

378.162.33:542.1:616—074—035—07

KONTROLA VYŠETŘOVACÍCH METOD V KLINICKÝCH BIOCHEMICKÝCH LABORATOŘÍCH

RNDr. J. PRÁCHENSKÁ, pplk. MUDr. K. KOUŘÍLEK, MUDr. V. KYRAL

Oddělení klinických laboratoří Ústřední vojenské nemocnice,
náčelník plk. doc. MUDr. M. Arient, CSc.

Pronikání analytických biochemických metod do klinických laboratoří, rychle se rozvíjejících zejména po druhé světové válce, přineslo s sebou i požadavek účinné kontroly vyšetřovacích postupů k zabezpečení správných a reprodukovatelných výsledků. Při výběru vhodné metody je nutno dbát, aby byla pokud možno co nejvíce specifická pro vyšetřovanou látku, dávala správné a přesné výsledky, byla dostatečně rychle proveditelná a dostatečně citlivá. Zaručení správnosti výsledku, to znamená, jak se nalezený výsledek blíží pravé hodnotě, je záležitost spíše analytická, daná právě volbou a prověřením metody za použití reagensů vyhovující čistoty a prověřením vhodných podmínek měření na dostatečně citlivém přístroji. Kontrolou standardním roztokem nebo jeho přidavkem k vyšetřovanému séru jako tzv. „recovery“ mů-

žeme zachytit i některou složku chyby v této oblasti. Přesností metody rozumíme reprodukovatelnost a prokazujeme ji opakovaným kontrolním vyšetřením stejných vzorků.

Chyby, se kterými se setkáváme v laboratoři, jsou náhodné, soustavné a hrubé. Náhodných chyb může být v celém metodickém postupu více a předpokládá se, že se většinou navzájem ruší, takže se neprojeví. Soustavné chyby spočívají např. ve špatném nastavení slepé zkoušky, při použití chemikálií nedostatečné čistoty apod. Vyskytují se při provádění metodik konstantně a je nutno se jich vyvarovat. Hrubé chyby jsou zvláště závažné a jsou způsobeny omylem nebo nepozorností pracovníků.

Podle charakteru analyzované látky možno rozdělit vyšetřovací metody do tří skupin: na prvním místě jsou to metody chemické, jimiž

prokazujeme hledanou látku jako chemické individuum, dále metody chemické určující produkty enzymatických reakcí a konečně metody uzanční, kdy princip nebo produkt proběhlé chemické reakce nelze mnohdy dostatečně dobře definovat.

Mezi metody první skupiny patří např. stanovení glukózy, sodíku, draslíku, chloridů, vápníku, anorganického fosforu, hořčíku, nebílkovinného dusíku, kreatininu aj. Lze je vhodně kontrolovat např. směsným krystaloidním standardem podle Štěpánové [22], který vyhovuje lépe než roztoky jednoduché s jednou chemikálií. Sami ho používáme v různých úpravách několik let a máme s ním dobré zkušenosti. Kontrola metod druhé a třetí skupiny není již tak snadná a spolehlivá. Opakovaným vyšetřením téhož vzorku ověříme pouze reprodukovatelnost metody, nikoli však její správnost.

Systém kontroly biochemických metodik využívá od samého začátku tří hlavních směrů:

1. Kontrola výsledků analýz pomocí chemického standardu, tj. kalibračními standardními roztoky nebo směsným krystaloidním standardem, který obsahuje chemické látky v podobném zastoupení jako v krevním séru, ovšem bez bílkoviny.
2. Kontrola tzv. biologickým standardem. Zde se používá zmrazená či lyofilizovaná směs lidských sér s ověřenými hodnotami vyšetřovaných látek, event. ještě obohacená např. glukózou, bilirubinem, krystalickými enzymy aj. Podobně je možno použít i sérum zvířecí, např. koňské nebo králičí. Nejmodernějším prostředkem je komerčně vyráběné standardní sérum, expedované pod různými názvy, jako např. Labtrol, Pathotrol, Versatol, Reprotest aj.
3. Různé způsoby statistického hodnocení výsledků biochemických vyšetření.

