

## **jakost v klinické analýze její kontrola a řízení**

III.

„fatální“ význam klinické medicíny  
aplikace norem ISO řady 9000

### **jakost**

**charakteristické a žádané vlastnosti nebo rysy výrobku či služby**

**jakost je nepřímo úměrná variabilitě výrobku nebo služby**

: variabilita – odchylka od návrhu/záměru

**prověření všech etap** celého stanovení analytu

: od odběru vzorku až po výpočet; výcvik analytika, příprava činidel, mytí nádobí, nakládání s odpadem *atd.*

**výsledkem je návrh** na jejich správné **provádění** a vytvořit **podmínky** pro provoz s minimálními odchylkami od předepsaného postupu, včetně **kontrolního mechanismu**

68

**definice dle ČSN ISO 8402** (nahrazena normou ČSN EN ISO 9000)

#### **jakost** (*quality*)

celkový souhrn vlastností a znaků výrobku (např. analytické soupravy) nebo služby (např. provádění analýz), které zaručují schopnost uspokojovat předem stanovené nebo předpokládané potřeby

#### **koncepce jakosti** (*quality policy*)

celkové záměry a směry působení organizace v oblasti jakosti formulované vrcholovým vedením (např. vedoucím laboratoře)

#### **řízení jakosti** (*quality management*)

součást funkce celkového řízení, která určuje a realizuje koncepci jakosti

#### **systém jakosti** (*quality system*)

organizační struktura, zodpovědnosti, postupy, procesy a zdroje potřebné na realizaci řízení jakosti; požadavkem je, aby veškeré postupy byly jasné, řádně dokumentované a dodržované; systém jakosti je pravidelně kontrolován a doplňován; všichni pracovníci se aktivně zúčastňují zavádění a provozování systému jakosti

69

## příručka jakosti

řízení jakosti v laboratoři – **příručka jakosti**  
: je v každé certifikované či akreditované laboratoři



**komplexní dokument** zahrnující všechny aspekty **činnosti laboratoře**, od činnosti **vrcholového managementu** až po **úklid laboratoří**

„**domácí norma**“ – převod obecných norem ISO 9000 resp. EN 45000 správné laboratorní praxe (GLP), bezpečnostních předpisů, zákonů a nařízení *aj.* na konkrétní podmínky laboratoře

### celková koncepce jakosti

70

- 1) laboratoř a její povinnosti** – jméno laboratoře, adresa, fax, e-mail, tel. čísla, jméno zodpovědného vedoucího
- 2) pracovní doba laboratoře** – způsob a doby příjmu vzorků
- 3) seznam zajišťovaných služeb** – (včetně analytů)
- 4) komunikace mezi laboratoří a uživateli** – popis žádanek, popis nálezového formuláře, pravidla pro předávání výsledků telefonicky, způsob, pro opravy či doplnění předaných analytických nálezů, dobu potřebnou k provedení analýz, včetně způsobu kontroly jejího dodržování
- 5) odběry vzorků (doba)** – instrukce pro pacienta, doprava vzorků, úprava až po přípravu zkušební vzorku a skladování včetně expirační doby; zajištění jednoznačné identifikace pacienta; způsoby vyřazení nevyhovujících vzorků; směrnice pro předávání dílčích vzorků do různých sekcí laboratoře
- 6) provádění analýz** – psané návody pro užívané analytické postupy; dohledatelnost každého stanovení od žádanky až po laboratorní nález; kalibrace včetně návaznosti na metrologicky vyšší etalony
- 7) interpretace výsledků** – údaje o možnostech konzultace pracovníků laboratoře, určené kontaktní osoby

71

- 8) účast na klinických poradách, setkání s externími lékaři
- 9) výchova pracovníků laboratoře, kliniků, sester a studentů
- 10) informování o změnách v provozu, o akreditaci či certifikaci
- 11) účast na vývoji a výzkumu – koncepci účasti laboratoře na výzkumu a vývoji; systém kontroly a jména příslušných odpovědných pracovníků
- 12) způsoby zajištění povinné mlčenlivosti
- 13) počty pracovníků v jednotlivých kategoriích
- 14) údaje o vybavení laboratoře – názvy přístrojů, výrobci, rok nákupu, cena, údaje o záruce, umístění přístrojů, údaje o servisních prohlídkách, o opravách, provozní deník přístroje a jeho uložení; o kalibraci
- 15) bezpečnostní pravidla laboratoře a nemocnice – uložení příslušných směrnic; záznamy o nehodách a úrazech

**jakost není stav, ale dynamický, vylepšující se proces**

72

### kalibrační, kontrolní a referenční materiály

**chybná analýza** ⇒ špatné rozhodnutí ⇒ poškození zdraví nebo smrt  
**měřící proces** – k měřenému signálu přiřadit jeho odpovídající koncentrace pomocí kalibračních materiálů (standardů)

**kontrolně-regulační proces** – validace výsledku analýzy a zahrnutí do řízení jakosti; sledování analýzy v delším časovém intervalu  
 : vyžaduje vhodné kontrolní a referenční materiály

#### 50. – 70. léta XX. století

analýzy **manuální** (fotometricky, titračně *apod.*) nebo poloautomatické (nalévací/odsávací kyvety)

: objem vzorku 20 – 500 µl, objem činidel 1 – 5 ml

: **vodné roztoky** připravené z čistého analytu

#### dnes

**automatické** analyzátory

: objem vzorku v mikrolitrech, objem činidla v desítkách mikrolitrů

: *viskozita* ⇒ *potíže*; kalibrační roztoky bez biologické matrice nesplňují

:: požadavek shody s analyzovaným vzorkem

:: místo vodných roztoků **kalibrátory s bílkovinnou maticí**

: **certifikované referenční materiály**

73

## **vodné kalibrační roztoky a standardy**

*IFCC – všude, kde je to možné – kalibrace pomocí vodných roztoků standardů*

**stabilizování a ochrana** (oxidace, bakteriální kontaminace *apod.*)

**užití:** atestace enzymů, ověřování výtěžnosti analytické metody, kontrola vlnových délek fotometrů *apod.*

**příprava:** vážením; vysoce čisté chemikálie, redestilovaná voda

**uchování:** skleněné ampule nebo dobře těsnících lahvíček  
: pod inertní atmosférou N<sub>2</sub> nebo CO<sub>2</sub>

**pomocné látky:** albumin, polysacharidy, cukry, glycerol (stabilizace enzymů), cystein, dithiothreitol, kyselina askorbová (ochrana před oxidací), komplexany, (např. EDTA, maskování těžkých kovů katalyzujících oxidaci), různé pufrы a produkty enzymové hydrolýzy substrátů (zvýšení stability enzymů) a konzervační přísady (benzoan sodný, azid sodný *apod.*)

nesmějí obsahovat jako příměs/nečistotu uvažovaný standard  
(jen stopové a definované množství)

74

## **kontrolní séra a moče**

*k operativnímu řízení jakosti (k tzv. vnitřní kontrole kvality)*

**kapalná** – zmrazená (– 80 °C)

: původně séra zvířecí: koňská (*equine*), hovězí (*bovine*), prasečí (*porcine*)  
: nahrazována séry lidského původu

**lyofilizovaná** – stabilnější

: připravována v nejméně dvou koncentracích pokrývajících jak referenční interval analytů, tak i patologické hodnoty

**séra s atestem** – určení správnosti v delším časovém intervalu

**séra bez atestu** – určení shodnosti (reprodukovatelnosti)

**parametry:** pH 7 až 8, rozdíl obsahu ve stejné šarži < 0.1 %, volný glycerol < 0.2 %, mají být sterilní, zbytková vlhkost < 1 %, stabilita v chladu 3 roky, rozdíl obsahu labilních složek < 4 %, zákal po rekonstituci a zředění vodou 1:9 měřený květě 1 cm jako absorbance při 700 nm pod 0.05 a při 340 nm pod 0.2

75

## **sérové kalibrátory**

*podobné složení a chování jako analyzovaný vzorek*

**příprava:** jako kontrolní séra; koncentrace analytů se upravuje přidáním

**lyofilizáty** – stabilita

**komutabilita** s určenými metodami

**příprava a atestace:** jako u kontrolních sér

**obsah** jednotlivých **analytů** stanoven definitivními  
či **referenčními metodami** certifikovanými referenčními materiály

přípravky pro **normální** a **patologické** hodnoty analytů

**multikalibrační** přípravky

76

## **certifikované referenční materiály (CRM)**

: kalibrace definitivních a referenčních metod

: testování/porovnávání rutinních metod (**komutabilita**)

**RM** – materiál nebo látka, hodnoty vlastností stanovenými pro kalibraci přístrojového vybavení, vyhodnocení metody měření nebo pro stanovení hodnot materiálů

