

Porovnání některých charakteristik výsledků čtyř analytických systémů pro 12 základních biochemických analytů

Dohnal L.¹, Kloudová M.¹, Čechák P.²

¹Referenční laboratoř pro klinickou biochemii MZ ČR, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky
1. LF UK a VFN, Praha

²Ústav biochemie a patobiochemie 3. LF UK a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha

SOUHRN

Cíl práce: Porovnání přesnosti (precision) za podmínek opakovatelnosti na dvou kontrolních materiálech (rekonstituovaných lidských sérech) na 4 analytických systémech (Kone, Spotchem, Piccolo a Vitros) pro 12 základních biochemických analytů (albumin, ALP, ALT, AMS, AST, bilirubin, močovina, vápník celkový, cholesterol, kreatinin, glukóza, celková bílkovina). Posouzení kompatibility výsledků pocházejících ze systémů různého typu (Piccolo – „mokrý chemie“, menší POCT biochemický analyzátor, Spotchem – „suchá chemie“, menší POCT biochemický analyzátor, Vitros 950 – „suchá chemie“, laboratorní biochemický analyzátor, Konelab 60 – „mokrý chemie“, klasický velkokapacitní biochemický analyzátor).

Materiál a metody: Stanovení byla provedena pomocí výše uvedených analytických systémů originálními postupy podle výrobce. Za účelem zjištění opakovatelnosti byly analyzovány komerční kontrolní materiály – rekonstituovaná lyofilizovaná lidská séra.

Výsledky: Opakovatelnost jako variační koeficient byla typicky kolem 2,5 % s maximem 5 % s výjimkou následujících případů. ALP/Spotchem (14,9 % a 8,1 %) – trend v datech, ALT/Piccolo (18,0 %) – odlehlá hodnota, močovina/Piccolo (7,4 %) – celkově velký rozptyl, cholesterol/Piccolo (7,6 % a 6,0 %) – nenormalita dat a odlehlá hodnota. Reprodukovatelnost jako variační koeficient byla typicky do 7 %, vyšší (7–11 %) vykazuje ALT/Piccolo, bilirubin/Kone, močovina/Kone, Ca/Kone, kreatinin/Kone. Vychýlení bylo možno počítat pouze pro vápník, cholesterol, glukózu a kreatinin. Statisticky významné vychýlení (hladina významnosti 0,05) vykazuje Ca/Spotchem (-12 % a -15 %), cholesterol/Vitros (+5 %), glukóza/Kone (+5 %), glukóza/Spotchem (-12 %), kreatinin/Piccolo (+8 %), kreatinin/Vitros (+15 % a +14 %). Vzájemné porovnání výsledků z plazmy i séra od pacientů na všech analyzátoch je patrné z obrázků.

Závěr: Opakovatelnost byla dobrá – variační koeficient byl maximálně 5% – až na výjimky, které byly způsobeny odlehlými hodnotami nebo nenormálním rozdělením (variační koeficienty 18,0 – ALT/Piccolo, 7,5 % a 13,6 % – cholesterol/Piccolo, 5,3 % – AMS/Spotchem) a trendy v datech (variační koeficienty 14,9 % a 8,1 % – ALP/Spotchem). Pouze v jediném případě byl při zachované homoskedasticitě celkově příliš velký rozptyl (variační koeficient 7,4 % – močovina/Piccolo). Reprodukovatelnost jako variační koeficient byla do 7 %, výjimečně do 11 %. Z důvodu malého počtu dat (n = 3–5) je třeba ji posuzovat obezřetně. Každý ze čtyř analytů (celkový vápník, cholesterol, glukóza, kreatinin), pro něž bylo možno hodnotit vychýlení, vykázal alespoň na jednom analyzátoru statisticky významný bias v rozmezí od -15 % do +16 %. Při vzájemném porovnávání byly nápadně nesrovnatelné výsledky získány v následujících případech: ALT/Piccolo/plazma – proporcionální negativní odchylka (nevhodná kalibrace ?); AMS ve všech pěti případech – celkově špatná srovnatelnost (metodická nejednotnost ?); bilirubin ve všech sedmi případech – v oblasti 5–15 µmol/l špatná srovnatelnost (malá citlivost ?); glukóza/Spotchem/plazma i sérum nevelká, ale zřetelná záporná aditivní odchylka (nevhodný blank?); celková bílkovina/Kone a Vitros v séru má malou ale zřetelnou zápornou aditivní odchylku vůči hodnotám na Kone a Vitros v plazmě (fibrinogen?).

Klíčová slova: opakovatelnost, Piccolo, Spotchem, Vitros 950, Konelab 60, suchá chemie, mokrá chemie.

SUMMARY

Dohnal L., Kloudová M., Čechák P.: Comparison of some characteristics in results of four analytical systems for 12 basic biochemical analytes

Objective: The aim of the work was the comparison of precision under conditions of repeatability two reconstituted control human materials from 4 different analytical systems (Kone – Konelab 60, Arkray – Spotchem EZ, Abaxis – Piccolo and Ortho-Clinical Diagnostics – Vitros 950). At these analyzers was estimated 12 basic biochemical analytes (albumin, ALP, ALT, AMS, AST, bilirubin, urea, total calcium, cholesterol, creatinine, glucose, total protein). Judgment of comparability of results coming through different analytical systems (two small POCT analysers: Piccolo – “wet chemistry” and Spotchem – “dry chemistry” and two big biochemical analyzers with big capacity: Vitros 950 – “dry chemistry analyser” and Konelab 60 – classical “wet chemistry” analyser).

