

# Stagnace analytické kvality v klinické laboratoři-soubor nových informací o analytických problémech

B. Friedecký

*Laboratoř není místem pro průmyslovou výrobu, ale podléhá podobné logice a může se takovým místem rychle stát.*

(Konrad Paul Liessmann. Teorie nevzdělanosti).

## Metrologická návaznost =- srovnatelnost výsledků

Jen srovnatelné výsledky, nezávislé na použitých metodách, kitech, instrumentaci mohou být zárukou dobré úrovně jejich klinické interpretace. Jen seriózní úroveň klinické interpretace může garantovat přijatelnou úroveň rizika zdravotní péče. Pouze metrologická návaznost může být bezpečnou zárukou srovnatelnosti a přijatelné úrovně laboratorních vyšetření.

Uvádíme tři ukázky nesporného pozitivního vlivu metrologické návaznosti:

1. Klasické stanovení skandinávských referenčních intervalů experimentem NORIP 2000, kdy se použilo přísných metrologických pravidel při kalibraci měření (1). Bohužel stalo se to jen u 25 analytů, stanovovaných v klinických laboratořích.
2. Klinická enzymologie (2), která v podstatě nezná po provedeném zabezpečení metrologické návaznosti rutinních stanovení na referenční metody IFCC žádné závažné problémy. Metrologická návaznost vede k velmi dobré srovnatelnosti výsledků, nezávislých na kitech, metodách a lokalizaci laboratoří a k obecně platným referenčním intervalům.
3. Třetí přesvědčivý výsledek pozitivního vlivu návaznosti na efektivitu a bezpečnost analytických procesů pro pacienty je mezinárodní standardizace stanovení HbA1c. (3)

## Nedokonalost nebo nepřítomnost návaznosti - riziko péče o pacienty. Recentní příklady.

Není nouze o příklady, kdy nedostatek schopnosti, možnosti nebo vůle realizovat metrologickou návaznost komplikuje úroveň zdravotní péče.

V experimentech při stanovení novorozeneckého bilirubinu v letech 2003-2006 za účasti několika tisíců laboratoří byly registrovány významné signifikantní diference mezi různými metodami/kity, často přesahující někdy i 20 %. Příčiny lze hledat v nevhodných pracovních kalibrátorech výrobců. Konkrétně v nevhodném poměru konjugovaného a nekonjugovaného bilirubinu a také v matici z hovězího albuminu (4, 5). Nepříznivým důsledkem je zvýšení rizika péče o novorozence.

Stav standardizace měření thyroïdních hormonů(6, 7, 8, 9), sledující výsledky, dosažené analýzou sěr pacientů (nikoliv kontrolních materiálů) měřícími systémy největších globálních výrobců a publikovaný zcela nedávno (2010), ukazuje, že základním problémem při hodnocení srovnatelnosti jsou systematické diference mezi.

Při stanovení TSH tři systémy z 16 sledovaných vykázaly průměry, diferující od celkového průměru o více, než 10 %, pět poskytlo v Demingově regresní analýze hodnoty směrnice nad  $\pm 10$  %.

V případech stanovení celkového T4 a T3 bylo možné očekávat příznivější výsledky, protože zde je k dispozici referenční metoda na bázi kombinace kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií a s využitím izotopové diluce ID-LC/MS-MS Sledováno bylo 11 systémů pro tT4 a 12 pro tT3 největších výrobců. Ve čtyřech případech uT4 byl zjištěn bias nad 10 % (dvakrát -12 % a dvakrát +17 %).. U T3 byl bias všech skupin výsledků bez výjimky pozitivní a v šokujícím rozmezí < 10 až 32 %. Ani návaznost na referenci nezajistí srovnatelnost, pokud není respektována a kvalitně realizována.

Při testování volných frakcí fT4 a fT3 byla k dispozici rovněž reference v podobě metody. ED-ID-MS (equilibrium dialysis-isotropic dilution-mass spectrometry) a testováno 15 imunosystémů fT4 a 13 fT od 9 největších výrobců. Přes existenci referenční metody byly zjištěny systematické diference v neuvěřitelném rozmezí -42 % až +22 %.

Je nejasné (9), z čeho vznikají tak veliké systematické chyby i v případech, že existuje dobře ustanovená referenční metoda. Snad tím, že ustanovování hodnot v kalibrátorech nemají producenti pod kontrolou? Berou vůbec ohled na existující referenční metody a materiály? V každém případě kooperace výrobců s uživateli a mezi sebou není na potřebné úrovni a riziko diagnostických a terapeutických procesů značné.

