

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Zavedení nového analytického systému do rutinní biochemické laboratoře

Bc. Martin Berdych

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Maria Khalikova, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Jiří Plíšek, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2018

Poděkování

Děkuji Mgr. Marii Khalikové, Ph.D. za zadání zajímavého tématu, za odborné vedení, vstřícnost a ochotu. Dále děkuji RNDr. Jiřímu Plíškovi za trpělivost, cenné rady a pomoc při laboratorní práci. Dík patří i vedení laboratoře AeskuLab Hradec Králové za poskytnutí pracovních prostor a podmínek.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Dne 22.08.2018 v Hradci Králové

ABSTRAKT V ČEŠTINĚ

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Martin Berdych

Školitel: Mgr. Maria Khalikova, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Jiří Plíšek, Ph.D.

Název diplomové práce: Zavedení nového analytického systému do rutinní biochemické laboratoře

Diplomová práce se zabývá postupy v případě výměny biochemického analyzátoru za podmínek běžné laboratorní klinické praxe v biochemické laboratoři. Experimentální část je zaměřena na porovnání analytických systémů COBAS Integra 800 a COBAS 6000 a posouzení míry shody v měření biochemických metod pomocí statistických nástrojů (diferenciální analýza dle Bland –Altmana a regresní analýza dle Passing – Babloka). Za pomoci určení dílčích nejistot výsledků měření byla vyhodnocena verifikace jednotlivých metod pomocí měření kontrolních a referenčních materiálů na analyzátoru COBAS 6000. Porovnávaných osm metod - alaninaminotransferáza, antistreptolysin-O, aspartátaminotransferáza, C-reaktivní protein, HDL-cholesterol, hořčík, kreatinkináza a LDL-cholesterol – jevílo určitou míru difference, která byla posouzena. Následně u některých metod došlo ke změně referenčních mezí, o čemž byli informováni lékaři. Všech osm metod bylo verifikováno a bylo vyhodnoceno jako vhodné pro zamýšlené použití.

Klíčová slova: porovnání analyzátorů, porovnatelnost, verifikace, rutinní praxe biochemické laboratoře, nejistoty měření, opakovatelnost, preciznost

ABSTRACT IN ENGLISH

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Department of analytical chemistry

Candidate: Bc. Martin Berdych

Supervisor: Mgr. Maria Khalikova, Ph.D.

Consultant: RNDr. Jiří Plíšek, Ph.D.

Title of the diploma thesis: Implementation of new analytical system into a routine biochemical laboratory

The diploma thesis deals with the procedures in the case of the exchange of a biochemical analyzer under conditions of common laboratory clinical practice in a biochemical laboratory. The experimental part is focused on the comparison of the COBAS Integra 800 and COBAS 6000 analytical systems and the assessment of the degree of conformity in the measurement of biochemical methods using statistical tools (differential analysis according to Bland-Altman and Passing-Bablok regression analysis). With the help of determining the partial uncertainties of the measurement results, it evaluates the verification of individual methods by measuring control and reference materials on the COBAS 6000 analyzer. Comparison of eight methods - alanine aminotransferase, antistreptolysin-O, aspartate aminotransferase, C-reactive protein, HDL cholesterol, magnesium, creatine kinase and LDL cholesterol - a certain degree of difference appeared to have been assessed. Consequently some of the methods had changed the reference limits and the doctors were informed. All eight methods passed through verification and were judged to be appropriate for the intended use.

Keywords: comparison of analyzers, comparability, verification, routine practice of biochemical laboratory, uncertainty of measurement, repeatability, precision

OBSAH

1. ÚVOD.....	8
2. CÍL PRÁCE.....	9
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	10
3.1 Principy měření a průběhy analytických reakcí	10
3.1.1 Spektrofotometrie.....	10
3.1.2 Turbidimetrie	11
3.1.3 Průběhy analytických reakcí.....	12
3.2 Biochemické analyzátory	14
3.2.1 COBAS Integra 800	14
3.2.2 COBAS 6000 – biochemický modul c501.....	15
3.3 Charakteristika vybraných analytů a jejich stanovení.....	16
3.3.1 Alaninaminotransferáza	16
3.3.2 Antistreptolysin-O	17
3.3.3 Aspartátaminotransferáza	18
3.3.4 C-reaktivní protein	20
3.3.5 HDL cholesterol	21
3.3.6 Hořčík	23
3.3.7 Kreatinkináza.....	24
3.3.8 LDL cholesterol.....	25
3.4 Charakteristika metod.....	28
3.4.1 Diferenciální analýza dle Bland - Altmana.....	28
3.4.2 Regresní analýza dle Passing – Babloka	28
3.4.3 Verifikace metody	28
3.4.4 Nejistoty měření.....	29
3.4.5 Opakovatelnost metody.....	30
3.4.6 Mezilehlá preciznost měření.....	30
3.4.7 Intraindividuální a interindividuální variabilita	31
3.4.8 Bias	31
3.4.9 Výpočty nejistot měření.....	32

3.4.10	Interní kontrola kvality	35
3.4.11	Externí kontrola kvality	37
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
4.1	Použité analyzátory	39
4.2	Použitý software	39
4.3	Použité reagensy, pomocné a promývací roztoky	39
4.4	Použitý spotřební materiál	40
4.5	Použitý kalibrační a kontrolní materiál	40
4.6	Použité (měřené) vzorky	41
4.6.1	Vzorky měřené pro porovnávání metod	41
4.6.2	Vzorky měřené pro verifikaci metod	41
5.	VÝSLEDKY	42
5.1	Statistické vyhodnocení a verifikace alaninaminotransferázy	42
5.2	Statistické vyhodnocení a verifikace antistreptolysin-O	45
5.3	Statistické vyhodnocení a verifikace aspartátaminotransferázy	47
5.4	Statistické vyhodnocení a verifikace C-reaktivního proteinu	50
5.5	Statistické vyhodnocení a verifikace HDL cholesterolu	53
5.6	Statistické vyhodnocení a verifikace hořčičku	56
5.7	Statistické vyhodnocení a verifikace kreatinkinázy	59
5.8	Statistické vyhodnocení a verifikace LDL cholesterolu	61
6.	DISKUSE	64
6.1	Porovnání metod na analyzátorech COBAS Integra 800 a COBAS 6000	64
6.2	Verifikace metod na analyzátoru COBAS 6000	67
7.	ZÁVĚR	68
8.	SEZNAM ZKRATEK	69
9.	PŘÍLOHY	71
10.	POUŽITÁ LITERATURA	72

1. ÚVOD

Na úvod své práce bych rád citoval část definice World Health Organization týkající se kontroly kvality v laboratoři. Definice dobře vystihuje, proč je nutné mít správně nastavený analytický systém a znát jeho parametry. „Soustředění se na chyby v laboratorní medicíně je důležitou součástí mezinárodních snah týkajících se bezpečí pacientů. Včasné a správné sdělení laboratorních výsledků je jedním z pilířů efektivní diagnostiky a léčby. Téměř dvě třetiny rozhodnutí o přijetí či propuštění pacientů z nemocnice, stejně jako o předepsání léků, jsou založeny na laboratorních výsledcích“ [1]. Povinnost porovnání analytických systémů při přechodu na jiný analyzátor a následná verifikace metod je podmínkou získání akreditace laboratoře vyplývající z normy ČSN EN ISO 15189:2013 [2]. Porovnání analytických systémů a verifikace metod je také součástí řízení kontroly kvality laboratoře.

V laboratoři AeskuLab Hradec Králové došlo koncem roku 2017 k ukončení technické a servisní podpory biochemického analyzátoru COBAS Integra 800 od firmy ROCHE. Z tohoto důvodu byl nutný přechod na novější typ od stejného výrobce - COBAS 6000, který vyžadoval porovnání metod stanovovaných v biologickém materiálu na obou analyzátorech. Tytéž metody byly následně verifikovány na analyzátoru COBAS 6000. Metody, které vykazovaly určitou míru difference, byly: alaninaminotransferáza, antistreptolysin-O, aspartátaminotransferáza, C-reaktivní protein, HDL-cholesterol, hořčík, kreatinkináza a LDL-cholesterol. Porovnání a verifikace těchto metod byly podkladem pro tuto práci.

2. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo porovnat a statisticky vyhodnotit osm metod na dvou analytických systémech za podmínek běžného provozu v biochemické laboratoři s ohledem na klinickou praxi, správnou laboratorní praxi, systém kvality a doporučení odborných společností. Součástí zavedení nového analyzátoru byla též verifikace všech metod a posouzení jejich vhodnosti ke klinickému použití.

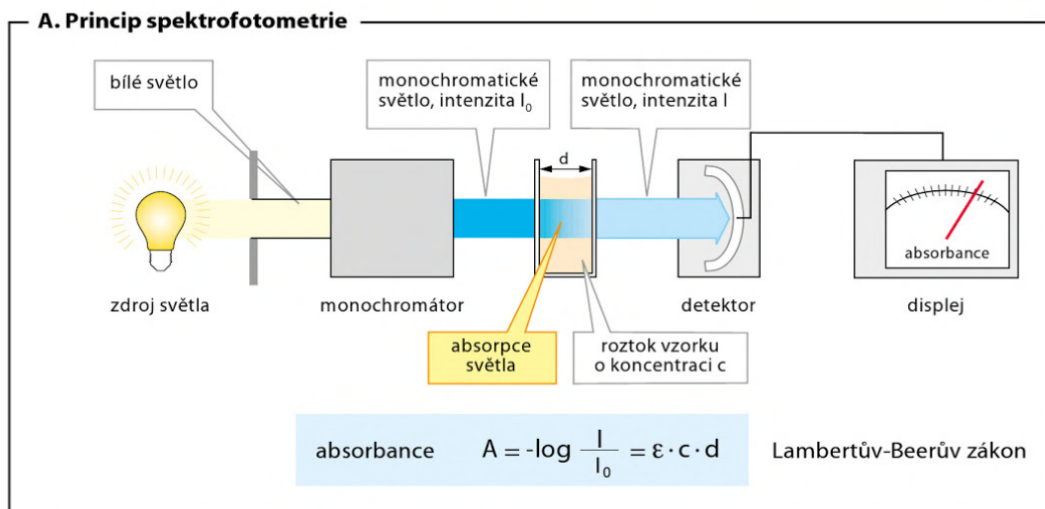
3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Principy měření a průběhy analytických reakcí

Kapitola popisuje obecné principy metod pro stanovení analytů. Konkrétní přeměny a reakce jsou uvedeny v kapitole 3.3.

3.1.1 Spektrofotometrie

Spektrofotometrie je jedna z nejběžněji používaných metod stanovení analytu u biochemických analyzátorů v současnosti [3]. Tato metoda patří mezi spektrální optické metody založené na principu pohlcení (absorpce) záření o určité vlnové délce. Každá látka pohlcuje záření o dané vlnové délce, což umožňuje selektivní (kvalitativní) měření konkrétní látky. Záření s konkrétní vlnovou délkou je získáno z polychromatického světla pomocí monochromátoru. Princip kvantitativního stanovení je založen na Lambert-Beerově zákoně, který říká, že absorbance (měřená při určité vlnové délce) je přímo úměrná koncentraci látky ve vzorku. Zákon vychází z úbytku intenzity záření procházejícího vzorkem.



Obr. 1. Princip spektrofotometrie; absorbance (A), intenzita záření po průchodu vzorkem (I), intenzita původního záření (I_0), molární absorpční koeficient (ϵ), koncentrace vzorku (c), tloušťka absorbující vrstvy (d) [3]

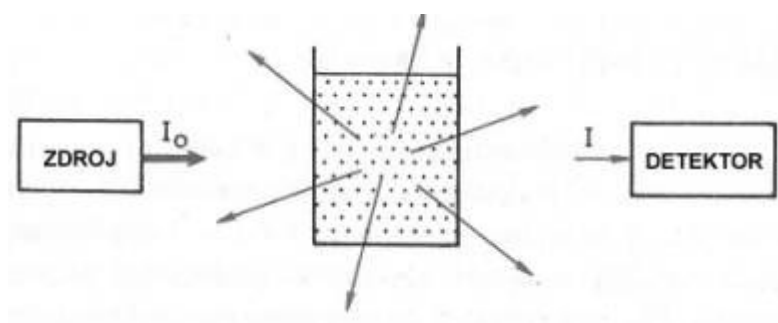
3.1.2 Turbidimetrie

Je optická metoda založená na principu měření procházejícího světla, jež je zeslabeno rozptylem na částicích. Tato metoda využívá tzv. Tyndallův jev: „Rozptýlené záření na částicích má stejnou vlnovou délku jako záření dopadající na koloidní částice“. Kromě rozptylu dochází i k absorpci záření částicemi. U turbidimetrie se používá absorpční spektrofotometr jako detektor v přímém směru, tedy v ose světelného paprsku.

Závislost intenzity prošlého záření na vlastnostech absorbujícího prostředí je exponenciální:

$$I_t = I_0 \cdot \exp(-\tau L)$$

kde I_t = intenzita prošlého záření, I_0 = intenzita světelného zdroje, τ = turbiditní koeficient, L = tloušťka květy [4, 5].



Obr. 2. Turbidimetrie [6]

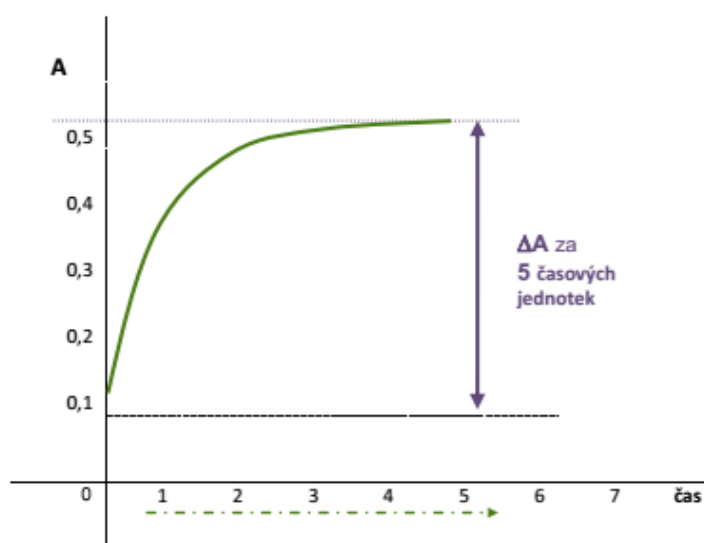
Imunoturbidimetrie

Imunoturbidimetrie je turbidimetrické měření roztoku obsahující suspenzi imunoprecipitátů – komplexy antigen + protilátka. Spektrum analytů zahrnuje především plazmatické proteiny. Určitou limitaci metody přináší fakt, že rozptyl světla nezávisí pouze na koncentraci analytu, ale i na velikosti částic precipitátu a na složení matrice[7].

3.1.3 Průběhy analytických reakcí

3.1.3.1 End-point metoda

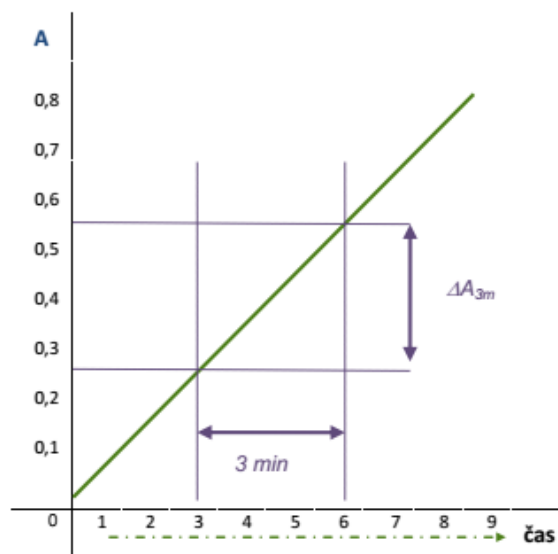
Využití end-point postupu kvantitativního měření předpokládá stanovení měřeného parametru (detekce) až po proběhnutí reakce (tvorba komplexu, tvorba barevného produktu) a ustanovení reakční rovnováhy po definovaném čase. Například dojde k záznamu absorbance po 5 minutách inkubace vzorku s reagensy, jak je uvedeno na obrázku 3. Koncentrace analytu je následně odvozena přepočtením z kalibrační křivky [7, 8].



Obr. 3. End-point reakce [8]

3.1.3.2 Kinetické měření

V případě kinetického měření se zaznamenává rychlost reakce neboli rychlost změny koncentrace v čase. Kinetická metoda je hojně využívána v případě stanovování enzymů [7]. Obrázek 4 znázorňuje měření změny absorbance (ΔA) v daném čase za 3 minuty. Podmínkou použitelnosti tohoto způsobu měření je, aby byl průběh závislosti absorbance na čase lineární. V případě kinetického měření enzymů je tolerována maximální odchylka od linearity 15% [8].



Obr. 4. Kinetické měření [8]

3.2 Biochemické analyzátory

3.2.1 COBAS Integra 800



Obr. 5. – COBAS Integra 800 [9]

3.2.1.1 Specifikace

- Možnost až 72 testů na palubě
- Až 855 testů za hodinu
- Spektrofotometrie, turbidimetrie, fluorescenční polarimetrie, iontově selektivní elektrody
- Spotřeba množství vzorku 2 až 10 μ l per test, iontově selektivní elektrody (ISE) 20 μ l
- Váha 512 kg
- Spotřeba 7 l vody za hodinu [9]

3.2.2 COBAS 6000 – biochemický modul c501



Obr. 6. – COBAS 6000 biochemický modul c501 s podavačem stojánků [10]

3.2.2.1 Specifikace

- Možnost až 63 testů na palubě
- Až 1000 testů za hodinu
- Fotometrické metody, lontově selektivní elektrody
- Spotřeba množství vzorku 1 až 35 μ l per test
- Váha 510 kg
- Spotřeba 15 l vody za hodinu [10]

3.3 Charakteristika vybraných analytů a jejich stanovení

V této kapitole jsou stručně popsány vybrané analyty. Každý analyt je stručně charakterizován, jsou uvedeny nejčastější klinické indikace, interference stanovení a uveden princip měření.

3.3.1 Alaninaminotransferáza

Charakteristika

Alaninaminotransferáza (ALT, dřívější název glutamát-pyrohroznová transamináza [11], glutamát-pyruvát transamináza [12], GPT) je enzym katalyzující přenos aminoskupiny mezi L-alaninem a 2-oxoglutarátem a naopak. Jedná se o cytoplazmatický enzym vyskytující se v různých tkáních (erythrocyty, kardiomyocyty, myocyty, pankreas a ledviny), s nejvyšší aktivitou v hepatocytech. Poločas katabolismu alaninaminotransferázy v krevním oběhu je 48 hodin. Při transaminaci je koenzymem ALT pyridoxal-5'-fosfát, který aktivitu enzymu výrazně zvyšuje. Reagencie s obsahem pyridoxalfosfátu předchází falešně nižším naměřeným hodnotám ve vzorcích pacientů s deficitem vitamínu B6 [11-15].