**CRM** je RM doložený certifikátem

: certifikovaná metoda je doprovázena nejistotou při dané úrovni spolehlivosti

**koncentrace a matrice analytu** v CRM **stejná** jako analyzovaném **vzorku**

**vhodnost RM** pro daný účel se **prověřuje** (ISO Guide 35:2006)

**šarže** CRM musí být **homogenní**

: rozdíly mezi reprezentativním měřením vzorku musí být vždy menší než celková nejistota všech měření

**CRM** musí mít uvedenu svou **expirační lhůtu**

**CRM** – opatřen atestem

koordinace **evropskou komisí** při **evropské unii**, např. **institutem pro referenční materiály a měření** v Belgii (IRMM)

77

## validace a správná laboratorní praxe

**potvrzení** měření (zkoušením) a opatření **objektivního průkazu**, že byly **splněny** jednotlivé **požadavky** pro **určený účel**

**validovaná analytická metoda** – poskytuje medicínsky správné výsledky a využitím analytického výsledku při léčení pacienta nedojde k jeho újmě

ověření velikosti **celkové chyby** – součtu chyb náhodných a systematických

**správná laboratorní praxe** (*good laboratory praxis, GLP*)

: mezinárodně dohodnutý systém zabezpečení a kontroly jakosti

: zahrnuje organizaci zkoušek, studií a podmínek, za nichž jsou neklinické studie plánovány, prováděny, monitorovány, zaznamenávány, archivovány

78

## operativní řízení jakosti

také **vnitřní kontrola kvality (VKK)**

nástroje VKK tzv. „**báječná sedma**“:



**tabulka lodyha-list** (*stem-and-leaf display*) – kontrolní data rozepsaná tak, aby bylo možné rychle posoudit globální rozdělení dat



**list závad** (*check list*) – kalendář s uvedenými příčinami závad; řádky tvoří kalendář, do kterého se zapisuje, kdy a kolikrát se daná závada objevila



**Paretův graf** (*Pareto chart*) – histogram se sloupci vyjadřujícími četnost jednotlivých typů závad v klesajícím pořadí



**diagram příčina-následek** (*cause and effect diagram*) – grafický rozbor chyb a jejich zdrojů



**proudový diagram** (*flow chart, defect concentration diagram*) – grafické zobrazení zařízení či procesu s vyznačením citlivých bodů



**korelační diagram** (*scatter diagram*) – korelační graf k odhadu vzájemných závislostí analyzovaného problému

**regulační diagram** (*control chart*)

79

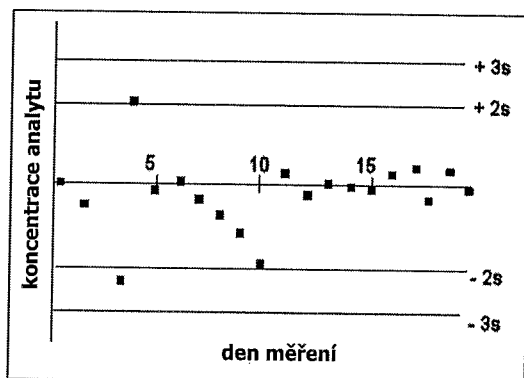
## regulační diagram

: 1931 W. A. Shewhart

: 1950 S. Levey a E. R. Jennings – klinická biochemie

## jednoduchá grafická interpretace Gaussova rozdělení

množina normálně rozdělených dat  $\Rightarrow$   
v intervalu směrodatných odchylek  
od  $-s$  do  $+s$  leží **68.3 %** údajů  
od  $-2s$  do  $+2s$  leží **95.5 %** údajů (*varovná mez*)  
od  $-3s$  do  $+3s$  leží **99.7 %** údajů (*regulační mez*)



**osa x** – čas  
**osa y** – měřený signál

: uvedený podíl údajů musí ležet  
v odpovídajících pásech na grafu

: polovina těchto údajů musí být  
střídavě nad a polovina pod osou **x**

80

**kumulace** jen na jednu stranu intervalu  $\Rightarrow$  **systematická chyba** v analytickém procesu

: mimo varovnou mez **<1x měsíčně**

: mimo regulační meze **<1x za 18 měsíců**

:: mimo varovné meze častěji

$\Rightarrow$  závady v analytickém procesu nebo proces je úplně mimo kontrolu

**odchyly**:  $\Delta$  směrodatné odchyly ( $s_x$ ) ;  $\Delta$  vychýlení (**b**)

**účinnost regulačního diagramu**

**průměrné délky série (PDS)**

:  $\emptyset$  počet bodů, kdy právě vynášený bod indikuje metodu mimo kontrolu

$$PDS = 1/p$$

kde **p** je pravděpodobnost, že libovolný bod překročí kontrolní meze

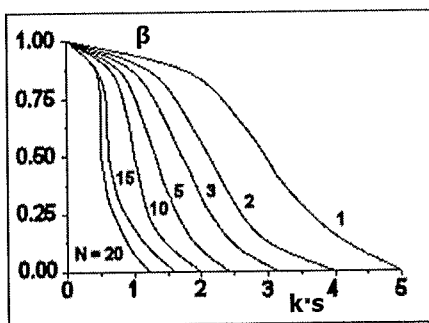
**operativní charakteristické křivky**

: závislost chyby  $\beta$ , tj. pravděpodobnosti nezjistit posun

$$\beta = \Phi(L - k\sqrt{N}) - \Phi(-L - k\sqrt{N})$$

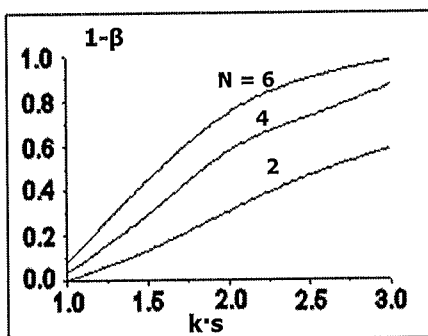
kde  $\Phi$  je Gaussova funkce, **L** je násobek  $s_x$  dle zvolené meze, **k** je faktor respektující změnu **x** v násobcích  $s_x$ , **N** je počet vzorků

81



**silofunkce**

na rozdíl od operativní charakteristické křivky  
**osa y** –  $(1-\beta)$ , tedy pravděpodobnost zamítnutí

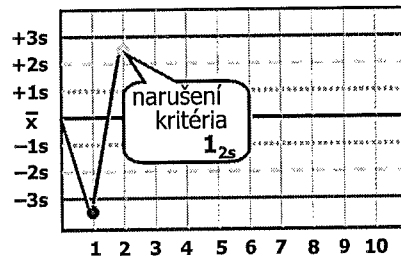
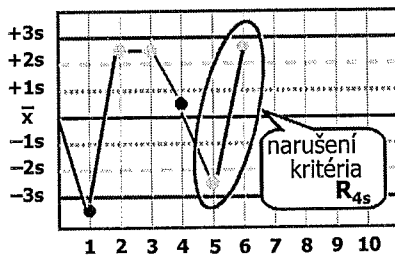


**řízení jakosti dle Westgarda  
 (Westgard QC)**

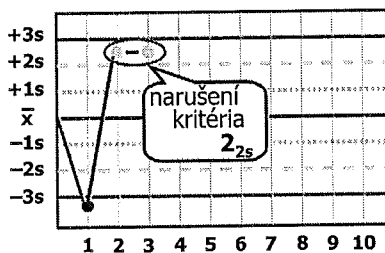
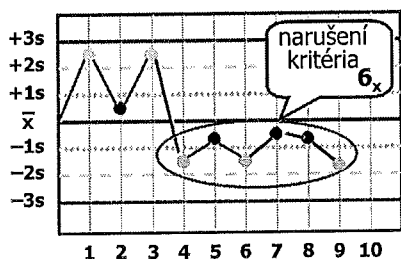
**vícekritériální řízení jakosti**

- : využívá kombinací více kritérií pro hodnocení analýz
- : 2 až 4 kontrolní měření na jeden běh analýz

- : 5 různých kritérií
- :: varovná kritéria
- :::  $1_{2s}$  – kontrola za  $\pm 2s$



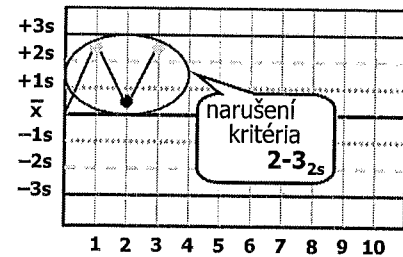
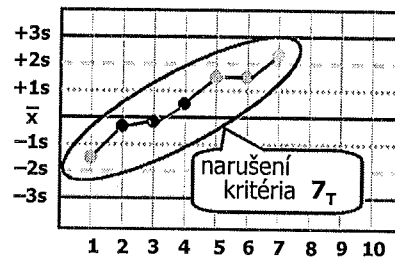
- :: hodnotící kritéria
- :::  $1_{3s}$   $2_{2s}$   $R_{4s}$   $4_{1s}$   $10_x$ , eventuálně  $8_x$  nebo  $12_x$





