

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Soňa Kucejová

**POROVNANIE STANOVENIA HORMÓNŮV (FOLIKULY
STIMULUJÚCÍ HORMÓN, LUTEINIZAČNÝ HORMÓN,
PROLAKTÍN, TESTOSTERÓN, PROGESTERÓN)
DVOMA ANALYTICKÝMI SYSTÉMAMI. PREVEDENIE
AKREDITOVANEJ METÓDY A JEJ VERIFIKÁCIA.**

Comparison of the determination of hormones (Follicle stimulating hormone, Luteinizing hormone, Prolactin, Testosterone, Progesteron) by two analytical systems.
Converting accredited method and its verification.

Bakalářská práce

Konzultant bakalářské práce: Ing. Drahomíra Springer Ph.D.

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Markéta Martínková Ph.D.

Praha 2013

Táto bakalárska práca vznikla v súvislosti s riešením výskumného zámeru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 2. září 2013

Abstrakt a kľúčové slová

Abstrakt

Analytický systém ARCHITEC i2000SR bol verifikovaný podľa požiadaviek laboratória ÚLBD VFN a 1. LF UK v Prahe. Ako výkonnostné parametre verifikácie analytických postupov pre testosterón, progesterón, luteinizačný hormón, folikuly stimulujúci hormón a prolaktín boli vyhodnotené opakovateľnosť, medziľahlá precíznosť a neistota merania. Namerané výsledky kontrolných vzoriek Lyphochek sa zhodovali s hodnotami, ktoré uviedol výrobca. Opakovateľnosť: variačné koeficienty testosterónu pre Lyphochek 1 6,81%, pre Lyphochek 3 6,40%, progesterónu 2,4% a 1,8%, luteinizačného hormónu 5,38% a 1,89%, folikuly stimulujúceho hormónu 5,12% a 3,24%, prolaktínu 1,45% a 1,83%. Medziľahlá precíznosť: variačné koeficienty testosterónu pre Lyphochek 1 6,02%, Lyphochek 2 3,60%, Lyphochek 3 3,07%, progesterónu 7,9%, 4,9% a 5,8%, luteinizačného hormónu 4,50%, 5,51% a 5,83%, folikuly stimulujúceho hormónu 4,00%, 3,72% a 4,87%, prolaktínu 4,60%, 4,20% a 5,00%. Neistota merania: testosterón 6,02%, progesterón 7,9%, luteinizačný hormón 5,83%, folikuly stimulujúci hormón 4,87%, prolaktín 5,00%.

Analytický systém ARCHITECT i2000SR bol porovnaný s dovtedy používaným systémom ADVIA Centaur, aby sa zistilo či je možné previesť metódy Centaur Testosterón, Progesterón, Luteinizačný hormón, Folikuly stimulujúci hormón a Prolaktín na systém ARCHITECT i2000SR. Pre porovnanie bola použitá lineárna regresia. Medzi hodnotami stanovenými na obidvoch analyzátoroch bola nájdená veľmi dobrá zhoda. Korelačné koeficienty sa pohybovali v rozmedzí od 0,9840 do 0,9961 (testosterón $r = 0,9843$, progesterón $r = 0,9840$, luteinizačný hormón $r = 0,9961$, folikuly stimulujúci hormón $r = 0,9884$, prolaktín $r = 0,9900$).

Kľúčové slová:

ARCHITECT i2000SR, ADVIA Centaur, verifikácia, porovnanie, testosterón, progesterón, luteinizačný hormón, folikuly stimulujúci hormón, prolaktín

Abstract

Analytical system ARCHITECT i2000SR was verified according to requirements of ÚLBD VFN and 1. LF UK laboratory in Prague. Repeatability, intermediate precision, and measurement uncertainty were determined as performance parameters for verification of analytical assays for testosterone, progesterone, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and prolactin. Results of Lyphochek control samples, which were measured, were consistent with values given by manufacture. Repeatability: coefficients of variation for testosterone Lyphochek 1 6,81%, for Lyphochek 3 6,40%, progesterone 2,4% and 1,8%, luteinizing hormone 5,38% and 1,89%, follicle stimulating hormone 5,12% and 3,24% prolactin 1,45% a 1,83%. Intermediate precision: coefficients of variation for testosterone Lyphochek 1 6,02%, Lyphochek 2 3,60%, Lyphochek 3 3,07%, progesterone 7,9%, 4,9% and 5,8%, luteinizing hormone 4,50%, 5,51% and 5,83%, follicle stimulating hormone 4,00%, 3,72% and 4,87%, prolactin 4,60%, 4,20% and 5,00%. Measurement uncertainty: testosterone 6,02%, progesterone 7,9%, luteinizing hormone 5,83%, follicle stimulating hormone 4,87%, prolactin 5,00%.

Analytical System Architect i2000SR was compared with previously used ADVIA Centaur system to find out, whether it is possible to convert the method Centaur Testosterone, Progesterone, Luteinizing hormone, Follicle stimulating hormone and Prolactin to the System ARCHITECT i2000SR. For comparison, linear regression was used. Very good agreement was found between the values which were determined on both analyzers. Correlation coefficients ranged from 0.9840 to 0.9961 (testosterone $r = 0,9843$, progesterone $r = 0,9840$, luteinizing hormone $r = 0,9961$, follicle stimulating hormone $r = 0,9884$, prolactin $r = 0,9900$).

Key words:

ARCHITECT i2000SR, ADVIA Centaur, verification, comparison, testosterone, progesterone, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, prolactin

Pod'akovanie

Touto cestou by som sa chcela veľmi pekne poďakovať pani Ing. Drahomíre Springer Ph.D., ktorá mi počas celého písania bakalárskej práce veľmi pomáhala, dávala mi cenné rady, bola ústretová, chápavá a trezlivá. Ďakujem jej aj za to, že mi ukázala, čo obnáša práca v klinicko-biochemickom laboratóriu. Taktiež by som sa chcela veľmi pekne poďakovať pani doc. RNDr. Markéte Martínkovej, Ph.D. za jej cenné rady a za samotné sprostredkovanie a možnosť vypracovať bakalársku prácu v laboratóriu ÚLBLD VFN a 1. LF UK.

Moja veľká vďaka patrí aj mojim rodičom, ktorí mi štúdium umožnili a od prvého dňa v škole ma podporovali a boli mi oporou.

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Teoretická časť	10
2.1 Validácia a verifikácia.....	10
2.1.1 Kto vykonáva validáciu či verifikáciu.....	10
2.1.2 Kedy sa vykonáva validácia a verifikácia	11
2.1.3 Rozsah a intenzita validácie a verifikácie	11
2.1.4 Obecný postup validácie a verifikácie.....	12
2.2 Experimentálne a štatistické postupy validácie a verifikácie	12
2.2.1 Opakovateľnosť	12
2.2.2 Medziľahlá precíznosť	13
2.2.3 Vychýlenie (bias) metódy.....	13
2.2.4 Porovnateľnosť metód	14
2.2.5 Pracovný rozsah	14
2.2.6 Medza detekcie a medza stanovenia	15
2.2.7 Výťažnosť	15
2.2.8 Intereferencie.....	16
2.2.9 Robustnosť analytickej metódy.....	16
2.2.10 Neistota merania.....	16
2.3 Hormóny.....	17
2.3.1 Testosterón.....	17
2.3.2 Progesterón	18
2.3.3 Luteinizačný hormón.....	20
2.3.4 Folikuly stimulujúci hormón.....	21
2.3.5 Prolaktín.....	22
2.4 Imunoanalytické metódy.....	23
2.4.1 Princíp systému ADVIA Centaur.....	24
2.4.2 Princíp systému ARCHITECT i2000 SR.....	25
3. Experimentálna časť	27
3.1 Analyzované vzorky	27
3.2 Použité chemikálie	27
3.2.1 Zoznam použitých chemikálií pre ADVIA Centaur.....	27
3.2.2 Zoznam použitých chemikálií pre ARCHITECT i2000SR.....	28
3.3 Postupy merania a spracovanie nameraných dát	30
3.3.1 Postup merania pre opakovateľnosť.....	30
3.3.2 Postup merania pre medziľahlú precíznosť	30
3.3.3 Postup kvantifikácie hormónov systémom ADVIA Centaur	31
3.3.4 Postup kvantifikácie hormónov systémom ARCHITECT	31
3.4 Spracovanie nameraných dát.....	32
4. Výsledky a diskusia.....	33

4.1 Testosterón	33
4.1.1 Opakovateľnosť a medziľahlá precíznosť	33
4.1.2 Neistota merania.....	34
4.1.3 Porovnanie s analyzátorom Centaur	34
4.2 Progesterón.....	36
4.2.1 Opakovateľnosť a medziľahlá precíznosť.....	36
4.2.3 Neistota merania.....	37
4.2.4 Porovnanie s analyzátorom Centaur	37
4.3 Luteinizačný hormón	38
4.3.1 Opakovateľnosť a medziľahlá precíznosť.....	38
4.3.2 Neistota merania.....	39
4.3.3 Porovnanie s analyzátorom Centaur	40
4.4 Folikuly stimulujúci hormón	41
4.4.1 Opakovateľnosť a medziľahlá precíznosť.....	41
4.4.2 Neistota merania.....	42
4.4.3 Porovnanie s analyzátorom ADVIA Centaur.....	42
4.5 Prolaktín	44
4.5.1 Opakovateľnosť a medziľahlá precíznosť.....	44
4.5.2 Neistota merania.....	45
4.5.3 Porovnanie s analyzátorom Centaur	45
5. Záver.....	49
Literatúra.....	50
Príloha.....	54

Zoznam skratiek

AM	aritmetický priemer
B	bias
CE	European Conformity
CV	variačný koeficient
FSH	folikuly stimulujúci hormón
GABA	gamaaminomáselná kyselina
GFC	gelová filtračná chromatografia
GnRH	gonadotropíny uvoľňujúci hormón
hCG	ľudský chorion gonadotropín
ID-GC-MS/MS	isotope dilution-gas chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry
ID-LC-MS/MS	isotope dilution-liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry
IVD MD	in vitro diagnostics medical device
LH	luteinizačný hormón
LoD	medza detekcie
LoQ	medza stanovenia
MS/MS	tandemová hmotnostná spektrometria
n	počet meraní
PEG	precipitácia s polyetylen glykolom
PRL	prolaktín
r	korelačný koeficient
R	výt'aznosť
RLU	relatívne svetelné jednotky
SD	smerodajná odchýlka
TSH	tyreotropný hormón
ÚLBDL VFN	Ústav lekárskej biochémie a laboratórnej diagnostiky Všeobecnej fakultnej nemocnici v Prahe
1. LF UK	1. lekárska fakulta Univerzity Karlovy

1. ÚVOD

Klinické laboratória denno denne vykonávajú tisícky rozborov, na základe ktorých lekári rozhodujú o ďalšej liečbe pacientov. Práve životy závislé na výsledku stanovenia sú dôvodom, prečo sa stále vyvíjajú nové a nové meracie systémy, ktoré by boli presnejšie, špecifickejšie a citlivešie. Je tiež v záujme samotného laboratória, poskytnúť lekárovi čo najpresnejší výsledok, s čo najvyššou určitosťou.

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo po prvé verifikovať, teda poskytnúť objektívny dôkaz, že nový analytický merací systém ARCHITECT i2000SR spĺňa špecifikované požiadavky a funkčné vlastnosti deklarované výrobcom v laboratóriu Ústavu lekárskej biochémie a laboratórnej diagnostiky Všeobecnej fakultnej nemocnici a 1. Lekárskej fakulty Univerzity Karlovej (ÚLBLD VFN a 1. LF UK) v Prahe. Jednalo sa o určenie opakovateľnosti, medziláhlej precíznosti a neistoty merania. Druhým cieľom bolo zistiť či je možné prevedenie metód pre testosterón, progesterón, luteinizačný hormón, folikuly stimulujúci hormón a prolaktín z doposiaľ používaného systému ADVIA Centaur na nový systém ARCHITECT i2000SR.

2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Validácia a verifikácia

Pojem validácia je v metrologickom slovníku definovaný ako overenie, že špecifikované požiadavky sú primerané na zamýšľané použitie [1]. V Slovníku managementu kvality je tento termín charakterizovaný ako potvrdenie získané prostredníctvom poskytnutia objektívnych dôkazov, že požiadavky na špecificky zamýšľané použitie alebo špecifickú aplikáciu boli splnené. Validácia potvrdzuje, že merací postup, systém alebo výrobok IVD MD (in vitro diagnostics medical device), ktorý bol uvedený na trh v súlade so zásadami Direktívy IVD 98/79 EC, je schopný plniť všetky požiadavky, ktoré sa na neho budú klásť [2].

Pri validácii sa vyhodnocujú výkonnostné charakteristiky metódy, potvrdzujú sa obmedzenia metódy a identifikujú sa vplyvy, ktoré môžu tieto charakteristiky zmeniť a do akej miery [3]. V klinických laboratóriách sa vo väčšine používajú validované metódy. Validáčnej charakteristiky sú súčasťou príbal'ovacieho letáku od výrobcu. V takomto prípade je nutné vykonať iba verifikáciu.

Verifikácia je poskytnutie objektívneho dôkazu, že daná položka spĺňa špecifikované požiadavky [2]. Je potvrdením, že sú dosiahnuté funkčné vlastnosti alebo zákonné požiadavky na merací systém. Taktiež potvrdzuje, že dáta o analytických znakoch deklarovane výrobcem, iným laboratóriom alebo referenčnou inštitúciou sú v danom laboratóriu s použitím konkrétneho meracieho systému dosiahnuteľné. Verifikácia dokazuje spôsobilosť personálu laboratória, zariadenia a prostredia vo vzťahu k vykonávaniu daného meracieho postupu. Výsledkom je verifikačný protokol, ktorého súčasťou je vyjadrenie či je daná metóda vhodná pre zamýšľané použitie.

Z dôvodu mimoriadne silného dopadu výsledkov analytických meraní v praxi je validácia a verifikácia nutná. Zaisťujú kvalitu dát pri rutinnej práci [2].

2.1.1 Kto vykonáva validáciu či verifikáciu

Validáciu a verifikáciu vykonávajú najmä výrobcovia diagnostických systémov, ktorých meracie prístroje majú byť uvedené na trh Európskej únie, čo im nariaďuje smernica IVD 98/79 EC [2]. Celkový postup a rozsah validácie IVD MD je stanovený normou ČSN EN 13612. Validácia a verifikácia je tiež vykonávaná profesionálnymi organizáciami analytikov, ako je napríklad Association of Official Analytical Chemists (AOAC), ktorej cieľom je prispievať k celosvetovej dôverihodnosti analytických výsledkov. Posledným článkom, ktorý vykonáva konečnú validáciu a verifikáciu meracieho postupu je laboratórium. Pokiaľ validačné údaje pochádzajú z dokumentácie

výrobcu a sú podložené experimentami v laboratóriách výrobcu, profesionálnych organizáciách alebo v kalibračných/referenčných laboratóriách, je laboratórium povinné tieto dáta neustále doplňovať a reverifikovať. Z tohoto dôvodu musia byť dodržiavané štandardné operačné postupy výrobku, ktoré spĺňajú požiadavky Direktívy IVD 98/79 EC.

2.1.2 Kedy sa vykonáva validácia a verifikácia

Existuje viacero prípadov kedy je laboratórium povinné vykonať validáciu či verifikáciu [2]. A to pred zavedením novej metódy, pred aplikáciou nového analytického meracieho systému do laboratória alebo pred zavedením nového alebo iného diagnostického kitu. Ďalším dôvodom na opätovné vykonanie validácie či verifikácie je rozšírenie používanej metódy o ďalší účel (napr. rozšíri meranie o ďalší druh biologického materiálu), pretrvávajúci problém pri kontrole kvality, prevzatie metódy (tj. typu in-house) z iného laboratória či z publikácie alebo významná zmena inštrumentácie.

2.1.3 Rozsah a intenzita validácie a verifikácie

Rozsah a hĺbka validácie či verifikácie musí vždy odpovedať potrebe získať dostatok údajov k rozhodnutiu či je metóda skutočne vhodná na zamýšľaný účel [2]. Validačné a verifikačné plány sú dané charakterom validovanej či verifikovanej metódy.

Z hľadiska validácie či verifikácie a ich potrebného rozsahu je možné klinické skúšky rozdeliť do štyroch skupín. Kvalitatívna skúška vykonávaná pomocou výrobku IVD vybaveným značkou zhody CE (European Conformity) [2]. U tejto skupiny metód je jedinou podmienkou striktné dodržiavať pracovné postupy výrobcu. Aj v tomto prípade by mal byť vytvorený program vnútornej kontroly kvality. Na základe Direktívy 98/79 EC by mal byť kontrolný materiál doporučovaný, dodávaný a charakterizovaný výrobcom IVD podľa normy ISO 15198.

Kvantitatívna skúška vykonávaná pomocou výrobku IVD vybaveným značkou zhody CE [2, 4]. Do tejto skupiny spadajú metódy, ktoré používajú prostriedky splňujúce požiadavky Direktívy 98/79 EC. Laboratórium sa zameriava na verifikáciu základných vopred validovaných parametrov. Verifikačný plán výrobku IVD MD (minimum): precíznosť (opakovateľnosť, medziľahlá precíznosť), vychýlenie (bias) kvantifikované ako výťažnosť, pracovný rozsah. Tieto znaky sú potrebné na odhad neistoty výsledku merania.

Kvantitatívna skúška vykonávaná pomocou výrobku IVD vybaveným značkou zhody CE, ale s použitím modifikovaného postupu [2, 5]. Modifikovaný postup by mal

byť podrobený krížovej validácii, kde sa porovnávajú validačné parametre dvoch alebo viacerých analytických systémov. Najčastejšie ide o porovnanie pôvodne validovanej bioanalytickej metódy, ktorá slúži ako referencia a modifikovanej metódy ako porovnávacej zložky. Jej cieľom je potvrdiť, že modifikáciou postupu nedošlo k porušeniu zhody vlastností s požiadavkami špecifikovanými pre dané použitie.