Referenční meze ALT u dospělých mužů jsou 0,17 – 0,83 $\mu\text{kat/l}$, u žen jsou 0,17 – 0,58 $\mu\text{kat/l}$ [13].

Požadavek na vyšetření

Aktivita ALT je indikována v diagnostice jaterních onemocnění. Elevace ALT se nachází již při sníženém energetickém přísunu hepatocytů (hypoxie). Prognostickým ukazatelem je poměr aspartátaminotransferázy (AST) a alaninaminotransferázy (ALT) – deRitisův kvocient – (AST/ALT) stanovující závažnost poškození hepatocytu (AST v mitochondriích opouští hepatocyt až při nekróze). Výsledek vyšší než 2 je ukazatelem například alkoholického poškození, menší než 1 je typický pro virové hepatitidy a více než 1 je ukazatelem jaterní cirhózy [14].

Příčinou sérové elevace může být například poškození jater (virová hepatitida, infekční mononukleóza, biliární kolika, cirhóza, alkohol, cholestáza, karcinom jater a další), nebo srdeční selhání s městnáním v játrech. ALT je pro jaterní onemocnění více specifická než AST [11, 12, 14].

Interference

Základní dělení faktorů zvyšujících aktivitu ALT je na neovlivnitelné (věk) a ovlivnitelné (hmotnost, požití alkoholu, fyzická zátěž, léky, odběrová poloha, hemolýza atd.). Hemolýza zásadním způsobem ovlivňuje stanovení, neboť aktivita ALT v erythrocytech je až 6x vyšší než v séru. Z léků jsou to především antibiotika, statiny, nesteroidní antiflogistika, sulfonované léky a jiné. Sníženou aktivitu vykazuje podávání metronidazolu [16].

Princip metody stanovení ALT

Kvantitativní stanovení alaninaminotransferázy se provádí in vitro s aktivací pyridoxalfosfátem z lidského séra. ALT katalyzuje reakci mezi L-alaninem a 2-oxoglutarátem. Vytvářený pyruvát je následně redukován NADH v reakci katalyzované laktátdehydrogenázou (LDH) na L-laktát a NAD⁺. Jako koenzym při přenosu aminoskupiny slouží pyridoxalfosfát (zajišťuje úplnou aktivaci enzymů).



Rychlost oxidace NADH je přímo úměrná katalytické aktivitě ALT. Stanovuje se měřením poklesu absorbance při vlnové délce 340 nm [13].

3.3.2 Antistreptolysin-O

Charakteristika

Streptolysin O je exotoxin produkovaný skoro všemi pyogenními kmeny streptokoka a kmeny skupiny C a G. „O“ v názvu je odvozeno od vratné inhibice tohoto toxinu kyslíkem. Titr protilátek proti streptolysinu O (ASLO, ASO) vzrůstá po dobu 3-6 týdnů po streptokokové infekci a k normalizaci dochází za 6-12 měsíců [17].

Referenční meze ASLO u dospělých jsou do 200 IU/ml [18].

Požadavek na vyšetření

Vzhledem k dynamice nárůstu a poklesu hodnot nemá, dle MUDr. Pavelky [17], vyšetření ASLO opodstatněný význam v diagnostice akutních streptokokových infekcí krom akutní revmatické horečky. U diagnostiky poststreptokokové glomerulonefritidy je význam omezený (propuká kolem 10. dne po infekci). Zvýšené hodnoty má 85 % pacientů s akutní revmatickou horečkou [17, 18].

Interference

Vliv na výsledek má věk a sezónní výkyvy (zima a jaro vyšší než v létě). Falešně vyšší výsledek pro stanovení ASLO byl zaznamenán při zvýšené hladině beta-lipoproteinů. Snížené hodnoty lze očekávat při užívání Intralipidu (čištěný sojový olej), některých antibiotik a kortikosteroidů [16].

Princip metody stanovení ASLO

Kvantitativní imunoturbidimetrické stanovení antistreptolysinu O se provádí in vitro z lidského séra. Lidské protilátky proti antistreptolysinu O precipitují s latexovými částicemi s navázaným antigenem antistreptolysinu O. Precipitát je stanoven turbidimetricky při vlnové délce 700 nm [18].

3.3.3 Aspartátaminotransferáza

Charakteristika

Aspartátaminotransferáza (AST, dříve glutamát-oxaloctová transamináza [11]) je enzym katalyzující přenos aminoskupiny z aminokyseliny (kyselina L-asparagová) na ketokyselinu (kyselina 2-oxoglutarová) za vzniku kyseliny oxaloctové a glutamové a naopak. Jedná se o plazmatický a mitochondriální (70%) enzym s výskytem v myocytech, myokardu a hepatocytech. Poločas katabolismu aspartátaminotransferázy v krevním oběhu je 17 hodin. Stejně jako u ALT je koenzymem zvyšujícím aktivitu pyridoxal-5'-fosfát. Je proto nezbytné použití reagenčních souprav s obsahem tohoto koenzymu k vyloučení falešně nižších hodnot u pacientu s deficitem vitamínu B6 [12, 14, 16, 19].

Požadavek na vyšetření

AST je společně s ALT markerem hepatobiliárních poruch. V praxi se využívá poměr AST/ALT, jak bylo vysvětleno výše v kapitole 3.3.1. Zvýšená aktivita AST je přítomna i v případě poškození myokardu (operace, infarkt myokardu, u anginy pectoris

je AST v normě), poškození kosterních svalů (námaha, zhmoždění, šok atd.) a po podání morfinu (heroinismus) [11, 14, 19].

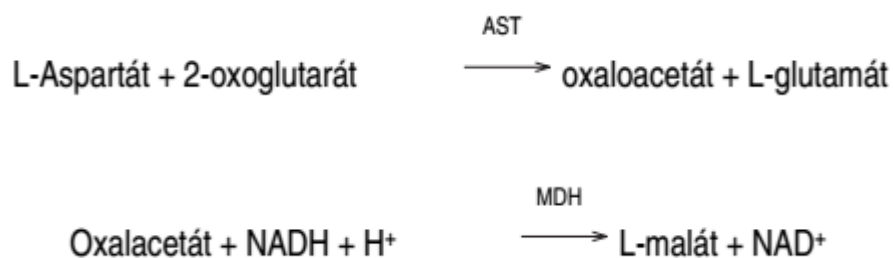
Referenční meze AST u dospělých mužů jsou 0,17 – 0,85 $\mu\text{kat/l}$, u žen jsou 0,17 – 0,60 $\mu\text{kat/l}$ [20].

Interference

Základní dělení faktorů zvyšujících aktivitu AST je na neovlivnitelné (věk) a ovlivnitelné (hmotnost, požití alkoholu, fyzická zátěž, léky, odběrová poloha, hemolýza atd.). Hemolýza zásadním způsobem ovlivňuje stanovení, neboť aktivita AST v erythrocytech je až 40x vyšší než v séru. Z léků, které zvyšují aktivitu AST, jsou to především antibiotika, nesteroidní antiflogistika, kontraceptiva, kyselina askorbová a jiné. Snížení aktivity AST vykazuje podávání cyklosporinu, progesteron aj. [16].

Princip metody stanovení AST

Kvantitativní stanovení aspartataminotransferázy se provádí in vitro s aktivací pyridoxalfosfátem z lidského séra. AST ve vzorku katalyzuje přenos aminoskupiny mezi L-aspartátem a 2-oxoglutarátem za tvorby oxalacetátu a L-glutamátu. Oxalacetát poté reaguje s nikotinamidadenindinukleotidem (NADH) v přítomnosti malátdehydrogenázy (MDH) a vytváří NAD^+ . Pyridoxalfosfát slouží jako koenzym při přenosu aminoskupiny v reakci a zajišťuje úplnou aktivaci enzymů.



Rychlost oxidace NADH je přímo úměrná katalytické aktivitě AST. Stanovuje se měřením poklesu absorbance při vlnové délce 340 nm [20].

3.3.4 C-reaktivní protein

Charakteristika

C-reaktivní protein (CRP) je protein akutní fáze sloužící jako časný ukazatel zánětu nebo infekce. Je syntetizován játry a v krvi je běžně v koncentracích menších než 10 mg/l. Vzestup hladiny při bakteriálních infekcích je již v prvních cca 6 hodinách s maximem po 48 hodinách, při uzdravování klesá o přibližně 50% denně. Funkce CRP je rozpoznávací i efektorová. Aglutinuje antigenní struktury, aktivuje komplement klasickou cestou, indukuje edém bakteriálního pouzdra a opsonizuje mikroorganismy pro fagocyty [19, 21-23].

Požadavek na vyšetření

Ke zvýšení hodnot CRP dochází při zánětech infekční (bakteriální onemocnění) neinfekční etiologie (autoimunitní, nádorové onemocnění) a při tkáňové nekróze (ischemie, embolie, operační výkon) a přímo koreluje s rozsahem poškození. CRP má souvislost s kardiovaskulárním rizikem, se stupněm endoteliální dysfunkce a s nedostatečnou syntézou oxidu dusnatého. U revmatoidní artritidy je ukazatelem aktivity onemocnění. V neposlední řadě také slouží jako rozhodovací faktor při terapii ATB a následné monitorování terapie [14, 19, 22, 23].

Referenční meze CRP u dospělých jsou < 5 mg/l [24].

Interference

Základní dělení faktorů majících vliv na hladinu CRP je na neovlivnitelné (věk) a ovlivnitelné (fyzická zátěž, těhotenství, obezita, kouření, nadmořská výška, odběrová poloha, hemolýza, lipémie atd.). Koncentraci dále zvyšuje hormonální substituční terapie, hemodialýza, interleukiny 2 a 6, TNF-alfa, cholecystektomie a revmatoidní faktor. Není ovlivněn užíváním imunosupresiv a nesteroidních antiflogistik [16, 22].

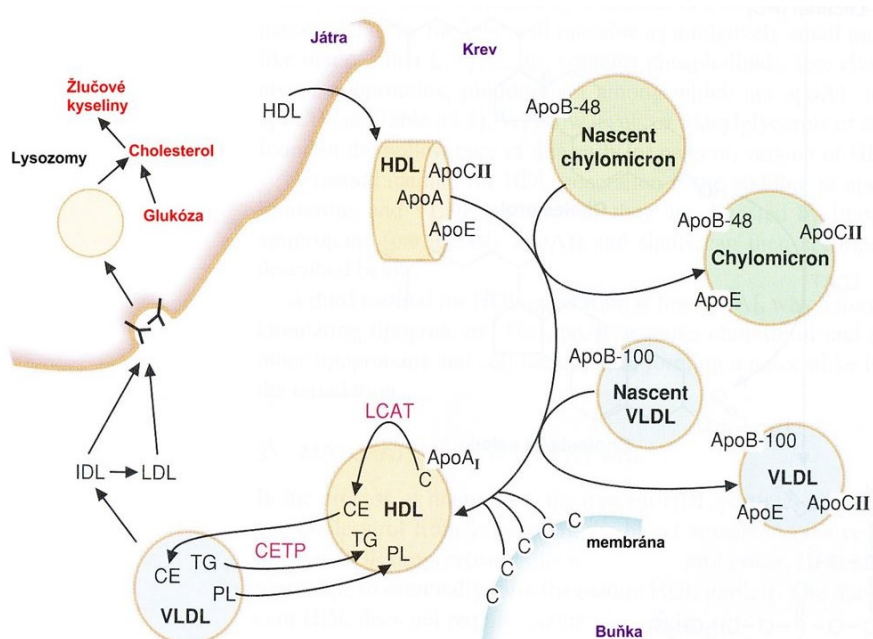
Princip metody stanovení CRP

Kvantitativní imunoturbidimetrické stanovení CRP se provádí in vitro z lidského séra. CRP aglutinuje s latexovými částicemi potaženými monoklonálními protilátkami proti CRP. Agregáty se měří turbidimetricky. Vlnová délka záření je 570 nm [24].

3.3.5 HDL cholesterol

Charakteristika

Lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL, high density lipoprotein) jsou tvořeny v játrech a střevní sliznici. Jejich úlohou je transport cholesterolu z periferních tkání a z lipoproteinů jiných tříd zpět do jater, kde dochází k odbourávání a vylučování z organismu, jak je ukázáno na obrázku 7 [11, 14, 25].



Obr. 7. Metabolismus HDL v organismu [26]

Požadavek na vyšetření

Monitorování hladiny HDL-cholesterolu má význam především v prevenci kardiovaskulárních chorob (rozvoji aterosklerózy, ischemické choroby srdeční (IČS)), dále působí antitrombogenně, vazoprotektivně, vykazuje protizánětlivé a antioxidační účinky. Zvýšená koncentrace HDL působí snížením rizika rozvoje aterosklerózy, liší se ale optimální hladina HDL-cholesterolu s ohledem na hladinu celkového cholesterolu. Izolované měření hladiny HDL ne vždy koreluje s mírou rizika kardiovaskulárních chorob. Důležitá je v tomto ohledu i struktura a funkčnost částic HDL [11, 14, 19, 27].

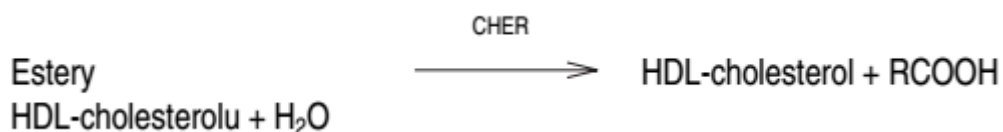
Referenční meze HDL cholesterolu u dospělých mužů jsou 1,00 – 2,10 mmol/l, u žen jsou 1,20 – 2,70 mmol/l [28].

Interference

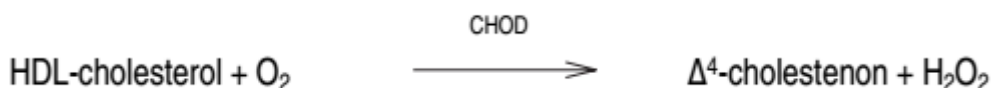
Základní dělení faktorů zvyšujících koncentraci HDL je na neovlivnitelné (pohlaví, věk) a ovlivnitelné (požití alkoholu, fyzická zátěž, léky, odběrová poloha, hemolýza atd.). Koncentraci HDL zvyšuje například hemodialýza, omega-3-mastné kyseliny, estrogen a naopak snižují ethanol, estradiol, gravidita, kouření, aj. [11, 16].

Princip metody stanovení HDL

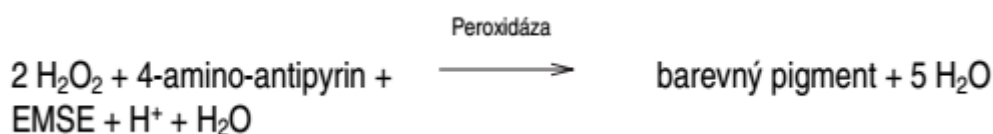
Kvantitativní stanovení koncentrace HDL-cholesterolu se provádí in vitro z lidského séra. Jedná se o homogenní enzymatický fotometrický test. Lipoproteiny jako LDL, VLDL a chylomikrony se pojí s polyanionty a detergentem za vzniku ve vodě rozpustného komplexu. V tomto komplexu je enzymová reakce lipoproteinů s cholesterolesterázou (CHER) a cholesteroxidázou (CHOD) zablokována. CHER a CHOD mohou reagovat pouze s HDL-částicemi. Estery cholesterolu jsou kvantitativně štěpené pomocí CHER na volný cholesterol a mastné kyseliny.



V přítomnosti kyslíku je cholesterol oxidován cholesteroxidázou na Δ^4 -cholestenon a peroxid vodíku.



V přítomnosti peroxidázy reaguje vytvořený peroxid vodíku s 4-aminoantipyrinem a N-ethyl-N-(3-methylfenyl)-N'-sukcinyloxyethylenediaminem (EMSE) za tvorby růžovo-červeného zbarvení. Reakce je modifikací Trinderovi reakce. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci cholesterolu a měří se fotometricky při vlnové délce 600 nm [25].



3.3.6 Hořčík

Charakteristika

Hořčík je hned po draslíku hlavním intracelulárním kationtem a čtvrtým nejběžnějším kationtem v těle. Část hořčíku v plazmě je vázána na bílkoviny (30%), část v komplexech (15%) a část ionizovaná (55%). Více než polovina hořčíku je uložena v kostní tkáni. Hořčík slouží jako kofaktor přibližně 300 enzymů, je důležitý pro normální buněčnou permeabilitu, nervosvalovou funkci a je potřebný pro syntézu a sekreci parathormonu. Regulace plazmatické koncentrace probíhá prostřednictvím ledvin [29-31].

Požadavek na vyšetření

Deficit hořčíku se vyskytuje zřídka (výskyt magnezia je v rostlinné i živočišné stravě hojně zastoupen, ledviny dokáží hořčík resorbovat (95%) a omezit vylučování). Riziko deficitu je u osob s déletrvajícím průjmami, osob užívajících kličková diuretika, nebo u malabsorbčních stavů (chronický alkoholismus). Riziko hypermagnezémie hrozí hlavně u selhávání ledvin [11, 19, 29, 32].

Referenční meze hořčíku u dospělých jsou 0,66 – 1,07 mmol/l [31].

Interference

Koncentraci hořčíku zvyšuje například cvičení paží před odběrem, histamin, menses aj. Stanovení ruší hemolýza, chylóza i ikterita. Snížení koncentrace způsobuje například ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), ethanol, glukagon, těhotenství aj. [16].

Princip metody stanovení hořčíku

Kvantitativní stanovení hořčíku se provádí in vitro z lidského séra. Fotometrická end-point metoda je založená na reakci mezi hořčíkem a xylidylovou modří v alkalickém roztoku obsahujícím ethylenglykoltetraoctovou kyselinu (EGTA) kvůli maskování vápníku ve vzorku. V alkalickém roztoku vytváří hořčík s xylidylovou modří barevný komplex diazoniové soli. Koncentrace hořčíku je vypočtena na základě fotometricky měřeného poklesu absorbance xylidylové modři. Měřeno při vlnové délce 600 nm [31].