Material and Methods: All estimations were conducted according to producer recommendations and using the original producer recommended reagents. For evaluation of repeatability were analysed commercial control materials (lyophilized human sera after reconstitution).

Results: Repeatability expressed as coefficient of variation achieved typical value about 2.5% with maximum 5% with exceptions as follows: ALP/Spotchem (14.9% and 8.1%) – trend in data, ALT/Piccolo (18.0%) – outlier, urea/Piccolo (7.4%) – generally great variance of values, cholesterol/Piccolo (7.6% and 6.0%) – abnormality of data and outlier. Reproducibility expressed as coefficient of variation was typically to 7%, higher values (7–11%) were found as follows: ALT/Piccolo, bilirubine/Kone, urea/Kone, Ca/Kone, kreatinin/Kone. The bias value was possible count only for calcium, cholesterol, glucose and creatinine. Statistical significant bias (significance level 0,05) indicates Ca/Spotchem (-12% and -15%), cholesterol/Vitros (+5%), glucose/Kone (+5%), glucose/Spotchem (-12%), kreatinin/Piccolo (+8%), kreatinin/Vitros (+15% and +14%). Results comparison of patients plasma and serum in all analysers is demonstrated at figures.

Conclusion: Repeatability was good, coefficient of variation was max. 5%. Reasons of exceptions were caused by outliers or abnormal distribution (coeff. of variation 18% – ALT/Piccolo, 7.5% and 13.6% – cholesterol/Piccolo, 5.3% – AMS/Spotchem) and by trends of data (coeff. of variation 14.9% and 8.1% – ALP/Spotchem). Only in one case (e.g. urea/Piccolo) was generally very large values distribution – coeff. of variation 7.4%. Reproducibility as coefficient of variation was found up to 7%, exceptionally up to 11%. Because of the reason of the small cohort of data (n = from 3 to 5) it is necessary to evaluate reproducibility very carefully. Each of four analytes (total calcium, cholesterol, glucose, creatinine) for which was possible to evaluate bias appeared minimally on one analyte, at least in one of four compared analyzers, statistically significant bias in range from -15% up to +16%. In random cross comparison of achieved results were remarkably incomparable results in following cases: ALT/Piccolo/plasma – proportional negative bias (influence of calibration?); AMS at all 5 cases – generally poor comparability (methods heterogeneity?); bilirubine at all 7 cases – in range from 5 up to 15 $\mu\text{mol/l}$ was generally found bad comparison (low sensitivity?); glucose/Spotchem/plasma and serum – not big but significant negative additive bias (blank?); total protein/Kone and Vitros in serum indicates no big, but significant additive bias against values measured on Kone and Vitros in plasma (influence of fibrinogen?).
Key words: repeatability, Piccolo, Spotchem, Vitros 950, Konelab 60, dry chemistry, wet chemistry.

Úvod

Cílem práce bylo zjistit, zda výsledky získané různými měřicími systémy jak u originálního biologického materiálu od pacientů (plazma, sérum), tak také u kontrolních vzorků (rekonstituované lidské sérum) jsou natolik shodné, aby bylo možné je vzájemně zaměnit, jmenovitě zaměnit výsledky „suché“ a „mokré“ chemie. Také jsme byli zvědaví na případné rozdíly mezi výsledky v séru a odpovídající plazmě. Dále nás zajímalo, do jaké míry je možné pro všechny typy sledovaných analyzátorů použít jeden typ kontrolního materiálu. Je známo, že existují systémy externí kontroly kvality, které kontrolují jedním typem kontrolních vzorků „suchou“ i „mokrou“ chemii (např. holandský národní systém). Většina systémů externí kontroly však má pro oba „druhy chemie“ kontrolní cykly oddělené. K vyloučení případného nedorozumění je třeba definovat některé použité pojmy. Přesnost (precision) je těsnost souhlasu mezi nezávislými výsledky měření získanými za předem určených podmínek. V našem případě se spokojíme s opakovatelností – přesností za podmínek opakovatelnosti (repeatability, within run) a s reprodukovatelností – přesností za podmínek reprodukovatelnosti (reproducibility, between run). Správnost (accuracy) je těsnost souhlasu mezi jedním výsledkem měření a dohodnutou referenční hodnotou. Vychýlení neboli odchylka (bias) je rozdíl mezi střední hodnotou výsledku měření a dohodnutou referenční hodnotou.

Materiál a metody

Byly použity čtyři analytické systémy:

- Menší spektrofotometrický centrifugační analyzátor POCT Piccolo (výrobce – Abaxis) pracuje na principu „mokré chemie“. Zařízením je možné stanovit najednou až 13 analytů do 15 minut ze 100 μl krve, přičemž personál po aplikaci vzorku do přístroje se po celou dobu analýzy může věnovat pacientovi v kritickém stavu.
- Menší POCT analyzátor Spotchem EZ (výrobce Arkray) pracuje na principu „suché chemie“. Měří reflektanci, má rovněž předem dané kombinace až 6 analytů. Přístroj lze umístit přímo u lůžka nemocného.
- POCT analyzátor Vitros 950 (výrobce Ortho-Clinical Diagnostics) pracuje na principu „suché chemie“. Měří reflektanci a je vhodný pro statimovou laboratoř.