:: doplňková kritéria

:::  $2-3_{2s}$   $3_{1s}$   $6_{x'}$   $9_{x'}$   $7_T$



: pravděpodobnost **falešného poplachu** je *minimalizována* užitím kritéria  $1_{2s}$

: pravděpodobnost **pravého poplachu** je *maximalizována* kombinací více kritérií  
:: musí detekovat jak **nahodilé**, tak i **systematické** chyby

: použití **jednokriteriálního** místo **vícekriteriálního** řízení jakosti

:: neuvádění prostého  $1_{2s}$  (Levey-Jennings), ale alespoň  $1_{3s}$

:: risk < 90% pravděpodobnosti odhalení problému, > 5% falešných poplachů

::: takže funguje jen u velmi robustních analytických metod

84

## **system správy laboratorních informací (LIMS, laboratory information management system)**

: **centrální** softvér (laboratorní informatika)

:: sleduje **celý postup** od zadání až po odstranění vzorku

: kontrola **provedení**

: kontrola **jakosti**

: **automatizované** zpracování dat

: odstranění **chyb** způsobených **lidským faktorem**

: **autentizace** procesu (místní původ analýzy, způsob analýzy...)

: **snadné audits** akreditovaných laboratoří

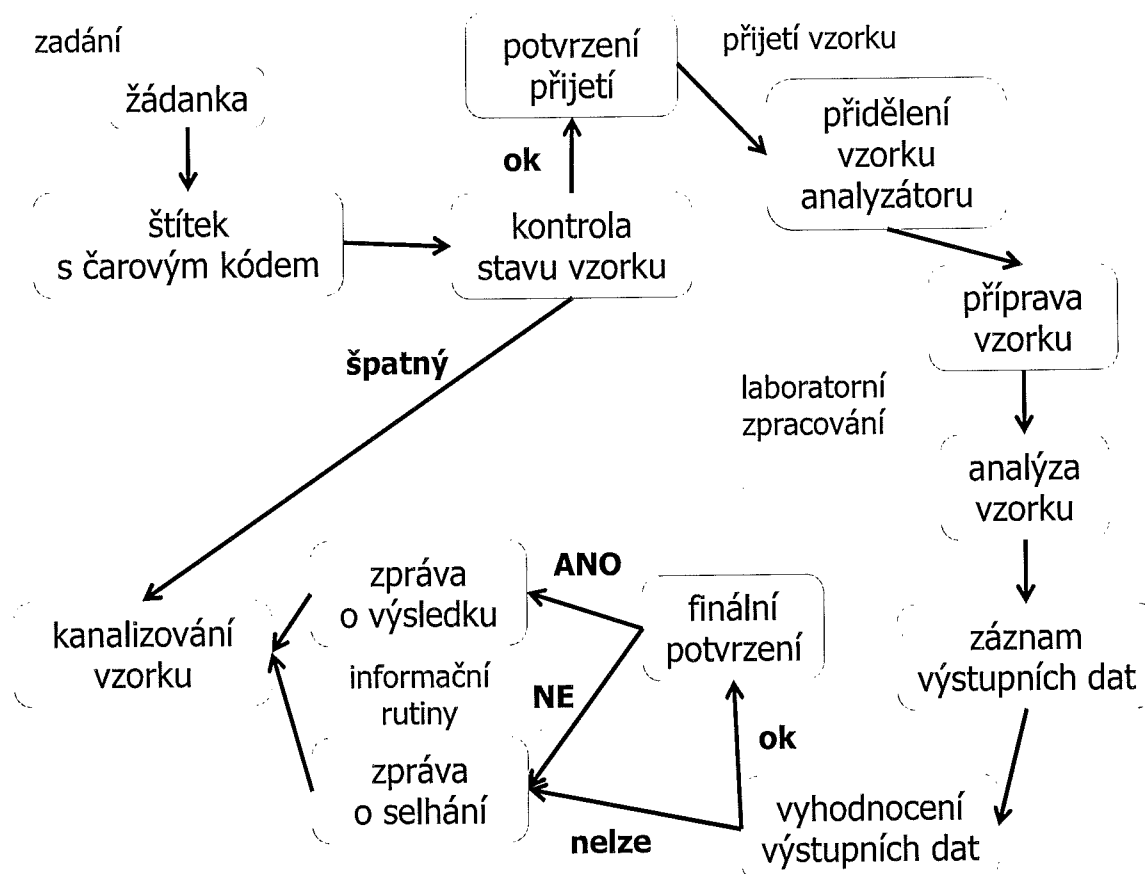
: **časově** i **finančně** náročná implementace

: neexistuje **standard**

:: mnoho **různých** dodavatelů

:: není upraven **normou**, ani **zákonem**

85



86

## mezilaboratorní posuzování jakosti

(EQA, *external quality assurance*)

součást obecného řízení jakosti každé laboratoře (cca 1x za 2 měsíce)

### : validace metod

: **sledování laboratoře** a porovnání její přesnosti vůči ostatním laboratořím nebo obecně platným požadavkům

### posuzuje se

- : vychýlení ve vztahu k současně dosahované úrovni (*state-of-the-art*), resp. vůči údajům získaným referenčními či definitivními metodami
- : dosahovaná úroveň všech zúčastněných laboratořích, a to jak podle inter-, tak i podle intra-laboratorního rozptýlení nalezených údajů
- : vztah mezi nalezenými údaji a způsobem kalibrace, analytickým postupem, užitými komerčními analytickými soupravami a použitým přístrojovým parkem
- : dosahovaná současnou úroveň v závislosti na koncentraci analytu v kontrolních materiálech

87

## mezinárodní harmonizovaný protokol pro ověřování způsobilosti (chemických) analytických laboratoří

*international harmonised protocol for proficiency testing of (chemical) analytical laboratories*

: od roku 1992

: IUPAC, ISO a AOAC (*association of official analytical chemists*)

**materiál IFCC:** základy mezilaboratorního posuzování jakosti

### přesná a protokolární organizace testu

### statistické vyhodnocení testu

**z-skóre**

$$z = \frac{(x - x_a)}{s_x}$$

kde  $s_x$  je cílová směrodatná odchylka,  $x$  je naměřená veličina,  $x_a$  dohodnutá (skutečná) hodnota veličiny a  $z$  má tvar směrodatné normální veličiny

interpretace z-skóre

$|z| \leq 1$  lze hovořit o **dobrém skóre**

$|z| \leq 2$  o skóre dostačujícím

$2 \leq |z| \leq 3$  o skóre problematickém

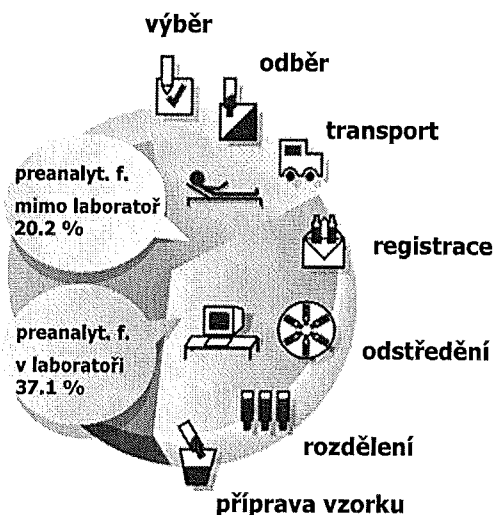
skóre  $|z| \geq 3$  skóre nedostačující

88

## význam hodnocení laboratoře

**úspěch** laboratoře v externím hodnocení kvality

její **výkony** jsou v **tolerančních limitech** akceptovaných příslušnou (mezi)-národní společností klinické chemie pro dané období



: preanalytická fáze

: analytická fáze

: postanalytická fáze

89

**řízen a kontrolován** – pouze *vlastní analytický postup*

opomíjení *preanalytické fáze* (odběr, transport a uchovávání vzorku)

chyby **preanalytické fáze** – až 50 % **X analytický proces** má asi 25 % zbytek připadá na tzv. **postanalytickou fázi**

**jednu hrubá chyba** na *cca 1600 analýz*

příprava vzorku (55 % jde na vrub jeho hemolýzy), nedostatečný objem vzorku (21 %), záměna vzorků (12 %) a koagulovaný vzorek (5 %)

**hrubá chyba** ohrožuje život ⇒ zpřísnění kontroly **preanalytické fáze**

*Kill as few patients as possible & 56 other essays on how to be the world's best doctor; Arlan Cohn, 2004*

**postanalytická fáze**

: uskladnění vzorků i výsledků

: přeměna analytických výsledků na podložené informace (smysl lab. medicíny)