3.3.7 Kreatinkináza

Charakteristika

Kreatinkináza (CK – creatine kinase, dřívější označení fosfokináza) je intracelulární enzym přítomný v hojné míře v kosterním svalstvu, myokardu a mozku, v menší míře v dalších orgánech. CK je dimerní molekulou, která se vyskytuje ve 3 isoformách (CK-MM, CK-MB, CK-BB) se strukturou kombinace podjednotek (M-muscle, svalová; B-brain, mozková). CK-BB se vyskytuje v malém množství ve všech tkáních, nebo je produkován nádory, a nepoužívá se k diagnostice. CK-MM se s převahou (98 %) vyskytuje v kosterním svalstvu, kde se nachází i CK-MB (1 %). V srdeční svalovině je poměr zastoupení isoform CK-MM a CK-MB odlišný (70: 30, %). Isoforma CK-MB je využívána v diagnostice infarktu myokardu. Kreatinkináza je enzym katalyzující fosforylaci kreatinu na kreatinfosfát pomocí ATP a naopak [11, 15, 19, 33, 34].

Požadavek na vyšetření

Dle Voháňky [34] je v současnosti hladina CK považována za nejcitlivější laboratorní ukazatel svalového resp. neuromuskulárního poškození. Zvýšená hladina CK se vyskytuje i po fyzické námaze, svalových poraněních, těhotenství, abúzu alkoholu, onemocnění štítné žlázy, diabetu, či medikaci. Extrémní hodnoty CK se objevují například u běžců po maratónu nebo běhu na 100 km. Při nekróze myokardu dochází k nárůstu po 4-6 hodinách od počátku ischemie. Zvýšení hladiny CK je tedy pouze nespecifickým ukazatelem poškození myokardu. Voháňka [34] navíc uvádí i variantu idiopatické hyperCKemie [11, 19, 34, 35].

Referenční meze CK u dospělých mužů jsou 0,12 – 3,20 $\mu\text{kat/l}$, u žen jsou 0,12 – 2,85 $\mu\text{kat/l}$ [36].

Interference

Hodnoty CK jsou závislé na rase, pohlaví, věku a svalové hmotě. Zvýšení je způsobeno fyzickou zátěží, intramuskulárními injekcemi, pooperačně. Elevaci CK způsobuje i řada látek jako amfetamin, některá antibiotika, steroidy, inzulin aj. Stanovení CK ruší silná hemolýza [16, 19].

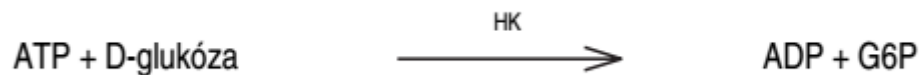
Princip metody stanovení CK

Kvantitativní stanovení kreatinkinázy se provádí in vitro z lidského séra fotometricky. Reakce má několik kroků:

CK katalyzuje konverzi kreatinfosfátu a adenosindifosfátu (ADP) na kreatin a adenosintrifosfát (ATP).



Vzniklý ATP reaguje s glukózou za katalýzy hexokinázy (HK) na ADP a glukóza-6-fosfát (G6P).



Katalytická koncentrace CK je pak vyhodnocena detekční reakcí glukóza-6-fosfátu s NADP^+ za katalýzy glukóza-6-fosfát dehydrogenázy na NADPH. Stejně množství NADPH a ATP je vytvářeno stejnou rychlostí. Fotometricky měřená rychlost tvorby NADPH je přímo úměrná aktivitě CK. Absorbance měřena při vlnové délce 340 nm [36].



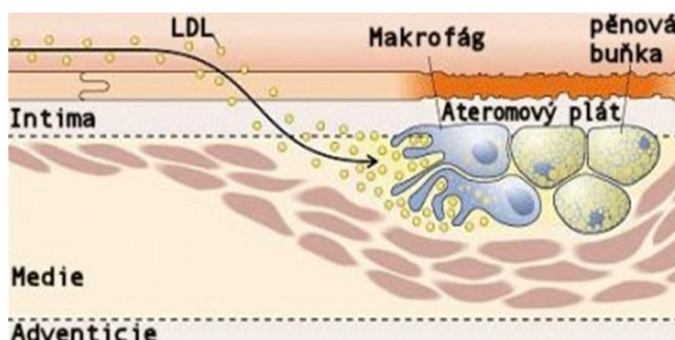
3.3.8 LDL cholesterol

Charakteristika

Nízkodenzitní lipoproteiny (LDL, low density lipoprotein) jsou hlavní částice přenášející cholesterol v plazmě. Nejvíce jich je tvořeno přeměnou z VLDL (lipoproteiny s velmi nízkou hustotou), některé jsou syntetizovány přímo. Metabolizace LDL probíhá v různých typech buněk. Kontakt s buňkou může být jak receptor-dependentní, tak receptor-nondependentní (v případě makrofágů, tzv. zametacích „scavenger“ buněk). LDL pohlcený buňkou je dezintegrován. Uvolněný cholesterol inhibuje HMG-CoA-reduktázu, což je klíčový enzym v syntéze cholesterolu [14, 37].

Požadavek na vyšetření

LDL (především modifikované oxidací) je velmi významným faktorem při tvorbě a růstu aterosklerotických plátů (většina cholesterolu v plátu pochází právě z LDL), jak je vidět na obrázku 8 [11, 37].



Obr. 8. Tvorba aterosklerotického plátu [38]

Masopust [14] však uvádí, že samostatné stanovení LDL nemá příliš valnou hodnotu v predikci rizika. Snížení hladiny LDL je terapeutickým cílem v prevenci aterosklerózy, její progresu a ruptury plátů [37].

Referenční meze LDL u dospělých jsou 1,20 – 3,00 mmol/l [28].

Interference

Základní dělení faktorů zvyšujících koncentraci LDL je na neovlivnitelné (pohlaví, věk) a ovlivnitelné (menstruační cyklus, gravidita, kouření, menopauza, obezita, stres atd.). Snížení hladiny LDL lze zaznamenat například u hypertyreózy, malabsorbce, malnutrice, při bezlepkové dietě, konzumaci česneku, alkoholu, rybího tuku, užívání heparinu aj. [16].

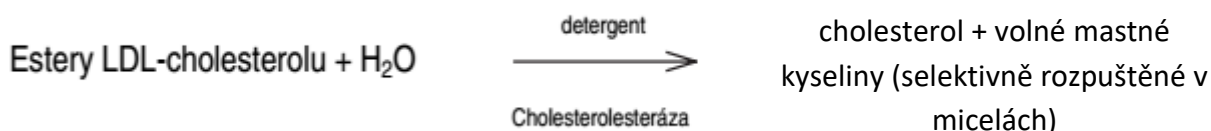
Princip metody stanovení LDL

V běžné praxi se pro stanovení hodnoty LDL-cholesterolu používají 2 metody. Přímé stanovení a výpočet. K výpočtu slouží konvenčně zavedený Friedewaldův vztah, který vychází z předpokladu konstantního poměru triacylglycerolů a cholesterolu. Tento předpoklad nese v řadě případů (chorobných stavů) míru pochybnosti. Nejznámějším faktorem, který limituje spolehlivost výsledku je koncentrace triacylglycerolů (TAG) v séru. Horní mez TAG pro použití výpočtu je 5,0 mmol/l. Tato hranice je diskutována –

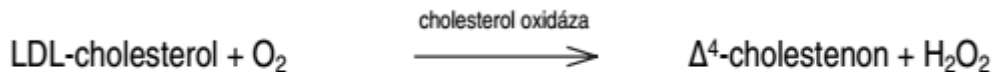
například ze studie dat z externího hodnocení kvality v roce 2005 bylo laboratořemi (80 účastníků) použito 11 různých přístupů [39, 40].

Rovnice dle zdroje [39]: LDL cholesterol = Cholesterol - Triglyceridy*0,4537 - HDL cholesterol

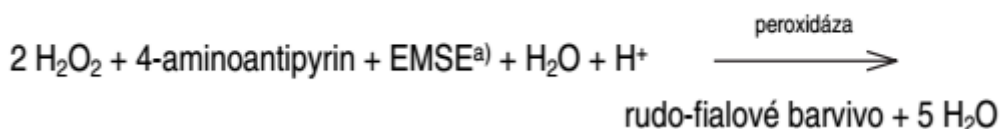
Při získávání dat k porovnání analyzátorů v této práci byla použita metoda in vitro pro kvantitativní stanovení LDL-cholesterolu v lidském séru, homogenní enzymatické fotometrické stanovení. Estery cholesterolu a volný cholesterol v LDL se měří na základě enzymatické metody pro cholesterol použitím cholesterolesterázy a cholesteroxidázy v přítomnosti surfaktantů, které selektivně rozpouští pouze LDL. Reakce enzymů na lipoproteiny jiné než LDL jsou inhibovány surfaktanty a cukernou složkou.



Estery cholesterolu jsou kvantitativně štěpeny cholesterol esterázou na volný cholesterol a estery.



V přítomnosti kyslíku je cholesterol oxidován cholesteroxidázou na Δ^4 -cholestenon a peroxid vodíku.



V přítomnosti peroxidázy reaguje vytvořený peroxid vodíku s 4-aminoantipyrinem a N-ethyl-N-(3-methylfenyl)-N-succinylethylenediaminem (EMSE). Reakce je modifikací Trinderovy reakce. Dochází k tvorbě rudo-fialového zbarvení, jehož intenzita je přímo úměrná koncentraci cholesterolu. Absorbance měřena při vlnové délce 600 nm [37].

3.4 Charakteristika metod

V této části práce je pojednáno o použitých statistických metodách v postupech porovnání analyzátorů (kapitoly 3.4.1. a 3.4.2.), verifikaci jednotlivých metod (kapitoly 3.4.3. až 3.4.9.) a kontrole kvality.

3.4.1 Diferenciální analýza dle Bland - Altmana

Analýza Bland-Altman (B&A) slouží ke kvantifikaci shody mezi dvěma kvantitativními měřeními pomocí studie průměrného rozdílu těchto měření a sestavováním limitů shody. Tato analýza umožňuje určit, zda je diference mezi dvěma metodami významná, či nikoliv. V rámci analýzy se stanoví bias mezi průměry diferencí a stanovení intervalu shody, do které spadá 95% diferencí metody 2 v porovnání s metodou 1. Analýza definuje pouze interval shody, nikoliv zda je tento interval vhodný nebo ne pro zamýšlené použití. Výsledkem je graf vykreslení rozptylu, kde je na ose Y diference mezi dvěma porovnávanými měřeními (A-B) a na ose X je průměr těchto hodnot $((A+B)/2)$. Jinými slovy, diference dvou porovnávaných měření je vynesena v grafu proti průměru těchto měření. B&A doporučují, aby 95% hodnot leželo v rozmezí +/- dvě směrodatné odchylky od průměrné diference [41].

3.4.2 Regresní analýza dle Passing – Babloka

Regresní analýza dle Passing-Babloka slouží ke zjištění závislosti dvojice metod. Umožňuje odhadnout shodu mezi metodami a odhalit případný bias. Tato analýza je robustní, neparametrová metoda, necitlivá k odlehlým (outlier) hodnotám. Díky intervalu spolehlivosti lze určit, zda hodnoty procházejí nulou nebo hodnotou jedna, což ukazuje na shodu metod nebo nutnost případné korekce.

Pokud interval spolehlivosti (CI, confidential interval) metody A neobsahuje 0, je zde přítomna systematická diference mezi metodami. Pokud CI metody B neobsahuje 1, je zde proporcionální diference mezi metodami [42, 43].

3.4.3 Verifikace metody

Verifikace, neboli ověření, je poskytnutí objektivního důkazu, že metoda splňuje dané požadavky. Jinými slovy se jedná o potvrzení dosažení funkčních vlastností (nebo

zákonných požadavků) měřicího systému prostřednictvím objektivních důkazů. Je to ověření, že je laboratoř schopna dosáhnout u validovaných metod deklarovaných výkonnostních parametrů, které uvádí výrobce (nejčastěji v dokumentaci). Verifikace poskytuje potřebná data pro odhad nejistoty měření. Minimální četnost verifikace je dle doporučení ČSKB 1 krát ročně [44, 45].

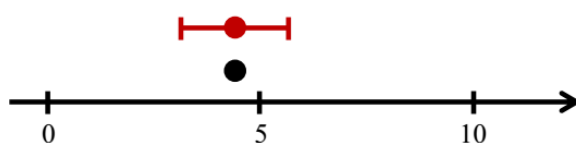
Závěr vyplývající z pojmu verifikace je zhodnocení, do jaké míry je laboratoř s výslednou kombinovanou nejistotou ve shodě s referenčně měřeným certifikovaným materiálem. V rámci verifikace se vyhodnocuje a porovnává se Rozšířená kombinovaná nejistota zjištěná laboratoří, s Přijatelným rozdílem (označení D_{max} , %), vydávaným dodavatelem referenčního certifikovaného materiálu.

Odlišnost validace od verifikace je následující - Validace je potvrzení, že metoda splňuje požadavky na ni kladené a od ní očekávané (úroveň měření je dostatečná, vyhovuje zamýšlenému použití atd.). Validace se používá v případě zavádění nových metod vyvíjených v laboratoři [46]. V diplomové práci jsou popsány verifikace již výrobcem validovaných biochemických metod. Vzor verifikačního protokolu je uveden v příloze číslo 1.

3.4.4 Nejistoty měření

V Doporučení [47] je vysvětleno správné chápání měření a vydávání výsledků. Je známo, že absolutně přesný výsledek měření neexistuje a každé měření je spojeno s určitou nejistotou. Nejistotou se rozumí parametr, který charakterizuje míru rozptýlení hodnoty výsledku měření. Z toho vyplývá, že výsledkem měření není jedna hodnota (jak by se mohlo z výsledku měření zdát) ale interval, jak je ukázáno na obrázku 9, ve kterém se výsledek měření s určitou pravděpodobností nachází [47-50].

Správná představa: Výsledek se nachází v nějakém intervalu s určitou pravděpodobností.
Nesprávná představa: Výsledek je bod.



Obr. 9. Správná představa výsledku měření

Nejistota se vždy týká pouze výsledku měření (ne metody, systému atd.). Celková nejistota (Kombinovaná nejistota, označení u_c) je souborem dílčích nejistot (každý krok procesu s sebou nese část nejistoty od preanalytické přes analytickou a postanalytickou fázi).

$$u_c = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + \dots + u_n^2}$$

V praxi se běžné používá **rozšířená kombinovaná nejistota (U_c)**, což je kombinovaná nejistota vynásobená faktorem rozšíření k (obvykle $k = 2$, odpovídá 95% intervalu spolehlivosti pro normální rozdělení dat).

$$U_c = k \cdot u_c$$

Vyjadřuje se buď v absolutních (v jednotce měření, označení *abs*) nebo relativních (v %, označení *rel*) jednotkách [47].

3.4.5 Opakovatelnost metody

Opakovatelnost metody je preciznost měření stanovená za specifických podmínek (stejný personál obsluhující systém, stejné pracovní podmínky, stejné místo, měření na stejných nebo podobných objektech) v krátkém časovém úseku (v sérii) [51, 52].

3.4.6 Mezilehlá preciznost měření

Mezilehlá preciznost měření (MPM) je dílčí složkou nejistoty. Mezilehlá preciznost měření je těsnost shody mezi naměřenými hodnotami získanými opakovaným měřením za specifických podmínek měření. MPM bývá vyjádřena mírami nepřeciznosti (směrodatnou odchylkou, rozptylem, variačním koeficientem). Rozdíl oproti opakovatelnosti tkví v delším časovém úseku, nikoliv tedy měření v sérii [48, 52].

3.4.7 Intraindividuální a interindividuální variabilita

Intraindividuální biologická variabilita (CV_i , %) (Westgard [53] používá označení CV_w = within biological variation) udává biologickou proměnlivost hladiny analytu v rámci jedince (cirkadiální rytmy, věk, pohlaví atd.).

Interindividuální biologická variabilita (CV_G , %) (general biological variation) udává biologickou proměnlivost hladiny analytu mezi jedinci [1].

V rámci diplomové práce, hodnoty intraindividuálních a interindividuálních biologických variabilit byly čerpány z databáze Westgarda [53].

3.4.8 Bias

Bias neboli vychýlení je v literatuře definován jako hodnota odhadu systematické chyby měření. Je to rozdíl mezi naměřenou a očekávanou hodnotou. Je nutno bias zahrnout do celkové povolené chyby. Bias metody se zjišťuje měřením vzorku o známé koncentraci za podmínek mezilehlé preciznosti měření. K tomuto účelu se nejčastěji používají komerční vzorky s patřičnou dokumentací, nebo vzorky prošlé cyklem externího hodnocení kvality (EHK). Ne vždy je možné zjistit bias přímo, tedy měřením certifikovaného materiálu a i v případě řádně provedené kalibrace se může bias projevit. Tento bias se navíc může měnit v závislosti na šaržích kalibrátoru a reagenčních souprav. Významný (nebo také Nekorigovaný) bias ovlivní výsledek a není možné ho při výpočtu nejistoty výsledku nezapočítat. Bias je považován za nevýznamný, a lze ho při výpočtu pominout, pokud platí:

$$|b_{abs}| \leq 2 \sqrt{u_{ref,abs}^2 + u_{xp,abs}^2}$$

- b_{abs} je bias vyjádřený v jednotce měření;
- $u_{ref,abs}$ je standardní nejistota hodnoty vzorku o známé koncentraci;
- $u_{xp,abs}$ je standardní nejistota průměru výsledků měření vzorku o známé koncentraci.

Bias lze také zanedbat, pokud je o mnoho menší než nejistota vypočítaná z mezilehlé preciznosti. Je-li například bias menší než 1/3 MPM, přispívá ke kombinované nejistotě méně než 5% [47, 51, 54].

Interindividuální a intraindividuální biologická variabilita jsou veličiny, ke kterým se přihlíží při stanovování referenčních mezí. Obě tyto veličiny lze vyjádřit formou variačních koeficientů (CV, %).

Celkovou biologickou variabilitu lze následně vyjádřit vztahem:

$$\sqrt{CV_I^2 + CV_G^2}$$

kde CV_I je intraindividuální a CV_G interindividuální biologická variabilita.

Bias (B_A) by měl být menší než $\frac{1}{4}$ uvedené celkové biologické variability. Přípustný je však i bias $\frac{3}{8}$.

$$B_A \leq 0,375\sqrt{CV_I^2 + CV_G^2}$$

Za ideální hodnotu se považuje B_A $\frac{1}{8}$ uvedené celkové biologické variability [54].

$$B_A \leq 0,125\sqrt{CV_I^2 + CV_G^2}$$

3.4.9 Výpočty nejistot měření

Dle Doporučení [47] je možné použít následující 4 postupy pro výpočet nejistot měření. Možností je samozřejmě více, ale tyto 4 základní jsou nejčastěji používané v klinické praxi, jeden z nich je dokonce doporučen pro výpočet nejistot pro účastníky EHK.

