

# Několik poznámek k určení biologické variability

A. Jabor, Z. Kubíček, J. Franeková

## Úvod

O biologické variabilitě bylo možné získat validní a podrobné informace v minulém čísle bulletinu FONS (1). Naše sdělení na článek RNDr. Kratochvíly volně navazuje. V tomto čísle bulletinu FONS přinášíme další zamyšlení nad významem biologické variability především pro interpretaci výsledků měření.

Biologická variabilita (biologická proměnlivost) se promítá do všech tří aspektů celkového procesu vyšetřování:

- V preanalytické fázi může být základem pro diagnostické algoritmy, především v plánování počtu odběrů u jednoho jedince s cílem lépe odhadnout homeostatický bod, kolem kterého koncentrace analytu mohou kolísat. Důslednou kontrolou preanalytické fáze obecně je v některých případech možné omezit tu část variability, která by se zbytečně mohla promítnout do celkové nejistoty výsledku.
- V analytické fázi je biologická variabilita využívána ve významném modelu určení analytických specifikací, s přihlédnutím k hierarchii modelů pro jejich určení.
- V postanalytické fázi může znalost biologické variability například sloužit jako podklad pro nastavení delta check, pro posouzení významnosti změn při opakovaných vyšetřeních u jednoho jedince nebo pro racionální používání referenčních mezí.

## Parametry související s biologickou variabilitou

Experimentální práce jsou orientovány na získání základních parametrů, kterými jsou

- Variabilita analytická (vtisknutá procesu,  $CV_A$ )
- Variabilita uvnitř subjektu (intra-individuální, within-subject variation, vyjádřená jako variační koeficient s označením  $CV_I$  nebo  $CV_W$ )
- Variabilita mezi subjekty (interindividuální, between-subject variation,  $CV_G$ )

Doporučenou terminologii lze nalézt v citaci 2. Tyto tři variability, popsané směrodatnými odchylkami, lze spojit do celkové variability:

$$S_T^2 = S_A^2 + S_I^2 + S_G^2$$

Analytická variabilita ( $CV_A$ ) sice nesouvisí přímo s biologickou variabilitou, ale je nutné ji získávat v experimentech zaměřených na získání  $CV_I$  a  $CV_G$ ; získání  $CV_A$  z jiných zdrojů nebo experimentů se nepovažuje za vhodné. Dále se v rámci experimentů týkajících se biologické variability určuje

- index individuality (II, poměr  $CV_I/ CV_G$ , případně se zahrnutím  $CV_A$  do výpočtu), a v případě nutnosti individuální referenční meze
- kritická difference nebo reference change value (RCV, určená výpočtem  $2^{1/2} \times 1,96 \times (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}$ ; tento výpočet je založen na dvoustranné pravděpodobnosti
- případně RCV počítané zvlášť pro vzestup a zvlášť pro pokles, pokud jde o analyt s negaussovským rozložením hodnot
- analytické cíle kvality (popsány například v publikaci 3)
- parametr six sigma.

## Databáze s údaji o biologické variabilitě

Získat literární údaje o parametrech biologické variability v přehledné formě bylo po řadu let možné ze stránek Jamese Westgarda [www.westgard.com/biobase1.htm](http://www.westgard.com/biobase1.htm). Tuto databázi udržoval kolektiv autorů pod vedením Carmen Ricós. Vytvoření pracovní skupiny European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) bylo zlomovým bodem jak pro nově koncipované metodologické postupy, tak pro prezentování výsledků. EFLM muselo provést několik kroků, jejichž základ byl sice racionální, ale mohly se některých aktérů dotýkat osobně. Prvním krokem bylo vynechání Caluma G. Fräsera z autorského kolektivu; přitom se ale prof. Fraser řadu let výpočty biologické variability zabýval, lze ho považovat za jednoho ze zakladatelů této koncepce v práci klinické laboratoře a koncept použití přenesl z teorie do rutinní praxe. Možnost slyšet jeho přednášky – včetně vystoupení v České republice – bylo vždy zajímavým obohacením znalostí. Druhým krokem byl pokyn EFLM k zastavení aktualizace databáze na stránkách Jamese Westgarda, kde lze nalézt tento text:

“The 2014 edition of Desirable Specifications for imprecision, inaccuracy, and total allowable error, calculated from data on within-subject and between-subject biologic variation. This database was updated and compiled by Dr. Carmen Ricos and colleagues, before the EFLM took the helm. The EFLM then instructed us to stop updating our tables. We were honored to host this database for 15 years.”

