



# LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

Slovak Society of Clinical Biochemistry  
Časopis pre pracovníkov diagnostických laboratórií

Číslo 1-2/2009

Ročník XIV.



LABKVALITA 09 –  
SÚHRNY A IN EXTENZO ČLÁNKY

PORUCHY METABOLIZMU  
VITAMÍNU D

BIOCHEMICKÉ VYŠETRENIA  
V NEUROLÓGII

# Ako zabezpečiť bezproblémovú prevádzku laboratória?



**Ak ide o rýchlosť a presnosť, nikto vám nedokáže poskytnúť lepšie nástroje.**

Siemens Healthcare Diagnostics veľmi dobre chápe neustály tlak na zefektívňovanie pracovných postupov, rýchlejšie poskytovanie výsledkov a elimináciu chýb. Naše pokročilé testovacie systémy, IT konektivita a automatizačné riešenia vám umožnia pracovať efektívnejšie tak, aby ste lekárom mohli poskytovať informácie, ktoré nevyhnutne potrebujú pre zabezpečenie lepšej starostlivosti o pacienta. Začnite už dnes:

[www.siemens.com/diagnostics-streamline](http://www.siemens.com/diagnostics-streamline)

**Answers for life.**

**SIEMENS**

# Riešenie s UniCel AutoMate 800 zvýši efektivitu Vášho laboratória



## **AUTOMATIZÁCIA PREANALYTICKEJ FÁZY DO VÁŠHO LABORÁTORIA**

Systém UniCel AutoMate 800 je plne automatická linka, ktorá zahŕňa všetky kroky preanalytickej fázy v laboratóriu, ako odstreďovanie vzorky, alikvotácia do sekundárnych skúmaviek a triedenie skúmaviek do sektorov a stojanov podľa následného použitia pre biochemické, imunochémické a iné vyšetrenia.

### **VÝHODY AUTOMATE 800**

- spracovanie skúmaviek rôznych veľkostí a priemerov
- vstupné a výstupné stojany so vzorkami sa vkladajú a vyberajú za chodu linky
- vyhradené pozície pre statimové vzorky
- efektívna alikvotácia, ktorá zabezpečí optimálnu prípravu alikvótov
- jednoduché nastavenie režimu spracovania vzoriek
- minimálne požiadavky na údržbu

### **PRE VIAC INFORMÁCIÍ KONTAKTUJTE PRODUKTOVÝCH ŠPECIALISTOV:**

Ing. Miroslav Bischof, e-mail: [mbischof@beckmancoulter.com](mailto:mbischof@beckmancoulter.com),  
tel: 00420 605 200 149

Ing. Lukáš Palivec, e-mail: [lpalivec@beckmancoulter.com](mailto:lpalivec@beckmancoulter.com),  
tel: 00420 603 538 361

alebo navštívte stránky [www.beckmancoulter.com/automate800\\_eu](http://www.beckmancoulter.com/automate800_eu)

**cobas<sup>®</sup>**

*Life needs answers*



# **cobas<sup>®</sup> 6000 – rodina analyzátorov**

Flexibilita, na ktorej môžete stavať

Roche Slovensko, s.r.o.  
Diagnostics Division  
Lazaretská 12  
811 08 Bratislava 1  
[www.roche.sk](http://www.roche.sk)





# LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

Slovak Society of Clinical Biochemistry

Časopis pre pracovníkov diagnostických laboratórií

**Číslo 1–2/2009**

Ročník XIV.

## PRESEDA REDAKČNEJ RADY

Katarína Daňová

## VÝKONNÝ REDAKTOR

Oliver Rác

## ODBORNÝ REDAKTOR

Ján Mocák

## REDAKČNÁ RADA

Anna Stecová, bývalá predsedkyňa redakčnej rady

Ján Balla, bývalý výkonný redaktor

Pavol Blažíček, bývalý výkonný redaktor

Roman Alberty

Peter Božek

Ladislav Cebecauer

Jozef Čársky

Ivan Čižmár

Michal Farkaš

Drahoslav Gábor

Ján Lepej

Tomáš Lipšic

Vladimír Kohút

Peter Kubisz

Ivan Pecháň

Hedviga Pivovarníková

Viera Spustová

Dagmar Syrová

Katarína Šebeková

Helena Šeboková

Ivana Šidlíková

Božena Švecová

Rastislav Valko

Juraj Volmut

Vydáva Slovenská spoločnosť klinickej biochémie pre SLS

Povolené Ministerstvom Kultúry SR pod reg. č. 1531/96

ISSN 1335-2644

# OBSAH

## LABKVALITA – SÚHRNY

<b>Národný register zdravotných výkonov v klinickej biochémií. Verzia 3</b> .....	7
<i>Ján Balla, Drahoslav Gábor, Katarína Schmidtová</i>	
<b>Firemný Middleware ako nástroj pre riadenie internej kontroly kvality</b> .....	8
<i>Miroslav Bischof, Beckman Coulter</i>	
<b>Point-of-Care Testing (POCT): A laboratory testing performed at the patient's bedside at a distance from the central laboratory near patient at bedside</b> .....	9
<i>Pavel Blažiček</i>	
<b>Traceability as a mean to obtain worldwide useful reference intervals in clinical enzymology</b> .....	10
<i>Ferruccio Ceriotti</i>	
<b>Srdeční troponiny 2009: diagnostika, stratifikace rizika, optimalizace léčby</b> .....	10
<i>Miroslav Engliš</i>	
<b>POCT – možnosti kontroly kvality a aplikace six sigma</b> .....	11
<i>Jakub Hejsek</i>	
<b>Field Safety Corrective Action – FSCA – korektívne opatrenia, dôležitý zdroj informácií pre užívateľa</b> .....	11
<i>Peter Jeník, Peter Znášik</i>	
<b>Labquality's EQA challenges in different client groups</b> .....	12
<i>Mauri Keinanen</i>	
<b>Novorodenecký skrining cystickej fibrózy na Slovensku</b> .....	13
<i>Mária Knapková, Svetozár Dluholucký</i>	
<b>Prokalcitonín – možnosti jeho využitia v praxi</b> .....	14
<i>Erika Kollárová, Eva Janoková, Dušan Drozda</i>	
<b>Prístup zdravotných poisovní k medicínskym laboratóriam v podmienkach ekonomickej krízy</b> .....	15
<i>Eduard Kováč</i>	
<b>Externí hodnocení kvality biochemických markerů srdečního poškození</b> .....	16
<i>Josef Kratochvíla, Bedřich Friedecký, Marek Budina</i>	
<b>EQA of biochemical markers for myocardial damage</b> .....	17
<i>Josef Kratochvíla, Bedřich Friedecký, Marek Budina</i>	
<b>Metrologická návaznosť kalibrácie a její problémy</b> .....	18
<i>Josef Kratochvíla, Bedřich Friedecký, Marek Budina</i>	

