

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**OPTIMALIZACE NOVÉHO ANALYTICKÉHO SYSTÉMU
PRO VYBRANÉ BIOCHEMICKÉ A IMUNOCHEMICKÉ
METODY**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Martina Hrdinová

Hradec Králové 2022

Bc. Kristýna Dvořáková

Poděkování

Ráda bych poděkovala své kolegyni a konzultantce Mgr. Martině Hrdinové za trpělivost, drahocenné rady a výbornou spolupráci. Chci také poděkovat vedoucí mé práce, paní profesorce Lence Skálové za celkovou a formální úpravu. Dále bych chtěla poděkovat kolegům z oddělení klinické biochemie z EUC Laboratoře s.r.o., své rodině a přáteli za obrovskou morální podporu.

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala pod vedením konzultanta. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu“.

V Hradci Králové 11. 5. 2022

Bc. Kristýna Dvořáková

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Předmět validace a verifikace	9
2.1.1 Validace	9
2.1.2 Verifikace	10
2.2 Výkonnostní charakteristiky pro validaci a verifikaci	11
2.2.1 Pravdivost měření	12
2.2.2 Preciznost měření	12
2.2.3 Přesnost měření	13
2.2.4 Porovnatelnost dvou metod	14
2.2.5 Další analytické vlastnosti laboratorních metod	15
2.3 Nejistota měření	18
2.3.1 Výpočty nejistot	18
2.3.2 Výpočet kombinované nejistoty	19
2.3.3 Minimální a maximální přípustná velikost nejistoty	19
2.4 Interní a externí hodnocení kvality kontrol	20
2.4.1 Interní kontrola kvality	20
2.4.2 Externí hodnocení kvality	21
2.5 Vybrané biochemické a imunochemické metody	22
2.5.1 Močovina	22
2.5.2 Kreatinin	23
2.5.3 Alaninaminotransferáza	23
2.5.4 Celkový bilirubin	24
2.5.5 LDL-cholesterol	25
2.5.6 C-reaktivní protein	26
2.5.7 Vysoce senzitivní Troponin T	26

2.5.8 Thyreotropní hormon	27
2.5.9 Volný thyroxin	27
3. CÍL PRÁCE	29
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
4.1 Metodika stanovení.....	30
4.1.1 Spektrofotometrie	30
4.1.2 Imunoturbidimetrie	31
4.1.3 Elektrochemiluminiscence	31
4.2 Automatické analyzátory	32
4.2.1 Cobas 8000.....	32
4.2.2 Cobas 6000.....	33
4.3 Reagencie a pomocné roztoky	34
4.4 Kalibrační a kontrolní materiál	36
4.5 Použitý software	38
4.6 Testovaný soubor vzorků.....	38
5. VÝSLEDKY	39
5.1 Verifikace	39
5.1.1 Verifikace metod analytického systému Cobas 8000	39
5.1.2 Verifikace metod analytického systému Cobas 6000	41
5.2 Opakovatelnost	43
5.2.1 Opakovatelnost metod pro analytický systém Cobas 8000	43
5.2.2 Opakovatelnost metod pro analytický systém Cobas 6000	45
5.3 Porovnání metod na analyzátorech Cobas 8000 a Cobas 6000	47
5.3.1 Statistické vyhodnocení metody UREA	47
5.3.2 Statistické vyhodnocení metody CREA.....	50
5.3.3 Statistické vyhodnocení metody BILT	52
5.3.4 Statistické vyhodnocení metody ALT	54

5.3.5 Statistické vyhodnocení metody LDL	56
5.3.6 Statistické vyhodnocení metody CRP	58
5.3.7 Statistické vyhodnocení metody TNT	60
5.3.8 Statistické vyhodnocení metody TSH.....	62
5.3.9 Statistické vyhodnocení metody FT4.....	64
6. DISKUZE	66
7. ZÁVĚR	70
8. SEZNAM ZKRATEK	71
9. SEZNAM OBRÁZKŮ	73
10. SEZNAM TABULEK	74
11. LITERATURA	75

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Kristýna Dvořáková

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Martina Hrdinová

Název diplomové práce: Optimalizace nového analytického systému pro vybrané biochemické a imunochemické metody

Specifické požadavky na validaci a verifikaci analytických metod dle normy ČSN EN ISO 15189:2013 musí splňovat každá zdravotnická laboratoř. Cílem práce bylo vyhovět požadavkům verifikace při zavedení nového analytického systému Cobas 8000 a porovnat výsledky s těmi získanými na starším analyzátoru Cobas 6000 v laboratoři klinické biochemie.

Pro analýzu biochemických a imunochemických metod jsme použili diagnostické soupravy od stejného dodavatele Roche s.r.o. Vybrané klinicko-biochemické markery jsme stanovili základními metodami s využitím spektrofotometrie, imunoturbidimetrie a elektrochemiluminiscence. V rámci verifikace metod jsme používali certifikovaný kalibrační a kontrolní materiál. Pro opakovatelnost a porovnatelnost metod jsme použili směsná séra pacientů.

Verifikace a opakovatelnost metod jsme vyhodnotili pomocí programu Microsoft Excel. Výsledné nejistoty měření a variační koeficienty mezilehlé preciznosti jsme porovnali s maximálními hodnotami přijatelných rozdílů z dokumentace externího hodnocení kvality od firmy SEKK s.r.o. pro rok 2022. Pro porovnání 9 vybraných metod jsme použili statistické nástroje regresní analýzu dle Passing-Babloka a rozdílový graf dle Bland-Altmana.

Výsledky verifikace, opakovatelnosti a porovnatelnosti vybraných metod pro oba automatické analyzátory vyhovovaly našim požadavkům pro zamýšlené použití v klinické praxi.

Klíčová slova: validace, verifikace, nejistota měření, mezilehlá preciznost, opakovatelnost, porovnatelnost

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Kristýna Dvořáková

Thesis supervisor: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Consultant: Mgr. Martina Hrdinová

Title of diploma thesis: Optimization of a new analytical system for selected biochemical and immunochemical methods

Specific requirements for validation and verification of analytical methods according to the ČSN EN ISO 15189: 2013 standard must be met by every medical laboratory. The aim of the work was to meet the requirements of verification in the introduction of a new analytical system Cobas 8000 and also to compare the results with those obtained using older analyzer Cobas 6000 in the laboratory of clinical biochemistry.

For the analysis of biochemical and immunochemical methods, we used diagnostic kits from the same supplier Roche s.r.o. We determined the selected clinic-biochemical markers by the basic methods using spectrophotometry, immunoturbidimetry and electrochemiluminiscence. We used certified calibration and control material in the process of method verification. The mixed patient serum was used for the evaluation of repeatability and comparability of the methods.

We evaluated the verification and repeatability of methods using Microsoft Excel software. We compared the resulting measurement uncertainties and coefficients of intermediate precision with the maximum values of acceptable differences from the documentation of the external quality assessment from the company SEKK s.r.o. for 2022. To compare 9 selected methods, we used statistical tools regression analysis according to Passing-Bablok and a difference graph according to Bland-Altman.

The results of verification, repeatability, and comparability of selected methods for both automatic analyzers met our requirements for the intended use in clinical practice.

Keywords: validation, verification, uncertainty of measurement, intermediate precision, repeatability, comparability

1. ÚVOD

Snahou většiny klinicko-biochemických laboratoří je v současnosti zavádění nových vyšetřovacích metod a technologií do rutinní praxe. Pro interpretaci a využití laboratorních vyšetření v diagnostice a monitorování léčby pacientů je nutné pravidelně kontrolovat spolehlivost používaných metod. Každý nově zavedený analytický systém nebo metoda musí splňovat určitá kritéria a parametry. Plnění těchto požadavků je předmětem validace a verifikace každé zdravotnické laboratoře. Prvotní validaci provádí výzkumná a dále klinická laboratoř, po které následuje optimalizace podmínek analytického systému u výrobce. Následuje trvalé sledování, ověřování a hodnocení parametrů diagnostických metod pomocí interního a externího hodnocení kvality a klinického auditu. Výsledkem těchto procesů je plně funkční analytický systém, který je schopný plnit požadavky pro klinické účely. Tato práce se opírá o nová doporučení k provádění validace a verifikace včetně nejistot měření analytických metod v klinických laboratořích.

Teoretická část práce popisuje předmět validace, verifikace a detailní charakteristiku analytických metod. Dále se zaměřuje na nejistotu měření a její výpočet dle nových doporučení ČSKB a také na interní a externí hodnocení kvality kontrol. Jsou zde stručně popsány vybrané biochemické a imunochemické metody pro experimentální část práce.

Experimentální část obsahuje praktické provedení verifikace, opakovatelnosti a výpočtu nejistoty pro vybrané metody na dvou rozdílných analyzátořech. Dále jsme se zaměřili na porovnání patientských vzorků mezi analyzátořem Cobas 6000 a nově zavedeným analyzátořem Cobas 8000. Výsledky jsme zaznamenali do tabulek a statisticky zpracovali v programu MedCalc.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Předmět validace a verifikace

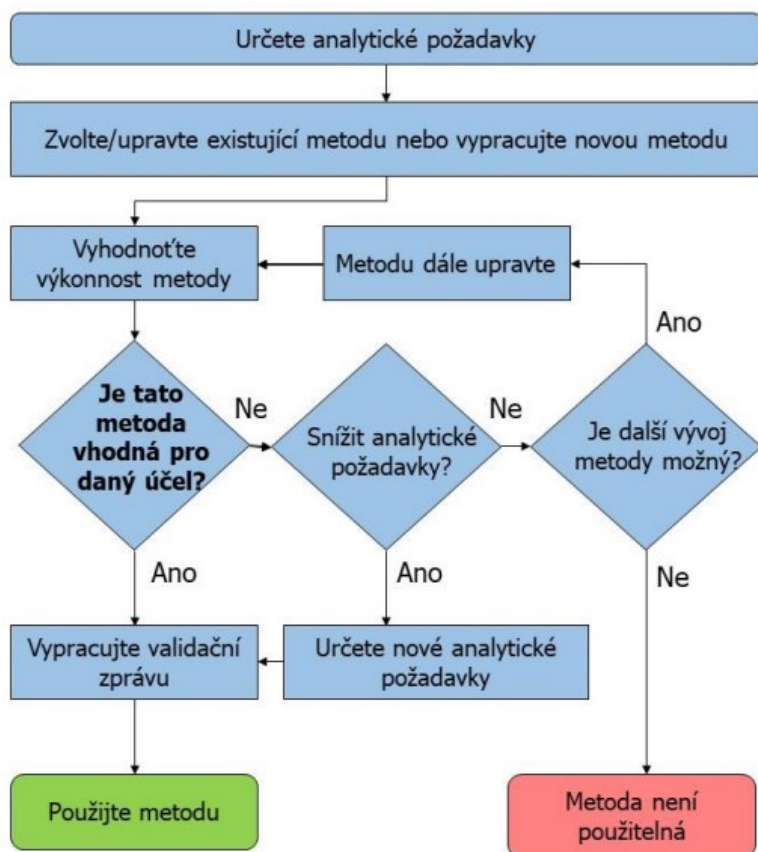
Specifické požadavky na validaci a verifikaci analytických metod a postupů laboratorních vyšetření musí splňovat každá zdravotnická laboratoř. Tyto požadavky, podle které jsou zdravotnické laboratoře akreditovány, definuje norma ČSN EN ISO 15189:2013 (Zdravotnické laboratoře – požadavky na kvalitu a způsobilost). Dalšími dokumenty zabývajícími se detailně validací a verifikací metod v laboratořích je také nová přepracovaná příručka EURACHEM (dostupné na <http://www.eurachem.org>).

Validace i verifikace analytických metod je velmi důležitá z hlediska diagnostiky a léčby pacienta. Také zajišťuje kvalitu pro danou laboratoř v rutinním provozu. Provádět tyto postupy je nedílnou součástí každého analytického pracovníka na oddělení klinické biochemie. Odpovědnost za řádně provedenou validaci či verifikaci však nese sama zdravotnická laboratoř, která by se měla řídit standardními operačními postupy (SOP) splňující nařízení IVD 98/79 EC 2017. Laboratoř, která splňuje řádně validované a verifikované metody, má zajištěné potvrzení odborné kompetence neboli akreditaci (Plzák *et al.*, 2021).

2.1.1 Validace

Obecně validaci definujeme jako proces, kterým zdravotnická laboratoř prokazuje, zda je analytická metoda vhodná pro zamýšlené použití (Obr. 1). Validace tedy potvrzuje, že je měřicí systém či analytická metoda schopna plnit požadavky pro klinické účely. Ve většině laboratoří jsou již validované diagnostické soupravy prováděné výrobcem. V takovém případě jsou soupravy označeny certifikátem IVD v souladu s evropskou směrnicí pro diagnostiku a přístroje IVD 98/79 EC 2017. Validaci metody může provádět i sama laboratoř, ale výsledkem vždy musí být validační protokol. Validace se především provádí za účelem používání nové analytické metody nebo měřicího systému. Dále pokud chceme rozšířit momentálně používanou metodu, změnit instrumentaci přístroje, převzít metodu z jiné laboratoře, nebo dle validačního plánu.

Mezi nejčastější výkonnostní charakteristiky zkoumané při vlastní validaci metody v laboratoři lze zařadit nejistotu měření, preciznost, pravdivost, přesnost, analytickou citlivost, specifickou, linearitu, mez detekce a stanovitelnosti, měřicí rozsah (Magnusson *et al.*, 2014; Plzák *et al.*, 2021).



Obrázek 1 Postup validace metody

Zdroj obrázku: <http://www.eurachem.cz/user-files/files/ml24-mv-leaflet-cz.pdf>

2.1.2 Verifikace

Verifikaci definujeme jako proces ověřování platnosti závěrů validace. Ověřujeme tedy metodu v průběhu jejího používání pro klinické účely, a to zpravidla 1x ročně. Cílem verifikace je důkaz, že je laboratoř schopná dosáhnout požadavků na měřicí systém či metodu, které uvádí výrobce. Výsledkem verifikace je plně funkční analytický systém. Verifikace se pravidelně provádí dle plánu verifikací, pokud se projeví v řízení procesu kvality problém, nebo pokud chceme zahájit používání nové metody, která je již validována výrobcem. Většina laboratoří provádí verifikaci validovaných kvantitativních zkoušek, tzn. že se provede základní verifikace předem validovaných parametrů. Tyto metody jsou opatřené značkou CE a potvrzují shodu jejich vlastností s deklarovanými vlastnostmi od výrobce.

Mezi nejdůležitější výkonnostní charakteristiky při verifikaci řadíme nejistotu měření, preciznost, pravdivost, pracovní rozsah, stabilitu, rozhodovací meze, interference a porovnatelnost s jinou metodou. Pro základní odhad nejistoty výsledků měření je pro výstup verifikace nezbytná preciznost, bias a pracovní rozsah (Beránek, 2013; Plzák *et al.*, 2021).

2.2 Výkonnostní charakteristiky pro validaci a verifikaci

Analytické vlastnosti laboratorních metod nebo také výkonnostní charakteristiky pro validaci a verifikaci jsou v této práci definovány dle Metrologické terminologie ve zdravotnické a analytické laboratoři ze zdroje SEKK s.r.o. a EURACHEM-ČR (Plzák, 2022). Dle doporučení pro validace a verifikace z roku 2021 vycházející z normy ČSN EN ISO 15189, jsou zde v tabulce uvedeny nejdůležitější výkonnostní charakteristiky analytického postupu (Tab. 1). Výsledky verifikace či validace musí být zdokumentovány odborným pracovníkem a musí vyhovovat běžným podmínkám rutinní činnosti zdravotnické laboratoře (Plzák *et al.*, 2021).

Tabulka 1 Výkonnostní charakteristiky pro validaci/verifikaci analytického postupu

VALIDACE	VERIFIKACE
<ul style="list-style-type: none">• Pravdivost měření• Přesnost měření• Preciznost měření včetně opakovatelnosti měření a mezilehlé preciznosti měření• Nejistota měření• Analytická specifická včetně interferujících látek• Referenční interval a klinické rozhodovací meze• Analytická citlivost• Mez detekce a mez stanovitelnosti• Měřicí rozsah• Diagnostická specifická• Diagnostická citlivost (senzitivita)	<ul style="list-style-type: none">• Preciznost měření – opakovatelnost• Mezilehlá preciznost• Pravdivost měření – bias• Pracovní rozsah, mez detekce• Stabilita• Porovnání s jinou metodou, pokud je to možné• Klinické rozhodovací meze• Interference• Nejistota měření

Zdroj dat: (Plzák *et al.*, 2021)

2.2.1 Pravdivost měření

Pravdivost měření („measurement trueness“) je těsnost shody mezi aritmetickým průměrem nekonečného počtu opakovaných naměřených hodnot veličiny a referenční hodnotou veličiny (Plzák, 2022).

Pravdivost tedy vyjadřuje shodu měření se skutečnou hodnotou, kterou určujeme referenční metodou. Pravdivost měření se nepřímou vztahuje pouze k systematické chybě. Nepravdivost vyjadřujeme jako **bias** (vychýlení). Jedná se o hodnotu odhadu systematické chyby, kterou charakterizuje aritmetický průměr. Systematická chyba může být konstantní, kdy při procesu měření klesají nebo stoupají výsledky vždy o stejnou hodnotu. Může se ale naopak jednat o chybu proporcionální, kdy se stoupající koncentrací zároveň klesá nebo stoupá i velikost chyby. Systematické chyby obecně vznikají z nedokonalosti použité metody měření, nebo chyby měřicího přístroje, ale také jsou to chyby způsobené lidským faktorem. Bias můžeme určit opakovaným měřením materiálu se známou koncentrací a vypočítá se jako střední hodnota (průměr) naměřených hodnot, od kterého odečteme skutečnou (referenční) hodnotu (Racek, 2021).

2.2.2 Preciznost měření

Preciznost měření („measurement precision“) je těsnost shody mezi indikacemi nebo naměřenými hodnotami veličiny získanými opakovanými měřeními na stejném objektu nebo na podobných objektech za specifikovaných podmínek (Plzák, 2022).

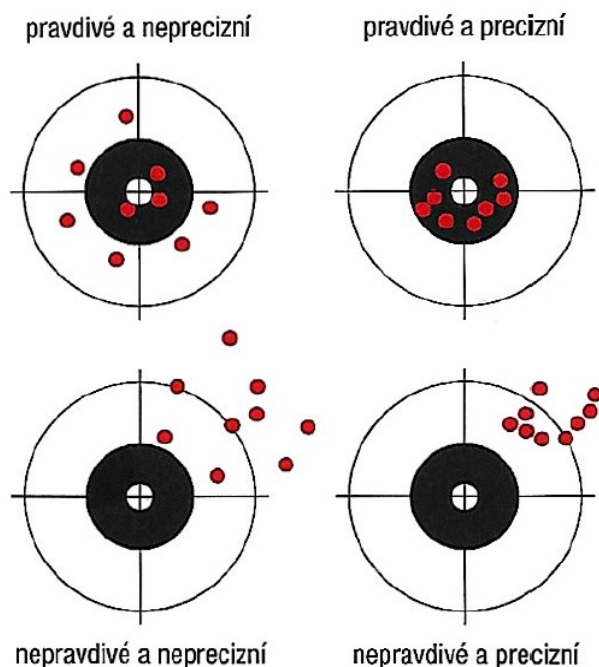
Preciznost v praxi vyjadřuje schopnost metody poskytovat stejné výsledky opakovaným měřením vzorku o stejné koncentraci analytu. Preciznost na rozdíl od pravdivosti závisí pouze na rozdělení náhodných chyb. Preciznost můžeme testovat za různých specifických podmínek (podmínky opakovatelnosti, reprodukovatelnosti, mezilehlé preciznosti) a je vyjádřena směrodatnou odchylkou, rozptylem, nebo variačním koeficientem. Variační koeficient (CV) popisuje, jaké procento z průměru tvoří směrodatná odchylka (SD). SD získáme odmocněním hodnoty rozptylu při opakovaném měření kolem průměru. CV mají pro referenční metody hodnotu 1 %, pro fotometrické obvykle 10 % a imunochemické v rozmezí 10-30 % (Beránek, 2013; Racek 2021).

Opakovatelnost neboli měření v sérii, obvykle zahrnuje měření jedné metody 10x za sebou za stejných analytických podmínek (stejný den, přístroj, postup, osoba, šarže reagentie). **Mezilehlá preciznost měření** (CV_p) je preciznost při odlišných podmínkách (jiný den, osoba, šarže reagentie apod.) v rámci několika měření v sérii nebo během několika dní. Jedná se o dlouhodobé měření kontrolních vzorků jako součást vnitřní kontroly kvality. Preciznost, která se zjišťuje mezilaboratorními porovnávacími zkouškami v rámci externího hodnocení kvality označujeme jako **reprodukovatelnost**. Podmínky reprodukovatelnosti zahrnují odlišná pracoviště, jiný personál a měřicí systémy. (Beránek, 2013; Pospíšil, 2010).

2.2.3 Přesnost měření

Přesnost měření („measurement accuracy“) je těsnost shody mezi naměřenou hodnotou veličiny a pravou hodnotou měřené veličiny (Plzák, 2022).

Přesnost měření kombinuje preciznost a pravdivost (Obr. 2), tzn. náhodné a systematické chyby. Náhodná chyba je tedy ovlivněna precizností stanovení, systematická pravdivostí a z výrazné části návazností diagnostické soupravy. Měření považujeme za přesnější, pokud nám nabízí menší chybu měření. Chyba měření se obecně vyjadřuje jako rozdíl skutečné naměřené hodnoty a referenční hodnoty (Jabor, 2020; Pospíšil, 2010).



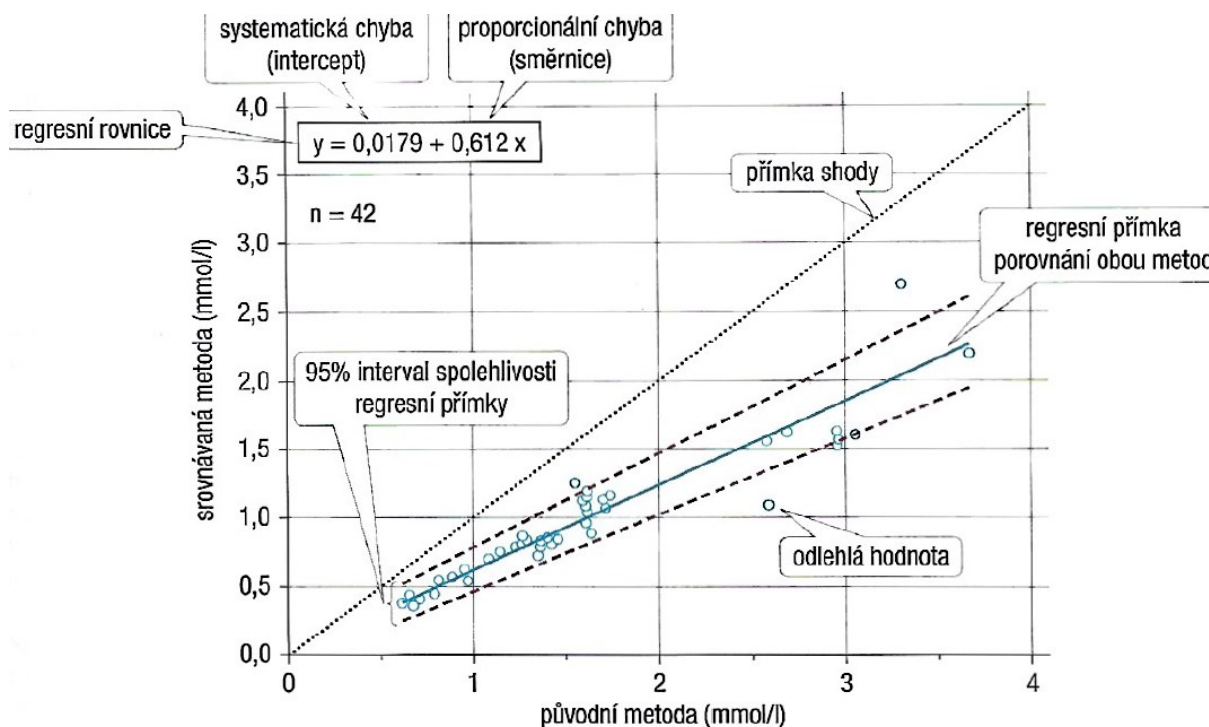
Obrázek 2 Různé kombinace pravdivosti a preciznosti

Zdroj obrázku: (Racek, 2021)

2.2.4 Porovnatelnost dvou metod

Porovnání je důležitou součástí procesu validace a verifikace analytických metod a přístrojů. Pokud zavádíme nový analytický systém, nebo novou vyšetřovací metodu, je důležitým krokem provést srovnání s dosud používaným systémem/metodou na pracovišti. Důvodem pro optimalizaci může být levnější stanovení, zlepšení analytických vlastností metod, nebo modernější typ analyzátoru. Cílem jsou srovnatelné výsledky u obou zkoumaných složek. Vždy se snažíme porovnat takový soubor vzorků, ve kterém budou zastoupeny nízké, střední i vysoké hodnoty. Pro vyhodnocení výsledků měření se používají metody regresní analýzy: Passingova-Bablokova regrese a rozdílový Bland-Altmanův graf (Racek, 2021).