- Velkokapacitní spektrofotometrický analyzátor Konelab 60 (výrobce Termo-Fisher-Scientific) pracuje na principu „mokré chemie“.

Analyzátor Piccolo byl obsluhován zaškolenými zdravotnickými sestrami pracoviště akutní péče Kliniky anesteziologie a resuscitace FNKV Praha. Analyzátoři Spotchem, Vitros 950 a Konelab 60 byly obsluhovány laboratorním personálem Ústavu biochemie a patobiochemie 3. LF UK a FNKV.

Dvěma kontrolními materiály, v nichž byly analyty opakovaně stanovovány pro zjištění přesnosti, správnosti a vychýlení, byla rekonstituovaná lyofilizovaná séra. Jednalo se o materiály použité v kontrolním cyklu SEKK, spol. s r. o. pro kontrolu „mokré chemie“ a zakoupené od této firmy jako materiály validované pod č. 0678 a 0679. Jsou jim přiřazeny vztažné hodnoty a jejich 95% intervaly spolehlivosti, které, jak uvádí SEKK, spol. s r. o., jsou převzaty z certifikátů materiálů č. 86403 a 86404 Referenčního institutu pro bioanalytiku DGKC v Bonnu. V těchto materiálech byla použitými analytickými systémy provedena stanovení sledovaných analytů za podmínek opakovatelnosti (typicky n = 10 nebo n = 15) a reprodukovatelnosti, typicky n = 3–5. Dvakrát 38 vzorků od pacientů, v nichž byly analyty stanovovány pro zjištění porovnatelnosti, byla nativní séra a nativní Li-heparinátové plazmy. V těchto vzorcích byla použitými analytickými systémy provedena stanovení sledovaných analytů, vždy n = 1. Ke zpracování dat, výpočtům a tvorbě grafů byly použity počítačové programy Statgraphics Plus v. 5.1 (Statistical Graphics Comp.) a Adstat v. 2.0 (Trilobyte s. r. o.).

Výsledky

Ve snaze ukázat výsledky podrobného statistického hodnocení dat obsahuje práce značný počet tabulek a grafů, které jsou – po dohodě s vedoucím redaktorem – publikovány na webu a v následujícím textu jsou uváděny jejich hypertextové odkazy. Aby nebylo třeba neustále „přepínat“ mezi tištěnou a webovou formou článku a pracně opisovat odkazy na webové tabulky a obrázky, je na webu <http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/> rovněž publikován kompletní text této práce včetně tabulek a grafů.

Analyzátor/ analyt	KONE	PICCOLO	SPOTCHEM	VITROS
ALT	modifikace IFCC (37 °C), bez PDP, kineticky, 340 nm	modifikace IFCC (37° C), bez PDP, kineticky, 340 nm	JSCC ^{*)} , standardní metoda ^{****)}	modifikace IFCC (37 °C) s PDP, 340 nm, inkubace 5 min.
AST	modifikace IFCC (37 °C), bez PDP, kineticky, 340 nm	modifikace IFCC (37° C), bez PDP, kineticky, 340 nm	JSCC ^{*)} , standardní metoda ^{***)}	modifikace IFCC (37 °C) s PDP, 340 nm, inkubace 5 min.
ALP	modifikace IFCC (37 °C) pufr AMP, 405 nm	modifikace IFCC a AACCC (37° C), pufr AMP (s Mg ²⁺ a Zn ²⁺), měření z nárůstu rozdílu absorbance při 450 a 500 nm	JSCC ^{*)} , standardní metoda, substrát p-nitrofenylfosfát, 405 nm	substrát p-nitrofenylfosfát, pufr AMP, (s Mg ²⁺), 37 °C, 400 nm
AMS	neprovádí se	substrát (CNP3) ^{**} , měření: bichromaticky 450 a 500 nm, 37 °C	substrát benzyliden-p-nitrofenyl-maltohepta-oxid (BG7-PNP), gluukoamyláza uvolňuje p-nitrofenol, 405 nm	substrát - barevný amylopektin, 540 nm, 37 °C
Albumin	neprovádí se	BCP + povrchově aktivní látky	BCG, 610 nm	BCG, inkubace 2,5 min., 37 °C, 630 nm
Celková bílkovina	biuret, 540 nm	biuret-end-point, měření: rozdíl absolutní při 450 a 850 nm	biuret, 550 nm	biuretová metoda, inkubace 5 min.
Celkový bilirubin	diazotovaná sulfanilová kyselina, souprava kapalných činidel	enzymaticky, bilirubinoxidáza-biliverdin -> fialový komplex, vlastní slepá, měření 467 a 550 nm	diazotovaná kyselina sulfanilové reaguje v přítomnosti difyllinu ^{*)} s nepřímým i přímým bilirubinem v kyselém prostředí za vzniku červeného azobilirubinu, 550 nm	difyllin ^{*)} s diazoniovou solí ^{*****)} , 540 a 460 nm
Glukóza	hexokinázová metoda, 340 nm	hexokinázová metoda, 340 nm	GOD-POD, 550 nm	CHOD-POD, červené zbarvení, 540 nm, inkubace 5 min. 37 °C
Močovina	ureáza/GLDH, kineticky 340 nm	ureáza/GLDH, 340 a 405 nm	o-ftalaldehyd a N-1-naftyl-N'-dietyletylen-diaminošťavelová kyselina, 610 nm	ureáza + barevný indikátor na NH ₃ 37 °C, 670 nm
Kreatinin	Jaffé kineticky	enzymaticky po odečtení endogenního kreatinu a kreatinu vzniklého při enzymové reakci, k měření 2 kvety, vlastní slepá a vzorek při 550 a 630 nm	s kyselinou 3,5-dinitrobenzoovou v alkalickém prostředí, 550 nm	enzymaticky – vzniklý endogenní kreatin je v reakci oxidován, měření dvoubodové při 670 nm
Cholesterol	chromogenní oxidace - CHOD-PAP - end-point, 500 nm	enzymaticky přeměna NAD ⁺ na NADH ⁻ end-point	cholesteroxidáza/ peroxidáza, peroxid reaguje s 4-aminoanti-pyrimem DAOS (derivát anilinu) za vzniku modrého chromoforu, 610 nm	chromogenní oxidace (CHOD-PAP), inkubace 5 min., 37 °C, 540 nm
Celkový vápník	Arzenazo III, end-point, 650 nm	Arzenazo III, end-point, 600 nm	o-kresoltaleinkomplexon, 575 nm	Arzenazo III, inkubace 5 min. 37 °C, 680 nm