Kvantitatívna skúška vyvinutá laboratóriom (in-house) [2, 4]. Takýto typ metódy musí byť validovaný v plnom rozsahu. Laboratórium by malo vykonať nasledujúce: precíznosť (opakovateľnosť, medziľahlá precíznosť), vychýlenie (bias) výťažnosť, linearitu, pracovný rozsah merania, medzu detekcie a medzu stanovenia, interferencie, porovnanie s inou metódou, referenčné intervaly.

2.1.4 Obecný postup validácie a verifikácie

Na začiatku je potrebné sformulovať požiadavky, ktoré majú byť na daný účel použitia dosiahnuté (u výrobkoch IVD MD sú tieto požiadavky súčasťou pracovnej dokumentácie dodané výrobcom a laboratórium iba verifikuje ich platnosť) [2, 3]. Následne sa určí rozsah validácie/verifikácie (tj. výber validačných parametrov). Základným kritériom pri výbere je získať dostatok údajov, aby bolo možné posúdiť či je metóda vhodná pre zamýšľaný účel. Ďalej sa vypracuje plán a vykonajú príslušné merania. Výsledky merania sú následne vyhodnotené. Niekedy môže nastať prípad, že výsledky sú nedostatočné, a preto je potrebné podstúpiť opatrenia k tomu aby boli špecifikované požiadavky splnené. Posledným krokom je vytvorenie dokumentácie validácie/verifikácie vo forme validačnej/verifikačnej správy.

2.2 Experimentálne a štatistické postupy validácie a verifikácie

2.2.1 Opakovateľnosť

Opakovateľnosť je definovaná ako precíznosť merania za súboru podmienok opakovateľnosti merania, pričom podmienky opakovateľnosti merania zahŕňajú rovnaký postup merania, rovnaký personál obsluhy, rovnaký merací systém, rovnaké pracovné podmienky, rovnaké miesto a opakované merania na rovnakých alebo podobných objektoch v krátkom časovom úseku [1, 6]. Opakovateľnosť je vlastnosť metódy, nie výsledku.

Cieľom je kvantifikovať náhodné chyby merania [2]. Doporučuje sa 20 výsledkov merania dvoch vzoriek s dvomi rôznymi hodnotami (jedna vzorky zvnútra referenčného intervalu, druhá nad alebo pod hodnotou hornej/dolnej hranice

referenčného intervalu alebo rozhodovacieho limitu). K meraniu môžu byť použité ako vzorky materiálov pacientov tak aj kontrolné/referenčné materiály.

Štatistické hodnotenie: priemer, smerodajná odchýlka (SD) opakovateľnosti, variačný koeficient opakovateľnosti.

2.2.2 Medzil'ahlá precíznosť

Medzil'ahlá precíznosť je definovaná, podobne ako opakovateľnosť, ako precíznosť merania za súboru podmienok medzi'ahlej precíznosti merania [1, 6]. Podmienka zahŕňa opäť rovnaký postup merania, rovnaké miesto a opakované merania na rovnakých alebo podobných objektoch. Rozdiel je v tom, že meranie prebieha v rozšírenom časovom úseku, ale môže obsahovať ďalšie podmienky zahrňujúce zmeny.

Varianta 1:

Hodnota medzi'ahlej precíznosti sa zistí z výsledkov vnútornej kontroly kvality [3]. Doporučuje sa obdobie 3 až 6 mesiacov pri používaní jednej šarži kalibrátora a kontrolných materiálov. Pri meraní sa používajú dva až tri rôzne hodnoty koncentrácie analytu. Do výpočtu sa nezahŕňajú odľahlé výsledky.

Varianta 2:

Používajú sa dva až tri vzorky materiálov o rôznych hodnotách. Meria sa 10 (minimum) až 20 (optimum) dní po sebe. Je potrebné získať aspoň 20 výsledkov. Pokiaľ je pri meraní v niektorom dni získaný odľahlý výsledok, musí sa doba merania adekvátne predĺžiť.

Štatistické hodnotenie: priemer, SD medzi'ahlej precíznosti, variačný koeficient medzi'ahlej precíznosti.

2.2.3 Vychýlenie (bias) metódy

Bias je definovaná ako hodnota odhadu systematickej chyby merania alebo ako rozdiel medzi strednou hodnotou výsledku skúšky a prijatou referenčnou hodnotou [1, 6].

Cieľom je odhadnúť systematickú chybu merania pomocou analýzy referenčného alebo vhodného kontrolného materiálu [2]. K zisteniu tohoto odhadu musí byť minimalizovaná náhodná chyba merania použitím dostatočného počtu opakovaných meraní. Hodnota vychýlenia (bias) dokumentuje stav náväznosti meraní v laboratóriu.

Ideálnymi vzorkami pre stanovenie vychýlenia (bias) merania sú matricové certifikované referenčné materiály, ktoré disponujú hodnotami obsahu analytov získanými referenčnými meracími postupmi. Často sa však stáva, že takéto vzorky sú pre bežné laboratórium nedostupné. V praxi je preto potrebné voliť postup, kedy

laboratórium porovnáva svoje výsledky s výsledkami ostatných laboratórií, ktoré využívajú rovnaké kontrolné materiály. Toto porovnanie je možné zrealizovať s pomocou kontrolných materiálov, ktoré boli predtým použité v programoch externého hodnotenia kvality.

Je potrebné vykonať 10 meraní jednej vzorky za podmienok opakovateľnosti a získať súbor výsledkov x_i ($i = 1$ až 10) [7]. Z hodnôt sa vypočíta aritmetický priemer (AM) a následne hodnota opakovateľnosti ako SD a variačný koeficient (CV) (%). Nakoniec sa vypočíta hodnota vychýlenia (bias) ako výt'ážnosť (R):

$$R = AM/\mu$$
$$R = 100 \cdot (AM/\mu) [\%]$$

kde μ je referenčná hodnota.

Samotná hodnota pre bias (B) sa získa:

$$B = R - 100 [\%]$$

2.2.4 Porovnatel'nosť metód

Cieľom je vyhodnotiť vychýlenie, typ systematickej chyby a koreláciu porovnaním validovanej metódy s metódou porovnávaciou [2].

Ideálnou porovnávaciou metódou je referenčný merací postup. V bežnej praxi je však obvykle nedostupný, preto sa postupuje tak, že sa nová metóda/postup/analytický systém porovnáva s inou bežnou metódou/postupom/analytickým systémom, ktoré boli už vopred validované.

Vzorky na určenie porovnatel'nosti metód musia byť starostlivo vybrané tak, aby rovnomerne pokrývali celý pracovný rozsah merania. Doporučuje sa meranie jednotlivých vzoriek v duplikátoch. Experiment môže byť hotový aj za jeden deň, odporúča sa však 5 dní po ôsmich vzorkách denne.

Získané dáta je najvhodnejšie zapísať do tabuľky. V prípade vynesenia do grafu sa výsledky porovnávej metódy vždy uvádzajú na os x a výsledky validovanej metódy na os y. Na grafický záznam dát sa môže používať Bland-Altmanov diagram, kde sa na os x umiestnia priemery výsledkov a na os y rozdiely výsledkov obidvoch metód (s výhodou vyjadrené v %) alebo sa používa graf regresnej závislosti, kde je na ose x opäť lokalizovaná hodnota porovnávej metódy. Na posúdenie systematickej posunu validovanej metódy od porovnávej sa doporučuje používať neparametrické regresie (napr. Passing-Bablok, Deming).

2.2.5 Pracovný rozsah

Pracovný rozsah je definovaný ako uzavretý interval hodnot množstva alebo obsahu meranej veličiny vo vzorke, pre ktorý bolo validáciou potvrdené, že metóda (postup) je v ňom aplikovateľná (neistota merania je v tejto oblasti priateľná) [6].

Ohraničenie tvorí najčastejšie zdola medza stanovenia (podľa definície dolná hranica pracovného rozsahu nesmie byť menšia než medza stanovenia).

Funkcia závislosti analytického signálu na množstve, obsahu alebo koncentrácii má vo svojej obecnej podobe sigmoidný tvar [2]. Pri nízkych hodnotách obsahu alebo koncentrácie limituje k nule alebo ku konštante a pri vysokých koncentráciách k hornej hraničnej hodnote. V obidvoch týchto krajných oblastiach však neúmerne rastie neistota výsledku. Pokiaľ chceme udržať neistotu v priateľných hodnotách, môžeme použiť iba určitú časť funkcie. Obecne sa zvolí jej lineárna časť, ktorú možno exaktne popísať matematickou funkciou. Pracovný rozsah kvantitatívnej analýzy sa stanovuje meraním vzoriek s rôznou hodnotou obsahu analytu. V prípade, že ide o významne nelineárnu závislosť je potrebné nájsť vhodný model a výber rozsahu a optimalizáciu vykonať tak, aby bola neistota kalibrácie minimálna.

2.2.6 Medza detekcie a medza stanovenia

Medza detekcie je nameraná hodnota veličiny získaná daným postupom merania, pre ktorú je pravdepodobnosť nepravdivého tvrdenia o neprítomnosti zložky v materiály β , pričom pravdepodobnosť nepravdivého tvrdenia o jej prítomnosti je α [1]. Medza stanovenia je najnižšie množstvo analytu vo vzorke, ktoré môže byť stanovené ako exaktná hodnota s požadovanou hodnotou neistoty. Ako materiál sa najčastejšie používa vzorkový blank alebo „nulový“ kalibrátor. Postup stanovenia spočíva v zmeraní 10 vzoriek blanku v sérii pomocou bežne používanej kalibrácie. Vypočíta sa hodnota SD_{blank} a následne hodnota medze detekcie ako:

$$LoD = 3 \times SD_{blank}$$

Z predchádzajúceho vzťahu je tiež určíaná medza stanovenia podľa vzťahu:

$$LoQ = 3 \times LoD$$

2.2.7 Výťažnosť

Hodnoty výťažnosti merania dosiahnuté pridaním meraného analytu ku vzorke meraného materiálu kvantifikujú vychýlenie merania ako bolo už spomenuté [2]. Hodnoty výťažnosti môžu tiež poskytnúť informácie o analytickej selektivitě validovanej metódy, a to vyhodnotením signifikantnej proporčionalnej systematickej chyby merania. Takéto hodnoty sú získané po pridaní interferentu ku vzorke meraného biologického materiálu. V prípade separačných metód je výťažnosť merania základnou informáciou o účinnosti izolácie zložky od matrice vzorky. V klinických laboratóriách sa zisťuje výťažnosť prídavkom vhodného množstva analytu do biologického materiálu.

2.2.8 Intreferencie

Celý postup experimentu sa vykonáva podľa pravidiel pri stanovení výtlačnosti. Hlavným rozdielom je, že ako prídavok sa nepridáva analyt, ale interferent [2].

Základnými testovacími interferentmi sú hemoglobín, pridávaný ako štandardný roztok hemoglobínu alebo hemolyzát erytrocytov, bilirubín, pridávaný vo forme štandardného roztoku, triacylglyceroly, pridávané ako komerčne dostupné lipidové suspenzie.

Dokumentácia výsledkov je vo forme grafu, ktorý zobrazuje závislosť teoretických hodnôt koncentrácií na nameraných hodnotách. Výskyt interferencií je možné dobre detekovať porušením linearitu vzťahu, teda zmenou smernice grafu, ktorá indikuje prítomnosť proporcionálnej systematickej chyby spôsobenej interferentom.

2.2.9 Robustnosť analytickej metódy

Robustnosť metódy je definovaná ako schopnosť poskytovať priateľné výsledky merania aj v prípade, že dôjde k malým odchýlkam od meracieho postupu alebo zloženia vzorky [3, 6]. Udáva jej spoľahlivosť pri bežnom používaní.

Pri stanovení robustnosti sa matematicko-štatistickým postupom zaisťuje, ako veľmi je analytický signál závislý na malých zmenách parametrov, ktoré charakterizujú analytický postup.

Experimentálne sa určuje úmyselným zanášaním malých zmien do štandardného operačného postupu. Táto charakteristika sa vyhodnocuje len pokiaľ je to vhodné.

2.2.10 Neistota merania

Neistota je parameter charakterizujúci rozptýlenie hodnôt, ktoré sú na základe dostupných informácií priradené meranej veličine [7, 8]. Neistota vymedzuje hranice, v ktorých je výsledok s danou (určitou) pravdepodobnosťou považovaný za správny tj. presný a pravdivý.

Štandardná neistota (u_1 až u_n) je neistota vyjadrené vo forme smerodajnej odchylky [8].

Kombinovaná neistota (u_c) je celková neistota, ktorú získame spojením všetkých zložiek neistoty (vyjadrených vo forme SD) podľa pravidla o šírení neistôt.

Rozšírená kombinovaná neistota (U_c) je interval, o ktorom sa dá predpokladať, že sa v ňom nachádza hodnota meranej veličiny na vyššej úrovni spoľahlivosti. Hodnota U_c sa získa vynásobením u_c koeficientom rozšírenia k . Voľba koeficientu závisí na požadovanej hladine spoľahlivosti. Pre hladinu spoľahlivosti približne 95% sa $k = 2$ (pre hladinu 99% je $k = 3$).

Hodnota neistoty merania v klinických laboratóriách sa skladá s čiastkových neistôt.

Dlhodobá presnosť (reprodukovateľnosť, medziľahlá precíznosť) ($u_{r, repro}$): zdrojom dát sú výsledky vnútornej kontroly kvality [8]. Mierou je CV (%).

Systematická odchyľka (vychýlenie, bias) a výťažnosť (R): stanovuje sa experimentálne a je to rozdiel medzi priemerom výsledkov merania a správnu (referenčnou) hodnotou [8]. Predmetom merania je vhodný referenčný materiál, ktorý musí byť vždy doprevádzaný údajom o referenčnej hodnote a jej neistote. Stanovenie meraní prebieha za podmienok opakovateľnosti.

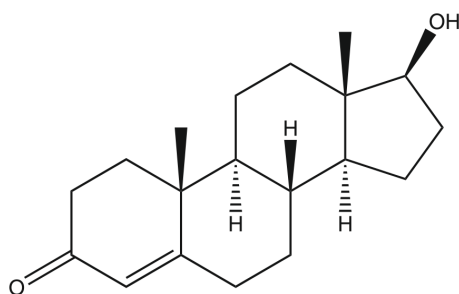
Neistota vychýlenia a výťažnosti ($u_{r, xp}$): obidve hodnoty, z ktorých sa počíta vychýlenie metódy alebo výťažnosť, majú svoju neistotu [8]. Prvá je neistota referenčnej hodnoty uvedená v certifikáte. Druhá je neistota hodnoty priemeru, daná opakovateľnosťou merania a ich počtom (SD/\sqrt{n}).

Neistoty certifikovaných referenčných materiálov ($u_{r, ref}$): povinná súčasť certifikátov referenčných materiálov [8]. Sú uvádzané formou rozšírenej kombinovanej neistoty U_{ref} .

V prípade, že nie je dostupný referenčný materiál s udanou neistotou deklarovanej hodnoty, vyhodnotí sa medziľahlá precíznosť vyjadrená ako CV (%) alebo ako SD (jednotky metódy) [3].

2.3 Hormóny

2.3.1 Testosterón



Obr. 2.1: Chemická štruktúra testosterónu [22].

Testosterón je steroidný hormón, ktorého molekulová hmotnosť je 288,4 daltona. Je odvodený od delta-5-pregnenolónu a progesterónu [9]. Dôležitými medziproduktmi sú dehydroepiandrosteron a androstendion.

Testosterón sa v periférnej krvi vyskytuje prevažne viazaný na transportné proteíny [10, 11]. Voľný predstavuje menej ako 2,5% celkového testosterónu v krvi.

Je metabolizovaný hlavne v pečeni na 17-ketosteroidy, ktoré sú ako glukuronidy a sulfáty vylučované v moči.

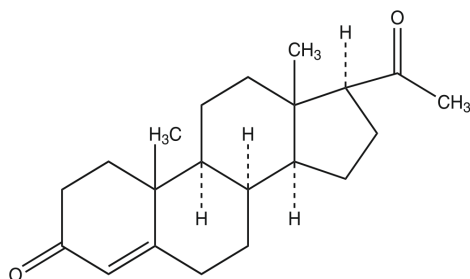
U mužov je testosterón vylučovaný v semenníkoch a kôrou nadobličiek [9]. Syntéza a následné vylučovanie hormónu prebieha hlavne v Leydigových bunkách semenníkov ako odpoveď na luteinizačný hormón z prednej hypofýzy.

Ženy majú obvykle 3 až 4 násobne nižšiu hladinu testosterónu než s akou sa stretávajú u zdravých mužov [12]. Malé množstvo hormónu je vylučované kôrou nadobličiek a vaječníkmi. Najväčšie množstvo (50 až 60%) je produktom premeny prekursorov, dehydroepiandrosteronu a androstendionu.

Testosteron reguluje diferenciáciu Wolfvho vývodu, ovplyvňuje spermatogéziu, je zodpovedný za vývin genitálií, sekundárnych pohlavných znakov a rast tvárového, pubického a axilárneho ochlpenia [9, 13].

Monitorovanie testosteronu sa v klinickej praxi používa na diagnostiku endokrinných porúch. Medzi tieto ochorenia patrí u mužov hypogonadizmus, zlyhávanie semenníkov, neplodnosť, hypopituitarizmus a hyperprolaktinémia. U žien môžu byť zmeny v hladinách testosterónu v séru spôsobené syndrómom polycystických ovárií, adrenálnej hyperplázie, neplodnosťou, hirsutizmom, amenoreou, obezitou a virilizáciou [9, 10, 14].

2.3.2 Progesterón



Obr. 2.2: Chemická štruktúra progesterónu [22].

