

Metodika a výsledky porovnání stanovení vybraných analytů na pracovištích Oddělení klinické biochemie FN Brno

Mikušková A., Beňovská M., Wiewiorka O., Dastych M.

Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice Brno

SOUHRN

K problematice srovnávání výsledků kvantitativních metod v klinické laboratoři lze najít množství informací v odborných časopisech, monografiích i na webových zdrojích. Popisované způsoby srovnávacích studií se však týkají převážně případu, kdy je třeba porovnat výsledky jedné dvojice metod (např. nově zaváděné metody s metodou v laboratoři již používanou). Uváděné metody srovnání nejsou v plném rozsahu použitelné v případech, kdy je nutné souběžné porovnávání širokého spektra analytických metod (např. postupů prováděných paralelně na více pracovištích velké klinické laboratoře), ať už z důvodů množství shromážděných a měřených vzorků, tak i proveditelnosti experimentů takového rozsahu při běžném provozu laboratoří. Pokusili jsme se navrhnout jednoduchý a přitom vyhovující způsob souběžného porovnání širšího spektra analytických metod s cílem zajistit maximální srovnatelnost výsledků stanovení analytů na různých pracovištích laboratoře, a tím i kontinuitu výsledků opakovaného laboratorního vyšetření pacienta alternativně na těchto pracovištích. Při plánování experimentů i statistického hodnocení jsme vycházeli z Doporučení ČSKB Validace a verifikace metod, pro naše účely jsme však zredukovali počet srovnávaných vzorků i způsob jejich zpracování. Navrhli jsme kritéria hodnocení výsledků srovnávacích experimentů nejen z hlediska statistického, ale hlavně z klinického pohledu.

Klíčová slova: porovnatelnost výsledků stanovení, odchylka dvojice výsledků, kritická diference, regrese Passing-Bablok, Bland-Altmanův graf.

SUMMARY

Mikušková A., Beňovská M., Wiewiorka O., Dastych M.: Methodology and results of selected analytes comparison between laboratories of Clinical Biochemistry Department University Hospital Brno

The issue of quantitative methods comparison in clinical laboratory is amply covered by professional journals, monographs and web sources. However, the usually described statistical approaches include one pair of methods results (e.g. the newly introduced and previously used methods in the laboratory). Such studies are not fully applicable when it is necessary to compare the wide spectrum of analytical methods (e.g. the procedures carried out in parallel in several workplaces of large clinical laboratory) due to the large amount of required comparison samples in addition to a usual laboratory operation. We propose a simple and simultaneously satisfactory way of parallel comparison of a wider spectrum of analytical methods.

Keywords: comparison of results analysis, deviation in pair of samples, critical difference, Passing-Bablok regression, Bland-Altman graph.

Úvod

Oddělení klinické biochemie FN Brno je konsolidovaným subjektem tří pracovišť – OKB Pracoviště medicíny dospělého věku (PMDV), Pracoviště dětské medicíny (PDM) a Pracoviště reprodukční medicíny (PRM). Centrální biochemická laboratoř (OKB PMDV) zajišťuje veškerá rutinní, speciální a statimová vyšetření pro potřeby klinik a oddělení FN Brno i jiných zdravotnických zařízení v Brně a celém jihomoravském regionu, laboratoře OKB na obou menších pracovištích zpracovávají pouze vyšetření statimová (v případě OKB PDM dále i některá vysoce speciální vyšetření související s problematikou dětského věku). Rutinní či málo frekventní biochemická vyšetření z obou menších pracovišť jsou zpracovávána na OKB PMDV. Na celém OKB se používá jednotný odběrový systém a převoz vzorků biologického materiálu k laboratornímu vyšetření mezi pracovišti OKB FN Brno je zajišťován pravidelnými svozy.

Vyšetřovací postupy téhož analytu na různých pracovištích OKB jsou maximálně analyticky sjednoceny a prováděny na analytických systémech stejného výrobce (PMDV Cobas 8000, PDM a PRM Cobas

Integra 400; Roche). Je používán i jednotný systém zabezpečování analytické spolehlivosti laboratorních výsledků – systém interní kontroly kvality, externího hodnocení i pravidelných validací/verifikací analytických metod.