Uvedeme příklady některých důležitých nebo zajímavých prací, které jsme vybrali z dostupné literatury. Chceme tak upozornit na různá zaměření a způsoby kontrolní činnosti, jejíž nezbytnost vede v poslední době až k vypracování celých systémů kontroly a k tovární přípravě standardů. V řadě prací je provedeno porovnání mnoha pracovišť a metod jimi používaných, jinde je věnována pozornost normálním hodnotám v laboratoři, užitečnosti používaných chemických standardů nebo významu statistické kontroly, která je zvláště výhodná při práci s autoanalyzátory.

Z prvních publikací, které se zabývají touto tematikou, sluší jmenovat práci Belka a Sundermana [2] z r. 1947, kteří využili zkušeností z chemického válečného průmyslu a použili statistického hodnocení v klinicko-biochemické laboratoři. Průkopnickým dílem kontroly práce v laboratoři je práce Leveye a Jenningse [13],

kterí poprvé použili směsi sér jako provozních standardů. V posledních letech je již popsána ve světové literatuře řada prací, které přinášejí další zkušenosti a zdůrazňují nutnost a soustavnost kontroly práce v laboratoři.

Bodansky [4] si ve své práci o diagnostické biochemii a klinické medicíně všímá rezervovanosti kliniků k laboratorním výsledkům. Rozebírá otázku rozdílných výsledků stejných analýz provedených v různých laboratořích, příčin možných chyb uvnitř laboratoří i různých způsobů jejich odstranění. Za důležitou považuje otázku spolupráce klinika s biochemikem, zvláště při nesrovnalostech mezi diagnózou a laboratorními nálezy. O chemické a diagnostické specifitě laboratorních testů pojednává rozsáhlá práce Carawayova [6] z r. 1962 s téměř 200 literárními odkazy. Rozebírá v ní velmi podrobně problematiku ovlivnění laboratorního výsledku takovými faktory, jako je hemolýza, lipémie, terapie zvláště antikoagulačními léky, vliv světla, žlučových barviv a celé řady dalších látek.

O vývoji klinických laboratoří v Anglii pojednává práce A. Jordana [12]. Autor rozlišuje dvě etapy: období do konce druhé světové války a období poválečné. Zvláště si všímá srovnatelnosti výsledků mezi různými laboratořemi a doporučuje pracovat na této problematice co nejintenzivněji. Podle jeho názoru vyžaduje práce v klinicko-biochemické laboratoři dva druhy kontroly. Takovou, která umožňuje srovnání výsledků s jinými pracovišti, a každodenní kontrolu, která upozorní okamžitě na chybu v sériích vyšetřovaného biologického materiálu (možno použít např. i sterilní koňské sérum).

V r. 1963 publikoval Tonks [25] výsledky a zkušenosti z kontrolní referenční činnosti v kanadských laboratořích. Lyofilizované vzorky dvou různých směsí sér (komerčně připravené Versatol a Versatol A) zaslal 200 pracovištím ke stanovení celkového cholesterolu, sodíku, chloridů, glukózy, nebílkovinného dusíku nebo dusíku močoviny, anorganického fosforu a celkové bílkoviny. Cílem této vyhodnocovací studie bylo posoudit, zda tyto laboratoře jako skupina pracují dobře, upozornit na případné hrubé chyby a pomoci vyhodnotit jednotlivým laboratořím jejich výsledky. Zjištěné hodnoty zaslalo 170 laboratoří. Výsledky průzkumu znázornil Tonks pomocí tabulek, rozptylových diagramů a map četnosti. V řadě laboratoří tak byla zjištěna nedostatečná správnost a přesnost udávaných výsledků. Autor navrhl a použil pro povolené meze chyby vzorec

$$+ - \frac{1/4 \text{ normálního rozmezí}}{\text{střed norm. rozmezí}} \times 100$$