<b>Metrological traceability of calibration and related problems</b> .....	19
<i>Josef Kratochvíla, Bedřich Friedecký, Marek Budina</i>	
<b>Challenges in External Quality Assurance; laboratory focus and the new accreditation standard (ISO 17043) of providers</b> .....	20
<i>Loikkanen, M. M.</i>	
<b>Why EQALM?</b> .....	21
<i>Gunnar Nordin</i>	
<b>What do we learn from the Nordic Reference Intervals Project (NORIP)</b> .....	21
<i>Gunnar Nordin</i>	
<b>www. labtestsonline.cz a jeho význam pro pacienta i pro pracovníky ve zdravotnictví</b> .....	22
<i>Lenka Nováková</i>	
<b>Common Reference Interval Concept. A need to differentiate between reference intervals and decision limits</b> .....	24
<i>Per Hyltoft Petersen</i>	
<b>Monitoring of healthy and patients</b> .....	24
<i>Per Hyltoft Petersen</i>	
<b>Kyselina listová – možný škodlivý účinek vysokých dávek vo vyššom veku</b> .....	25
<i>Oliver Rácz, Eva Sedláková</i>	
<i>Eva Lovásová, Jaroslava Nováková</i>	
<b>Laboratorne ukazovatele obličkového ochorenia</b> .....	25
<i>Anna Stecová, Zita Belicová, Peter Kilián</i>	
<b>C – reaktivny proteín v praxi všeobecného lekára pre deti a dorast</b> .....	26
<i>Katarína Šimovičová</i>	
<b>Současné technologie a možnosti zajištění jakosti POCT</b> .....	27
<i>Luděk Šprongl</i>	
<b>Firma Abbott Laboratories – nové perspektivy diagnostiky a vzdělávání pracovníků laboratorí</b> .....	27
<i>Jan Trbušek</i>	
<b>POCT u pediatrických pacientov v intenzívnej starostlivosti</b> .....	28
<i>Alena Vasilenková, Dagmar Syrová, Darina Behúlová, Jozef Ponec, Pavol Kunovský</i>	
<b>POCT: jeho možnosti a nedostatky</b> .....	29
<i>Tomáš Zima, Petr Štern</i>	

---

**IN EXTENZO – LABKVALITA – ČLÁNKY**

---

<b>ERNDIM – systém externého hodnotenia kvality biochemickej diagnostiky dedičných metabolických porúch</b> .....	33
<i>Darina Behúlová, Anna Šalingová, Jozefína Škodová, Darina Holešová, Jozef Ponec, Jana Perečková, Claudia Šebová, Mária Ostrožlíková</i>	
<b>Reference intervals: the way forward</b> .....	39
<i>Ferruccio Ceriotti, Rolf Hinzmann, Mauro Panteghini</i>	
<b>Reference values: from philosophy to a tool for laboratory medicine</b> .....	51
<i>Joseph Henny, Per Hyltoft Petersen</i>	
<b>Biological variation of thyroid autoantibodies and thyroglobulin</b> .....	57
<i>Esther Jensen, Per Hyltoft Petersen, Ole Blaabjerg, Laszlo Hegedüs</i>	
<b>Význam kvality v laboratóriu pre nový trend prediktívnej, preventívnej a personalizovanej medicíny</b> .....	65
<i>Marko Kapalla, Dagmar Kapallová</i>	
<b>Aktuálne problémy reštrukturalizácie laboratórnej diagnostiky</b> .....	67
<i>Gustáv Kováč, Katarína Rumanová, Peter Lednický</i>	
<b>Referenčné hodnoty u patologických stavov: problematika interpretačných stratégií laboratórneho nálezu</b> .....	71
<i>Gustáv Kováč, Anna Porubenová</i>	
<b>Manažment POCT vo FN Ostrava-Poruba</b> .....	74
<i>Alena Krnáčová</i>	
<b>Ako nás vidia tí druhí, alebo čo sa dozvieme, ak sa opýtame</b> .....	76
<i>Ján Lepej, Katarína Lepejová</i>	
<b>Analýza oligoklonálnych pásov v cerebrospinálnom likvore u pacientov so suspektnou sklerózou multiplex</b> .....	83
<i>Marta Ondrkalová, Terézia Kalnovičová, Petra Jenkrichová, Peter Turčáni</i>	
<b>Metrologická nadväznosť chemických a biochemických meraní</b> .....	88
<i>Viliam Pätoprstý</i>	

<b>Graphical interpretation of confidence curves in rankit plots</b> .....	96
<i>Per Hyltoft Petersen, Ole Blaabjerg, Marianne Andersen, Lone G. M. Jørgensen, Karoline Schousboe, Esther Jensen</i>	

<b>Niektoré požiadavky ISO 15189 a rutinná prax v medicínskych laboratóriách</b> .....	106
<i>Eubomír Špaček</i>	

<b>Praktické využití metodologie six sigma v klinické laboratoři</b> .....	109
<i>Luděk Šprongl</i>	

---

**IN EXTENZO – PŮVODNÉ PRÁCE**

---

<b>Stanovenie 25(OH)-vitamínu D<sub>3</sub> metódou HPLC a elektrochemiluminiscenčnou (ECL) metódou</b> .....	117
<i>Edita Dobáková, Eva Bátorová, Anna Stecová, Peter Kilián</i>	

<b>Koncentrácie vitamínu D u premenopauzálnych žien na slovensku</b> .....	121
<i>Anna Stecová, Eva Bátorová, Juraj Payer, Zdenko Killinger, Peter Kilián, Edita Dobáková, Zlatica Kmečová, Pavol Masaryk, Viera Spustová, Soňa Tomková, Peter Vaňuga</i>	

<b>Kyselina močová a jej úloha v patogenéze sklerózy mlutiplex</b> .....	126
<i>Kalnovičová Terézia, Turčáni Peter</i>	

<b>Biochemické vyšetrenie mozgovomiechového moku – odporúčaniedoporučenie pri diagnostike sclerosis multiplex, revízia 2008</b> .....	131
<i>Rudolf Gaško, Eleonóra Klímová, Ján Balla</i>	

---

**RESTY Z MINULÉHO ČÍSLA**

---

<b>Fellowship of the european board of medical biopathology</b> .....	137
<i>Gustav Kováč, Anna Porubenová</i>	

**LABKVALITA**  
**SÚHRNY**





PLIVA-Lachema Diagnostika



www.lachema.com • www.lachema.com • www.lachema.com • www.lachema.com • www.lachema.com

# Tři velikosti jedna chemie

## BIO-LA-TEST® a FLEXOR:

vysoká spolehlivost • nízké provozní náklady • rychlá návratnost investic • kompaktnost a flexibilita