Vysvětlivky:

^{*)} JSCC – Japonská Společnost klinické chemie

^{**)} CNPG3 – 2-chloro-p-nitro-fenyl- α -D-maltotriosid

^{***)} z L-aspartátu a alfa-ketoglutarátu vzniká za katalýzy AST L-glutamát a oxalacetát, z oxalacetátu je pomocí oxalacetátdekarboxylázy odštěpen oxid uhličitý za vzniku pyruvátu. Pyruvát v přítomnosti hořčnatých iontů a thiaminpyrofosfátu reaguje s fosfátem a kyslíkem za vzniku acetylpyrofosfátu, oxidu uhličitého a peroxidu vodíku. Peroxid s pomocí peroxidázy oxiduje a kondenzuje 4-aminoanti-pyrim a DAOS (derivát anilinu) a vzniká modrý chromofor, který se měří při 610 nm. Případná interference askorbátu se předem odstraní askorbát oxidázou.

^{****)} z L-alaninu a alfa-ketoglutarátu vzniká za katalýzy ALT L-glutamát a pyruvát. Pyruvát v přítomnosti hořčnatých iontů a thiaminpyrofosfátu reaguje s fosfátem a kyslíkem za vzniku acetylpyrofosfátu, oxidu uhličitého a peroxidu vodíku. Peroxid pomocí peroxidázy oxiduje a kondenzuje 4-aminoanti-pyrim a DAOS (derivát anilinu) a vzniká modrý chromofor, který se měří při 610 nm. Případná interference askorbátu se předem odstraní askorbát oxidázou.

^{*****)} 4-(N-karboxymetylsulfonyl) benzendiazoniumhexafluorofosfát

^{#)} 1,3-dimetyl-7H-purin-2,6-dion

Přesnost (precision) za podmínek opakovatelnosti

Pro všechny výsledky dvojic analyt-použitý analytický systém v materiálech č. 678 a 679, pro něž byla získána příslušná data, byly vypočteny následující statistiky a provedeny následující testy: počet výsledků (n), aritmetický průměr (\bar{x}), směrodatná odchylka (SD), relativní směrodatná odchylka neboli variační koeficient (VK), winsorizovaný průměr (x_{winsor}), winsorizovaná směrodatná odchylka (SD_{winsor}), winsorizovaná relativní směrodatná odchylka neboli variační koeficient (VK_{winsor}), minimum (min), maximum (max), standardizovaná šikmost ($StSkew$), standardizovaná špičatost ($StKurt$), hladina významnosti ($\chi^2 p$ -value) testu chí-kvadrát k posouzení normality a hladina významnosti ($K-S p$ -value) Kolmogorova-Smirnova jednovýběrového testu rovněž k posouzení normality. Tyto statistiky společně s rozhodnutím normalita ano/ne a outliers (odlehlé body) ano/ne pomocí Grubbsova testu a Dixonova testu na odlehlé body na hladině významnosti 0,05 jsou uvedeny v tabulkách 1–12.