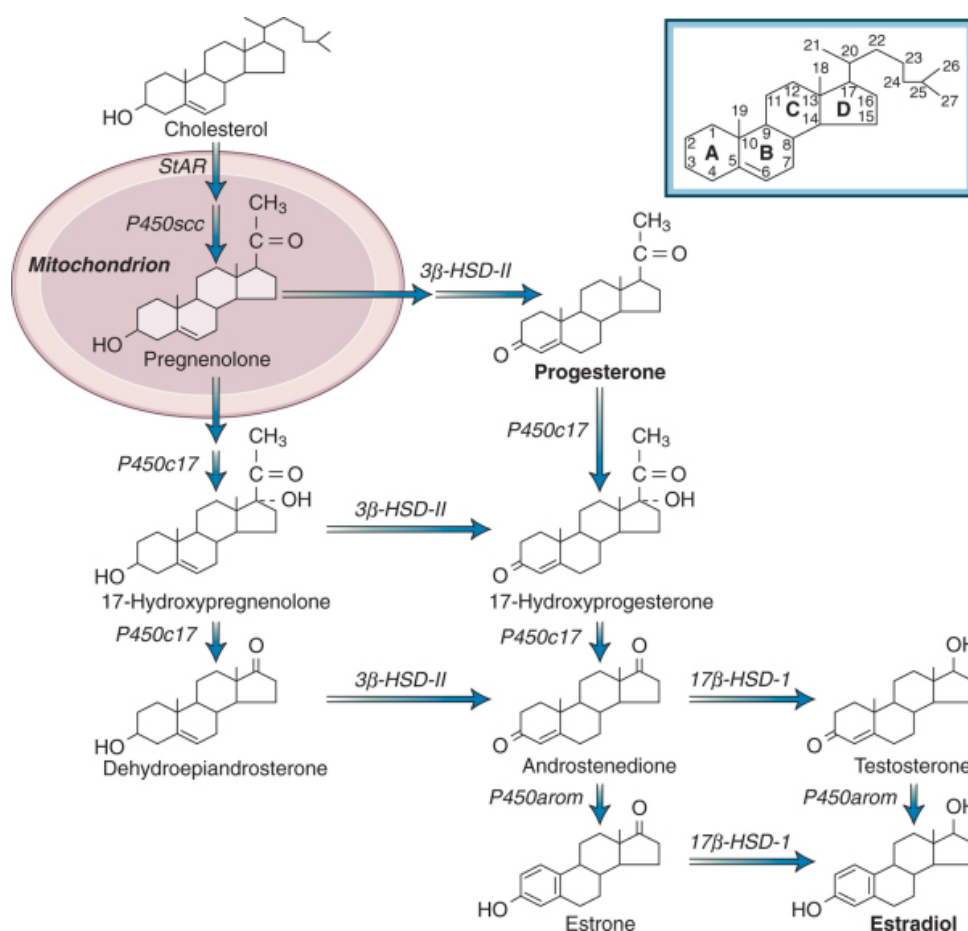
U normálne menštruujúcich žien je progesterón primárne produkovaný žltým telieskom vaječníkov a v menšej miere aj kôrou nadobličiek, kde je odvodený od cholesterolu pod vplyvom lutropínu [15]. Približne v šiestom týždni tehotenstva preberá hlavnú časť produkcie progesteronu placenta [16]. Hlavnou funkciou progesteronu je príprava maternice pre zahniezdenie vajíčka a udržanie tehotenstva [16, 17].

Počas folikulárnej fázy zostáva hladina progesterónu nízka (0,2-1,5 ng/ml) [16]. Po zvýšení hladiny LH a ovulácií, produkujú luteálne bunky z prasknutého folikula progesterón ako odpoveď na vylučovanie LH. Má termogenetickú vlastnosť, spôsobuje

zvýšenie bazálnej teploty tela po ovulácii. V priebehu luteálnej fázy hladina progesterónu náhle stúpa a maximum (10-20 ng/ml) dosahuje 5-7 dní po ovulácii [16, 17, 18]. Pokiaľ nedôjde k oplodneniu, hladina progesterónu v dôsledku regresie žltého telieska behom posledných 4 dní cyklu klesá. Pokiaľ k oplodneniu dôjde, hladina progesterónu je žltým telieskom udržiavaná na úrovni strednej luteálnej fázy až do konca prvého trimestra tehotenstva, kedy je ďalej produkovaný placentou [17, 19].

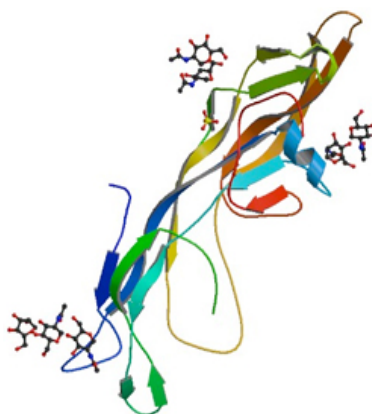
Progesterón v séru je spoľahlivým indikátorom ovulácie, pretože jeho hladina rýchlo stúpa [20]. Poruchy ovulácie sa vyskytujú relatívne často a sú príčinou neplodnosti. V takýchto prípadoch je hladina progesterónu počas strednej luteálnej fázy abnormálne nízka.

Luteálna insuficiencia je reprodukčná porucha [12,20]. Neplodnosť a spontánne potraty spojené s touto poruchou sú pravdepodobne spôsobené nedostatočným vývojom endometria. Predpokladá sa, že pokiaľ žlté teliesko neprodukuje dostatok progesterónu, endometrium nemôže dozrieť. Jeho hladina je počas luteálnej fázy u žien s luteálnou insuficienciou nižšia ako u zdravých žien.



Obr. 2.3: Biosyntetická dráha tvorby testosterónu a progesterónu [22].

2.3.3 Luteinizačný hormón



Obr. 2.4: Model LH [23].

Ludský luteinizačný hormón (LH, lutropin) je glykoproteín tvorený dvomi rozdielnymi podjednotkami (α a β) [16, 21]. Podjednotka α je identická s podjednotkami α , ktoré sú súčasťou folikuly stimulujúceho hormónu (FSH), hormónu stimulujúceho štítnu žľazu, tyreotropného hormónu (TSH) a ľudského choriongonadotropínu (hCG). Podjednotka β hormónu LH sa výrazne líši od podjednotky β FSH a TSH, je však veľmi podobná β podjednotke hCG.

Hormóny LH a FSH sú produkované gonadotropnými bunkami hypofýzy ako odpoveď na vylučovanie decapeptidu uvoľňujúceho gonadotropíny, gonadoliberínu [16] zo stredného dolného hypotalamu [21].

Steroidy ovárií, prevažne estrogény, tiež ovplyvňujú vylučovanie LH a FSH, ktoré následne regulujú menštruačný cyklus žien [21]. Po dozretí folikulu s vajíčkom spôsobí prudký nárast hladiny LH jeho prasknutie a uvoľnenie vajíčka.

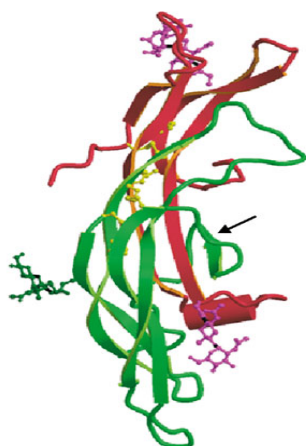
Primárna úloha LH u mužov spočíva v stimulácii produkcie testosterónu v Leydigových bunkách [13]. Tvorbu spermíí v Sertoliho bunkách regulujú hormóny LH (prostredníctvom testosterónu) a FSH. Testosterón pôsobí na uvoľňovanie LH negatívnou spätnou väzbou [21].

Stanovenie koncentrácie LH je dôležitým faktorom pri predvídaní ovulácie, pri hodnotení neplodnosti a pri diagnóze porúch hypofýzy a gonád [21].

U pohlavne zrelých dospelých jedincov je nedostatok gonadotropínov obvykle skorým prejavom panhypopituitarizmu [12, 21]. Pri tomto ochorení sú pozorované nízke koncentrácie LH, FSH a steroidov. Naopak nádory hypotalamu a hypofýzy, ktoré produkujú gonadotropíny, spôsobujú zvýšenú koncentráciu LH a FSH.

Zlyhanie funkcie pohlavných žliaz, ktoré je príčinou neplodnosti sa prejavuje zvýšenými koncentraciami LH a FSH a zároveň nízkymi koncentraciami gonadálnych steroidov [21].

2.3.4 Folikuly stimulujúci hormón



Obr. 2.5: Model FSH [24].

Ludský folikuly stimulujúci hormón (FSH, folitropin) je glykoproteín o molekulovej hmotnosti približne 30 000 daltonov, ktorý sa skladá z dvoch nekovalentne viazaných podjednotiek α a β [16, 21]. Podjednotka α obsahuje 92 aminokyselín a je veľmi podobná podjednotkám α hormónov LH, TSH a hCG. Podjednotka β je pre FSH jedinečná a určuje jeho imunologickú a funkčnú špecifickosť.

Hormóny LH a FSH sú produkované gonadotropnými bunkami hypofýzy ako odpoveď na vylučovanie decapeptidu uvoľňujúceho gonadotropínu, gonadoliberinu [16] zo stredného dolného hypotalamu [21].

Hormóny LH a FSH regulujú rast gonadálnych tkanív a ich reprodukčnú aktivitu [22, 26]. FSH sa podieľa na stimulácii vývoja folikulov vo vaječníkoch. Jeho hladina v krvnom obehu sa počas menštruačného cyklu mení v závislosti na produkcii estradiolu a progesterónu. K malému, ale viditeľnému zvýšeniu hladiny FSH v obehu dochádza súbežne s ovulačným vrcholom LH. V luteálnej fázi hladina FSH v krvi klesá v dôsledku potlačenia jeho produkcie estradiolom a progesteronom, ktoré sú vylučované rastúcim žltým telieskom.

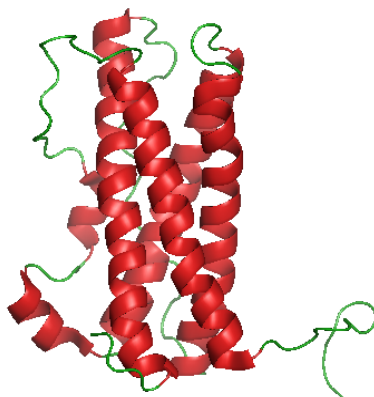
U mužov FSH, LH a testosterón regulujú spermatogéniu v semenotvorných tubuloch semeníkov pôsobením na Sertolihov bunky [22, 26]. FSH je na inhibíciu spätnou väzbou testosterónu menej citlivý než LH. Predpokladá sa, že produkcia FSH je nezávisle regulovaná inhibičným peptidom inhibinom, ktorý sa tvorí v Sertolihov bunkách.

Zvýšené koncentrácie LH a FSH, doprevádzané nízkymi koncentraciami gonadálnych steroidov, sú známkou gonadálnej poruchy [22]. U mužov môžu byť tieto nálezy výsledkom primárnej testikulárnej poruchy, anorchizmu alebo zlyhania Sertolihov buniek.

U žien je zvýšená hladina FSH a znížená hladina gonadálnych steroidov pozorovaná v menopauze, pri predčasnom zlyhaní vaječníkov a po odstránení vaječníkov [12].

U pohlavne zreých dospelých jedincov môže byť nedostatok FSH doprevádzaný nízkymi koncentraciami LH a pohlavných steroidov výsledkom panhypopituitarizmu, ktorý môže byť spôsobený zníženým uvoľňovaním GnRH alebo nedostatočnou odpoveďou hypofýzy na GnRH [12].

2.3.5 Prolaktín



Obr. 2.6: Model prolaktínu [25].

Prolaktín (PRL) je 23 kDa polypeptid tvorený 190 aminokyselinami [27]. Je produkovaný hlavne prolaktínovými bunkami v prednom laloku hypofýzy, placentou, decíduálnymi bunkami a lymfocytami.

PRL sa vyskytuje v niekoľkých formách, v dôsledku posttranskripčných a posttranslačných modifikácií [28]. Napriek tomu, že 80-90% sérového PRL je vo forme monoméru, existuje aj vo forme dimérov a polymérov, v dôsledku zlučovania sa dvoch alebo viacerých monomérov, čo vedie k zvýšeniu molekulovej hmotnosti (120 až 150 kDa). Tieto veľké izoformy, nazývajúce sa veľký veľký PRL alebo makroprolaktín, sú veľmi dôležité, kvôli ich zníženej biologickej aktivite [27].

Hlavným kontrolným mechanizmom sekrécie PRL je inhibičný účinok dopamínu [29]. Ďalšími faktormi, ktoré ovplyvňujú vylučovani PRL, v menšej miere ako dopamín, sú GABA, somatostatín, acetylcholín a noradrenalín. PRL je pod dvojitou reguláciou hormónov z hypothalamu [30]. Zatiaľ čo prevládajúci signál dopamínu ho inhibuje, tyreotropný-uvoľňujúci hormón produkciu PRL stimuluje.

Hyperprolaktinémia je najbežnejším endokrinným ochorením osy hypothalamus-hypofýza [31]. Príčinou zvýšenej hladiny PRL je užívanie farmaceutických výrobkov (psychotropné lieky, antidepresíva a iné.), fyziologické zmeny (dojčeni, tehotenstvo, spánok, stres), patologické poruchy (poruchy hypofýzy, hypothalamické a endokrinné

poruchy) a iné ochorenia (lézia hrudnej steny v dôsledku traumy alebo rakoviny, chronická renálna insuficiencia, vážne ochorenia pečene a iné) [27].

Hyperprolaktinémia môže spôsobiť krátkodobé aj dlhodobé nežiadúce účinky [27, 30, 31]. Príznakmi krátkodobého zvýšenia PRL je galaktorea, u žien menštruačné poruchy neplodnosť, kožné ochorenia, u mužov impotencia, poruchy ejakulácie, zníženie spermatogenézy. Dlhodobé nežiadúce účinky sú osteoporóza, priberania zmeny nálad, rakovina prsníkov, prostaty, kardiovaskulárne poruchy.

2.4 Imunoanalytické metódy

Medzi najbežnejšie metódy pre stanovenie hormónov, ktoré sa používajú vo väčšine klinických laboratórií patria hlavne imunoanalytické metódy a to vďaka ich vysokej špecifickosti, citlivosti a hlavne dostupnosti [32].

Imunoanalytické metódy môžu byť delené na základe rôznych charakteristík. Jednou z nich je rozdelenie podľa princípu prevedenia na kompetitívne stanovenie a nekompetitívne (sendvičové) stanovenie [33, 34, 35]. V prvom prípade antigen zo vzorky súťaží s rovnakým, ale značeným antigénom zo súpravy o obmedzené množstvo protilátky. Pôvodná koncentrácia stanovovaného analytu je nepriamoúmerná výške vzniknutého signálu. Tento typ imunoanalýzy je typický pre menšie molekuly, ktoré nemajú dostatočne veľký povrch, ktorý je využívaný pri nekompetitívnom prevedení, kedy je antigen zo vzorky vychytávaný medzi dve protilátky, ktoré sú v nadbytku. Pôvodná koncentrácia je priamoúmerná veľkosti nameraného signálu.

Špecifickosť a citlivosť imunochemických vyšetrení sú dané čistotou a typom protilátky, monoklonálnej alebo polyklonálnej [34, 35]. Monoklonálne protilátky sú produkované hybridomami, ktoré sa pripravujú fúziou imunizovaných buniek sleziny s nádorovými bunkami, a ktoré následne po čistení a selekcii produkujú iba jeden typ protilátky. Príprava je drahá, ale s monoklonálnymi protilátkami je možné dosiahnuť vyššiu špecifickosť a je možné ich produkovať kontinuálne. Polyklonálne protilátky sa pripravujú imunizáciou zvierat. Výsledný produkt je zmesou protilátok, a preto je možné rozoznať aj izoformy antigénu čo zvyšuje citlivosť. Nevýhodou je závislosť na imunizovanom zvierati, pretože opätovné získanie protilátky niekedy nie je možné.

Samotné stanovenie a detekciu je u imunochemických metódach možné urobiť priamo v reakčnej zmesi (homogenná imunoanalýza) alebo po špecifickej separácii vytvoreného imunokomplexu (heterogenná imunoanalýza) [33, 34, 36]. Separácia môže byť vykonaná precipitačne, odsatím zvyšku reakčnej zmesi u pevne zakotvenej protilátky, magneticky, prípadne priľnavosťou použitých častíc viazaných na protilátku.

Pre výslednú citlivosť stanovenia je, okrem kvality použitej protilátky, dôležitý aj spôsob detekcie. Podľa použitej značky a spôsobu merania signálu sa imunoanalytické metódy delia najčastejšie a to na radioimunoanalýzu,

enzymoimunoanalýzu, fluoroimunoanalýzu, luminiscenčnú analýzu a iné.

Radioimunoanalýza (RIA) je založená na reakcii antigénu s protilátkou značenou radioizotopom [37]. Ako najčastejšia značka sa používa ^{125}I . Je to γ -žiarič, ktorého polčas rozpadu je 60 dní. U niektorých súprav sa používa ^3H , ktorý je β -žiarič [36, 38]. Jeho polčas rozpadu je však okolo 12 rokov čo robí jeho detekciu obtiažnejšou. Radioimunoanalýza je dostupná aj v kompetitívnom usporiadaní RIA aj v sendvičovom usporiadaní IRMA (Immuno Radio Metric Assay). Jej najväčšou nevýhodou je práca s radioaktivitou.

U emzymoimunoanalýzy (EIA) je ako značka používaný enzým. V prípade heterogénnej EIA sú to najčastejšie peroxidáza, alkalická fosfatáza a β -galaktozidáza [35]. Meranie signálu je závislé na produkte konečnej enzymatickej reakcie. Podľa povahy substrátu je možné reakciu detekovať spektrofotometricky, nefelometricky, flourometricky a luminometricky [36]. Najčastejšie používaným pevným nosičom sú mikrotitračné doštičky. Špeciálnym prípadom EIA je ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), veľmi rýchla neizotopická metóda [36, 37]. Je možné použiť oba typy usporiadania, kompetitívne aj sendvičové.