Vycházel z předpokladu, že $1/4$ normálního rozmezí lomena středem normálního rozmezí dá, vyjádřeno v %, vhodné pásmo pro výsledek, který lze označit jako vyhovující. Např. u sodíku při rozmezí 135-145 mE/l vychází $+ - 1,8 \%$. U ostatních vyšetření byly povolené meze stanoveny vzhledem k normálním hodnotám takto:

pro chloridy + — 2 %, celkovou bílkovinu + — 7 %, glukózu [celkové redukující látky], anorganický fosfor, nebílkovinný dusík, dusík močoviny a cholesterol + — 10 %. Z 3762 zaslaných výsledků bylo přes 40 % hodnot mimo povolené meze chyb a byly hodnoceny jako klinicky nepoužitelné. Závěry tohoto průzkumu tedy přesvědčivě podpořily požadavek vypracovat systém účinné kontroly práce v laboratořích tohoto typu.

Hoffmann a Waidová [9] popsali kontrolní postup známý jako „number plus method“, který spočívá na statistickém zhodnocení velkého počtu — několika set laboratorních výsledků. Přes četné kritiky je tato metoda stále v různých modifikacích používána [8, 15, 20, 27]. Ke kontrole využívá výsledků analýz prováděných v laboratoři. Grafickým znázorněním rozložení četnosti stejných hodnot je Gaussova křivka. Autoři zdůrazňují přednost této metody proti referenčnímu vzorku, který neprochází všemi stupni manipulace od odběru biologického materiálu až po jeho konečné zpracování. Zkušenost ukazuje, že je to pro většinu metodických postupů citlivý kontrolní ukazatel.

Statistická kontrola je nejvhodnější při zpracování velkých sérií vzorků, zejména při práci s autoanalyzátory, kdy je nutno kontrolovat i dílčí operace celého systému, aby se vyloučila možnost hromadných chyb. Jinak se jí používá ke zpracování laboratorních údajů za delší časové údobí. Mohelský a Štěpánová [15] vypracovali v r. 1967 na základě prací Hoffmana a Waidové [10] a van Peenena a Lindberga [27] grafickou metodu stanovení normálních biochemických hodnot. Za delší období — asi 3 měsíce — kdy se nemění kalibrace, zhodnotíme výsledky zvolené vyšetřovací metody. Do grafu vyneseme četnosti jednotlivých hodnot a obkreslíme Gaussovu křivku. Normální hodnoty jsou pouze v rozsahu této křivky. Z jejího vrcholu spustíme kolmici, která znamená střední normální hodnotu. Tento způsob však není vhodný pro všechny metody. Neosvědčil se např. u glykémie, která je vyšetřována cíleně, převážně u diabetiků, a nezahrnuje tak dostatečnou převahu normálního souboru (nepravidelnost křivky — dva vrcholy).

Skoro všechna laboratorní vyšetření jsou založena na několika dílčích pochodech, z nichž každý může být zatížen nahodilou chybou (např. odběr materiálu, pipetovací chyba, chyba fotometru atd.). Pro kontrolu metod a zpřesnění jejich výsledků je užitečné znát velikost jednotlivých složek celkové chyby metody. Büttner [5] udává, že dílčí složky celkové chyby klinicko-chemických analýz mohou být určeny několikanásobnou variační analýzou na vhodně plánovaných pokusech. Jejich grafické znázornění provedl pomocí Gaussových křivek a stejně vyjádřil i celkovou chybu analýzy.

Zajímavá je práce Plymové [16], jejímž účelem bylo srovnání koeficientů variace (míry přesnosti) při různých koncentracích 14 sledo-

vaných látek v krevním séru. Je totiž známo, že absolutní hodnota směrodatné odchylky se může lišit při různých koncentracích složek. Podobně tomu může být i u konficientu variace:

$$\left(\frac{\text{směrodatná odchylka}}{\text{průměr}} \times 100 \right).$$

Autorka provedla srovnání na vzorcích hovězího séra o známých nízkých a vysokých hodnotách zkoumaných látek. Zjistila, že nejsou statisticky významné rozdíly při různých aktivitách alkalické fosfatázy, různých koncentracích chloridů, cholesterolu, glukózy a sodíku. Pro tyto látky stačí tedy jedno kontrolní sérum. Naproti tomu u vápníku, kreatininu, fosforu, draslíku, celkové bílkoviny, transaminázy kyseliny glutamové-oxalocetové, dusíku močoviny a kyseliny močové zjistila signifikantní rozdíly. Je tedy nutno připravovat pro tyto metody alespoň dvě kontrolní séra, jedno pro nízké a jedno pro vysoké koncentrace.