## Definice analytu a specifičnost měření-limity imunoanalýzy?

Problémy se špatnou definicí (respektive nedokonalou znalostí struktury analytů a toho, co vlastně

měříme) jsou patrně klíčovým problémem laboratorní medicíny. Špatně definovaný analyt nemůže být dobře připravený formou referenčního materiálu a kalibrátoru. Lze demonstrovat nedávno publikovanými pracemi o stanovení hCG a klinicky velmi atraktivního vitamínu D (10, 11)

U hCG je obrovským problémem velká nejistota o znalostech nadměrně heterogenní struktury předmětu měření. Kalibrátory WHO, které tvoří základ návaznosti měření a ze kterých se odvozují hodnoty pracovních kalibrátorů producentů jsou připravovány přidáním 5 různých izoform do séra o nulové koncentraci hCG. Autoři testovali kity osmi globálních výrobců. Reprodukovatelnost stanovení jednotlivých izoform byla v rozmezí 19-46%! Recovery u jednotlivých izoform v závislosti na různých kitech se pohybovaly v rozmezí 47-121%. Závislost výsledků, dosažených různými kity byla enormní a závislá nejen na použitých protilátkách, ale i na poměru izoform v jednotlivých vzorcích pacientů. Zvláště zážející je, že přes 75% dat z dokumentací rutinních metod výrobců bylo shledáno nejasnými a konfuzními, neposkytujícími uživateli orientaci v problémech. Důsledkem jsou nepochybně značné obtíže při interpretaci výsledků u jednotlivých pacientů.

U vitamínu D plyne z výsledků <http://www.deqas.org> i z dalších programů EHK (včetně programu kostní markery SEKK) hodnota reprodukovatelnosti (uvnitř stejnohlých skupin) 15-25% a difference mezi různými metodami běžně v rozmezí 25-30%. Program DE-QAS používá jako kontrolních materiálů nativních sér pacientů. Problém z toho plynoucí je nespolehlivá znalost jak lékaři doporučovaných hodnot, tak i spolehlivě stanovených hodnot pacientů. Kde je řešení? V použití referenční metodologie LC/MS-MS, certifikovaného referenčního materiálu SRM-NIST 972 a v jasné definici předmětu měření. V nepochybné znalosti toho, co měříme. Jde o 25-hydroxyvitamin D2, 25-hydroxyvitamin D3 nebo 25-hydroxyvitamin D2+D3. Stručně řečeno, řešením je zvýšená úroveň metrologie.

### Výrobci občas poskytují nedostatečná nebo ne dost věrohodná data

Přečteme-li si nedávno do klinických laboratoří rozeslanou dokumentaci špičkového výrobce, nazvanou emfaticky „Vylepšení metody stanovení vitamínu D“, zjistíme, že i po „vylepšení“ je hodnota mezilehlé přesnosti až 15% a difference od starého kitu o 20-50%(!). Bias vůči referenční metodě je i po „vylepšení“ 8-15%. Vylepšení se nachází daleko od cíle, kterým je bias pod 5% a přesnost pod 10% (12), ale je zato dost velké na vznik velkých změn klinických závěrů při sledování pacientů.

U stanovení albuminu oznámil výrobce nedávno změnu kalibrace. Předpokládaný efekt byl specifikován snížením naměřených výsledků o -13%. Verifikace pomocí výsledků EHK by ukázala zcela jasně, že takové snížení je nonsens, protože žádné systematické difference v programech EHK nebyly již řadu let pozorovány.

Pokud by byl posuv o 13% akceptován, posunul by se dolní referenční limit z 35 g/l na cca 30 g/l, horní referenční limit ze 48 g/l na 42 g/l a zcela by se změnilý klinický parametry vyšetření. Producent však písemně oznámil (jako součást této informace), že referenční interval zůstává beze změn!