Pojem “to take the helm” znamená chopit se kormidla a jako by bylo možné identifikovat malý nádech hořkosti. Také v citované publikaci Dr. Kratochvíly

(1) lze tento aspekt vycítit. Nová databáze EFLM na stránkách <https://biologicalvariation.eu/> v současné podobě není rozhodně plně funkční, i když koncepci lze považovat za zajímavou. Není zatím jasné, jak bude běžný uživatel údaje o biologické variabilitě čerpat – získá se dokonalý přehled o stavu poznání, ale problémem může být translace do praxe.

## Proces získání odhadu biologické variability

Proces je založen na několika požadavcích

- vybrat malý počet referenčních jedinců, lze přitom posoudit validitu experimentu a sílu testu porovnáním počtu jedinců a počtu opakovaných odběrů (4)
- získat informace o stavu zdraví (dotazníky, laboratorní vyšetření)
- aplikovat vylučující kritéria tak, jako u výběru referenční zdravé populace
- zjistit kontrolovanou preanalytickou fázi (pokyny týkající se diety, pitného režimu, pohybové aktivity)
- odběry v pravidelných časových intervalech (obvykle >24 h) s minimalizací preanalytických vlivů
- zajistit stabilitu analytů během uchování
- analyzovat v replikátech (obvykle v duplikátech)
- náhodné pořadí analýz vzorků v každém běhu měření
- aplikovat postup pro vyhledávání homogeneity rozptylů, odlehlých hodnot a testování normality dat (Cochranův test, Reedův test, Fligner-Killeenův test, Shapiro-Wilkův test, Kolgorov-Smirnovův test), například podle algoritmu popsánoho Bragou (5)
- použít „nested ANOVA“ k odhadu  $CV_A$ ,  $CV_I$ ,  $CV_G$  nebo lineární smíšený model a určit vhodné parametry (6, 7, 8).

## Popis experimentu

Popis experimentu pro odhad biologické variability musí obsahovat jasnou specifikaci metodiky, přesnou specifikaci analytu, popis preanalytické fáze, principu testu, způsobu analýzy, specifikaci analytických charakteristik použitého testu a jasný popis použitých statistických postupů. Je nanejvýš vhodné, aby se pro posouzení kvality experimentu od počátku přihlíželo k požadavkům pracovní skupiny pro biologickou variabilitu Evropské federace klinické chemie a laboratorní medicíny (European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Working Group on Biological Variation). Tato pracovní skupina publikovala kontrolní list, pomocí kterého je možné hodnotit existující práce

o biologické variabilitě nebo ho použít k optimalizaci plánovaného experimentu.

## Kontrolní list

Autoři kontrolního listu (9) specifikovali 14 okruhů s hodnocením dosažení požadovaných kritérií se skórem A (optimální) až D (nevyhovující). Pokud může být sdělení o biologické variabilitě označeno jako validní, může dosahovat pouze skóre A a výjimečně B. Jednotlivé okruhy hodnocení jsou

- charakteristika analytu na škále hodnot výsledků měření (lze akceptovat pouze analyty s výsledky měření na racionální škále, tedy kontinuální číselné hodnoty)
- kvalitní popis experimentálních osob
- specifikace vzorků a podmínek jejich získání
- specifikace analytu a dostatečný popis metody měření jeho koncentrace
- přesný popis preanalytické fáze s minimalizací vlivu preanalytických faktorů
- podmínky odhadu analytické variability (přednost má zásadně stanovení z minimálně duplikátů měření v rámci experimentu)
- dosažení steady state u všech experimentálních osob během experimentu nebo zajištění přiměřené transformace dat
- hodnocení odchýlených hodnot (výsledků stanovení v replikátech, vzorků u jedinců, mezi jedinci)
- normalita dat nebo vhodná transformace dat k normalitě
- testování homogenity rozptylů
- použití statistické metody výpočtů (ANOVA nebo její ekvivalent)
- určení intervalů spolehlivosti  $CV_I$
- referování o počtu vyloučených jedinců
- prezentace zjištěných koncentrací analytu v průběhu experimentu vhodným způsobem (například graficky).