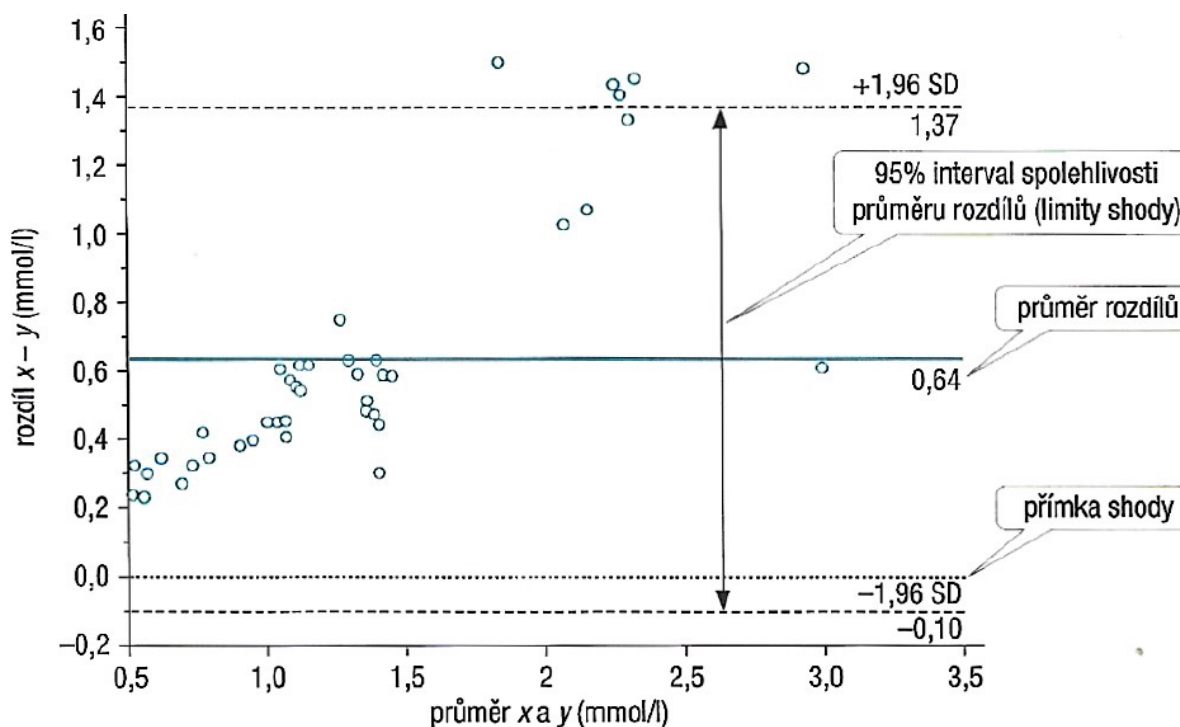
Regresní analýza dle Passing-Babloka (Obr. 3) je statistický postup, který umožňuje odhad shody analytických metod a identifikuje možné systematické i náhodné chyby. Jedná se o robustní, neparametrickou regresi, jejíž výsledky jsou odolné vůči odlehlým hodnotám. Předpokladem správné aplikace regrese je lineární vztah mezi naměřenými daty prostřednictvím dvou analytických metod. Výsledky jsou prezentovány jako korelační (bodový) graf s regresní přímkou a rovnicí (Zulle, 2011).



Obrázek 3 Grafické znázornění regresní analýzy dle Passing-Babloka

Zdroj obrázku: (Racek, 2021)

Blandův a Altmanův rozdílový graf (Obr. 4) graficky vyjadřuje závislost mezi průměry a rozdíly výsledků dvou metod. Na ose x jsou průměry a na ose y rozdíly naměřených hodnot. Z grafu můžeme zjistit bias testované metody vůči srovnávané (Dastyeh, 2015).



Obrázek 4 Grafické znázornění pro Bland-Altmanův rozdílový graf

Zdroj obrázku: (Racek, 2021)

2.2.5 Další analytické vlastnosti laboratorních metod

Mez detekce (LoD, L_D – „limit of detection“) je definována jako naměřená hodnota veličiny získaná daným postupem měření, pro kterou je pravděpodobnost nepravdivého tvrzení o nepřítomnosti složky v materiálu β , přičemž pravděpodobnost nepravdivého tvrzení o její přítomnosti je α (Plzák, 2022).

Mez detekce je nejmenší koncentrací analytu, kterou lze danou metodou prokázat. Je to taková koncentrace, která může být detekována, ale ne nutně kvantifikována. Tuto koncentraci lze bezpečně odlišit od přístrojového šumu. LoD je parametrem limitních testů. Naproti tomu **mez stanovitelnosti** (LoQ, L_Q) určuje nejmenší koncentraci analytu, kterou lze metodou prokázat spolu s požadovanou hodnotou nejistoty měření. LoQ je parametr kvantitativních testů pro nízké hladiny sloučenin v matricích vzorků. U imunochemických metod bývá hodnota LoQ totožná s koncentrací nejnižšího kalibrátoru. Z naměřených hodnot se tyto limity vypočítají pomocí průměru hodnot šumu a SD: **LoD** = průměr + 3SD; **LoQ** = průměr + 6SD (Beránek, 2013; Sengul, 2016).

Pracovní/měřicí rozsah („working/measuring interval“) definujeme jako uzavřený interval hodnot množství či obsahu měřené veličiny ve vzorku, pro který bylo validací potvrzeno, že metoda (postup) je v něm aplikovatelná (Plzák, 2022).

Pracovní rozsah měření je v podstatě interval koncentrací ohraničený zdola mezi stanovitelností. Horní konec rozsahu je definován koncentrací, při které dochází k výrazným anomáliím v analytické citlivosti (Magnusson *et al.*, 2014).

Analytická specifičnost („analytical specificity“) je schopnost měřicího postupu stanovovat pouze tu měřenou veličinu, která má být stanovena (Plzák, 2022).

Specifita je schopnost metody, která umožňuje zjistit analyt v přítomnosti jiných složek. Pokud metoda zachytí v průběhu měření i jinou složku, může to znamenat negativní ovlivnění výsledku. V takovém případě mluvíme o **interferenci**. Interference mohou být exogenního původu (kyselina askorbová, léky) i endogenního původu (bilirubin, hemoglobin, triacylglyceroly). Na analyzátoch jsou u každého vzorku stanoveny tzv. sérové indexy, které testují přítomnost endogenních interferujících látek (ikteritu, hemolýzu a chylozitu). Výsledky mohou ovlivnit i protilátky v případě zkřížených reakcí u imunochemických metod (Dastych, 2015; Racek, 2021).

Citlivost měřicího systému („sensitivity of measuring system“) definujeme jako podíl změny indikace měřicího systému a odpovídající změny hodnoty veličiny, která je měřena (Plzák, 2022).

Analytickou citlivost můžeme chápat jako nejmenší rozdíl koncentrací, který ještě lze rozlišit. Citlivost je určena směrnici kalibrační křivky tzn., čím je křivka strmější (odezva detektoru větší), tím je metoda citlivější (Dastych, 2015).

Klinická specifičnost („clinical specificity“) znamená četnost negativních výsledků u populace bez choroby, tzn. skutečně negativní výsledky (Plzák, 2022).

Klinická citlivost („clinical sensitivity“) je definována jako četnost pozitivních výsledků u populace s chorobou, tzn. skutečně pozitivní výsledky (Plzák, 2022).

Klinická/diagnostická specifičnost a citlivost dané metody nás informují o schopnosti potvrdit nebo vyloučit konkrétní diagnózu. Senzitivita/citlivost se vyjadřuje jako procento správné pozitivnosti u všech nemocných. Specifičnost je vyjádřením správné negativnosti u všech zdravých pacientů (Ďurovcová, 2020).

Referenční interval („reference interval“) je specifikovaný interval rozložení hodnot převzatý z biologického referenčního základního souboru (Plzák, 2022).

Referenční interval (RI) je taková hodnota, se kterou můžeme srovnávat laboratorní výsledky a podle které jsme schopni posoudit zdravotní stav pacienta. V praxi se intervaly získávají měřením velkého množství zdravých pacientů a následným statistickým vyhodnocením měřeného parametru v referenční populaci. Většina laboratoří přebírá RI od výrobců diagnostických souprav, který je definován jako 95% interval. Kromě RI se v praxi využívají **klinické rozhodovací meze** (cutt-off), které představují horní nebo dolní mez RI. Tyto mezní hodnoty se využívají v diagnostice a léčbě pacienta v laboratorní medicíně. Standardním nástrojem k určení cutt-off hodnot jsou postupy ROC analýzy (Ďurovcová *et al.*, 2020; Šálek *et al.*, 2016; Šprongl, 2014).

Stabilita analytů patří mezi neméně důležité znaky laboratorní medicíny. Stabilitu můžeme v klinické biochemii chápat jako časový prostor, ve kterém je udržena hodnota ve stanovených mezích tím, že stabilizuje vzorek, ve kterém jsou analyty analyzovány za určitých specifických podmínek. Změny způsobené nedostatečnou nebo nízkou stabilitou se odráží na výsledcích laboratorních testů používaných lékaři pro terapii pacientů. Pro laboratorní měření je při porušení stability séra/plazmy dlouhodobý kontakt s ostatními buněčnými složkami častou příčinou variability výsledků testů (Flores *et al.*, 2020).

Mezi hlavní zdroje variability laboratorních výsledků řadíme chyby v odběru, transportu a zpracování vzorku, dále náhodné a systematické chyby v analytickém procesu, přítomnost nemoci pacienta, ale především biologickou variabilitu. **Intraindividuální biologická variabilita** je dána rozptylem hodnot analytu u jednoho člověka. Lze ji minimalizovat dodržením podmínek při odběru, ne však zcela eliminovat. Příkladem může být vliv polohy těla, cirkadiálních rytmů, příjmu potravy. Naproti tomu je **interindividuální biologická variabilita** dána rozptylem hodnot analytu u různých jedinců z populace. Příkladem může být vliv pohlaví, věku a rasy. Variabilitu můžeme odhadnout z referenčního rozmezí, ale lze ji také hodnotit dle evropského seznamu kritérií. Tato databáze z roku 2019 je pod záštitou Evropské federace pro klinickou chemii a laboratorní medicínu (EFLM). Variabilita se také používá k nastavení analytických cílů kvality a k porovnání dvou po sobě jdoucích měření, tzv. **kritické diferenci**. Diferenci můžeme vypočítat, pokud chceme zjistit významnou odlišnost dvou naměřených hodnot po sobě u stejného testu a pacienta (Jabor, 2020; Racek, 2021).

2.3 Nejistota měření

Nejistota měření („uncertainty of measurement“) je dle terminologie definována jako nezáporný parametr charakterizující rozptýlení hodnot veličiny přiřazených k měřené veličině na základě použité informace (Plzák, 2022).

Tento nezáporný parametr je vztažen ke každému výsledku měření a vyjadřuje omezené teoretické i praktické možnosti analytického procesu měření. Přesný výsledek měření, který má nulovou nejistotu, v klinické praxi neexistuje. Každá naměřená hodnota je odhadem skutečné hodnoty, která se s určitou pravděpodobností nachází právě v okolí dané naměřené hodnoty. Nejistota zahrnuje vlivy, které mohou ovlivňovat výsledky, jako je systematická a náhodná chyba. Pro získání potřebných dat pro výpočet nejistoty je nutné provést několik měření. Tento proces se provádí 1x ročně v rámci verifikace na stabilním měřicím systému. Výsledky nejistot by měly být vydávány na 2 platné číslice. Pro jedno laboratorní vyšetření využíváme nejistoty ze snadno dostupných dat, vypočítáme tedy nejistotu pro jednotlivé koncentrace odpovídající materiálům používaným pro interní kontrolu kvality (Bartoš *et al.*, 2021; Ramsey *et al.*, 2019).

2.3.1 Výpočty nejistot

Dle nového doporučení ČSKB k vyjadřování nejistot z roku 2021 se nově do nejistoty nezapočítává bias (vychýlení). Předpokládáme, že bias není významný. Nejistotu můžeme vyjádřit jako absolutní (v jednotce měření) nebo relativní (v %).

Základní nejistoty:

Standardní nejistota (u) je složka, která přispívá ke kombinované nejistotě výsledku měření a vyjadřuje se ve formě směrodatné odchylky (SD).

Relativní standardní nejistota (u_{rel}) je nejistota vyjádřena v % a odpovídá variačnímu koeficientu (CV).

Relativní kombinovaná nejistota ($u_{c,rel}$) se vypočítá z dílčích nejistot jako:

$$u_{c,rel} = \sqrt{u_{1,rel}^2 + u_{2,rel}^2 + \dots + u_{n,rel}^2} \text{ [%]}$$

kde je: $u_{c,rel}$...relativní kombinovaná nejistota

$u_{1,rel}$ až $u_{n,rel}$...dílčí relativní standardní nejistoty

Relativní kombinovaná rozšířená nejistota ($U_{c,rel}$) se vypočítá jako:

$$U_{c,rel} = k \cdot u_{c,rel} \text{ [%]}$$

kde je: $U_{c,rel}$...relativní kombinovaná rozšířená nejistota

k ...koeficient rozšíření, $k = 2$, což odpovídá intervalu pokrytí 95 %

$u_{c,rel}$...relativní kombinovaná nejistota

2.3.2 Výpočet kombinované nejistoty

V rámci tohoto doporučení je cílem každé zdravotnické laboratoře výpočet právě relativní kombinované rozšířené nejistoty, která se neuvádí v rutinních laboratorních zprávách, ale měla by být k dispozici klinikům na vyžádání. Ze všech vypočtených nejistot vybereme a prezentujeme pouze jednu, a to sice nejistotu, která je největší (nejhorší). Dílčí nejistoty, které zahrnujeme do výpočtu celkové kombinované nejistoty, jsou nejistota charakterizující mezilehlou preciznost měření ($u_{Rw,rel}$) a nejistota kalibrátoru ($u_{cal,rel}$). Jako dílčí nejistoty se tedy nezapočítávají nejistoty spojené s preanalytickou a postanalytickou částí měření a intra a interindividuální biologickou variabilitou (Bartoš *et al.*, 2021).

Výpočet relativní standardní kombinované nejistoty se vypočítá z dosazení dílčích nejistot:

$$u_{c,rel} = \sqrt{u_{Rw,rel}^2 + u_{cal,rel}^2} [\%]$$

kde je: $u_{c,rel}$...relativní kombinovaná standardní nejistota

$u_{Rw,rel}$...relativní standardní nejistota

$u_{cal,rel}$...relativní standardní nejistota kalibrátoru získaná z dokumentace

Relativní standardní nejistotu vypočítáme jako podíl směrodatné odchylky a průměru:

$$CV_p = \frac{SD}{x_p} \cdot 100 [\%]$$

kde je: CV_p ...variační koeficient mezilehlé preciznosti měření

SD ...směrodatná odchylka naměřených hodnot

x_p ...aritmetický průměr naměřených hodnot

Pro klinickou interpretaci je finálním výsledkem výpočet: $U_{c,rel} = 2 \cdot u_{c,rel}$

2.3.3 Minimální a maximální přípustná velikost nejistoty

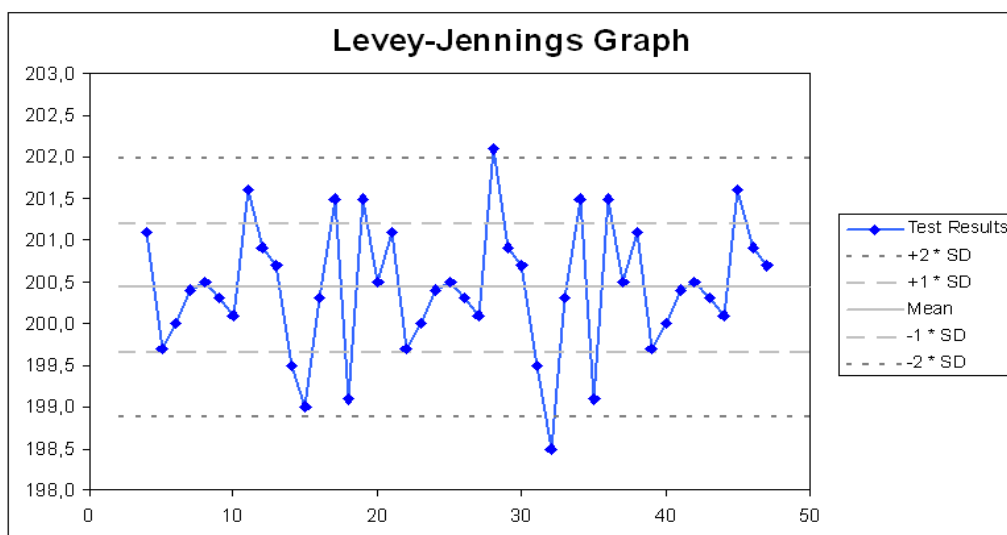
Přípustná velikost nejistoty měření informuje laboratoř o tom, jaká velikost nejistoty konkrétního parametru má být přijatelná. Minimální přípustné nejistoty se prakticky nelze dopracovat, protože nejistota je vždy větší než nula. Naopak maximální přípustná nejistota ($U_{c,rel \max}$) by měla odpovídat klinickým potřebám. Můžeme použít hodnoty odvozené z biologických variabilit, tedy určit kombinovanou nejistotu jako polovinu intraindividuální variability. Přehled o velikosti nejistot lze získat také ze zpráv poskytovatelů EHK a to odvozením od velikosti D_{\max} . Je doporučeno kritérium pro maximální přípustnou velikost nejistoty jako $U_{c,rel \max} = \frac{2}{3} D_{\max}$. Tento vztah poskytuje 90% šanci na úspěch, pokud systematická chyba měření nepřesáhne třetinu D_{\max} (Bartoš *et al.*, 2021).

2.4 Interní a externí hodnocení kvality kontrol

Pokud jsou splněny podmínky validace a verifikace v konkrétní laboratoři, může být analytický systém používán k diagnostickým účelům. Výsledky stanovení analytů musí být i při dlouhodobém používání analytických metod spolehlivé a kvalitní. Kvalita zajišťuje schopnost produktu vyhovět daným požadavkům. Mezi důležité prvky zabezpečení kvality řadíme vhodné laboratorní prostředí, zkušený personál, kalibrovaná zařízení, kalibrační a kontrolní materiály a standardy, dokumentace metod, návaznost výsledků, programy řízení kvality a interní audity. Kvalitu v laboratoři klinické biochemie kontrolujeme v rámci systému hodnocení kvality. Požadavky na kontrolu kvality určuje norma ČSN EN ISO 15189:2013. Rozlišujeme interní kontrolu kvality (IKK), kterou provádějí a vyhodnocují pracovníci laboratoře, a externí hodnocení kvality (EHK), které poskytují národní instituce v rámci mezilaboratorního porovnávání rutinních metod. Pro hodnocení kvality se využívají kontrolní materiály, které mají vlastnosti podobné reálným biologickým vzorkům (Beránek, 2013; Štern, 2011).

2.4.1 Interní kontrola kvality

Interní nebo také vnitřní kontrola kvality (IKK) zahrnuje měření známé koncentrace analytu z kontrolního materiálu. IKK je nástrojem prokázání stability analytického systému a zajištění validity laboratorních výsledků. Cílem je detekce a minimalizace analytických chyb. Výsledky IKK jsou využívány pro validaci a verifikaci metod, stejně jako k odhadu nejistot měření. Pro kontrolní materiály by měla být zajištěna dlouhodobá stabilita v rámci používaných šarží. Kontrolní materiál je do laboratoře dodáván v kapalně nebo lyofilizované formě od výrobce analytických souprav. Obvykle měříme minimálně dvě hladiny kontrol (negativní a pozitivní), ideálně až tři (nízká/normální/vysoká). Pro rutinní stanovení provádíme měření kontrol vždy před zahájením měření patientských vzorků, a to minimálně 1x denně. Dále je nutné měřit kontrolní vzorky vždy po kalibraci, výměně reagensů, servisním zásahu nebo jiném funkčním problému v analytickém systému. Výsledné hodnoty kontrolního materiálu jsou graficky znázorněny pomocí Levey-Jenningsova diagramu (Obr. 5), kde na ose x je čas a na ose y hodnota kontroly. Pro vyhodnocení grafu a detekci chyb používáme tzv. Westgardova pravidla. Pomocí pravidel zjistíme, zda je metoda stabilní a leží uvnitř tolerančních mezí, které jsou v grafu charakterizovány směrodatnou odchylkou (Braga *et al.*, 2021; Jabor, 2020; Šprongl *et al.*, 2022).



Obrázek 5 Regulační Levey-Jenningsův graf

Zdroj obrázku: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f6/Levy-Jennings_SampleChart.png

2.4.2 Externí hodnocení kvality

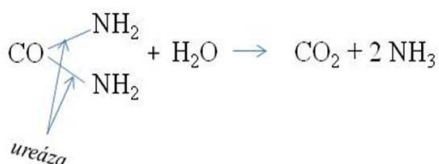
Externí hodnocení kvality (EHK) ověřuje porovnatelnost výsledků mezi různými laboratořemi. EHK je nástrojem monitorování kvality analytických systémů z hlediska harmonizace a mezilaboratorní reprodukovatelnosti. Principem je rozesílání totožných neznámých vzorků různým laboratořím zúčastněným v cyklu EHK, od kterých je požadováno stanovení koncentrací hodnocených analytů. Výsledky se zaznamenají do formuláře a odešlou do firmy SEKK s.r.o. (pro ČR), kde se porovnají výsledky všech laboratoří s referenčními hodnotami. Cykly EHK probíhají dle ročního plánu a jsou vyhodnoceny poskytovatelem. Úspěšné absolvování EHK v daném cyklu znamená, že rozdíl mezi naměřenou hodnotou v dané laboratoři a referenční hodnotou je menší než přijatelný rozdíl (D_{max}). Laboratoř obdrží osvědčení o účasti, dále certifikát, výsledkový list, souhrnnou statistiku a závěrečnou zprávu (Zima, 2020; Racek, 2021).

2.5 Vybrané biochemické a imunochemické metody

V této kapitole jsou stručně popsány některé biochemické a imunochemické metody, které byly vybrány pro experimentální část práce. Jednotlivé principy testů a referenční meze jsou převzaty z příslušných příbalových letáků pro dané metody. Z oblasti diagnostiky funkce ledvin je zde zmíněna močovina a kreatinin. Pro funkční vyšetření jater je charakterizován celkový bilirubin a enzym alaninaminotransferáza. Jako zástupce lipidového souboru je uveden LDL cholesterol a jako marker pro odhalení zánětlivého procesu v organismu C-reaktivní protein. Z imunochemických metod jsou zde popsány nejčastěji vyšetřované markery funkce štítné žlázy, thyreotropin a volný thyroxin. Jako poslední je zmíněn ukazatel srdečního poškození vysoce senzitivní troponin T.

2.5.1 Močovina

Močovina (**UREA**) je organická dusíkatá sloučenina syntetizována v játrech z amoniaku (Obr. 6). Urea je hlavním koncovým produktem metabolismu dusíku. Je vylučována především ledvinami, a proto je spolu s kreatininem běžným testem pro diagnostiku funkce ledvin. Zvýšená hladina močoviny může způsobit uremickou neuropatii, poškození nervů, glomerulární nefritidu, tubulární nekrózu i šokové stavy. Rizikovým vedlejším účinkem je obstrukce močových cest, gastrointestinální krvácení až selhání ledvin. Nižší hladiny močoviny mohou přispívat ke kachexii, nefritickému syndromu nebo selhání jater (Příbalový leták UREAL, 2022; Saravjeet, 2021).