: komunikace s praktikem, zpětná vazba

: metaanalýza výsledků

90

## **analytické metody výběr a optimalizace**

**IV.**

**výběr** metod/postupů je **poznámenán vývojem** oboru analytické chemie

: **kvalitativní**

: **kvantitativní**

**původně:** metody chemické

: počet stanovovaných analytů byl malý, nepřesáhl několik desítek

**od 70. let:** metody biochemické/enzymové/molekulárně biologické

: spektrofotometrie

: průmyslová výroba enzymů, analyzátory

zájmem klinické laboratoře je analytický postup

: náročnější požadavky – analytické i klinické požadavky

**vlastní nepřesnosti výsledku testu:** včetně preanalytických chyb, systematické vlivy, náhodné chyby a omyly

**biologické vlivy:** intra- a inter-individuální variabilitu, chyby způsobené nestandardním odběrem vzorků

**nejistoty:** schopnost testu skýtat správné závěry (diagnóza, prognóza, nebo terapeutická rozhodnutí)

91

### historie stanovení glukózy:

- 1) **oxidoredukční vlastnosti** v alkalickém prostředí, oxidace kyselinou pikrovou, ferrikyanidem nebo redukcí  $\text{Cu}^{1+}$ ; pracné, málo citlivé, nespecifické
- 2) ***o*-toluidinem přes Schiffovu bázi**; citlivé a specifické;  
*o*-toluidin – kancerogen, činidlo obsahuje ledovou kyselinou octovou
- 3) stanovení **enzymovými postupy** (GOD)

### charakteristické znaky analytické metody

#### definovaná a popsána analytická metoda

: charakteristické znaky, normované v mezinárodních normách ISO i v odvozených nebo převzatých národních normách

92

#### specifické klinické požadavky

#### přesnost metody ve vztahu k biologické variabilitě

**rozsah kalibrační funkce** – minimální rozsah kalibrační funkce v rozsahu referenčních hodnot analytu

**analytická metoda** – v principu funkce daného analytu v organizmu

#### ekologické a toxikologické požadavky

analýza potenciálně **infekčního** biologického materiálu

**neužívat** k analýze jedy, kancerogeny, žíraviny a hořlaviny

**nevyhnutelnost:** stanovení kreatininu kyselinou pikrovou, celkové bílkoviny biuretovou reakcí s NaOH, stanovení hemoglobinu přes hemiglobinkyanid *aj.*

93

## **vlastní znaky analytické metody**

### **znak analytické metody** (*analytical performance characteristic*)

: vlastnost z množiny vlastností, které jsou nutné pro ověření přesnosti měřicího postupu a jeho vhodnosti pro daný účel a které může být přiřazena experimentálně určitelná hodnota

definováno **IFCC** a **IUPAC**

**Česká společnost chemická** (ČSCH) – jiná nomenklatura analytických znaků

### **správnost** (*accuracy, trueness*; ČCHS pravdivost)

: těsnost shody mezi průměrnou hodnotou získanou z velké řady výsledků zkoušek a přijatou referenční hodnotou

### **přijatá referenční hodnota** (dohodnutá referenční hodnota)

: hodnota, která slouží jako schválená referenční hodnota, odvoditelná jako

- :: teoretická
- :: odsouhlasená (certifikovaná), založená na experimentálních pracích
- :: přiřazená (certifikovaná), založená na experimentální spolupráci
- :: není-li ani jedna z předchozích; očekávaná hodnota měřitelné veličiny, tj. střední hodnota specifikovaného základního souboru měření

94

### **strannost** čili **vychýlení** (*bias*, odchylka)

rozdíl mezi střední hodnotou výsledků zkoušek a přijatou referenční hodnotou

*stanovení*: pomocí CRM nebo RM

### **výtěžnost** (*recovery*)

poměrem vyjádřený rozdíl mezi údaji měřicího systému při měření vzorku se známým přidaným množstvím analytu a vzorku bez přídavku, vztažený na přidané množství

### **shodnost, preciznost** (*precision*, přesnost)

těsnost shody mezi nezávislými výsledky zkoušek získanými za předem specifikovaných podmínek

### **opakovatelnost** (*repeatability*)

shodnost stanovená za podmínek opakovatelnosti (stejná laboratoř, stejná metoda, stejné zkušební zařízení, stejný operátor, během krátkého časového intervalu)

95

**reprodukovatelnost** (*reproducibility*)

shodnost stanovení za podmínek reprodukovatelnosti (stejná metoda, různá laboratoř, různý operátor, různé zkušební zařízení, různá doba)

přesná specifikace – slouží jako základ při konstrukci regulačních diagramů

**nejistota měření** (*uncertainty of measurement*)

parametr přidružený k výsledku měření, charakterizující rozptyl hodnot, které by mohly být důvodně přisuzovány k měřené veličině

*zahrnuje mnoho složek*

**pracovní interval** (*measuring interval*)

uzavřený interval hodnot, které lze určit daným měřicím postupem; je omezený dolní a horní mezí stanovitelnosti. U fotometrických metod se vybere lineární oblast kalibrační křivky nebo lineární část grafu závislosti  $T = f(\log c)$

**linearita kalibračního vztahu** (*linearity*)

rozsah koncentrací, ve kterém je analytický signál lineární funkcí koncentrace

96

**kalibrace**

soubor úkonů, za specifikovaných podmínek se stanoví vztah mezi hodnotami měřených veličin a odpovídajícími kalibračními hodnotami (etalony)

**kalibrační funkce**  $S = f(c)$ 

**analytická citlivost** – první derivace této funkce podle koncentrace

$$\frac{dS}{dc} = \frac{df(c)}{dc}$$

**výpočet** kalibrační funkce z kalibračních údajů **regresní analýzou**

**lineární kalibrační funkce**

- : 10 koncentrací v pracovním intervalu, 3 – 4 měření jedné koncentrace
- : test na homoskedasticitu (rovnost jejich směrodatných odchylek)
- : konstrukce regresní přímky
  - :: normální regrese (homoskedasticita)
  - :: vážená regrese (heteroskedasticita)
- : test na linearitu
- : výpočet mezí spolehlivosti (toleranční interval)

97

### ***přednost lineární závislosti***

: stanovení mezí spolehlivosti, jednodušší výpočty

**mez detekce** (*limit of detection,  $L_D$ , LOD*) – souvisí s mezemi spolehlivosti

: pro použitý měřicí mechanismus platí

$$\alpha = \beta = 0.05$$

$\beta$  – pravděpodobnost falešně negativního výsledku

$\alpha$  – pravděpodobnost falešně pozitivního výsledku

**dolní mez stanovitelnosti** (*limit of quantification, LOQ*)

nejnižší výsledek měření, pro který může být udána nejistota stanovení;

IUPAC: pro LOQ nejistota (variační koeficient) = 10 %

**analytická specifita, specifita** (*analytical specificity*)

schopnost měřicího postupu stanovovat pouze tu měřenou veličinu, která má být stanovena

*vyjádření* – jako nespecifita, tj. jako efekt libovolné složky vzorku odlišné od analytu způsobující změnu indikace měřicího přístroje a tím zavádějící systematickou chybu

98

### **interference**

systematická chyba měření způsobená analytickým interferentem

analytický interferent – složka vzorku, která je současně složkou ovlivňující veličiny, která však sama není zdrojem signálu měřicího systému, ale která způsobuje přírůstek nebo pokles indikované hodnoty

**robustnost metody** (*robustness, ruggedness*)

schopnost metody skýtat přijatelné výsledky měření i v případě malých odchylek v měřicím postupu nebo ve složení vzorku

**srovnání s jinými metodami** (*comparison with other methods*)

např. rutinně laboratoří používaná metoda a její porovnání s metodou referenční (IFCC), či s metodou definitivní, pokud je k dispozici

99



### rozmývání vzorku (*carry-over*)

není znakem metody, ale jedná se o zjištění, zda nedochází k rozmývání po sobě jdoucích vzorku (vzájemné ovlivnění měření signálu nízkého vzorku po vysokém a naopak)

problém nalévacích a průtokových kyvet

### provedení:

15 analýz, 5x s vodou (absorbance  $A_1$  až  $A_5$ )

5x se vzorkem (absorbance  $A_6$  až  $A_{10}$ )

nakonec 5x s vodou (absorbance  $A_{11}$  až  $A_{15}$ )

$$A_6 - A_5 = A_{10} - A_5 = A_{10} - A_{11}$$

$$A_{15} - A_5 = 0$$

nedochází k rozmývání

**rozmývání** – numericky v % jako podíl rozmývání

$$100 \cdot (A_{10} - A_6) / (A_{10} - A_5)$$

100

## kritéria výběru analytické metody

### analýza v laboratorní medicíně

: smysl pouze k vyhodnocení zdravotního stavu pacienta

dva hlavní aspekty

**klinická užitečnost** – jaká je požadovaná jakost z lékařského hlediska

**jakost analytického stanovení** – nesprávnosti a neshodnosti, interference a specifita metody

### výběr metody podle analytických znaků

dle současného stavu (*state-of-the-art*)

volí se postupy podle právě žádoucích klinických potřeb při užití analytických metod

dle požadavků expertů či expertních skupin (*panel experts*)