U analytů, které jsou v nabídce měření na více pracovištích OKB, je přísně požadována dobrá porovnatelnost výsledků stanovení na různých analytických systémech, která je za daných podmínek zárukou kontinuity výsledků opakovaného laboratorního vyšetření pacienta. Pro analyty, které jsou v nabídce měření na více pracovištích OKB, se proto každoročně provádí porovnávání výsledků měření na základě analýzy sérií vybraných patientských vzorků paralelně na všech pracovištích, která daný parametr vyšetřují.

Materiál a metodika

K problematice srovnávání výsledků kvantitativních metod v klinické laboratoři lze najít množství informací v odborných časopisech, monografiích i na webových zdrojích [1-3].

Pokusili jsme se pro tento účel navrhnout proveditelný a přitom vyhovující způsob souběžného porovnání celého spektra analytických metod prováděných na více pracovištích s ohledem na skutečnost, že všechny používané metody byly již dříve verifikovány a vyšetřovací postupy téhož analytu na různých pracovištích byly maximálně sjednoceny.

Při našich experimentech jsme oproti Doporučení ČSKB [3] zredukovali počet srovnávaných vzorků (ovšem s přísnými požadavky na jejich výběr) a zjednodušili jsme i způsob jejich zpracování.

Pro každý analyt, resp. malou skupinu „spřažených“ analytů (např. ALT + AST, urea + kreatinin, cholesterol + triacylglyceroly + HDL cholesterol) byla vybrána série zpravidla 20 nativních biologických materiálů pacientů, přičemž byl kladen velký důraz na pečlivý výběr vzorků z hlediska vhodných hodnot obsahu analytu tak, aby byl rovnoměrně pokryt rozsah měření (v případě některých analytů se však tento požadavek nepodařilo splnit zcela optimálně z důvodu nedostatku vzorků vhodné koncentrace analytu). Každý vzorek byl rozdělen na 2 až 3 alikvoty (podle počtu pracovišť OKB, která mají daný parametr ve své nabídce) a uložen při -25°C do zkompletování série a do doby analýzy. Pokud docházelo během skladování ke změnám obsahu analytů vlivem jejich nestability, dělo se tak tedy stejnou měrou ve všech alikvotách uloženého vzorku. Pro srovnání společných 36 metod na OKB FN Brno bylo v našich podmínkách postupně zpracováno 27 takovýchto sérií, což představovalo celkem cca 1500 alikvotů.

V určených dnech byly série vzorků pro stanovení požadovaných analytů postupně distribuovány na jednotlivá pracoviště OKB (za dodržení preanalytických podmínek) a paralelně analyzovány na zde používaných analytických systémech. Srovnávací vzorky byly měřeny pouze v singletu, v jedné analytické sérii za běžného provozu analyzátorů jednotlivých laboratoří, tj. během zpracovávání patientských vzorků. Při vyhovujících výsledcích interní kontroly kvality nebyly před analýzou prováděny již žádné další mimořádné kalibrace metod s cílem eliminovat případný menší bias.

Hodnocení shody výsledků

Ke zpracování získaných výsledků srovnávacích analýz byly využity běžné programy Microsoft Excel a MedCalc Statistical Software. Orientační vizuální posouzení shody souborů dat pro každý srovnávaný analyt bylo provedeno na základě jednoduchého bodového grafu získaného vynesemím všech naměřených hodnot proti hodnotám z centrálního pracoviště OKB-PMDV. Normální rozdělení dat bylo prokázáno u 75 % srovnávaných souborů (Kolmogorovův-Smirnovův test).