Obrázek 6 Syntéza močoviny za katalýzy enzymem ureázou

Zdroj obrázku: https://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/files/50/5251.jpg

Princip stanovení: $\text{Močovina} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{NH}_4^+ + \text{CO}_3^{2-}$
 $\text{NH}_4^+ + 2\text{-oxoglutarát} + \text{NADH} \rightarrow \text{L-glutamát} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$

První reakce močoviny s vodou je hydrolyzována enzymem ureázou na amoniak a uhlíčan. Druhá reakce je katalyzována enzymem glutamátdehydrogenázou (GLDH) za vzniku NAD^+ (nikotinamidadenindinukleotidového kationtu), vody a L-glutamátu. Koncentrace NADH je přímo úměrná koncentraci močoviny ve vzorku, která je stanovena fotometricky.

Referenční meze: dospělí 2,76 – 8,07 mmol/l (Příbalový leták UREAL, 2022)

2.5.2 Kreatinin

Kreatinin (**CREA**) se syntetizuje ve svalech metabolizací kreatinu a kreatinfosfátu a je volně filtrován v glomerulech. Tzv. glomerulární filtrací je vylučován do moči a jeho koncentrace v séru i moči je zcela zásadní pro diagnostiku akutního a chronického onemocnění ledvin. K odhadu glomerulární filtrace se v praxi používá stanovení clearance kreatininu, které je senzitivnější pro ranné stádium akutního poškození ledvin. Hodnoty sérového kreatininu bývají výrazně nižší u žen, u nemocných se svalovou atrofií, při jaterní cirhóze, nebo malignitách. Zvýšená hladina kreatininu je především ukazatelem poškození glomerulů a může vést k chronickému selhání ledvin (Zima, 2017).

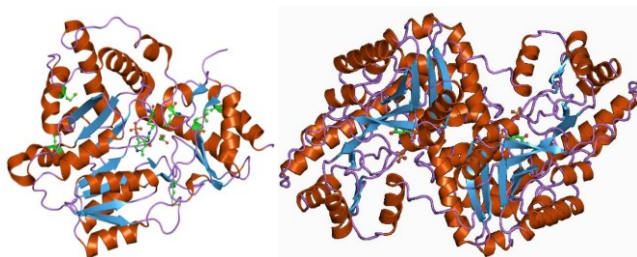
Princip stanovení: Kreatinin + kyselina pikrová → žlutooranžový komplex

Reakce probíhá v alkalickém prostředí a rychlost zabarvení vzniklého komplexu je přímo úměrná koncentraci kreatininu ve vzorku. Jedná se o fotometrické stanovení založené na tzv. Jaffého metodě.

Referenční meze: ženy 44 – 80 $\mu\text{mol/l}$; muži 62 – 106 $\mu\text{mol/l}$ (Příbalový leták CREJ2, 2022).

2.5.3 Alaninaminotransferáza

Alaninaminotransferáza (**ALT**), dříve známá jako glutamátpyruváttransamináza, je enzym specifický pro jaterní tkáň, který citlivěji reaguje na poškození jaterních buněk. Na rozdíl od aspartátaminotransferázy (AST) je enzym ALT (Obr. 7) lokalizován v cytosolu hepatocytů. V diagnostice chronických jaterních chorob hladina ALT výrazně převyšuje AST. U alkoholismu bývá naopak vyšší hladina AST. Vysoké hladiny transamináz jsou citlivé na poškození jater, ale mohou být také zvýšeny u jiných stavů, jako je onemocnění štítné žlázy, celiakie a onemocnění svalů. Hlavními důvody extrémně vysokých hladin ALT u poškození jater jsou akutní virové horečky, cirhóza, hepatitida, léky a toxiny (Mohammed, 2017; Urbánek 2018).



Obrázek 7 Struktura enzymu ALT a AST

Zdroj obrázku: <https://www.wikiskripta.eu/w/Aminotransfer%C3%A1zy>

Princip stanovení: L-alanin + 2-oxoglutarát → pyruvát + L-glutamát

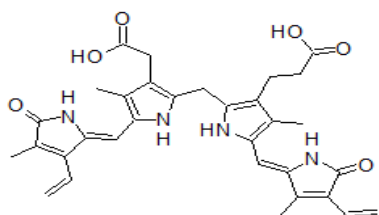
Pyruvát + NADH + H⁺ → L-laktát + NAD⁺

První reakce je katalyzována enzymem ALT za vzniku pyruvátu, který je poté redukován enzymem laktátdehydrogenázou (LDH) na L-laktát a NAD⁺. Rychlost oxidace NADH (nikotinamidadeninindinukleotidfosfátu) je přímo úměrná koncentraci aktivity ALT, která je stanovena poklesem absorbance. Aby nedocházelo k falešnému snížení aktivity ALT ve vzorcích pacientů, přidává se k metodě stanovení pyridoxalfosfát. Ten zajistí úplnou aktivaci enzymů.

Referenční meze: ženy 0,17 – 0,58 μkat/l; muži 0,17 – 0,83 μkat/l (Příbalový leták ALTPM, 2021).

2.5.4 Celkový bilirubin

Bilirubin (**BILT**) je produktem rozkladu hemu, který se uvolňuje při lýze erytrocytů. Narušuje řetězové reakce volných radikálů, a proto působí jako účinný antioxidant. Extrémně zvýšená koncentrace bilirubinu v séru má za následek nažloutlé zbarvení kůže, skléry a sliznice – hepatitidu. Celkový bilirubin (Obr. 8) je spolu s konjugovaným běžně využívaný v diagnostice novorozenecké žloutenky. Zvýšené hladiny bilirubinu bývají u dědičných poruch jako je Gilbertův syndrom a Crigler-Najarrův syndrom. U těchto poruch nedochází ke konjugaci bilirubinu s UDP-glukuronovou kyselinou. Důsledkem vyšších hladin je také intoxikace léky, alkoholem, zánět jater a žlučového, hemolytická anémie nebo poškození mozku. Hypobilirubinémie, nízká hladina bilirubinu, může vést ke kardiovaskulárním komplikacím, mrtvici, artritidě, kolitidě, kognitivním poruchám (Creeden *et al.*, 2021).



Obrázek 8 Vzorec bilirubinu

Zdroj obrázku: <https://www.wikiskripta.eu/w/Bilirubin#/media/Soubor:Bilirubin.png>

Princip stanovení: Bilirubin + 3,5-DPD → azobilirubin

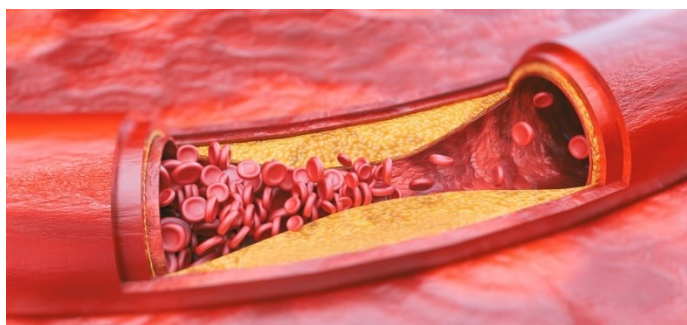
Bilirubin reaguje v kyselém prostředí s 3,5-dichlorofenyldiazoniem za vzniku červeného zbarvení, jehož intenzita je přímo úměrná celkovému bilirubinu a lze ji měřit fotometricky.

Referenční meze: dospělí 0 – 21 μmol/l (Příbalový leták BILT3, 2022).

2.5.5 LDL-cholesterol

Lipoproteiny o nízké hustotě (low density lipoproteins, **LDL**) patří spolu s lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL), cholesterolem a triacylglyceroly (TAG) mezi stanovované složky lipidového souboru. LDL jsou syntetizované v játrech a jejich funkcí je transport cholesterolu krví do okolních buněk a tkání k dalšímu využití. V jádře těchto lipoproteinů jsou výhradně estery cholesterolu, na povrchu fosfolipidy, volný cholesterol a jedna molekula apolipoproteinu B-100. Normálně je LDL rychle vylučován jaterními LDL receptory, ale pokud se hromadí v plazmě, ukládá se do cévní stěny, kde jeho cholesterolová složka spouští rozvoj aterosklerózy (Obr. 9). Proto je LDL-cholesterol označován jako hlavní rizikový faktor aterosklerózy. Zvýšené hladiny LDL sledujeme zejména u nemocných s diabetem, chorobami ledvin a kardiaků. Kromě fotometrického stanovení můžeme LDL vypočítat pomocí Friedewaldovy rovnice pro koncentraci TAG pod 4,5 mmol/l (Racek, 2021; Wolska, 2020), která zní:

$$\text{LDL-cholesterol} = \text{celkový cholesterol} - \text{HDL-cholesterol} - \text{TAG}/2,2$$



Obrázek 9 Zúžení cévní stěny důsledkem nahromadění a ukládání lipidů

Zdroj obrázku: <https://zdravi.euro.cz/leky/wp-content/uploads/2019/04/Ateroskleroza-1.jpg>

Princip stanovení: Estery LDL-cholesterolu + H₂O → cholesterol + volné mastné kyseliny
LDL-cholesterol + O₂ → Δ⁴-cholestenon + H₂O₂
2 H₂O₂ + 4-aminoantipyrin + EMSE + H₂O + H⁺ → barvivo + 5 H₂O

První reakce je katalyzována enzymem cholesterolesterázou, která štěpí estery cholesterolu na estery a volný cholesterol. Ten je dále v přítomnosti kyslíku oxidován enzymem cholesteroxidázou. Vzniklý peroxid vodíku reaguje za přítomnosti peroxidázy s vodou, EMSE (N-ethyl-N-(3-metylfenyl)-N-succinyletylendiamin) a 4-aminoantipyrinem za tvorby rudo-fialového zbarvení, jehož intenzita je přímo úměrná koncentraci cholesterolu.

Referenční meze: dospělí 1,2 – 3 mmol/l (Příbalový leták LDLC3, 2021).

2.5.6 C-reaktivní protein

C-reaktivní protein (**CRP**) je homopentamerní zánětlivý protein akutní fáze, který se v místech infekce nebo zánětu zvyšuje až 1000x. Je syntetizován primárně v jaterních hepatocytech, ale také v buňkách hladkého svalstva, makrofázích, endoteliálních buňkách, lymfocytech a adipocytech. Je tradičně užíván jako marker pro odlišení bakteriální a virové infekce a u kardiovaskulárních chorob. CRP hraje důležitou roli v zánětlivých procesech a reakcích hostitele na infekci, včetně dráhy komplementu, apoptózy, fagocytózy, uvolňování oxidu dusnatého a produkce cytokinů (interleukin 6 a tumor-nekrotizující faktor α). Zvýšené hladiny CRP jsou pozorovány u pacientů s akutní pankreatitidou, apendicitidou a meningitidou, u revmatoidní artritidy a kardiovaskulárních onemocnění (Sproston, 2018).

Princip stanovení: Imunoturbidimetrie. CRP aglutinuje s latexovými částicemi, které jsou potažené monoklonálními protilátkami proti CRP. Vzniklé agregáty se měří turbidimetricky.

Referenční meze: 0 – 5 mg/l (Příbalový leták CRP4, 2021).

2.5.7 Vysoce senzitivní Troponin T

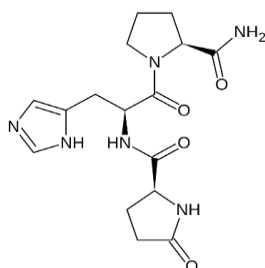
Vysoce senzitivní troponin T (**hs-TnT**) je citlivým markerem pro poškození myokardu. Fyziologicky se jedná o bílkovinu, která je složkou kontraktilního aparátu kosterního i srdečního svalu. Troponin T (TnT) se však vylučuje během nekrózy kardiomyocytů, proto je specifický výhradně pro srdce. Existuje ve třech komplexech: **T** (nasedá na tropomyosin), **I** (inhibiční troponin) a **C** (váže Ca^{2+}). V klinické praxi se využívají pro diagnostiku akutního infarktu myokardu (AIM) pouze troponiny T a I. Diagnostická souprava hs-TnT umožňuje detekovat hladinu troponinu dříve a stanovit tak koncentraci troponinu téměř u všech zdravých lidí. Koncentrace TnT může být zvýšena kromě AIM u stavů jako je kardiotoxická způsobená léky, myokarditida, plicní embolie, onemocnění ledvin (Park *et al.*, 2017; Racek, 2021).

Princip stanovení: ECLIA (elektrochemiluminiscence): Během 9minutové inkubace reagují antigen ve vzorku, biotinylovaná monoklonální protilátka specifická pro TnT, monoklonální protilátka značená rutheniovým komplexem a mikročástice potažené streptavidinem. Vzniká sendvičový komplex navázaný na pevnou fázi. Reakční směs je nasáta do měřicí cely s mikročásticemi komplexů, které jsou zachyceny magnetickým polem. Složky, které se nenaváží jsou odstraněny roztokem ProCell II M. Podstatou ECLIA je napětí na pracovní elektrodě, které vyvolá chemiluminiscenční emisi fotonů měřenou fotonásobičem.

Referenční meze: 0 – 14 ng/l (Příbalový leták Elecsys Troponin T hs, 2021).

2.5.8 Thyreotropní hormon

Thyreotropin (TSH), hormon stimulující štítnou žlázu, je glykoprotein (Obr. 10) vylučovaný specializovanými buňkami (thyrotrofy) sídlícími v přední hypofýze. Působením vazby na receptor stimuluje produkci a sekreci hormonů, diferenciaci a růst štítné žlázy. Klinicky se TSH využívá jako primární screeningový test dysfunkce štítné žlázy. Pokud je jeho koncentrace v normálu, můžeme dysfunkci s jistotou vyloučit. Dále jeho hladina slouží k monitorování hormonální substituční terapie štítné žlázy u pacientů s hypotyreózou, nebo karcinomem odvozeným z folikulárních buněk. U hypotyreózy neboli snížené funkce štítné žlázy, jsou koncentrace TSH zvýšené a u hypertyreózy naopak vždy snížené (Grasberger, 2017; Esfandiari, 2017).



Obrázek 10 Vzorec thyreotropinu

Zdroj obrázku: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/f8/Thyrotropin-releasing_hormone.svg/800px-Thyrotropin-releasing_hormone.svg.png

Princip stanovení: ECLIA: 30 μ l vzorku + biotinylovaná monoklonální protilátka proti TSH + monoklonální protilátka značená ruthenioým komplexem \rightarrow sendvičový komplex. Interakcí mezi biotinem a streptavidinem se komplex váže na pevnou fázi, směs je dále nasáta do měřicí cely, kde se mikročástice zachytí pomocí magnetického pole. Napětí vyvolá emisi fotonů měřenou fotonásobičem.

Referenční meze: dospělí 0,27 – 4,20 mU/l (Příbalový leták Elecsys TSH, 2022).

2.5.9 Volný thyroxin

Volný thyroxin (FT4) je účinnou volnou frakcí thyroxinu (T4, tetrajodthyroninu). Analytickým úkolem je měřit samotný FT4 bez narušení rovnováhy T4 a jeho vazebných proteinů. FT4 klinicky stanovujeme spolu s TSH při podezření poruchy štítné žlázy. Vztah mezi nimi je logaritmicko-lineární tzn., že malé změny FT4 vedou ke změně koncentrace TSH (Tab. 2). Hladina TSH obvykle stačí k vyloučení onemocnění štítné žlázy, měření FT4 je však diagnosticky využíváno k přímému monitorování léčby a odlišení subklinické hyper nebo hypotyreózy od té zjevné (Kratzsch *et al.*, 2021).

Tabulka 2 Laboratorní nálezy TSH a FT4 u poruch funkce štítné žlázy

FT4: ↑	Hyperthyreóza	Hypofyzární adenom produkující TSH	Hypofyzární adenom produkující TSH
FT4: normální	Subklinická hyperthyreóza T3-thyreotoxikóza	Normální funkce štítné žlázy	Subklinická hypothyreóza
FT4: ↓	Hypopituitarismus	Hypopituitarismus	Hypothyreóza
	TSH: ↓	TSH: normální	TSH: ↑

Zdroj dat: (Racek, 2021)

Princip stanovení: ECLIA: 9 µl vzorku reaguje se specifickou protilátkou proti T4 značenou rutheniovým komplexem. Po přidání biotinylového T4 a streptavidinem potaženým mikročásticemi vzniká komplex protilátka-hapten, který se váže na pevnou fázi prostřednictvím interakce biotin-streptavidin. Směs je nasáta do měřicí cely, kde jsou mikročástice zachyceny magnetickým polem a přivedené napětí vyvolá emisi fotonů měřenou fotonásobičem.

Referenční meze: dospělí 12 – 22 pmol/l (Příbalový leták Elecsys FT4 III, 2022).

3. CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části této práce bylo popsat validaci a verifikaci a s nimi spojené výkonnostní charakteristiky analytických metod se zaměřením na výpočet nejistoty měření dle nového doporučení ČSKB.

Cílem experimentální části práce bylo praktické provedení verifikace vybraných biochemických a imunochemických metod na dvou analytických systémech v laboratoři klinické biochemie. Naším záměrem bylo zjistit, zda metody vyhovují zamýšlenému použití pro klinickou praxi. Úkolem práce bylo také stanovit vybrané markery ve vzorcích séra pacientů na dvou automatických analyzátorech a následně porovnat a statisticky zhodnotit dosažené výsledky.

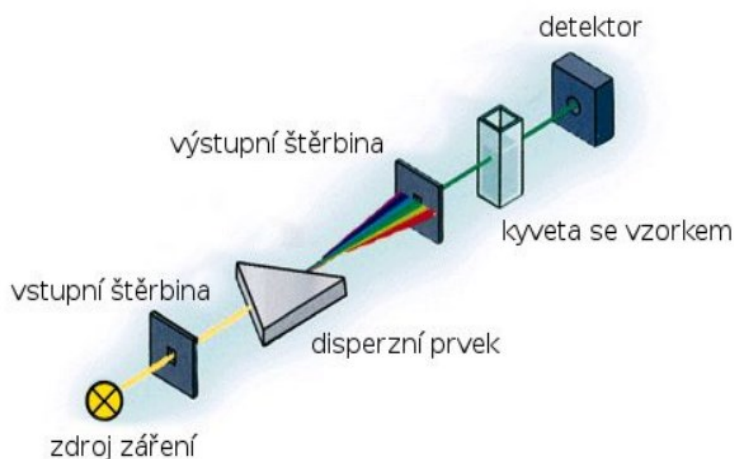
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Metodika stanovení

Ve většině klinicko-biochemických laboratoří jsou v současnosti na automatických analyzátořech rutinně měřeny klinicko-biochemické markery pomocí základních biochemických nebo imunochemických metod s využitím např. spektrofotometrické, turbidimetrické či chemiluminiscenční detekce.

4.1.1 Spektrofotometrie

Spektrofotometrická analýza zahrnuje stanovení koncentrace biomolekul v roztoku a je běžně využívaná v klinické biochemii i molekulární biologii. Obecně řadíme spektrofotometrii mezi optické metody zabývající se kvantitativním hodnocením změny intenzity záření, které prochází analytickým prostředím. Základním vztahem je Lambert-Beerův zákon, který říká, že výsledná absorbance je přímo úměrná látkové koncentraci a tloušťce absorbující vrstvy. V praxi se běžně využívají pro měření UV/VIS oblasti spekter fotometry a spektrofotometry. Spektrofotometry využívají mřížkový monochromátor, který mění vlnovou délku v širokém intervalu. Jsou tvořené zdrojem záření (žárovka, výbojka), mřížkou pro izolaci pásma zářivé energie a detektorem, který měří záření propuštěné vzorkem a převádí energii na elektrickou (např. detektor s diodovým polem). Mezi mřížku a detektor je vkládána kyveta s měřeným vzorkem (Obr. 11). Spektrofotometry snímají spektra běžných biochemických metod, jako je v případě naší práce UREA, CREA, BILT, ALT a LDL (Trumbo *et al.*, 2013; Zima, 2017).



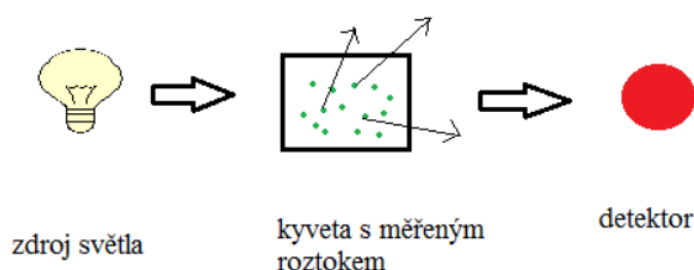
Obrázek 11 Schéma spektrofotometru

Zdroj obrázku:

https://is.muni.cz/el/1411/jaro2017/BVCP0222c/um/UV_Vis_spektrometrie.pdf

4.1.2 Imunoturbidimetrie

Turbidimetrie je optická metoda založená na měření procházejícího světla, které je zeslabené rozptylem na částicích v koloidních roztocích či suspenzích (Obr. 12). Absorpce záření je měřena spektrofotometry a fotometrická citlivost stanovení je nepřímo úměrná vlnové délce. Turbidimetrická imunoanalýza, zkráceně imunoturbidimetrie, detekuje množství agregátů, které jsou tvořeny aglutinací antigenu a monoklonální protilátky vázané na latexové částice. Antigeny jsou kvantifikovány detekcí poklesu procházejícího světla prostřednictvím změny absorbance (turbidity). Mezi metody, které jsou založené na měření stupně zákalu, řadíme kromě typického zánětlivého markeru CRP také imunoglobuliny, nebo trombofilní marker D-dimer (Hiraoka *et al.*, 2019; Zima, 2017).



Obrázek 12 Schéma imunoturbidimetrie

Zdroj obrázku:

https://www.wikiskripta.eu/images/f/f7/Imunoturbidimetrie_a_imunonefelometrie.png

4.1.3 Elektrochemiluminiscence

Chemiluminiscence patří mezi luminiscenční metody, kdy dochází na základě chemické reakce k excitaci fotonů. Pokud dochází k aktivaci činidel oxidací na anodě hovoříme o elektrochemiluminiscenci (ECLIA). Metoda využívá elektrochemické potenciály k produkci fotoluminiscence. Klíčovou součástí analýzy jsou luminofory používané jako signální sondy a elektrodová zařízení, která indukují chemické reakce. Mezi nejběžnější luminofory řadíme ruthenium a luminol. Podstatou ECLIA je tedy elektrické napětí na pracovní elektrodě, které vyvolá chemiluminiscenční emisi fotonů měřenou fotonásobičem. Mezi imunochemické metody stanovené principem ECLIA řadíme kostní, tumorové, kardiální markery a hormony. Z našich vybraných metod jsou to markery štítné žlázy TSH, FT4 a srdeční marker hs-TnT (Hiramoto *et al.*, 2020; Zima, 2017).

4.2 Automatické analyzátory

Měření vzorků pro verifikace, opakovatelnost a porovnatelnost jsme prováděli na dvou automatických analyzátorech v laboratoři klinické biochemie na pracovišti EUC Laboratoře s.r.o. Používali jsme přístroje Cobas 8000 a 6000 od stejného dodavatele Roche s.r.o., výrobce Hitachi Corporation.

Cobas 8000 je v porovnání se starším typem 6000 výkonnější, rychlejší a umožňuje během hodiny provést mnohem více testů.

4.2.1 Cobas 8000

Automatický analyzátor Cobas 8000 je složen z ISE jednotky, dvou biochemických modulů c702 a c502 a jednoho imunochemického modulu e801 (Obr. 13). Specifikace pro jednotlivé moduly:

- c702** – 2000 testů/hod, fotometrické stanovení, 70 reagenčních pozic
- c502** – 600 testů/hod, fotometrické stanovení, 60 reagenčních pozic
- e801** – 300 testů/hod, ECLIA, 48 reagenčních pozic



Obrázek 13 Cobas 8000 (ISE, c702, c502, e801)

Zdroj obrázku: EUC Laboratoře s.r.o., vlastní foto

4.2.2 Cobas 6000

Automatický analyzátor Cobas 6000 je složen z biochemického modulu c501 a imunochemického modulu e601 (Obr. 14). Základní specifikace pro jednotlivé moduly:

c501 – 1000 testů/hod, ISE a fotometrické stanovení, 60 reagenčních pozic

e601 – 170 testů/hod, ECLIA, 25 reagenčních pozic



Obrázek 14 Cobas 6000 (c501, e601)

Zdroj obrázku: EUC Laboratoře s.r.o., vlastní foto

4.3 Reagencie a pomocné roztoky

Reagenční kazety pro stanovení vybraných markerů s využitím biochemických (Obr. 15) a imunochemických metod (Obr. 16), které byly použity v rámci verifikace a opakovatelnosti pro oba analyzátory, shrnuje tabulka 3. Další pomocné a promývací roztoky, které jsou součástí automatických analyzátorů a bez kterých by jednotlivá stanovení nebyla proveditelná, jsou shrnuty v následujícím přehledu (Tab. 4).