### ① flexor junior

CLINICAL CHEMISTRY ANALYSER

KOMPAKTNOST BEZ KOMPROMISU

stolní analyzátor 100 testů / hod

### ② flexor E

CLINICAL CHEMISTRY ANALYSER

EKONOMICKÉ ŘEŠENÍ VAŠICH POTŘEB

stolní analyzátor 180 testů / hod



### ③ flexor XL

CHEMISTRY WORKSTATION

VÝKON A OSVĚDČENÁ KVALITA

biochemický analyzátor 360 testů / hod



 **vital scientific**

GIVING YOU PEACE OF MIND

JÁN BALLA<sup>1</sup>, DRAHOSLAV GÁBOR<sup>2</sup>  
KATARÍNA SCHMIDTOVÁ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Analyticko-diagnostické laboratórium, s.r.o., Prešov

<sup>2</sup>Fakultná nemocnica s poliklinikou F.D. Roosevelta  
Banská Bystrica

<sup>3</sup>Klinika laboratórnej medicíny, Synlab SK s.r.o., Bratislava  
Slovensko

Súčasný katalóg zdravotných výkonov, pôvodne implementovaný do slovenského zdravotníctva z Nemecka pred dvadsiatimi rokmi, odzrkadľuje charakteristické znaky počiatkov transformačného procesu v zdravotníckom sektore Slovenskej republiky. Analýza jeho problémov ukazuje na mnohé systémové nedostatky a nespočetné formálne chyby, ktoré sa rokmi zakonzervovali a doteraz neboli odstránené ani opravené. Kľúčovým faktorom zdravotníckych systémov a motorom ich reforiem vo svete, a samozrejme nevynímajúc ani SR, sú obmedzené finančné zdroje, ktoré sú do sektoru nalievané. Zoznam (katalóg) zdravotných výkonov v laboratórnych odboroch je kritickým prvkom, na základe ktorého sa prerozdeľujú finančné prostriedky pre laboratória. Súčasný zoznam nie je objektívnym prostriedkom na hodnotenie, posudzovanie, riadenie a oceňovanie jednotlivých laboratórnych výkonov a činností alebo pracovísk. Jeho principiálne nedostatky boli presne analyzované už pred 14 rokmi a sú publikované v modrej knižke SNOLAMED [1].

**1. Nejednotný rozsah informácií o výkonoch.** Prejavuje sa to niekde veľmi stručnými, na inom mieste príliš rozsiahlymi názvami a popisom laboratórnych výkonov. Tento štýl sťažuje jeho priamu aplikáciu nielen v lokálnych informačných systémoch, ale bráni zavedeniu štandardného Národného registra laboratórnych výkonov. Vlastné modifikácie a úpravy v tomto smere sú zdrojom chýb a celoplošnej nejednotnosti.

**2. Problémy interpretácie výkonov.** Niektoré výkony svojim rozsahom nezodpovedajú skutočne vykonávanej činnosti (typu vyšetrenia, ošetrenia, analýzy a pod.).

**3. Duplicita** niektorých výkonov je spôsobená nejednotnou terminológiou alebo zaradením tých istých výkonov viacerými odbornosťami (niekedy pod iným názvom).

**4.** Niektoré výkony nemajú **správnu slovenskú terminológiu**, vyskytujú sa nielen terminologické, ale aj gramatické a odborné chyby.

**5.** Formálna **nejednotnosť členenia** Zoznamu. Výkony sú členené a definované podľa rôznej filozofie:

- druhu vyšetrovaného materiálu,
- technologického procesu vyšetrenia,
- metodologického prístupu
- orgánov, atď.

Spôsobuje to sťaženie vyhľadanie výkonov a chaotickú orientáciu v Zozname.

**6.** Problém **doplňkových výkonov**. V existujúcom Zozname nie je definovaný rozsah a ich väzba na základné výkony.

**7.** Chýba **správca zoznamu** výkonov. Zaradenie nových

a vyradenie už neaktuálnych výkonov musí byť jednoduché a systematické. Z Katalógu sa za niekoľko rokov stal „trhací kalendár“ niektorých lobistických skupín.

**8. Zastaranosť a rigidnosť** zoznamu. S výnimkou lobistických vsuviek Zoznam ako celok sa po mnohých rokoch zakonzervoval a stal archaickým. Mnohé výkony sa nepoužívajú, sú „mŕtve“, obsolentné, iné, nové, moderné a účinnejšie chýbajú.

**9.** So Zoznamom zdravotníckych výkonov nie je v súlade ani systém **štatistického výkazníctva**. Štatistika jednotlivých laboratórnych odborov sa navzájom výrazne líši a nevedno, komu a čomu vlastne v tejto podobe slúži.

**10.** Súčasný Zoznam neobsahuje informácie potrebné na stanovenie **ceny**, čo neumožňuje jeho priame využitie v procese cenotvorby.

**11.** Zoznam je absolútne nevyhovujúci pre modely ekonomického hodnotenia **efektivity** a porovnávania **efektívnosti** práce.

**12. Elektronická** forma. Zoznam bol pôvodne napísaný v textovom editore T602 a neumožňuje **triedenie** výkonov, **vytváranie** zoznamov a stručných verzií, **filtráciu** údajov a komplikuje export dát do iných typov textových editorov.

Vplyv globálnych zmien, technologický pokrok, ekonomické reštrikcie, centralizácia a konsolidácia poskytovateľov laboratórnych služieb si nevyhnutne vyžaduje objektívny nástroj na realizáciu týchto cieľov. Nový návrh **Národného registra zdravotných výkonov v klinickej biochémii. Verzia 3** rešpektuje:

- vnútornú kompatibilitu a príbuznosť laboratórnych odborov,
- medziodborovú proporcionalitu výkonov,
- zvláštnosti a špecifiká jednotlivých laboratórnych odborov,
- správnu slovenskú terminológiu a nomenklatúru,
- unifikovaný formát (odbor, kapitola, kód, názov výkonu, *skratka* výkonu, charakteristika výkonu, vykazovanie výkonu, čas výkonu, určenie nového, rozdeleného resp. zrušeného výkonu, duplicitu výkonu, miesto výkonu, nositeľa výkonu, zvlášť vykazované liečivo alebo pomôcku, autora, resp. zodpovedného riešiteľa výkonu) ľahko aplikovateľný do jednoduchej počítačovej databázy.

Nový návrh *Národného registra zdravotných výkonov v klinickej biochémii* spĺňa všetky požiadavky, ktoré predložilo MZ SR. Klinická biochémia vložila do predpísaného formátu MZ SR nový pridaný prvok – vo svete bežne používanú referenčnú skratku výkonu, ktorá je užívateľmi Zoznamov najviac používaným vyhľadávacím nástrojom v elektronických zoznamoch. Na druhej strane nám v predpísanom formáte MZ SR silne chýba prvok **kategorizácie** laboratórnych výkonov podľa náročnosti ich vykonania, ktorý je objektívnou zárukou správnej a korektnej tvorby reálnej a ekonomicky odôvodnenej ceny laboratórneho výkonu.