Fluoroimunoanalýza pomocou imunochemickej reakcie s fluorescenčným indikátorom umožňuje stanoviť koncentráciu analytu. Ku značeniu využíva fluorofory a detekčnou technikou je fluorometria [32, 34, 36]. Je známych viacero usporiadaní. DELFIA (Dissociation-enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay) využíva protilátky značené chelátmi Eu alebo Sm. Slabá fluorescence je zosilená uvoľnením iónov do prostredia (životnosť fluorescence je o mnohokrát dlhšia). FPIA (Fluorescence Polarization Immunoassay) je homogenná kompetitívna metóda, ktorá na značenie využíva fluoresceín a meria fluorescenciu emitovanú v rovine polarizovaného svetla. Je výhodná pre určenie koncentrácie malých molekúl.

Luminiscenčná imunoanalýza sa využíva ako neradioaktívna varianta v mnohých analytických systémoch a to aj pre svoju vysokú citlivosť [36, 38, 39]. Luminofory používané na značenie nemajú interferencie v biologickom materiáli a sú pomerne stabilné. Jednou z najčastejšie používaných značiek je akridinový ester. Ten sa v alkalickom prostredí pôsobením peroxidu vodíka rozpadá, pričom sa uvoľní svetelné kvantum.

2.4.1 Princíp systému ADVIA Centaur

Systém ADVIA Centaur je chemiluminiscenčný imunoanalyzátor využívajúci paramagnetické mikročastice.

Je to plne automatizovaný imunoanalyzátor s priamou chemiluminiscenčnou technológiu, využívajúci konštantné množstvo dvoch protilátok [40, 41]. Prvá protilátka je značená akridinovým esterom a druhá je kovalentne viazaná na paramagnetické častice oxidu železitého, ktoré sú dostatočne malé aby mohli poskytnúť extrémne veľký povrch pre rýchlu kinetiku vznikajúcej väzby a zostať v suspenzii po dlhšiu dobu.

Dochádza k špecifickej reakcii medzi oboma protilátkami. Separácia komplexu antigen-protilátka sa vykonáva magneticky, vďaka paramagnetickým vlastnostiam mikročastíc, po umiestnení do magnetického poľa. Detekuje sa chemiluminiscenčný signál, ktorý je iniciovaný pôsobením peroxidu vodíka po pridaní alkalického roztoku. Vtedy dochádza k rozpadu akridinového esteru a uvoľneniu luminiscencie. Teplota, pri ktorej sa pracuje je 37°C.

Pri stanovovaní koncentrácie hormónov sa využívajú dva typy usporiadania reakcie medzi antigenom a protilátkou [21]. Pre LH, FSH a PRL ide o sendvičovú, nekompetitívnu imunoanalýzu, kde medzi koncentráciou vo vzorke a RLU nameranými analyzátorom existuje priama úmera.

V prípade progesterónu a testosterónu ide o kompetitívnu imunoanalýzu, kde medzi koncentráciou vo vzorke a relatívnymi svetelnými jednotkami (RLU) nameranými analyzátorom existuje nepriama úmera [15]. Celkové stanovenie má, v porovnaní s ostatnými hormónami o jeden krok navyše. Na začiatku je pridaný Releasing Agent, ktorý spôsobí uvoľnenie viazaných steroidov.



Obr. 2.7: Analyzátor ADVIA Centaur (dokumentácia výrobcu).

2.4.2 Princíp systému ARCHITECT i2000 SR

ARCHITECT i2000SR (ďalej iba ARCHITECT) je automatický imunoanalýzátor využívajúci technológiu chemiluminiscenčnej imunoanalýzy na mikročasticách s tvz. flexibilnými protokolmi (CHEMIFLEX) [42].

Analyzátor využíva pre všetky testy paramagnetické častice pre zachytenie analytu a chemiluminiscenčnú detekciu založenú na novej triede akridinových zlúčenín (sulfopropyl acridinum karboxamidy) so zlepšenou rozpustnosťou vo vode a stabilitou [41, 43].

Princíp metódy pre stanovenie koncentrácie LH, FSH a PRL prebieha v dvoch krokoch (dvojkroková imunoanalýza) [21, 41]. V prvom kroku sa antigen (naš analyt) naviaže na protilátky viazané na mikročasticách. Následne sa magneticky vykoná separácia komplexu antigen-protilátka. Po premytí sa pridá druhá protilátka značená

akridinovým esterom. Po ďalšom premytí sú pridané roztoky Pre-Trigger (roztok s H_2O_2) a Trigger (alkalický roztok). Výsledný chemiluminiscenčný signál je meraný optickým systémom analyzátoru v RLU. Metóda je nekompetitívna (sedvičová) a preto existuje medzi koncentráciou vo vzorke a RLU nameranými analyzátorom priama úmera.

Stanovenie testosterónu a progesterónu prebieha v jednom kroku (jednokroková imunoanalýza) [15]. Vzorka sa zmieša s paramagnetickými mikročasticami potiahnutými protilátkou proti analytu, konjugátom daného analytu značeným akridinovým esterom a riediacim roztokom pre metódu. Vznikne reakčná zmes. Po premytí sú pridané roztoky Pre-Trigger (roztok s H_2O_2) a Trigger (alkalický roztok). Výsledný chemiluminiscenčný signál je meraný optickým systémom analyzátoru v RLU. Metóda je kompetitívna, preto existuje medzi koncentráciou vo vzorke a RLU nameranými analyzátorom nepriama úmera.



Obr. 2.8: Analyzátor ARCHITECT i2000 SR (dokumentácia výrobcu).

3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Analyzované vzorky

Ako vzorky pre porovnanie dvoch analytických systémov, bol použitý biologický materiál (ľudské sérum). Odber krvi bol vykonaný odberovým centrom VFN alebo objednávacím lekárom v rôznych obdobiach v Prahe. Z krvi bolo za pomoci centrifugi získané sérum. Pokiaľ neboli vzorky spracované do ôsmich hodín od odberu, uchovávali sa dobre uzavreté pri 2-8°C a to maximálne 48 hodín. Pre dlhšie skladovanie sa vzorky skladovali pri teplote -20°C. Po rozmrazení bolo potrebné sérum premiešať a vzorky už nebolo možné opäť zmraziť.

Kontrolné vzorky, Lyphochek, ktoré boli používané pri meraní opakovateľnosti a medziľahlej precíznosti pre všetky hormóny, boli dodávané Spoločnosťou BIO-RAD spol.s.r.o, ktorá v Českej republike zastupuje americkú spoločnosť BIO-RAD Laboratories. Každé balenie obsahuje lyofilizované vzorky o troch rôznych hodnotách (hodnota pod referenčným intervalom, v referenčnom intervale a hodnota nad referenčným intervalom). Jedná sa o multikontroly, vhodné pre stanovovanie viacerých analytov. Každé balenie bolo odlišené číslom šarže a bolo ho možné používať až do dátumu expirácie.

Tab. 3.1: Čísla šarží a dátum expirácie pre opakovateľnosť a medziľahlú precíznosť.

	Opakovateľnosť		Medziľahlá precíznosť	
	Číslo šarže	Dátum expirácie	Číslo šarže	Dátum expirácie
PRL	40260	31.7.2014	40260	31.7.2014
FSH	40260	31.7.2014	40260	31.7.2014
LH	40250	28.2.2014	40262	31.7.2014
Progesterón	40260	31.7.2014	40260	31.7.2014
Testosterón	40260	31.7.2014	40260	31.7.2014

3.2 Použité chemikálie

3.2.1 Zoznam použitých chemikálií pre ADVIA Centaur

Zoznamy použitých chemikálií sú uvedené v tabuľkách 3.2 a 3.3. Ďalšie chemikálie sú pomocné roztoky pre chemiluminiscenčnú detekciu ADVIA Centaur Acid/Base: Acid (obsahuje peroxid vodíku a malé množstvo kyseliny dusičnej), Base (roztok hydroxidu sodného s detergentom). Výrobcom všetkých chemikálií je Siemens Medical Solutions Diagnostics v Terrytown NY, U.S.A.

Tab. 3.2: Zoznam použitých chemikálií pre ADVIA Centaur pre testosterón a progesterón.

	Testosterón	Progesterón
Lite Reagent	testosterón značený akridinovým esterom (~3,2 ng/ml) v pufrí so stabilizátormi	polyklonálna myšacia anti-progesterón protilátka (~0,20 ng/ml) značená akridinovým esterom v pufrí s azidom sodným (<0,1%) a stabilizátormi
Solid Phase	polyklonálna zajačia anti-testosterón protilátka (~0,03 µg/ml) viazaná k monoklonálnej myšacej anti-zajačej protilátke (~0,53 µg/ml), ktorá je kovalentne viazaná na paramagnetické častice v pufrí s azidom sodným (0,1%) a stabilizátormi	progesterónový derivát (~60 ng/ml) kovalentne viazaná na paramagnetické častice vo fosfátovom pufrí s azidom sodným a stabilizátormi
Releasing Agent	čínidlo uvoľňujúce steroidy v pufrí s azidom sodným (0,11%) a stabilizátormi	čínidlo uvoľňujúce steroidy v pufrí s azidom sodným (0,11%) a stabilizátormi
Multi Diluent 3	ľudská plazma s azidom sodným (0,1%)	ľudská plazma s azidom sodným (0,1%)

Tab. 3.3: Zoznam použitých chemikálií pre ADVIA Centaur pre LH, FSH, PRL.

	LH	FSH	Prolaktín
Lite Reagent	polyklonálna kozia anti-LH protilátka (~0,17 µg/ml) značená akridinovým esterom v pufrí s azidom sodným (<0,1%) a stabilizátormi	polyklonálna kozia anti-FSH protilátka (~327,2 ng/ml) značená akridinovým esterom v pufrí s azidom sodným (0,1%) a stabilizátormi	polyklonálna kozia anti-prolaktín protilátka (~0,16 µg/ml) značená akridinovým esterom v pufrí s azidom sodným (0,11%) a stabilizátormi
Solid Phase	monoklonálna myšacia anti-LH protilátka (~0,05 mg/ml) kovalentne viazaná na paramagnetické častice v pufrí s azidom sodným a stabilizátormi	monoklonálna myšacia anti-FSH protilátka (~0,01 mg/ml) kovalentne viazaná na paramagnetické častice v pufrí s azidom sodným a stabilizátormi	monoklonálna myšacia anti-prolaktín protilátka (~3,67 µg/ml) kovalentne viazaná na paramagnetické častice v pufrí s azidom sodným a stabilizátormi
Multi Diluent 1	(konské sérum s azidom sodným (0,1%) a stabilizátormi	(konské sérum s azidom sodným (0,1%) a stabilizátormi	(konské sérum s azidom sodným (0,1%) a stabilizátormi

3.2.2 Zoznam použitých chemikálií pre ARCHITECT i2000SR

Zoznamy použitých chemikálií sú uvedené v tabuľkách 3.4 a 3.5. Ďalšími reagensiami sú: Pre-Trigger Solution (1,32% (w/v) peroxid vodíka), Trigger Solution (0,35N hydroxid sodný), Wash Buffer (fyziologický roztok s fosfátovým pufrí a konzervačným čínidlom je antimikrobiálna látka). Výrobcom všetkých chemikálií je Abbott Laboratories v Abbott Park, Illinois, U.S.A..

Tab. 3.4: Zoznam použitých chemikálií pre ARCHITECT pre testosterón a progesterón

	Testosterón	Progesterón
Microparticles	mikročastice potiahnuté myšacími monoklonálnymi protilátkami proti testosterónu v BIS-TRIS pufri s bovinými a myšacími bielkovinovými stabilizátormi, konzervačné činidlo je antimikrobiálna látka	mikročastice potiahnuté komplexom progesterónu, fluoresceínu myšacími monoklonálnymi protilátkami proti fluoresceínu v TRIS pufri, ako stabilizátory sú použité boviné a myšacie proteíny a povrchovoaktívna látka, koncentrácia pevných častíc je 0,1%, konzervačné činidlo je azid sodný a ProClin
Conjugate	konjugát testosterónu s akridínom v citrátovom pufri s povrchovo aktívnou látkou ako stabilizátorom, minimálna koncentrácia je 0,1 nM, konzervačné činidlo je antimikrobiálna látka	konjugát ovčích monoklonálnych protilátok proti progesterónu s akridínom v MES pufri s bovinými a ovčými stabilizátormi, minimálna koncentrácia je 7 ng/ml, konzervačné činidlo je azid sodný a ProClin
Assay Diluent	riediaci roztok obsahuje povrchovo aktívnu látku v citrátovom pufri a konzervačným činidlom je antimikrobiálna látka	riediaci roztok obsahuje TRIS pufo a konzervačné činidlo azid sodný
Riediaci roztok	spracované boviné sérum a konzervačným činidlom je antimikrobiálna látka	TRIS pufo a konzervačné činidlo azid sodný.

Tab. 3.5: Zoznam použitých chemikálií pre ARCHITECT pre LH, FSH a PRL

	LH	FSH	Prolaktín
Microparticles	mikročastice potiahnuté myšacími monoklonálnymi protilátkami anti- β LH v HEPES pufri s bovinými a myšacími bielkovinovými stabilizátormi, minimálna koncentrácia je 0,04% pevných častíc, konzervačné činidlo je ProClin 300	mikročastice potiahnuté myšacími monoklonálnymi protilátkami anti- β FSH v MES pufri s kozími a myšacími bielkovinovými stabilizátormi, konzervačné činidlo je antimikrobiálna látka	mikročastice potiahnuté myšacími monoklonálnymi protilátkami proti prolaktínu v TRIS pufri s bovinými a myšacími bielkovinovými stabilizátormi, konzervačné činidlo je antimikrobiálna látka
Conjugate	konjugát myšacích monoklonálnych protilátok anti- α LH s akridínom v MES pufri s bovinými stabilizátormi (vrátane kaseínu), minimálna koncentrácia je 170 ng/ml, konzervačné činidlo je ProClin 300 a ProClin 950	konjugát myšacích monoklonálnych protilátok anti- α FSH s akridínom v MES pufri s bovinými stabilizátormi, minimálna koncentrácia je 45 ng/ml, konzervačné činidlo je antimikrobiálna látka	konjugát myšacích monoklonálnych protilátok proti prolaktínu s akridínom vo fosfatovom pufri s rybacími a bovinými stabilizátormi, minimálna koncentrácia je 0,05 μ g/ml, konzervačné činidlo je antimikrobiálna látka
Riediaci roztok	fyziológický roztok s fosfátovým pufo a konzervačným činidlom je antimikrobiálna látka	fyziológický roztok s fosfátovým pufo a konzervačným činidlom je antimikrobiálna látka	fyziológický roztok s fosfátovým pufo a konzervačným činidlom je antimikrobiálna látka

3.3 Postupy merania a spracovanie nameraných dát

3.3.1 Postup merania pre opakovateľnosť

Pracovný postup pre meranie opakovateľnosti bol rovnaký pre všetky hormóny. Merania boli robené na systéme ARCHITECT vyrobenom spoločnosťou Abbott Laboratories v Abbott Park, Illinois, U.S.A.. Ako vzorka bol použitý kontrolný materiál, Lyphochekek od Spoločnosti BIO-RAD spol.s.r.o.. Na meranie boli použité vždy dva kontrolné vzorky z danej šarže.

Obidve vzorky boli dôkladne premiešané a z hladiny boli odstránené všetky bubliny. Skúmavky boli umiestnené do stojanu označeného vlastným kódom (napr. F040). Celý stojan bol uložený do priestoru analyzátora, kde boli vzorky automaticky spracovávané. Do počítača bola následne zadaná metóda podľa toho, ktorý hormón sa práve stanovoval. Po zadaní pokynov do počítača sa spustilo automatické dávkovanie. Systém stanovil koncentráciu daného hormónu dvanásťkrát v sérii za sebou v jeden deň. Skúmavky boli rozoznávané podľa čiarového kódu, ktorý bol súčasťou balenia.

3.3.2 Postup merania pre medziľahľú precíznosť

Pracovný postup pre meranie medziľahlej precíznosti bol rovnaký pre všetky hormóny. Merania boli robené na systéme ARCHITECT vyrobenom spoločnosťou Abbott Laboratories v Abbott Park, Illinois, U.S.A.. Ako vzorka bol použitý kontrolný materiál, Lyphochekek od Spoločnosti BIO-RAD spol.s.r.o. Na meranie boli použité všetky tri kontrolné vzorky z danej šarže. Meranie prebiehalo období od 5.10.2013 do 28.2.2013 v určité dni a vždy iba jedenkrát za deň.

Vzorky boli dôkladne premiešané a z hladiny boli odstránené všetky bubliny. Skúmavky boli umiestnené do stojanu označeného vlastným kódom (napr. F040). Celý stojan bol uložený do priestoru analyzátora, kde boli vzorky automaticky spracovávané. Do počítača bola následne zadaná metóda podľa toho, ktorý hormón sa práve stanovoval. Po zadaní pokynov do počítača sa spustilo automatické dávkovanie. Počet jednotlivých meraní nebol presne určený. Pohyboval sa v rozmedzí 5 až 30 meraní. Všetky stanovené hodnoty systém v priebehu celého obdobia zaznamenával a na konci merania sám aj štatisticky vyhodnotil vo forme tabuľky pre každý hormón a kontrolný materiál.