: empirická zjištění expertů ve specializovaných lékařských odvětvích

: kompromisy přihlížející spíše k současně dosaženému stavu než k reálným potřebám

dle výsledků řízení jakosti

: s rostoucí jakostí analytických metod klesají náklady a pracnost kontroly

### **výběr podle požadavků kliniků**

**zkušenosti lékaře** konfrontované se **současnou úrovní postupů**

**není** možné navrhnout **univerzální požadavky** na jakost postupů

nevýhoda – mohou se lišit a není možné stanovit společná hodnotící kritéria

### **výběr založený na biologické variabilitě**

*nejpřiměřenější* klinickým i analytickým požadavkům

: intra- i interindividuální variabilita analytů je skoro konstantní (i ve stáří)

: je možný geografický i časový přenos

102

### **výběr podle klinické významnosti**

ke změnám koncentrace nebo i složení některých analytů může dojít při jakékoli změně zdravotního stavu; pro praktické využití je účelné užívat jen některé indikace změny – **potřeba definovat užitečnou indikaci změny**

#### **testy s binárními výsledky**

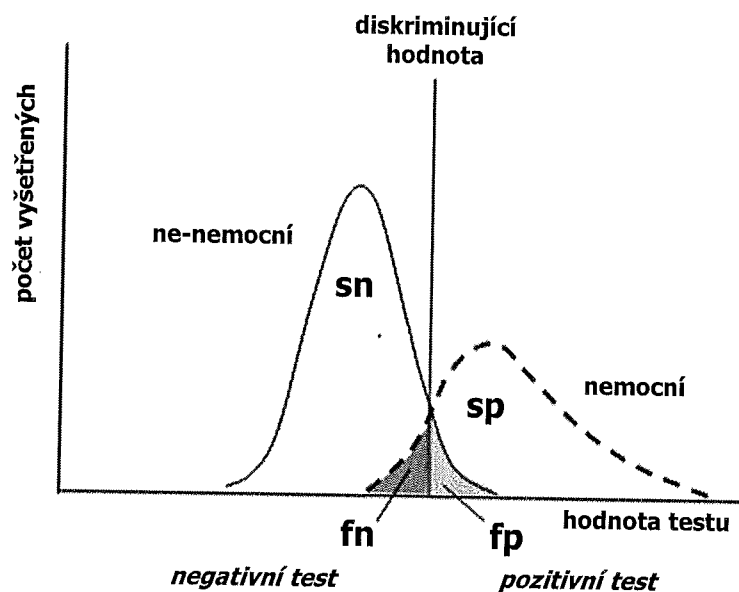
výsledky testů: pozitivní/negativní (ano/ne)

**diagnostická významnost** (kontingenční tabulka 2x2)

: řádky – výsledky nalezené u skupiny *nemocných* a u skupiny *ne-nemocných*

<b>pacient</b>	<b>pozitivní test</b>	<b>negativní test</b>	<b>suma</b>
<i>nemocný</i>	správně (sp)	falešně (fn)	$N \cdot sp + N \cdot fn$
<i>ne-nemocný</i>	falešně (fp)	správně (sn)	$N \cdot fp + N \cdot sn$
<i>suma</i>	$N \cdot sp + N \cdot fp$	$N \cdot fn + N \cdot sn$	$N \cdot (sp + fn + fp + sn)$

103



104

**senzitivita** (citlivost, DSE, *diagnostic sensitivity*)

: pravděpodobnost, že u nemocného bude nalezen pozitivní výsledek testu

$$DSE = N \cdot sp / (N \cdot sp + N \cdot fn)$$

směrodatná odchylka  $s_{DSE} = \sqrt{(DSE \cdot (1 - DSE)) / N}$

**specifita** (DSP, *diagnostic specificity*)

: pravděpodobnost, se kterou se u **ne**-nemocných získá negativní výsledek

$$DSP = N \cdot sn / (N \cdot sn + N \cdot fp)$$

směrodatná odchylka  $s_{DSP} = \sqrt{(DSP \cdot (1 - DSP)) / N}$

**ne-senzitivita** (necitlivost)

: pravděpodobnost očekávání falešně negativního výsledku u nemocného

: ne-senzitivita je doplňkový pojem k citlivosti

$$(1 + DSE) = NDSE = N \cdot fn / (N \cdot sp + N \cdot fn)$$

**ne-specifita**

: pravděpodobnost očekávání falešně pozitivního výsledku u zdravého

$$(1 + DSP) = NDSP = N \cdot fp / (N \cdot sn + N \cdot fp)$$

105

**predikce** (předpověď)

: pravděpodobnost nemoci, je-li test pozitivní (nebo test ne-nemoci negativní)

: popsáno dvěma podmíněnými pravděpodobnostmi

**hodnota pozitivní predikce** (PPV, *positive predictive value*)

$$PPV = N \cdot sp / (N \cdot sp + N \cdot fp)$$

**hodnota negativní predikce** (NPV, *negative predictive value*)

$$NPV = N \cdot sn / (N \cdot sn + N \cdot fn)$$

	<b>T</b>	<b>¬T</b>	<b>Σ</b>
<b>D</b>	94	6	100
<b>¬D</b>	5	95	100
<b>Σ</b>	99	101	200

$$DSE = 94/100 = \mathbf{0.94}$$

$$DSP = 95/100 = \mathbf{0.95}$$

$$NDSE = 6/100 = \mathbf{0.06}$$

$$NDSP = 5/100 = \mathbf{0.05}$$

$$PPV = 94/(94 + 5) = \mathbf{0.95}$$

$$NPV = 95/(95 + 6) = \mathbf{0.94}$$

106

**význam prevalence**

: pravděpodobnost nemoci v definované populaci v určitém okamžiku

**prevalence** (PRE) – podíl nemocných z počtu testovaných

$$100 \text{ D} + 100 \text{ ¬D} \Rightarrow 200 \text{ testů} \Rightarrow \text{PRE} = 0.5$$

*citlivost a specifita* se **nemění**, mění-li se počet vyšetřovaných,

**mění se predikce**

**vždy srovnávat  
jen souměřitelné  
testovací skupiny**

	<b>T</b>	<b>¬T</b>	<b>Σ</b>
<b>D</b>	470	30	500
<b>¬D</b>	475	9025	9500
<b>Σ</b>	945	9055	10000

**predikce infaktu**

$$D = 500, \text{ ¬D} = 9500 \Rightarrow \text{PRE} = 0.05$$

**populace X kardiaci**

$$DSE = 470/500 = \mathbf{0.94}$$

$$DSP = 9025/9500 = \mathbf{0.95}$$

$$PPV = 470/945 = \mathbf{0.497}$$

$$NPV = 9025/9055 = \mathbf{0.997}$$

107

## incidence

: výskytu nemoci za určitý časový interval (např. rok)

např. cukrovka

: prevalence v USA – 2.00 %, tj. cca 4 miliony občanů nemocných diabetem

: incidence v USA – 1.99 %, tj. každý rok nových 398 000 případů

## vydatnost (EFF, efficiency)

: poměr počtu všech správných výsledků k jejich celkovému počtu

$$EFF = (N \cdot sp + N \cdot sn) / (N \cdot sp + N \cdot sn + N \cdot fp + N \cdot fn)$$

## věrohodnost a poměr věrohodností

### věrohodnost (likelihood)

: pravděpodobnost je mírou pro nastoupení jevu při **dané hypotéze**

: věrohodnost je mírou pro nastoupení jevu při **různých hypotézách**

108

### poměr věrohodností (LQ, likelihood quotient, likelihood ratio)

$$LQ = DSE / (1 - DSP)$$

místo prevalence a prediktivní hodnoty: **naděje** (W, chance)

**p** (post) – naději po provedení testu

**a** (ante) – naději před provedením testu

$$W_p = LQ \cdot W_a$$

vztah mezi pravděpodobnostmi (P) a nadějemi (W)

$$W = P / (1 - P), P = W / (1 + W)$$

$$W_a = P / (1 - P) = 0.05 / (1 - 0.05) = \mathbf{0.0526}$$

$$LQ = DSE / (1 - DSP) = 0.94 / (1 - 0.95) = \mathbf{18.8}$$

$$W_p = LQ \cdot W_a = 0.0526 \cdot 18.8 = \mathbf{0.98888}$$

$$W_p / (1 + W_p) = 0.98888 / (1 + 0.98888) = \mathbf{0.497}$$

109

## definitivní metody

## klasifikace analytických metod

založené na *izotopovém zředování* (ID) a *hmotnostní spektrometrii* (ID-MS), popř. na kombinaci ID s *plynovou chromatografií* (ID-GC)

