

# Zásadní příčinou systematických chyb výsledků základních analytů séra je nevhodná kalibrace

Friedecký B., Kratochvíla J.

## Problém

Systematické diference (číselně vyjadřované jako bias měření) jsou často zdrojem problémů klinické interpretace výsledků a navíc jedním z hlavních důvodů, proč jsou výsledky účastníků programů externího hodnocení kvality (EHK) hodnoceny jako neúspěšné. Výrobci/dodavatelé je často chápou jako poškození dobrého jména firmy a případně jako potenciální možnost jejich ekonomického poškození. Podle dobře známé a používané zásady, že chyby jsou vždy, nebo aspoň většinou jinde než u mne (tedy vně vlastních analytických a výrobních procesů) se příliš často za jejich příčinu označují nevhodné vlastnosti použitých kontrolních materiálů (vlivly matrice, nekomutabilita). Jako všemohoucí lék je pak požadováno speciální hodnocení výsledků EHK ve stejnorodých skupinách (peer groups). Jakmile jsou touto cestou získány úspěšné výsledky, jiné možné příčiny vlastních systematických chyb se už neřeší, a tím se umožňuje jejich přetrvávání i po dlouhou dobu. Tak postupně vzniká vědecky absurdní představa o tom, že systematické rozdíly nejsou zas až tak podstatné, nebo dokonce že jsou regulérní součástí rutinních analýz v klinických laboratořích.

To pak budí dojem, že zájmy dokumentace kvality jsou pro klinické laboratoře a výrobce prioritní a zájmy diagnostiky, klasifikace chorob a jejich terapie jsou až na dalším místě. O zájmech a benefitech pacientů se hodně (a někdy i módně) mluví, ale o zájmy klinických laboratořích a výrobců se bojuje.

## Vzorky dárců krve jako kontrolní materiály EHK

Některé programy EHK/PT používají směsi sér nebo krví pacientů jako vhodnější kontrolní materiál ve srovnání s komerčními kontrolními materiály. I v těchto případech se občas pozorují problémy s tím, že ne každý takový pool se chová při EHK srovnatelně. Je to pochopitelné. Při výrobě kvalitních komerčních kontrolních materiálů může skutečně v menším množství případů (asi v 4 až 6 %) být negativní vliv matrice pozorován,

dojde-li při výrobě daného kontrolního materiálu k jejímu nežádoucímu ovlivnění. Podobně je možné ovšem předpokládat, že k nežádoucímu ovlivnění může dojít i u vzorků pacientů ať už vlivem choroby, používaných léků a (špatně kontrolovatelného) používání lékových doplňků (známé je například velmi časté používání vitamínu C v různých formách). Zcela jasně bylo možné problém matricových vlivů směsi nativních lidských sér pozorovat u materiálů cyklu ABL (Správnost měření lipidů - Accuracy based), kdy v roce 2009 dvě metody z osmi hodnocených nebyly úspěšné vůči referenční metodě u tří ze 48 vzorků (6 %), zatímco šest ostatních vykázalo úspěšnost vysoko nad 90 %. Při stanovení HDL cholesterolu bylo „nekomutabilních“ směsí patientských sér ještě výrazně více. 38 % vzorků ze 48 celkového počtu se chovalo „nekomutabilně“ a jen dvě metody z osmi neměly žádné potíže. Do jaké míry se na tomto jevu podepsaly chyby přípravy materiálů, do jaké míry různé vlastnosti použitých metod a do třetice do jaké míry to byla vysoká heterogenita složení HDL, není jasné.

Při retrospektivním hodnocení měření albuminu a celkového proteinu v programu zkoušení způsobilosti CAP USA (1) bylo použito čtyř komerčních lyofilizovaných vzorků a jednoho poolu čerstvých nativních sér. Podle závěrů autorů byly komerční vzorky při stanovení celkového proteinu 100% komutabilní, zatímco u albuminu byly tři komerční vzorky označeny pro čtyři metody (z toho 3 pro metody BCP a 1 pro metody BCG) za nekomutabilní. Ponecháme-li zatím stranou, zda je tento fakt problémem kontrolního materiálu nebo samotné metody BCP (což je sporná otázka, na kterou není zatím principiálně odpovězeno), není nezajímavé, že i u inkriminovaných nekomutabilních vzorků bylo dosaženo v podstatě stejných (někdy i příznivějších) hodnot bias. To je ovšem zcela paradoxní závěr, jakoby úderem blesku byl nekomutabilní materiál dokonce někdy lepší, než komutabilní! Opravdu podivné!