Autoři kontrolního listu při analýze publikací o biologické variabilitě zjistili, že největší problémy jsou při vyhodnocování odlehlých hodnot, odhadech analytické variability (neprovádí se měření v replikátech), není během experimentu dosažen steady state, není splněn předpoklad normální distribuce výsledků, není testována homogenita rozptylů, není možné posoudit počet vyloučených jedinců a nejsou udávány konfidenční limity zjištěných hodnot (9).

## Důsledky nového přístupu k odhadu biologické variability

Podmínky, jak je specifikuje například zmíněný kontrolní list (9), jsou poměrně přísné. Může to mít několik důsledků, z nichž některé mají pozitivní a jiné i negativní rysy:

- výsledné údaje o biologické variabilitě jsou získány pomocí standardizovaného protokolu s možností reprodukovat experimenty
- je téměř jisté, že takto získané údaje o biologické variabilitě budou v řadě případů nižší, než dosud udávala literatura
- může to dále a logicky správně zvyšovat požadavky na analytickou kvalitu (performance specifications)
- může se rozevírat vzdálenost mezi experimentálními údaji a realitou v praxi u zdravých osob
- pravděpodobně se může snižovat význam takto získaných hodnot u nemocných osob v klinické realitě a bude nutné podobné experimenty realizovat u pacientů s jasně definovaným stavem konkrétní nemoci.

Jedním z problémů, které experimenty o biologické variabilitě mohou přinést, je rozpor mezi biologií a statistikou. Podobně jako neexistuje ostrá hranice mezi stavem zdraví (navíc v konkrétním čase, zjiitelná dostupnými prostředky) a chorobou, neexistuje jediný vhodný statistický postup pro hodnocení experimentů. Je tedy možné, že různými statistickými postupy budou vylučováni různí jedinci (problém je v podstatě totožný se statistickým určováním 99. percentilu koncentrace srdečních troponinů pomocí vysoce senzitivních metod). Dále je možné, že pro některé analyty budou statistickými postupy vylučováni jedinci, jejichž variabilita je stále v rámci „biologie“, ale nikoli v rámci „matematiky“.

## Literatura

1. Kratochvíla, J.: Biologická variabilita a pracovní skupina EuBIVAS. FONS, 2019, č. 1, s. 15 – 19.
2. Simundic AM, Kackov S, Miler M, Fraser CG, Petersen PH. Terms and symbols used in studies on biological variation: the need for harmonization. *Clin Chem*. 2015;Feb;61(2):438-9. doi: 10.1373/clinchem.2014.233791.
3. Jabor, A., Franeková, J., Kubíček, Z.: Principy interpretace laboratorních testů. Roche, Praha 2013.
4. Røraas T, Petersen PH, Sandberg S. Confidence intervals and power calculations for within-person biological variation: effect of analytical imprecision, number of replicates, number of samples, and number of individuals. *Clin Chem* 2012;58:1306-1313.
5. Braga F, Panteghini M. Generation of data on within-subject biological variation in laboratory medicine: An update. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2016;53:313-325.
6. Røraas T, Støve B, Petersen PH, et al. Biological Variation: The Effect of Different Distributions on Estimated Within-Person Variation and Reference Change Values. *Clin Chem* 2016;62:725-736.
7. Røraas T. Estimating Biological Variation: Methodological and Statistical Aspects. 2017. 10.13140/RG.2.2.13446.16966.
8. Fokkema MR, Herrmann Z, Muskiet FA, et al. Reference change values for brain natriuretic peptides revisited. *Clin Chem* 2006;52:1602-1603.
9. Aarsand AK, Røraas T, Fernandez-Calle P, et al. The Biological Variation Data Critical Appraisal Checklist: A Standard for Evaluating Studies on Biological Variation. *Clin Chem* 2018;64:501-514.