: nejsou většinou aplikovatelné do denní praxe – *složitě a pracně*

: slouží hlavně při **atestaci kalibrátorů a kontrolních přípravků**

## referenční metody

základní, důkladně prostudovaný a definovaný měřicí postup, jehož analytické znaky (nepřesnost a strannost) dovolují jeho užití k posuzování správnosti jiných měřících postupů a k charakterizaci referenčních materiálů

## doporučené metody

(dle IFCC) s popsányi logickými sledy operací, které jsou součástí postupu měření tak, jak byly definovány a doporučeny příslušnou pracovní skupinou

## rutinní metody

metody, které nepatří do některé z výše uvedených skupin

: musí být **komutabilní** s metodou referenční

komutabilní metoda – poskytuje na reprezentativním souboru nativních sér stejné výsledky jako metoda referenční

110

## optimalizace analytické metody

### **optimální podmínky analýzy**

: složení reakční směsi (druh, koncentrace složek, pH a teplota reakční směsi *apod.*)

: jednotlivé kroky a pořadí přidávání činidel

hledání optimálních reakčních podmínek – zkoumání většího počtu parametrů, zjišťuje se jejich vliv

existuje *většinou* jen **jedna určitá optimální kombinace**

### **metoda postupného měnění parametrů** (*single variable approach, SVA*)

: *relaxační metoda*

zkoumá odděleně reakční parametry; vyžaduje větší počet nezávislých měření; zkoumá odděleně i ty, které spolu mnohdy těsně souvisí (může vést k nesprávnému závěru)

### **multivariační metody** (*multivariable approach, MVA*)

zkoumá parametry komplexně; mění se současně několik parametrů; metodicky správnější

: vyžaduje **plán pokusů** (*experimental design, ED*)

111

## plány pokusů

způsob rozvržení experimentů tak, aby z co nejmenšího počtu bodů byla získána maximální informace a tedy co nejlepší popis průběhu funkce o více proměnných

### **faktorový plán**

obsahuje všechny možné kombinace vybraných faktorů

**parametry:** počet faktorů a počet úrovní každého faktoru

: *počet faktorů* ( $f$ ) odpovídá počtu vstupních proměnných (počtu složek)

: *počet úrovní* ( $L$ ) je počet hodnot každé vstupní proměnné (*např.* počet měřených koncentrací)

*počet bodů faktorového plánu* (celkový počet experimentů  $n$ )



112

## aproximativní metody a algoritmy

**optimalizace** – snaha „odhalit“ numericky funkci závislosti výstupu na optimalizovaných parametrech – **aproximace**

**black box** : algoritmy nepopisují fyzikálně chemické vlastnosti, ale „jen“ numericky zaznamenávají vztahy mezi proměnnými

**parciální metodou nejmenších čtverců** (*partial least squares, PLS*)

: MVA, hodnoty pro všechny komponenty analyzované směsi počítány současně

**kanonická korelace** (*canonical correlation, CC*)

**umělé nervové (neuronové) sítě** (*artificial neural networks, ANN*)

: nápodoba biologického systému vzájemně propojených neuronů

113

## **analytické soubory**

**funkční soubory** jednotlivých **analytických metod**

**klinicko-biochemické požadavky** lékařů

: jaterní soubor, soubor pro tukový metabolismus, soubor pro poruchy glukózové tolerance *aj.*)

*jiné důvody* – organizační, bezpečnostní, ekonomické

### **akutní (statimová) analýza**

*stanovení jednoho nebo skupiny hlavních analytů co nejdříve a non-stop*

glukóza (diabetes), kreatinin nebo močovina (ledviny), bilirubin a aminotransferáza ALT (jaterní testy), kreatinkináza a troponin (srdce),  $\alpha$ -amyláza či lipáza (slinivka), acidobazická rovnováha krve, základní toxikologické vyšetření a základní vyšetření moči

### **základní biochemické vyšetření**

*základní sledovací (screening) vyšetření analytů charakterizujících činnost hlavních tělesných orgánů a funkcí*

celkovou bílkovinu, bilirubin, kreatinin, močovinu, glukózu, cholesterol, kyselinu močovou, ALP, aminotransferázy ALT a AST, popř. GMT nebo CK

114

### **základní hematologické vyšetření**

*stanovení krevního obrazu*

hemoglobin, erytrocyty, hematokrit, leukocyty, trombocyty, retikuloocyty, osmotickou rezistenci erytrocytů, bazofilní tečkování erytrocytů *apod.*

**organizační dělení analýz do souborů**

### **imunochemická vyšetření**

*imunoelektroforéza*

sérové bílkoviny,  $\alpha$ 1-fetoprotein, imunoglobuliny A, G, M, prealbumin,  $\alpha$ 1-antitrypsin,  $\alpha$ 2-makroglobulin, transferin, ceruloplasmin, CRP, prostatický specifický antigen *aj.*

### **radioimunoanalytická vyšetření**

thyroxin, trijodtyronin, thyreotropin, luteinizační hormon, folikuly stimulujícího hormonu, prolaktin, choriogonadotropin, estradiol, progesteron *aj.*

### **vyšetření mozkomíšního moku**

*chemické stanovení analytů + různé speciální testy*

115



### **základní vyšetření moči**

*pH, dusitany, bílkovina, glukóza, bilirubin, urobilinogen, ketolátky, osmolalita, erytrocyty a hemoglobin, leukocyty, vyšetření močového sedimentu*

### **doplňkové analýzy**

morfologická analýza močového sedimentu (epitelie, válce granulované, voskové, epitelové, erytrocytární, leukocytové, žlučové, pseudoválce, spermie a mikroby (kvasinky, bakterie, trichomonady, plísňe)

### **speciální analytické soubory**

#### **analýzy na místě** (POCT, *point-of-care testing*)

alternativní názvy

: analýzy mimo laboratoř (*off-site testing*)

: analýzy u pacienta (NPT, *near patient testing*)

#### **sebekontrola pacientů** (*self-monitoring, home diagnostics*)

analýzy krve a moče s cílem kontroly aktuálního zdravotního stavu

: dávkování léčiv (diabetici, kardiaci), signál k návštěvě lékaře

116

#### **analýza u lůžka** (*bed-side monitoring*)

analýzy přímo u lůžka pacienta (mikroanalýzátory) personálem kliniky

:: sledování tzv. vnitřního prostředí pacienta: pH krve, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, ionty sodíku, draslíku, chloridy a hemoglobin nebo hematokrit

#### **sledování léčiv** (*drug monitoring*)

*kontrola hladiny těch léčiv, která jsou ve větších dávkách toxická a hrozí jejich předávkování, nebo protože mají lidé na některá léčiva individuální toleranci*

#### **speciální analyzátory**

nejčastěji monitorovanými léčivy – digoxin, fenytoin, fenobarbital, kyselina valproová, diazepam, theofylin, gentamicin, tobramicin, methotrexat, cyklosporin a dal.

#### **drogy** (*drugs of abuse*)

: semikvantitativní imunoanalýza (diagnostické proužky)

: kvantitativní instrumentální metody (HPLC, GC, MS, CZE apod.)

alkohol, amfetamin, barbiturany, benzodiazepiny, cannabinoidy, kokain, methadon, opiáty, antidepressiva, anabolické steroidy aj.

117

V.

## obsah analytu ve vzorku

## analytické výsledky způsob jejich vyjadřování

### hodnota analytického výsledku

c(glukóza) = 4.7 ± 0.1 mmol/l

: přímá diagnostická hodnota

: počet platných číslic; první platná

$$\bar{x} \pm s_x \cdot \frac{t_\alpha}{\sqrt{n}}$$

$$\bar{x} \pm K_n \cdot R$$

### hodnota diagnostického indexu

$$x = \frac{a}{b} \rightarrow \frac{s_x}{x} = \sqrt{\left(\frac{s_a}{a}\right)^2 + \left(\frac{s_b}{b}\right)^2}$$

**de Ritisův index** – poměr katalytických koncentrací AST a ALT

: porucha jater; < 0.7 dobrá prognóza, > 1 špatná prognóza

: **poměr hodnot** analytického výsledku; zákon šíření chyb!