Závažné chyby při stanovení sodíku, draslíku a chloridů v normálních a patologických sérech vyšetřovaných paralelně na čtyřech různých pracovištích (univerzitní výzkumná laboratoř a 3 nemocnice) popisuje Thompson a Jones [24]. Zjistili velké rozptyly u zdravých i nemocných a četná normální séra byla posuzována jako patologická a opačně. Značné rozdíly pozorovali i mezi normály, které jednotlivé laboratoře používaly k hodnocení výsledků.

Sparapani a Berry [19] uvádějí vlastní způsob přípravy standardního směsného séra. Zbylá séra slévají a skladují při -30°C až do množství asi 2 litrů. Pak je důkladně promíchají, odstředí a supernatant rozplní po 15 ml do speciálních zkumavek s uzávěrem. Ty skladují opět při -30°C . Zjistili, že takto připravené směsné vzorky jsou si obsahově velmi podobné, a proto koncentrace některých látek dále upravují. Některou sérii např. demineralizují na iontoměničích, jinou deproteinují a přivažují čisté chemikálie. Takto získají série rozličných vzorků, u nichž provedou ověřovací analýzy, stanoví průměry jednotlivých chemických látek a standardní odchylky. Potom je zařazují do provozu jako neznámé kontrolní vzorky. Používání směsného séra připraveného v laboratoři udávají i jiní autoři [3, 18, 21]. Světový trend však směřuje ke stále širšímu používání komerčních přípravků, s nimiž je mnoho dobrých zkušeností.

Při zavádění kontrolních referenčních preparátů, ať už připravovaných některým z uvedených postupů v laboratoři nebo komerčních přípravků, vyvstávají dva důležité problémy. Jsou to stabilita roztoku, resp. látek v něm obsažených a standardizace jejich přípravy. Tak např. Hanok a Kuo [11] publikovali v r. 1968 práci o stabilitě rozpuštěného lyofilizovaného séra fy Hyland. Sérum skladovali v lednici při teplotě $+10^{\circ}\text{C}$ a v mrazicím boxu při -15° a v určitých časových intervalech v něm sledovali koncentrace sodíku, draslíku, chloridů, vápníku, glukózy, kyseliny močové, fosforu, bilirubinu,

kreatininu, dusíku močoviny, celkové bílkoviny, albuminů a aktivitu alkalické fosfatázy a transaminázy GOT. Zjistili, že při skladování po dobu tří týdnů při -15°C se koncentrace těchto parametrů nemění. Při uchovávání v prostředí $+10^{\circ}\text{C}$ se však doba použitelnosti zkrátila na pět dnů. Lyofilizované preparáty vydrží samozřejmě při správném skladování daleko větší dobu, dva roky i více. Logan a Allen [14] vyzkoušeli 17 různých komerčních kontrolních sér od 6 výrobců a potvrdili jejich použitelnost i po dlouhodobém skladování.

Problematikou mezinárodní standardizace metod pomocí komerčních preparátů se zabývá Bakos a Rex-Kiss [1]. Autoři provedli řadu srovnávacích stanovení mezinárodně prodávajících standardních preparátů fy Asal (Berlín) a fy Dade, Miami (USA). Získali poměrně velmi shodné výsledky a doporučují je alespoň k občasné kontrole.

Otázkou standardu v klinické biochemii se zabývá Radin [17], který na příkladech uvádí kritéria pojmu standard. Kriticky se vyjadřuje k některým komerčním preparátům, jež bývají ne plným právem nazývány standardy.