3.3.3 Postup kvantifikácie hormónov systémom ADVIA Centaur

Postup kvantifikácie pre všetky hormóny bol rovnaký. Merania boli robené na systéme ADVIA Centaur vyrobenom spoločnosťou Siemens Medical Solutions Diagnostics v Terrytown NY, U.S.A.. Vzorky biologického materiálu boli dôkladne rozmrazené a premiešané. Z hladiny séra boli odstránené všetky bubliny, ktoré by mohli spôsobiť nesprávne nadávkovanie množstva. Samotné skúmavky označené príslušným čiarovým kódom boli ešte raz označené číslom (1-18) pre zjednodušenie. Následne boli s celým obsahom umiestnené do stojanov označených vlastným kódom (napr. 0039A). Do jedného stojanu sa zmestilo päť skúmaviek. Celý stojan bol uložený do priestoru analyzátora, kde boli vzorky automaticky spracovávané. Do počítača boli následne zadané informácie o každej skúmavke vo forme napr. 0039A , V- 6. Pričom číslo za pomlčkou informovalo o umiestnení v stojane, “V” znamenalo výskum a číslo “6” znamenalo označenie samotnej skúmavky. Ku každej vzorke bola priradená metóda v závislosti na tom, aký hormón bol práve stanovovaný.

Kedže analyzátor ADVIA Centaur je samostatnou jednotkou, po zadaní pokynov do počítača sa automaticky spustilo dávkovanie prvej vzorky. Dávkovaný objem vzorky sa líšil na základe daného hormónu (viz tab. 3.6). Následné dávkovanie reagentov, inkubáciu a detekciu systém vykonával sám.

Tab. 3.6: Dávkované objemy vrátane nepoužitého objemu skúmavky a objemy pre ďalšie samotné stanovenie pre všetky metódy systému ADVIA Centaur.

	Dávkovaný objem vrátane nepoužitého objemu skúmavky/samotné stanovenie
PRL	200 µl/25 µl
FSH	200 µl/100 µl
LH	200 µl/50 µl
Progesterón	200 µl/20 µl
Testosterón	150 µl/15 µl

3.3.4 Postup kvantifikácie hormónov systémom ARCHITECT

Postup kvantifikácie pre všetky hormóny systémom ARCHITECT, vyrobenom spoločnosťou Abbott Laboratories v Abbott Park, Illinois, U.S.A., bol obdobný postupu na analyzátore ADVIA Centaur. Rozdiel bol iba v objeme dávky pre jednotlivé hormóny (viz. tab. 3.7) a v kódoch stojanov pre skúmavky (napr. F040).

Tab. 3.7: Dávkované objemy vrátene nepoužitého objemu skúmavky a objemy pre ďalšie samotné stanovenie pre všetky metódy systému ARCHITECT.

	Dávkovaný objem vrátene nepoužitého objemu skúmavky/samotné stanovenie
PRL	150 µl/30 µl
FSH	100 µl/25 µl
LH	150 µl/65 µl
Progesterón	100 µl/50 µl
Testosterón	150 µl/100 µl

3.4 Spracovanie nameraných dát

Výpočet výsledných hodnôt vykonávajú obidva systémy automaticky z nameraných RLU z vopred vložených kalibračných kriviek. Výsledky sú uvádzané najčastejšie 2 desatinné miesta (v prípade progesterónu na jedno desatinné miesto). Jednotky v akých sú koncentrácie uvádzané sa hormón od hormónu líšia (viz. tab. 3.8).

Všetky hodnoty boli následne spracované štatistickým programom STATISTICA (data analysis software system), version 10, StatSoft, Inc. (2011).

Tab. 3.8: Tabuľka používaných jednotiek pre každý hormón.

	Jednotky
PRL	µg/l
FSH	IU/l
LH	IU/l
Progesterón	nmol/l
Testosterón	nmol/l

4. VÝSLEDKY A DISKUSIE

4.1 Testosterón

4.1.1 Opakovateľnosť a medziláhľá precíznosť

Metóda ARCHITECT Testosteron bola navrhnutá tak, aby bol celkový variačný koeficient pre vzorky s koncentraciami v rozmedzí všetkých kontrol $\leq 10\%$.

Tabuľka 4.1 zobrazuje namerané hodnoty pre stanovenie opakovateľnosti a štatistické vyhodnotenie. Variačné koeficienty pre Lyphochek 1 6,81% a Lyphochek 3 6,40% teda odpovedajú hodnote, ktorá bola stanovená výrobcom na základe protokolu EP5-T219 Clinical and Laboratory Standards Institute. Namerané hodnoty sa tiež zhodujú z hodnotami uvádzanými v literatúre [43].

Tab. 4.1: Namerané hodnoty kontrolných vzoriek (Lyphochek 1 a Lyphochek 3) pre stanovenie opakovateľnosti, štatistické vyhodnotenie a deklarované hodnoty kontrolných vzoriek pre testosterón.

Číslo merania	Lyphochek 1 [nmol/l]	Lyphochek 3 [nmol/l]
1.	5,10	33,34
2.	4,99	27,52
3.	4,40	29,73
4.	4,31	32,00
5.	4,32	32,80
6.	4,17	33,43
7.	4,32	29,62
8.	4,85	33,86
9.	4,66	32,10
10.	4,94	33,86
11.	4,59	33,34
12.	4,81	30,62
Deklarovaná hodnota	4,76	34,00
Priemer	4,62	31,85
SD	0,31	2,04
CV %	6,81	6,40
Bias %	-2,91	-6,32

Tabuľka 4.2 zhrňuje štatistické vyhodnotenie nameraných dát medziláhľej precíznosti, ktoré bolo merané na kontrolných vzorkách (vid' tab. 3.1 strana 27). Hodnoty variačných koeficientov (Lyphochek 1 6,02%, Lyphochek 2 3,60% a Lyphochek 3 3,07%) odpovedajú hodnotám stanoveným výrobcom aj dodávateľom kontrolných vzoriek.

Tab. 4.2: Štatistické vyhodnotenie nameraných dát kontrolných vzoriek medziľahlej precíznosti stanovené analytickým systémom a dodávateľom kontrolných vzoriek pre testosterón.

Kontrolné vzorky pre testosterón	Stanovené analyzátorom ARCHITECT				Definované výrobcom	
	Priemer [nmol/l]	SD [nmol/l]	CV %	n	priemer [nmol/l]	2SD [nmol/l]
Lyphocek 1	4,66	0,28	6,02	25	5,00	0,51
Lyphocek 2	20,75	0,748	3,60	26	21,20	1,35
Lyphocek 3	33,44	1,027	3,07	24	34,01	1,89

4.1.2 Neistota merania

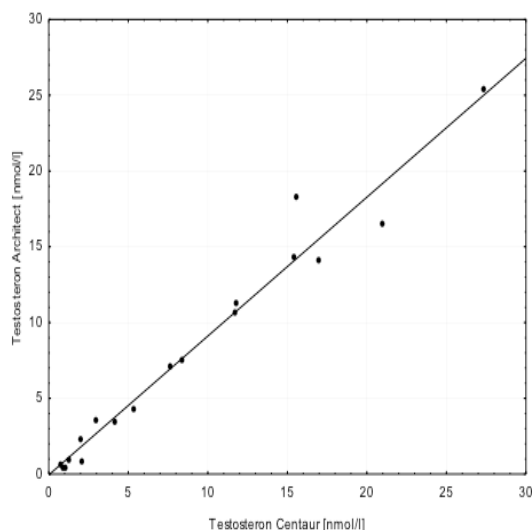
Odhad neistoty merania bol vyjadrený ako variačný koeficient medziľahlej precíznosti, z dôvodu nedostupnosti referenčných materiálov. Pre všetky hladiny kontrolných materiálov testosterónu bola neistota merania nižšia ako 6,02%, pričom hodnoty pre neistotu merania v rozmedzí 5-10% sú považované za vyhovujúce a pod 5% za vynikajúce.

4.1.3 Porovnanie s analyzátorom Centaur

Pri porovnaní s doposiaľ používanou metódou Centaur Testosterone bola nájdená veľmi dobrá zhoda výsledkov s korelačným koeficientom 0,9843 (vid' tab. 4.3). Z regresnej rovnice (vid' obr. 4.1) plynie minimálny systematický posun k nižším hodnotám pri meraní na analyzátoch ARCHITECT. Vzhľadom k tomu, že ide o klinicky nevýznamné zmeny, nie je nutné meniť doposiaľ používané referenčné intervaly.

Tab. 4.3: Tabuľka súhrnných hodnôt (počet meraní, median, minimum, maximum a korelačný koeficient) pre porovnanie analyzátorov ADVIA Centaur a ARCHITECT pre testosterón.

	Počet meraní	Median [nmol/l]	Minimum [nmol/l]	Maximum [nmol/l]	Korelačný koeficient
Centaur Testosteron	18	8,68	0,77	27,36	0,9843
ARCHITECT Testosteron	18	7,90	0,39	25,36	



Obr. 4.1: Lineárna regresná závislosť koncentrácie testosterónu nameraná na systémoch ADVIA Centaur a ARCHITECT. Plná čiara predstavuje regresnú priamku. Regresná rovnica:

$$\text{Architect} = 0,9148 \times \text{Centaur} - 0,0577 \text{ [nmol/l]} \quad (r = 0,9843; n = 18).$$

Na základe získaných výsledkov sme dospeli k záveru, že metóda je vhodná pre stanovenie testosterónu v ľudskom sére. Taktiež bolo dokázané, že doposiaľ používaná metóda Testosteron Centaur môže byť prevedená na novú metódu ARCHITECT Testosteron, ktorá bola danými meraniami verifikovaná, čo je dôkazom, že boli dosiahnuté funkčné vlastnosti o analytických znakoch deklarované výrobcom v laboratóriu ÚLBLD na meracom systéme ARCHITECT.

V súčasnosti sa ako referenčná metóda, „zlatý štandard“, pre stanovenie testosterónu najčastejšie používa ID-GC-MS/MS (isotope dilution-gas chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry) ako uvádza literatúra [15]. Ako ďalšia možnosť bola navrhnutá metóda ID-LC-MS/MS (isotope dilution-liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry) [48], ktorá, ako uvádza literatúra [45], je dostatočne citlivá a špecifická pre meranie testosterónu u žien v porovnaní s už spomínanou metódou ID-GC-MS/MS. Zatiaľ však, čo sú tieto metódy ľahko dostupné a široko rozšírené v referenčných laboratóriách, sú drahé a nie bežne k dispozícii pre mnoho klinických laboratórií [15].

Metóda ARCHITECT Testosterone bola vyvinutá pre zvýšenie presnosti a citlivosti najmä pri nízkych hodnotách (u žien a detí) [15], ktorá podľa literatúry nebola dostatočná u jej predchodcu [46]. Metóda bola porovnaná s ID-LC-MS/MS. Výsledky imunoanalýzy ukázali rovnaký testosteronový profil v priebehu menštruačného cyklu 25 zdravých žien s malou pozitívnou bias [15]. Táto hodnota je v rovnakom rozmedzí ako bias uvádzaná pri porovnaní s metódami tandemovej hmotnostnej spektrometrie (MS/MS) [47]. Z tohoto uhla pohľadu je metóda ARCHITECT Testosteron dostatočná pre klinickú prax. Dokonca podľa literatúry [15] je, na základe Demingovej regresnej priamky a korelačného koeficientu považovaná

za lepšiu metódu v porovnaní s metódami použitými pri kvantifikácii testosterónu v ďalších dvoch štúdiách [46, 49].

Bias, ktorá bola nameraná pri porovnaní referenčnej metódy s metódou ARCHITECT Testosteron, ako uvádza literatúra [15], bola pravdepodobne spôsobená rozdielnymi profily androgénov a viazanými proteínmi u samotných jednotlivcoch.

4.2 Progesterón

4.2.1 Opakovateľnosť a medziľahlá precíznosť

Metóda ARCHITECT Progesteron bola navrhnutá tak, aby bol celkový variačný koeficient pre vzorky s koncentraciami v rozmedzí všetkých kontrol $\leq 10\%$.

Tabuľka 4.4 zobrazuje namerané hodnoty pre stanovenie opakovateľnosti a štatistické vyhodnotenie. Variačné koeficienty pre Lyphochek 1 2,39% a Lyphochek 3 1,83% teda odpovedajú hodnote, ktorá bola stanovená výrobcom na základe protokolu EP5-T219 Clinical and Laboratory Standards Institute. Namerané hodnoty sa tiež zhodujú z hodnotami uvádzanými v literatúre [40].

Tab. 4.4: Namerané hodnoty kontrolných vzoriek (Lyphochek 1 a Lyphochek 3) pre stanovenie opakovateľnosti, štatistické vyhodnotenie a deklarované hodnoty kontrolných vzoriek pre progesterón.

Číslo merania	Lyphochek 1 [nmol/l]	Lyphochek 3 [nmol/l]
1.	2,2	73,6
2.	2,1	71,5
3.	2,2	70,5
4.	2,2	70,8
5.	2,1	73,6
6.	2,2	71,5
7.	2,2	73,2
8.	2,1	74,2
9.	2,2	70,8
10.	2,2	70,9
11.	2,1	71,1
12.	2,1	72,3
Deklarovaná hodnota	2,2	74,8
Priemer	2,2	72,0
SD	0,1	1,3
CV %	2,4	1,8
bias %	-0,1	-3,7

Tabuľka 4.5 zhrňuje štatistické vyhodnotenie nameraných dát medziľahlej precíznosti, ktoré bolo merané na kontrolných vzorkách (viď tab. 3.1 strana 27). Hodnoty variačných koeficientov (Lyphochek 1 7,9%, Lyphochek 2 4,9% a Lyphochek 3 5,8%) odpovedajú hodnotám stanoveným výrobcom aj dodávateľom kontrolných vzoriek.

Tab. 4.5: Štatistické vyhodnotenie nameraných dát kontrolných vzoriek medziľahlej precíznosti stanovené analytickým systémom a dodávateľom kontrolných vzoriek pre progesterón.

Kontrolné vzorky pre progesterón	Stanovené analyzátorom ARCHITECT				Definované výrobcom	
	Priemer [nmol/l]	SD [nmol/l]	CV %	n	priemer [nmol/l]	2SD [nmol/l]
Lyphochek 1	2,1	0,2	7,9	30	2,2	0,2
Lyphochek 2	26,7	1,3	4,9	24	27,2	2,7
Lyphochek 3	68,6	4,0	5,8	25	74,9	7,5

4.2.3 Neistota merania

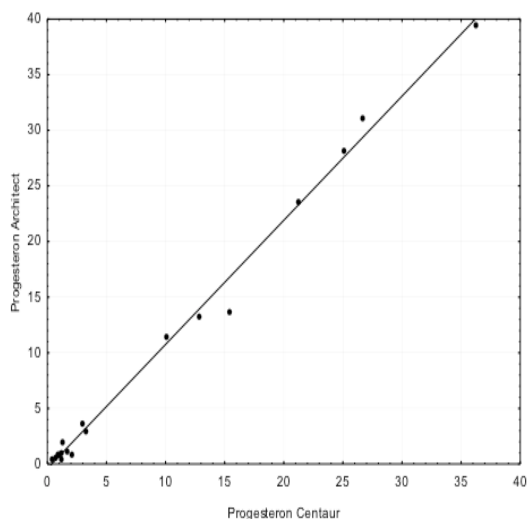
Odhad neistoty merania bol vyjadrený ako variačný koeficient medziľahlej precíznosti, z dôvodu nedostupnosti referenčných materiálov. Pre všetky hladiny kontrolných materiálov progesterónu bola neistota merania nižšia ako 7,9%, pričom hodnoty pre neistotu merania v rozmedzí 5-10% sú považované za vyhovujúce a pod 5% za vynikajúce.

4.2.4 Porovnanie s analyzátorom Centaur

Pri porovnaní s doposiaľ používanou metódou Centaur Progesterone bola nájdená veľmi dobrá zhoda výsledkov s korelačným koeficientom 0,9969 (viď tab. 4.6). Z regresnej rovnice (viď obr. 4.2), ktorej hodnoty sú výrazne lepšie ako uvádza literatúra [40], plynie minimálny systematický posun k nižším hodnotám pri meraní na analyzátoch ARCHITECT. Vzhľadom k tomu, že ide o klinicky nevýznamné zmeny, nie je nutné meniť doposiaľ používané referenčné intervaly.

Tab. 4.6: Tabuľka súhrnných hodnôt (počet meraní, median, minimum, maximum a korelačný koeficient) pre porovnanie analyzátorov ADVIA Centaur a ARCHITECT pre progesterón.

	Počet meraní	Median [nmol/l]	Minimum [nmol/l]	Maximum [nmol/l]	Korelačný koeficient
Centaur Progesteron	18	9,1	0,4	36,2	0,9969
ARCHITECT Progesteron	18	9,8	0,5	39,5	



Obr. 4.2: Lineárna regresná závislosť koncentrácie progesterónu nameraná na systémoch ADVIA Centaur a ARCHITECT. Plná čiara predstavuje regresnú priamku. Regresná rovnica:

$$\text{Architect} = 1,1163 \times \text{Centaur} - 0,414 \text{ [nmol/l]} \quad (r = 0,9969; n = 18).$$

Na základe získaných výsledkov sme dospeli k záveru, že metóda je vhodná pre stanovenie progesterónu v ľudskom sére. Taktiež bolo dokázané, že doposiaľ používaná metóda Progesteron Centaur môže byť prevedená na novú metódu ARCHITECT Progesteron, ktorá bola danými meraniami verifikovaná, čo je dôkazom, že boli dosiahnuté funkčné vlastnosti o analytických znakoch deklarované výrobcom v laboratóriu ÚLBD na meracom systéme ARCHITECT.

Ako referenčná metóda pre stanovenie koncentrácie progesterónu sa používa ID-GC-MS/MS ako uvádza literatúra [49, 50].

4.3 Luteinizačný hormón

4.3.1 Opakovateľnosť a medzil'ahlá precíznosť

Metóda ARCHITECT LH bola navrhnutá tak, aby bol celkový variačný koeficient pre vzorky s koncentraciami v rozmedzí všetkých kontrol $\leq 10\%$.

Tabuľka 4.7 zobrazuje namerané hodnoty pre stanovenie opakovateľnosti a štatistické vyhodnotenie. Variačné koeficienty pre Lyphochek 1 5,38% a Lyphochek 3 1,89% teda odpovedajú hodnote, ktorá bola stanovená výrobcom na základe protokolu EP5-T219 Clinical and Laboratory Standards Institute. Namerané hodnoty sa tiež zhodujú z hodnotami uvádzanými v literatúre [22, 40, 43].