Zcela aktuální „restandardizace“ kitů pro stanovení progesteronu a prolaktinu byla doprovázena významnými hodnotami bias (progesteron cca 7-9%, prolaktin cca 13-14%), uvedenými v dokumentaci, rozeslané uživateli. Zda se mají změnit referenční intervaly bylo ponecháno na vůli a rozhodnutí jednotlivých pracovišť. V tomto případě:

- nebyla provedena klinická validace nových kitů
- nebyla splněna povinnost sdělit platné referenční intervaly, uložená výrobcům normativním předpisem IVD 98/79 EC
- výrobce přesunul svou povinnost zajistit bezpečnost pacientů na své zákazníky

Nabádat uživatele v době tvrdých úsporných opatření k případnému ustanovení nových referenčních intervalů je neuvážené. Přesouvat řádnou klinickou validaci na bedra často malých laboratoří znamená zvyšovat riziko chyb a snižovat bezpečnost pacientů. Názor Priceho a Christensona, uvedený v Plebanio publikaci (13), tvrdící, že zákazníci příliš snadno a ochotně akceptují diagnostika velkých výrobců a že požadavky na jejich výrobky jsou nedostatečné, je naprosto oprávněný. Lze pochopit obtížnost úkolu realizovat zejména v oblasti imunochemie s nedostatkem referenčních materiálů a metod a z toho plynoucí neexistencí metrologické návaznosti, funkční kalibrační hierarchie a nesrovnatelnost výsledků. V tom případě je ovšem víc než nutné zajistit správnou klinickou interpretaci nesrovnatelných výsledků precizní znalostí a samozřejmým poskytnutím referenčních intervalů a rozhodovacích limitů klinickým laboratořím. Avšak informací o vztahu systematických chyb k hodnotám referenčních intervalů/rozhodovacích limitů je žalostně málo jak v dokumentacích výrobců, tak i v publikacích uživatelů a pracovních skupin profesních organizací. Jak chceme donutit pacienty, aby stonali v souladu s použitým diagnostikem a neukázněně se nepohybovali mezi různými laboratořemi a nemocnicemi? I kdyby to nedělali, jejich vzorky se takto pohybují běžně.

## Jsou referenční metody vždy spolehlivou metrologickou referencí)

Informace o stavu referenční metodologie, tohoto pracovního nástroje návaznosti, mohou poskytnout velmi instruktivně výsledky programu externího hodnocení kvality referenčních laboratoří (RELA), organizovaného IFCC od roku 2004.

Uvádíme a stručně komentujeme dva příklady, kde by návaznost měla být bezproblémová a kde je reference již řadu let ustanovena, a kde i přesto problémy zůstávají

### Příklad 1: Bilirubin

V roce 2005 byly v programu dvě referenční laboratoře. Vzorek B v rozmezí 68,7-76,4  $\mu\text{mol/l}$  (11,2 %)

V roce 2009 to bylo již šest referenčních laboratoří. Vzorek A byl v rozmezí 19,4-20,6  $\mu\text{mol/l}$  (6,2 %) a vzorek B v rozmezí 33,7-34,7  $\mu\text{mol/l}$  (3 %).

Původně a ještě nedávno zoufalý stav referenčních měření bilirubinu podnítl vysoké zvýšení kvality referenčních laboratoří a také náležité zvýšení jejich počtu. Nicméně žádoucí efekt zlepšení kvality a srovnatelnosti v oblasti rutinní metodologie má stále ještě výrazné zpoždění, což může představovat významné riziko zejména v péči o novorozence.

### Příklad 2. Cholesterol 2009

9 referenčních laboratoří použilo některou ze separačních referenčních metod- ID/GC/MS, ID/LC/MS a ID/LC/MS/MS. Průměr vzorku B = 4,7  $\text{mmol/l}$ , průměr  $u(c) = 1,4\%$

3 referenční laboratoře použily referenční metody spektrofotometrická (Abell-Kendall) průměr vzorku B = 4,91  $\text{mmol/l}$ , průměr  $u(c) = 1,4\%$

Diference (systematická chyba) 4,5 % byla vyšší, než požadují mezinárodní doporučení pro diagnózu a terapii rizika aterosklerosy (3 %).

U zdánlivě tak bezproblémového analytu, za jaký je cholesterol bezesporu považován, je tedy dlouhodobě registrována hodnota bias, která teoreticky není akceptovatelná ani pro účely rutinních měření.

## Nedostatečná validace snižuje úroveň péče o pacienta

Inovace laboratorních diagnostik je často doprovázena nedostatečnou úrovní analytické a klinické validace.

Imunochemické metody trpí nedostatkem znalosti o struktuře analytů a vzájemná harmonizace výsledků, dosažených různými systémy, je opomíjena, což se musí nesporně odrážet na úrovni péče o pacienta.