3.4.9.1 Postup 1 – jediná dílčí nejistota

Postup „Jediná dílčí nejistota“ lze zvolit, pokud není k dispozici žádný referenční materiál, ani materiál se vztažnými hodnotami a nelze tudíž určit bias. Jedinou dílčí nejistotou je zde MPM. Alespoň 15 opakovaných měření jednoho vzorku se provede za podmínek mezilehlé preciznosti. Z výsledků měření je vypočten aritmetický průměr (x_{MPM}):

$$x_{MPM} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

- n počet měření;
- x_i jednotlivé výsledky měření.

Směrodatná odchylka (SD_{MPM}):

$$SD_{MPM} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - x_{MPM})^2}$$

Variační koeficient (CV_{MPM}):

$$CV_{MPM} = 100 \cdot \frac{SD_{MPM}}{x_{MPM}} \quad [\%]$$

Vzhledem k tomu, že již nejsou další dílčí složky kombinované nejistoty, je výpočet nejistoty výsledku následující:

$$u_{c,abs} = u_{MPM,abs} = SD_{MPM}$$

a

$$u_{c,rel} = u_{MPM,rel} = CV_{MPM} \quad [\%]$$

3.4.9.2 Postup 2 – kombinace MPM a měření vzorku o známé koncentraci, bias je nevýznamný

Pokud jsou k dispozici vzorky s ověřenou vztažnou hodnotou (certifikovaný materiál, vzorky EHK, komerční vzorky), lze určit bias. Výsledná kombinovaná nejistota (relativní, v %, označena $u_{c,rel}$) bude složena ze 3 dílčích nejistot:

$$u_{c,rel} = \sqrt{u_{MPM,rel}^2 + u_{ref,rel}^2 + u_{Xp,rel}^2} \quad [\%]$$

- $u_{MPM,rel}$ nejistota vypočítaná z MPM (viz postup 1);
- $u_{ref,rel}$ nejistota koncentrace vzorku se známým obsahem (uvedena v dokumentaci ke vzorku);
- $u_{Xp,rel}$ nejistota průměru měření (X_p) vzorku se známým obsahem.

Nejistotu průměru (relativní) vypočítává se z absolutní nejistoty průměru výsledků měření vzorku o známé koncentraci:

$$u_{x_p,abs} = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

$$u_{x_p,rel} = 100 \cdot \frac{u_{x_p,abs}}{x_p} \quad [\%]$$

- $u_{x_p,rel}$ relativní nejistota průměru;
- $u_{x_p,abs}$ absolutní nejistota průměru;
- X_p aritmetický průměr (výpočet viz postup 1);
- SD výběrová směrodatná odchylka (výpočet viz postup 1);
- n počet měření.

3.4.9.3 Postup 3 - kombinace MPM a měření vzorku o známé koncentraci, bias je významný

Výchozí podmínky tohoto postupu jsou shodné s postupem 2. Rozdíl je v tom, že bias není zanedbatelný (viz kapitola 3.4.8. Bias). Proč významný bias do nejistoty výsledku zahrnout?

Pokud máme výsledek měření x , který je doprovázen určitou (stanovenou) celkovou rozšířenou nejistotou U_c , pak dle obecného konceptu nejistot výsledek leží v intervalu $x \pm U_c$ s 95% pravděpodobností. Jestliže je výsledek zatížen významným bias, v uvedeném intervalu se téměř jistě nenachází, nebo s úplně jinou pravděpodobností. Doporučení SEKKu [47] uvádí 3 použitelné postupy pro začlenění významného bias do nejistoty výsledku měření. Vzhledem k tomu, že první postup obsahuje oboustranné rozšíření nejistoty (bias představuje vychýlení jen na jednu stranu) a příspěvek bias k celkové nejistotě je násoben koeficientem rozšíření, není tento způsob nejvhodnější. Třetí postup nese nevýhodu v podobě asymetrické výsledné nejistoty a komplikuje tím vyjádření výsledku. Z těchto důvodů byl v experimentální části diplomové práce použit pouze druhý postup, který je také doporučen účastníkům EHK.

Sloučení bias s kombinovanou rozšířenou nejistotou

Tento postup zahrnuje bias do nejistoty výsledku měření tak, že jej sloučí s rozšířenou kombinovanou nejistotou.

$$U_{c,rel} = \sqrt{(k \cdot u_{(bez\ bias),rel})^2 + b_{rel}^2}$$

- $U_{c,rel}$ kombinovaná rozšířená nejistota;
- k koeficient rozšíření (obvykle hodnota 2, odpovídá 95% intervalu spolehlivosti pro normální rozložení);
- $u_{(bez\ bias),rel}$ nejistota bez zahrnutého bias (výpočet viz Postup 2);
- b_{rel} relativní bias, výpočet :

$$b_{abs} = x_p - c_{ref}$$

$$b_{rel} = 100 \cdot \frac{b_{abs}}{c_{ref}} \quad [\%]$$

- b_{abs} absolutní bias;
- X_p aritmetický průměr výsledků měření vzorku o známé koncentraci;
- c_{ref} hodnota koncentrace vzorku o známé koncentraci (uvedena v dokumentaci) [47].

3.4.10 Interní kontrola kvality

Interní kontrola kvality, označována též IKK, VKK (vnitřní kontrola kvality), IHK (interní hodnocení kvality), je dle definice WHO: „VKK jsou postupy, které jsou prováděny personálem laboratoří ke kontinuálnímu hodnocení laboratorní práce a zejména patologických výsledků, aby se rozhodlo, zda jsou výsledky dostatečně validní k uvolnění lékařům (buď k podpoře klinických závěrů nebo pro epidemiologické nebo výzkumné účely). Postupy VKK mají okamžitý efekt na laboratorní práci a měly by vést ke kontrole, popř. k vyloučení analytické série laboratorních výsledků. Soustředění se na chyby v laboratorní medicíně je důležitou součástí mezinárodních snah týkajících se bezpečí pacientů. Včasné a správné sdělení laboratorních výsledků je jedním z pilířů efektivní diagnostiky a léčby. Téměř dvě třetiny rozhodnutí o přijetí či propuštění pacientů z nemocnice, stejně jako o předepsání léků, jsou založeny na laboratorních výsledcích [1]“.

VKK je systém zvyšující pravděpodobnost vydávání validních a pro lékaře použitelných výsledků v procesu diagnostiky a rozhodování. Cílem je odhalit a snížit analytické chyby, jež mohou mít negativní vliv. Praktické provádění VKK je měření kontrolních vzorků a porovnávání výsledků s očekávanou hodnotou. Kontrolní materiál by ideálně měl, dle doporučení ČSKB [54], splňovat tyto parametry:

1. Být pokud možno na bázi lidské matrice;
2. Vhodnější je kapalná forma (nižší riziko chyby při ředění);

3. Minimálně 2 nejlépe 3 hladiny (nízká, normální, vysoká);
4. Koncentrace blížíci hladinám s klinickým rozhodováním.

Frekvence měření všech hladin kontrolního materiálu je minimálně jednou za analytickou sérii odpovídající jedné pracovní směně. Maximální přípustná doba série je 24 hodin. Kontrolní vzorky je potřeba vždy přeměřovat po kalibraci, výměně reagensů, po servisním zásahu do měřící části analyzátoru, či při pochybách o správné funkci analytického systému.

Je třeba dbát zvýšené pozornosti na vyhodnocování výsledků kontrol a na následné nastavení systému. Pro hodnocení slouží různé regulační diagramy (například Levey – Jenningsovy grafy). K vyjádření kvality se pak používá termín celková povolená chyba (Total Error Allowable = TEA) nebo pojem cílová nejistota měření (Target Measurement Uncertainty = TMU). TMU lze odhadnout z biologické variability, nebo lze použít hodnoty doporučené odbornými společnostmi pro EHK (D_{max} , %). Vhodnost nastavení VKK je následně ověřeno při cyklech EHK. V případě neshody je třeba prověřit celý systém. Výsledky získané z VKK je možné použít pro verifikaci metod a při odhadu nejistot výsledků měření [1, 54].

3.4.10.1 Postupy pro hodnocení VKK

Pro praxi nejen klinické laboratoře lze použít systém pravidel, které již v roce 1981 publikoval profesor Westgard [53]. Soubor těchto pravidel slouží k detekci chyb v analytickém procesu. Základní schéma má 6 pravidel, která lze použít samostatně nebo v kombinaci, jako takzvaná multi-pravidla. Základní důvody použití těchto pravidel jsou snížit zbytečná opakování měření, zvýšit pravděpodobnost záchytu chyb a využít pravidla pro odlišení náhodné a systematické chyby.

Základní pravidla pro použití 2 hladin kontrolních vzorků:

- **1-2s.** Varovné pravidlo. Jedna hodnota VKK přesáhne průměrnou hodnotu o 2 SD na libovolnou stranu.
- **1-3s.** Jedna hodnota VKK přesáhne průměrnou hodnotu o 3 SD na libovolnou stranu. Je vždy důvodem k odmítnutí daného měření. Pravidlo odhalující neakceptovatelnou náhodnou, nebo počátek systematické chyby.

- **2-2s.** Porušení pravidla 1-2s dvakrát za sebou na stejnou stranu. Je vždy důvodem k odmítnutí daného měření. Odhaluje systematickou chybu. Aplikuje se pro jednu hladinu i mezi hladinami.
- **R-4s.** Pravidlo identifikující náhodnou chybu. Použitelné pouze pro aktuální sérii. Opakování série se provede v případě rozdílu 4 SD mezi dvěma kontrolními měřeními v jedné sérii. Příklad: měření VKK na 2 hladinách. Výsledek 1 hladiny byl 2,3 SD nad průměrem a výsledek hladiny 2 byl 1,8 SD pod průměrem. Celkový rozdíl je větší než 4 SD: $(2,3 \text{ SD} - (-1,8 \text{ SD}))=4,1 \text{ SD}$
- **4-1s.** Varovné pravidlo. Poslední 4 hodnoty VKK jsou o více než 1 SD stejným směrem vzdáleny od průměru. Hodnotí se jak pro jednu hladinu (systematická chyba v menší oblasti měřicího rozsahu), tak mezi hladinami (systematická chyba v celém měřicím rozsahu).
- **10-x.** Pokud je 10 výsledků měření na stejné straně od průměru, je toto pravidlo porušeno. Hodnotí se jak pro jednu hladinu (systematická chyba v menší oblasti měřicího rozsahu), tak mezi hladinami (systematická chyba v celém měřicím rozsahu).

Opakování se obecně provádí až po úpravě metody. Je však třeba zjistit, kde se problém nachází. Problém se může vyskytovat v metodě, ale i jinde (nesprávně připravený kontrolní materiál, chyba obsluhy analyzátoru, chyba přístroje atd.).

V současnosti již většina programů obsahuje vhodný software na implementaci těchto pravidel a jejich optimální kombinaci pro danou metodu, což snižuje riziko zbytečných opakování analýz a plýtvání drahým kontrolním materiálem [54].

3.4.11 Externí kontrola kvality

Externí hodnocení kvality neboli EHK, je součástí procesů zajišťujících kvalitu měření. Podstatou je provádění mezilaboratorního porovnávání výsledků měření referenčních materiálů. Organizaci a vyhodnocování zajišťuje organizátor EHK. Vyhodnocení výsledků poskytuje účastníkovi možnost odhalit chyby nebo nejistoty, vede ke zlepšování kvality, může být použito při verifikaci metody a zajištění návaznosti výsledků měření. Data lze využít k odhadu nejistot výsledků měření. Účast v programu

EHK je dle požadavků norem ISO 15189 a ISO 17025 povinná. Z hlediska poskytování zdravotní péče nese mezilaboratorní porovnání velký význam.

Organizace EHK probíhá formou předem naplánovaných cyklů. Cyklus má z pohledu účastníka následující průběh:

- rozeslání pro účastníka neznámých kontrolních vzorků;
- zpravování těchto vzorků (uskladnění, rozpouštění, alikvotace, měření);
- předání výsledků organizátorovi;
- zpracování, vyhodnocení a rozeslání výsledků daného cyklu.

Cílové hodnoty jednotlivých zkoušek jsou účastníkům sděleny až ve výsledcích cyklu. Pro vybrané analyty jsou v systému EHK vydávány certifikáty úspěšnosti. Pokud jsou podmínky pro udělení certifikátu splněny, pracoviště obdrží daný certifikát s výslednou zprávou. Platnost certifikátu je jeden rok. Osvědčení o účasti obdrží pracoviště, které splnilo podmínky pro udělení osvědčení [55].

Požadavky na kontrolní materiály EHK cyklu:

- matrice musí vykazovat shodu s matricí reálného vzorku;
- garance dostatečné homogenity a stability.

Způsoby získání Cílové hodnoty kontrolního materiálu:

- referenčním měřicím postupem;
- validované kalibračními laboratořemi výrobců na podkladě jejich kalibračního protokolu;
- průměr výsledků všech účastníků (s vyloučením odlehlých hodnot);
- průměr měření stejnorodých skupin účastníků (stejně měřicí postupy nebo měřicí systémy) [55].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité analyzátory

- Analyzátor 1 : **COBAS Integra 800**
 - Výrobce: Hitachi Corporation, Tokyo, Japan
 - Dodavatel: Roche s.r.o.
- Analyzátor 2 : **COBAS 6000 (modul c501)**
 - Výrobce: Hitachi Corporation, Tokyo, Japan
 - Dodavatel: Roche s.r.o.

4.2 Použitý software

Pro statistické vyhodnocení dat byl použit software - Method Validator verze 1.1.10.0, od firmy Metz – France, Philippe Marquis 1999.

4.3 Použité reagensie, pomocné a promývací roztoky

Použité reagensie, pomocné a promývací roztoky (kromě deionizované vody) byly originální balení od firmy ROCHE doporučené pro In Vitro Diagnostiku a s příslušnou certifikací.

Reagenční kazety

- ALTLP (Alaninaminotransferáza s aktivací pyridoxal fosfátem)
- ASLOT (Tina-quant Antistreptolysin O)
- ASTLP (Aspartátaminotransferáza s aktivací pyridoxal fosfátem)
- CRPL3 (C-reaktivní protein 3.generace)
- HDLC4 (HDL cholesterol 4.generace)
- MG2 (Magnesium 2.generace)
- CK (Kreatinkináza)
- LDLC3 (LDL cholesterol 3.generace)

Pracovní roztoky – pomocné a promývací

- Deionizovaná voda – výrobce od firmy GORO s.r.o.
- NaOH-D kazeta – slouží k promývání reagenční jehly během EWC
- NaOH-D/Basic kanystr – slouží k alkalickému mytí reakčních kyvet
- Acid Wash Solution – slouží ke kyselému mytí reakčních kyvet
- Eco-D – detergent, přidává se do vodní lázně
- Sample Cleaner 1 – používá se pro alkalické mytí vzorkové jehly
- SMS/Acid Wash – používá se pro kyselý mytí vzorkové jehly
- SMS – kazeta, používá se pro kyselý mytí reagenční jehly
- 9% roztok NaCl – pro ředění patientských vzorků a kalibrátorů
- 9% roztok NaCl – pro sérové indexy

4.4 Použitý spotřební materiál

- primární zkumavky s gelem 16x100 mm, 13x100 mm, 13x75 mm, plastové zkumavky 15x75 mm
- vzorkové nádobky Hitachi 0,5 ml nebo 1,5 ml
- reakční kyvety

4.5 Použitý kalibrační a kontrolní materiál

- Kalibrační materiál
 - C.f.a.s. (Calibrator for automated systems)
 - C.f.a.s. PAC (Prealbumin-ASLOCeruloplasmin)
 - C.f.a.s. Proteins
 - C.f.a.s. Lipids

- Kontrolní materiál
 - PCCM1 (PreciControl ClinChem Multi 1)
 - PCCM2 (PreciControl ClinChem Multi 2)

4.6 Použité (měřené) vzorky

4.6.1 Vzorky měřené pro porovnávání metod

Každou metodou bylo měřeno cca 40 vzorků sér pacientů. Pacienti byli muži a ženy ve věku 18 – 85 let. Výběr vzorků byl cílený, se zaměřením na co nejširší spektrum patologických i fyziologických hodnot. Časové období výběru a analýzy vzorků na obou analyzátorech bylo 04.09.2017 – 15.11.2017.

4.6.2 Vzorky měřené pro verifikaci metod

Měřenými vzorky pro verifikaci metod byl kontrolní materiál na 2 hladinách (normální a patologická) od výrobce ROCHE s označením PCCCM1 a PCCCM2. Mezilehlá preciznost měření byla vypočtena jako variační koeficient (%) ze souboru měření (minimálně 20 hodnot) certifikovaného kontrolního materiálu a následně porovnána s variačním koeficientem uvedeným v dokumentaci výrobce.

Opakovatelnost jednotlivých metod byla hodnocena pomocí 10 měření (v sérii) referenčního certifikovaného materiálu od firmy SEKK. Z porovnání průměru měření s cílovou hodnotou referenčního materiálu byl stanoven bias a zjištěn jeho význam. Z rozšířené nejistoty vztažné hodnoty (U_{AV} , uvádí poskytovatel referenčního materiálu v absolutních hodnotách) je vypočtena relativní nejistota vztažné hodnoty ($u_{ref,rel}$).

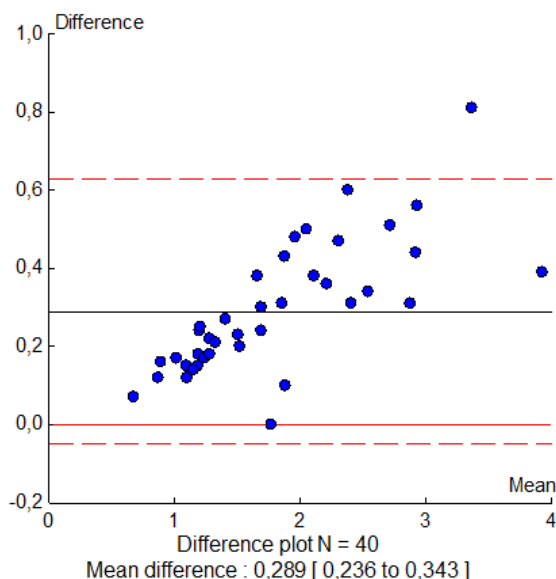
5. VÝSLEDKY

5.1 Statistické vyhodnocení a verifikace alaninaminotransferázy

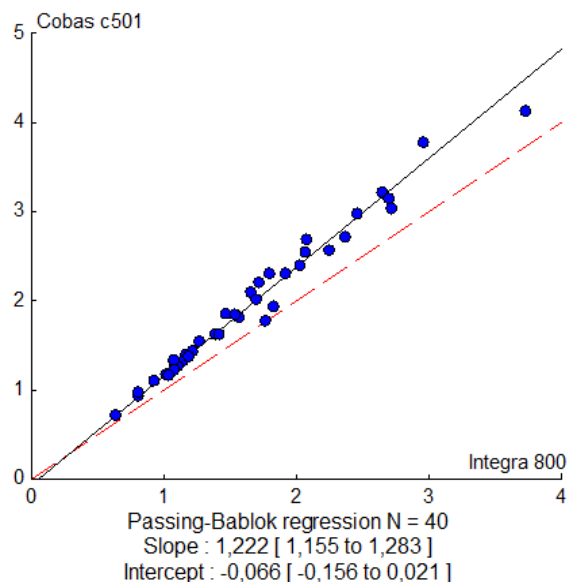
5.1.1 Porovnání metody na analyzátoch COBAS Integra 800 a COBAS 6000

Pro porovnání metod stanovení alaninaminotransferázy byla provedena Bland – Altmanova diferenciální analýza. Výsledky analýzy jsou uvedené na obrázku 10. Z grafu je patrná průměrná diference mezi oběma metodami, která dosahuje hodnoty 0,289 $\mu\text{kat/l}$, což odpovídá 14,99%. Intraindividuální biologická variabilita je dle Westgarda [53] 19,40%.