Table 1. Albumin – precision under repeatability conditions

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/tab01.htm>

Table 2. ALP – precision under repeatability conditions

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/tab02.htm>

Table 3. ALT – precision under repeatability conditions

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/tab03.htm>

Table 4. AMS – precision under repeatability conditions

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/tab04.htm>

Table 5. AST – precision under repeatability conditions

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/tab05.htm>

Table 6. Bilirubin – precision under repeatability conditions

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/tab06.htm>

Table 7. Urea – precision under repeatability conditions

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/tab07.htm>

Table 8. Ca – precision under repeatability conditions

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/tab08.htm>

Table 9. Cholesterol – precision under repeatability conditions

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/tab09.htm>

Table 10. Creatinine – precision under repeatability conditions

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/tab10.htm>

Table 11. Glucose – precision under repeatability conditions

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/tab11.htm>

Table 12. Total protein – precision under repeatability conditions

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/tab12.htm>

Výsledky testů podle Grubbsa a Dixona na odlehle hodnoty (outliers) je nutno posuzovat obezřetně především v případech, kdy bylo na základě hodnot standardizované šikmosti, standardizované špičatosti a výsledků chí kvadrát testu a Kolmogorova-Smirnova testu rozhodnuto, že výsledky nemají normální rozdělení. U stanovení ALT systémem Piccolo v materiálu č. 679 je zřejmě příčinou velkého variačního koeficientu odlehlý bod, jak vyplývá z testů na normalitu a z porovnání variačního koeficientu a winsorizovaného variačního koeficientu. U stanovení močoviny systémem Piccolo v materiálu č. 679. mají data zřetelně normální rozdělení a neobsahují odlehle body. Vysoký variační koeficient je tedy bohužel projevem velmi špatné opakovatelnosti stanovení. U stanovení cho-

lesterolu systémem Piccolo v materiálu č. 678 je patrně příčinou velkého variačního koeficientu nenormalita dat, která však není způsobena odlehlym bodem. U stanovení cholesterolu systémem Piccolo v materiálu č. 679 je příčinou odlehly bod, data jsou normální, Grubbsův a Dixonův test jsou pozitivní a variační koeficient je 13,6 %, zatímco winsorizovaný variační koeficient je 6 %. Celkově lze říci, že kromě zmíněných šesti případů je opakovatelnost pro týž analyt mezi jednotlivými systémy srovnatelná. Tady je vhodné připomenout, že exaktnější porovnání opakovatelnosti nelze provést, poněvadž nebyla získána data pro každý analyt a každý analyzovaný materiál od všech čtyř systémů.

Přesnost (precision) za podmínek reprodukovatelnosti

Pro všechny výsledky dvojic analyt-použitý analytický systém v materiálech č. 678 a 679, pro něž byla získána příslušná data, byly vypočteny následující statistiky a provedeny následující testy: počet výsledků (n), aritmetický průměr (\bar{x}), směrodatná odchylka (SD), relativní směrodatná odchylka neboli variační koeficient (VK), minimum (min), maximum (max). Tyto statistiky jsou uvedeny v tabulkách 13–24.

Table 13. Albumin – precision under reproducibility conditions

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/tab13.htm>

Table 14. ALP – precision under reproducibility conditions

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/tab14.htm>

Table 15. ALT – precision under reproducibility conditions

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/tab15.htm>

Table 16. AMS – precision under reproducibility conditions

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/tab16.htm>

Table 17. AST – precision under reproducibility conditions

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/tab17.htm>

Table 18. Biliubin – precision under reproducibility conditions

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/tab18.htm>

Table 19. Urea – precision under reproducibility conditions

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/tab19.htm>

Table 20. Ca – precision under reproducibility conditions

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/tab20.htm>

Table 21. Cholesterol – precision under reproducibility conditions

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/tab21.htm>

Table 22. Creatinine – precision under reproducibility conditions

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/tab22.htm>

Table 23. Glucose – precision under reproducibility conditions

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/tab23.htm>

Table 24. Total protein – precision under reproducibility conditions

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/tab24.htm>

Počet dat n je malý, pohybuje se mezi 3–5, proto je třeba posuzovat reprodukovatelnost vyjádřenou jako variační koeficient velmi obezřetně, respektive tolerantně. Při použití tohoto principu předběžné opatrnosti lze konstatovat, že horší reprodukovatelnost (variační koeficienty mezi 7 a 11 %) vykazuje Piccolo pro ALT na materiálu č. 678, Kone pro bilirubin na materiálu č. 678, Kone pro močovinu na materiálu č. 678 i 679, Kone pro vápník na materiálu č. 678 a Kone pro kreatinin na materiálu č. 678.

Odchylna neboli vychýlení (bias)

Pro stanovované analyty, pro něž jsme měli k dispozici v kontrolních materiálech č. 678 a 679 referenční hodnoty stanovené Referenčním institutem pro bioanalytiku DGKC v Bonnu (vápník celkový, cholesterol, glukóza, kreatinin), jsou tyto referenční hodnoty a jejich 95% intervaly spolehlivosti uvedeny v tabulce 25.

Table 25. Reference values and 95% confidence intervals for materials No. 678 and 679

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/tab25.htm>

Konstatujeme, že intervaly spolehlivosti těchto referenčních materiálů, které jsou dvojnásobkem směrodatných odchylek uvedených ve „Validačním protokolu SEKK, spol. s r. o. s poznámkou, že „vyjadřují mezilaboratorní reprodukovatelnost“, jsou nepravděpodobně úzké. Nápadné je to především u cholesterolu a glukózy. Pro srovnání uvádíme, že např. v certifikátu NISTu k SRM 965a jsou uvedeny rozšířené kombinované nejistoty certifikované koncentrace glukózy (faktor rozšíření-pokrytí = 2) kolem 1,1 % [4].