Tab. 4.7: Namerané hodnoty kontrolných vzoriek (Lyphoček 1 a Lyphoček 3) pre stanovenie opakovateľnosti, štatistické vyhodnotenie a deklarované hodnoty kontrolných vzoriek pre LH.

Číslo merania	Lyphoček 1 [IU/l]	Lyphoček 3 [IU/l]
1.	1,21	65,29
2.	1,22	66,48
3.	1,34	66,77
4.	1,24	67,26
5.	1,18	69,33
6.	1,15	68,15
7.	1,20	66,57
8.	1,21	66,94
9.	1,10	68,45
10.	1,12	66,30
11.	1,19	69,54
12.	1,27	67,45
Deklarovaná hodnota	1,19	68,60
Priemer	1,20	67,38
SD	0,06	1,27
CV %	5,38	1,89
Bias %	1,05	-1,78

Tabuľka 4.8 zhrňuje štatistické vyhodnotenie nameraných dát medziľahlej presnosti, ktoré bolo merané na kontrolných vzorkách (viď tab. 3.1 strana 27) Hodnoty variačných koeficientov (Lyphoček 1 4,50%, Lyphoček 2 5,51% a Lyphoček 3 5,83%) odpovedajú hodnotám stanoveným výrobcom aj dodávateľom kontrolných vzoriek.

Tab. 4.8: Štatistické vyhodnotenie nameraných dát kontrolných vzoriek medziľahlej presnosti stanovené analytickým systémom a dodávateľom kontrolných vzoriek pre LH.

Kontrolné vzorky pre LH	Stanovené analyzátorom ARCHITECT				Definované výrobcom	
	Priemer [IU/l]	SD [IU/l]	CV %	n	priemer [IU/l]	2SD [IU/l]
Lyphoček 1	1,28	0,06	4,50	28	1,26	0,13
Lyphoček 2	16,15	0,89	5,51	29	15,00	1,50
Lyphoček 3	42,62	2,48	5,83	27	39,00	3,90

4.3.2 Neistota merania

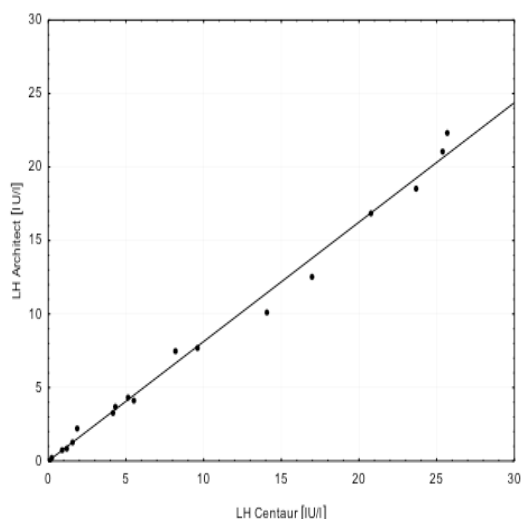
Odhad neistoty merania bol vyjadrený ako variačný koeficient medziľahlej presnosti, z dôvodu nedostupnosti referenčných materiálov. Pre všetky hladiny kontrolných materiálov LH bola neistota merania nižšia ako 5,83%, pričom hodnoty pre neistotu v rozmedzí 5-10% sú považované za vyhovujúce a pod 5% za vynikajúce.

4.3.3 Porovnanie s analyzátorom Centaur

Pri porovnaní s doposiaľ používanou metódou Centaur Testosterone bola nájdená veľmi dobrá zhoda výsledkov s korelačným koeficientom 0,9961 (vid' tab. 4.9). Z regresnej rovnice (vid' obr. 4.3) plynie minimálny systematický posun k nižším hodnotám pri meraní na analyzátoch ARCHITECT. Hodnoty korelačného koeficientu a regresnej rovnice boli podobné hodnotám uvedeným v literatúre [40]. Vzhľadom k tomu, že ide o klinicky nevýznamné zmeny, nie je nutné meniť doposiaľ používané referenčné intervaly

Tab. 4.9: Tabuľka súhrnných hodnôt (počet meraní, median, minimum, maximum a korelačný koeficient) pre porovnanie analyzátorov ADVIA Centaur a ARCHITECT pre LH.

	Počet meraní	Median [nmol/l]	Minimum [nmol/l]	Maximum [nmol/l]	Korelačný koeficient
Centaur LH	18	9,40	0,09	25,70	0,9961
ARCHITECT LH	18	7,64	0,06	22,35	



Obr. 4.3: Lineárna regresná závislosť koncentrácie LH nameraná na systémoch ADVIA Centaur a ARCHITECT. Plná čiara predstavuje regresnú priamku. Regresná rovnica:

$$\text{Architect} = 0,8124 \times \text{Centaur} - 0,0023 \text{ [IU/l]} \quad (r = 0,9961; n = 18).$$

Na základe získaných výsledkov sme dospeli k záveru, že metóda je vhodná pre stanovenie LH v ľudskom sére. Taktiež bolo dokázané, že doposiaľ používaná metóda LH Centaur môže byť prevedená na novú metódu ARCHITECT LH, ktorá bola danými meraniami verifikovaná, čo je dôkazom, že boli dosiahnuté funkčné vlastnosti o analytických znakoch deklarované výrobcom v laboratóriu ÚLBLD na meracom systéme ARCHITECT.

Ako uvádza literatúra [22] metóda ARCHITECT LH je cenným nástrojom pre

stanovenie LH v klinických laboratóriách, vďaka je presnosti, precíznosti a vynikajúcemu prevedeniu.

Pre stanovenie LH sa v súčasnosti používajú najmä chemiluminiscenčné metódy, čo potvrdzujú aj mnohé štúdie, ktoré pre kvantifikáciu LH využívali túto metódu. [51, 52, 53]. Ďalšími často využívanými metódami sú fluoroimunometódy a to najmä DELFIA ako dokazuje literatúra [54, 55]. V menšej miere, ale ešte stále sa pre stanovenie LH používajú aj radioimunometódy [56].

4.4 Folikuly stimulujúci hormón

4.4.1 Opakovateľnosť a medzil'ahlá precíznosť

Metóda ARCHITECT FSH bola navrhnutá tak, aby bol celkový variačný koeficient pre vzorky s koncentraciami v rozmedzí všetkých kontrol $\leq 10\%$.

Tabuľka 4.10 zobrazuje namerané hodnoty pre stanovenie opakovateľnosti a štatistické vyhodnotenie. Variačné koeficienty pre Lyphoček 1 5,12% a Lyphoček 3 3,24% teda odpovedajú hodnote, ktorá bola stanovená výrobcom na základe protokolu EP5-T219 Clinical and Laboratory Standards Institute. Namerané hodnoty sa tiež zhodujú z hodnotami uvádzanými v literatúre [40, 43].

Tab. 4.10: Namerané hodnoty kontrolných vzoriek (Lyphoček 1 a Lyphoček 3) pre stanovenie opakovateľnosti, štatistické vyhodnotenie a deklarované hodnoty kontrolných vzoriek pre FSH.

Číslo merania	Lyphoček 1 [IU/l]	Lyphoček 3 [IU/l]
1.	5,67	38,20
2.	5,38	36,13
3.	5,54	35,89
4.	5,99	37,74
5.	5,80	36,86
6.	5,49	35,33
7.	6,40	36,97
8.	5,32	36,52
9.	5,75	37,45
10.	5,67	39,52
11.	5,56	38,68
12.	5,81	36,96
Deklarovaná hodnota	5,43	36,30
Priemer	5,70	37,19
SD	0,29	1,20
CV %	5,12	3,24
Bias %	4,94	2,44

Tabuľka 4.11 zhrňuje štatistické vyhodnotenie nameraných dát medziľahlej precíznosti, ktoré bolo merané na kontrolných vzorkách (viď tab. 3.1 strana 27). Hodnoty variačných koeficientov (Lyphoček 1 4,00%, Lyphoček 2 3,72% a Lyphoček 3 4,87%) odpovedajú hodnotám stanoveným výrobcom aj dodávateľom kontrolných vzoriek.

Tab. 4.11: Štatistické vyhodnotenie nameraných dát kontrolných vzoriek medziľahlej precíznosti stanovené analytickým systémom a dodávateľom kontrolných vzoriek pre FSH.

	Stanovené analyzátorom ARCHITECT				Definované výrobcom	
	Priemer [IU/l]	SD [IU/l]	CV %	n	Priemer [IU/l]	2SD [IU/l]
Kontrolné vzorky pre FSH						
Lyphoček 1	5,72	0,23	4,00	25	5,44	0,54
Lyphoček 2	23,75	0,88	3,72	26	23,00	2,30
Lyphoček 3	37,50	1,82	4,87	23	36,30	3,65

4.4.2 Neistota merania

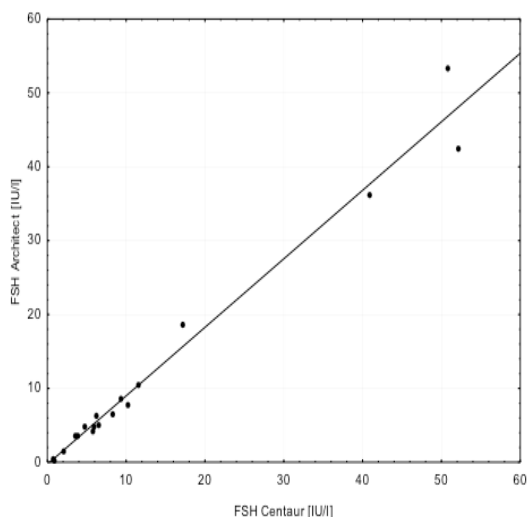
Odhad neistoty merania bol vyjadrený ako variačný koeficient medziľahlej precíznosti, z dôvodu nedostupnosti referenčných materiálov. Pre všetky hladiny kontrolných materiálov FSH bola neistota merania nižšia ako 4,87%, pričom hodnoty pre neistotu merania v rozmedzí 5-10% sú považované za vyhovujúce a pod 5% za vynikajúce.

4.4.3 Porovnanie s analyzátorom ADVIA Centaur

Pri porovnaní s doposiaľ používanou metódou Centaur FSH bola nájdená veľmi dobrá zhoda výsledkov s korelačným koeficientom 0,9884 (viď tab. 4.12). Z regresnej rovnice (viď obr. 4.4) plynie minimálny systematický posun k nižším hodnotám pri meraní na analyzátoch ARCHITECT. Hodnoty korelačného koeficientu a regresnej rovnice boli podobné hodnotám uvedeným v literatúre [40]. Vzhľadom k tomu, že ide o klinicky nevýznamné zmeny, nie je nutné meniť doposiaľ používané referenčné intervaly.

Tab. 4.12: Tabuľka súhrnných hodnôt (počet meraní, median, minimum, maximum a korelačný koeficient) pre porovnanie analyzátorov ADVIA Centaur a ARCHITECT pre FSH.

	Počet meraní	Median c [IU/l]	Minimum c [IU/l]	Maximum c [IU/l]	Korelačný koeficient
Centaur FSH	18	13,39	0,77	52,21	0,9884
ARCHITECT FSH	18	12,13	0,29	53,37	



Obr. 4.4: Lineárna regresná závislosť koncentrácie FSH nameraná na systémoch ADVIA Centaur a ARCHITECT. Plná čiara predstavuje regresnú priamku. Regresná rovnica:
 $\text{Architect} = 0,9276 \times \text{Centaur} - 0,2889 \text{ [IU/l]}$ ($r = 0,9884$; $n = 18$).

Na základe získaných výsledkov sme dospeli k záveru, že metóda je vhodná pre stanovenie FSH v ľudskom sére. Taktiež bolo dokázané, že doposiaľ používaná metóda FSH Centaur môže byť prevedená na novú metódu ARCHITECT FSH, ktorá bola danými meraniami verifikovaná, čo je dôkazom, že boli dosiahnuté funkčné vlastnosti o analytických znakoch deklarované výrobcom v laboratóriu ÚLBLD na meracom systéme ARCHITECT.

Pre stanovenie FSH sa v súčasnosti používajú najmä chemiluminiscenčné metódy, čo potvrdzujú aj mnohé štúdie, ktoré pre kvantifikáciu FSH využívali túto metódu [51, 52, 53, 58]. Ďalšími často využívanými metódami sú fluoroimunometódy a to najmä DELFIA ako dokazuje literatúra [54, 55, 57]. V menšej miere, ale ešte stále sa pre stanovenie FSH používajú aj radioimunometódy [56, 59].

Rozdiely v nameraných koncentráciách FSH, ktoré su podľa literatúry [60] medzi radioimunometódami a chemiluminiscenčnými metódami významné, môžu byť spôsobené, ako tá istá štúdia uvádza, kombináciou troch faktorov: štruktúrov FSH (α a β podjednotka), niektoré izoformy sú kvantifikované jednou metódou, ale druhou nie, z dôvodu rôznej špecifickosti protilátok; prítomnosťou iných glykoproteínov, ktoré sú štruktúrne veľmi podobné FSH; matematickým vzťahom, ktorým je signál prevedený na koncentráciu [60].

4.5 Prolaktín

4.5.1 Opakovateľnosť a medziláhľá precíznosť

Metóda ARCHITECT Prolaktin bola navrhnutá tak, aby bol celkový variačný koeficient pre vzorky s koncentraciami v rozmedzí všetkých kontrol $\leq 10\%$.

Tabuľka 4.13 zobrazuje namerané hodnoty pre stanovenie opakovateľnosti a štatistické vyhodnotenie. Variačné koeficienty pre Lyphochek 1 1,45% a Lyphochek 3 1,83% teda odpovedajú hodnote, ktorá bola stanovená výrobcom na základe protokolu EP5-T219 Clinical and Laboratory Standards Institute. Namerané hodnoty sa tiež zhodujú z hodnotami uvádzanými v literatúre [40, 43].

Tab. 4.13: Namerané hodnoty kontrolných vzoriek (Lyphochek 1 a Lyphochek 3) pre stanovenie opakovateľnosti, štatistické vyhodnotenie a deklarované hodnoty kontrolných vzoriek pre PRL.

Číslo merania	Lyphochek 1 [$\mu\text{g/l}$]	Lyphochek 3 [$\mu\text{g/l}$]
1.	7,17	45,34
2.	7,27	44,51
3.	7,13	45,25
4.	7,21	45,61
5.	7,11	46,18
6.	7,24	44,76
7.	7,18	44,50
8.	6,89	43,86
9.	7,16	46,10
10.	7,22	44,95
11.	7,02	43,86
12.	7,15	46,12
Deklarovaná hodnota	-	-
priemer	7,15	45,09
SD	0,10	0,82
CV %	1,45	1,83
bias %	-	-

Tabuľka 4.14 zhrňuje štatistické vyhodnotenie nameraných dát medziláhľej precíznosti, ktoré bolo merané na kontrolných vzorkách (vid' tab. 3.1 strana 27). Hodnoty variačných koeficientov (Lyphochek 1 4,60%, Lyphochek 2 4,20% a Lyphochek 3 5,00%) odpovedajú hodnotám stanoveným výrobcom aj dodávateľom kontrolných vzoriek.

Tab. 4.14: Štatistické vyhodnotenie nameraných dát kontrolných vzoriek medziľahlej precíznosti stanovené analytickým systémom a dodávateľom kontrolných vzoriek pre PRL.

Kontrolné vzorky	Stanovené analyzátorom ARCHITECT			n	Definované výrobcom	
	Priemer	SD	CV %		Priemer	2SD
pre prolaktin	[µg /l]	[µg /l]			[µg /l]	[µg /l]
Lyphochek 1	5,70	0,26	4,60	5	-	-
Lyphochek 2	15,26	0,64	4,20	6	-	-
Lyphochek 3 c	34,70	1,74	5,00	6	-	-

4.5.2 Neistota merania

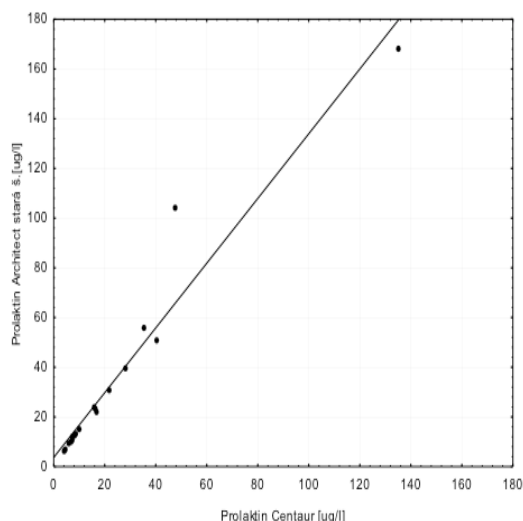
Odhad neistoty merania bol vyjadrený ako variačný koeficient medziľahlej precíznosti, z dôvodu nedostupnosti referenčných materiálov. Pre všetky hladiny kontrolných materiálov PRL bola neistota merania nižšia ako 5,00%, pričom hodnoty pre neistotu merania v rozmedzí 5-10% sú považované za vyhovujúce a pod 5% za vynikajúce.

4.5.3 Porovnanie s analyzátorom Centaur

Pri porovnaní s doposiaľ používanou metódou Prolaktin Centaur nebola nájdená zhoda výsledkov, čomu odpovedala aj hodnota korelačného koeficientu 0,9703 (viď tab. 4.15) a graf (viď obr. 4.5). Z rovnice regresnej priamky Architect = 1,1323×Centaur + 3,706 [µg/ml] plynie veľký systematický posun k vyšším hodnotám. Pri štatistickom vyhodnotení bola metóda programom STATISTICA vyhodnotená ako nevyhovujúca.

Tab. 4.15: Tabuľka súhrnných hodnôt (počet meraní, median, minimum, maximum a korelačný koeficient) pre porovnanie analyzátorov ADVIA Centaur a ARCHITECT pre PRL (stará šarža).