Dále byla provedena Passing – Bablokova regresní analýza s výsledky, které jsou uvedené na obrázku 11, z níž je patrné, že interval spolehlivosti směrnice (slope) neobsahuje hodnotu 1, což svědčí o přítomnosti proporcionální diference. Interval spolehlivosti úseku (intercept) obsahuje hodnotu 0, což vylučuje přítomnost konstantní diference.



Obr. 10. Bland - Altman rozdílový graf pro metody stanovení ALT



Obr. 11. Passing – Bablokova regresní analýza pro metody stanovení ALT

5.1.2 Verifikace metody na analyzátoru COBAS 6000

Verifikace metody stanovení alaninaminotransferázy zahrnovala měření na dvou hladinách – normální PCCCM1 a patologické PCCCM2. Výsledky mezilehlé preciznosti měření pro stanovení metody jsou shrnuté v tabulce 1.

Tabulka 1. Stanovení mezilehlé preciznosti měření pro metodu stanovení ALT

	PCCCM1	PCCCM2
Počet měření	23	23
Průměr měření	0,77	1,94
Směrodatné odchylna	0,01	0,03
CV _{MPM} (%)	1,53	1,57
CV _{výrobce} (%)	1,60	1,00
Srovnání CV _{MPM} a CV _{výrobce}	Vyhovuje	Nevyhovuje
Intraindividuální biologická variabilita CV _i (%)	19,4	

Z výsledků uvedených v tabulce 1 je patrné, že vypočtený variační koeficient je vyšší než koeficient udávaný výrobcem v případě patologické hladiny kontrolního materiálu PCCCM2. Vzhledem k biologické variabilitě je dosahovaná preciznost vyhovující.

Verifikace metody stanovení alaninaminotransferázy dále zahrnovala měření opakovatelnosti na dvou hladinách referenčního materiálu – patologické (vzorek A) a normální (vzorek B). Výsledky měření opakovatelnosti metody jsou shrnuté v tabulce 2.

Tabulka 2. Stanovení opakovatelnosti metody stanovení ALT

Pořadí měření	Vzorek A*	Vzorek B*
1	1,25	2,29
2	1,26	2,28
3	1,23	2,27
4	1,23	2,29
5	1,26	2,26
6	1,23	2,25
7	1,25	2,25
8	1,25	2,29
9	1,26	2,28
10	1,25	2,30
Průměr měření	1,25	2,28
Směrodatná odchylka	0,01	0,02
Nejistota průměru měření $u_{xp,rel}(\%)$	0,3	0,2
Vztažná hodnota referenčního materiálu	1,259	2,355
Nejistota $u_{ref,rel}(\%)$	1,191	1,104
Bias (%)	-0,953	-3,355
Bias významný	ne	ano

*Referenční materiál EHK firmy SEKK, cyklus AKS 4/17 (analyty krevního séra) o neznámé koncentraci

Z výsledků uvedených v tabulce 2 je patrné, že směrodatné odchylky měření obou vzorků nepřesahovaly 0,02. Bias byl významný pouze u vzorku B. Získané výsledky byly zahrnuty do výpočtu výsledné nejistoty.

Výpočet výsledných nejistot

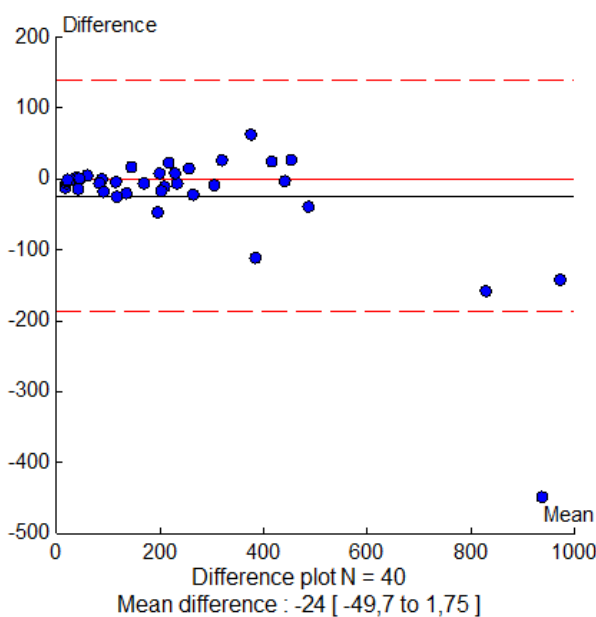
Na základě výpočtu dílčích nejistot, uvedených v tabulce 1 a 2, byla vyhodnocena velikost rozšířené kombinované nejistoty $U_{c,rel}$ pro vzorek A (3,93%) a vzorek B (5,12%). Obě hodnoty byly porovnávány s požadavky mezní nejistoty (D_{max}) uvedené v dokumentaci EHK od firmy SEKK z roku 2017, která měla hodnotu 15%. Výsledné rozšířené kombinované nejistoty jsou nižší než mezní nejistota, z čehož lze učinit závěr, že metoda stanovení alaninaminotransferázy vyhovuje zamýšlenému použití.

5.2 Statistické vyhodnocení a verifikace antistreptolyzinu-O

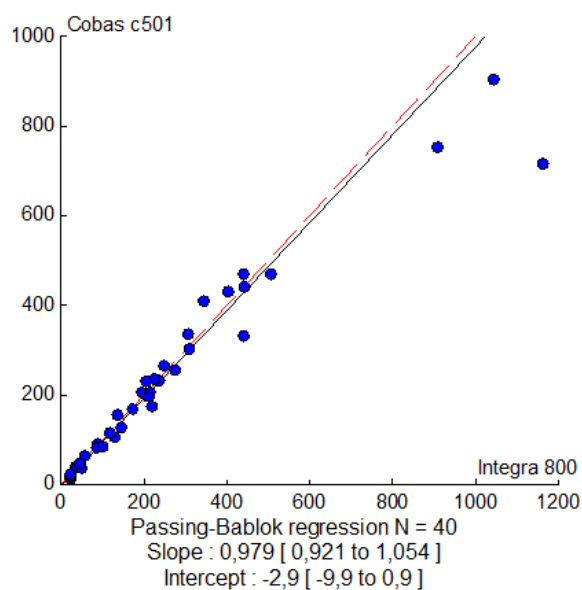
5.2.1 Porovnání metody na analyzátoch COBAS Integra 800 a COBAS 6000

Pro porovnání metod stanovení antistreptolyzinu-O byla provedena Bland – Altmanova diferenciální analýza. Výsledky analýzy jsou uvedené na obrázku 12. Z grafu na obrázku je patrná průměrná diference mezi oběma metodikami, která dosahuje hodnoty -24 IU/ml, což odpovídá -10,87%.

Dále byla provedena Passing – Bablokova regresní analýza s výsledky, které jsou uvedené na obrázku 13, z níž je patrné, že interval spolehlivosti směrnice (slope) obsahuje hodnotu 1, což vylučuje přítomnost proporcionální diference. Interval spolehlivosti úseku (intercept) obsahuje hodnotu 0, což vylučuje přítomnost konstantní diference.



Obr. 12. Bland - Altman rozdílový graf pro metody stanovení ASLO



Obr. 13. Passing – Bablokova regresní analýza pro metody stanovení ASLO

5.2.2 Verifikace metody na analyzátoru COBAS 6000

Verifikace metody stanovení antistreptolyzinu-O zahrnovala měření na dvou hladinách – normální PCCCM1 a patologické PCCCM2. Výsledky mezilehlé preciznosti měření pro stanovení metody jsou shrnuté v tabulce 3.

Tabulka 3. Stanovení mezilehlé preciznosti měření pro metodu stanovení ASLO

	PCCCM1	PCCCM2
Počet měření	32	32
Průměr měření	125,25	262,03
Směrodatná odchylka	2,62	1,08
CV _{MPM} (%)	2,09	1,56
CV _{výrobce} (%)	2,50	1,70
Srovnání CV _{MPM} a CV _{výrobce}	Vyhovuje	Vyhovuje
Intraindividuální biologická variabilita CV _i (%)	neuveдено	

Z výsledků uvedených v tabulce 3 je patrné, že vypočtený variační koeficient je nižší než koeficient udávaný výrobcem. Preciznost metody je vyhovující.

Verifikace metody stanovení antistreptolysinu-O dále zahrnovala měření opakovatelnosti na dvou hladinách referenčního materiálu – patologické (vzorek A) a normální (vzorek B). Výsledky měření pro stanovení metody jsou shrnuté v tabulce 4.

Tabulka 4. Stanovení opakovatelnosti metody stanovení ASLO

Pořadí měření	Vzorek A*	Vzorek B*
1	479,00	205,00
2	478,00	200,00
3	489,00	206,00
4	477,00	213,00
5	487,00	208,00
6	480,00	205,00
7	489,00	207,00
8	500,00	208,00
9	487,00	208,00
10	495,00	205,00
Průměr měření	486,10	206,50
Směrodatná odchylka	7,65	3,31
Nejistota průměru měření $u_{Xp,rel}(\%)$	0,5	0,5
Vztažná hodnota referenčního materiálu	485	198
Nejistota RH $u_{ref,rel}(\%)$	0,969	0,732
Bias (%)	0,227	4,293
Bias významný	ne	ano

*Referenční materiál EHK firmy SEKK, cyklus RF 1/18 (Diagnostika revmatoidní artritidy a ASLO) o neznámé koncentraci

Z výsledků uvedených v tabulce 4 je patrné, že směrodatné odchylky měření obou vzorků nepřesahovaly 0,5. Bias byl významný pouze u vzorku B. Získané výsledky byly zahrnuty do výpočtu výsledné nejistoty.

Výpočet výsledných nejistot

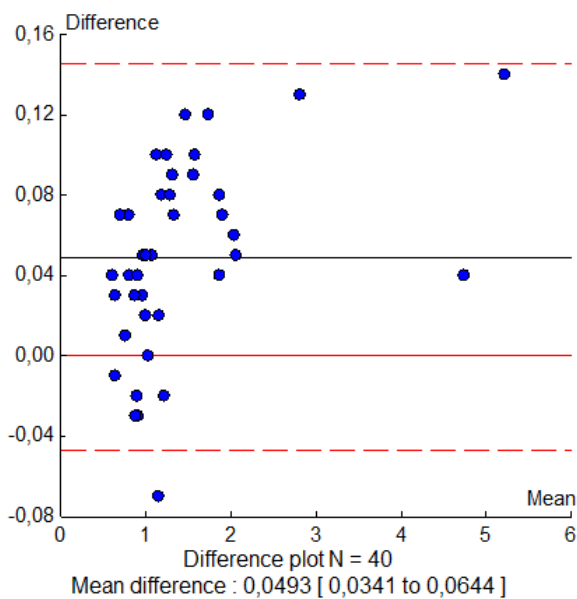
Na základě výpočtu dílčích nejistot uvedených v tabulce 3 a 4 byla vyhodnocena velikost rozšířené kombinované nejistoty výsledku měření $U_{c,rel}$ pro vzorek A (4,71%) a vzorek B (5,60%). Obě hodnoty byly porovnávány s požadavky mezní nejistoty (D_{max}) uvedené v dokumentaci EHK od firmy SEKK z roku 2018, která měla hodnotu 24%. Výsledné rozšířené kombinované nejistoty jsou nižší než mezní nejistota, z čehož lze učinit závěr, že metoda stanovení antistreptolyzinu-O vyhovuje zamýšlenému použití.

5.3 Statistické vyhodnocení a verifikace aspartátaminotransferázy

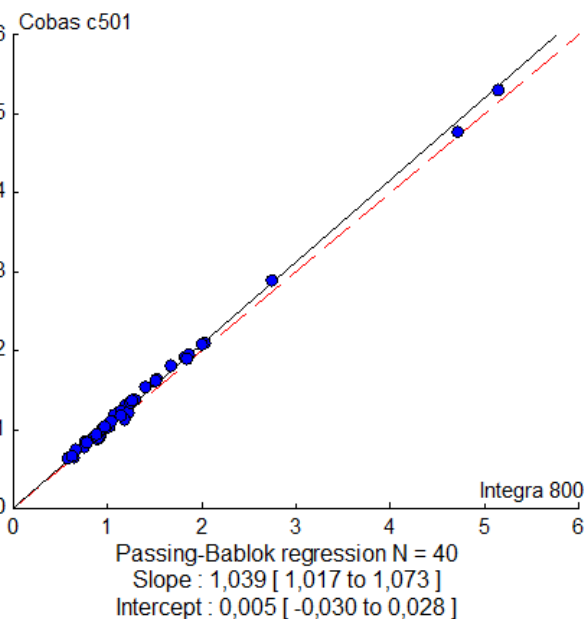
5.3.1 Porovnání metody na analyzátoch COBAS Integra 800 a COBAS 6000

Pro porovnání metod stanovení aspartátaminotransferázy byla provedena Bland – Altmanova diferenciální analýza. Výsledky analýzy jsou uvedené na obrázku 14. Z grafu na obrázku je patrná průměrná diference mezi oběma metodikami dosahuje hodnoty 0,0493 μkat , což odpovídá 3,44%. Intraindividuální biologická variabilita je dle Westgarda[53] 12,3%.

Dále byla provedena Passing – Bablokova regresní analýza s výsledky, které jsou uvedené na obrázku 15, z níž je patrné, že interval spolehlivosti směrnice (slope) neobsahuje hodnotu 1, což svědčí o přítomnosti proporcionální diference. Interval spolehlivosti úseku (intercept) obsahuje hodnotu 0, což vylučuje přítomnost konstantní diference.



Obr. 14. Bland - Altman rozdílový graf pro metody stanovení AST



Obr. 15. Passing – Bablokova regresní analýza pro metody stanovení AST

5.3.2 Verifikace metody na analyzátoru COBAS 6000

Verifikace metody stanovení aspartátaminotransferázy zahrnovala měření na dvou hladinách – normální PCCCM1 a patologické PCCCM2. Výsledky mezilehlé preciznosti měření pro stanovení metody jsou shrnuté v tabulce 5.

Tabulka 5. Stanovení mezilehlé preciznosti měření pro metodu stanovení AST

	PCCCM1	PCCCM2
Počet měření	23	23
Průměr měření	0,78	2,38
Směrodatné odchylka	0,01	0,03
CV _{MPM} (%)	1,42	1,08
CV _{výrobce} (%)	1,60	0,80
Srovnání CV _{MPM} a CV _{výrobce}	vyhovuje	Nevhovuje
Intraindividuální biologická variabilita CV _i (%)	12,3	

Z výsledků uvedených v tabulce 5 je patrné, že vypočtený variační koeficient je vyšší než koeficient udávaný výrobcem v případě PCCCM2. Vzhledem k biologické variabilitě je dosahovaná preciznost vyhovující.

Verifikace metody stanovení aspartátaminotransferázy dále zahrnovala měření opakovatelnosti na dvou hladinách referenčního materiálu – patologické (vzorek A) a normální (vzorek B). Výsledky měření pro stanovení metody jsou shrnuté v tabulce 6.

Tabulka 6. Stanovení opakovatelnosti metody stanovení AST

Pořadí měření	Vzorek A*	Vzorek B*
1	3,28	2,42
2	3,28	2,42
3	3,26	2,41
4	3,29	2,43
5	3,28	2,43
6	3,32	2,42
7	3,24	2,42
8	3,24	2,46
9	3,29	2,44
10	3,32	2,47
Průměr měření	3,28	2,43
Směrodatná odchylka	0,03	0,02
Nejistota průměru měření $u_{xp,rel}(\%)$	0,3	0,3
Vztažná hodnota referenčního materiálu	3,267	2,474
Nejistota RH $u_{ref,rel}(\%)$	1,102	1,213
Bias (%)	0,398	-1,698
Bias významný	ne	ne

*Referenční materiál EHK firmy SEKK, cyklus AKS 4/17 (analyty krevního séra) o neznámé koncentraci

Z výsledků uvedených v tabulce 6 je patrné, že směrodatné odchylky měření obou vzorků nepřesahovaly 0,03. Bias byl u měření obou vzorků nevýznamný. Získané výsledky byly zahrnuty do výpočtu výsledné nejistoty.

Výpočet výsledných nejistot

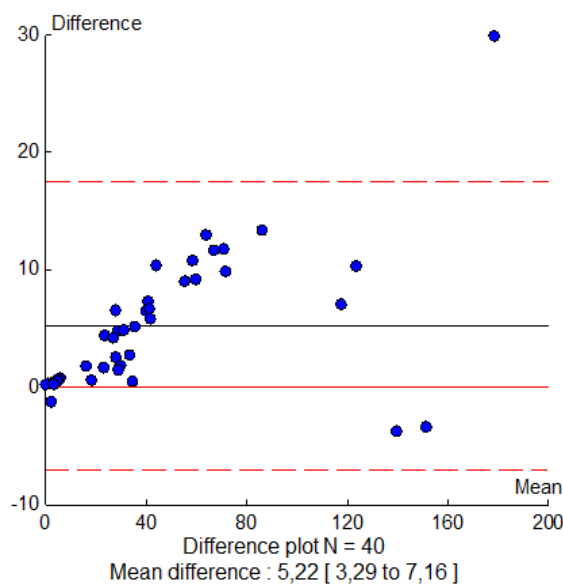
Na základě výpočtu dílčích nejistot uvedených v tabulce 5 a 6 byla vyhodnocena velikost rozšířené kombinované nejistoty výsledku měření $U_{c,rel}$ pro vzorek A (3,63%) a vzorek B (3,29%). Obě hodnoty byly porovnávány s požadavky mezní nejistoty (D_{max}) uvedené v dokumentaci EHK od firmy SEKK z roku 2017, která měla hodnotu 15%. Výsledné rozšířené kombinované nejistoty jsou nižší než mezní nejistota, z čehož lze učinit závěr, že metoda stanovení aspartátaminotransferázy vyhovuje zamýšlenému použití.