## LITERATÚRA

Balla, J., Lepej, J., Keleová, A.: SNOLAMED. Systematická nomenklatúra v laboratórnej medicíne a v ostatných odboroch Spoločných vyšetrovacích a liečebných zložiek. Prešov, 1999

---

**FIREMNÝ MIDDLEWARE AKO NÁSTROJ  
PRE RIADENIE INTERNEJ KONTROLY KVALITY**

---

**MIROSLAV BISCHOF  
BECKMAN COULTER**

**Praha  
Česká republika**

Více laboratorních informačních systémů zahrnuje i základní software pro správu a management výsledků měření jen kontrolních materiálů. Na základě potřeb a požadavků na kvalitu a datový management klinických laboratoří bylo nutné vytvořit nový software pro zlepšení validace a potvrzování patientských výsledků. REMISOL ADVANCE EQC modul umožňuje následující funkce:

Management kontrolních materiálů ze všech napojených i nenapojených analyzátorů klinické laboratoře z jednoho či více míst (pracovních stanic).

Management kontrolních materiálů podle kritérií:

- Westgardovy pravidla pro jednu hladinu (1-2S, 1-3S, 2-2S, 3-1S, 4-1S, 10X, 12X)
- Westgardovy pravidla pro více hladin (2-2S, (2of3)2S, R-4S, 3-1S, 4-1S, 10X, 12X)

• Pravidla založena na rozmezí (mimo rozmezí, varovná, chybová rozmezí) v souladu s Rili-bäk

Management šarží kontrolních materiálů

Management založený na patientských datech "patient based qc" (statistika patientských výsledků) podle kritérií:

- Klouzavý průměr
- EWMA (Extended Weighted Moving Average)
- Xb

Možnost filtrování "patient based qc" podle oddělení, pohlaví, věku, ...

Nový typ grafického vyjádření:

- Levey Jennings
- Stewart
- Klouzající průměr
- Distribuční grafy

Možnost grafického prolínání výsledků pro jednoduché porovnání (současné znázornění více hladin nebo více analyzátorů).

Detailní statistika podle časových úseků (den, týden, měsíc nebo vlastní výběr).

Statistika „Date to date“.

Interakce se SW Remisol Advance umožňující aktivovat následující akce (na základě abnormálních výsledků):

- Zobraz specifické/předdefinované chybové hlášení
- Zobraz specifické/předdefinované varovné hlášení

Zastavení automatické validace parametrů v případě selhání pravidel (pro specifické analyzátory).

Zastavení programování analyzátoru při detekci chyby.

Akceptace dat z více zdrojů:

- SW Remisol Advance (kontrolní a/nebo patientská data)
- Manuální vklad dat (pro nenapojené analyzátory)
- z jednotlivých QC modulů laboratoře (umožňuje migraci dat do nového systému)

- ze souborů CSV (text delimited) používající specifický formát

Export dat to souborů CSV

Several products used in diagnostics environment include a basic quality control management (Westgard and Range/Rili-bäk for single levels) dedicated to material control only.

As quality control becomes a key feature of data management, and as regulations become stricter and stricter (in all countries), it was decided to create a new Quality Control software to improve the validation and release of patient results. The REMISOL ADVANCE EQC (Extended quality Control) module was born.

The EQC software provides the following functionalities:

Management of material control with the following rules:

- Westgard on single levels (1-2S, 1-3S, 2-2S, 3-1S, 4-1S, 10X, 12X)
- Westgard on multi levels (2-2S, (2of3)2S, R-4S, 3-1S, 4-1S, 10X, 12X)
- Rules based on ranges (out ranges, warning ranges, error ranges), this to match Rili-bäk

Management of control lots

Management of 'patient based qc' (statistics on patient results) with the following rules:

- Moving Average
- EWMA (Extended Weighted Moving Average)
- Xb

Possibility to filter the 'patient based qc' by department, sex, age, ...

New types of graphics:

- Levey Jennings
- Shewart
- Moving Average
- Distribution Charts

Possibility to overlay graphics for easy comparison (multiple levels or multiple instruments)

Detailed statistics by period (day, week, month or as manually selected)

Date to date statistics

Interaction with Remisol Advance allowing the activation of following selectable actions (based on abnormal results):

- Display of specific / predefined error messages
- Display of specific / predefined warning messages

Stopping the automatic validation of parameters failing rules (for specific instruments)

Stopping the instrument programming when a failure is detected

Acceptation of data from multiple sources:

- From Remisol Advance (controls and/or patient data)
- Manual data entry (for non connected instruments)
- From the (old) embedded QC module, allowing the migration of old data into the new product
- From CSV files (text delimited) using a specific format

Export of data to CSV files

---

**POINT-OF-CARE TESTING (POCT):  
A LABORATORY TESTING PERFORMED AT  
THE PATIENT'S BEDSIDE AT A DISTANCE FROM  
THE CENTRAL LABORATORY NEAR PATIENT  
AT BEDSIDE**

---

**PAVEL BLAŽÍČEK**

**Alpha Medical Bratislava**

**Úvod k problematike POCT**

Na úvod som si dovoľil citovať z práce dr. Othmana, lebo si myslím, že výstižne vystihuje celú problematiku POCT.

„Point-of-Care Testing (POCT) is a laboratory testing performed at the patient's bedside at a distance from the central laboratory near patient at bedside. A well-planned and organized POCT program (POCTP), with great emphasis on patient safety and quality, can achieve compliance with preestablished regulatory requirements. The result should be the provision of high-quality patient care which will satisfy the customer's needs“ (Y.H.Othman)“.

Rýchla a presná analýza je veľmi dôležitá. Povinnosťou každého laboratória je znižovať čas odozvy (TAT) a v tomto môže byť POCT prínos. Vo svete je POCT akceptovaná a veľa problémov je vyriešených. Na SK okrem skutočných problémov, máme ešte aj problém, ktorý jasne pomenovali biochemici-manažéri. „POCT nám bude odčerpávať body“. Je to síce pravda, ale klinická biochémia je tu pre klinikov, aby mohli správne diagnostikovať a liečiť pacienta a teda hlavný prínos z rýchlej a presnej inormácie by mal mať pacient. Na Labkvalite 2009 sme sa rozhodli s MUDr. Špaňárom poskytnúť Vám komplexnú informáciu o POCT, o jeho perspektívach, o využití v nemocnici a praktické využitie v ambulancii praktického lekára. Verím, že sa nám to podarí.

