υλικών ελέγχου (QC controls), τα οποία όπως προαναφέρθηκε είναι συνήθως δείγματα με γνωστές τιμές και τυπικές αποκλίσεις για τις προσδιοριζόμενες παραμέτρους ώστε να περιλαμβάνονται στην κατεργασία των δειγμάτων σε κάθε αναλυτική σειρά (analytical run) και να ελέγχεται αποτελεσματικά η μεθοδολογία και η ανάλυση των δεδομένων (process and data acquisition QC controls). Συζητείται πολύ πλέον η έννοια της χρήσης ενός ασθενώς θετικού δείγματος (στη Μοριακή

Μικροβιολογία είναι απαραίτητο!) καθώς με αυτό τον τρόπο ελέγχεται καλλίτερα η σταθερή απόδοση της πολυμεράσης στις PCR μεθοδολογίες [38]. Έως τώρα έχουν προκύψει πιστοποιημένα υλικά αναφοράς μόνο για τον έλεγχο της μετάλλαξης G20210A του γονιδίου της προθρομβίνης (IRMM/IFCC 490-2) καθώς και γίνεται προσπάθεια για κάποιες μεταλλάξεις του γονιδίου της κυστικής ίνωσης [39], αντίγραφα bcr-abl, HPV-16/18 (WHO-NIBSC) κ.λπ. Υπάρχει μεγάλη συζήτηση κατά πόσο τα control σε πλασμίδια είναι το ίδιο αξιόπιστα όπως τα γενωμικά controls και δεν δημιουργείται κάποιο matrix effect. Υλικά ελέγχου διατίθενται πλέον από αρκετούς οργανισμούς ή εταιρείες όπως τις JRC-IRMM, WHO, CDC, ATCC/Coriell, NIBSC, NGRL, LGC, Acrometrix, Advanced Biotechnologies, MMQCI κ.λπ.

Στην αρχή, για τις πρώτες 20 φορές μπορεί να χρησιμοποιηθούν οι τιμές του κατασκευαστή του υλικού ελέγχου για τη μέση τιμή και για τα διαστήματα $\pm 1 SD$, $\pm 2SD$, $\pm 3SD$ τα οποία συνήθως είναι μεγάλα, ωστόσο αναμένεται ότι στη συνέχεια το εργαστήριο θα χρησιμοποιήσει τις δικές του τιμές για την κατασκευή των διαγραμμάτων ελέγχου (control charts) Levey-Jennings. Το εργαστήριο οφείλει να καταγράψει την πολιτική που ακολουθεί: α) για τον αριθμό και τα επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου που θα εκτελεστούν ανά αναλυτική σειρά β) για τα κριτήρια που θα εφαρμοστεί σε σχέση με την αποδοχή ή απόρριψη της αναλυτικής σειράς με βάση τις τιμές του εσωτερικού ελέγχου ποιότητας και γ) τις ενδεδειγμένες διορθωτικές ενέργειες που πρέπει να γίνουν.

Μπορεί π.χ. να ακολουθήσει μέθοδο ενός κριτηρίου 1_{2s} ή 1_{3s} , έχοντας όμως αυξημένη πιθανότητα λανθασμένης απόρριψης στην πρώτη περίπτωση ή μειωμένη πιθανότητα ανίχνευσης σφάλματος στη δεύτερη [40]. Υπάρχουν και η μέθοδος πολλαπλών κριτηρίων κατά Westgard (multirule method) η οποία χρησιμοποιεί 6 διαφορετικά κριτήρια (1_{2s} , 1_{3s} , 2_{2s} , R_{4s} , 4_{1s} , 10_x) και 2-4 μετρήσεις δειγμάτων ελέγχου ανά αναλυτική σειρά και τα οποία ανιχνεύουν και τυχαία και συστηματικά σφάλματα [41].