Moderně prováděná kontrola má vypracovanou celou řadu doporučovaných systémů. Např. Sax, Dorman a Libenson [18] zařazují ve své laboratoři denně tři typy kontrolních sér: lidské směsné sérum, obohacené králičí sérum a tajné doublety vybrané z analyzovaných sér.

Kontrolu Versatolem a jinými komerčními preparáty se záznamem počítače na děrovaných štítcích popisují Conn, Best, Anido a Crain [7]. Nejdříve zjišťují základní data — průměr, směrodatnou odchylku a koeficient variace — z 10krát vyšetřeného vzorku. Ten pak denně zařazují do práce a vždy jednou za měsíc srovnávají jednotlivé údaje s dříve zjištěnými parametry. Nalezené výsledky zhodnotí statisticky pomocí g a F testu. Do výpočtu berou jen analýzy, které leží v rozmezí tří směrodatných odchylek. Na jiný štítek vynášejí celkový počet analýz a procento chybných výsledků. Takto za určitou dobu, nejčastěji 1 měsíc, hodnotí i kvalitu používaných továrních přípravků. Denní výsledky eviduje pověřený pracovník laboratoře. Zhodnocení na samočinném počítači je prováděno každý měsíc a celkově 1krát za rok. Těchto statistických metod se užívá často i při použití průtokových systémů autoanalyzátorů, jak je např. popisují Thiers a Oglesby [23].

Pozornost zasluhuje systém kontroly navržený Tonksem [26] v r. 1968. Autor má zavedenu v laboratoři dvojí kontrolu. Každý laborant zpracuje nejméně jednou denně s určitou sérií vyšetření vzorek standardu a známého směsného séra a navíc dostane od provozního chemika nebo vedoucího laboratoře neznámý vzorek. Z grafického znázornění obou způsobů je zřejmé, jsou-li výsledky dané metody v přípustných mezích.

Kontrola spolehlivosti výsledků klinickobiochemického vyšetřování je důležitou součástí

každodenní práce laboratoře. S ohledem na zkušenosti našeho pracoviště v referenční činnosti a v souhlase se světovým trendem můžeme doporučit podobný systém kontroly, jaký ve své práci podrobně probírá a zdůvodňuje Tonks [26]. Prakticky to znamená kontrolu všech metodik standardem při jejich zpracování v sérii. To není nic neobvyklého a běžně se na většině našich pracovišť provádí. Ne všude je však zvykem další současná kontrola zařazením vzorku zmrazeného nebo lyofilizovaného směsného séra lidského nebo koňského. Komerční preparáty lyofilizovaného séra by byly samozřejmě daleko výhodnější. Byla by tak zajištěna každodenní kontrola metodik již samotnými středními zdravotnickými pracovníky. Ze zahraničních přípravků se zdá nejvhodnější Versatol, jehož používání je ve světě velmi rozšířeno. Tento způsob kontroly se stává velmi objektivní a nutný hlavně při nové organizaci práce, jak se v současné době v souladu se zkušenostmi ze zahraničí zavádí na našich předních pracovištích (centrální rozpípetování biologického materiálu, poloautomatické nebo automatické dávkování činidel, měření na přístrojích s průtočnými kvyetami event. i s automatickým vyčíslením hodnot apod.).

Je na uvážení a možnostech vedoucích pracovníků, jak si kontrolu metod v laboratoři zařídí. Ve vojenské zdravotnické službě převzalo úlohu referenční laboratoře oddělení klinických laboratoří ÚVN. Občasná kontrola však nestačí. Spolehlivost výsledků laboratoře musí zaručovat dobře propracovaný systém několikanásobné kontroly.

Souhrn

Autoři uvádějí přehled literatury o možnostech kontroly biochemických metodik, chemické a diagnostické specifitě laboratorních testů a zdrojích některých chyb. Na základě vlastních zkušeností doporučují dvoustupňový systém kontroly spolehlivosti výsledků.