Záujemcov o problematiku POCT dovoľujem si upozorniť na časopis:

**Point of Care** The Journal of Near-Patient Testing & Technology  
**CPOCT** Central Point of Care Testing Division

**Z obsahu decembrového čísla (December 2008)**

- How to Manage Successful Point of Care Testing Program
- Nursing Role in Point-of-Care Testing
- Quality Assurance and Accreditation in Point-of-Care Testing
- Point-of-Care Testing and Patient Safety-A Partnership
- Use of Stabilized Whole Blood for Glucose Proficiency Testing at Point-of-Care Sites
- Wishes for the Future of Point-of-Care Testing
- My Point-of-Care Wish List
- Point-of-Care Testing: 3 New Developments Needed for Future Growth
- Practically Practical Requests for the Next Generation of Point-of-Care Testing
- Point of Need, Global Outreach, and a Universal Companion
- The Grand Point-of-Care Challenge
- Standardization, Harmonization, and Realization
- Knowledge  $\Rightarrow$  Education  $\Rightarrow$  Mind Connectivity: Using Telemedicine to Achieve a Global Vision for Point-of-Care Testing

---

**TRACEABILITY AS A MEAN TO OBTAIN WORLDWIDE USEFUL REFERENCE INTERVALS IN CLINICAL ENZYMOLOGY**

---

**FERRUCCIO CERIOTTI**

**Diagnostica e Ricerca S. Raffaele S.p.A.  
Ospedale San Raffaele, Via Olgettina 60, 20132 Milano  
Italy**

The present situation of the reference intervals in clinical enzymology is discomfoting: on a database of about 590 Italian laboratories for ALT measurement 90 different reference intervals are indicated just for males. Forty two % of the laboratories use identical intervals for males and females. If we restrict the field to the methods that claim to be "according to IFCC with pyridoxal phosphate" (only 93 labs), we still find males upper reference limits spanning from 40 to 72 U/L) with lower limits spanning from 0 to 30 U/L (lower and upper limits almost overlap!). The presence of different analytical principles combined to laboratory dependent reference intervals creates a dangerous mix. But substituting the decision levels for the reference ranges, instead of normalizing the situation adds confusion to confusion. It can be easily demonstrated that the combination of different methods with inappropriate reference ranges reduces the comparability of the clinical information provided instead of increasing it. To improve the situation is mandatory to work on both problems: first to reduce the inter-laboratory – inter-method variability implementing a reference measurement system for the catalytic activities of the enzymes and, second, to define better reference intervals using the standardized methods.

IFCC has defined the primary reference methods for all the most commonly measured enzymatic activities (only Alkaline Phosphatase is still in process, but it will be released soon). The network of IFCC reference laboratories, in collaboration with IRMM has prepared certified reference materials. Now manufacturers have the means to trace back their results to a common reference. Up to now important variability among analytical systems still exists, but the new international regulations like the European IVD Directive will contribute to reduce it.

The availability of field methods producing traceable results will allow the production, via multicenter studies, of well defined reference intervals that could be applicable worldwide. The adoption of these common reference intervals would certainly improve the clinical utility of the enzymatic measurements.

---

**SRDEČNÍ TROPONINY 2009: DIAGNOSTIKA, STRATIFIKACE RIZIKA, OPTIMALIZACE LÉČBY**

---

**MIROSLAV ENGLIŠ**

**Fakultní Thomayerova nemocnice s poliklinikou  
Oddělení klinické biochemie, Praha  
Česká republika**

Vývoj metod ke stanovení srdečních troponinů je v posledních letech charakterizován postupným zvyšováním analytické citlivosti (ultrasenzitivní, high-sensitivity metody) s paralelním snižováním diagnostických rozhodovacích hodnot (cut-off) stanovitelných s požadovanou analytickou přesností.

Důsledkem je možnost identifikace stále menších poškození myokardu jak u ischemických lézí při koronární chorobě, tak při poškození myokardu jiné etiopatogenézy; podstatně se rozšiřuje možnost objektivního průkazu poškození myokardu u chronických onemocnění.

V klinické praxi bude přibývat situací, kdy při nepochybném, analyticky spolehlivém patologickém výsledku stanovení srdečních troponinů se klinik bude stále častěji setkávat s malou a nespecifickou klinickou symptomatologií, jeho rozhodování bude obtížnější, bude muset vyšetření opakovat a postupovat podle trendu změn cTn; jeho pracovní i časové nároky na stanovení diagnózy a volbu léčby se zřejmě často zvýší, vyšší budou i náklady s tím spojené.

Přínos vyšetřování srdečních troponinů byl v relativně krátkém časovém období několika let hlavním, ne-li rozhodujícím impulsem k podstatně novému pohledu na diagnostiku a stratifikaci rizika nejen u akutních ischemických syndromů, ale u řady jiných onemocnění myokardu. Nová generace metod ke stanovení srdečních troponinů takový vývoj nepochybně prohloubí.

**JAKUB HEJSEK**

**Bio-Rad Laboratories Emerging Markets**

Possibilities of point-of-care testing are expanding every year. Its important to formalize the conditions under which this testing can be performed. Several web portals are dedicated to POCT. On Dr Westgard's web, this problematic is also cited and the application of six sigma is demonstrated. Six sigma can be interesting when applied to POCT – especially when selecting between different instruments.

Současné možnosti tzv. "point-of-care" stanovení se neustále rozšiřují. Jedná se o metody, které jsou prováděny v místě kontaktu s pacientem, zejména osobami bez laboratorních zkušeností. Proto je důležité stanovit vhodnost a podmínky použití těchto metod (např. viz Doporučení ČSKB). Dnešní škála testů sahá od testů orientačních/semikvantitativních mnohdy pro jednorázové použití až po kvantitativní stanovení (někdy s návazností na referenční materiál) na víceúčelových POCT přístrojích. Existuje několik internetových portálů věnovaných POCT. Stránky Dr Westgarda se touto problematikou také zabývají a snaží se aplikovat koncept six sigma na POCT. Tento koncept je obzvláště zajímavý pro evaluaci nových přístrojů na trhu. V prezentaci je uváděn příklad různých POCT systémů a možnosti jejich evaluace (např. na základě výsledků z cyklů SEKK). Výsledky těchto evaluací a jejich použití pro lékaře či laboratoře jsou diskutovány. Je zdůrazněna nezbytnost spolupráce měřícího místa, laboratoře a též organizátora externího hodnocení kvality.

**PETER JENÍK, PETER ZNÁŠIK**

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS**

**Bratislava  
Slovensko**

Korektívne opatrenia sú dôležitým zdrojom informácií pre bezpečnosť práce užívateľa. Správnosť a bezpečnosť výsledkov je zabezpečená viacstupňovou kontrolou na úrovni výrobcu diagnostických zdravotníckych pomôcok in vitro ako aj systémom validácií, interných a externých kontrol kvality práce užívateľa. Spoločným prvkom tohto procesu je aj systém korektívnych opatrení, spolupráca užívateľa a výrobcu na úrovni odovzdávania podnetov užívateľov, ich následnej analýzy, vyhodnotenie a identifikácia vzniku podnetu ako aj jeho následné odstránenie. Väčšina výrobcov zdravotníckych pomôcok in vitro má tento proces zavedený a je prísne kontrolovaný národnými ako aj medzinárodnými autoritami vykonávajúcimi dozor nad bezpečnosťou starostlivosťou o pacienta. Firma Siemens Healthcare Diagnostics ako jedna z najväčších producentov zdravotníckych pomôcok na svete, aj keď je na „diagnostickom“ trhu nová, prevzala tento systém po svojich bývalých spoločnostiach Bayer Diagnostics, DPC Diagnostics a Dade Behring a zaradila ho do svojho systému riadenia kvality ISO ako samostatnú kapitolu. Systém pozostáva zo zberu podnetov od užívateľov, ich vyhodnotenia, následnej klasifikácie možného dôsledku pre ohrozenie zdravia pacienta, systém ohlásenia chyby u medzinárodných a národných autoritách, identifikáciu postihnutých užívateľov, systém vypracovania informácie o vzniknutej chybe, jeho kvalifikovaný preklad do jednotlivých jazykových mutácií, systém distribúcie týchto opatrení k užívateľom ako aj systém kvalifikovanej odpovede užívateľa o vykonaní korektívneho opatrenia. Tento proces sa ale u užívateľa nekončí, od ohlásenia korektívneho opatrenia má výrobca len krátky čas na to, aby zdokumentoval jeho efektivitu a informoval o jeho uskutočnení národné a medzinárodné autority. Chceme sa poďakovať užívateľom našich systémov za spoluprácu aj pri týchto činnostiach, ktoré síce navyšujú počet byrokratických činností v laboratóriu, v konečnom hľadisku ale prispievajú k tomu, aby aj v našich laboratóriách bol na prvom mieste kvalitný a správny výsledok pre pacienta.