Dále byly sady výsledků hodnoceny vždy po dvojicích (PMDV-PDM, PMDV-PRM, PDM-PRM), při výběru nástrojů statistického zpracování dat jsme vycházeli z Doporučení ČSKB Validace a verifikace

metod [3]. Pro zjištění závislosti dvojic metod jsme použili neparametrickou regresi Passing-Bablok [4] a systematické difference byly posouzeny na základě Bland-Altmanova diagramu (hodnoty difference metod vyjádřené v % proti průměrům dvojic výsledků obou metod) [5].

Pro každou dvojici metod byl doplněn i Pearsonův korelační koeficient (s plným vědomím všech nevýhod a omezení tohoto parametru při hodnocení dat ze srovnávacích experimentů), který poskytl užitečnou informaci o míře lineární závislosti alespoň tam, kde srovnávané soubory měly normální rozložení dat. V našem případě byla požadována hodnota korelačního koeficientu $\geq 0,95$.

Shoda mezi metodami byla hodnocena podle předem zvolených limitů; požadována byla minimální hodnota proporcionální i konstantní odchylky mezi srovnávanými metodami, tj. nevýrazný rozdíl hodnot směrnice regresní přímky od hodnoty 1,0 (max. 0,90 – 1,10 podle srovnávaného analytu) a minimální úsek na ose y. Vyjádření, zda reálně zjištěné hodnoty představují přijatelnou shodu mezi metodami, není ovšem možné provést pouze na základě statistiky. Pro posouzení limitů shody získaných z Bland-Altmanových rozdílových diagramů byly proto pečlivě zváženy klinické aspekty a byla zvolena následující kritéria:

Odchylky dvojic výsledků (zakreslené v Bland-Altman grafu) by v žádném případě neměly dosahovat hodnoty $2D_{\max}$ (%), tj. dvojnásobku přijatelného rozdílu v % dle SEKK (uvažujeme-li teoretickou možnost, že se výsledky dvou srovnávaných pracovišť odchylojí od správné hodnoty ještě v povolených mezích, ale na opačnou stranu od této hodnoty).

Aby nedocházelo k nesrovnalostem v klinické interpretaci výsledků téhož pacienta vyšetřovaného na jiném pracovišti, odchylky dvojic výsledků by také měly být menší ve srovnání s hodnotou kritické referenční změny RCV (Reference Change Value, tj. rozdílu mezi dvěma následnými měřeními jedince, který lze považovat za významný z hlediska lékařské interpretace) vypočtené na základě analytické nepřesnosti CV_a a intraindividuální variability CV_i . Jako CV_a byly pro výpočet použity dlouhodobé variační koeficienty z interní kontroly kvality vybraného pracoviště, hodnoty CV_i pro jednotlivé analyty byly převzaty z databáze biologické variability [6].

$$RCV = 2,77 (CV_a^2 + CV_i^2)^{1/2}$$

RCV není primárně parametrem pro posouzení srovnatelnosti, nicméně znalost hodnoty RCV může být užitečná při posouzení limitů shody Bland-Altmanových grafů a rozhodnutí, zda tyto limity představují přijatelnou shodu mezi metodami.

Pro hodnocení velikosti odchylky dvojic výsledků byl použit postup ($2D_{\max}$ resp. RCV), který byl pro daný analyt přísnější.

Pozn.: Pro hodnocení těch analytů, pro které SEKK uvádí různé hodnoty D_{\max} pro porovnatelnost ($P D_{\max}$) a pro návaznost ($N D_{\max}$), jsme při hodnocení použili přísnější hodnotu $P D_{\max}$.

Výsledky

Poslední kompletní údaje o shodě metod na pracovištích OKB FN Brno pochází ze srovnávacích měření, která probíhala během druhého pololetí roku 2016.

Způsob vyhodnocení výsledků porovnávacích stanovení sledovaného spektra analytů je demonstrován na jednom konkrétním příkladu – měření aktivity ALT (Tabulka 1, obr. 1; Tabulka 2, obr. 2 a-c, obr. 3 a-c).