5.4 Statistické vyhodnocení a verifikace C-reaktivního proteinu

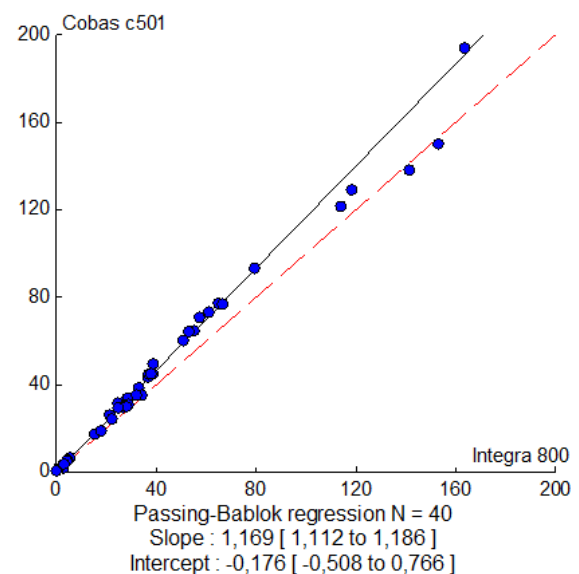
5.4.1 Porovnání metody na analyzátoch COBAS Integra 800 a COBAS 6000

Pro porovnání metod stanovení C-reaktivního proteinu byla provedena Bland – Altmanova diferenciální analýza. Výsledky analýzy jsou uvedené na obrázku 16. Z grafu na obrázku je patrná průměrná diference mezi oběma metodikami dosahuje hodnoty 5,22 mg/l, což odpovídá 10,59%. Intraindividuální biologická variabilita je dle Westgarda[53] 42,2%.

Dále byla provedena Passing – Bablokova regresní analýza s výsledky, které jsou uvedené na obrázku 17, z níž je patrné, že interval spolehlivosti směrnice (slope) neobsahuje hodnotu 1, což svědčí o přítomnosti proporcionální diference. Interval spolehlivosti úseku (intercept) obsahuje hodnotu 0, což vylučuje přítomnost konstantní diference.



Obr. 16. Bland - Altman rozdílový graf pro metody stanovení CRP



Obr. 17. Passing – Bablokova regresní analýza pro metody stanovení CRP

5.4.2 Verifikace metody na analyzátoru COBAS 6000

Verifikace metody stanovení C-reaktivního proteinu zahrnovala měření na dvou hladinách – normální PCCCM1 a patologické PCCCM2. Výsledky mezilehlé preciznosti měření pro stanovení metody jsou shrnuté v tabulce 7.

Tabulka 7. Stanovení mezilehlé preciznosti měření pro metodu stanovení CRP

	PCCCM1	PCCCM2
Počet měření	23	23
Průměr měření	7,1	35,02
Směrodatné odchylnka	0,08	0,67
CV_{MPM} (%)	1,07	1,92
CV_{výrobce} (%)	2,90	1,90
Srovnání CV_{MPM} a CV_{výrobce}	vyhovuje	nevyhovuje
Intraindividuální biologická variabilita CV_i (%)	42,2	

Z výsledků uvedených v tabulce 1 je patrné, že vypočtený variační koeficient je vyšší než koeficient udávaný výrobcem v případě PCCCM2. Vzhledem k biologické variabilitě je dosahovaná preciznost vyhovující.

Verifikace metody stanovení C-reaktivního proteinu dále zahrnovala měření opakovatelnosti na dvou hladinách referenčního materiálu – patologické (vzorek A) a normální (vzorek B). Výsledky měření pro stanovení metody jsou shrnuté v tabulce 8.

Tabulka 8. Stanovení opakovatelnosti metody stanovení CRP

Pořadí měření	Vzorek A*	Vzorek B*
1	70,83	40,39
2	70,78	40,10
3	71,57	39,72
4	73,26	40,48
5	72,36	40,04
6	73,31	40,07
7	72,96	39,95
8	72,91	39,51
9	72,46	40,19
10	72,16	40,72
Průměr měření	72,26	40,12
Směrodatná odchylka	0,93	0,36
Nejistota průměru měření $u_{xp,rel}(\%)$	0,4	0,3
Vztažná hodnota referenčního materiálu	77,8	43,8
Nejistota RH $u_{ref,rel}(\%)$	0,617	0,594
Bias (%)	-7,121	-8,409
Bias významný	ano	ano

*Referenční materiál EHK firmy SEKK, cyklus CRP 3/17 (C-reaktivní protein) o neznámé koncentraci

Z výsledků uvedených v tabulce 8 je patrné, že směrodatné odchylky měření obou vzorků nepřesahovaly 0,4. Bias byl významný u obou měření vzorků. Získané výsledky byly zahrnuty do výpočtu výsledné nejistoty.

Výpočet výsledných nejistot

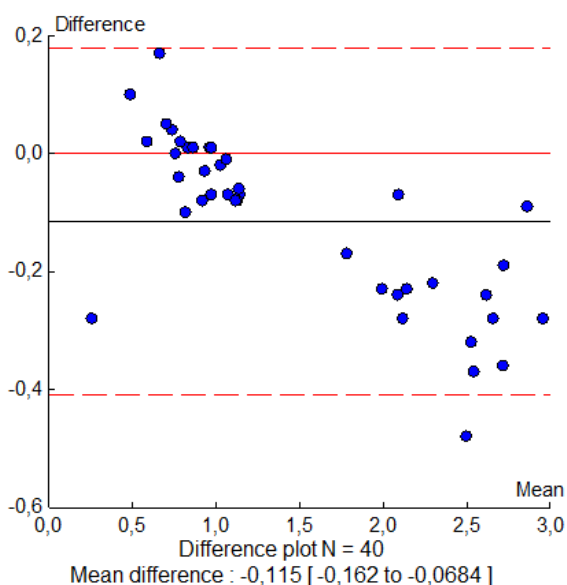
Na základě výpočtu dílčích nejistot uvedených v tabulce 7 a 8 byla vyhodnocena velikost rozšířené kombinované nejistoty výsledku měření $U_{c,rel}$ pro vzorek A (7,58%) a vzorek B (9,34%). Obě hodnoty byly porovnávány s požadavky mezní nejistoty (D_{max}) uvedené v dokumentaci EHK od firmy SEKK z roku 2017, která měla hodnotu 24%. Výsledné rozšířené kombinované nejistoty jsou nižší než mezní nejistota, z čehož lze učinit závěr, že metoda stanovení C-reaktivního proteinu vyhovuje zamýšlenému použití.

5.5 Statistické vyhodnocení a verifikace HDL cholesterolu

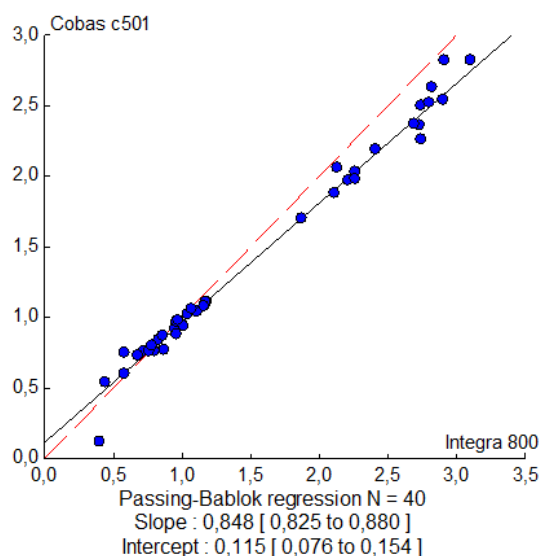
5.5.1 Porovnání metody na analyzátoch COBAS Integra 800 a COBAS 6000

Pro porovnání metod stanovení HDL cholesterolu byla provedena Bland – Altmanova diferenciální analýza. Výsledky analýzy jsou uvedené na obrázku 18. Z grafu na obrázku je patrná průměrná diference mezi oběma metodikami dosahuje hodnoty - 0,115 mmol/l, což odpovídá -8,05 %. Intraindividuální biologická variabilita je dle Westgarda [53] 7,3 %.

Dále byla provedena Passing – Bablokova regresní analýza s výsledky, které jsou uvedené na obrázku 19, z níž je patrné, že interval spolehlivosti směrnice (slope) neobsahuje hodnotu 1, což svědčí o přítomnosti proporcionální diference. Interval spolehlivosti úseku (intercept) neobsahuje hodnotu 0, což svědčí o přítomnosti konstantní diference.



Obr. 18. Bland - Altman rozdílový graf pro metody stanovení HDL



Obr. 19. Passing – Bablokova regresní analýza pro metody stanovení HDL

5.5.2 Verifikace metody na analyzátoru COBAS 6000

Verifikace metody stanovení HDL cholesterolu zahrnovala měření na dvou hladinách – patologické PCCCM1 a normální PCCCM2. Výsledky mezilehlé preciznosti měření pro stanovení metody jsou shrnuté v tabulce 9.

Tabulka 9. Stanovení mezilehlé preciznosti měření pro metodu stanovení HDL

	PCCCM1	PCCCM2
Počet měření	23	23
Průměr měření	0,7	1,76
Směrodatné odchylna	0,01	0,02
CV_{MPM} (%)	1,24	0,95
CV_{výrobce} (%)	1,00	1,40
Srovnání CV_{MPM} a CV_{výrobce}	nevyhovuje	vyhovuje
Intraindividuální biologická variabilita CV_i (%)	7,3	

Z výsledků uvedených v tabulce 9 je patrné, že vypočtený variační koeficient je vyšší než koeficient udávaný výrobcem v případě PCCCM1. Vzhledem k biologické variabilitě je dosahovaná preciznost vyhovující.

Verifikace metody stanovení HDL cholesterolu dále zahrnovala měření opakovatelnosti na dvou hladinách referenčního materiálu – patologické (vzorek A) a normální (vzorek B). Výsledky měření pro stanovení metody jsou shrnuté v tabulce 10.

Tabulka 10. Stanovení opakovatelnosti metody stanovení HDL

Pořadí měření	Vzorek A*	Vzorek B*
1	1,32	1,97
2	1,33	1,98
3	1,32	1,99
4	1,32	1,97
5	1,32	1,98
6	1,32	1,99
7	1,30	1,99
8	1,31	1,98
9	1,32	1,99
10	1,31	2,00
Průměr měření	1,32	1,98
Směrodatná odchylka	0,01	0,01
Nejistota průměru měření $u_{xp,rel}(\%)$	0,2	0,2
Vztažná hodnota referenčního materiálu	1,33	2,04
Nejistota RH $u_{ref,rel}(\%)$	3,459	0,368
Bias (%)	-0,977	-2,745
Bias významný	ne	ano

*Referenční materiál EHK firmy SEKK, cyklus RFA 2/17 (rizikové faktory aterosklerózy) o neznámé koncentraci

Z výsledků uvedených v tabulce 10 je patrné, že směrodatné odchylky měření obou vzorků nepřesahovaly 0,01. Bias byl významný pouze u vzorku B. Získané výsledky byly zahrnuty do výpočtu výsledné nejistoty.

Výpočet výsledných nejistot

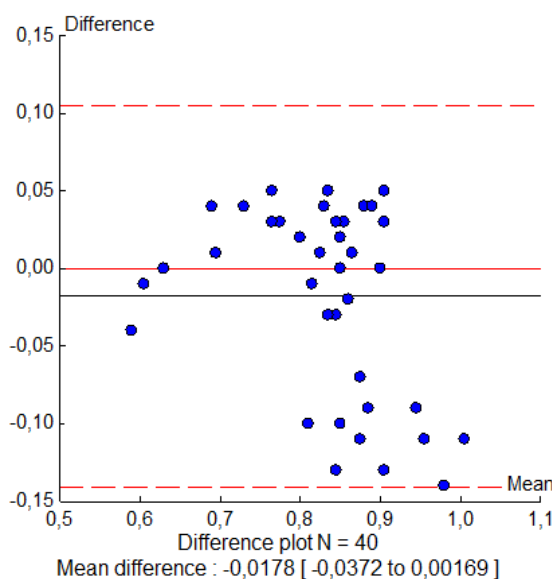
Na základě výpočtu dílčích nejistot uvedených v tabulce 9 a 10 byla vyhodnocena velikost rozšířené kombinované nejistoty výsledku měření $U_{c,rel}$ pro vzorek A (7,36%) a vzorek B (3,43%). Obě hodnoty byly porovnávány s požadavky mezní nejistoty (D_{max}) uvedené v dokumentaci EHK od firmy SEKK z roku 2017, která měla hodnotu 15%. Výsledné rozšířené kombinované nejistoty jsou nižší než mezní nejistota, z čehož lze učinit závěr, že metoda stanovení HDL cholesterolu vyhovuje zamýšlenému použití.

5.6 Statistické vyhodnocení a verifikace hořčíku

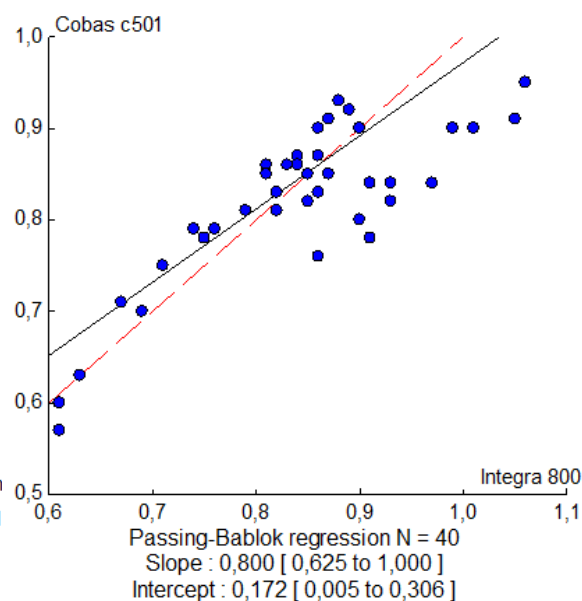
5.6.1 Porovnání metody na analyzátoch COBAS Integra 800 a COBAS 6000

Pro porovnání metod stanovení hořčíku byla provedena Bland – Altmanova diferenciální analýza. Výsledky analýzy jsou uvedené na obrázku 20. Z grafu na obrázku je patrná průměrná diference mezi oběma metodikami dosahuje hodnoty $-0,0178$ mmol, což odpovídá $-2,17\%$. Intraindividuální biologická variabilita je dle Westgarda [53] $3,6\%$.

Dále byla provedena Passing – Bablokova regresní analýza s výsledky, které jsou uvedené na obrázku 21, z níž je patrné, že interval spolehlivosti směrnice (slope) obsahuje hodnotu 1, což vylučuje přítomnost proporcionální diference. Interval spolehlivosti úseku (intercept) neobsahuje hodnotu 0, což svědčí o přítomnosti konstantní diference.



Obr. 20. Bland - Altman rozdílový graf pro metody stanovení hořčíku



Obr. 21. Passing – Bablokova regresní analýza pro metody stanovení hořčíku

5.6.2 Verifikace metody na analyzátoru COBAS 6000

Verifikace metody stanovení hořčíku zahrnovala měření na dvou hladinách – normální PCCCM1 a patologické PCCCM2. Výsledky mezilehlé preciznosti měření pro stanovení metody jsou shrnuté v tabulce 11.

Tabulka 11. Stanovení mezilehlé preciznosti měření pro metodu stanovení hořčíku

	PCCCM1	PCCCM2
Počet měření	23	23
Průměr měření	0,81	1,32
Směrodatné odchylna	0,01	0,01
CV _{MPM} (%)	1,29	0,75
CV _{výrobce} (%)	1,00	1,00
Srovnání CV _{MPM} a CV _{výrobce}	Nevyhovuje	vyhovuje
Intraindividuální biologická variabilita CV _i (%)	3,6	

Z výsledků uvedených v tabulce 11 je patrné, že vypočtený variační koeficient je vyšší než koeficient udávaný výrobcem v případě PCCCM1. Vzhledem k biologické variabilitě je dosahovaná preciznost vyhovující.

Verifikace metody stanovení hořčíku dále zahrnovala měření opakovatelnosti na dvou hladinách referenčního materiálu – patologické (vzorek A) a normální (vzorek B). Výsledky měření pro stanovení metody jsou shrnuté v tabulce 12.

Tabulka 12. Stanovení opakovatelnosti metody stanovení hořčíku

Pořadí měření	Vzorek A*	Vzorek B*
1	1,41	2,01
2	1,39	1,97
3	1,40	1,98
4	1,43	1,99
5	1,41	2,00
6	1,42	2,00
7	1,40	1,99
8	1,41	2,00
9	1,42	2,00
10	1,41	2,00
Průměr měření	1,41	1,99
Směrodatná odchylka	0,01	0,01
Nejistota průměru měření $u_{xp,rel}(\%)$	0,3	0,2
Vztažná hodnota referenčního materiálu	1,383	1,970
Nejistota RH $u_{ref,rel}(\%)$	0,759	0,761
Bias (%)	1,952	1,218
Bias významný	Ano	ne

*Referenční materiál EHK firmy SEKK, cyklus AKS 4/17 (analyty krevního séra) o neznámé koncentraci

Z výsledků uvedených v tabulce 12 je patrné, že směrodatné odchylky měření obou vzorků nepřesahovaly 0,3. Bias byl významný pouze u vzorku A. Získané výsledky byly zahrnuty do výpočtu výsledné nejistoty.