### hodnota diagnostického testu

$$GFR = V_{\text{serum}} = \frac{C_{\text{urea}} \cdot V_{\text{urea}}}{C_{\text{serum}}}$$

**test na účinnost glomerulární filtrace** (*glomerular filtration rate*)

: současné stanovení kreatininu v séru a sbírané (24 h) moči

:: výpočet kreatininové klirens; korekce na povrch těla

118

## interpretace výsledku analýzy

**analyt** – součást vzorku, kterou stanovujeme (*kreatinin v séru a v moči*)

: stanovení s určitou přesností v závislosti na obsahu, stabilitě, metodě *apod.*

**analytická metoda/postup** – metoda stanovení analytu (*Jaffého reakce s kyselinou pikrovou v alkalickém prostředí*)

**výsledek analýzy** – hodnota ve vztahu k diagnóze (*kreatininová klirens*)

**test na určitou funkci** – testovaný stav ve vztahu k diagnóze (*glomerulární filtrace*)

**index** – diagnostické poměry obsahu analytů

srovnání **hodnoty výsledku analýzy** s **diagnostickými hodnotami**  
(referenční interval)

119

## **variabilita výsledku analýzy (AV)**

*analytická nepřesnost, analytická variabilita, variabilita analytického procesu*

### **suma všech analytických chyb**

: **preanalytická fáze** (odběry, transport, uskladnění)

+ **analytická fáze**

(dávkování, kalibrace, instrumentální chyba, náhodné chyby)

**výsledná přesnost**, resp. nepřesnost – ve **shodě s účelem analýzy**

## **model analytického měření**

souhrn všech vztahů mezi vstupními a výstupními veličinami měření

: vstupní veličiny

:: hodnoty veličin ve vzorku

:: veličiny ovlivňující měření – podmínky

:: hodnoty konstant

120

## **zdroje chyb (nejistot) měření**

: nezahrnutí všech ovlivňujících podmínek

: instrumentální vlivy

: vlivy lidského faktoru

: hodnoty veličin získané externě

## **přehled možných chyb analytického měřicího postupu**

: **náhodné** (nahodilé) chyby

:: pravděpodobnost náhodné chyby má tzv. normální rozdělení

: **systematické** (soustavné) chyby

:: chyby měřících metod

::: citlivost, dynamický rozsah, selektivita

:: chyby měřících prostředků

::: nehomogenity měřících podmínek

::: fyzikální – tepelná konvekce

::: konstrukce – umístění čidla

:: chyby obsluhy

::: únava

::: morálně-volní vlastnosti – podvody, lenost...

121

## parametry vyhodnocení nejistot analytického měřicího postupu

: normované pokyny – ČSN P ENV 13005 (014109)

:: *pokyn pro vyjádření nejistoty měření*

: **nejpravděpodobnější hodnota výsledku**

:: aritmetický průměr (při normálním rozdělení hodnot)

:: medián pro  $n \leq 3$

: **střední chyba jednoho měření**

:: výběrová směrodatná odchylka ( $s$ )

:: výběrový rozptyl – střední kvadratická chyba ( $s^2$ )

: **střední chyba aritmetického průměru ( $\bar{s}$ ,  $u_A$ )**

: **nejistota výsledku měření – limit spolehlivosti**

:: interval, ve kterém se nachází s deklarovanou mírou pravděpodobnosti skutečný výsledek měření

:: specifikuje charakter měřicí metody

:: vymezuje hranice, v nichž je výsledek s danou (určitou) pravděpodobností považován za správný, tj. přesný a pravdivý

122

## dílčí nejistoty analytického postupu v laboratorní medicíně

### nejistota typu A

: náhodné vlivy; příčiny přímo neznámy

: statistickou analýzou z vlastních měření

:: výtěžnost, systematická odchylka

$$b = \frac{X_{\text{exp}} - X_{\text{ref}}}{X_{\text{ref}}}$$

: **systematická odchylka ( $b$ )**

:: někdy *bias* nebo *vychýlení*

:: rozdíl mezi **průměrem měření ( $\bar{x}_{\text{exp}}$ )** – v sérii,  $n = 10$   
a **referenční (správnou) hodnotou ( $x_{\text{ref}}$ )**

:: někdy se spíše používá hodnota **výtěžnosti ( $r$ )**

$$r = \frac{X_{\text{exp}}}{X_{\text{ref}}}$$

: **dlouhodobá přesnost (*intermediate precision*)**

:: jinak též *reprodukovatelnost*

:: sledování přesnosti metody, regulační diagramy

::: minimum 15 záznamů ročně

::: geometrický průměr

:: jako **relativní směrodatná odchylka metody ( $s_{x,\text{rel}}$ ,  $u_{\text{rel, repro}}$ )**  
nebo **směrodatná odchylka průměru**

$$s_{x,\text{rel}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n s_{x,i}^2}{n}}$$

$$s_{x,\text{rel}} = \frac{s_x}{\bar{x}}$$

123

## nejistota typu B

- : známé vlivy; odhadnutelné příčiny
- : nelze zjistit statistickým vyhodnocením vlastních dat
- :: převzatá (certifikát, odborná literatura, dokumentace)

- : krajní chyba –  $\pm z$  ( $\Delta z$ )
- : koeficient chybového rozdělení ( $\Theta$ )
- ::  $\Theta = 3$  (normální)
- ::  $\Theta = \sqrt{3}$  (rovnoměrné)
- ::  $\Theta = \sqrt{6}$  (trojúhelníkové)

$$u_B = \frac{\Delta z}{\Theta}$$

- : je dána geometrickým součtem jednotlivých nejistot ( $u_{BE}$  – nejistota reference/etalonu,  $u_{BM}$  – n. měřidla,  $u_{BT}$  – n. vlivem teploty)

$$u_B^2 = u_{BE}^2 + u_{BM}^2 + u_{BT}^2 + \dots$$

- : relativní nejistota referenčního materiálu ( $u_{rel,ref}$ )

$$u_{rel,ref} = \frac{u_{ref}}{X_{ref}}$$

124

## celková nejistota měření ( $u_{tot}$ )

(TMU, *total measurement uncertainty*,  $TE_A$ , *total allowable analytical error*)

- : kombinovaná nejistota ( $u_k$ )

$$u_k = \sqrt{u_A^2 + u_B^2}$$

- : (standardní) kombinovaná nejistota ( $u_{rel,tot}$ )

$$u_{rel,tot} = \sqrt{u_{rel,rep}^2 + u_{rel,ref}^2 + b_{rel}^2 + u_{rel,x}^2}$$

- : rozšířená kombinovaná nejistota ( $u_{ext,tot}$ )

- : koeficient rozšíření ( $k$ )
- ::  $k = 1$  (P = 68 %)
- ::  $k = 2$  (P = 95 %)
- ::  $k = 2.58$  (P = 99 %)

$$u_{ext,tot} = k \cdot u_k$$

$$u_{ext,tot} = k \cdot u_{rel,tot}$$

125

## biologická variabilita (BV) obsahu analytu

**přirozená biologická proměnlivost** (roztyl) **obsahu** bioanalytu

: **intraindividuální** – u jednoho jedince

:: biologické faktory a jejich časový vliv

: **interindividuální** – mezi jedinci

:: rozptyl průměrných hodnot individuí určité populace

**vlivy**

: stálé – rasa, pohlaví, věk, biorytmy

: proměnné – hmotnost, dieta, léky

**BV** se vyjadřuje **relativní směrodatnou odchylkou**  $s_{x,rel}$   
(RSD, *relative standard deviation*)

: starší název je **variační koeficient** (CV, *coefficient of variation*)

$$s_{x,rel} = \frac{s_x}{\bar{x}}$$

$x$  – koncentrace analytu A,  $s_x$  – směrodatná odchylka stanovení  $x$ ,

$\bar{x}$  – průměrná hodnota  $x$

126

**intraindividuální variabilita** ( $s_I$ ;  $CV_I$ )

: ukazuje na maximální nepřesnost stanovení

: analytická metoda musí mít přesnost rovnu  $1/3 s_I$

**interindividuální variabilita** ( $s_G$ ,  $CV_G$ )

: ukazuje na maximální systematickou odchylku (vychýlení, bias) stanovení

:: systematická odchylka ( $b$ ;  $B_A$ ; správnost)

::: rozdíl mezi hodnotou očekávanou a naměřenou

**celková biologická variabilita** ( $s_{tot}$ ;  $CV_C$ )

$$s_{tot} = \sqrt{(s_I^2 + s_G^2)}$$

**cílová hodnota (TV) obsahu analytu**

(*target value*, TV)

: průměrná hodnota všech anal. výsledků po vyloučení výsledků odlehlých

: průměrná hodnota stanovená primární či referenční hodnotou

: pragmaticky nahrazuje biologicky relevantní údaj o obsahu (BV)

:: aproximace skutečné hodnoty

127

## referenční interval (RI) obsahu analytu

referenční rozmezí, mez, hranice (1929)  
dříve i tzv. normální či fyziologické hodnoty

**získávání:** analýzou vzorků osob, které se hodnotí jako zdravé

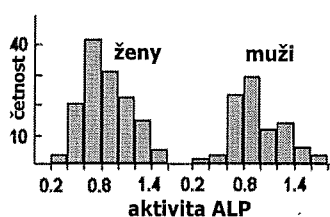
**RI** (fyziologický interval) – hodnoty laboratorního testu, mezi nimiž leží většina hodnot získaná měřením referenční populace (mezi 2.5% a 97.5% kvantilem souboru zdravých jedinců)