Pozn.: Přestože z výsledků regrese Passing-Bablok v tomto případě vyplývá odlišnost směrnic závislos-

tí od hodnoty 1 (z čistě statistického hlediska tedy metody neposkytují identické hodnoty aktivity ALT), dobrá shoda výsledků získaných odlišnými vyšetřovacími postupy z hlediska jejich klinické použitelnosti je zřejmá. Odchyly dvojic výsledků přesahují stanovené limity pouze v jednom případě, kdy byla měřena extrémně nízká hodnota aktivity blíží se mezi stanovitelnosti metody.

Stejným způsobem bylo provedeno vyhodnocení výsledků pro všechny srovnávané analyty.

Table 1: Results of ALT catalytic activity ($\mu\text{kat/L}$) in individual laboratory workplaces (PMDV, PDM, PRM) Department of Clinical Biochemistry, University Hospital Brno

Sample N	ALT catalytic activity ($\mu\text{kat/L}$)		
	PMDV	PDM	PRM
1	12.69	11.50	11.83
2	10.78	10.34	10.81
3	8.27	7.50	7.80
4	4.57	4.34	4.46
5	0.79	0.76	0.79
6	2.52	2.36	2.38
7	2.70	2.53	2.49
8	0.09	0.16	0.14
9	3.06	2.74	2.84
10	5.19	4.84	4.97
11	4.14	3.72	3.90
12	9.03	7.69	8.29
13	11.01	10.85	11.26
14	11.62	11.12	11.40
15	0.84	0.75	0.79
16	13.14	13.09	12.89
17	2.18	2.03	2.05
18	6.88	6.48	6.56
19	6.53	6.05	6.22
20	11.07	10.09	10.50

Table 2: Statistical parameters (ALT) of Passing-Bablok regression for the laboratory workplaces (PMDV, PDM, PRM)

n = 20	PMDV - PDM		PMDV - PRM		PDM - PRM	
Lowest value	0.09	0.16	0.09	0.14	0.16	0.14
Highest value	13.14	13.09	13.14	12.89	13.09	12.89
Average	6.36	5.95	6.36	6.12	5.95	6.12
Median	5.86	5.44	5.86	5.60	5.44	5.60
SD	4.32	4.11	4.32	4.22	4.11	4.22
SD of Average	0.97	0.92	0.97	0.94	0.92	0.94
Linear regression equation	$y = 0.006187 + 0.9322x$		$y = -0.02868 + 0.9573x$		$y = -0.02312 + 1.0325x$	
Intercept A	0.006187		-0.02868		-0.02312	
95% CI	-0.09533 to 0.07852		-0.1192 to 0.05216		-0.07188 to 0.03514	
Slope B	0.9322		0.9573		1.0325	
95% CI	0.9053 to 0.9665		0.9383 to 0.9842		1.0211 to 1.0445	