Výpočet výsledných nejistot

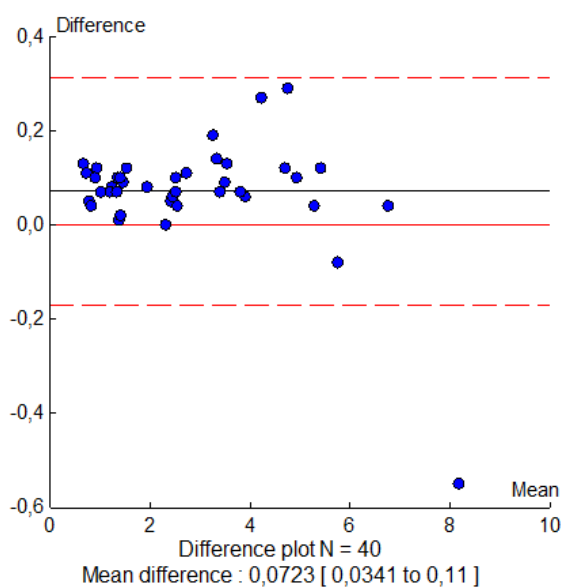
Na základě výpočtu dílčích nejistot uvedených v tabulce 11 a 12 byla vyhodnocena velikost rozšířené kombinované nejistoty výsledku měření $U_{c,rel}$ pro vzorek A (3,61%) a vzorek B (2,17%). Obě hodnoty byly porovnávány s požadavky mezní nejistoty (D_{max}) uvedené v dokumentaci EHK od firmy SEKK z roku 2017, která měla hodnotu 15%. Výsledné rozšířené kombinované nejistoty jsou nižší než mezní nejistota, z čehož lze učinit závěr, že metoda stanovení hořčíku vyhovuje zamýšlenému použití.

5.7 Statistické vyhodnocení a verifikace kreatinkinázy

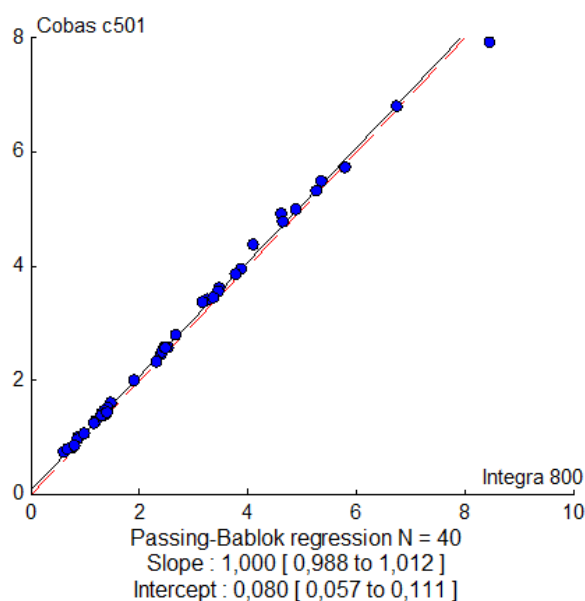
5.7.1 Porovnání metody na analyzátoch COBAS Integra 800 a COBAS 6000

Pro porovnání metod stanovení kreatinkinázy byla provedena Bland – Altmanova diferenciální analýza. Výsledky analýzy jsou uvedené na obrázku 22. Z grafu na obrázku je patrná průměrná diference mezi oběma metodikami dosahuje hodnoty 0,0723 μkat , což odpovídá 2,53%. Intraindividuální biologická variabilita je dle Westgarda [53] 22,8%.

Dále byla provedena Passing – Bablokova regresní analýza s výsledky, které jsou uvedené na obrázku 23, z níž je patrné, že interval spolehlivosti směrnice (slope) obsahuje hodnotu 1, což vylučuje přítomnost proporcionální diference. Interval spolehlivosti úseku (intercept) neobsahuje hodnotu 0, což svědčí o přítomnosti konstantní diference.



Obr. 22. Bland - Altman rozdílový graf pro metody stanovení CK



Obr. 23. Passing – Bablokova regresní analýza pro metody stanovení CK

5.7.2 Verifikace metody na analyzátoru COBAS 6000

Verifikace metody stanovení kreatinkinázy zahrnovala měření na dvou hladinách – normální PCCCM1 a patologické PCCCM2. Výsledky mezilehlé preciznosti měření pro stanovení metody jsou shrnuté v tabulce 13.

Tabulka 13. Stanovení mezilehlé preciznosti měření pro metodu stanovení CK

	PCCCM1	PCCCM2
Počet měření	23	23
Průměr měření	2,47	4,55
Směrodatná odchylka	0,04	0,05
CV _{M_{MPM}} (%)	1,69	1,07
CV _{výrobce} (%)	1,10	0,90
Srovnání CV _{M_{MPM}} a CV _{výrobce}	nevyhovuje	nevyhovuje
Intraindividuální biologická variabilita CV _i (%)	22,8	

Z výsledků uvedených v tabulce 13 je patrné, že vypočtený variační koeficient je vyšší než koeficient udávaný výrobcem v případě obou materiálů. Vzhledem k biologické variabilitě je dosahovaná preciznost vyhovující.

Verifikace metody stanovení kreatinkinázy dále zahrnovala měření opakovatelnosti na dvou hladinách referenčního materiálu – patologické (vzorek A) a normální (vzorek B). Výsledky měření pro stanovení metody jsou shrnuté v tabulce 14.

Tabulka 14. Stanovení opakovatelnosti metody stanovení CK

Pořadí měření	Vzorek A*	Vzorek B*
1	3,43	8,19
2	3,41	8,10
3	3,42	8,14
4	3,40	8,12
5	3,41	8,13
6	3,42	8,12
7	3,41	8,16
8	3,42	8,14
9	3,43	8,19
10	3,44	8,11
Průměr měření	3,42	8,14
Směrodatná odchylka	0,01	0,03
Nejistota průměru měření $u_{xp,rel}(\%)$	0,1	0,1
Vztažná hodnota referenčního materiálu	3,692	8,705
Nejistota RH $u_{ref,rel}(\%)$	1,192	1,206
Bias (%)	-7,394	-6,491
Bias významný	ano	ano

*Referenční materiál EHK firmy SEKK, cyklus AKS 4/17 (analyty krevního séra) o neznámé koncentraci

Z výsledků uvedených v tabulce 14 je patrné, že směrodatné odchylky měření obou vzorků nepřesahovaly 0,1. Bias byl významný u měření obou vzorků. Získané výsledky byly zahrnuty do výpočtu výsledné nejistoty.

Výpočet výsledných nejistot

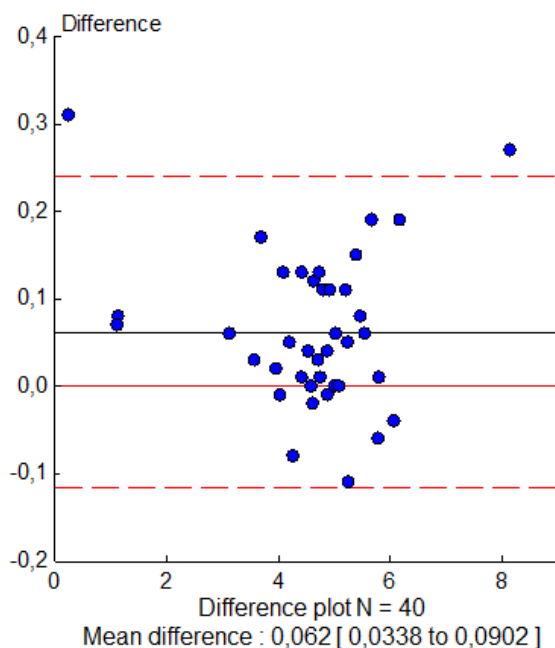
Na základě výpočtu dílčích nejistot uvedených v tabulce 13 a 14 byla vyhodnocena velikost rozšířené kombinované nejistoty výsledku měření $U_{c,rel}$ pro vzorek A (8,48%) a vzorek B (7,25%). Obě hodnoty byly porovnávány s požadavky mezní nejistoty (D_{max}) uvedené v dokumentaci EHK od firmy SEKK z roku 2017, která měla hodnotu 20%. Výsledné rozšířené kombinované nejistoty jsou nižší než mezní nejistota, z čehož lze učinit závěr, že metoda stanovení kreatinkinázy vyhovuje zamýšlenému použití.

5.8 Statistické vyhodnocení a verifikace LDL cholesterolu

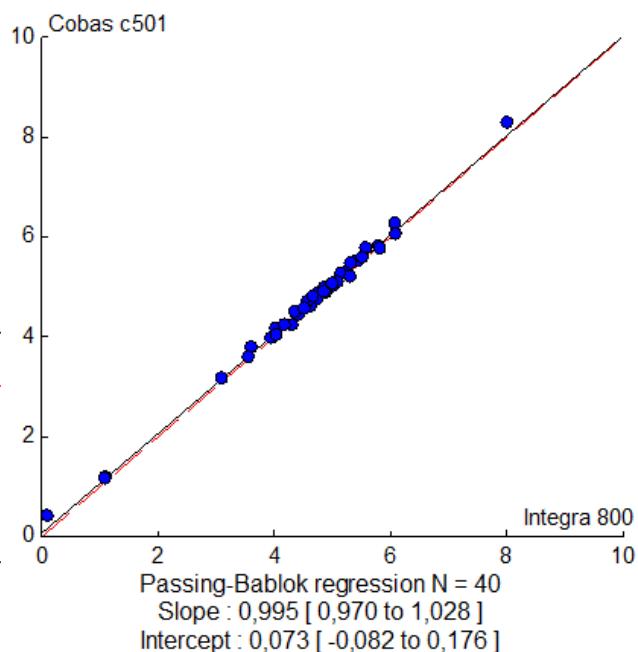
5.8.1 Porovnání metody na analyzátorech COBAS Integra 800 a COBAS 6000

Pro porovnání metod stanovení LDL cholesterolu byla provedena Bland – Altmanova diferenciální analýza. Výsledky analýzy jsou uvedené na obrázku 24. Z grafu na obrázku je patrná průměrná diference mezi oběma metodikami dosahuje hodnoty 0,062 mmol/l, což odpovídá 1,34 %. Intraindividuální biologická variabilita je dle Westgarda[53] 7,8 %.

Dále byla provedena Passing – Bablokova regresní analýza s výsledky, které jsou uvedené na obrázku 25, z níž je patrné, že interval spolehlivosti směrnice (slope) obsahuje hodnotu 1, což vylučuje přítomnost proporcionální diference. Interval spolehlivosti úseku (intercept) obsahuje hodnotu 0, což vylučuje přítomnost konstantní diference.



Obr. 24. Bland - Altman rozdílový graf pro metody stanovení LDL



Obr. 25. Passing – Bablokova regresní analýza pro metody stanovení LDL

5.8.2 Verifikace metody na analyzátoru COBAS 6000

Verifikace metody stanovení LDL cholesterolu zahrnovala měření na dvou hladinách – normální PCCCM1 a patologické PCCCM2. Výsledky mezilehlé preciznosti měření pro stanovení metody jsou shrnuté v tabulce 15.

Tabulka 15. Stanovení mezilehlé preciznosti měření pro metodu stanovení LDL

	PCCCM1	PCCCM2
Počet měření	23	23
Průměr měření	1,41	2,42
Směrodatná odchylka	0,02	0,02
CV _{MPM} (%)	1,22	1,00
CV _{výrobce} (%)	2,30	2,10
Srovnání CV _{MPM} a CV _{výrobce}	Vyhovuje	vyhovuje
Intraindividuální biologická variabilita CV _i (%)	7,8	

Z výsledků uvedených v tabulce 15 je patrné, že vypočtený variační koeficient je nižší než koeficient udávaný výrobcem a dosahovaná preciznost je vyhovující.

Verifikace metody stanovení LDL cholesterolu dále zahrnovala měření opakovatelnosti na dvou hladinách referenčního materiálu – patologické (vzorek A) a normální (vzorek B). Výsledky měření pro stanovení metody jsou shrnuté v tabulce 16.

Tabulka 16. Stanovení opakovatelnosti metody stanovení LDL

Pořadí měření	Vzorek A*	Vzorek B*
1	2,86	4,11
2	2,86	4,12
3	2,85	4,10
4	2,82	4,16
5	2,81	4,13
6	2,81	4,13
7	2,83	4,19
8	2,82	4,16
9	2,83	4,15
10	2,82	4,12
Průměr měření	2,83	4,14
Směrodatná odchylka	0,02	0,03
Nejistota průměru měření $u_{xp,rel}(\%)$	0,2	0,2
Vztažná hodnota referenčního materiálu	2,99	4,53
Nejistota RH $u_{ref,rel}(\%)$	0,502	0,563
Bias (%)	-5,318	-8,675
Bias významný	ano	ano

*Referenční materiál EHK firmy SEKK, cyklus RFA 2/17 (rizikové faktory aterosklerózy) o neznámé koncentraci

Z výsledků uvedených v tabulce 16 je patrné, že směrodatné odchylky měření obou vzorků nepřesahovaly 0,2. Bias byl významný u měření obou vzorků. Získané výsledky byly zahrnuty do výpočtu výsledné nejistoty.

Výpočet výsledných nejistot

Na základě výpočtu dílčích nejistot uvedených v tabulce 15 a 16 byla vyhodnocena velikost rozšířené kombinované nejistoty výsledku měření $U_{c,rel}$ pro vzorek A (5,95%) a vzorku B (8,98%). Obě hodnoty byly porovnávány s požadavky mezní nejistoty (D_{max}) uvedené v dokumentaci EHK od firmy SEKK z roku 2017, která měla hodnotu 15%. Výsledné rozšířené kombinované nejistoty jsou nižší než mezní nejistota, z čehož lze učinit závěr, že metoda stanovení LDL cholesterolu vyhovuje zamýšlenému použití.

6. DISKUSE

V období září až listopad 2017 bylo provedeno srovnání analyzátorů COBAS Integra 800 a COBAS 6000. Ke každé metodě bylo vybráno cca 40 reálných vzorků sér pacientů a každý vzorek byl změřen na obou analyzátořech. Výběr vzorků byl proveden s ohledem na co nejširší rozsah hodnot (od patologicky nízkých, přes fyziologické, po patologicky zvýšené). Pro porovnání analyzátorů bylo vybráno 8 metod, u kterých se porovnával jiný typ reagenční soupravy, či u nich byla zjištěna diference s klinickým významem nebo bez něj. Všechny metody byly po naměření na obou analytických systémech vyhodnoceny jako porovnatelné.

U všech metod byla provedena verifikace. Výsledky verifikací metod na nahrazujícím analyzátoru COBAS 6000 byly vyhodnoceny jako vyhovující.

6.1 Porovnání metod na analyzátořech COBAS Integra 800 a COBAS 6000

Vyhodnocení porovnání jednotlivých metod shrnuje tabulka 17. U každé metody lze posoudit výskyt proporcionální a konstantní diference a porovnat průměrnou diferencí s intraindividuální variabilitou.

Tabulka 17. Vyhodnocení porovnatelnosti metod

Metoda	Odlišnost	Proporcionální diference	Konstantní diference	Průměrná diference	Intraindividuální variabilita[53]
ALT	Jiná reagencie	ANO	NE	14,99	19,40
ASLO	Jiná reagencie	NE	NE	-10,87	neuveđeno
AST	Jiná reagencie	ANO	NE	3,44	12,3
CRP	Jiná reagencie	ANO	NE	10,59	42,2
HDL	Jiná reagencie	ANO	ANO	-8,05	7,3
Mg	Jiná reagencie	NE	ANO	-2,17	3,6
CK	Jiná reagencie	NE	ANO	2,53	22,8
LDL	Jiná reagencie	NE	NE	1,34	7,8

Z tabulky 17 je patrné, že u porovnávaných metod (kromě HDL) byla průměrná diference nižší než jejich intraindividuální biologická variabilita, což dokazuje

dostatečnou srovnatelnost výsledků měření na obou analytických systémech. Porovnáním metod byl splněn požadavek normy [2] na řízení kvality v laboratoři.

ALT

Metodiky pro stanovení alaninaminotransferázy v séru na analyzátoch COBAS Integra 800 a COBAS 6000 vykazovaly proporcionální diferenci zejména při hodnotách $> 0,5 \mu\text{kat/l}$. Rozdíl byl způsoben změnou reagentie s obsahem pyridoxal fosfátu. Z toho důvodu bylo nutné aktualizovat referenční meze a informovat o této změně lékaře.

ASLO

Metodiky pro stanovení antistreptolysinu-O v séru na analyzátoch COBAS Integra 800 a COBAS 6000 byly porovnatelné, jelikož nevykazovaly proporcionální ani konstantní diferenci. Rozdíl byl tedy klinicky nevýznamný a lékaře nebylo nutné o této změně informovat.

AST

Metodiky pro stanovení aspartátaminotransferázy v séru na analyzátoch COBAS Integra 800 a COBAS 6000 byly porovnatelné, i když vykazovaly mírnou proporcionální diferenci. Rozdíl byl klinicky nevýznamný, avšak na základě doporučení výrobce byly aktualizovány referenční meze. O této změně byli lékaři informováni.

CRP

Metodiky pro stanovení C-reaktivního proteinu v séru na analyzátoch COBAS Integra 800 a COBAS 6000 byly porovnatelné, i když vykazovaly mírnou proporcionální diferenci. Rozdíl byl však klinicky nevýznamný a lékaře nebylo nutné o této změně informovat.

HDL

Metodiky pro stanovení HDL cholesterolu v séru na analyzátoch COBAS Integra 800 a COBAS 6000 byly porovnatelné, i když vykazovaly mírnou proporcionální a konstantní diferenci hlavně v hodnotách nad $1,2 \text{ mmol/l}$. Tyto hodnoty odpovídaly nízkému nebo negativnímu rizikovému faktoru ICHS a z toho důvodu nebylo nutné lékaře o této změně informovat. V oblasti hodnot nižších než $1,2 \text{ mmol/l}$ jevíla metoda

HDL nízkou diferencí, a tedy dobrou porovnatelnost. Referenční meze zůstaly nezměněny vzhledem k doporučení České společnosti klinické biochemie [28].

Mg

Metodiky pro stanovení hořčíku v séru na analyzátoch COBAS Integra 800 a COBAS 6000 byly porovnatelné, i když vykazovaly mírnou konstantní diferencí. Rozdíl však byl klinicky nevýznamný a lékaře nebylo nutné o této změně informovat.

CK

Metodiky pro stanovení kreatinkinázy v séru na analyzátoch COBAS Integra 800 a COBAS 6000 byly porovnatelné, i když vykazovaly mírnou konstantní diferencí. Rozdíl byl klinicky nevýznamný, avšak na základě doporučení výrobce byly aktualizovány referenční meze. O této změně byli lékaři informováni.

LDL

Metodiky pro stanovení LDL cholesterolu v séru na analyzátoch COBAS Integra 800 a COBAS 6000 byly porovnatelné, jelikož nevykazovaly proporcionální ani konstantní diferencí. Rozdíl byl tedy klinicky nevýznamný a lékaře nebylo nutné o této změně informovat.

6.2 Verifikace metod na analyzátoru COBAS 6000

V tabulce 18 jsou uvedeny mezilehlé preciznosti jednotlivých metod s polovinou hodnoty intraindividuální biologické variability a rozšířené kombinované nejistoty jednotlivých metod s doporučenými mezními nejistotami (D_{max}).