Dále pro výsledky dvojic analyt-použitý analytický systém, pro něž jsou k dispozici referenční hodnoty v tabulce 13, jsou vypočteny následující statistiky: počet výsledků za podmínek opakovatelnosti (n_{within}), jejich aritmetický průměr (x_{within}), dvojnásobek směrodatné odchylny jejich průměru ($2 \times SE_{\text{within}}$) – viz „Přesnost (precision) za podmínek opakovatelnosti“. Dále pak počet výsledků za podmínek reprodukovatelnosti s vyloučením eventuálních odlehlých bodů – viz „Přesnost (precision) za podmínek reprodukovatelnosti“ (n_{between}), jejich aritmetický průměr (x_{between}), dvojnásobek směrodatné odchylny jejich průměru ($2 \times SE_{\text{between}}$), střední hodnota (průměr) x_{within} a x_{between} (grand mean), odchylna grand mean od referenční hodnoty (bias), dolní mez intervalu spolehlivosti grand mean (lower limit), horní mez intervalu spolehlivosti grand mean (upper limit). Meze jsou spočteny jako grand mean \pm dvojnásobek průměru SE_{within} a SE_{between} .

Tyto statistiky, společně s komentářem, zda odchylna (bias) od referenční hodnoty je statisticky významná na hladině významnosti 0,05 – intervaly spolehlivosti se nepronikají (signif. diff.) – jsou uvedeny v tabulkách 26–29.

Table 26. Ca (mmol/l) – bias

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/tab26.htm>

Table 27. Cholesterol (mmol/l) – bias

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/tab27.htm>

Table 28. Glucose (mmol/l) – bias

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/tab28.htm>

Table 29. Creatinine ($\mu\text{mol/l}$) – bias

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/tab29.htm>

Statisticky významný bias (hladina významnosti 0,05) je u následujících stanovení: vápník systémem Spotchem v obou materiálech; cholesterol

systémem Spotchem v materiálu č. 678 je na hranici statistické významnosti – není významný interpretačně; cholesterol systémem Vitros v materiálu č. 679; glukóza systémem Kone v materiálu č. 679; glukóza systémem Spot-chem v materiálu č. 678; glukóza systémem Piccolo v materiálu č. 679 je na hranici statistické významnosti – není významný interpretačně; kreatinin systémem Piccolo v materiálu č. 678; kreatinin systémem Vitros v obou materiálech.

Srovnatelnost

Původně plánované porovnávání neparametrickým Friedmanovým testem (pořadový test pro několik závislých náhodných výběrů stejného rozsahu) [6] jsme nakonec zamítli, poněvadž takto bychom testovali pouze nulovou hypotézu, že výsledky nejsou závislé na použité metodě stanovení v kombinaci s plazmou nebo sérem.

U žádného z porovnávaných systémů nepředpokládáme, že je „zlatým standardem“, tedy apriorně důvěryhodnější než ostatní. Data v tabulkách nejsou dostatečně názorná ani přehledná, proto je uvádíme pouze graficky. Máme za to, že porovnání prezentované tímto způsobem je na první pohled srozumitelné bez hlubších statistických úvah a znalostí.

Vzájemné porovnání výsledků stanovení v séru i plazmě je pro každý analyt v různých systémech provedeno pomocí rozdílového grafu, který je zobecněním rozdílového grafu podle Altmana a Blanda [5]. Na vodorovné ose jsou pro jednotlivé vzorky (pacienty) aritmetické průměry z výsledků stanovení daného analytu všemi systémy, na svislé ose pak rozdíl mezi výsledky jednotlivých vzorků (pacientů) a průměry z vodorovné osy. Tyto grafy jsou na obrázcích 1–12.

Fig. 1. Difference plots for albumin (g/l)

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/obr1.htm>

Fig. 2. Difference plots for ALP ($\mu\text{kat/l}$)

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/obr2.htm>

Fig. 3. Difference plots for ALT ($\mu\text{kat/l}$)

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/obr3.htm>

Fig. 4. Difference plots for AMS ($\mu\text{kat/l}$)

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/obr4.htm>

Fig. 5. Difference plots for AST ($\mu\text{kat/l}$)

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/obr5.htm>

Fig. 6. Difference plots for bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/obr6.htm>

Fig. 7. Difference plots for Ca (mmol/l)

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/obr7.htm>

Fig. 8. Difference plots for glucose (mmol/l)

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/obr8.htm>

Fig. 9. Difference plots for cholesterol (mmol/l)

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/obr9.htm>

Fig. 10. Difference plots for creatinine ($\mu\text{mol/l}$)

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/obr10.htm>

Fig. 11. Difference plots for total protein (g/l)

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/obr11.htm>

Fig. 12. Difference plots for urea (mmol/l)

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/obr12.htm>

Diskuse

Opakovatelnost je do 5 % s následujícími výjimkami:

- ALP, systém Spotchem – variační koeficienty jsou 14,9 % a 8,1 %. Příčinou jsou trendy v datech.
- ALT, systém Piccolo – variační koeficient je 18,0 %. Příčinou je odlehlý bod.
- Močovina, systém Piccolo – variační koeficient je 7,4 %. Rozdělení dat je normální a odlehlý bod není přítomen. Zdá se, že tento princip je málo robustní vůči opakování.
- Cholesterol, systém Piccolo – variační koeficienty jsou 7,5 % a 13,6 %. V prvním případě je příčinou nejspíš nenormalita dat, která není způsobena odlehlým bodem. V druhém případě je příčinou odlehlý bod, data jsou normální.