Ε) Εξωτερικός έλεγχος ποιότητας

Η ετήσια συμμετοχή του εργαστηρίου σε διεργαστηριακά σχήματα (EQA, external quality assessment ή PT, proficiency testing) είναι εκ των ουκ άνευ για την έννοια της διαπίστευσης [42]. Η συμμετοχή των εργαστηρίων σε εξωτερικό έλεγχο ποιότητας έχει βοηθήσει τα μέγιστα στην βελτίωση της ακρίβειας των μεθόδων διαχρονικά [43-45]. Η επιτυχής συμμετοχή του εργαστηρίου κρίνεται από το συνολικό βαθμό που έλαβε στο τέλος της χρονιάς για την παράμετρο υπό διαπίστευση. Ήδη υπάρχει ένας ικανοποιητικός αριθμός διεργαστηριακών σχημάτων για δοκιμές μοριακής διαγνωστικής: μοριακή ανίχνευση μικροοργανισμών και τυποποίηση, έλεγχος αντίστασης στην HIV αντιρετροϊκή αγωγή, ιικό

φορτίο (HBV, HCV, CMV), συγκεκριμένες μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια, γενετικά νοσήματα αλλά και πιο γενικά σχήματα αξιολόγησης του εργαστηρίου σε συγκεκριμένες τεχνικές π.χ. real-time qPCR, DNA Sequencing κ.λπ. Αυτά προσφέρονται από οργανισμούς όπως UK-NEQAS, EMQN, CAP, QCMD, UNIQ, INSTAND κ.λπ. οι περισσότεροι από τους οποίους έχουν προχωρήσει και σε διαπίστευση των διεργαστηριακών σχημάτων που προσφέρουν κατά το πρότυπο ISO 43-1.

Όπου δεν υπάρχει τεκμηριωμένα διεργαστηριακό σχήμα για μια παράμετρο, τότε ένας μικρός αριθμός εργαστηρίων που ασχολούνται με το συγκεκριμένο προσδιορισμό μπορούν να οργανώσουν δικό τους διεργαστηριακό σχήμα σύγκρισης με ανταλλαγή ικανοποιητικού αριθμού δειγμάτων σε ετήσια βάση για τον εξωτερικό έλεγχο ποιότητας των αποτελεσμάτων τους. Η επιτυχία στα διεργαστηριακά σχήματα αποτελεί σημαντικότατο δείκτη ποιότητας (quality indicator) για το σύστημα διαχείρισης ποιότητας του εργαστηρίου. Τυχόν αστοχίες καταγράφονται και αποτελούν απαρχή για διερεύνηση του προβλήματος και διορθωτική ή προληπτική ενέργεια (corrective/preventative action). Επίσης η επίδοση στα διεργαστηριακά σχήματα αποτελούν ασφαλώς θέμα προς συζήτηση κατά την ετήσια ανασκόπηση από τη διοίκηση του εργαστηρίου (management review).

Βιβλιογραφία

1. Κρούσης Χ. Διαπίστευση κλινικών εργαστηρίων κατά ISO 15189. Ενημερωτικό Δελτίο Ελληνικής Εταιρείας Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας 2008;47: 10-2.
2. Βογιατζάκης ΕΔ. Αξιολόγηση της ποιότητας των εργαστηριακών εξετάσεων. Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής 2007;24: 58-78.
3. Σταθάκη-Φερδερίγου Α, Πουλάκη Ε, Πρίγκος Ν, Λυκόκα ΕΧ, Πιπεράκη Κ. Οδηγίες διασφάλισης ποιότητας κλινικών εργαστηρίων. 1ο Σεμινάριο Συνεχιζόμενης Εκπαίδευσης, Πιστοποίηση-Διαπίστευση Κλινικών Εργαστηρίων. Αθήνα: Ελληνική Εταιρεία Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας; 2006, p. 53-6.
4. International Standards Organisation. ISO 15189: Medical Laboratories-particular requirements for quality and competence. 2007.
5. Μπακάς ΕΒ. Διαπίστευση Εργαστηρίων Δοκιμών. 1ο Σεμινάριο Συνεχιζόμενης Εκπαίδευσης, Πιστοποίηση-Διαπίστευση Κλινικών Εργαστηρίων. Αθήνα: Ελληνική Εταιρεία Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας; 2006, p. 7-11.
6. Neumaier M, Braun A, Wagener C. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. International Federation of Clinical Chemistry Scientific Division Committee on Molecular Biology Techniques. Clin Chem 1998;44: 12-26.