Literatura

1. Bakos, G., Rex-Kiss, B.: Vergleichende Untersuchungen an Labor-Standarden. *Ärztl. Lab.*, 11, 1965, 15-20.
2. Belk, W.P., Sunderman, F. W.: Survey of accuracy of Chemical analyses in clinical laboratories. *Amer. J. clin. Path.*, 17, 1947, 853-861.
3. Berry, R.: A comparative study of laboratory performance using frozen serum unknowns. *Amer. J. clin. Path.*, 46, 1966, 193-197.
4. Bodansky, O.: Diagnostic biochemistry and clinical medicine. Facts and fallacies. *Clin. Chem.*, 9, 1963, 1-18.
5. Büttner, H.: Fehleruntersuchungen bei klinisch — chemischen Analysen. *Z. klin. Chem.*, 3, 1965, 69-74.
6. Caraway, W. T.: Chemical and diagnostic specificity of laboratory tests. *Amer. J. clin. Path.*, 37, 1962, 445-464.
7. Conn, R. B., Best, M. L., Anido, V., Crain, F. D.: Computer analysis of quality control data. *Amer. J. clin. Path.*, 48, 1967, 447-452.
8. Frankel, S., Ahlvin, R. C.: An evaluation the number plus method of quality control. *Amer. J. clin. Path.*, 48, 1967, 248-250.

9. Hoffmann, R., Waid, M.: The number plus method of quality control of laboratory accuracy. Amer. J. clin. Path., 40, 1963, 263-269.
10. Hoffmann, R., Waid, M.: The „Average of normals“ method of quality control. Amer. J. clin. Path., 43, 1965, 134-141.
11. Hanok, A., Kuo, J.: The stability of a reconstituted serum for the assay of fifteen chemical constituents. Clin. Chem., 14, 1968, 58-69.
12. Jordan, A.: The development of clinical pathology. J. clin. Path., 18, 1965, 274-276.
13. Levey, S., Jennings, E. R.: Use of control charts in clinical laboratory. Amer. J. clin. Path., 20, 1950, 1059-1066.
14. Logan, E., Allen, R.: Control serum preparations. Clin. Chem., 14, 1968, 437-448.
15. Mohelský, V., Štěpánová, I.: O grafické metodě stanovení normálních biochemických hodnot. Vnitř. lék., 13, 1967, 265-269.
16. Plym, A.: Multiple concentration of constituents in a quality control program. Am. J. Med. Technol., 31, 1965, 95-102.
17. Radin, N.: What is a standard? Clin. Chem., 13, 1967, 55-76.
18. Sax, S., Dorman, L., Libenson, D.: Design and operation of an expanded system of quality control. Clin. Chem., 13, 1967, 825-833.
19. Sparapani, A., Berry, R. E.: Pools of frozen serum in the quality control in clinical chemistry. Amer. J. clin. Path., 42, 1964, 129-132.
20. Sparapani, A., Berry, R. E.: The range of normal values in the quality control of clinical chemistry. Amer. J. clin. Path., 42, 1964, 133-136.
21. Stramufford, J. V., Copeland, B. E.: Clinical chemistry quality control values in thirty three university medical school hospitals. Amer. J. clin. Path., 44, 1965, 252-258.
22. Štěpánová, I.: Kontrola spolehlivosti vyšetření zdravotnického zařízení v ústřední laboratoři. Prakt. lék., 18, 1963, 25.
23. Thiers, R., Oglesby, K.: The precision, accuracy and inherent errors of automatic continuous flow methods. Clin. Chem., 10, 1964, 246-257.
24. Thompson, G., Jones, E.: Errors in the measurement of serum electrolytes. J. clin. Path., 18, 1965, 443-445.
25. Tonks, D.: A study of the accuracy and precision of clinical chemistry determinations in 170 canadian laboratories. Clin. Chem., 9, 1963, 217-233.
26. Tonks, D.: A quality control program for quantitative clinical chemistry estimations. Canad. J. med. Technol., 30, 1968, 38-54.
27. van Peenen, H., Lindberg, D.: The limitation of laboratory control with reference to the „number plus“ method. Amer. J. clin. Path., 44, 1965, 332-330.