Zajímavé jsou případy, kdy variační koeficient přesáhl 5 %. U stanovení ALP systémem Spotchem v materiálech č. 678 i 679 je zřejmě příčinou vysokého variačního koeficientu vzestupný trend v datech, jak je zřejmé z obrázků 13 a 14, na nichž je na svislé ose výsledek stanovení v $\mu\text{kat/l}$ a na vodorovné ose pořadové číslo stanovení. Na obrázku 13 je navíc viditelný lokální sestupný trend prvních pěti měření.

Fig. 13. Graph of data for ALP/Spotchem/678

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/obr13.htm>

Fig. 14. Graph of data for ALP/Spotchem/679

<http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/charakteristiky/obr14.htm>

Reprodukovatelnost, kterou je nutno posuzovat obezřetně pro malý počet dat, je do 7 % s následujícími výjimkami:

- ALT, systém Piccolo – variační koeficient 7,1 %, materiál č. 678.
- Bilirubin, systém Kone – variační koeficient 8,0 %, materiál č. 678.
- Močovina, systém Kone – variační koeficienty 8,9 % a 8,1 %, materiály č. 678 a 679.
- Vápník celkový, systém Kone – variační koeficient 9,8 %, materiál č. 678.
- Kreatinin, systém Kone – variační koeficient 10,8 %, materiál č. 678.

Vychýlení neboli bias, které bylo možno zkoumat pouze u čtyř analytů (vápník celkový, cholesterol, glukóza, kreatinin) je statisticky významné na hladině 0,05 v následujících případech:

- Vápník celkový, systém Spotchem, bias -12 % a -15 %, materiál č. 678 a 679.
- Cholesterol, systém Vitros, bias +5 %, materiál č. 679.
- Glukóza, systém Kone, bias +5 %, materiál č. 679.
- Glukóza, systém Spotchem, bias -12 %, materiál č. 678.
- Kreatinin, systém Piccolo, bias +8 %, materiál č. 678.
- Kreatinin, systém Vitros, bias +16 % a +14 %, materiál č. 678 a 679.

Co se týká vzájemné srovnatelnosti, lze konstatovat následující závěry:

- Albumin byl porovnán v rozmezí cca 24–44 g/l pro systémy Piccolo/plazma, Vitros/plazma, Vitros/sérum. Srovnatelnost je dobrá, rozdíly byly nejvýš cca 5 g/l.
- ALP byla porovnána v rozmezí cca 0,5–4 $\mu\text{kat/l}$ pro systémy Kone/plazma, Kone/sérum, Piccolo/plazma, Spotchem/plazma, Spotchem/sérum, Vitros/plazma, Vitros/sérum. Srovnatelnost je dobrá, rozdíly jsou nejvýš cca 0,5 $\mu\text{kat/l}$. Spotchem/plazma a Spotchem/sérum má několik vychýlených bodů.
- ALT byla porovnána v rozmezí cca 0,5–8 $\mu\text{kat/l}$ pro systémy Kone/plazma, Kone/sérum, Piccolo/plazma, Spotchem/plazma, Spotchem/sérum, Vitros/plazma, Vitros/sérum. Srovnatelnost je dobrá, rozdíly na nejvýš 0,7 $\mu\text{kat/l}$. Piccolo/plazma vykazuje soustavnou proporcionální negativní odchylku cca 20 %.
- AMS byla porovnána v rozmezí cca 0–4 $\mu\text{kat/l}$ pro systémy Piccolo/plazma, Spotchem/plazma, Spotchem/sérum, Vitros/sérum. Dobrá shoda je pouze v okolí 0,5 $\mu\text{kat/l}$, rozdíly nejvýš 0,5 $\mu\text{kat/l}$. Ve vyšších hodnotách jsou výsledky neporovnatelné.
- AST byla porovnána v rozmezí cca 0–8 $\mu\text{kat/l}$ pro systémy Kone/plazma, Kone/sérum, Piccolo/plazma, Spotchem/plazma, Spotchem/sérum, Vitros/plazma, Vitros/sérum. Až na jeden nebo dva vychýlené body je srovnatelnost dobrá, rozdíly nejvýš 0,5 $\mu\text{kat/l}$.
- Bilirubin byl porovnán v rozmezí cca 5–20 $\mu\text{mol/l}$ pro systémy Kone/plazma, Kone/sérum, Piccolo/plazma, Spotchem/plazma, Spotchem/sérum, Vitros/plazma, Vitros/sérum. V oblasti 5–15 $\mu\text{mol/l}$ je srovnatelnost špatná, rozdíly až 4,5 $\mu\text{mol/l}$. V oblasti 15–20 $\mu\text{mol/l}$ je srovnatelnost o něco lepší.
- Močovina byla porovnána v rozmezí cca 1–22 mmol/l pro systémy Kone/sérum, Piccolo/plazma, Spotchem/plazma, Spotchem/sérum, Vitros/plazma, Vitros/sérum. Srovnatelnost není dobrá, rozdíly až 1,7 mmol/l.
- Vápník celkový byl porovnán v rozmezí cca 1,9–2,6 mmol/l pro systémy Kone/plazma, Kone/sérum, Piccolo/plazma, Spotchem/plazma, Spotchem/sérum, Vitros/plazma, Vitros/sérum. Až na jeden nebo dva vychýlené body u Spotchem/plazma a Spotchem/sérum je srovnatelnost dobrá, rozdíly nejvýš 0,4 mmol/l.
- Cholesterol byl porovnán v rozmezí cca 1,9–6,9 mmol/l pro systémy Kone/plazma, Kone/sérum, Piccolo/plazma, Spotchem/plazma, Spotchem/sérum, Vitros/plazma, Vitros/sérum. Srovnatelnost je dobrá, rozdíly nejvýš 0,6 mmol/l.
- Kreatinin byl porovnán v rozmezí cca 50–250 $\mu\text{mol/l}$ pro systémy Kone/sérum, Piccolo/plazma, Vitros/plazma, Vitros/sérum. Srovnatelnost je dobrá, rozdíly nejvýš 35 $\mu\text{mol/l}$.
- Glukóza byla porovnána v rozmezí cca 5–15 mmol/l pro systémy Kone/plazma, Kone/sérum, Piccolo/plazma, Spotchem/plazma, Spotchem/sérum, Vitros/plazma, Vitros/sérum. Srovnatelnost je dobrá, rozdíly nejvýš 0,4 mmol/l. Systém Spotchem/plazma a Spotchem/sérum vykazuje nevelkou, ale zřetelnou soustavnou zápornou aditivní odchylku cca 0,4 mmol/l.