Tabulka 3 Použité reagenční kazety

COBAS 8000			COBAS 6000		
Test	Šarže	Expirace	Test	Šarže	Expirace
UREA	583200	31.7.2022	UREA	579537	30.6.2022
CREA	591167	31.7.2023	CREA	579387	30.6.2023
BILT	567728	28.2.2023	BILT	561813	31.1.2023
ALT	580810	31.12.2022	ALT	586412	31.1.2023
LDL	554157	30.4.2023	LDL	535837	31.1.2023
CRP	576796	30.9.2022	CRP	576792	30.9.2022
TNT	523685	31.7.2022	TNT	512050	31.5.2022
TSH	583118	31.3.2023	TSH	581577	30.11.2022
FT4	572941	30.9.2022	FT4	579081	31.10.2022

Tabulka 4 Použité pomocné a promývací roztoky

Reagencie, roztoky	Modul	Popis
Sample Cleaner 1, 2	c702, c502, c501	Mycí roztoky vzorkové jehly
CellCln 1 NaOH-D	c702, c502, c501	Alkalický roztok pro reakční kyvety
CellCln 2 Acid Wash	c702, c502, c501	Kyselý roztok pro mytí reakčních kyvet
NaOH-D, SMS	c702, c502, c501	Mycí roztoky reagenční jehly a kyvet
ECO-D	c702, c502, c501	Detergent, brání tvorbě bublin
NaCl 9%	c702, c502, c501	Roztok pro ředění vzorků
Diluent Universal, Multiassay	e601, e801	Roztoky pro ředění vzorků
PreClean II M	e601, e801	Roztok pro odstranění interferujících látek při detekci signálu
ProCell II M	e601, e801	Roztok pro vytváření elektrochem. signálu
CleanCell M	e601, e801	Roztok pro čištění systému hadiček a měřicí cely po každém měření
ProbeWash M	e601	Roztok pro čištění reagenční jehly



Obrázek 15 Reagencie pro biochemické metody

Zdroj obrázku: EUC Laboratoře s.r.o., vlastní foto

Pro biochemické metody jsou využívány stejné reagenční soupravy. Odlišností je reagenzie testu ALT na obrázku 15 dole pro modul c702, kterou musíme před vložením na palubu připravit promícháním pyridoxalfosfátu s pufrům a přenést do reagenční pozice B. CRP před vložením na palubu také promícháváme, a to z důvodu promísení latexových částic.



Obrázek 16 Reagencie pro imunochemické metody

Zdroj obrázku: EUC Laboratoře s.r.o., vlastní foto

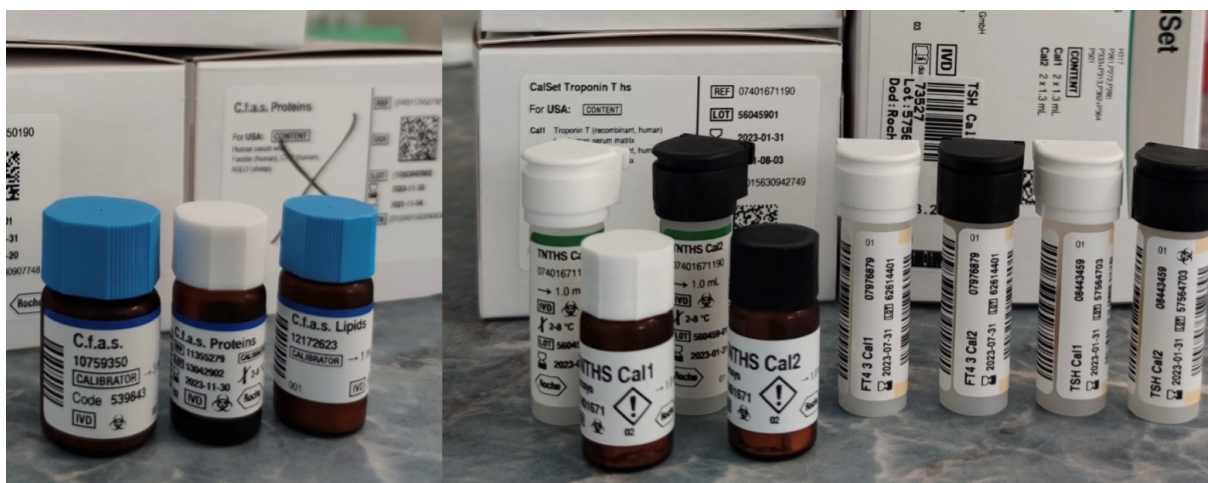
Reagencie na obrázku 16 vlevo se pro modul e601 vkládají do reagenčního kruhu pootevřené, naproti tomu reagenzie pro imunochemický modul e801 vkládáme do reagenčního výtahu vždy zavřené. Reagenční kazety musí být ve svislé poloze nepromíchané a před vložením na palubu vždy kontrolujeme a případně odstraníme přítomnost bublin.

4.4 Kalibrační a kontrolní materiál

Veškeré kalibrační (Obr. 17) a kontrolní materiály (Obr. 18), které jsme použili pro měření verifikace a opakovatelnosti na obou analyzátozech, byli od stejného dodavatele firmy Roche s.r.o. a jsou shrnuty v tabulce 5. Kalibrátor C.f.a.s. („Calibrator for automated systems“) se využívá pro kalibraci základních biochemických metod, v našem případě pro metody CREA, UREA, BILT a ALT. Proteinový kalibrátor „C.f.a.s. Proteins“ se speciálně využívá pro metodu CRP a „C.f.a.s. Lipids“ pro kalibraci lipoproteinů LDL. Imunochemické metody mají své vlastní kalibrátory označovány CalSet, které jsou dodávány kromě lyofilizované formy také v kapalně formě. Lyofilizovaná forma kalibračních a kontrolních vzorků sebou nese riziko chybovosti při ředění laboratorním pracovníkem, proto se doporučují používat kapalně vzorky. Pro všechny biochemické metody jsme použili kontrolní materiál „PeciControl ClinChem Multi“ 1 a 2 (PCCC1, PCCC2), pro markery štítné žlázy kontrolní materiál „PeciControl Universal“ (PC U1, PC U2) a pro hs-TnT „PeciControl Troponin“ (PC TN1, PC TN2).

Tabulka 5 Použitý kalibrační a kontrolní materiál

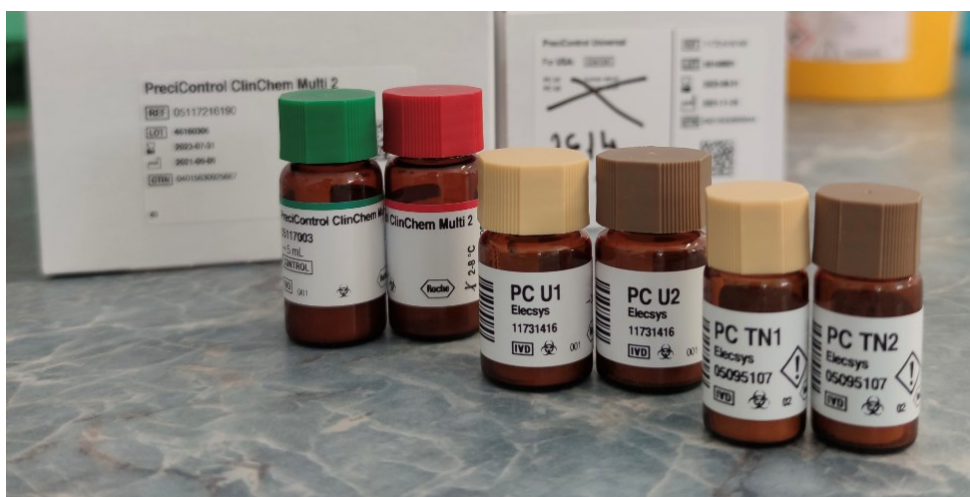
COBAS 8000			COBAS 6000		
Kalibrátor	Šarže	Expirace	Kalibrátor	Šarže	Expirace
CFAS	499017	28.2.2023	CFAS	479241	31.8.2022
CFAS proteins	518756	31.5.2023	CFAS proteins	471492	31.10.2022
CFAS lipids	502643	31.5.2022	CFAS lipids	502643	31.5.2022
CalSet TNT	560459	31.1.2023	CalSet TNT	481682	31.1.2022
CalSet TSH	575647	31.1.2023	CalSet TSH	523681	30.4.2022
CalSet FT4	541052	31.8.2022	CalSet FT4	586657	30.4.2023
Kontrola	Šarže	Expirace	Kontrola	Šarže	Expirace
PCCC1	494173	30.6.2023	PCCC1	410110	31.10.2022
PCCC2	461595	31.1.2023	PCCC2	410105	31.10.2022
PC TN1	534562	31.10.2022	PC TN1	534562	31.10.2022
PC TN2	534576	31.10.2022	PC TN2	534576	31.10.2022
PC U1	506211	28.2.2023	PC U1	506211	28.2.2023
PC U2	506213	28.2.2023	PC U2	506213	28.2.2023



Obrázek 17 Použitý kalibrační materiál

Zdroj obrázku: EUC Laboratoře s.r.o., vlastní foto

Kalibrátory pro biochemické metody C.f.a.s. a „C.f.a.s. Lipids“ jsme před použitím rozpustili v destilované vodě. „C.f.a.s. Proteins“ je dodáván v kapalně formě. Pro imunochemické metody jsou většinou dodávány kalibrátory v kapalně formě, avšak CalSet pro hs-TnT bylo také nutné rozpustit. Rozpuštěné imunochemické kalibrátory byly uchovávané v chladničce při 2-8 °C po dobu maximálně 3 měsíců, biochemické po rozpuštění byly rozpipetovány do mikrozkušavek a zamrazeny při (-15)-(-25) °C pro další použití.



Obrázek 18 Použitý kontrolní materiál

Zdroj obrázku: EUC Laboratoře s.r.o., vlastní foto

Kontrolní materiály pro naše vybrané metody po rozpuštění lyofilizované formy byly také rozpipetovány do mikrozkušavek a zamrazeny při (-15)-(-25) °C pro další použití.

4.5 Použitý software

Pro zpracování výsledků verifikace a opakovatelnosti jsme pro oba automatické analyzátory použili výpočty a tabulky zhotovené v programu Microsoft Excel (Office 365). Pro zpracování výsledků porovnatelnosti metod mezi analyzátory jsme použili statistický program MedCalc, který je využíván v biomedicínských vědách.

4.6 Testovaný soubor vzorků

Pro verifikaci metod na obou analyzátorech jsme použili kontrolní materiál PCCC1/2 pro biochemické metody a PC U1/2, PC TN1/2 pro imunochemické metody od firmy Roche s.r.o. Měření jsme prováděli na dvou kontrolních hladinách (negativní a pozitivní) každý den po dobu jednoho měsíce. Hodnotili jsme celkem 22 měření za období měsíce prosince 2021.

Pro opakovatelnost jsme na obou analyzátorech použili směsná séra pacientů. Měření jsme prováděli také na dvou hladinách, a to 10x za sebou. Měření vzorků v sérii jsme provedli pro analyzátor Cobas 8000 dne 30.12.2021 a pro analyzátor Cobas 6000 dne 31.12.2021.

Pro porovnatelnost mezi dvěma analytickými systémy Cobas 8000 a 6000 jsme použili 100 směsných patientských vzorků. Séra byla vybrána pro muže a ženy v rozmezí věku 15–93 let s různými fyziologickými a patologickými hodnotami. Měření jsme prováděli průběžně za období únor–březen 2022.

5. VÝSLEDKY

5.1 Verifikace

Výsledky verifikace pro oba analyzátory Cobas 8000 a 6000 jsme zpracovali v programu Microsoft Excel. Provedli jsme základní výpočty z celkového počtu měřených kontrolních vzorků (n) pro aritmetický průměr (x_p), směrodatnou odchylku (SD) a variační koeficient mezilehlé preciznosti měření (CV_p). Pro výpočet dílčí nejistoty kalibrátoru ($u_{cal,rel}$) dané metody jsme použili dokumentaci z portálu Roche DiaLog dle katalogového čísla pro jednotlivé kalibrátory. Výslednou nejistotu měření ($U_{c,rel}$) jsme porovnávali s maximální přijatelnou hodnotou rozdílu D_{max} v dokumentaci EHK od firmy SEKK s.r.o. pro rok 2022 (dostupné na <https://www.sekk.cz>). Zhodnotili jsme, zda je metoda vyhovující pro zamýšlené použití.

5.1.1 Verifikace metod analytického systému Cobas 8000

Výsledky verifikace metod pro automatický analyzátor Cobas 8000 jsme zaznamenali do tabulek, zvlášť pro negativní (Tab. 6) a pozitivní hladinu kontrol (Tab. 7).

Tabulka 6 Verifikace metod (negativní hladiny kontrol) na analyzátoru Cobas 8000

COBAS 8000 – VERIFIKACE (negativní hladina)											
Šarže	Test	Jednotky	n	x_p	SD	CV_p (%)	$u_{cal,rel}$ (%)	$U_{c,rel}$ (%)	D_{max} (%)	D_{max} 2/3(%)	Vyhovující ANO/NE
583200	UREA	mmol/l	22	6,5	0,16	2,39	0,93	5,1	15	10	ANO
591167	CREA	μ mol/l	22	98	2,65	2,69	0,71	5,6	13	8,7	ANO
567728	BILT	μ mol/l	22	17,2	0,32	1,84	0,42	3,8	21	14,1	ANO
580810	ALT	μ kat/l	22	0,81	0,02	2,47	0,31	5	15	10	ANO
554157	LDL	mmol/l	22	1,65	0,02	0,93	0,56	2,2	15	10	ANO
576796	CRP	mg/l	22	9,5	0,11	1,16	1,07	3,2	24	16,1	ANO
523685	TNT	ng/l	22	25	0,61	2,43	0,46	4,9	22	14,7	ANO
583118	TSH	mU/l	22	1,3	0,03	2,03	0,56	4,2	14	9,4	ANO
572941	FT4	pmol/l	22	15	0,32	2,14	0,77	4,5	13	8,7	ANO

n = počet měření; x_p = aritmetický průměr měření; SD = směrodatná odchylka

CV_p (%) = variační koeficient mezilehlé preciznosti měření

$u_{cal,rel}$ (%) = relativní standardní nejistota kalibrátoru

$U_{c,rel}$ (%) = relativní kombinovaná rozšířená nejistota

D_{max} (%) = přijatelný rozdíl

Tabulka 7 Verifikace metod (pozitivní hladiny kontrol) na analyzátoru Cobas 8000

COBAS 8000 – VERIFIKACE (pozitivní hladina)											
Šarže	Test	Jednotky	n	x_p	SD	CV _p (%)	$u_{cal,rel}$ (%)	$U_{c,rel}$ (%)	Dmax (%)	Dmax 2/3(%)	Vyhovující ANO/NE
583200	UREA	mmol/l	22	19,9	0,30	1,50	0,93	3,5	15	10	ANO
591167	CREA	μmol/l	22	378	6,58	1,74	0,71	3,8	13	8,7	ANO
567728	BILT	μmol/l	22	63,9	0,64	0,99	0,42	2,2	21	14,1	ANO
580810	ALT	μkat/l	22	2,06	0,02	1,18	0,31	2,4	15	10	ANO
554157	LDL	mmol/l	22	2,79	0,02	0,63	0,56	1,7	15	10	ANO
576796	CRP	mg/l	22	52,9	1,12	2,12	1,07	4,7	24	16,1	ANO
523685	TNT	ng/l	22	1914	42,6	2,23	0,46	4,6	22	14,7	ANO
583118	TSH	mU/l	22	8,40	0,13	1,58	0,56	3,4	14	9,4	ANO
572941	FT4	pmol/l	22	34,4	0,57	1,66	0,77	3,7	13	8,7	ANO

Na základě výpočtu dílčích nejistot uvedených v tabulce 6 a 7 jsme vyhodnotili velikost relativní kombinované rozšířené nejistoty $U_{c,rel}$ pro negativní a pozitivní hladinu kontrol vybraných metod pro analyzátor Cobas 8000. Jako přísnější kritérium pro hodnocení nejistoty měření jsme vypočítali 2/3 z celkové hodnoty Dmax, kterou jsme získali z dokumentace EHK. S hodnotami Dmax jsme porovnali všechny naše získané výsledky $U_{c,rel}$. Výsledné nejistoty jsou menší, než maximální přijatelné hodnoty. Z výsledků verifikace vyplývá, že metody vyhovují zamýšlenému použití.

5.1.2 Verifikace metod analytického systému Cobas 6000

Výsledky verifikace metod pro automatický analyzátor Cobas 6000 jsme také zaznamenali do tabulek, zvláště pro negativní (Tab. 8) a pozitivní hladinu kontrol (Tab. 9).

Tabulka 8 Verifikace metod (negativní hladiny kontrol) na analyzátoru Cobas 6000

COBAS 6000 – VERIFIKACE (negativní hladina)											
Šarže	Test	Jednotky	n	x_p	SD	CV _p (%)	u _{cal,rel} (%)	U _{c,rel} (%)	Dmax (%)	Dmax 2/3(%)	Vyhovující ANO/NE
579537	UREA	mmol/l	22	6,5	0,08	1,19	0,93	3	15	10	ANO
579387	CREA	μmol/l	22	95	2,22	2,34	0,71	4,9	13	8,7	ANO
561813	BILT	μmol/l	22	17,3	0,25	1,47	0,42	3,1	21	14,1	ANO
586412	ALT	μkat/l	22	0,78	0,01	1,79	0,31	3,6	15	10	ANO
535837	LDL	mmol/l	22	1,71	0,02	1,16	0,56	2,6	15	10	ANO
576792	CRP	mg/l	22	8,9	0,18	2,05	1,07	4,6	24	16,1	ANO
512050	TNT	ng/l	22	24,4	0,46	1,90	0,46	3,9	22	14,7	ANO
581577	TSH	mU/l	22	1,35	0,03	2,43	0,56	5	14	9,4	ANO
579081	FT4	pmol/l	22	14,9	0,38	2,57	0,77	5,4	13	8,7	ANO

Tabulka 9 Verifikace metod (pozitivní hladiny kontrol) na analyzátoru Cobas 6000

COBAS 6000 – VERIFIKACE (pozitivní hladina)											
Šarže	Test	Jednotky	n	x_p	SD	CV _p (%)	u _{cal,rel} (%)	U _{c,rel} (%)	Dmax (%)	Dmax 2/3(%)	Vyhovující ANO/NE
579537	UREA	mmol/l	22	19,9	0,15	0,75	0,93	2,4	15	10	ANO
579387	CREA	μmol/l	22	341	4,52	1,33	0,71	3	13	8,7	ANO
561813	BILT	μmol/l	22	63,4	0,98	1,54	0,42	3,2	21	14,1	ANO
586412	ALT	μkat/l	22	2,04	0,04	1,81	0,31	3,7	15	10	ANO
535837	LDL	mmol/l	22	2,69	0,03	1,22	0,56	2,7	15	10	ANO
576792	CRP	mg/l	22	52,5	0,88	1,67	1,07	4	24	16,1	ANO
512050	TNT	ng/l	22	1855	36,3	1,95	0,46	4	22	14,7	ANO
581577	TSH	mU/l	22	8,45	0,12	1,42	0,56	3,1	14	9,4	ANO
579081	FT4	pmol/l	22	34,1	0,73	2,15	0,77	4,6	13	8,7	ANO

Na základě výpočtu dílčích nejistot uvedených v tabulce 8 a 9 jsme vyhodnotili velikost relativní kombinované rozšířené nejistoty $U_{c,rel}$ pro negativní a pozitivní hladinu kontrol vybraných metod pro analyzátor Cobas 6000. Pro hodnocení nejistoty měření jsme rovněž vypočítali 2/3 z celkové hodnoty D_{max} , kterou jsme získali z dokumentace EHK. S hodnotami D_{max} jsme porovnali všechny naše získané výsledky $U_{c,rel}$. Výsledné nejistoty jsou menší, než maximální přijatelné hodnoty. Z výsledků verifikace vyplývá, že metody vyhovují zamýšlenému použití.

Pokud si lékař přeje dokumentaci výsledné nejistoty pro jakoukoliv metodu na vyžádání, vždy vydáváme takovou nejistotu, která je nejvyšší (nejhorší) bez ohledu na negativní nebo pozitivní hladinu. Přehled všech výsledných nejistot měření uvádí tabulka 10. Nejhorší nejistotu podle pesimistického přístupu 5,6 % má pro Cobas 8000 metoda CREA. Pro Cobas 6000 vyšla nejvyšší nejistota metody FT4 5,4 %.

Tabulka 10 Přehled výsledných nejistot měření

Test	Jednotky	COBAS 8000			COBAS 6000		
		$U_{c,rel}$ negativní (%)	$U_{c,rel}$ pozitivní (%)	$U_{c,rel}$ na vyžádání (%)	$U_{c,rel}$ negativní (%)	$U_{c,rel}$ pozitivní (%)	$U_{c,rel}$ na vyžádání (%)
UREA	mmol/l	5,1	3,5	5,1	3	2,4	3
CREA	μ mol/l	5,6	3,8	5,6	4,9	3	4,9
BILT	μ mol/l	3,8	2,2	3,8	3,1	3,2	3,2
ALT	μ kat/l	5	2,4	5	3,6	3,7	3,7
LDL	mmol/l	2,2	1,7	2,2	2,6	2,7	2,7
CRP	mg/l	3,2	4,7	4,7	4,6	4	4,6
TNT	ng/l	4,9	4,6	4,9	3,9	4	4
TSH	mU/l	4,2	3,4	4,2	5	3,1	5
FT4	pmol/l	4,5	3,7	4,5	5,4	4,6	5,4

5.2 Opakovatelnost

Výsledky opakovatelnosti pro oba analyzátoři Cobas 8000 a 6000 jsme také zpracovali v programu Microsoft Excel. Provedli jsme základní výpočty z celkového počtu měřených vzorků (n) pro aritmetický průměr (x_p) a směrodatnou odchylku (SD). Vypočítali jsme variační koeficienty pro mezilehlou preciznost měření (CV_p) a tyto hodnoty jsme rovněž porovnávali s D_{max} hodnotami z dokumentace EHK od firmy SEKK s.r.o. pro rok 2022. Zhodnotili jsme, zda jsou metody vyhovující a jaká je chybovost při měření v sérii.

5.2.1 Opakovatelnost metod pro analytický systém Cobas 8000

Výsledky opakovatelnosti metod pro automatický analyzátoři Cobas 8000 jsme zaznamenali do tabulek, zvlášť pro negativní (Tab. 11) a pozitivní hladinu vzorků (Tab. 12).