Harmonizace výsledků měření u metod bez fungující návaznosti by musela být dosažena používáním perfektně stanovených referenčních intervalů nebo

rozhodovacích limitů. Víme, že tomu tak ve skutečnosti není a že se výrobci velmi často tomuto problému vyhýbají a snaží se ho přesunout na laboratoře. Analytické procesy vyžadují nepochybně dosažení vyšší úrovně aplikace metrologie, než je požadována z tohoto hlediska sterilní Směrnici IVD 98/79 ES. Podle ní stačí formální prohlášení o návaznosti bez aplikace signifikantních metrologických pravidel. Péče o pacienta a redukce rizik skutečnou metrologickou návaznost vyžadují. Pokud ovšem komerční zájmy nemají rozhodnou přednost před nimi. Někdy to vypadá, že PR (public relation) firmy je cennější, než zdraví pacienta. PR však může být dvojsečná zbraň a důvěra pacientů v medicínu, laboratoře a farmaceutické/diagnostické firmy není bez hranic.

**A co akreditační procesy? Akreditace vyžaduje průběžně provádět dobře popsané verifikační operace při používání laboratorních diagnostik. Pokud dojde k jejich inovacím tak, jak je výše popsáno, neporušují klinické laboratoře podmínky, závazné pro udělení akreditačních certifikátů?**

Vrátím se na okamžik k dost neradostným výše zmíněným výsledkům mezinárodních experimentů s thyroïdními hormony. V České republice znám oblast, kde se vzorek pacienta k stanovení thyroïdních hormonů může ocitnout ve třech klinických laboratořích, používajících tři různých systémů měření nebo v jednom zdravotnickém zařízení, využívajícím na dvou laboratorních odděleních dvou odlišných systémů měření. Záleží jen na lékaři a také na době odběru. Jak to „my všichni pečujeme o pacienta povinně“ myslíme s pacientem doopravdy? Není zdůrazňování péče o bezpečnost pacienta tak trochu reklamní slogan? Nemělo by to být návratem k renesanci profesionálních schopností a poctivosti? Doba, kdy není dále možné plýtvat s prostředky, by mohla být k renesanci profesionality příznivá.

1. P. Rustad, P. Felding, L. Franzson, V. Kairisto, A. Lahti a spol. The Nordic Reference Interval Project 2000: recommended reference intervals for 25 common biochemical properties. *Scand J Clin Lab Invest* 2004, 64:271-284
2. Infusino I, Schumann G, Cerriotti F, Panthegini M. Standardization in clinical enzymology. a challenge for the theory of metrological traceability. *Clin Chem Lab Med* 2010, 49:301-307
3. Consensus statement on the worldwide standardization of the Hemoglobin A1c. *Diabetes Care* 2007, 30:2399-2400
4. Lo SF, Jendrzeczak B, Doumas BT. Performance in neonatal bilirubin testing using commutable specimens. *Arch Pathol Lab Med* 2010, 132:1781-1787

5. Lo SF, Jendrzyczak B, Doumas BT. Bovine serum-based bilirubin calibrators are inappropriate for some diazo methods. *Clin Chem* 2010, 56:869-871
6. Thienpont LM, van Uyphange K, Beastall G, Faix J, Ieri T a spol. Report of the IFCC working group for standardization of thyroid function tests; Part 1: Thyroid-stimulating hormone. *Clin Chem* 2010, 56:902-911
7. Thienpont LM, van Uyphange K, Beastall G, Faix J, Ieri T a spol. Report of the IFCC working group for standardization of thyroid function tests, Part 3: Total Thyroxine and total triiodothyronine. *Clin Chem* 2010, 56:921-929
8. Thienpont LM, van Uyphange K, Beastall G, Faix J, Ieri T a spol. Report of the IFCC working group for standardization of thyroid function tests. Part 2: Free thyroxine and free triiodothyronine. *Clin Chem* 2010, 56:912-920.
9. Klee GG. Harmonization and standardization of thyroid function tests. *Clin Chem* 2010, 56:869-871
10. Whittington JD, Fantz CR, Gronowski AM, Cudden C, Mullins R a spol. The analytical specificity of human chorionic gonadotropin assays determined using WHO international reference reagents. *Clin Chim Acta* 2010;411:81-85
11. Carter GD. 25-hydroxyvitamin D assays :The quest for accuracy. *Clin Chem* 2009, 55:1300-1302
12. Stöckl D, Sluss PH, Thienpont LM. Specifications for trueness and precision of a reference measurement system for serum/plasma 25-hydroxyvitamin D analysis. *Clin Chim Acta* 2009, 408:8-13
13. Plebani M. Evaluating laboratory diagnostics tests and translational research. *Clin Chem Lab Med.* 48:....