7. McCreedy BJ, Callaway TH. Laboratory design and work flow. In: Persing DH, Ed. *Diagnostic molecular Microbiology; principles and applications*. Washington, DC: ASM Press; 1993, p. 149-59.
8. Κουππάρης Μ. Σημειώσεις Χημειομετρίας.: Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2008.
9. National Pathology Accreditation Advisory Council. Requirements for the validation of in-house in vitro diagnostic devices (IVDs). Australia 2003.
10. OECD. Guidelines for quality assurance in molecular genetic testing. 2007.
11. Κρούπης Χ. Μοριακή διάγνωση ιών (και λοιπών παθογόνων μικροοργανισμών). 18ο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο, Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας στη Διαγνωστική. Αθήνα: Ελληνική Εταιρεία Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας; 2005, p.127-141.
12. Stathopoulou A. Laboratory Infrastructure and quality control in Molecular Diagnostics. XVI Meeting of Balkan Clinical Laboratory Federation, E Athens, 16-18 Oct, Greek Society of Clinical Chemistry-Clinical Biochemistry; 2008.
13. National Pathology Accreditation Advisory Council. Laboratory accreditation standards and guidelines for nucleic acid detection and analysis. Australia 2006.
14. American College of Medical Genetics. Standards and guidelines for Clinical Genetics laboratories. USA 2006.
15. Clinical Molecular Genetics Society. Best practice guidelines for DNA Sequencing analysis and interpretation. UK 2002.
16. Clinical Molecular Genetics Society. Practice guidelines for the use of the WAVE system in diagnostic service. UK 2003.
17. Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;55: 611-22.
18. Lefever S, Hellemans J, Pattyn F, et al. RDML: structured language and reporting guidelines for real-time quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 2009;37: 2065-9.
19. Raymaekers M, Smets R, Maes B, Cartuyvels R. Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. *J Clin Lab Anal* 2009;23: 145-51.
20. European Cytogeneticists Association (E.C.A.). Cytogenetic guidelines and quality assurance. 2008.
21. Tang YW, Procop GW, Persing DH. Molecular diagnostics of infectious diseases. *Clin Chem* 1997;43: 2021-38.
22. Dequeker E, Ramsden S, Grody WW, Stenzel TT, Barton DE. Quality control in molecular genetic testing. *Nat Rev Genet* 2001;2: 717-23.
23. Swiss Accreditation Service. Guidelines for accreditation of Swiss medical laboratories performing nucleic acid-based diagnostic procedures. 2004.
24. Larsson N, Borg A, Hodgson S, et al. EMQN best practice guidelines for molecular genetic analysis in hereditary breast/ovarian cancer. 2007.
25. Castellani C, Cuppens H, Macek M, Jr., et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* 2008;7: 179-96.
26. Dequeker E, Stuhmann M, Morris MA, et al. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders--updated European recommendations. *Eur J Hum Genet* 2009;17: 51-65.
27. Traeger-Synodinos J, Old JM, Petrou M, Galanello R. EMQN best practice guidelines for carrier identification and prenatal diagnosis of haemoglobinopathies. 2002.
28. Den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat* 2000;15: 7-12.
29. Wain HM, Bruford EA, Lovering RC, et al. Guidelines for human gene nomenclature. *Genomics* 2002;79: 464-70.
30. Porter CJ, Talbot CC, Cuticchia AJ. Central mutation databases--a review. *Hum Mutat* 2000;15: 36-44.
31. Hamosh A, Scott AF, Amberger J, Valle D, McKusick VA. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). *Hum Mutat* 2000;15: 57-61.
32. Κρούπης Χ. Διαπίστευση κλινικών εργαστηρίων κατά ISO 15189: εφαρμογή στις δοκιμές κυτταρομετρίας ρόης. 5ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κυτταρομετρίας, Ολυμπία: Ελληνική Εταιρεία Κυτταρομετρίας; 2008, p. 19-30.
33. Panteghini M. Traceability as a unique tool to improve standardization in laboratory medicine. *Clin Biochem* 2009;42: 236-40.
34. Ευαγγελόπουλος ΑΑ, Θωμαΐδης ΝΣ, Κουππάρης Μ. Αβεβαιότητα και ιχνηλασιμότητα στο βιοχημικό εργαστήριο: νέα θεώρηση κλασικών όρων. Δελτίον Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας 2006;51: 82-94.
35. Λυκόκα ΕΧ, Πουλάκη Ε, Πρίγκος Ν, Πιπεράκη Κ, Σταθάκη-Φερδερίγου Α. Αβεβαιότητα μετρήσεων στην Κλινική Χημεία. 1ο Σεμινάριο Συνεχιζόμενης Εκπαίδευσης, Πιστοποίηση-Διαπίστευση Κλινικών Εργαστηρίων. Αθήνα: Ελληνική Εταιρεία Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας; 2006, p. 41-52.
36. Gancberg D, Corbisier P, Schimmel H, Emons H, JRC-IRMM. Guidance document on the use of reference materials in genetic testing. 2008.
37. Λειμονή ΕΔ. Επαλήθευση Αναλυτικών Μεθόδων Κλινικών Εργαστηρίων. 1ο Σεμινάριο Συνεχιζόμενης Εκπαίδευσης, Πιστοποίηση-Διαπίστευση Κλινικών Εργαστηρίων. Αθήνα: Ελληνική Εταιρεία Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας; 2006, p. 32-40.