Tabulka 11 Opakovatelnost metod (negativní hladiny vzorků) na analyzátoři Cobas 8000

COBAS 8000 – OPAKOVATELNOST (negativní hladina)								
Test	Jednotky	n	x_p	SD	CV_p (%)	D_{max} (%)	D_{max} 2/3(%)	Vyhovující ANO/NE
UREA	mmol/l	10	5,5	0,07	1,22	15	10	ANO
CREA	μ mol/l	10	174	3,65	2,10	13	8,7	ANO
BILT	μ mol/l	10	14,9	0,24	1,58	21	14,1	ANO
ALT	μ kat/l	10	0,51	0,02	4,51	15	10	ANO
LDL	mmol/l	10	1,66	0,01	0,51	15	10	ANO
CRP	mg/l	10	2,7	0,07	2,67	24	16,1	ANO
TNT	ng/l	10	26,7	0,19	0,71	22	14,7	ANO
TSH	mU/l	10	1,62	0,01	0,61	14	9,4	ANO
FT4	pmol/l	10	15,6	0,33	2,09	13	8,7	ANO

n = počet měření

x_p = aritmetický průměr měření

SD = směrodatná odchylka

CV_p (%) = variační koeficient mezilehlé preciznosti měření

D_{max} (%) = přijatelný rozdíl

Tabulka 12 Opakovatelnost metod (pozitivní hladiny vzorků) na analyzátoru Cobas 8000

COBAS 8000 – OPAKOVATELNOST (pozitivní hladina)								
Test	Jednotky	n	x_p	SD	CV _p (%)	Dmax (%)	Dmax 2/3(%)	Vyhovující ANO/NE
UREA	mmol/l	10	16,6	0,14	0,87	15	10	ANO
CREA	μmol/l	10	438	5,30	1,21	13	8,7	ANO
BILT	μmol/l	10	66,9	0,47	0,70	21	14,1	ANO
ALT	μkat/l	10	1,72	0,01	0,49	15	10	ANO
LDL	mmol/l	10	3,33	0,02	0,66	15	10	ANO
CRP	mg/l	10	9,9	0,03	0,32	24	16,1	ANO
TNT	ng/l	10	1804	14,8	0,82	22	14,7	ANO
TSH	mU/l	10	8,42	0,11	1,32	14	9,4	ANO
FT4	pmol/l	10	35,3	0,23	0,64	13	8,7	ANO

Na základě výpočtu průměrů a odchylek uvedených v tabulce 11 a 12 jsme vyhodnotili velikost variačního koeficientu mezilehlé preciznosti měření CV_p pro negativní a pozitivní hladinu vzorků vybraných metod pro analyzátor Cobas 8000. Pro hodnocení koeficientu mezilehlé preciznosti jsme také použili výpočet 2/3 z celkové hodnoty Dmax, kterou jsme získali z dokumentace EHK. S hodnotami Dmax jsme porovnali všechny naše získané výsledky CV_p. Výsledné variační koeficienty mezilehlé preciznosti měření jsou menší než maximální přijatelné hodnoty. Z výsledků opakovatelnosti vyplývá, že metody vyhovují zamýšlenému použití. Největší chybovost při opakovatelnosti, neboli měření vzorků v sérii, jsme zaznamenali pro metodu ALT, jejíž hodnota **4,51 %** byla nejvyšší. Nejmenší chybovost vykazovala s **0,32 %** metoda CRP.

5.2.2 Opakovatelnost metod pro analytický systém Cobas 6000

Výsledky opakovatelnosti metod pro automatický analyzátor Cobas 6000 jsme také zaznamenali do tabulek, zvlášť pro negativní (Tab. 13) a pozitivní hladinu vzorků (Tab. 14).

Tabulka 13 Opakovatelnost metod (negativní hladiny vzorků) na analyzátoru Cobas 6000

COBAS 6000 – OPAKOVATELNOST (negativní hladina)								
Test	Jednotky	n	x_p	SD	CV _p (%)	Dmax (%)	Dmax 2/3(%)	Vyhovující ANO/NE
UREA	mmol/l	10	5,5	0,06	1,15	15	10	ANO
CREA	μmol/l	10	178	2,88	1,62	13	8,7	ANO
BILT	μmol/l	10	14,6	0,19	1,27	21	14,1	ANO
ALT	μkat/l	10	0,45	0,02	4,43	15	10	ANO
LDL	mmol/l	10	1,68	0,03	1,70	15	10	ANO
CRP	mg/l	10	2,5	0,05	1,91	24	16,1	ANO
TNT	ng/l	10	25	0,29	1,15	22	14,7	ANO
TSH	mU/l	10	1,58	0,01	0,95	14	9,4	ANO
FT4	pmol/l	10	16,3	0,39	2,40	13	8,7	ANO

Tabulka 14 Opakovatelnost metod (pozitivní hladiny vzorků) na analyzátoru Cobas 6000

COBAS 6000 – OPAKOVATELNOST (pozitivní hladina)								
Test	Jednotky	n	x_p	SD	CV _p (%)	Dmax (%)	Dmax 2/3(%)	Vyhovující ANO/NE
UREA	mmol/l	10	16,7	0,15	0,90	15	10	ANO
CREA	μmol/l	10	449	6,09	1,36	13	8,7	ANO
BILT	μmol/l	10	65,3	0,33	0,51	21	14,1	ANO
ALT	μkat/l	10	1,68	0,01	0,69	15	10	ANO
LDL	mmol/l	10	3,43	0,03	0,99	15	10	ANO
CRP	mg/l	10	9,8	0,03	0,32	24	16,1	ANO
TNT	ng/l	10	1789	11,4	0,64	22	14,7	ANO
TSH	mU/l	10	7,99	0,13	1,58	14	9,4	ANO
FT4	pmol/l	10	35,8	0,32	0,91	13	8,7	ANO

Na základě výpočtu průměrů a odchylek uvedených v tabulce **13** a **14** jsme vyhodnotili velikost variačního koeficientu mezilehlé preciznosti měření CV_p pro negativní a pozitivní hladinu vzorků vybraných metod pro analyzátor Cobas 6000. Pro hodnocení koeficientu mezilehlé preciznosti jsme použili výpočet $2/3$ z celkové hodnoty D_{max} , kterou jsme získali z dokumentace EHK. S hodnotami D_{max} jsme porovnali všechny naše získané výsledky CV_p . Výsledné variační koeficienty mezilehlé preciznosti měření jsou menší než maximální přijatelné hodnoty. Z výsledků opakovatelnosti vyplývá, že metody vyhovují zamýšlenému použití. Největší chybovost při opakovatelnosti jsme stejně jako pro analyzátor Cobas 8000 zaznamenali pro metodu ALT, jejíž hodnota **4,43 %** byla nejvyšší a pro metodu CRP, jejíž hodnota **0,32 %** byla nejnižší.

5.3 Porovnání metod na analyzátorech Cobas 8000 a Cobas 6000

Výsledky porovnání metod vybraných patientských vzorků pro oba analyzátoře Cobas 8000 a 6000 jsme statisticky vyhodnotili v programu MedCalc. Zpracovali jsme regresní analýzu dle Passing-Babloka a rozdílový graf dle Bland-Altmana pro všechny metody. Na základě statistické analýzy a grafického zpracování jsme zhodnotili, zda jsou vybrané metody pro oba analyzátoře srovnatelné. Oba automatické analyzátoře musí být v klinické praxi použitelné a vzájemně zastupitelné.

5.3.1 Statistické vyhodnocení metody UREA

Výsledky statistického vyhodnocení Passing-Bablokovy regresní analýzy pro metodu UREA mezi dvěma analyzátoři jsme zaznamenali do tabulky 15. Zhotovili jsme graf regrese (Obr. 19) a rozdílový graf dle Bland-Altmana (Obr. 20).

Tabulka 15 Vyhodnocení Passing-Bablokovy regrese pro metodu UREA

UREA (mmol/l)	Proměnná X = c6000	Proměnná Y = c8000
Počet vzorků (n)	100	100
Nejnižší hladina	1,6	1,9
Nejvyšší hladina	28,2	29,1
Aritmetický průměr (Xp)	6,89	7,17
Medián	5,3	5,4
Směrodatná odchylka (SD)	4,94	5,14
Standardní chyba průměru	0,49	0,51
Rovnice Passing-Bablokovy regrese: $y = -0,0210 + 1,033 x$		
Intercept A		-0,0210
95% interval spolehlivosti (CI)		-0,1385 až 0,1101
Směrnice B		1,0327
95% interval spolehlivosti (CI)		1,0135 až 1,0513
Zbytková směrodatná odchylka (RSD)		0,2565
Cusum test pro linearitu		Žádná významná odchylka od linearity (P = 0,96)

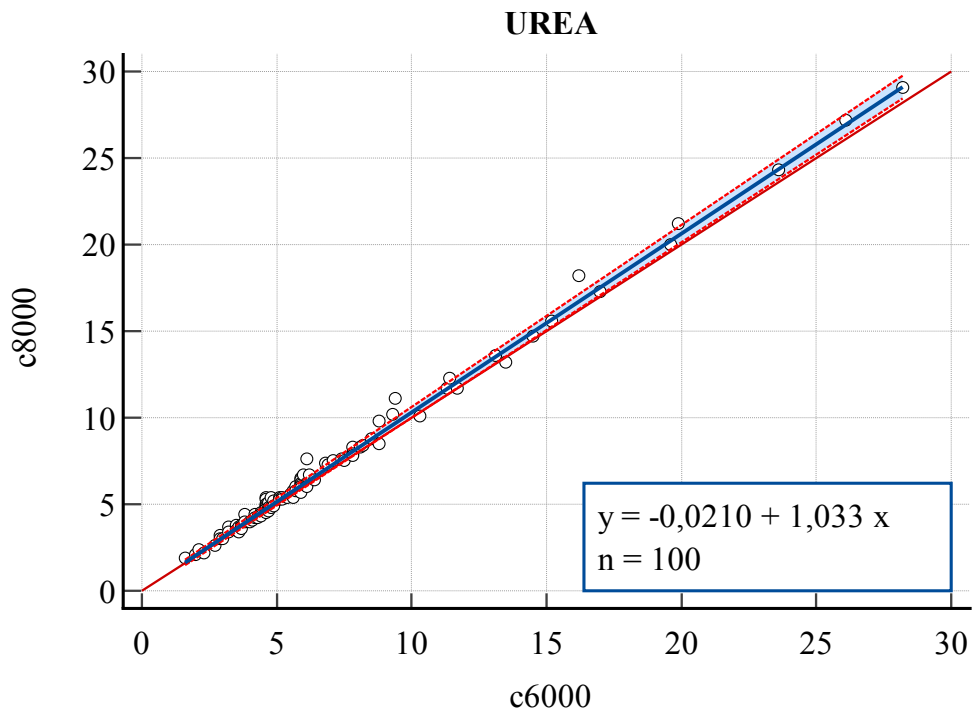
Proměnná X = pro Cobas 6000, původní metoda

Proměnná Y = pro Cobas 8000, srovnávaná metoda

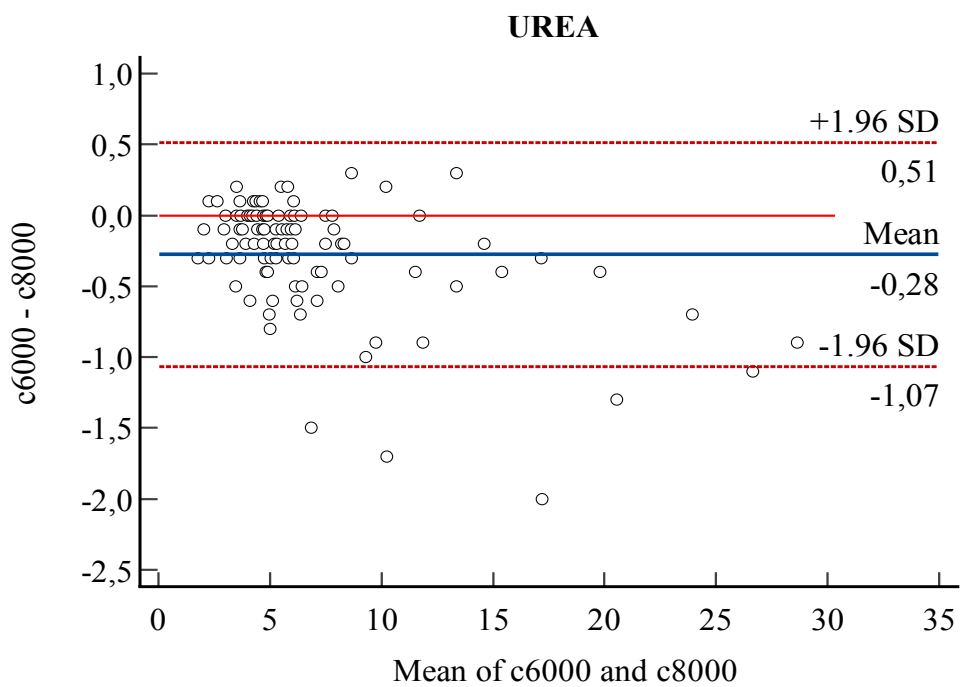
Intercept A = pokud platí hypotéza $A = 0$ v 95% intervalu spolehlivosti (CI), metoda nezahrnuje systematickou konstantní diferenci

Směrnice B = pokud platí hypotéza $B = 1$ v 95% intervalu spolehlivosti (CI), metoda nezahrnuje systematickou proporcionální diferenci

Cusum test = pokud je $P < 0,05$, metoda není lineární



Obrázek 19 Grafické znázornění Passing-Bablokovy regrese pro metodu UREA



Obrázek 20 Bland-Altmanův rozdílový graf pro metodu UREA

Na základě statistického zpracování Passing-Bablokovy regrese jsme dle výsledné rovnice vyhodnotili přítomnost systematických chyb. Výsledný interval spolehlivosti pro úsek A zahrnuje hodnotu 0, proto jsme vyloučili systematickou konstantní diferencí. Interval spolehlivosti pro směrnici B nezahrnuje hodnotu 1, proto je zde přítomná proporcionální diference.

Výsledky stanovení u patientských vzorků jsme porovnali také pomocí Bland-Altmanova rozdílového grafu, kdy jsou na osu x vyneseny průměry výsledků a na osu y diference výsledků obou metod. Průměr odchylek pro metodu UREA je v 95% intervalu spolehlivosti -0,28 % a je tedy potvrzena nulová hypotéza pro hodnotu P, že mezi metodami není významný statistický rozdíl. Z grafu (Obr. **20**) je patrné nerovnoměrné rozložení hodnot, což naznačuje přítomnost proporcionální diference.

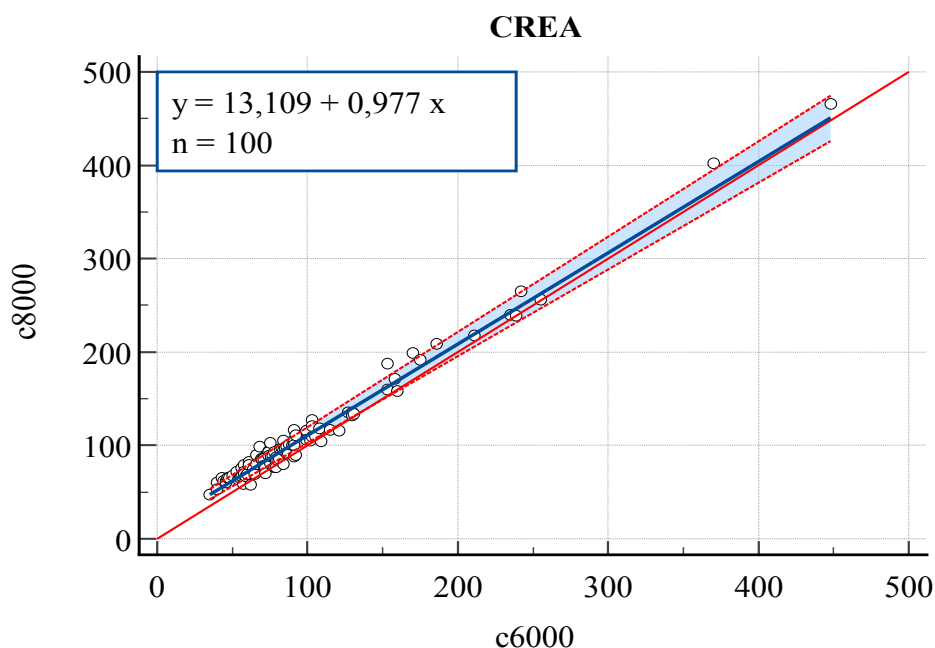
Na základě výsledků vyhodnocení regrese a rozdílového grafu jsme potvrdili vhodnost využití metody UREA pro oba automatické analyzátory.

5.3.2 Statistické vyhodnocení metody CREA

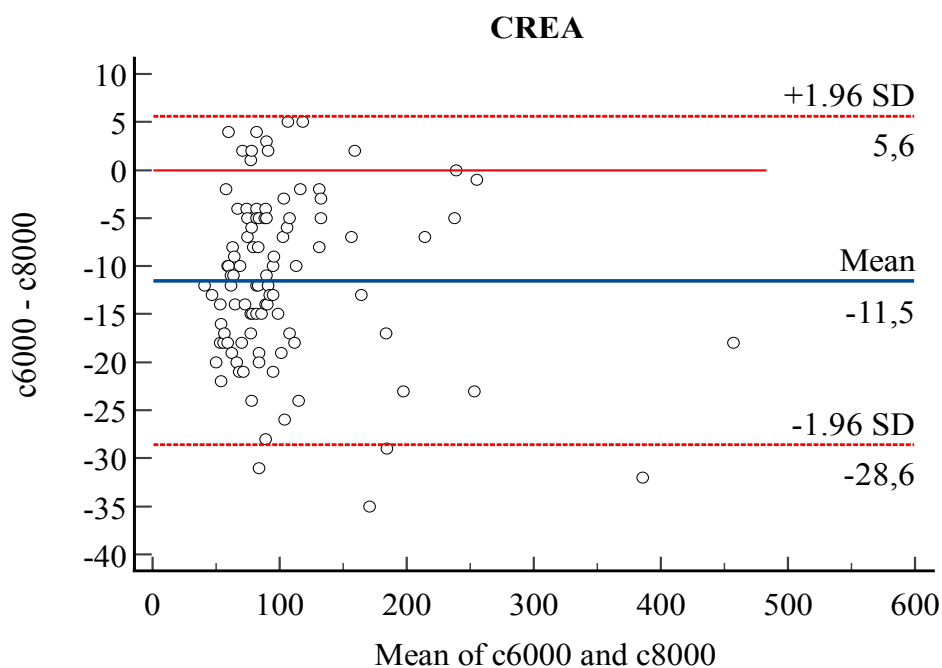
Výsledky statistického vyhodnocení Passing-Bablokovy regresní analýzy pro metodu CREA mezi dvěma analyzátory jsme zaznamenali do tabulky 16. Zhotovili jsme graf regrese (Obr. 21) a rozdílový graf dle Bland-Altmana (Obr. 22).

Tabulka 16 Vyhodnocení Passing-Bablokovy regrese pro metodu CREA

CREA ($\mu\text{mol/l}$)	Proměnná X = c6000	Proměnná Y = c8000
Počet vzorků (n)	100	100
Nejnižší hladina	35	47
Nejvyšší hladina	448	466
Aritmetický průměr (X_p)	97,5	109
Medián	79	90
Směrodatná odchylka (SD)	64	65
Standardní chyba průměru	6,4	6,5
Rovnice Passing-Bablokovy regrese: $y = 13,109 + 0,977 x$		
Intercept A		13,1092
95% interval spolehlivosti (CI)		9,8397 až 17,4643
Směrnice B		0,9770
95% interval spolehlivosti (CI)		0,9286 až 1,0204
Zbytková směrodatná odchylka (RSD)		6,4364
Cusum test pro linearitu		Žádná významná odchylka od linearity (P = 0,70)



Obrázek 21 Grafické znázornění Passing-Bablokovy regrese pro metodu CREA



Obrázek 22 Bland-Altmanův rozdílový graf pro metodu CREA

Provedli jsme Passing-Bablokovu regresní analýzu pro metodu CREA. Výsledný interval spolehlivosti pro úsek A nezahrnuje hodnotu 0, proto je zde přítomna systematická konstantní diference. Interval spolehlivosti pro směrnici B zahrnuje hodnotu 1, proto jsme vyloučili proporcionální diferenci.

Výsledky stanovení u patientských vzorků jsme porovnali pomocí Bland-Altmanova rozdílového grafu. Průměr odchylek pro metodu CREA je v 95% intervalu spolehlivosti -11,5 % a je zde tedy významný statistický rozdíl. Z grafu (Obr. 22) je patrné rovnoměrné rozložení hodnot s minimem odlehlých hodnot.

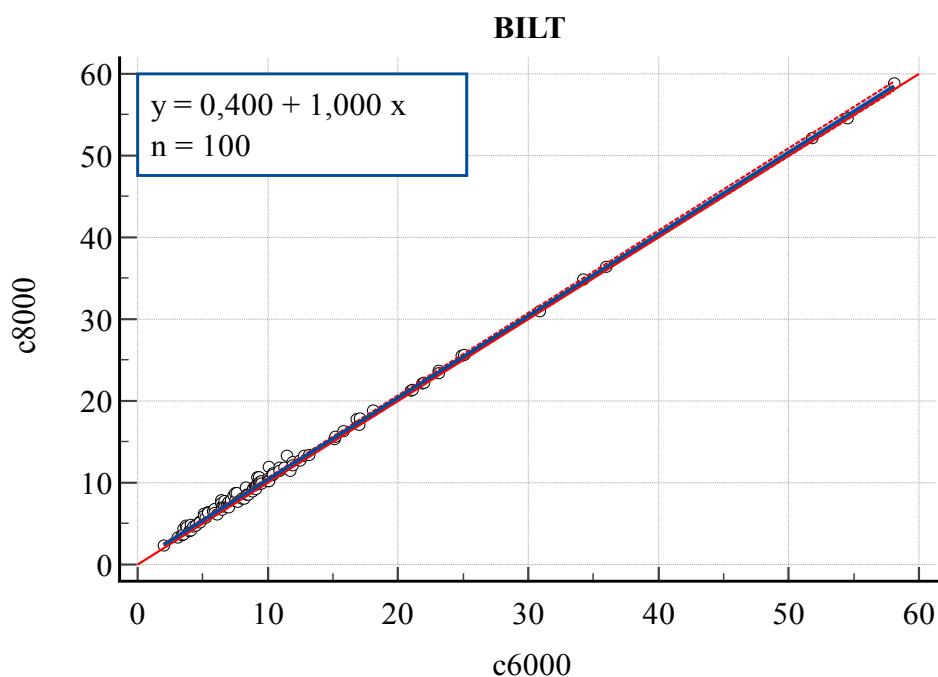
Na základě výsledků vyhodnocení regrese a rozdílového grafu jsme potvrdili možné použití metody CREA pro oba automatické analyzátoary.

5.3.3 Statistické vyhodnocení metody BILT

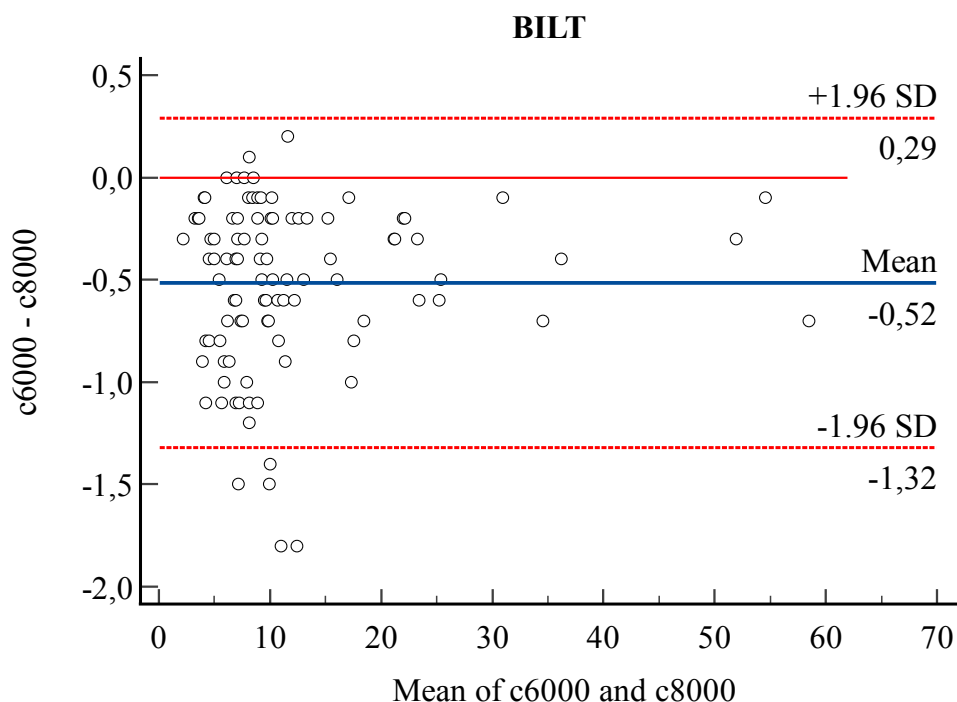
Výsledky statistického vyhodnocení Passing-Bablokovy regresní analýzy pro metodu BILT mezi dvěma analyzátory jsme zaznamenali do tabulky 17. Zhotovili jsme graf regrese (Obr. 23) a rozdílový graf dle Bland-Altmana (Obr. 24).