Jaká je četnost nekomutability? Zatímco američtí autoři (2) uvádějí četnost nekomutability astronomickým číslem 41 % z použitých kontrolních vzorků, jsou jihokorejsí autoři (3) strážlivější a za v podstatě stejných podmínek zjistili 4,2 % nekomutability. Přestože se zdá být problém nekomutability vzorků zatím nejasný, je hojně využíván v podstatě hlavně k stále stejným účelům, tedy k přesunu odpovědnosti za chybu ze stran firem, jejich analytických platforem a klinických laboratořích na kontrolní materiály a tedy k co nejméně náročnému hodnocení výsledků EHK (po skupinách).

Ideální matricí, shodnou v maximálně možné dosažitelné míře jsou vzorky individuálních pacientů, dárců krve o známém, definovaném stavu zdraví. Tyto vzorky použily kolektivy z Belgie a skandinávských zemí (4,5) pro měření celkového vápníku, albuminu, celkové bílkoviny a celkového hořčíku (47 laboratoří), glukózy, kreatininu, cholesterolu, HDL, LDL, kyseliny močové, anorganických fosfátů a triacylglycerolů (67 laboratoří). Experiment se soustředil na analytické měřicí systémy Roche Cobas, Roche Modular, Beckman AU, Abbott Architect, Siemens Advia, Thermo Kone, Ortho Diagnostic Vitros. Bylo použito 20 sér individuálních dárců krve. Séra byla připravována podle doporučení CLSI C 37 A (které je považováno za standard tvorby komutabilních materiálů). Jako vztažné hodnoty k výpočtu bias byly u cholesterolu, kreatininu a glukózy použity příslušné referenční metody, u ostatních analytů pak průměry měření po vyloučení odlehklých výsledků. Za zmínku stojí, že v případě kreatininu bylo k stanovení bias použito pouze enzymatických metod.

### Výsledky

Jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2. V tabulce 1 jsou uvedeny zjištěné intervaly bias pro jednotlivé metody výše uvedených velkých výrobců, v tabulce 2 pak intervaly bias (minima a maxima), zjištěné u účastnických laboratoří. Tabulka 3 uvádí intervaly bias stejných skupin metod, zjištěná v kontrolním cyklu AKS2/14 SEKKu. K výpočtu bias (%) byly vybrány ze dvou vzorků tohoto cyklu vždy ty s hodnotami v rozmezí referenčních intervalů, nebo co nejbliž k nim (vzorek A pro celkový vápník, celkovou bílkovinu, albumin, cholesterol, glukózu a vzorek B pro anorg. fosfáty, celkový hořčík, kreatinin, kyselinu močovou a triacylglyceroly).

**Jak je zřejmé z tabulek, systematické chyby v EHK při použití vzorků individuálních dárců krve a při použití komerčních kontrolních sér v cyklu AKS2/14 byly téměř shodné.**

*Tabulka 1. Intervaly bias pro metody (kity) globálních výrobců diagnostik*

Analyt/metody/kity	Bias [%]
Celková bílkovina	-0,8 až 1,0
Albumin	-7,4 až 5,1
Celkový vápník	-2,6 až 2,1
Celkový hořčík	-1,5 až 11,0
Cholesterol	-0,6 až 4,4
Kreatinin	-5,5 až 5,1
Glukóza	-3,0 až 2,1
Fosfáty anorg.	-1,1 až 14,6

Triacylglyceroly	-2,3 až 5,8
Kyselina močová	-4,9 až 6,4
HDL-cholesterol	-8,3 až 5,7
LDL-cholesterol	-1,3 až 5,2

*Tabulka 2. Intervaly bias v laboratořích účastníků pokusu (n=67)*

Analyt/metody/kity	Bias [%]
Cholesterol	-16 až 6
Kreatinin	-9 až 11
Glukóza	-8 až 6
Fosfáty anorg.	-6 až 13
Triacylglyceroly	-15 až 13
Kyselina močová	-7 až 11
HDL-cholesterol	-20 až 8
LDL-cholesterol	-17 až 25

*Tabulka 3. Intervaly bias pro metody/kity globálních výrobců v cyklu AKS2/14 (SEKK)*

Analyt/metody/kity	Bias [%]
Celková bílkovina	-1,1 až 0,9
Albumin	-7,3 až 2
Celkový vápník	-2 až 0,9
Celkový hořčík	-0,7 až 1,5
Cholesterol	-6,4 až -0,8
Kreatinin	-2,7 až 0,9
Glukóza	-0,7 až 3,4
Fosfáty anorg.	-0,6 až 1,5
Triacylglyceroly	0,3 až 3,7
Kyselina močová	-2,9 až 3,2