Tabulka 18. Souhrn výsledků verifikace

Metoda	CV _{MPM} PCCCM1 (%)	CV _{MPM} PCCCM2 (%)	CV _i / 2 (%)	U _{C,rel} vz. A (%)	U _{C,rel} vz. B (%)	Mezní nejistota (%)
ALT	1,53	1,57	9,7	3,93	5,12	15
ASLO	2,09	1,56	neuvedeno	4,71	5,60	24
AST	1,42	1,08	6,15	3,63	3,29	15
CRP	1,07	1,92	21,1	7,58	9,34	24
HDL	1,24	0,95	3,65	7,36	3,43	15
Mg	1,29	0,75	1,8	3,61	2,17	15
CK	1,69	1,07	11,4	8,48	7,25	20
LDL	1,22	1,00	3,9	5,95	8,98	15

CV_{MPM} PCCCM 1,2 mezilehlá preciznost vzorku PCCCM
 CV_i intraindividuální biologická variabilita
 U_{C,rel} vz. A, B rozšířená kombinovaná nejistota výsledků měření
 Mezní nejistota odpovídá D_{max} (přijatelný rozdíl v procentech) dle EHK firmy SEKK

Z tabulky 18 je patrné, že byl u všech metod na obou hladinách variační koeficient mezilehlé preciznosti měření (CV_{MPM}) nižší než polovina intraindividuální biologické variability (CV_i) tzn. $CV_{MPM} < 0,5 * CV_i$ [1]. Byla tím ověřena dostatečná preciznost měření pro daná stanovení. Rozšířená kombinovaná nejistota výsledků měření referenčních vzorků byla u všech metod nižší, než mezní nejistota uvedená v dokumentaci k těmto vzorkům od firmy SEKK. Bylo ověřeno (verifikováno), že metody jsou vhodné pro zamýšlené použití. Zároveň tím byl splněn požadavek normy [2] na řízení kvality v laboratoři.

7. ZÁVĚR

Porovnání analyzátorů v klinické praxi biochemické laboratoře bylo nutné z několika důvodů. Jednak je to výslovně požadováno normou ČSN EN ISO 15189:2013 [2] a dále je pro laboratoř, potažmo pro lékaře, nezbytné znát odchylky měření mezi analytickým systémem původním a novým a je třeba tyto odchylky kvantifikovat. Laboratoř je též povinna dle normy [2] periodicky provádět verifikace již zavedených metod a výsledky těchto verifikací poskytnout lékařům k nahlédnutí. V požadavcích normy [2] na řízení kvality v laboratoři je i srovnatelnost výsledků vyšetření a mezilaboratorní porovnání (účast v cyklech EHK).

Na základě dat získaných v rámci diplomové práce byla prokázána možnost využití nového analyzátoru COBAS 6000 pro porovnávané metody ke stanovení alaninaminotransferázy, antistreptolysin-O, aspartátaminotransferázy, C-reaktivní proteinu, HDL-cholesterolu, hořčíku, kreatinkinázy a LDL-cholesterolu v séru. Z výše uvedených metod došlo k úpravě referenčních mezí u stanovení alaninaminotransferázy, aspartátaminotransferázy a kreatinkinázy. O této změně byly lékaři informováni.

Verifikace metod alaninaminotransferáza, antistreptolysin-O, aspartátaminotransferáza, C-reaktivní protein, HDL-cholesterol, hořčík, kreatinkináza a LDL-cholesterol na analyzátoru COBAS 6000 byla ve shodě s výslednou kombinovanou nejistotou uvedenou výrobcem referenčního materiálu. Rozšířené kombinované nejistoty referenčního materiálu zjištěné laboratoří byly nižší než mezní nejistoty uváděné výrobcem tohoto materiálu. Byla prokázána vhodnost metod pro zamýšlené použití.

8. SEZNAM ZKRATEK

ADP - adenosindifosfát

AKS – analyty krevního séra

ALT – alaninaminotransferáza

AP – angina pectoris

AST- aspartátaminotransferáza

ASO – Antistreptolysin O (používaný v anglické literatuře)

ASLO – Antistreptolysin O (používaný v české literatuře)

ATP - adenosintrifosfát

B_A – bias

b_{abs} - bias vyjádřený v jednotce měření

CI – interval spolehlivosti, confidential interval

CK – kreatinkináza

CRP – C-reaktivní protein

CV – variační koeficient

CV_i , CV_w - intraindividuální biologická variabilita

CV_G - interindividuální biologická variabilita

ČSKB – Česká společnost klinické biochemie

EDTA - ethylendiamintetraoctová kyselina

EGTA - ethylenglykoltetraoctová kyselina

EHK – externí hodnocení kvality

EMSE - N-ethyl-N-(3-methylfenyl)-N-succinylethylenediamin

G6P – glukóza-6-fosfát

HDLC4 – reagenční kazeta pro stanovení HDL, čtvrtá generace

HK - hexokináza

IFCC – International Federation of Clinical Chemistry

ICHS – ischemická choroba srdeční

IKK,IHK,VKK – vnitřní kontrola kvality

IM – infarkt myokardu

ISE – iontově selektivní elektroda

KVO – kardiovaskulární onemocnění

LDL – low-density lipoprotein, lipoprotein o nízké hustotě

MPM – mezilehlá preciznost měření

RFA – rizikové faktory aterosklerózy

SD – směrodatná odchylka

TAG – triacylglycerol

TEA – total error allowable (celková povolená chyba)

TMU – target measurement uncertainty (cílová nejistota měření)

u_c – kombinovaná nejistota

U_c – rozšířená kombinovaná nejistota

$u_{ref,abs}$ - standardní nejistota hodnoty vzorku o známé koncentraci

$u_{xp,abs}$ - standardní nejistota průměru výsledků měření vzorku o známé koncentraci

WHO – World Health Organisation, Světová zdravotnická organizace

9. PŘÍLOHY

Příloha 1. Vzor verifikačního protokolu laboratoře AeskuLab Hradec Králové

AeskuLab
Hradec Králové

VERIFIKAČNÍ PROTOKOL

F-005
verze: 10.02.2017

Metoda:
Jednotky:
Provedl:
Datum zpracování:

Analyzátor:
Název soupravy:
Výrobce:
Katalogové číslo:

Stanovení mezilehlé preciznosti měření

Název materiálu:
Šarže materiálu:
Datum měření (od - do):

Stanovení opakovatelnosti metody

Název materiálu - vzorek A:
Název materiálu - vzorek B:
Datum měření:

	Vzorek A	Vzorek B
Počet měření (n)		
Průměr měření		
Směrodatná odchylka		
CV _{MPM} (%)		
CV _{výrobce} (%)		
Srovnání CV _{MPM} a CV _{výr.}		

Poř. č. měření	Vzorek A	Vzorek B
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
Počet měření (n)	0	0
Průměr měření	#####	#####
Směrodatná odchylka	#####	#####
CV _{opak} (%)	#####	#####
Cílová hodnota (ref.materiálu)		
Nejistota RH u _{ref,rel}	#####	#####
BIAS (%)	#####	#####
Je BIAS významný?	s není určen	s není určen

Komentář v případě, že CV_{MPM} > CV_{výrobce}:

Výpočet výsledných nejistot	U _{C,rel} ¹	u _{C,rel} ²	Výsledek se pohybuje v intervalu ³	Mezní nejistota ⁴	Verifikace
Vzorek A	0,00	0,00		12	Vyhovuje
Vzorek B	0,00	0,00			Vyhovuje

¹ rozšířená kombinovaná nejistota U_{C,rel} (%)

³ při 95% intervalu spolehlivosti

² kombinovaná nejistota u_{C,rel} (%)

⁴ mezní nejistota odpovídá D_{max} SEKK z aktuálního roku (%)

Závěr verifikace:

Velikost kombinované nejistoty u_{C,rel} je vyhovující vzhledem k požadavkům D_{max} SEKK z roku 2017 a slouží pro potřeby klinických žadatelů. Metoda je vhodná ke klinickému použití. Velikost rozšířené kombinované nejistoty U_{C,rel} slouží pro účely hodnocení v EHK.

Příloha: Výpočet nejistoty - výstup z SW Kalkulačka nejistot v elektronické podobě uložena na PC.
Zpracoval:
Platnost do:

Výpočet nejistoty metody byl proveden za využití SW Kalkulačka nejistot (viz www.sekk.cz). Výpočet vychází z doporučení odborné společnosti: Doporučení k výpočtu nejistot kvantitativních výsledků měření v klinických laboratořích, ze dne 11.11.2014.

10. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] **Bartoš, V. et al.**, Příručka k vnitřní kontrole kvality, in: L., Š. (Ed.), Česká společnost klinické biochemie, Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, Praha 2008, p. 108.
- [2] **ÚNMZ**, ČSN EN ISO 15189:2013 Zdravotnické laboratoře - Požadavky na kvalitu a způsobilost, in: Úřad pro technickou normalizaci, m. a. s. z. (Ed.) 2013.
- [3] **Koolman, J. Röhm, K-H**, Barevný atlas biochemie, Překlad 4. vydání, GRADA Publishing 2012.
- [4] **Štern, P.**, Současné možnosti turbidimetrie a nefelometrie, *Klinická biochemie a metabolismus* (2006), 14, 146-151.
- [5] **Gottwaldová, J.**, Katedra laboratorních metod LF Masarykovy Univerzity Brno 2014.
- [6] webová stránka <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd/hypertext/JVABU.htm> (navštíveno dne 15.06.2018)
- [7] **Cibiček, N. Vacek, J. a kol.**, Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2014.
- [8] **Friedecký, B. Kratochvíla, J.**, Analytická část laboratorního vyšetření - online kurz www.ceva-edu.cz (navštíveno dne 10.07.2018), CEVA Education 2018.
- [9] **Nold, M. Schütz, H.**, COBAS Integra 800 Configuration guide, (2000), 57.
- [10] **ROCHE**, cobas® 6000 analyzer series The success story continues, (2013).
- [11] **Racek, J. et al.**, *Klinická biochemie; druhé přepracované vydání*, Galén 2006.
- [12] **Champe, P. C. Ferrier, D. R. Harvey, R. A.**, *Biochemistry 3rd Edition*, 2004.
- [13] **ROCHE**, Příbalový leták ALTLP; 2017-01, V 13.0 Česky; https://pim-eservices.roche.com/eLD_SF/cz/cs/Documents/GetDocument?documentId=093a1334-efd7-e611-83a7-00215a9b3428 (navštíveno 3.3.2018), (2017).
- [14] **Masopust, J.**, Požadování a hodnocení biochemických vyšetření, Karolinum 1998.
- [15] **Xing-Jiu, H. Yang-Kyu, Ch. Hyung-Soon, I. et al.**, Aspartate Aminotransferase (AST/GOT) and Alanine Aminotransferase (ALT/GPT) Detection Techniques, *Sensors* (2006), 6, 756-782.
- [16] FONS Laboratorní příručka, <https://www.katalogfons.cz/Produkty/1BB7CA4D-8944-446A-A6DB-0DD2804B318D> (navštíveno dne 1.3.2018)
- [17] **Pavelka, J. Horník, P. Mikolášek, P. Homola, L. Krbková, L.**, Běžné streptokokové infekce - mýty a omyly, *Pediatric pro praxi* (2011), 12, 414-415.
- [18] **ROCHE**, Příbalový leták ASLOT; 2015-10, V 10.0 Česky; https://pim-eservices.roche.com/eLD_SF/cz/cs/Documents/GetDocument?documentId=32f6c9e2-fb2a-e511-9e94-00215a9b3424 (navštíveno 28.2.2018), (2015).
- [19] **Zima, T. a kol.**, Laboratorní diagnostika, první vydání, Galén 2002.
- [20] **ROCHE**, Příbalový leták ASTLP; 2016-09, V 14.0 Česky; https://pim-eservices.roche.com/eLD_SF/cz/cs/Documents/GetDocument?documentId=c1279aa9-7676-e611-4aad-00215a9b3428 (navštíveno 3.3.2018), (2016).
- [21] **WHO**, C-reactive protein concentrations as a marker of inflammation or infection for interpreting biomarkers of micronutrient status, *Vitamin and Mineral Nutrition Information System (VMNIS)* (2014).
- [22] **Polák, P. Matějovská-Kubešová, H.**, Co je C-reaktivní protein a jak správně interpretovat jeho zvýšené hodnoty?, *Interní medicína pro praxi* (2016), 2016/18, 49-51.
- [23] **Růžková, R.**, Cílená antibiotická terapie - Zkušenosti se stanovením kvantitativního CRP vyšetření u pacientů s horečkou, *Medicína pro praxi* (2006), 4/2006, 191-193.
- [24] **ROCHE**, Příbalový leták CRPL3; 2017-01, V 9.0 Česky ; https://pim-eservices.roche.com/eLD_SF/cz/cs/Documents/GetDocument?documentId=4e17bc5b-a1d2-e611-83a7-00215a9b3428 (navštíveno 28.3.2018), (2017).

- [25] **ROCHE**, Příbalový leták HDLC4; 2017-07, V 2.0 Česky; https://pim-eservices.roche.com/eLD_SF/cz/cs/Documents/GetDocument?documentId=09aa87c8-906d-e711-4484-00215a9b3428 (navštíveno 28.2.2018), (2017).
- [26] webová stránka https://www.zadani-seminarky.cz/preview/1/02/8be99c9021096d2f240b/005519_3.jpg (navštíveno dne 20.6.2018)
- [27] **Novotný, D.**, HDL: funkce, dysfunkce a laboratorní metody stanovení, *Klinická biochemie a metabolismus* (2013), 21, 122-128.
- [28] **ČSKB ČLS JEP, ČSPA ČLS JEP**, Společné doporučení České společnosti klinické biochemie ČLS JEP a České společnosti pro aterosklerózu ČLS JEP ke sjednocení hodnoticích mezí krevních lipidů a lipoproteinů pro dospělé populaci *Klinická biochemie a metabolismus* (2010), 1/2010, 45-46.
- [29] **Nessar, A.**, Clinical biochemistry second edition, OXFORD 2017.
- [30] **Nejedlý, B.**, Vnitřní prostředí, klinická biochemie a praxe, AVICENUM 1974.
- [31] **ROCHE**, Příbalový leták MG2; 2015-07, V 5.0 Česky; https://pim-eservices.roche.com/eLD_SF/cz/cs/Documents/GetDocument?documentId=074d4bbc-6c2c-e511-9e94-00215a9b3424 (navštíveno 28.2.2018), (2015).
- [32] **Brody, T.**, Nutritional biochemistry second edition, Academic press, Berkeley 1999.
- [33] **Walker, H. K. Hall, W.D. Hurst, J.W.**, Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. 3rd edition, Butterworths 1990.
- [34] **Voháňka, S.**, Zvýšená hladina kreatinkinázy, *Interní medicína pro praxi* (2012), 2012/14, 322-326.
- [35] **Neumann, G. Pfützner, A. Hottenrott, K.**, Trénink pod kontrolou, Grada Publishing a.s. 2005.
- [36] **ROCHE**, Příbalový leták CK; 2017-05, V 1.0 Česky ; https://pim-eservices.roche.com/eLD_SF/cz/cs/Documents/GetDocument?documentId=7c4406b4-3f17-e611-669d-00215a9b3428 (navštíveno 28.2.2018), (2017).
- [37] **ROCHE**, Příbalový leták LDLC3; 2017-09, V 3.0 Česky ; https://pim-eservices.roche.com/eLD_SF/cz/cs/Documents/GetDocument?documentId=5508c176-735d-e711-4484-00215a9b3428 (navštíveno 28.2.2018), (2017).
- [38] **Vrablík, M.**, Endoteliální dysfunkce – první stadium aterosklerózy, *Medicína pro praxi* (2011), 3/2011, 119-122.
- [39] webová stránka, <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/AJELJ.htm> (navštíveno dne 20.6.2018)
- [40] **Novotný, D. Budina, M. Friedecký, B. Kratochvíla, J. Schneiderka, P.**, Friedewaldův vztah a LDL cholesterol – studie dat z externího hodnocení kvality, *Klinická biochemie a metabolismus* (2005), 3/2005, 151-154.
- [41] **Giavarina, D.**, Understanding Bland Altman analysis, *Biochemia Medica* (2015), 25(2), 141–151.
- [42] **Bilić-Zulle, L.**, Comparison of methods: Passing and Bablok regression, *Biochemia Medica* (2011), 21(1), 49-52.
- [43] **Passing, H. Bablok, A.**, A New Biometrical Procedure for Testing the Equality of Measurements from Two Different Analytical Methods, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (1983), 21, 709-720.
- [44] **Friedecký, B. Šprongl, L. Kratochvíla, J. Plzák, Z.**, Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích, *Klinická biochemie a metabolismus* (2011), 1/2011, 36-44.
- [45] **Ambrožová, J.**, Poznámky k provádění verifikace preciznosti analytické metody, *Klinická biochemie a metabolismus* (2012), 4/2012, 231-237.
- [46] Doporučení výboru ČSKB - Validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích, webová stránka <http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni--validace-a-verifikace-metod> (navštíveno dne 4.7.2018)

- [47] Doporučení k výpočtu nejistot kvantitativních výsledků měření v klinických laboratořích, webová stránka http://www.sekk.cz/infoservis/2014_nejistoty_doporuceni.pdf (navštíveno dne 4.2.2018)
- [48] **Suchánek, M. Friedecký, B. Kratochvíla, J. Budina, M. Bartoš, V.**, Doporučení pro určení odhadů nejistot výsledků měření/klinických testů v klinických laboratořích, *Klinická biochemie a metabolismus* (2006), 1/2006, 43-53.
- [49] **Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM)**, International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (*VIM*), JCGM 2008.
- [50] **Racek, J. et al.**, *Klinická biochemie*; druhé, přepracované vydání, Galén 2006.
- [51] Metrologická terminologie, SEKK s.r.o.,
<http://www.sekk.cz/terminologie/Text/Terminologie.htm> (navštíveno 05.03.2018)
- [52] **Ambrožová, J. Kratochvíla, J.**, Preciznost a bias metod měření dle EP15-A3, *Klinická biochemie a metabolismus* (2016), 4/2016, 183-190.
- [53] webová stránka <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm#1> (navštíveno dne 15.11.2017)
- [54] Doporučení o vnitřní kontrole kvality, webová stránka
<http://www.cskb.cz/res/file/dokumenty/vnitri-kontrola-kvality.pdf> (navštíveno dne 20.6.2018)
- [55] Doporučení č.1 k systému externího hodnocení kvality (dále jen EHK, webová stránka
<http://www.cskb.cz/res/file/dokumenty/system-externiho-hodnoceni-kvality.pdf> (navštíveno dne 25.6.2018)