---

## LABQUALITY'S EQA CHALLENGES IN DIFFERENT CLIENT GROUPS

---

MAURI KEINANEN

**Managing Director, Labquality  
Finland**

Labquality has been a provider of External Quality Assessment (EQA) Schemes since 1971. First schemes were in clinical chemistry, but soon haematology, microbiology, cytology as well as other laboratory medicine disciplines were covered by different EQA schemes. From the beginning it has been clear, that even though same ideology of interlaboratory evaluations is shared between the disciplines, there is a need for different kinds of EQA schemes. For example most clinical chemistry laboratory test results are quantitative but microbiology test results qualitative, and EQA schemes need to be designed to meet the needs of these different kinds of tests. Some laboratory tests may need more subjective microscope analysis and therefore EQA schemes should also include more evaluation of the interpretation. Due to this kind of practical differences in the diagnostic tests and methods, different laboratory medicine disciplines form different client groups, which have different needs and expectations for EQA.

Another issue that forms different client groups is the size and expertise of a laboratory. Bigger laboratories have more laboratory professionals in their organization, and evaluation of EQA results is usually easier than in smaller laboratories or care units where only point of care tests are used. This difference between clients using EQA means that EQA reports and their interpretation need to be thought carefully, so that they can give expected help and information to the clients.

Third main category of different client groups comes because there are customers from different countries and regions. In some countries laboratories have participated many years in EQA using it as one tool for their quality improvement efforts, but some countries are in the first phases of exploiting EQA possibilities. Also, the fact that in some countries EQA participation is mandatory and in others voluntary, as well as that some countries have linked EQA participation and performance in refunding practices, have some impact how the laboratories and EQA users see the importance and aims of EQA.

Due to the for example increased use of Point of care tests, Labquality's EQA services are used also outside traditional clinical laboratories. Patient care units, outpatient clinics and other non-laboratory organization form the fourth client group category for EQA provider. This kind of broadening in our client base has led us to build linkages to health care organizations in general with new services like certification and radiation safety auditing.

---

**NOVORODENECKÝ SKRÍNING  
CYSTICKEJ FIBRÓZY NA SLOVENSKU**

---

**MÁRIA KNAPKOVÁ  
SVETozár DLUHOLUCKÝ**

**Skriningové centrum novorodencov SR, Detská fakultná  
nemocnica s poliklinikou  
Banská Bystrica**

Skriningové centrum novorodencov SR (SCN SR) je centrálné laboratórium pre novorodenecký skrining Slovenskej republiky. Denne vyšetří 300–500 suchých krvných vzoriek novorodencov zo všetkých novorodeneckých oddelení na Slovensku. Každý novorodenec je testovaný na kongenitálnu hypotyreózu (KH), fenylketonúriu (FKU), kongenitálnu adrenálnu hyperpláziu (CAH) a od 1.2.2009 aj na cystickú fibrózu (CF).

64. Odborné usmernenie MZ SR ku skriningu fenylketonúrie, kongenitálnej hypotyreózy, kongenitálnej adrenálnej hyperplázie a cystickej fibrózy novorodencov a zdravotnej starostlivosti o zachytené prípady číslo 18728/2008 presne stanovuje algoritmus vyšetřovania novorodencov na uvedené ochorenia. Zavedeniu vyšetřovania skriningu cystickej fibrózy predchádzala pilotná štúdia na tento skrining v období máj 2007 – apríl 2008. Všeobecne uznaným skriningovým testom na cystickú fibrózu je stanovenie imunoreaktívneho trypsínu v suchej kvapke krvi. Hladina IRT býva zvýšená u novorodencov s cystickou fibrózou. V období necelého roka sme v laboratóriu SCN SR vyšetřili 27 974 suchých krvných vzoriek kítom neo IRT ILMA od firmy Immunotech. Imunoluminometrické stanovenie imunoreaktívneho trypsínu je stanovenie typu „sandwich“ v mikrotitračných platničkách, potiahnutých špecifickou polyklonálnou králičou protilátkou pre ľudský kationický trypsin, prispôsobené suchej krvnej vzorke. Emitovaný svetelný signál je meraný luminometrom. Cieľom štúdie bolo zistiť hladinu IRT

u zdravých novorodencov, nájsť hladinu IRT vhodnú ako cut off limit pre nahlásenie diagnózy u suspektných novorodencov a zvoliť ďalší postup pri potvrdení alebo vylúčení ochorenia. Výsledky pilotnej štúdie boli nasledovné údaje: stredná hodnota IRT u novorodencov vo veku 72.–96. hodiny života bola v súbore 22,47 ng/mL. 99 % percentil sa pohyboval na úrovni 71,88 ng/mL, 99,5 % percentil na úrovni 87,25 ng/mL. Novorodencov s hladinou nad 87,25 ng/mL sme považovali za suspektných a požadovali sme opakovaný odber suchej krvnej vzorky na 21. deň života. 87 novorodencov malo hodnotu nad cut off limit, čo je 0,31 %. Po druhom odbere sme nahlásili ako suspektných 38 novorodencov. U nich nasledovalo ďalšie vyšetřovanie v špecializovaných Centrách cystickej fibrózy: meranie chloridov v pote pilokarpinovou iontoforézou a genetická analýza mutácií u potvrdených pacientov. Zo súboru 27 974 sa potvrdilo 5 prípadov cystickej fibrózy, incidencia ochorenia 1 : 5 594. Hladina IRT u zachytených prípadov bola 212,41 ng/mL (143,81–268,80) a deti mali nahlásený záchyt vo veku 18,8 dňa (13–39). Podľa výsledkov pilotnej štúdie bol zvolený algoritmus skriningového testu CF novorodencov vo veku 3.–4. deň života. Hladina nad 99 % percentil bude vyhodnocovaná štatisticky denne ako pozitívita, bude požadovaný opakovaný odber suchej kvapky vo veku 14.–21. dní života. Cut off pre druhú vzorku bude zohľadňovať pokles IRT v čase, bude znížený o 10 ng/mL. Po nameraní vysokého IRT aj v druhej vzorke bude dieťa nahlásené do tzv. recall centra na ďalšie dosledovanie stanovením chloridov v pote a genetickou analýzou mutácií CFTR génu u pacientov s pozitívnym potným testom.