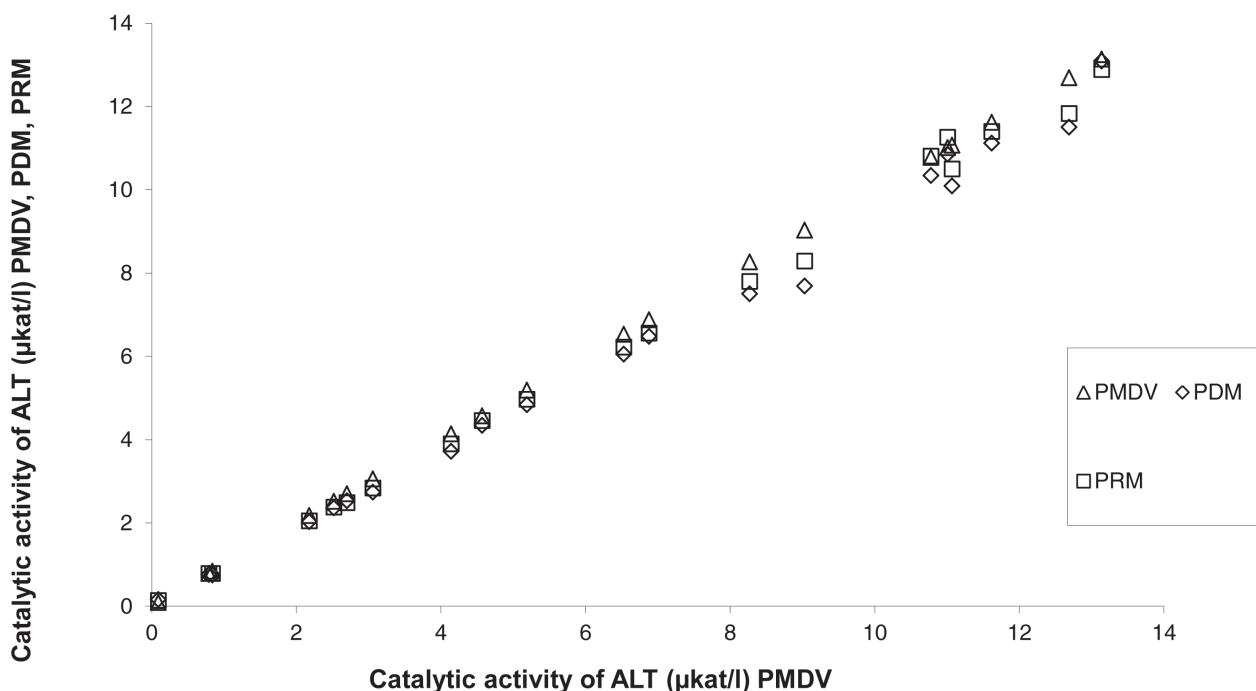


Fig. 1. Correlation graph – correlation of ALT results in Department of Clinical Biochemistry laboratories (PDM and PRM) with the results obtained from PMDV laboratory (triangular markers show ideal correlation). The correlation coefficients are: PMDV-PDM 0.9970; PMDV-PRM 0.9984; PDM-PRM 0.9992

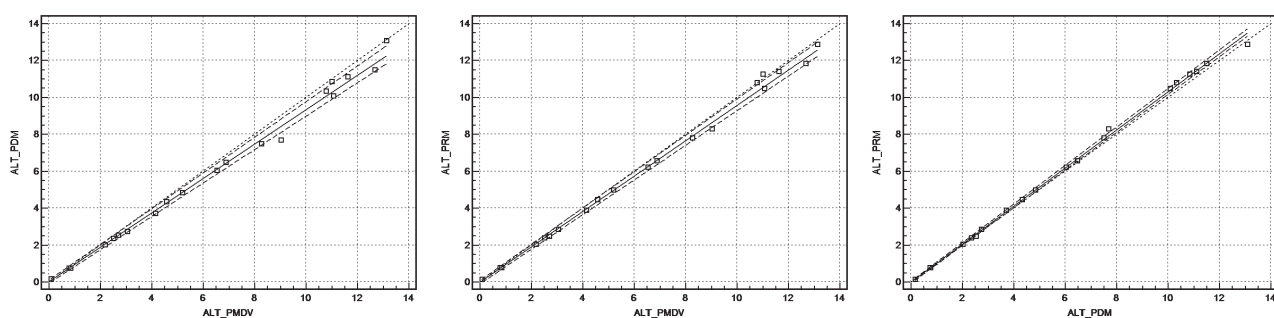


Fig. 2. Graphical interpretation of Passing-Bablok regression for the pairs of results a) PMDV-PDM; b) PMDV-PRM; c) PDM-PRM.