	Počet meraní	Median [µg /l]	Minimum [µg /l]	Maximum [µg /l]	Korelačný koeficient
Centaur Prolaktin	18	23,33	3,95	134,90	0,9703
ARCHITECT Prolaktin stará šarža	18	34,09	6,06	167,90	



Obr. 4.5: Lineárna regresná závislosť koncentrácie PRL nameraná na systémoch ADVIA Centaur a ARCHITECT pre starú šaržu. Plná čiara predstavuje regresnú priamku.

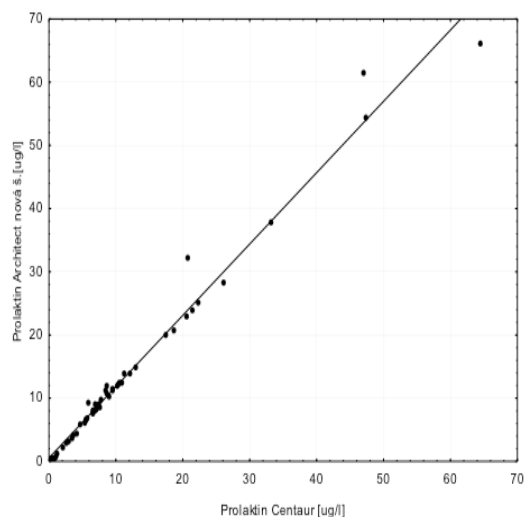
Regresná rovnica: Architect = 1,1323×Centaur + 3,706 [µg/ml] (r = 0,9703; n = 18).

Z dôvodu nedostatočnej zhody nameraných hodnôt na oboch analyzátoroch, spoločnosť Abbott Laboratories zabezpečila novú šaržu (nové reagenty). Bolo nazhromaždených 52 nových vzoriek biologického materiálu, v ktorých bola stanovená koncentrácia PRL na obidvoch analytických systémoch. Postupovalo sa presne ako pri prvých meraniach.

Pri opätovnom porovnaní metód bola nájdená veľmi dobrá zhoda výsledkov s korelačným koeficientom 0,9900 (vid' tab. 4.16). Z regresnej rovnice (vid' obr. 4.6) plynie už len minimálny systematický posun k vyšším hodnotám pri meraní na analyzátoch ARCHITECT. Podobnú regresnú rovnicu uvádza aj literatúra [40] čo opäť potvrdzuje, že metóda je vyhovujúca. Vzhľadom k tomu, že ide o klinicky nevýznamné zmeny, nie je nutné meniť doposiaľ používané referenčné intervaly.

Tab. 4.16: Tabuľka súhrnných hodnôt (počet meraní, median, minimum, maximum a korelačný koeficient) pre porovnanie analyzátorov ADVIA Centaur a ARCHITECT pre PRL (nová šarža).

	Počet meraní	Median [µg /l]	Minimum [µg /l]	Maximum [µg /l]	Korelačný koeficient
Centaur Prolaktin	52	11,50	0,30	64,50	0,9900
ARCHITECT Prolaktin nová šarža	52	13,51	0,60	66,13	



Obr. 4.6: Regresná závislosť koncentrácie PRL nameraná na systémoch ADVIA Centaur a ARCHITECT pre novú šaržu. Plná čiara predstavuje regresnú priamku.

Regresná rovnica: Architect = $1,1284 \times \text{Centaur} + 0,5333$ [$\mu\text{g/ml}$] ($r = 0,9900$; $n = 52$).

Na základe druhých získaných výsledkov sme dospeli k záveru, že metóda je vhodná pre stanovenie PRL v ľudskom sére. Taktiež bolo dokázané, že doposiaľ používaná metóda Centaur Prolaktin môže byť prevedená na novú metódu ARCHITECT Prolaktin, ktorá bola danými meraniami verifikovaná, čo je dôkazom, že boli dosiahnuté funkčné vlastnosti o analytických znakoch deklarované výrobcom v laboratóriu ÚLBDL na meracom systéme ARCHITECT.

Vo väčšine klinických laboratórií sa v súčasnosti na stanovenie PRL používajú rôzne druhy imunometód. Podľa niektorých štúdií [62, 63, 64] väčšina používaných imunometód nerozlišuje monomerný PRL od makroprolaktínu čo môže viesť k nesprávnej diagnóze a následne k neprimeranej liečbe [64]. Prípady, kedy je makroprolaktín v ľudskom sére zastúpený vo väčšej miere sa nazýva makroprolaktinémia. Percento kedy bola u pacientov s diagnostikovanou hyperprolaktinémiou odhalená makroprolaktinémia sa pohybuje od 10-45% [65, 65, 66].

„Zlatým štandardom“ pre stanovenie makroprolaktínu je gelová filtračná chromatografia (GFC), ktorá umožňuje kvantifikáciu všetkých troch variant PRL [64]. Metóda však nie je bežne dostupná pre klinické laboratóriá z dôvodu náročnosti na čas a ceny [62, 64].

Najviac rozšírenou metódou je precipitácia s polyetylen glykolom (PEG), ktorá je používaná aj v laboratóriu ÚLBDL. Avšak, napriek tomu, že je to jednoduchá, lacná a rýchla metóda, nie je dokonalá, pretože PEG môže inteferovať s niektorými Prolaktin imunometódami a tiež môže dôjsť k precipitácii nielen makroprolaktínu ale aj monomerného PRL [62, 63, 67].

Medzi najnovšie metódy patrí ultrafiltrácia založená na fyzickej separácii veľkých molekúl ako je „veľký veľký PRL” od malých izoformiem [68, 69].

Podľa literatúry [67] je stanovenie makroprolaktínu potrebné iba v prípade, že bola na základe výsledkov diagnostikovaná hyperprolaktinémia.

Vysoká koncentrácia PRL môže tiež spôsobiť „hook efekt”, ktorý vedie k falošne negatívnym výsledkom. Týka sa hlavne jednokrokových nekompetitívnych (sendvičových) metód, kde vysoká koncentrácia antigenu (analytu) vyviaže pevne viazanú protilátku aj značenú protilátku. Tým zabráni vytvoriť „sendvič” potrebný na detekciu [69, 70]. „Hook efekt” by mohol byť faktorom ovplyvňujúcim výsledky najmä na systéme ADVIA Centaur, keďže nekompetitívne metódy sú jednokrokové na rozdiel od metód systému ARCHITECT, ktoré sú dvojkrokové. Podľa literatúry [69, 70] sa používaním dvojkrokových metód dá „hook efektu” zabrániť ako aj použitím dostatočného riedenia [71].

Kvalita a funkčnosť analyzátoru bola potvrdená aj v externom hodnotení kontroly kvality, ktorá je 2x ročne usporiadaná spoločnosťou SEKK v Českej republike a tiež 2x ročne nemeckou spoločnosťou Rfb (Referencinstitut für Bioanalytik). V roku 2013 bol pre metódu ARCHITECT Testosteron, ARCHITECT Progesteron, ARCHITECT LH, ARCHITECT FSH, ARCHITECT Prolaktin získaný certifikát v 1. z dvoch nemeckých cyklov (viď. príloha A, ide o skenovaný materiál, horšia kvalita). Metódy sú v súčasnej dobe akreditované na základe vyhodnotenia Českého inštitútu pro akreditaci, o.p.s.

Zaistenie kvality a samotný dopad výsledkov na určenie diagnózy nie je jediným dôvodom, prečo sa vykonávajú validácie, verifikácie a následná akreditácia. V dnešnej dobe majú tieto postupy aj svoj ekonomický podtext. Uvažuje sa, že akreditované laboratóriá budú dostávať vyššie platby od poisťovní než neakreditované. Práve prebiehajú jednania o tom ako bude platba presne nastavená, ale že k tomu dôjde je už pomerne jasné.

5. ZÁVER

Táto bakalárska práca bola zameraná na verifikáciu nového analytického systému ARCHITECT a na prevedenie daných metód zo systému ADVIA Centaur na tento nový systém.

Samotná verifikácia spočívala na určení opakovateľnosti, medziľahlej presnosti a neistoty merania za použitia kontrolných materialov Lyphochek. V prípade opakovateľnosti sa u všetkých metódach podarilo dosiahnuť hodnoty deklarované výrobcom ($CV \leq 10\%$). Variačné koeficienty sa pohybovali v doporučených intervaloch : testosterón pre Lyphochek 1 6,81%, pre Lyphochek 3 6,40%, progesterón 2,4% a 1,8%, LH 5,38% a 1,89%, FSH 5,12% a 3,24%, PRL 1,45% a 1,83%.

Výsledky pre určenie medziľahlej presnosti boli taktiež vyhovujúce a potvrdili požiadavky stanovené výrobcom ($CV \leq 10\%$). Variačné koeficienty sa pohybovali v doporučených intervaloch: testosterón pre Lyphochek 1 6,02%, Lyphochek 2 3,60%, Lyphochek 3 3,07%, progesterón 7,9%, 4,9% a 5,8%, LH 4,50%, 5,51% a 5,83%, FSH 4,00%, 3,72% a 4,87%, PRL 4,60%, 4,20% a 5,00%.

Hodnoty neistoty merania boli pre všetky dané metódy vyhovujúce: testosterón 6,02%, progesterón 7,9%, LH 5,83%, FSH 4,87%, PRL 5,00%, pričom hodnoty pre neistotu merania v rozmedzí 5-10% sú považované za vyhovujúce a pod 5% za vynikajúce.

Pri porovnaní metód ARCHITECT Testosteron, ARCHITECT Progesteron, ARCHITECT LH a ARCHITECT FSH bola s dovedy používanými metódami na systéme ADVIA Centaur nájdená veľmi dobrá zhoda. Korelačné koeficienty sa pohybovali v rozmedzí od 0,9840 do 0,9961 (testosterón $r = 0,9843$, progesterón $r = 0,9840$, LH $r = 0,9961$, FSH $r = 0,9884$). Z regresných rovníc vyplynul minimálny systematický posun k nižším hodnotám pri meraní na analyzátore ARCHITECT (regresná rovnica testosterón: Architect = $0,9148 \times \text{Centaur} - 0,0577$ [nmol/l], progesterón: Architect = $0,9145 \times \text{Centaur} - 0,0502$ [nmol/l], LH: Architect = $0,8124 \times \text{Centaur} - 0,0023$ [IU/l], FSH: Architect = $0,9276 \times \text{Centaur} - 0,2889$ [IU/l]).

Pre metódu ARCHITECT Prolaktin bola stará šarža ohodnotená ako nevyhovujúca (rovnica regresie: Architect = $1,1323 \times \text{Centaur} + 3,706$ [μg/ml] s korelačným koeficientom 0,9703). Po použití novej šarže metóda spĺňala požiadavky a bola hodnotená ako vyhovujúca (rovnica regresie: Architect = $1,1284 \times \text{Centaur} + 0,5333$ [μg/ml] s korelačným koeficientom 0,9900).

Celkovým zhrnutím všetkých meraní a výsledkov je, že všetky hodnotené metódy na analytickom systéme ARCHITECT sú vhodné pre stanovenie v ľudskom sére. Metódy sú momentálne akreditované na základe vyhodnotenia Českého inštitútu pro akreditaci, o.p.s.

Literatúra

- [1] Sborníky technické harmonizace: *Terminologie z oblasti metrologie*. 2. vydanie. Dostupné z URL: <http://homel.vsb.cz/~khe0007/opory/podklady_vyuka/terminologie_metrolog2010.pdf> [cit. 2.7.2013].
- [2] Česká společnost klinické biochemie: *Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích*. Dostupné z URL: <<http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2011/2011-1/dop-validace.pdf>> [cit. 12.8.2013].
- [3] Pelinková K.: *Validace, verifikace, nejistoty měření (směrnice)*. 3. vydanie. ÚLBDL VFN a 1. LF UK, 2011.
- [4] Thompson M.; Ellison S. L. R.; Wood R.: Harmonized Guidelines for Single-laboratory Validation of Methods of Analysis. IUPAC Technical Report. *International Union of Pure and Applied Chemistry* 74:5, 835-855 (2002).
- [5] European medicines agency: *Guideline on bioanalytical method validation*. Dostupné z URL: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf> [cit. 9.8.2013].
- [6] SEKK: *Metrologická terminologie*. Dostupné z URL: <<http://www.sekk.cz/terminologie/Text/Terminologie.htm>> [cit. 15.7.2013].
- [7] Eurachem: *the fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics*. Dostupné z URL: <<http://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/mv>> [cit. 3.8.2013].
- [8] Suchánek M.; Friedecký B.; Kratochvíla J.; Budina M.; Bartoš V.: Doporučení pro určení odhadů nejistot výsledků měření/klinických testů v klinických laboratořích. *Klinická biochemie a metabolismus* 1, 43-53 (2006).
- [9] Spratt D. I.; Bigos S. T.; Beitins I. et al.: Both hyper- and hypogonadotropic hypogonadism occur transiently in acute illness: bio- and immunoactive gonadotropins. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 7, 1562-1570 (1992).
- [10] Wilke T. J.; Utley D. J.: Total testosterone, free-androgen index, calculated free testosterone, and free testosterone by analog RIA compared in hirsute women and in otherwise normal women with altered binding of sex- hormone-binding globulin. *Clinical Chemistry* 33: 1372-5 (1987).
- [11] Stephen J. Winters, David E. Kelley, and Bret Goodpaster. The analog free testosterone assay: are the results in men clinically useful?. *Clinical Chemistry* 44:10 2178 –2182 (1998).
- [12] Zima T.: *Labolatorní diagnostika*. Druhé doplněné a přepracované vydání. Galén 2002, p. 219-224.
- [13] Depenbusch M.; Nieschlag E.: Stimulation of Spermatogenesis in Hypogonadotropic Men. *Contemporary Endocrinology* 371-386 (2004). (abstrakt)
- [14] Bui H. N.; Sluss P. M.; Blincko S.; Knol D. L.; Blankenstein M. A.; Heijboer A. C.: Dynamics of serum testosterone during the menstrual cycle evaluated by daily measurements with an ID-LC-MS/MS method and a 2nd generation automated immunoassay. *Steroids* 78, 96–101 (2013).
- [15] Thienpont L.; Siekmann L.; Lawson A.; Cohnet E.; De Leenheer A.: Development, validation, and certification by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry of lyophilized human serum reference materials for cortisol (CRM 192 and 193) and progesterone (CRM 347 and 348). *Clinical Chemistry* 37:4, 540-546 (1991).
- [16] Mitchell G.; Ladenson J. H.; Ladenson S. H. : Hormonal evaluation of female infertility and reproductive disorders. *Clinical Chemistry* 35:4, 620-629 (1989).
- [17] Kol S.; Homburg R.: Change, change, change: hormonal actions depend on changes in blood levels. *Human Reproduction* 23:5, 1004–1006 (2008).

- [18] Filicori M.; Butler J. P.; Crowley W. F.: Neuroendocrine regulation of the corpus luteum in the human. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 73, 1638-1647 (1984).
- [19] Winkel P.; Gaede P.; Lyngbye J.: Method for monitoring plasma progesterone concentrations in pregnancy. *Clinical Chemistry* 22, 422-428 (1976).
- [20] Steril F.: The clinical relevance of luteal phase deficiency: a committee opinion. *American Society for Reproductive Medicine* 98, 1112-1117 (2012).
- [21] Oer M.; Beckert Ch.; Heinrich B.; Buenning C.; Kapprell H. P.: Performance evaluation of an improved ARCHITECT LH assay for the quantitative determination of luteinizing hormone in human serum and plasma. *BIO* 2, 27-36 (2012).
- [22] Kronenberg H. M. et al.: *Williams textbook of endocrinology*. 11th ed. Canada, Saunders 2008.
- [23] Diagnostic Biochem Canada: *Luteinizing hormone (LH) ELISA*. Dostupné z URL: <<http://www.dbc-labs.com/luteinizing-hormone-lh-elisa/>> [cit. 2.9.2013].
- [24] Alevizaki M.; Huhtaniemi I.: Structure-function relationships of glycoprotein hormones; lessons from mutations and polymorphisms of the thyrotrophin and gonadotrophin subunit genes. *Hormones* 1:4, 224-232 (2002).
- [25] López et al: *Physiological and Pathological Hyperprolactinemia: Can We Minimize Errors in the Clinical Practice?*. Dostupné z URL: <http://cdn.intechopen.com/pdfs/42143/InTech-Physiological_and_pathological_hyperprolactinemia_can_we_minimize_errors_in_the_clinical_practice_.pdf> [cit. 2.9.2013].
- [26] Rose M. P.; Das R. E. G.; Balen A. H.: Definition and measurement of follicle stimulating hormone. *Endocrine reviews* 21:1, 5-22 (2000).
- [27] Milano W.; D'Acunto C. W.; De Rosa M.; Festa M.; Milano L.; Petrella C.; Capasso A.: Recent Clinical Aspects of Hyperprolactinemia Induced by Antipsychotics. *Reviews on Recent Clinical Trials* 6, 52-63 (2011).
- [28] Fahie-Wilson M. N.; John R.; Ellis A. R.: Macroprolactin: high molecular mass forms of circulating prolactin. *Association of Clinical Biochemists* 42, 175-192 (2005). (abstrakt)
- [29] La Torre D.; Falorni A.: Pharmacological causes of hyperprolactinaemia. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 3, 929-951 (2007).
- [30] Serri O.; Chik C. L.; Ur E.; Ezzat S.: Diagnosis and management of hyperprolactinemia. *Canadian Medical Association Journal* 169:6, 575-581 (2003).
- [31] Isik S.; Dilek B.; Yasemin T. A.; Ufuk O.; Ferhat G.; Gonul E.; Hatice O. N.; Ferit K. K.; Yusuf A.; Serdar G.: Clinical and radiological findings in macroprolactinemia. *Endocrine* 41, 327-333 (2012).
- [32] Soini E.; Hemmit I.: Fluoroimmunoassay: Present status and key problem. *Clinical Chemistry* 25:3, 353-361 (1979).
- [33] Wild D.: *The immunoassay handbook*. 3rd ed. Elsevier 2005, s. 4.
- [34] Štern P. a kolektiv autorů: *Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia*. Karolinum 2011, s.244.
- [36] Gosling J. P.: A Decade of Development in Immunoassay Methodology. *Clinical Chemistry* 36:8, 1408-1427 (1990).
- [36] SEKK: *Encyklopedie laboratorní medicíny 2* [CD-ROM] Praha, 2003.
- [37] Hall J. E.; Nieman L. K.: Handbook of Diagnostic Endocrinology. In: *Issues in Endocrine Immunoassay*. Gill S.; Hayes F. J.; Sluss P. M.. Dostupné z URL <http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-59259-293-7_1> [cit. 29.5.2013].
- [38] Wodhead J. S.; Weks I.: Chemiluminescence immunoassay. *Pure Applied Chemistry* 57:3, 523—529 (1985).
- [39] De Boever J.; Kohen F.; Vandekerckhove D.; Van Maele G.: Solid-phase chemiluminescence immunoassay for progesterone in unextracted serum. *Clinical Chemistry* 30:10, 1637-1641 (1984).