- l) Celková bílkovina byla porovnána v rozmezí 42–82 g/l pro systémy Kone/sérum, Piccolo/plazma, Vitros/plazma, Vitros/sérum. Srovnatelnost je dobrá, rozdíly nejvýš 5 g/l. Kone/plazma oproti Kone/sérum a rovněž Vitros/plazma oproti Vitros/sérum vykazují nevelkou ale zřetelnou soustavnou kladnou aditivní odchylku cca 4 g/l.

Závěr

Na základě předchozích zjištění můžeme konstatovat následující:

- Je třeba pečlivě sledovat eventuální nenormalitu dat, vychýlené body a trendy a při hodnocení přesnosti k nim přihlížet.
- Na základě analýzy dat je třeba uvažovat o možnostech artefaktů (tzv. hrubých chyb) při zpracování – např. nestabilní koncentrace analytu (opakované používání fyzicky téhož materiálu) nebo odchylky vzniklé odpařováním.
- Je dobré rozvážně a kriticky posuzovat případné referenční hodnoty a jejich nejistoty u kontrolních materiálů, ale též uvažovat jiné pravděpodobné příčiny většího vychýlení, jako např. vliv nesprávné kalibrace na směrnici kalibrační přímky, vliv nesprávného blanku na posun nulové linie apod.
- Ukázalo se, že použité kontrolní materiály – rekonstituovaná lidská séra – jsou vhodné pro všechny čtyři typy porovnávaných analyzátorů. Při použití vhodných materiálů tedy vnitrolaboratorní kontrola a/nebo mezilaboratorní porovnávací zkoušky pro uvedené analyty a sledované systémy nevyžá-

dují nutně různé typy kontrolních materiálů pro stejné analyty, jak je to někdy v praxi zavedeno za cenu komplikovanější výstupní kontroly, mimo jiné i z hlediska porovnatelnosti výsledků pro daný analyt v rámci dané laboratoře či zdravotnického zařízení. Stojí za zmínku, že např. výsledky glukózy všemi systémy porovnávanými v této práci vykazují dobrou shodu.

Literatura

1. **Koshin, F. et al.** *Statgraphics aneb statistika pro každého*. Grada : Praha, 1992, 350 s., ISBN 80-85424-70-3.
2. **Meloun, M., Militký, J.** *Kompendium statistického zpracování dat*. Academia : Praha, 2002, 764 s., ISBN 80-200-1008-4.
3. **Dempír, J., Dohnal, L.** Některé robustní postupy určení střední hodnoty a rozptýlení souboru výsledků a jejich použití. *Klin. Biochem. Metab.*, 2005, 13, 34, 3, s. 139–144.
4. Certifikát materiálu SRM 965a (NIST). Dostupné na: https://srmors.nist.gov/view_cert.cfm?srm=965A (29. 8. 2006).
5. **Altman, D. G., Bland, J. M.** Measurement in medicine: The analysis of comparison studies. *Statistician*, 1983, 32, s. 307–313.
6. **Kubánková, V., Hendl, J.** *Statistika pro zdravotníky*. Avicenum : Praha, 1986, 278 s.

Do redakce došlo 7. 5. 2007.

Adresa pro korespondenci:

RNDr. Luděk Dohnal

Referenční laboratoř pro klinickou biochemii MZ ČR

Karlovo náměstí 32

121 11 Praha 2

e-mail: ludek.dohnal@lf1.cuni.cz