38. Rabenau HF, Kessler HH, Kortenbusch M, et al. Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. *J Clin Virol* 2007;40: 93-8.
39. Berwouts S, Gordon JT, Rundell CA, Barton DE, Dequeker E. Evaluation and use of a synthetic quality control material, included in the European external quality assessment scheme for cystic fibrosis. *Hum Mutat* 2008;29: 1063-70.
40. Παναγιωτάκης Ο. Διαγράμματα ελέγχου - Μέθοδοι ενός κριτηρίου. 2ο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο, Ο έλεγχος ποιότητας στο εργαστήριο Κλινικής Χημείας. Αθήνα: Ελληνική Εταιρεία Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας; 2003, p. 26-36.
41. Παναγιωτάκης Ο. Μέθοδοι πολλαπλών κριτηρίων - Μέθοδος Westgard. 2ο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο, Ο έλεγχος ποιότητας στο εργαστήριο Κλινικής Χημείας. Αθήνα: Ελληνική Εταιρεία Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας; 2003, p. 37-42.
42. Miller WG. The role of proficiency testing in achieving standardization and harmonization between laboratories. *Clin Biochem* 2009;42: 232-5.
43. Ahmad-Nejad P, Dorn-Beineke A, Pfeiffer U, et al. Methodologic European external quality assurance for DNA sequencing: the EQUALseq program. *Clin Chem* 2006;52: 716-27.
44. Orlando C, Verderio P, Maatman R, et al. EQUAL-qual: a European program for external quality assessment of genomic DNA extraction and PCR amplification. *Clin Chem* 2007;53: 1349-57.
45. Ramsden SC, Daly S, Geilenkeuser WJ, et al. EQUAL-quant: an international external quality assessment scheme for real-time PCR. *Clin Chem* 2006;52: 1584-91.