Tabulka 17 Vyhodnocení Passing-Bablokovy regrese pro metodu BILT

BILT ($\mu\text{mol/l}$)	Proměnná X = c6000	Proměnná Y = c8000
Počet vzorků (n)	100	100
Nejnižší hladina	1,4	2,3
Nejvyšší hladina	58,1	58,8
Aritmetický průměr (X_p)	11,6	12,1
Medián	8,8	9,1
Směrodatná odchylka (SD)	10,1	10,1
Standardní chyba průměru	1,01	1,01
Rovnice Passing-Bablokovy regrese: $y = 0,400 + 1,000 x$		
Intercept A		0,4000
95% interval spolehlivosti (CI)		0,3489 až 0,5364
Směrnice B		1,0000
95% interval spolehlivosti (CI)		0,9921 až 1,0075
Zbytková směrodatná odchylka (RSD)		0,3031
Cusum test pro linearitu		Žádná významná odchylka od linearitu ($P = 0,47$)



Obrázek 23 Grafické znázornění Passing-Bablokovy regrese pro metodu BILT



Obrázek 24 Bland-Altmanův rozdílový graf pro metodu BILT

Provedli jsme Passing-Bablokovu regresní analýzu pro metodu BILT. Výsledný interval spolehlivosti pro úsek A nezahrnuje hodnotu 0, proto je zde přítomna systematická konstantní diference. Interval spolehlivosti pro směrnici B zahrnuje hodnotu 1, proto jsme vyloučili proporcionální diferenci.

Výsledky stanovení u patientských vzorků jsme porovnali pomocí Bland-Altmanova rozdílového grafu. Průměr odchylek pro metodu BILT je v 95% intervalu spolehlivosti -0,52 % a je tedy potvrzena nulová hypotéza bez statisticky významného rozdílu. Z grafu (Obr. 24) je patrné rovnoměrné rozložení hodnot s několika odlehlými hodnotami.

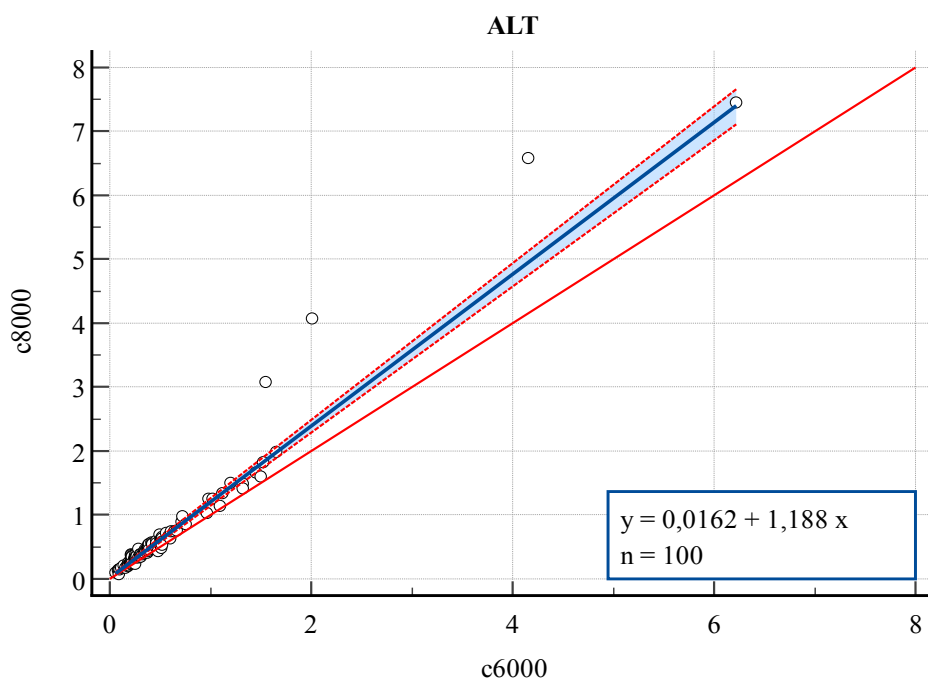
Na základě výsledků vyhodnocení regrese a rozdílového grafu jsme potvrdili možné použití metody BILT pro oba automatické analyzátory.

5.3.4 Statistické vyhodnocení metody ALT

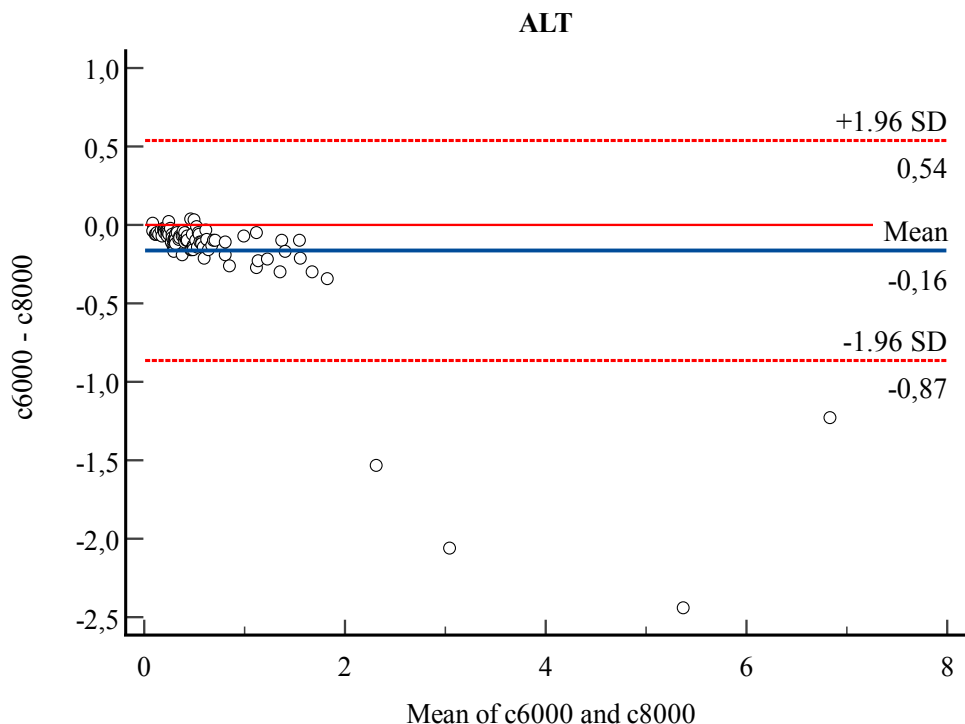
Výsledky statistického vyhodnocení Passing-Bablokovy regresní analýzy pro metodu ALT mezi dvěma analyzátoři jsme zaznamenali do tabulky 18. Zhotovili jsme graf regrese (Obr. 25) a rozdílový graf dle Bland-Altmana (Obr. 26).

Tabulka 18 Vyhodnocení Passing-Bablokovy regrese pro metodu ALT

ALT ($\mu\text{kat/l}$)	Proměnná X = c6000	Proměnná Y = c8000
Počet vzorků (n)	100	100
Nejnižší hladina	0,08	0,08
Nejvyšší hladina	6,22	7,45
Aritmetický průměr (X_p)	0,57	0,73
Medián	0,36	0,43
Směrodatná odchylka (SD)	0,79	1,08
Standardní chyba průměru	0,08	0,11
Rovnice Passing-Bablokovy regrese: $y = 0,0162 + 1,188 x$		
Intercept A		0,0162
95% interval spolehlivosti (CI)		0,0026 až 0,0357
Směrnice B		1,1875
95% interval spolehlivosti (CI)		1,1429 až 1,2258
Zbytková směrodatná odchylka (RSD)		0,1762
Cusum test pro linearitu		Žádná významná odchylka od linearitu (P = 0,85)



Obrázek 25 Grafické znázornění Passing-Bablokovy regrese pro metodu ALT



Obrázek 26 Bland-Altmanův rozdílový graf pro metodu ALT

Provedli jsme Passing-Bablokovu regresní analýzu pro metodu ALT. Výsledný interval spolehlivosti pro úsek A zahrnuje hodnotu 0, proto zde není přítomna systematická konstantní diference. Interval spolehlivosti pro směrnici B nezahrnuje hodnotu 1, proto jsme potvrdili přítomnost proporcionální diference.

Výsledky stanovení u patientských vzorků jsme porovnali pomocí Bland-Altmanova rozdílového grafu. Průměr odchylek pro metodu ALT je v 95% intervalu spolehlivosti -0,16 % a je tedy potvrzena nulová hypotéza bez statisticky významného rozdílu. Z grafu (Obr. 26) je patrné rovnoměrné rozložení hodnot s minimem odlehlých hodnot.

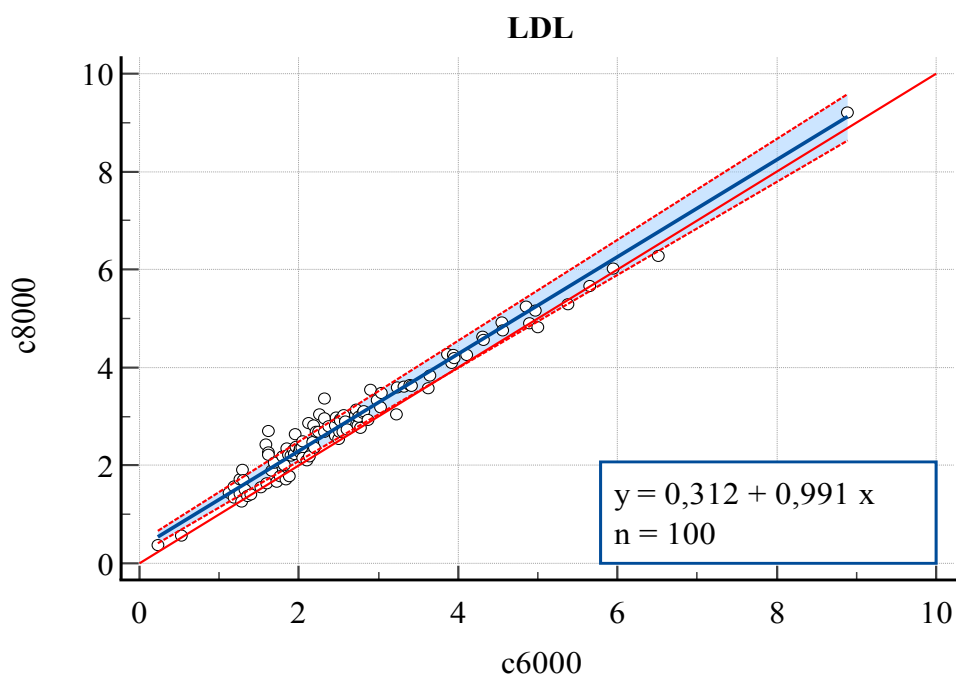
Na základě výsledků vyhodnocení regrese a rozdílového grafu jsme potvrdili možné použití metody ALT pro oba automatické analyzátoři.

5.3.5 Statistické vyhodnocení metody LDL

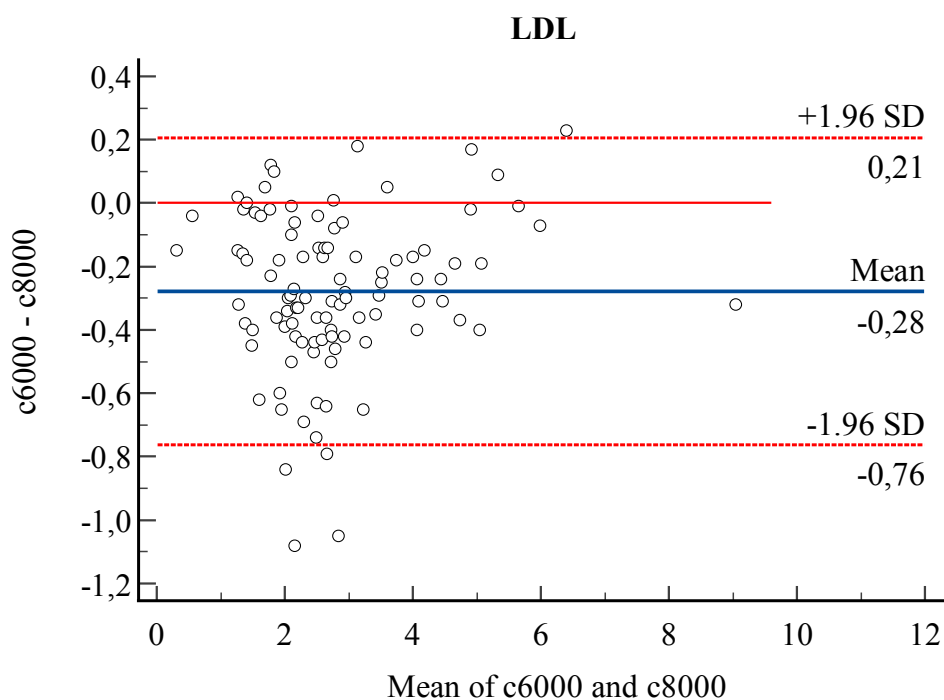
Výsledky statistického vyhodnocení Passing-Bablokovy regresní analýzy pro metodu LDL mezi dvěma analyzátoři jsme zaznamenali do tabulky 19. Zhotovili jsme graf regrese (Obr. 27) a rozdílový graf dle Bland-Altmana (Obr. 28).

Tabulka 19 Vyhodnocení Passing-Bablokovy regrese pro metodu LDL

LDL (mmol/l)	Proměnná X = c6000	Proměnná Y = c8000
Počet vzorků (n)	100	100
Nejnižší hladina	0,23	0,38
Nejvyšší hladina	8,89	9,21
Aritmetický průměr (Xp)	2,66	2,94
Medián	2,32	2,72
Směrodatná odchylka (SD)	1,35	1,32
Standardní chyba průměru	0,14	0,13
Rovnice Passing-Bablokovy regrese: $y = 0,312 + 0,991 x$		
Intercept A		0,3119
95% interval spolehlivosti (CI)		0,1908 až 0,4260
Směrnice B		0,9912
95% interval spolehlivosti (CI)		0,9498 až 1,0301
Zbytková směrodatná odchylka (RSD)		0,1748
Cusum test pro linearitu		Žádná významná odchylka od linearitu (P = 0,26)



Obrázek 27 Grafické znázornění Passing-Bablokovy regrese pro metodu LDL



Obrázek 28 Bland-Altmanův rozdílový graf pro metodu LDL

Provedli jsme Passing-Bablokovu regresní analýzu pro metodu LDL. Výsledný interval spolehlivosti pro úsek A nezahrnuje hodnotu 0, proto je zde přítomna systematická konstantní diference. Interval spolehlivosti pro směrnici B zahrnuje hodnotu 1, proto jsme vyloučili přítomnost proporcionální diference.

Výsledky stanovení u patientských vzorků jsme porovnali pomocí Bland-Altmanova rozdílového grafu. Průměr odchylek pro metodu LDL je v 95% intervalu spolehlivosti -0,28 % a je tedy potvrzena nulová hypotéza bez statisticky významného rozdílu. Z grafu (Obr. 28) je patrné rovnoměrné rozložení hodnot, kde se nachází celkem 5 odlehlých hodnot.

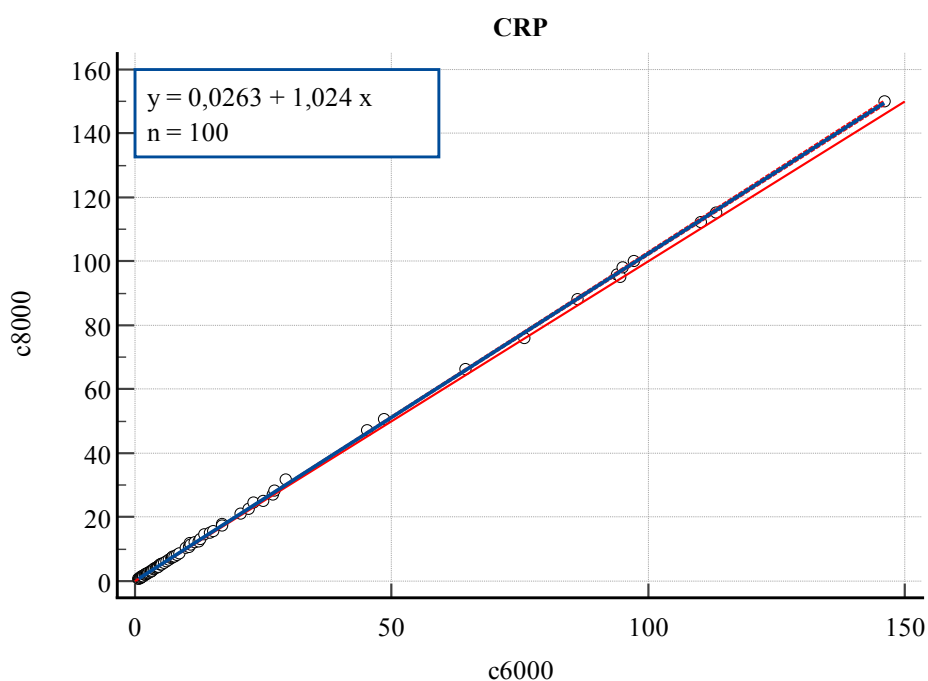
Na základě výsledků vyhodnocení regrese a rozdílového grafu jsme potvrdili možné použití metody LDL pro oba automatické analyzátoři.

5.3.6 Statistické vyhodnocení metody CRP

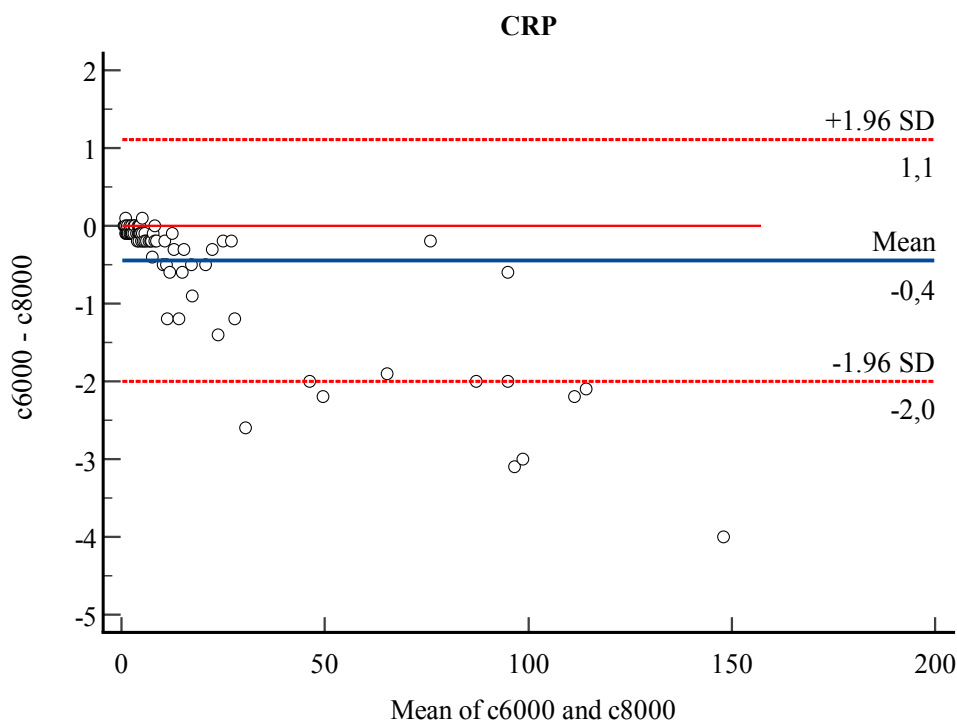
Výsledky statistického vyhodnocení Passing-Bablokovy regresní analýzy pro metodu CRP mezi dvěma analyzátoři jsme zaznamenali do tabulky 20. Zhotovili jsme graf regrese (Obr. 29) a rozdílový graf dle Bland-Altmana (Obr. 30).

Tabulka 20 Vyhodnocení Passing-Bablokovy regrese pro metodu CRP

CRP (mg/l)	Proměnná X = c6000	Proměnná Y = c8000
Počet vzorků (n)	100	100
Nejnižší hladina	0,7	0,7
Nejvyšší hladina	146	150
Aritmetický průměr (Xp)	16,3	16,7
Medián	4,55	4,65
Směrodatná odchylka (SD)	29,4	30,1
Standardní chyba průměru	2,94	3,01
Rovnice Passing-Bablokovy regrese: $y = 0,0263 + 1,024 x$		
Intercept A		0,0263
95% interval spolehlivosti (CI)		-0,0066 až 0,0536
Směrnice B		1,0240
95% interval spolehlivosti (CI)		1,0201 až 1,0289
Zbytková směrodatná odchylka (RSD)		0,2900
Cusum test pro linearitu		Žádná významná odchylka od linearitu (P = 0,26)



Obrázek 29 Grafické znázornění Passing-Bablokovy regrese pro metodu CRP



Obrázek 30 Bland-Altmanův rozdílový graf pro metodu CRP

Provedli jsme Passing-Bablokovu regresní analýzu pro metodu CRP. Výsledný interval spolehlivosti pro úsek A zahrnuje hodnotu 0, proto zde není přítomna systematická konstantní diference. Interval spolehlivosti pro směrnici B nezahrnuje hodnotu 1, proto jsme potvrdili přítomnost systematické proporcionální diference.

Výsledky stanovení u patientských vzorků jsme porovnali pomocí Bland-Altmanova rozdílového grafu. Průměr odchylek pro metodu CRP je v 95% intervalu spolehlivosti -0,4 % a je tedy potvrzena nulová hypotéza bez statisticky významného rozdílu. Z grafu (Obr. 30) je patrné nerovnoměrné rozložení hodnot, což naznačuje přítomnost proporcionální diference.

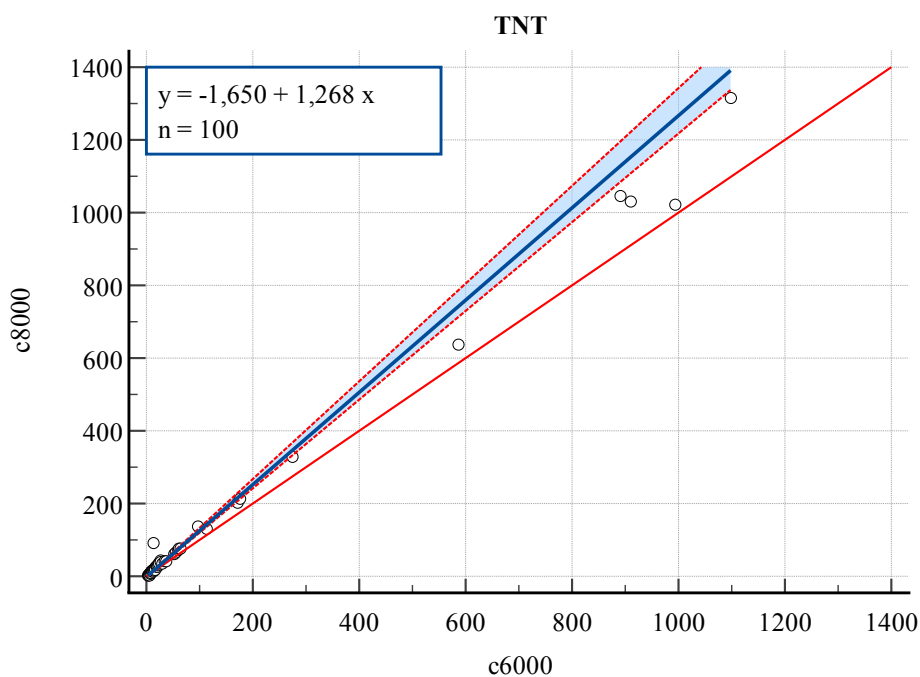
Na základě výsledků vyhodnocení regrese a rozdílového grafu jsme potvrdili možné použití metody CRP pro oba automatické analyzátoři.