: soubor dostatečně početný a homogenní

:: vyloučit faktory nehomogenity

::: nemocní, léčení

::: věk, konstituce, dieta, genetické aspekty



: referenční hodnoty **referenčního jedince** – donora

: **referenční skupiny**

: **referenční populace**

128

## souvislost mezi analytickým nálezem a stavem pacienta

**zdravý** (normální) nebo má **analyt vybočující** (patologické) hodnoty

: analytický výsledek je zatížen chybami, které vyjadřujeme **nejistotami**

: referenční interval je zatížen BV, respektive TV

**požadovaná výsledná přesnost** ( $s_A$ ;  $CV_A$  allowable coefficient of variation)

: minimální požadovaná přesnost

$$s_A \leq 0.5 \cdot s_I$$

**celková chyba** (TE, total error)

: rozdíl mezi výsledkem a cílovou hodnotou

: diagnostické kritérium kvality analytické metody

::  $TE > u_{tot} \Rightarrow$  **nesprávná** klinická interpretace

$$TE = z \cdot s_x + b$$

$z = 1 - 4$ ;  $z = 1.65$  nebo  $1.96$

129

### nejdůležitější parametry

- : celková biologická variabilita ( $s_{\text{tot}}$ )
- : intraindividuální variabilita ( $s_I$ )

### akceptovatelná kvalita stanovení

$$u_{\text{tot}} \leq 1.65 \cdot \frac{s_I}{2} + 0.25 \cdot s_{\text{tot}}$$

### minimální kvalita stanovení

$$u_{\text{tot}} \leq 1.65 \cdot \frac{s_I}{2} + 0.375 \cdot s_{\text{tot}}$$

### optimální kvalita stanovení

$$u_{\text{tot}} \leq 1.65 \cdot \frac{s_I}{2} + 0.125 \cdot s_{\text{tot}}$$

### akceptovatelné vychýlení

$$b \leq 0.375 \cdot s_{\text{tot}}$$

### ideální vychýlení

$$b \leq 0.125 \cdot s_{\text{tot}}$$

130

## příklad k vyhodnocování výsledků

### stanovení obsahu glukózy

#### : dlouhodobá přesnost

:: dvě kontroly v roce

:::  $x = 5.4 \text{ mmol/l}$ ,  $s_{x,\text{rel}} = 2.3 \%$

:::  $x = 13.4 \text{ mmol/l}$ ,  $s_{x,\text{rel}} = 1.7 \%$

$$s_{x,\text{rel}} = \sqrt{\frac{2^2 + 2^2}{2}} = 2 \%$$

#### : kombinovaná nejistota reference (CRM)

:: certifikovaný obsah glukózy  $x_{\text{ref}} = 8.75 \text{ mmol/l}$

:::  $u_{\text{ref}} = 0.6 \%$

$$u_{\text{rel,ref}} = \frac{0.006}{8.75} = 0.0007 = 0.07 \%$$

131



**: systematická odchylka**

$$\therefore \bar{x}_{\text{exp}} = 8.79 \text{ mmol/l, } n = 10$$

$$\therefore x_{\text{ref}} = 8.75 \text{ mmol/l}$$

$$r = \frac{8.79}{8.75} \cdot 100 = 100.5 \%$$

výtěžnost

$$b = 100.5 - 100.0 = 0.5 \%$$

výchylka

**: střední chyba aritmetického průměru**

$$\therefore s = 0.1_{14} \text{ mmol/l}$$

$$\therefore n = 10$$

$$s = u_A = \frac{0.1}{\sqrt{10}} = 0.03 \text{ mol/l}$$

**: relativní střední chyba aritmetického průměru**

$$s_{x,\text{rel}} = \frac{s_x}{\bar{x}} \cdot 100 = \frac{0.03}{8.79} \cdot 100 = 0.3 \%$$

132

**: kombinovaná nejistota**

$$u_k = \sqrt{2.0^2 + 0.3^2 + 0.5^2 + 0.3^2} = 2.1 \%$$

**: rozšířená kombinovaná nejistota**

$$u_{\text{ext,tot}} = 2.1 \cdot 2 = 4.2 \%$$

**biologická variabilita obsahu glukózy**

$$: s_I = 6.5 \%, s_G = 7.7 \% \Rightarrow s_{\text{tot}} = 10.1 \%$$

⇒ podmínka **optimální kvality stanovení splněna**

$$u_{\text{tot}} \leq 1.65 \cdot \frac{s_I}{2} + 0.125 \cdot s_{\text{tot}}$$

$$2.1 \% \leq 6.2 \%$$

⇒ podmínka **ideální vychýlení splněna**

$$b \leq 0.125 \cdot s_{\text{tot}}$$

$$0.5 \% \leq 1.3 \%$$

133

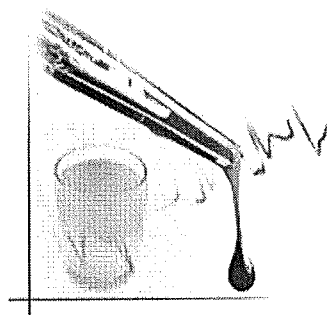
## správné čtení výsledků a jejich interpretace

**RI (glukóza)** = 3.3 – 5.6 mmol/l

$s_{\text{tot}} = 10.1 \%$ ,  $s_I = 6.5 \%$ ,  $s_x = 2 \%$

- |  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. výsledek analýzy glukózy<br>:: dnes                 | <b>4.3 ± 0.1 mmol/l</b> |
| 2. výsledek analýzy glukózy<br>:: na příští kontrole   | <b>4.7 ± 0.1 mmol/l</b> |
| 3. výsledek analýzy glukózy<br>:: na poslední kontrole | <b>3.8 ± 0.1 mmol/l</b> |

indikuje **stagnaci**



134

## normy a pokyny k vyhodnocování výsledků

- : **ČSN 01 0115**  
:: Mezinárodní slovník základních a všeobecných termínů v metrologii
- : **ČSN EN ISO 9001**  
:: Systém jakosti : Model zabezpečení jakosti při návrhu, vývoji, výrobě, instalaci a servisu
- : **ČSN EN ISO 10012-1**  
:: Metrologický certifikační systém pro měřicí zařízení
- : **ČSN EN ISO 10012-2**  
:: Směrnice pro řízení procesů měření
- : **EAL-R2**  
:: Vyjadřování nejistot při kalibracích
- : **EAL-R2-S1**  
:: Vyjadřování nejistot při kalibracích – Příklady
- : **TPM 0051-93**  
:: Stanovenie neistôt pri meraniach, 1. a 2. diel

135

## *jednotky*

**původně:** hmotnost, popř. aktivita na objem (v biologické tekutině)  
g a mg/dl, jinak též gramprocenta (g%) a miligramprocenta (mg%)

**1977:** soustava **SI**

hmotnost (g, mg) ⇒ **látkové množství** (mol)

**koncentrace** – mol/l (analyt s přesně definovanou molekulovou hmotností)

**enzymy:** koncentrace katalytické aktivity místo koncentrace enzymu

katalytická aktivita **1 katal** – množství enzymu, které rozloží **1 mol** enzymového substrátu **za 1 s** za definovaných reakčních podmínek

*koncentrace katalytické aktivity* – katalytická aktivita vztažená na objem

*obsah katalytické aktivity* – katalytická aktivita vztažená na hmotnost

mezinárodní jednotka **U** (international unit, IU) – množství enzymu, které rozloží za **1 min 1 μmol** enzymového substrátu za daných podmínek

$$1 \text{ U} = 1 \text{ μmol/min} = 16.67 \text{ nmol/s} = 16.67 \text{ nkat}$$

136

hmotnostní koncentrace enzymů/proteinů (*mass concentration*)

: stanovení v imunodiagnostice a u enzymu CK

:: koncentraci vyjadřujeme jako **mg** či **μg proteinu/l**

počet elementů v biologických tekutinách (buněk, částic, různých útvarů)

:: početní koncentrace, tj. **počet částic v litru**

močový sediment – **arbitrární početní koncentrace** (arbitrární jednotka)

: zjednodušení při vyjadřování počtu částic (elementů) na definovaný (dohodnutý) objem

po odstředění vzorku moče se zjistí počty jednotlivých elementů v zorném poli mikroskopu v odečítací komůrce s definovaným objemem (Bürkerova komůrka)

**jiné užití:** analýzy některých testů v moči (např. průkaz bílkoviny), v mozkomíšním moku, ve stolici (obsah železa) *apod.*

**IFCC** a **IUPAC:** systém zkratk pro vyjadřování analytického nálezu pro tyto typy vzorků nad rámec SI

137