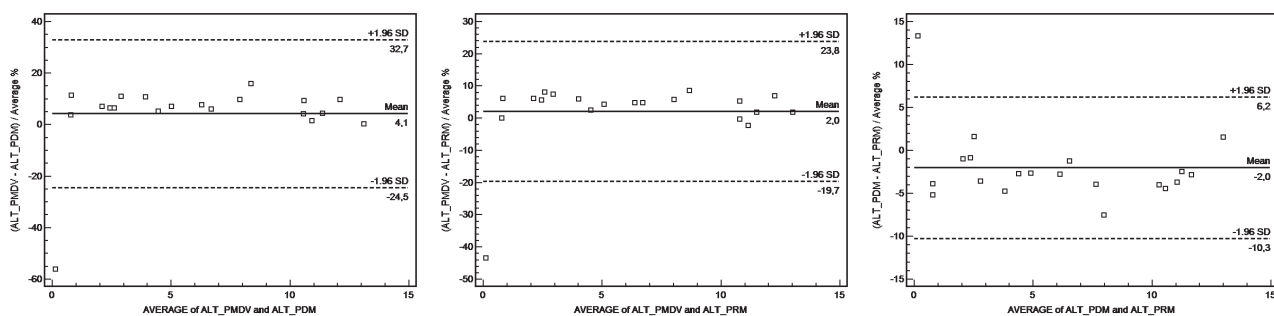


Fig. 3. Bland-Altman graph for the pairs of results a) PMDV-PDM; b) PMDV-PRM; c) PDM-PRM.

Závěr

Srovnávací analýzy prováděné v uvedeném rozsahu umožňují ověřit, že rozdílné vyšetřovací postupy stanovení téže komponenty používané na OKB FN Brno poskytují klinicky nevýznamné rozdíly naměřených hodnot obsahu analytů. Výraznější odchylky jsou pozorovány pouze v těch případech, kdy byly do srovná-

vací série zařazeny i vzorky s velmi nízkými hodnotami obsahu analytů blízcích se mezi stanovitelnosti metod, což se promítlo do hodnot limitů Bland-Altmanových grafů.

Několikaletá zkušenost s prováděním těchto srovnávacích experimentů umožňuje také identifikaci těch analytů, kterým je z hlediska srovnatelnosti nutno věnovat větší pozornost na rozdíl od analytů zcela bez-

problémových. Jedná se hlavně o stanovení analytů s velmi nízkou intraindividuální variabilitou (např. ionty) a také některé močové analyty. V praxi to znamená např. zpřísnění požadavků na interní kontrolu kvality / frekvenci kalibrací s cílem minimalizovat případný bias, případně opakované srovnávací experimenty.

Literatura

1. **Jensen, A. L., Kjølgaard-Hansen, M.** Method comparison in the clinical laboratory. *Vet. Clin. Pathol*, 2006, 35(3), p. 276-285
2. **Westgard, J. O.** Basic method validation, 3rd Edition, *Westgard QC*, 2009. Dostupné z: <https://www.westgard.com/lesson23.htm> [cit. 14.7.2017]
3. **Friedecký, B., Šprongl, L., Kratochvíla, J., Plzák, Z.:** Doporučení ČSKB ČLS JEP Validace averifikace metod (11/2010). *Klin. Biochem. Metab.*, 2011, 19(40), p. 36- 44
4. **Passing, H., Bablok, W.** A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1983, 21, p. 709-720
5. **Altman, D. G., Bland, J. M.** Measurement in medicine: the Analysis of method comparison studies. *The Statistician*, 1983, 32, p.307-317
6. **Ricos, C., Alvarez, V., Cava, F. et al.** Biological variation database & desirable quality specifications: the 2001 update. Dostupné z: <http://www.westgard.com/biodatabase1.htm> [cit.14.7.2017]
7. **Ricos, C., Perich, C., Minchinela, J., Alvarez, V., Simón, M., et al.** Application of biological variation – a review. *Biochemia Medica*, 2009, 19(3), p. 250-259
8. **Plzák, Z., Friedecký, B., Kratochvíla, J.:** Metrologická terminologie v klinické a analytické laboratoři. *SEKK s.r.o. a EURACHEM-ČR*, 2009. Dostupné z: <http://www.sekk.cz/terminologie/index.htm> [28.8.2017]

Do redakce došlo 4. 8. 2017

Adresa pro korespondenci:
Doc. MUDr. Milan Dastych, CSc., MBA
Odd. klinické biochemie
Fakultní nemocnice Brno
Jihlavská 20
625 00 Brno
e-mail: dastych.milan@fnbrno.cz