- [40] Hendriks H. A.; Kortlandt W.; Verweij W. M.: Analytical performance comparison of five new generation immunoassay analyzers. *Ned Tijdschr Klin Chem* 25:3, 170-177 (2000).
- [41] Wild D.: *The immunoassay handbook*. 3rd ed. Elsevier 2005, s. 402.
- [42] Stricker R.; Eberhart R.; Chevailler M.; Quinn F. A.; Bischof P.; Stricker R.: Establishment of detailed reference values for luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, estradiol, and progesterone during different phases of the menstrual cycle on the Abbott ARCHITECT analyzer. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 44:7, 883-887 (2006).
- [43] Verheecke1 P.; Quinn F. A.: Laboratory evaluation of representative disease state assays on the Abbott ARCHITECT® i2000® analyzer. *Journal of Laboratory Automation* 5, 30-33 (2000).
- [44] Rosner W.; Auchus R. J.; Azziz R.; Sluss P. M.; Raff H.: Position statement: utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: an endocrine society position statement. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92, 405-413 (2007).
- [45] Thienpont L. M.; Van Uytvanghe K.; Blincko S.; Ramsay C. S.; Xie H.; Doss R. C. et al.: State-of-the-art of serum testosterone measurement by isotope dilution-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 54, 1290-1297 (2008).
- [46] Taieb J.; Mathian B.; Millot F.; Patricot M. C.; Mathieu E.; Queyrel N. et al.: Testosterone measured by 10 immunoassays and by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry in sera from 116 men, women, and children. *Clinical Chemistry* 49, 1381-95 (2003).
- [47] Legro R. S.; Schlaff W. D.; Diamond M. P.; Coutifaris C.; Casson P. R.; Brzyski R. G. et al.: Total testosterone assays in women with polycystic ovary syndrome: precision and correlation with hirsutism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 95, 5305-13 (2010).
- [48] Groenestege W. M.; Bui H. N.; Kate T. J.; Menheere P. P.; Oosterhuis W. P.; Vader H. L. et al.: Accuracy of 1st and 2nd generation testosterone assays and improvement through sample extraction. *Clinical Chemistry* 58, 1154-6 (2012).
- [49] Gaskell S. J.; Brownsey B. G.; Groom G. V.: Analyses for progesterone in serum by gas chromatography/mass spectrometry: target data for external quality assessment of routine assays. *Clinical Chemistry* 30:10, 1696-1700 (1984).
- [50] Couckel W.; Devleeschouwer N.; Libeer J.; Schiettecatte J.; Martin M.; Smitz J.: Accuracy and reproducibility of automated estradiol-17b and progesterone assays using native serum samples: results obtained in the Belgian external assessment scheme. *Human Reproduction* 22:12, 3204-3209 (2007).
- [51] Chandel A.; Dhindsa S.; Topiwala S.; Chaudhuri A.; Dandona P.: Testosterone concentration in young patients with diabetes. *Diabetes Care* 31:10, 2013-2017 (2008).
- [52] Barth J. H.; Field H. P.; Yasmin E.; Balen A. H.: Defining hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome: measurement of testosterone and androstenedione by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and analysis by receiver operator characteristic plots. *European Journal of Endocrinology* 162, 611-615 (2010).
- [53] Ribeiro R. S.; Abucham J.: Clomiphene fails to revert hypogonadism in most male patients with conventionally treated nonfunctioning pituitary adenomas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia and Metabologia* 55:4, 266-271 (2011).
- [54] Wide L.; Naessén T.; Eriksson K.: Effects of 17beta-oestradiol and norethisterone acetate on sulfonation and sialylation of gonadotrophins in post-menopausal women. *Upsala Journal of Medical Sciences* 115, 97-106 (2010).
- [55] Grinspon R. P.; Ropelato M. G.; Gottlieb S.; Keselman A.; Martínez A.; Ballerini M. G.; Domené H. M.; Rey R. A.: Basal follicle-stimulating hormone and peak gonadotropin levels after gonadotropin-releasing hormone infusion show high diagnostic accuracy in boys with suspicion of hypogonadotropic hypogonadism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 95:6, 2811-2818 (2010).
- [56] Li S.; Dai J.; Zhang L.; Zhang J.; Zhang Z.; Chen B.: An association of elevated serum prolactin with phthalate exposure in adult men. *Biomedical and Environmental Sciences* 24:1, 31-39 (2011).

- [57] Ankarberg-Lindgren C.; Westphal O.; Dahlgren J.: Testicular size development and reproductive hormones in boys and adult males with Noonan syndrome: a longitudinal study. *European Journal of Endocrinology* 165, 137–144 (2011).
- [58] Chen SC, Hsieh JT, Yu HJ, Chang HC.: *Appropriate cut-off value for follicle-stimulating hormone in azoospermia to predict spermatogenesis.* Dostupné z URL <<http://www.rbej.com/content/8/1/108>> [cit. 1.8.2013].
- [59] Jinno M.; Takeuchi M.; Watanabe A.; Teruya K.; Hirohama J.; Eguchi N.; Miyazaki A.: Advanced glycation end-products accumulation compromises embryonic development and achievement of pregnancy by assisted reproductive technology. *Human Reproduction* 26:3, 604–610 (2011).
- [60] Taieb J.; Olivennes F.; Birr A. S.; Benattar C.; Righini C.; Frydman R.; Lindenbaum A.: Comparison of day 3 FSH serum values as determined by six different immunoassays. *Human Reproduction* 17:4, 926-928 (2002).
- [61] Beltran L.; Fahie-Wilson M. N.; McKenna T. J.; Kavanagh L.; Smith T. P.: Serum total prolactin and monomeric prolactin reference intervals determined by precipitation with polyethylene glycol: evaluation and validation on common immunoassay platforms. *Clinical Chemistry* 54:10, 1673–1681 (2008).
- [62] Beda-Maluga K.; Pisarek H.; Komorowski J.; Pawlikowski M.; Świętosławski J.; Winczyk K.: The detection of macroprolactin by precipitation and ultrafiltration methods. *Polish Journal of Endocrinology* 62:6, 529-536 (2011).
- [63] McCudden Ch. R.; Sharpless J. L.; Grenache D.G.: Comparison of multiple methods for identification of hyperprolactinemia in the presence of macroprolactin. *Clinica Chimica Acta* 411:3-4, 155–160 (2010).
- [64] Leslie H.; Courtney C. H.; Bell P. M. et al.: Laboratory and clinical experience in 55 patients with macroprolactinemia identified by a simple polyethylene glycol precipitation method. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86, 2743–2746 (2001).
- [65] Alfonso A.; Rieniets K. I.; Vigersky R. A.: Incidence and clinical significance of elevated macroprolactin levels in patients with hyperprolactinemia. *Endocrine Practice* 12, 275–280 (2006). (abstrakt)
- [66] Kavanagh L.; McKenna T. J.; Fahie-Wilson M. N. et al.: Specificity and clinical utility of methods for the detection of macroprolactin. *Clinical Chemistry* 52, 1366–1372 (2006).
- [67] Prazeres S.; Amparo S. M.; Ferreira H.G. et al. : A practical method for the detection of macroprolactinaemia using ultrafiltration. *Clinical Endocrinology* 58, 686–690 (2003). (abstrakt)
- [68] Quinn A. M.; Rubinas T. C.; Garbincius C. J. et al.: Determination of ultra- filterable prolactin elimination of macroprolactin interference with a monomeric prolactin-selective sample pretreatment. *The Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 130, 1807–1812 (2006).
- [69] Khosravi M. J.: Shifting the “Hook Effect” In One-Step Immunometric Assays . *Clinical Chemistry Journal* 36:1, 169-170 (1990).
- [70] Hailer B.L.; Fuller K. A.; Brown W. S.; Koenig J. W.; Eveland B. J.; Scott M.G.: Two automated prolactin immunoassays evaluated with demonstration of high-dose „hook effect” in one. *Clinical Chemistry Journal* 38:3, 437-438 (1992).
- [71] Unnikrishnan A. G.; Rajaratnam S.; Seshadri M. S.; Kanagasapabathy A. S.; Stephen D. C.: The 'hook effect' on serum prolactin estimation in a patient with macroprolactinoma. *Neurology India* 49, 78-80 (2001).

PRÍLOHA

Príloha A

Survey: HM3/12
month: July 2012
Participant-No: 9900540
date of issue: 28.07.12



Referenzinstitut für Bioanalytik



Všeobecná fakultní nemocnice
Centrální Laborator na UKBLD
Prof. MUDr. Zima, RNDr. Benáková
U Nemocnice 2
12808 PRAHA 2
TSCHECHIE

Ringversuchsleiter

Prof. Dr. C. Knabbe
Prof. Dr. K.P. Kohse
Prof. Dr. M. Neumaier

Leitung RFB

Dr. R. Kruse
Dr. W. J. Geilenkeuser

Bonn, 16. August 2012

Certificate

We confirm that you have participated in the survey for for hormone determinations in serum.

You have met the requirements of the survey for the following analytes:

Aldosterone	(1)	Cortisol	(4)	Estradiol-17beta	(4)
Progesterone	(4)	Testosterone	(4)	T3, free	(4)
T3, total	(4)	T4, free	(4)	T4, total	(13)
TBG	(4)	TSH	(4)	DHEA-S	(4)
17 OH-progesterone	(1)	Ferritin	(4)		

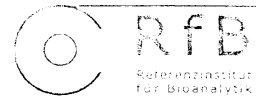
This certificate is valid until the end of January 2013.

The number in parentheses characterizes the analytical method used.

The assignment of the number to the respective method and/or the respective instrument is to be taken from the total evaluation.



Study: HM2/12
 month: July 2012
 Participant No: 9900540



Listing and Evaluation of your results

Explanations

Certificate

A certificate is issued (given) for an analyte only if the basis for an evaluation of the accuracy is given by the guidelines of the German Medical Association and/or if an evaluation is possible in analogy to these guidelines (see comments on the evaluation) and, if both results for an analyte are within the given acceptance limits. (marked as '+' below C)

Certificate of participation

In the participation certificate all analytes which are included in the list on this page are listed.
 If all analytes are listed on the certificate no participation certificate is printed.

Legend:	C=Certification, M=Method, R=Your result, D=Difference (T-T)	Certification: + = fulfilled (quotient D/Dmax <= 1.0)
	Dmax= maximum allowable amount of difference in measurement, partly given by annex 1 of the guideline of the BAK (Dt. Ärzteblatt 103, Heft 7, 10.2.2005).	= not fulfilled (quotient D/Dmax > 1.0)
	T = target value, either reference method value or assigned value, LL, UL = lower resp. upper limit	= certification cancelled because of technical and/or analytical reasons

	C	M	R	D/Dmax	T	LL	UL											
Aldosterone [µg/l]	+	A	206	-0.82	322	160	466											
			B	106	-0.34	163	34.2	243										
Cortisol [nmol/l]	+	A	458	0.63	365	219	511											
			B	1096	0.82	325	495	1155										
Estradiol-17beta [pmol/l]	+	A	0.565	0.09	0.534	0.213	0.655											
			B	1.15	0.23	1.01	0.404	1.62										
Progesterone [nmol/l]	+	A	13.2	-0.17	14.4	7.20	21.6											
			B	34.1	-0.14	36.7	18.3	55.1										
Testosterone [nmol/l]	+	A	22.1	-0.66	28.9	18.7	33.9											
			B	13.2	-0.18	14.1	9.16	19.1										
T3, free [pmol/l]	+	A	5.04	-0.05	5.10	3.67	6.33											
			B	14.1	0.06	13.8	10.4	17.2										
T3, total [nmol/l]	+	A	1.30	-0.66	1.55	1.17	1.93											
			B	3.99	-0.50	4.54	3.45	5.63										
T4, free [pmol/l]	+	A	15.2	0.05	15.0	11.4	18.6											
			B	39.2	0.09	38.3	29.1	47.5										
T4, total [nmol/l]	+	A	70.5	-0.17	73.5	55.8	91.2											
			B	154	0.25	164	124	204										
TBG [mg/dl]	+	A	10.8	-0.23	11.6	8.12	15.1											
			B	10.6	-0.09	10.9	7.63	14.2										
TSH [mUa]	+	A	1.04	-0.46	1.17	0.889	1.46											
			B	2.90	-0.49	3.29	2.50	4.06										
DHEA-S [nmol/l]	+	A	9.17	-0.20	9.86	6.40	13.4											
			B	4.73	-0.31	5.21	3.45	7.17										
17-OH-progesterone [nmol/l]	+	A	4.90	-0.06	5.07	2.32	8.12											
			B	13.8	-0.12	14.9	5.96	23.9										
Ferritin [µg/l]	+	A	71.0	-0.07	72.2	54.1	90.3											
			B	172	0.16	165	123	207										

Survey: HP1/13
month: February 2013
Participant-No: 9900540
date of issue: 02.02.13



Referenzinstitut für Bioanalytik

Všeobecná fakultní nemocnice
Centrální laborator na UKBLD
Prof. MUDr. Zima, RNDr. Benáková
U Nemocnice 2
12808 PRAHA 2
TSCHECHIEN



Ringversuchsleiter
Prof. Dr. C. Knabbe
Prof. Dr. Dr. K.P. Köhse
Prof. Dr. M. Neumaier

Leitung RfB
Dr. R. Haus
Dr. W. J. Geilenkeuser

Bonn, 19. February 2013

Certificate

We confirm that you have participated in the survey for hormone determinations in serum.

You have met the requirements of the survey for the following analytes:

FSH	(4)	LH	(4)	Prolactin	(4)
hGH	(1)	IGF-1	(1)	IGFBP-3	(1)
Insulin	(4)	Renin	(1)	SHBG	(4)
Parathyroid hormone	(4)	Ferritin	(4)	Folic acid	(4)
vitamin B12	(4)				

This certificate is valid until the end of August 2013.

The number in parentheses characterizes the analytical method used.
The assignment of the number to the respective method and/or the respective instrument is to be taken from the total evaluation.

Survey: HP1/13
 month: February 2013
 Participant-No: 9900540



Listing and Evaluation of your results

Explanations

Certificate

A certificate is issued (given) for an analyte only if the basis for an evaluation of the accuracy is given by the guidelines of the German Medical Association and/or if an evaluation is possible in analogy to these guidelines (see comments on the evaluation) and, if both results for an analyte are within the given acceptance limits (marked as "+" below)

Certificate of participation

In the participation certificate all analytes which are included in the list on this page are listed.
 If all analytes are listed on the certificate no participation certificate is printed.

Legend:	C=Certification, M=No of method, R=your result, D=difference (R-T) Dmax= maximum allowable amount of difference in measurement, partly given by annex 1 of the guideline of the BAK (Dt. Ärzteblatt 105, Heft 7, 15.2.2008). T = target value, either reference method value or assigned value, LL UL = lower resp. upper limit	Certification: + = fulfilled (quotient D/Dmax <= 1.0) - = not fulfilled (quotient D/Dmax > 1.0) ± = certification cancelled because of technical and/or analytical reasons
---------	---	--

	C	M	R	D/Dmax	T	LL	UL											
FSH [U/l]	+	4	A	28.0	0.50	25.0	19.0	31.0										
			B	66.2	0.57	58.1	44.1	72.1										
LH [U/l]	+	4	A	9.19	0.23	8.70	6.61	10.8										
			B	19.4	0.52	17.2	13.0	21.4										
Prolactin [ng/ml]	+	4	A	10.4	0.22	9.72	6.79	12.7										
			B	55.6	0.11	53.7	37.5	69.9										
hGH [mU/l]	+	1	A	21.5	0.06	21.1	14.7	27.5										
			B	57.0	0.82	45.6	31.8	53.4										
IGF-1 [µg/l]	+	1	A	209	0.42	185	129	241										
			B	262	-0.55	314	219	409										
IGFBP-3 [mg/l]	+	1	A	4.30	0.97	4.21	2.94	5.47										
			B	4.43	0.36	3.99	2.73	5.19										
Insulin [mU/l]	+	4	A	49.9	0.25	46.4	32.4	60.4										
			B	158	0.34	143	100	186										
Renin [pg/ml]	+	1	A	76.2	-0.24	82.0	57.4	107										
			B	35.3	-0.18	37.3	26.1	48.5										
SHBG [nmol/l]	+	4	A	42.4	0.26	39.3	27.5	51.1										
			B	40.9	0.20	38.5	28.9	50.1										
Parathyroid hormone [pmol/l]	+	4	A	1.38	-0.20	1.52	0.833	2.20										
			B	15.9	-0.14	17.0	9.34	24.7										
Ferritin [µg/l]	+	4	A	126	0.44	113	84.7	142										
			B	316	0.25	297	222	372										
Folic acid [µg/l]	+	4	A	2.67	0.10	2.52	1.10	3.94										
			B	9.95	0.19	8.50	4.22	8.73										
vitamin B12 [pg/l]	+	1	A	710	0.25	693	495	931										
			B	1371	0.12	1322	925	1719										