5.3.7 Statistické vyhodnocení metody TNT

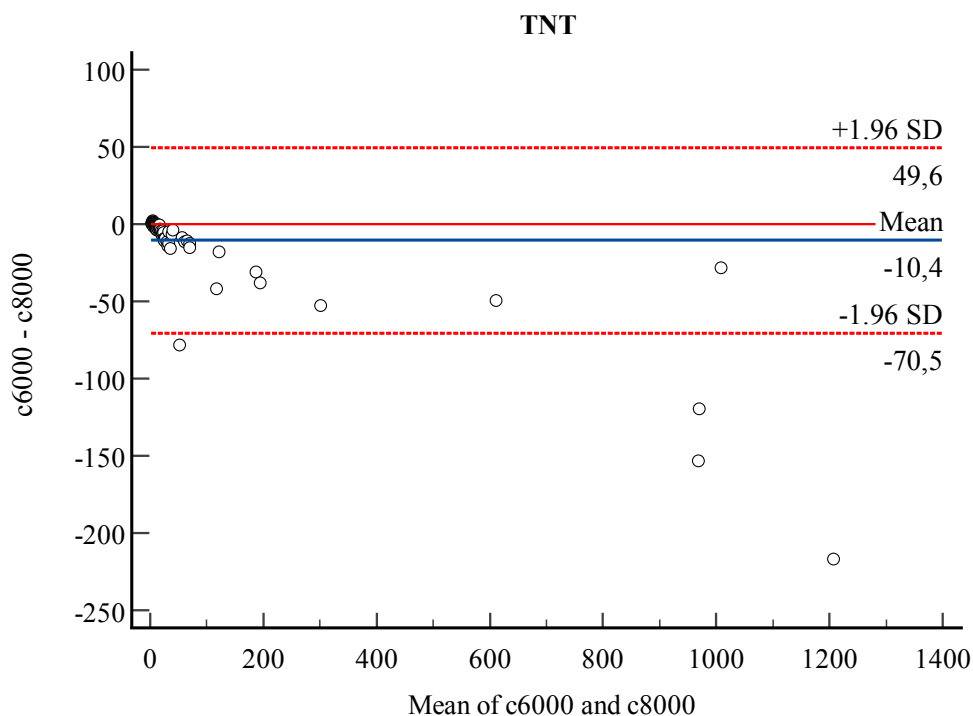
Výsledky statistického vyhodnocení Passing-Bablokovy regresní analýzy pro metodu TNT mezi dvěma analyzátoři jsme zaznamenali do tabulky 21. Zhotovili jsme graf regrese (Obr. 31) a rozdílový graf dle Bland-Altmana (Obr. 32).

Tabulka 21 Vyhodnocení Passing-Bablokovy regrese pro metodu TNT

TNT (ng/l)	Proměnná X = c6000	Proměnná Y = c8000
Počet vzorků (n)	100	100
Nejnižší hladina	3,0	3,0
Nejvyšší hladina	1098	1315
Aritmetický průměr (Xp)	64,9	75,3
Medián	8,8	10,7
Směrodatná odchylka (SD)	199	226
Standardní chyba průměru	19,9	22,6
Rovnice Passing-Bablokovy regrese: $y = -1,650 + 1,268 x$		
Intercept A		-1,6500
95% interval spolehlivosti (CI)		-2,0683 až -1,2597
Směrnice B		1,2683
95% interval spolehlivosti (CI)		1,2196 až 1,3436
Zbytková směrodatná odchylka (RSD)		20,0690
Cusum test pro linearitu		Žádná významná odchylka od linearity (P = 0,10)



Obrázek 31 Grafické znázornění Passing-Bablokovy regrese pro metodu TNT



Obrázek 32 Bland-Altmanův rozdílový graf pro metodu TNT

Provedli jsme Passing-Bablokovu regresní analýzu pro metodu TNT. Výsledný interval spolehlivosti pro úsek A nezahrnuje hodnotu 0, proto je zde přítomna systematická konstantní diference. Interval spolehlivosti pro směrnici B nezahrnuje ani hodnotu 1, proto jsme potvrdili přítomnost také systematické proporcionální diference. Vyhodnocením našich výsledků jsme potvrdili rozdíly při porovnání troponinů díky analytickým interferencím biotinu.

Výsledky stanovení u patientských vzorků jsme porovnali pomocí Bland-Altmanova rozdílového grafu. Průměr odchylek pro metodu TNT je v 95% intervalu spolehlivosti -10,4 % a je zde tedy významný statistický rozdíl. Z grafu (Obr. 32) je patrné nerovnoměrné rozložení hodnot, kde se nachází několik odlehlých hodnot.

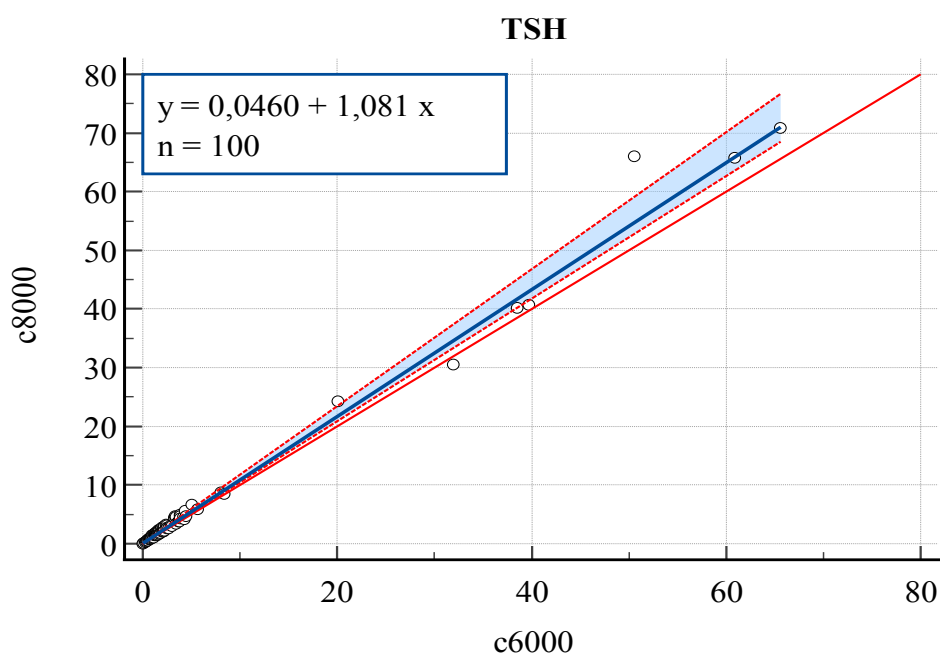
Na základě výsledků vyhodnocení regrese a rozdílového grafu jsme i přes přítomné systematické diference potvrdili možné použití metody TNT pro oba automatické analyzátoři.

5.3.8 Statistické vyhodnocení metody TSH

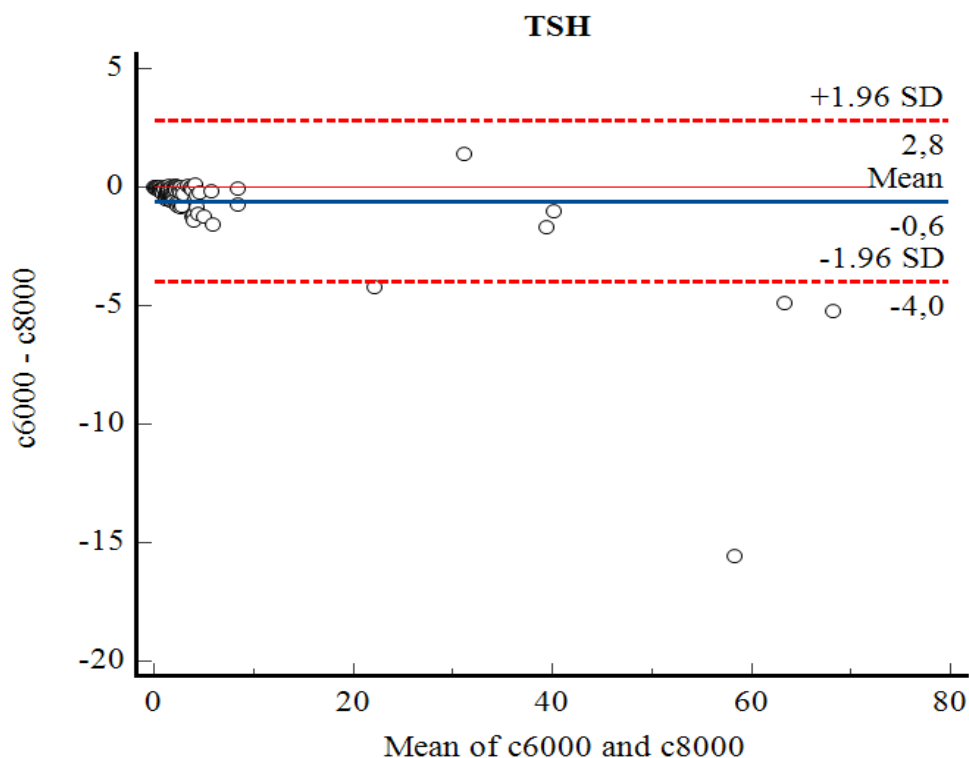
Výsledky statistického vyhodnocení Passing-Bablokovy regresní analýzy pro metodu TSH mezi dvěma analyzátory jsme zaznamenali do tabulky 22. Zhotovili jsme graf regrese (Obr. 33) a rozdílový graf dle Bland-Altmana (Obr. 34).

Tabulka 22 Vyhodnocení Passing-Bablokovy regrese pro metodu TSH

TSH (mU/l)	Proměnná X = c6000	Proměnná Y = c8000
Počet vzorků (n)	100	100
Nejnižší hladina	0,005	0,005
Nejvyšší hladina	65,6	70,8
Aritmetický průměr (Xp)	4,91	5,51
Medián	1,69	2,02
Směrodatná odchylka (SD)	11,6	12,8
Standardní chyba průměru	1,16	1,28
Rovnice Passing-Bablokovy regrese: $y = 0,0460 + 1,081 x$		
Intercept A		0,0460
95% interval spolehlivosti (CI)		-0,0076 až 0,1009
Směrnice B		1,0815
95% interval spolehlivosti (CI)		1,0445 až 1,1674
Zbytková směrodatná odchylka (RSD)		0,8970
Cusum test pro linearitu		Žádná významná odchylka od linearitu (P = 0,53)



Obrázek 33 Grafické znázornění Passing-Bablokovy regrese pro metodu TSH



Obrázek 34 Bland-Altmanův rozdílový graf pro metodu TSH

Provedli jsme Passing-Bablokovu regresní analýzu pro metodu TSH. Výsledný interval spolehlivosti pro úsek A zahrnuje hodnotu 0, proto zde není přítomna systematická konstantní diference. Interval spolehlivosti pro směrnici B nezahrnuje hodnotu 1, proto jsme potvrdili přítomnost proporcionální diference.

Výsledky stanovení patientských vzorků jsme porovnali pomocí Bland-Altmanova rozdílového grafu. Průměr odchylek pro metodu TSH je v 95% intervalu spolehlivosti -0,6 % a je tedy potvrzena nulová hypotéza bez statisticky významného rozdílu. Z grafu (Obr. 34) je patrné rovnoměrné rozložení hodnot s minimem odlehlých hodnot.

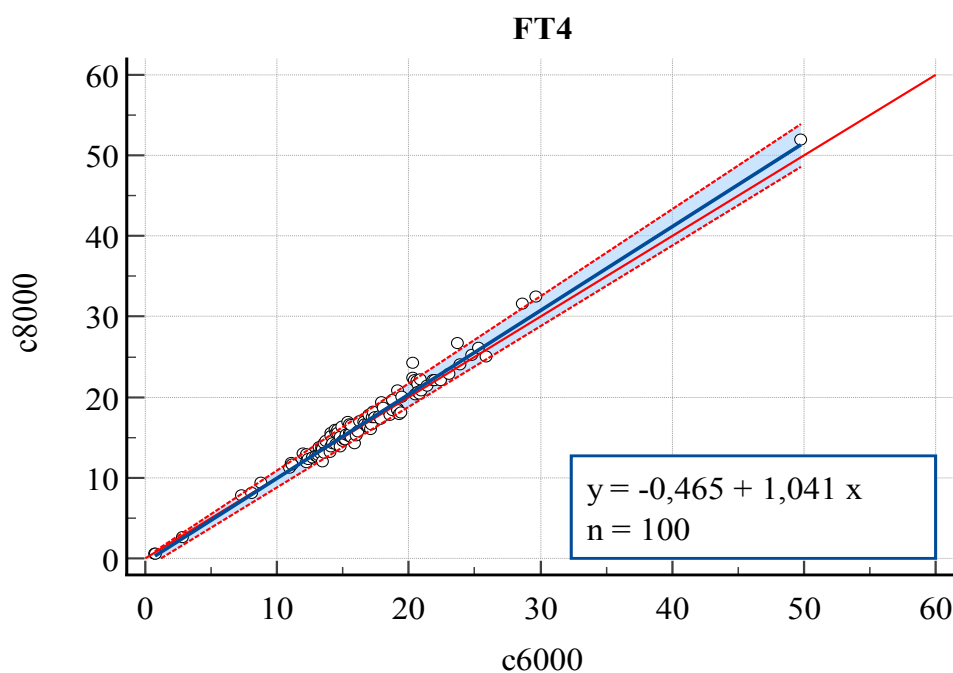
Na základě výsledků vyhodnocení regrese a rozdílového grafu jsme potvrdili možné použití metody TSH pro oba automatické analyzátoři.

5.3.9 Statistické vyhodnocení metody FT4

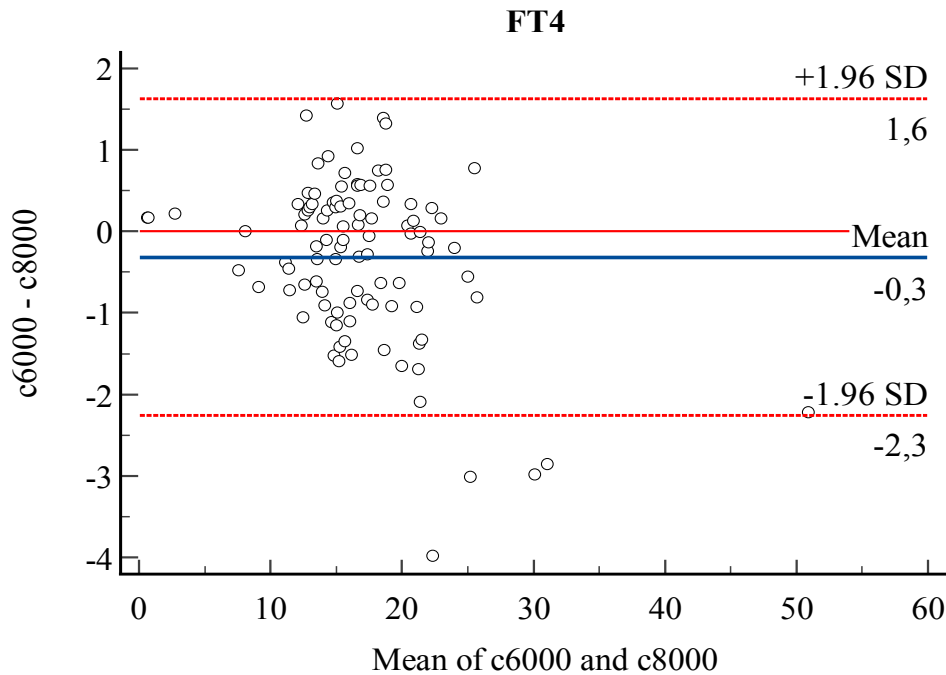
Výsledky statistického vyhodnocení Passing-Bablokovy regresní analýzy pro metodu FT4 mezi dvěma analyzátory jsme zaznamenali do tabulky 23. Zhotovili jsme graf regrese (Obr. 35) a rozdílový graf dle Bland-Altmana (Obr. 36).

Tabulka 23 Vyhodnocení Passing-Bablokovy regrese pro metodu FT4

FT4 (pmol/l)	Proměnná X = c6000	Proměnná Y = c8000
Počet vzorků (n)	100	100
Nejnižší hladina	0,73	0,56
Nejvyšší hladina	49,8	52,0
Aritmetický průměr (Xp)	16,7	17,0
Medián	15,9	16,3
Směrodatná odchylka (SD)	5,88	6,26
Standardní chyba průměru	0,58	0,62
Rovnice Passing-Bablokovy regrese: $y = -0,465 + 1,041 x$		
Intercept A		-0,4647
95% interval spolehlivosti (CI)		-1,1911 až 0,1000
Směrnice B		1,0406
95% interval spolehlivosti (CI)		1,0000 až 1,0807
Zbytková směrodatná odchylka (RSD)		0,6614
Cusum test pro linearitu		Žádná významná odchylka od linearitu (P = 0,38)



Obrázek 35 Grafické znázornění Passing-Bablokovy regrese pro metodu FT4



Obrázek 36 Bland-Altmanův rozdílový graf pro metodu FT4

Provedli jsme Passing-Bablokovu regresní analýzu pro metodu FT4. Výsledný interval spolehlivosti pro úsek A zahrnuje hodnotu 0, proto zde není přítomna systematická konstantní diference. Interval spolehlivosti pro směrnici B nezahrnuje hodnotu 1, proto jsme potvrdili přítomnost proporcionální diference.

Výsledky stanovení u patientských vzorků jsme porovnali pomocí Bland-Altmanova rozdílového grafu. Průměr odchylek pro metodu FT4 je v 95% intervalu spolehlivosti -0,3 % a je tedy potvrzena nulová hypotéza bez statisticky významného rozdílu. Z grafu (Obr. 36) je patrné rovnoměrné rozložení hodnot s minimem odlehlých hodnot.

Na základě výsledků vyhodnocení regrese a rozdílového grafu jsme potvrdili možné použití metody FT4 pro oba automatické analyzátoři.

6. DISKUZE

Při procesech validace a verifikace se v souladu s normou ČSN EN ISO 15189:2013 prokazuje vhodnost metod k zamýšlenému použití. Většina výrobců provádí validaci analytického systému či metod v souladu s evropskou směrnicí pro diagnostiku a přístroje IVD 98/79 EC 2017. Součástí procesu verifikace musí být hodnocení preciznosti a nejistoty měření u jednotlivých metod. Při hodnocení preciznosti metody je nutné posoudit opakovatelnost a mezilehlou preciznost měření (Ambrožová, 2012). Podle Berlínské studie z roku 2019 termín „zamýšlené použití“ lékařského vyšetřovacího postupu zahrnuje klinický stav a/nebo indikaci k postupu, i způsob, jakým má být postup včetně přípravy proveden. Laboratoř musí mít k dispozici informace od výrobce analytického systému, aby mohla potvrdit v procesu ověřování funkční charakteristiky metod. Pokud se k měření veličiny používá více analyzátorů, musí se ověřit správná funkce každého jednotlivého systému (Beer *et al.*, 2019).

Nejistoty měření jsou základem pro zabezpečení kvality výsledků měření a doprovázejí každý výsledek bez výjimky. Ze studie doktora Friedeckého z roku 2019 je výslovně dle normy požadováno, aby zdravotnické laboratoře dokumentovaly hodnoty nejistot svých měření. Postupy jejich stanovení však nejsou specifikovány, a proto většina klinických laboratoří provádí tzv. odhad výpočtu nejistot na základě teoretických principů. Při výpočtu nejistot u analytů s referenčním systémem se započítává do hodnoty kombinované nejistoty bias. U ostatních analýz se někteří autoři z jiné studie prezentované doktorem Friedeckým domnívají, že nejistotu lze vyčíslit pouze jako hodnotu preciznosti. Toto tvrzení dokládá i nové doporučení ČSKB, dle kterého se do výpočtu nejistot bias již nezapočítává. Preference nejistot před systematickými chybami je tedy důležitým nástrojem posouzení klinických dopadů laboratorních výsledků.

Z jiné zahraniční studie vyplývá, že nejistota by neměla být považována za parametr, který mají vypočítat lékařské laboratoře jen pro splnění akreditačních standardů, ale musí se stát klíčovým ukazatelem kvality pro popis jak výkonnosti *in vitro* diagnostiky měřícího systému, tak laboratoře samotné. Pro odhad nejistoty byly navrženy dva přístupy. Přístup „bottom-up“ je navržený v průvodci vyjádření nejistoty měření (GUM) a využívají ho referenční laboratoře. Přístup „top-down“ je jednodušší a představuje dobrou alternativu k předchozímu přístupu. Odhaduje nejistoty laboratorních výsledků pomocí dat IKK k odvození náhodných složek nejistoty a informací komerčních kalibrátorů. Nyní je oficiálně schválen technickou specifikací ISO 20914, která poskytuje praktický návod pro použití v laboratorních podmínkách za účelem měření biologických měřených veličin (Braga, 2020).

Ze studie Farrance a Frenkela z roku 2021 se také spekuluje o důležitosti zahrnutí korelačního koeficientu do výpočtu nejistot. Znaménko korelačního koeficientu i znaménka vstupních proměnných v rovnici nejistoty měření společně určují, zda nejistota spojená s výstupní veličinou v důsledku korelace vzroste nebo klesne. Zahrnutí korelačního členu do výpočtu nejistoty může ve skutečnosti poskytnout nižší hodnotu nejistoty pro uvažovanou hodnotu měřené veličiny.

Je tedy zřejmé, že není k dispozici jednotný a podrobný algoritmus výpočtu nejistot pro zdravotnické laboratoře. Proto se využívá přístup „top-down“ založený na datech IKK, EHK a nejistotách referenčních (kontrolních nebo kalibračních) materiálů, který jsme pro tuto práci také použili. Spolu s precizností a bias je nejistota jedním ze základních indikátorů analytické kvality. Naše výsledky nejistot byly v rámci dokumentace EHK s porovnáním hodnot Dmax od firmy SEKK s.r.o. pro rok 2022 velmi dobré, a proto byla verifikace metod pro oba analyzátory vyhodnocena jako vyhovující.

V této práci byli pro verifikace metod používané certifikované kalibrační a kontrolní materiály. Vybrané metody jsme verifikovali pro dva analytické systémy Cobas 8000 a Cobas 6000. V rámci verifikace byla také provedena opakovatelnost metod. Tu jsme vyhodnotili měřením směsných sér při měření v sérii 10x za sebou na dvou rozdílných hladinách pro oba analyzátory. Je vypočítána jako variační koeficient mezilehlé preciznosti měření a hodnotí přesnost měření tím, že poukazuje na podíl odchylek, které se mohou znovu objevit v opakovaných testech. Vyhodnocení opakovatelnosti je nezbytnou podmínkou pro jakýkoliv nově zaváděný analytický systém či metodu v klinické diagnostice (Hao *et al.*, 2021). Výsledky variačních koeficientů pro mezilehlou preciznost měření jsme také porovnali s hodnotami Dmax dostupných z dokumentace EHK. Opakovatelnost metod na obou analyzátorech v rámci verifikace byla také vyhodnocena jako vyhovující.

Srovnávání výsledků kvantitativních metod v laboratoři klinické biochemie provádíme vždy v případě porovnání jedné dvojice metod, z nichž je jedna nově zaváděná a druhá již používaná. V našem případě jsme porovnávali vybrané metody mezi dvěma analytickými systémy, nově zavedeným analyzátozem Cobas 8000 a již využívaným analyzátozem Cobas 6000. Dobrá porovnatelnost na různých analytických systémech je zárukou kontinuity výsledků opakovaného laboratorního vyšetření pacienta, jak uvádí studie doktorky Mikuškové *et al.*, z roku 2017. Při zavádění nového analytického systému je nutné znovu nainstalovat veškeré aplikace, provést kalibrace a kontroly jednotlivých metod, porovnat výsledky včetně statistického vyhodnocení a samozřejmě provést verifikaci metod. Pro statistické vyhodnocení

je nejvhodnějším používaným biomedicínským softwarem program MedCalc, což potvrzuje i doktorka Bořecká ve své studii z roku 2021, která se zabývá výměnou hlavních analyzátorů v laboratoři. Program zahrnuje mnoho statistických nástrojů, ale především pro porovnatelnost vhodnou regresní analýzu dle Passing-Babloka a grafické hodnocení pomocí rozdílového grafu dle Bland-Altmana.

Passing-Bablokova regresní analýza řeší problémy spojené s distribucí dat a s detekcí konstantního nebo proporcionálního rozdílu mezi dvěma metodami. Ve srovnání s další často navrhovanou metodou, Demingovou regresí, by Passing-Bablokova regrese mohla být upřednostňována pro srovnání klinických metod, protože nepředpokládá, že chyba měření je normálně rozložena, a je robustní vůči odlehlým hodnotám. Pro úplnou interpretaci výsledků regrese však potřebuje analýzu reziduí, rozložení rozdílu kolem proložené regresní přímky (Giavarina, 2015). Grafickým zhodnocením je pro regresní analýzu vhodný rozdílový graf Bland-Altmanovy metody, která je využívána pro hodnocení shody mezi dvěma metodami měření. Rozdíly dvou metod jsou vyneseny proti jejich průměrům. Předpokladem horního a dolního limitu metody shody je, že hodnoty rozdílu vyplývající ze dvou měření by měly mít přibližně normální rozdělení, konstantní rozptyl a žádné proporcionální vychýlení (Lu *et al.*, 2016).