### Závěry, poučení, zamýšlení

Výsledky jednoznačně a nevyvratitelně prokazují, že hlavním problémem analytické kvality při měření základních analytů séra jsou kalibrační diference mezi metodami jednotlivých výrobců. Rozdíly jak mezi metodami, tak i mezi laboratořemi jsou při použití vzorků individuálních zdravých dárců krve velmi podobné až identické s rozdíly zjišťovanými kvalitními komerčními kontrolními materiály používanými v programech EHK. Hledání příčin diferencí a neúspěchů jen u kontrolních materiálů je zavádějící a účelové. Je třeba hledat a následně odstraňovat chyby u výrobců (zejména chyby kalibrační) a klinických laboratoří. V poslední době se stalo

pravidlem považovat četnost analytických chyb za velmi nízkou (asi 10 %) ve srovnání s chybami preanalytickými a postanalytickými. **Pokud se ovšem odhaduje četnost analytických chyb z úspěšností v programech EHK, důsledně hodnotících laboratoře podle metodických skupin, je možné a pravděpodobné, že jsou uváděné hodnoty četnosti podceňované. A navíc dlouhodobě málo důsledně řešené.**

Důsledky systematických chyb mají závažné konsekvence:

- nedostatečnou srovnatelnost výsledků měření při použití různých metod,
- diference v hodnotách referenčních intervalů a diagnostických rozhodovacích limitů,
- nedostatečné zohlednění analytické kvality a odhadů nejistoty v lékařských doporučeních i v interpretacích výsledků měření.

Dnes se obecně uznává, že systematické chyby měření ovlivňují výslednou nejistotu měření významně více, než preciznost měření. Velmi kvalitní přístroje jsou často kalibrovány s menší, než žádoucí kvalitou (častá snaha výrobce o jednotnou kalibraci všech analytů na jen jeden polyfunkční kalibrátor). Hodnocení účastníků po metodických skupinách bez ohledu na stav standardizace a kvalitu kontrolního materiálu, nejasnost koncepce komutability (kdy se zdá, že mírou nekomutability je především potřeba hodnocených laboratoří a firem a ne skutečný stav kvality kontrolního materiálu), působí na snahu o adekvátní kalibraci demotivačně. Výsledky EHK nejsou jen kladnou položkou do akreditačního portfolia laboratoří a do složek PR firem, ale nenahraditelnou složkou monitorování kvality měření, metod, výroby a obsluhy. **Standardizace a kvalitní kalibrace vlastního analytického měřícího systému je při měření základních analytů séra v současnosti úkolem číslo 1. Tvářit se ale, že je v oblasti systematických diferencí/rozdlů vše v pořádku a zdroji systematických chyb jsou převážně jen použité kontrolní materiály EHK je tvářit v tvář faktům pokrytecké. Snaha v této oblasti by měla**

**být přesunuta na kooperaci, vedoucí k vyřadování a zlepšování úrovně kalibrace a standardizace.** Rázem bychom o notný kus cesty pokročili směrem k současnému trendu laboratorní medicíny (6,7).

**P. S. Notoricky známé problémy nesrovnatelnosti imunoanalytických výsledků, které občas dokážou poskytnout analytice až groteskní podobu, ponecháváme momentálně stranou. Ale ne nadobro.**

## Literatura

1. Lo FS, Greg Miller W, Doumas BT.: Laboratory performance in albumin and total protein measurement using a commutable specimen. Arch Pathol Lab Med 2013,137:912-920.
2. Greg Miller W, Jones GRD, Horowitz GL, Weykamp C.: Proficiency testing/external quality assessment: current challenges and future directions. Clin Chem 2011,57:1680-1690.
3. Kim SY, Chun S, Woochang L, Won KM.: Commutability of proficiency testing (PT): status of the matrix-related bias in general clinical chemistry. Clin Chem Lab Med 2013,51:169-173.
4. van Houcke SK, Rustad P, Stepman HCM, Kristensen GBB, Stöckl D, Roraas TH, Sandberg S, Thienpont LM.: Calcium, magnesium, albumin and total protein measurement in serum as assessed with 20 fresh-frozen single donation sera. Clin Chem 2012,58:1597-1599.
5. Stepman HCH, Tiikkainen U, Stöckl D, Vesper HW, Edwards SH, Laitinen H. Pelanti J, Thienpont LM et al.: Measurements for 8 common analytes in native sera identifies inadequate standardization among 6 routine laboratory assays. Clin Chem 2014, 60: 855-863
6. Braga F, Panteghini M. Verification of in vitro medical diagnostics (IVD) metrological traceability: Responsibilities and strategies Clin Chim Acta 2014 May 15,432:55-61
7. Greg Miller W, Tate JR, Barth MD, Jones GRD. Harmonization: the sample, the measurement, and the report. Ann Lab Med 2014,34:187-197.