Za obdobie február–marec 2009 sme v skriningu CF vyšetřili 18 465 novorodencov, po vylúčení v druhom kole sme ako suspektné záchyty nahlásili 28 novorodencov, čo je 0,15 % recall.

Zatiaľ máme vylúčených 5 pacientov ako negatívnych, 3 deti exitovali a ostatné budú vyšetřované v špecializovaných centrách. Konečné výsledky prvého roku plošného skriningu cystickej fibrózy budú vyhodnotené v Ročnej správe SCN SR 2009.



**PROKALCITONÍN -  
MOŽNOSTI JEHO VYUŽITIA V PRAXI (poster)**

**ERIKA KOLLÁROVÁ, EVA JANOKOVÁ  
DUŠAN DROZDA**

**Oddelenie klinickej biochémie  
Nemocnica Košice-Šaca a. s., Košice**

**ÚVOD:** Prokalcitonín (PCT) je vysokošpecifický marker pre diagnostiku klinicky závažných bakteriálnych infekcií a sepsy. Koreluje lepšie ako ostatné existujúce parametre so zápalovou aktivitou imunitného systému. Stanovenie prokalcitonínu sa na Oddelení klinickej biochémie v Košiciach-Šaci robí už od roku 2000. Bolo zavedené na zlepšenie diagnostiky septických stavov u pacientov hospitalizovaných na Klinike popálenín a rekonštrukčnej chirurgie. V tomto období sme používali súpravu firmy BRAHMS PCT-Q, ktorá umožňovala semikvantitatívne meranie. Neskôr sa využitie tohto testu rozšírilo aj v diagnostike a následne aj v manažmente liečby iných zápalových ochorení. V minulom roku sme do praxe zaviedli kvantitatívne stanovenie setom Elecsys BRAHMS PCT.

**CIEĽ:** Cieľom našej práce bolo zistiť prínos tohto vyšetrenia u skupín pacientov s vybranými diagnózami. Sledovali sme hodnoty PCT u pacientov s akútnymi zápalovými chorobami pankreasu a žľáz, dolných dýchacích ciest, obličiek, pacientov s popáleninami a sepsou.

**MATERIÁL A METÓDY:** Od novembra 2008 do apríla 2009 sme kvantitatívne urobili 236 stanovení PCT. Z toho do sledovaného súboru sme zaradili 54 pacientov so 152 meraniami, ktorých sme rozdelili do 5 skupín. V prvej skupine (A) bolo 12 pacientov s akútnym zápalovým ochorením pankreasu a žľáz, u ktorých sa robilo 53 meraní PCT. Ďalšiu skupinu (B) tvorilo 12 pacientov (29 meraní PCT) s akútnou bronchitídou a pneumóniou. Do tretej skupiny (C) sme zaradili 11 pacientov (24 meraní) s akútnou tubulointersticiálnou nefritídou. V štvrtej skupine (D) bolo 9 pacientov s popáleninami, u ktorých sme robili 16 meraní PCT a piatu skupinu (E) tvorilo 10 pacientov so sepsou (30 meraní). U všetkých pacientov boli stanovené v sére PCT a C-reaktívny proteín (CRP) ako markery zápalu. PCT bol vyšetovaný dg. súpravou Elecsys BRAHMS PCT na imunochemickom analyzátore Elecsys 2010 firmy Roche. Stanovenie CRP sme robili na analyzátore ADVIA 1200 setom CRP FS od firmy DiaSys.

**VÝSLEDKY:** Výsledky našich meraní PCT (ng/ml) sú zhodnotené v nasledujúcej tabuľke:

skupina	počet pacientov	počet meraní	priemer	minimum	maximum
A	12	53	4.39	0.088	80.37
B	12	29	1.60	0.066	16.11
C	11	24	19.30	0.430	111.40
D	9	16	1.60	0.174	6.38
E	10	30	18.08	0.113	113.6

- A - pacienti s akútnym zápalovým ochorením pankreasu a žľáz  
B - pacienti s akútnym zápalovým ochorením dolných dýchacích ciest  
C - pacienti s akútnou tubulointersticiálnou nefritídou  
D - pacienti s popáleninami  
E - pacienti so sepsou

Z nameraných výsledkov vyplynulo, že najvyššie hodnoty PCT boli zistené u pacientov so sepsou (maximum 113.6 ng/ml), čo koreluje s literárnymi údajmi.

Pozoruhodné je však zistenie, že veľmi vysoké hodnoty PCT majú pacienti s akútnou tubulointersticiálnou nefritídou (priemer 19.30 ng/ml). Z toho vyplýva, že PCT môže byť významným parametrom aj v oblasti nefrológie. Zo zahraničnej literatúry je známe, že tento test sa úspešne využíva pri tejto diagnóze hlavne u detí. Kazuistika pacientky s týmto ochorením ilustruje jeho rýchlu dynamiku ako odraz úspešnosti antibiotickej liečby.

Ďalšia kazuistika poukazuje na to, že pri akútnej pankreatitíde PCT je lepším markerom na odlíšenie pacientov s dobrou a zlou prognózou v porovnaní s CRP.

Meranie PCT pomáha odlíšiť pacientov s klinicky závažnými bakteriálnymi infekciami dolných dýchacích ciest, ktorí potrebujú antibiotickú terapiu, od tých s vírusovou alebo slabou bakteriálnou infekciou, ktorí ju nepotrebujú. Na diferenciálnu diagnostiku týchto infekcií môžu byť však použité iba senzitivné testy. Test Elecsys BRAHMS PCT túto podmienku spĺňa.

**ZÁVER:** Vyšetrenie prokalcitonínu je užitočným pomocníkom pri sepe, ale dokáže identifikovať pacientov so závažným bakteriálnym ochorením ešte v štádiu, keď sa dá cieľnou terapiou zabrániť rozvoju sepsy. Rozhodovací algoritmus založený na PCT umožňuje prispôbiť dĺžku terapie k individuálnej klinickej situácii každého pacienta. Integrácia PCT do diagnostických a terapeutických algoritmov umožňuje rýchlejšiu liečbu a redukciiu podávaných antibiotík a tiež počtu dní hospitalizácie.

---

PRÍSTUP ZDRAVOTNÝCH POISŤOVNÍ  
K MEDICÍNSKYM LABORATÓRIAM  
V PODMIENKACH EKONOMICKEJ KRÍZY  
ABSTRAKT

---

EDUARD KOVÁČ

Združenie zdravotných poisťovní  
Slovenskej republiky (ZZP)

Prístup zdravotných poisťovní sa odvíja od platného legislatívneho rámca, ekonomickej reality a v neposlednom rade od „zmluvného know-how“ poisťovní a ich empatie.