Systematické chyby měření, které jsme při porovnatelnosti metod zachytili, mohou mít několik příčin. Může se jednat o neadekvátní úroveň kalibrace, matricové vlivy nebo nedostatečnou analytickou specifičnost metody (Friedecký, 2015). Z našich výsledků porovnatelnosti vykazovala jednoznačně nejvyšší systematickou konstantní diferenci metoda CREA ($A = 13 \%$). Všechny ostatní vyhodnocené systematické chyby se pohybovaly maximálně do 1,5 %. Vysoké hodnoty bias jsou u kreatininu způsobené používáním nespecifické metody na bázi Jaffého reakce. Z doporučení ČSKB z roku 2012 jednoznačně vyplývá, že laboratoře využívají metodu Jaffého reakce z důvodu finanční náročnosti enzymatického stanovení kreatininu. Pro nízké koncentrace kreatininu zejména u dětí je však použití enzymatické metody nejlepším řešením. Ze zahraniční studie z roku 2021, která se zabývala porovnáním tří typů analýzy kreatininu, jasně vyplynul fakt, že Jaffého metoda může poskytovat falešně zvýšené výsledky díky přítomnosti nekreatininových chromogenů, jako je bilirubin, proteiny, glukóza a ketolátky. Enzymatická metoda není těmito materiály ovlivněna, proto výrobci důrazně doporučují laboratořím přechod na tuto variantu metody (Ji *et al.*, 2021).

Naše výsledky porovnatelnosti metod vykazovaly vždy alespoň jednu ze systematických chyb měření. Chyby bývají z největší části způsobené změnou stability analytů a omezení analýzy kvalitou vzorku analytickými interferencemi. U biochemických metod jsou interference způsobeny především vlivem hemolýzy, ikterity a chylozity. V případě imunochemických metod jsou potenciálním zdrojem interferencí zvýšené koncentrace exogenního biotinu při reakci streptavidin-biotin. Zvýšení koncentrací biotinu v séru vlivem terapie některých nemocí, používání řady doplňků stravy a kosmetických přípravků mohou být extrémně vysoké. Dle studií doktora Friedeckého z roku 2020 a 2022, jsou ovlivněny především hormony štítné žlázy a také kardiální troponiny. U thyroïdních hormonů je situace komplikovaná, protože pro analyty FT4 jsou paralelně při procesu měření vyhodnoceny pozitivní interference a pro TSH negativní. Interference biotinu také snižují hodnoty 99. percentilů a tím mění diagnostickou klasifikaci AIM při stanovení hs-TnT.

Při porovnatelnosti metody hs-TnT jsme díky statistickému vyhodnocení došli k závěru, že jsou mezi metodami konstantní i proporcionální systematické diference. Z tohoto důvodu i na základě doporučení od firmy Roche s.r.o. se laboratoř rozhodla přejít na novou verzi metody se zvýšenou rezistencí proti interferenci s biotinem. Do budoucna se tedy při procesu analytických měření můžeme vyhnout přítomným interferencím způsobených biotinem, které výrazně ovlivňují výsledky stanovení.

7. ZÁVĚR

V rámci své diplomové práce jsem charakterizovala proces validace a verifikace ve zdravotnické laboratoři. Dále jsem popsala některé vlastnosti analytických metod se zaměřením na výpočet nejistoty měření dle nového doporučení ČSKB.

V experimentální části práce jsem vyhodnotila verifikace a opakovatelnost vybraných biochemických a imunochemických metod na dvou automatických analyzátorech. Z výsledků verifikace a opakovatelnosti vyplývá, že metody vyhovují našim požadavkům pro zamýšlené použití v klinické praxi. Také jsem porovnála a statisticky vyhodnotila stanovení vybraných markerů ve vzorcích séra pacientů. Grafické a statistické zpracování potvrdilo využitelnost všech testovaných metod pro oba analytické systémy.

8. SEZNAM ZKRATEK

3,5-DPD = 3,5-dichlorofenyldiazonin

AIM = akutní infarkt myokardu

ALT = alaninaminotransferáza

AST = aspartátaminotransferáza

BILT = celkový bilirubin

CalSet = kalibrační set pro analytické metody

C.f.a.s. = kalibrátor pro automatický systém

CI = 95% interval spolehlivosti

CREA = kreatinin

CRP = C-reaktivní protein

cutt-off = klinické rozhodovací meze

CV = variační koeficient

CV_p = variační koeficient mezilehlé preciznosti měření

ČSKB = Česká společnost klinické biochemie

Dmax = přijatelný rozdíl

ECLIA = elektrochemiluminiscence

EFLM = Evropská federace pro klinickou chemii a laboratorní medicínu

EHK = externí hodnocení kvality

EMSE = N-ethyl-N-(3-methylfenyl)-N-succinyletylendiamin

FT4 = volný thyroxin

GLDH = glutamátdehydrogenáza

GUM = průvodce vyjádření nejistoty měření

HDL = lipoproteiny o vysoké hustotě

hs-TnT = vysoce senzitivní troponin T

IKK = interní kontrola kvality

IVD = *in vitro* diagnostika

k = koeficient rozšíření, $k = 2$

LDH = laktátdehydrogenáza

LDL = lipoproteiny o nízké hustotě

LoD, L_D = mez detekce

LoQ, L_Q = mez stanovitelnosti

n = počet měření

NAD⁺ = nikotinamidadeninukleotidový kation

NADH = nikotinamidadeninukleotidfosfát

PCCCI/2 = kontrolní materiál pro biochemické metody

PC U1/2 = kontrolní materiál universal

PC TN1/2 = kontrolní materiál troponin

RI = referenční interval

RSD = zbytková směrodatná odchylka

SEKK = česká společnost poskytující služby pro klinické laboratoře

SD = směrodatná odchylka

SOP = standardní operační postupy

T4 = thyroxin, tetrajodthyronin

TAG = triacylglyceroly

TnT = troponin T

u = standardní nejistota

u_{1,rel}...u_{n,rel} = dílčí relativní standardní nejistoty

u_{c,rel} = relativní kombinovaná nejistota

U_{c,rel} = relativní kombinovaná rozšířená nejistota

U_{c,rel max} = maximální přípustná nejistota

u_{cal,rel} = relativní standardní nejistota kalibrátoru

UREA = močovina

u_{RW,rel} = relativní standardní nejistota mezilehlé preciznosti měření

UV/VIS = ultrafialová a viditelná oblast spektra

x_p = aritmetický průměr měření

9. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1	Postup validace metody	10
Obrázek 2	Různé kombinace pravdivosti a preciznosti	13
Obrázek 3	Grafické znázornění regresní analýzy dle Passing-Babloka.....	14
Obrázek 4	Grafické znázornění pro Blandův-Altmanův rozdílový graf.....	15
Obrázek 5	Regulační Levey-Jenningsův graf	21
Obrázek 6	Syntéza močoviny za katalýzy enzymem ureázou	22
Obrázek 7	Struktura enzymu ALT a AST	23
Obrázek 8	Vzorec bilirubinu	24
Obrázek 9	Zúžení cévní stěny důsledkem nahromadění a ukládání lipidů	25
Obrázek 10	Vzorec thyreotropinu	27
Obrázek 11	Schéma spektrofotometru	30
Obrázek 12	Schéma imunoturbidimetrie.....	31
Obrázek 13	Cobas 8000 (ISE, c702, c502, e801)	32
Obrázek 14	Cobas 6000 (c501, e601)	33
Obrázek 15	Reagencie pro biochemické metody	35
Obrázek 16	Reagencie pro imunochemické metody	35
Obrázek 17	Použitý kalibrační materiál	37
Obrázek 18	Použitý kontrolní materiál	37
Obrázek 19	Grafické znázornění Passing-Bablokovy regrese pro metodu UREA	48
Obrázek 20	Bland-Altmanův rozdílový graf pro metodu UREA.....	48
Obrázek 21	Grafické znázornění Passing-Bablokovy regrese pro metodu CREA	50
Obrázek 22	Bland-Altmanův rozdílový graf pro metodu CREA.....	51
Obrázek 23	Grafické znázornění Passing-Bablokovy regrese pro metodu BILT	52
Obrázek 24	Bland-Altmanův rozdílový graf pro metodu BILT.....	53
Obrázek 25	Grafické znázornění Passing-Bablokovy regrese pro metodu ALT	54
Obrázek 26	Bland-Altmanův rozdílový graf pro metodu ALT	55
Obrázek 27	Grafické znázornění Passing-Bablokovy regrese pro metodu LDL	56
Obrázek 28	Bland-Altmanův rozdílový graf pro metodu LDL.....	57
Obrázek 29	Grafické znázornění Passing-Bablokovy regrese pro metodu CRP	58
Obrázek 30	Bland-Altmanův rozdílový graf pro metodu CRP	59
Obrázek 31	Grafické znázornění Passing-Bablokovy regrese pro metodu TNT	60
Obrázek 32	Bland-Altmanův rozdílový graf pro metodu TNT	61

Obrázek 33 Grafické znázornění Passing-Bablokovy regrese pro metodu TSH	62
Obrázek 34 Bland-Altmanův rozdílový graf pro metodu TSH	63
Obrázek 35 Grafické znázornění Passing-Bablokovy regrese pro metodu FT4	64
Obrázek 36 Bland-Altmanův rozdílový graf pro metodu FT4	65

10. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Výkonnostní charakteristiky pro validaci/verifikaci analytického postupu	11
Tabulka 2 Laboratorní nálezy TSH a FT4 u poruch funkce štítné žlázy	28
Tabulka 3 Použité reagenční kazety	34
Tabulka 4 Použité pomocné a promývací roztoky	34
Tabulka 5 Použitý kalibrační a kontrolní materiál	36
Tabulka 6 Verifikace metod (negativní hladiny kontrol) na analyzátoru Cobas 8000	39
Tabulka 7 Verifikace metod (pozitivní hladiny kontrol) na analyzátoru Cobas 8000	40
Tabulka 8 Verifikace metod (negativní hladiny kontrol) na analyzátoru Cobas 6000	41
Tabulka 9 Verifikace metod (pozitivní hladiny kontrol) na analyzátoru Cobas 6000	41
Tabulka 10 Přehled výsledných nejistot měření	42
Tabulka 11 Opakovatelnost metod (negativní hladiny vzorků) na analyzátoru Cobas 8000 ..	43
Tabulka 12 Opakovatelnost metod (pozitivní hladiny vzorků) na analyzátoru Cobas 8000 ..	44
Tabulka 13 Opakovatelnost metod (negativní hladiny vzorků) na analyzátoru Cobas 6000 ..	45
Tabulka 14 Opakovatelnost metod (pozitivní hladiny vzorků) na analyzátoru Cobas 6000 ..	45
Tabulka 15 Vyhodnocení Passing-Bablokovy regrese pro metodu UREA	47
Tabulka 16 Vyhodnocení Passing-Bablokovy regrese pro metodu CREA	50
Tabulka 17 Vyhodnocení Passing-Bablokovy regrese pro metodu BILT	52
Tabulka 18 Vyhodnocení Passing-Bablokovy regrese pro metodu ALT	54
Tabulka 19 Vyhodnocení Passing-Bablokovy regrese pro metodu LDL	56
Tabulka 20 Vyhodnocení Passing-Bablokovy regrese pro metodu CRP	58
Tabulka 21 Vyhodnocení Passing-Bablokovy regrese pro metodu TNT	60
Tabulka 22 Vyhodnocení Passing-Bablokovy regrese pro metodu TSH	62
Tabulka 23 Vyhodnocení Passing-Bablokovy regrese pro metodu FT4	64

11. LITERATURA

Ambrožová, J. 2012. Poznámky k provádění verifikace preciznosti analytické metody. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2012, 20 (41), 231-237.

Bartoš, V., Budina, M., Friedecký, B. et al. 2021. Doporučení k vyjadřování nejistot kvantitativních výsledků měření ve zdravotnických laboratořích. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2021, 29 (50), 84-93.

Beer, RR., Wielders, J., Boursier, G. et al. 2019. Validation and verification of examination procedures in medical laboratories: opinion of the EFLM Working Group Accreditation and ISO/CEN standards (WG-A/ISO) on dealing with ISO 15189:2012 demands for method verification and validation. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2019, 58 (3), 361-367. DOI:10.1515/cclm-2019-1053.

Beránek, M., Tichý, M. 2013. *Vybrané kapitoly z klinické biochemie: pro studijní program Zdravotnická bioanalytika*. Praha: Karolinum, 2013. ISBN 978-80-246-2186-9.

Bořecká, K., 2021. Výměna hlavních analyzátorů na Oddělení klinické biochemie Fakultní Thomayerovy nemocnice. *Labor Aktuell*. 2021, 25 (3), 36-41.

Braga, F., Panteghini, M. 2020. The utility of measurement uncertainty in medical laboratories. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2020, 58 (9), 1407-1413. DOI:10.1515/cclm-2019-1336.

Braga, F., Pasqualetti, S, Aloisio, E. et al. 2021. The internal quality control in the traceability era. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2021, 59 (2), 291-300. DOI:10.1515/cclm-2020-0371.

Creeden, JF., Gordon, DM., Stec, DE. et al. 2021. Bilirubin as a metabolic hormone: the physiological relevance of low levels. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*. 2021, 320 (2), E191-E207. DOI:10.1152/ajpendo.00405.2020.

Dastych, M., Breinek, P. 2015. *Klinická biochemie: bakalářský obor Zdravotní laborant*. 3. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2015. ISBN 978-80-210-7788-1.

Ďurovcová, E., Mareková, M., Molčányjová, A. et al. 2020. *Klinická biochémiá: vybrané kapitoly*. Osveta, 2020. ISBN 978-80-8063-489-6.

Esfandiari, NH., Papaleontiou, M. 2017. Biochemical Testing in Thyroid Disorders. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2017, 46 (3), 631-648. DOI:10.1016/j.ecl.2017.04.002.

Farrance, I., Frenkel, R. 2021. Measurement uncertainty and the importance of correlation. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2021, 59 (1), 7-9. DOI:10.1515/cclm-2020-1205.

Flores, CFY., de las Mercedes Hurtado Pineda, Á., Bonilla, VMC. et al. 2020. Sample Management: Stability of plasma and Serum on Different Storage Conditions. *The Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2020, 31 (1), 46-55.

Friedecký, B. 2022. Doporučení České společnosti klinické biochemie ČLS JEP. Laboratorní aspekty stanovení kardiálních troponinů. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2022, 30 (51), 21-24.

Friedecký, B., Kratochvíla, J. 2015. Bias měření základních analytů krevního séra. Výsledky a interpretace soudobých studií. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2015, 23 (44), 105-108.

Friedecký, B., Kratochvíla, J. 2019. Harmonizace v klinických laboratořích. Pojmy a problémy. Metrologická návaznost, standardizace, harmonizace. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2019, 27 (48), 116-123.

Friedecký, B., Kratochvíla, J. 2019. Nejistota a chyba měření ve zdravotnických laboratořích. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2019, 27 (48), 25-31.

Friedecký, B., Kratochvíla, J. 2020. Zpráva o biotinu a jeho interferencích u imunoanalytických metod. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2020, 28 (49), 20-23.

Friedecký, B., Zima, T., Sedlák, P. 2012. Stanovisko ČSKB k současnému stavu standardizace stanovení kreatininu v séru/plazmě. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2012, 20 (41), 44-45.

Giavarina, D. 2015. Understanding Bland Altman analysis. *Biochimica Medica*. 2015, 25 (2), 141-151. DOI:10.11613/BM.2015.015.

Grasberger, H., Refetoff, S. 2017. Resistance to thyrotropin. *Best practise & research. Clinical Endocrinology & metabolism*. 2017, 31 (2), 183-194. DOI:10.1016/j.beem.2017.03.004.

Hao, Y., Tian, L., Cao, K. et al. 2021. Repeatability and Reproducibility of SMTube Measurement in Dry Eye Disease Patients. *Journal of Ophthalmology*. 2021, article ID 1589378, 7 pages. DOI:10.1155/2021/1589378.

Hiramoto, K., Villani, E., Iwama, T. et al. 2020. Recent Advances in Electrochemiluminescence-Based Systems for Mammalian Cell Analysis. *Micromachines*. 2020, 11 (5), 530. DOI:10.3390/mi11050530.

Hiraoka, S., Takashima, S., Inokuchi, T. et al. 2019. The novel latex agglutination turbidimetric immunoassay system for simultaneous measurements of calprotectin and hemoglobin in feces. *Intestinal research*. 2019, 17 (2), 202-209. DOI:10.5217/ir.2018.00086.

Jabor, A., Franeková, J., Kubiček, Z. 2020. *Principy interpretace laboratorních testů. 2. přepracované a doplněné vydání.* Praha: Grada Publishing, 2020. ISBN 978-80-271-1272-2.

Ji, S., Yang, Y., Jeong, Y. et al. 2021. Comparison of three types of analyzers for urine-protein-to-creatinin ratios in dogs. *Journal of veterinary science*. 2021, 22 (1), e14. DOI:10.4142/jvs.2021.22.e14.

Kratzsch, J., Baumann, NA., Ceriotti, F. et al. 2021. Global FT4 immunoassay standardization: an expert opinion review. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2021, 59 (6), 1013-1023. DOI:10.1515/cclm-2020-1696.

Lu, MJ., Zhong, WH., Liu, YX. et al. 2016. Sample Size for Assessing Agreement between Two Methods of Measurement by Bland-Altman Method. *The International Journal of Biostatistics*. 2016, 12 (2), pp. 20150039. DOI:10.1515/ijb-2015-0039.

Magnusson, B., Örnemark, U. et al. 2014. *Eurachem guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0.

Mikušková, A., Beňovská, M., Dastych, M. et al. 2017. Metodika a výsledky porovnání vybraných analytů na pracovištích Oddělení klinické biochemie FN Brno. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2017, 25 (46), 177-181.

Mohammed, TU., Murtadha, JH., Razzaq, IHA. 2017. Measurement and purification of Alanine aminotransferase (ALT) enzyme activity in patients with celiac disease. *Baghdad Science Journal*. 2017, 14 (3), 557-563. DOI:10.21123/bsj.2017.14.3.0557.

Park, KCH., Gaze, DC., Collinson, PO. et al. 2017. Cardiac troponins: from myocardial infarction to chronic disease. *Cardiovascular Research*. 2017, 113 (14), 1708-1718. DOI:10.1093/cvr/cvx183.

Plzák, Z., Kratochvíla, J. 2022. *Metrologická terminologie*, 3. vydání [online]. Metrologická terminologie ve zdravotnické a analytické laboratoři. 2003-2022. SEKK s.r.o. a EURACHEM-ČR [cit. 2022-04-06]. Dostupné z: <http://sekk.cz/terminologie/index.php>

Plzák, Z., Kratochvíla, J., Friedecký, B. et al. 2021. Doporučení pro validace a verifikace postupů laboratorních vyšetření ve zdravotnických laboratořích. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2021, 29 (50), 78-83.

Pospíšil, M., Ludvík, V. 2010. *Terminologie z oblasti metrologie*, 2. vydání [online]. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2010 [cit. 2022-04-06]. Sborníky technické harmonizace. Dostupné z: https://www.unmz.cz/files/Sborn%C3%ADky%20TH/Terminologie%20v%20oblasti%20metrologie_DEF.pdf

Příbalový leták ALTPM, 2021. Roche diagnostics. [online] 2021. [cit. 2022-03-31]. Dostupné z: <https://pim-eservices.roche.com/eLD/api/downloads/e808f63b-1a46-ec11-0d91-005056a772fd?countryIsoCode=cz>

Příbalový leták BILT3, 2022. Roche diagnostics. [online] 2022. [cit. 2022-03-31]. Dostupné z: <https://pim-eservices.roche.com/eLD/api/downloads/d10ffcac-3d8a-ec11-0f91-005056a772fd?countryIsoCode=cz>

Příbalový leták CREJ2, 2022. Roche diagnostics. [online] 2022. [cit. 2022-03-31]. Dostupné z: <https://pim-eservices.roche.com/eLD/api/downloads/f815efcf-a796-ec11-0f91-005056a772fd?countryIsoCode=cz>

Příbalový leták CRP4, 2021. Roche diagnostics. [online] 2021. [cit. 2022-03-31]. Dostupné z: <https://pim-eservices.roche.com/eLD/api/downloads/387b7f06-c543-ec11-0b91-005056a772fd?countryIsoCode=cz>

Příbalový leták Elecsys Troponin T hs, 2021. Roche diagnostics. [online] 2021. [cit. 2022-03-31]. Dostupné z: <https://pim-eservices.roche.com/eLD/api/downloads/a2eae61d-3327-ec11-0d91-005056a71a5d?countryIsoCode=cz>

Příbalový leták Elecsys FT4, 2022. Roche diagnostics. [online] 2022. [cit. 2022-03-31]. Dostupné z: <https://pim-eservices.roche.com/eLD/api/downloads/dc7223e2-8498-ec11-1191-005056a71a5d?countryIsoCode=cz>

Příbalový leták LDLC3, 2021. Roche diagnostics. [online] 2021. [cit. 2022-03-31]. Dostupné z: <https://pim-eservices.roche.com/eLD/api/downloads/7ee9a956-6a9f-e911-f08c-f4a30bc86a7b?countryIsoCode=cz>

Příbalový leták Elecsys TSH, 2022. Roche diagnostics. [online] 2022. [cit. 2022-03-31]. Dostupné z: <https://pim-eservices.roche.com/eLD/api/downloads/c2068156-628d-ec11-0f91-005056a772fd?countryIsoCode=cz>

Příbalový leták UREAL, 2022. Roche diagnostics. [online] 2022. [cit. 2022-03-31]. Dostupné z: <https://pim-eservices.roche.com/eLD/api/downloads/8743dee6-26a5-ec11-1191-005056a71a5d?countryIsoCode=cz>

Racek, J., Rajdl, D. 2021. *Klinická biochemie*. Třetí, přepracované a rozšířené vydání. Praha: Galén, 2021. ISBN 978-80-7492-545-0.

Ramsey, MH., Ellison, SLR., Rostron, P. et al. 2019.

Eurachem/EUROLAB/CITAC/Nordtest/AMC Guide: *Measurement uncertainty arising from sampling: a guide to methods and approaches*. Second edition, Eurachem (2019). ISBN 978-0-948926-35-8. Dostupné z: <http://www.eurachem.org>

Saravjeet, S., Minakshi, S., Greeta, S. 2021. Recent advancements in urea biosensors for biomedical applications. *IET Nanobiotechnology*. 2021, 15 (4), 347-464. DOI:10.1049/nbt2.12050.

Sengul, U. 2016. Comparing determination methods of detection and quantification limits for aflatoxin analysis in hazelnut. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2016, 24 (1), 56-62. DOI:10.1016/j.jfda.2015.04.009.

Sproston, NR., Ashworth, JJ. 2018. Role of C-reactive protein at Sites of Inflammation and Infection. *Frontiers in Immunology*. 2018, 9: 754. DOI:10.3389/fimmu.2018.00754.

Šálek, T., Franeková, J., Jabor, A. et al. 2016. Postanalytická fáze a interpretace laboratorního testu (post-postanalytická fáze). *Klinická biochemie a metabolismus*. 2016, 24 (45), 82-87.

Šprongl, L., Pláňková, H., Stejskal, D. 2014. Sjednocení a validace referenčních intervalů, pilotní studie. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2014, 22 (43), 132-137.

Šprongl, L., Stančík, L., Minář, J. et al. 2022. Doporučení České společnosti klinické biochemie ČLS JEP o vnitřní kontrole kvality. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2022, 30 (51), 19-20.

Štern, P. 2011. *Obecná a klinická biochemie: pro bakalářské obory studia*. 2. vydání. Praha: Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-1979-8.

Trumbo, TA., Schultz, E., Borland, MG. et al. 2013. Applied spectrophotometry: Analysis of a biochemical mixture. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 2013, 41 (4), 242-250. DOI:10.1002/bmb.20694.

Urbánek, P., Seifert, B. 2018. *Abnormální jaterní testy*. Supplementum 2018. Praha: Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, Centrum doporučených postupů pro praktické lékaře, 2018. ISBN 978-80-88280-06-4.

Wolska, A., Remaley, AT. 2020. Measuring LDL-cholesterol: What is the best way to do it? *Curr Opin Cardiol*. 2020, 35 (4), 405-411. DOI:10.1097/HCO.0000000000000740.

Zima, T. 2017. *Laboratorní diagnostika*. 3. doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén, 2017. ISBN 978-80-7492-074-5.

Zima, T., Kratochvíla, J., Budina, M. 2020. Doporučení: Systém externího hodnocení kvality. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2020, 28 (49), 35-36.

Zulle, LB. 2011. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochemia Medica*. 2011, 21 (1), 49-52. DOI:10.11613/BM.2011.010.