Z pohľadu legislatívneho rámca je kľúčovým § 7 zákona o zdravotných poisťovniach (uzatváranie zmlúv o poskytovaní zdravotnej starostlivosti).

Z § 7 má zásadný význam odsek 4:

„ZZP je *povinná stanoviť a uverejňovať* kritériá na uzatváranie zmlúv vzťahujúce sa na *personálne a materiálno-technické vybavenie* poskytovateľov a na *indikátory kvality*;

ZZP je *povinná vytvoriť poradie poskytovateľov* podľa ich úspešnosti pri plnení vyššie uvádzaných kritérií a *zohľadniť toto poradie pri uzatváraní zmlúv*“.

Nevyhnutný rámec personálneho vybavenia a materiálno-technického zabezpečenia určuje „Výnos MZ SR o minimálnom personálnom zabezpečení a materiálno-technickom vybavení zdravotníckych zariadení“. Indikátory kvality pre jednotlivé sektory zdravotnej starostlivosti ustanovuje *Nariadenie vlády o indikátoroch kvality* (51/2009 Z.z. účinné od 1.3.2009). Toto nariadenie však zatiaľ neustanovuje žiadne indikátory kvality pre sektor SVLZ. Zdravotné poisťovne (členovia ZZP) rešpektujú zákonnú povinnosť stanoviť a uverejniť kritériá na uzatváranie zmlúv (vrátane indikátorov kvality) a po konzultáciách so Slovenskou spoločnosťou laboratórnej medicíny, inklinujú k štyrom indikátorom kvality pre laboratórnu medicínu – **spektrum vyšetrení; smennosť prevádzky; externá kontrola kvality a akreditácia.** Snažili sa pritom rešpektovať požiadavky jednoduchosti a transparentnosti.

Zdravotné poisťovne (členovia ZZP) sa dohodli aj na váhe skupiny indikátorov kvality pre rok 2009 – a to na 80%. Personálnemu vybaveniu prideliť váhu 10% a materiálno-technické zabezpečenie má váhu 10%.

Čo sa týka **ekonomickej reality**, treba poznamenať, že zo zdrojov zdravotného poistenia sa na sektor SVLZ vynaloží 11%. Na laboratórnu medicínu sa ročne vynakladá niečo viac ako 5% (cca 150 mil. €).

Hospodárska a ekonomická kríza má už preukázateľné dopady:

Zatiaľ čo štátny rozpočet ráta s nárastom HDP o 6,4%, tak aktuálny odhad Národnej banky Slovenska je na úrovni **mínus 2,4%**. Čo sa týka zdrojov zdravotného poistenia, existujú zatiaľ rôzne prognózy: Inštitút finančnej politiky ministerstva financií uvádza mínus 87 mil. € (február 2009), HPI mínus 128 až 345 mil. € (marec 2009), ZZP hovorí o mínus 250 mil. € (apríl 2009).

Podstatnejšia ako prognózy je však realita zdrojov zdravotného poistenia (tá bola za prvé dva mesiace nižšia o 10% oproti porovnateľnému obdobiu r. 2008). Pokles zdrojov je teda zrejмый. V roku 2009 sa nedá očakávať zlepšenie aktuálneho trendu zdrojov. Zároveň zdravotné poisťovne (v súlade s platnou legislatívou) sa nemôžu zaviazovať k ničomu, na čo ich neopravňujú reálne finančné zdroje. Preto, okrem iného, ZZP vyzýva na potrebu spoločných riešení.

Pri doterajšej zmluvnej komunikácii zdravotných poisťovní s poskytovateľmi, samotní poskytovatelia SVLZ zdôrazňovali viacero momentov, napr.: kľúčovými opatreniami musia byť motivačné opatrenia (aby sa oplátilo neklamať a nekraďnúť)! Ďalej racionálne správanie sa všetkých v systéme. Koncentrovať pracoviská SVLZ. Aby vo verejnej minimálnej sieti existovali len také SVLZ, ktoré pracujú 24 hod. Je potrebné uprednostňovať kvalitu pred dostupnosťou. Presadzovať diferencované zmluvy avšak s transparentnými pravidlami. Postihovať neracionálne indikujúcich a neefektívnych poskytovateľov.

Zdravotné poisťovne sú rozhodne za tri kľúčové oblasti: flexibilné zmluvy s inovatívnymi riešeniami, transparentnú súťaž a dôslednejšiu diferenciáciu (podľa kritérií – viď § 7 ods. 4).

JOSEF KRATOCHVÍLA  
BEDŘICH FRIEDECKÝ, MAREK BUDINA

SEKK Pardubice  
Česká republika

Biochemické markery, považované za průkazné pro diagnózu, sledování a prognózu kardiálních poškození, jsou kardiální troponiny cTnI/T pro akutní koronární syndromy a natriuretické peptidy BNP a NTpro-BNP pro diagnózu, sledování a prognózu chronické srdeční dysfunkce.

Společná doporučení laboratorní medicíny a kardiologie považují za nezbytné dosažení mezilehlé přesnosti  $CV \leq 10\%$  (cTnI/T) a  $CV \leq 15\%$  (BNP, NTpro-BNP). Požadované hodnoty má být dosaženo v celé oblasti pracovního rozsahu měření, počínaje hodnotou cut-off. Tou je v případě cTnI/T hodnota 99. percentilu dolního referenčního limitu.

Úroveň standardizace stanovení zmíněných biochemických markerů je nízká. Srovnatelných číselných výsledků měření lze docílit pouze při použití totožné instrumentální platformy a totožného reagenčního kitu. Už malé změny v konstrukci instrumentace nebo ve složení reagensií (tzv. „nová generace“), působí jako další zdroj nesrovnatelnosti. Z hlediska EHK to znamená tlak na vytvoření nové podskupiny při hodnocení účastníků jednoho výrobce. Pro pacienty jde pak o další možný zdroj rizika poskytnuté péče. Výsledky jsou závislé nejen na metodě, označené jménem výrobce, ale často i na různých typech instrumentace (platformách) stejného výrobce. Různé metody cTnT/I poskytují rozdílné počty výsledků nad hodnotu 99. percentilu. Tateová a spol. [1] našli při testování 8 různých metod stanovení cTnT/I počty pacientů nad 99. percentil v intervalu 53 % až 78 %. Samozřejmě, že existovalo 8 různých sad číselných výsledků a osm různých hodnot 99. percentilu.

Prozkoumáme-li údaje výrobců o použitých zachytých a detekčních protilátkách, zjistíme, že ze 14 metod mají jen dvě totožné, k stejným epitopům orientované protilátky. V řeči metrologie to znamená, že rozhodně není různými metodami stanovován stejný analyt. Dostatečně definovaný analyt je přitom první základní podmínkou metrologické návaznosti výsledků měření, protože jen s jeho pomocí může být:

- připraven standard měření jako ztělesnění jednotky měření
- dosaženo srovnatelnosti mezi výsledky měření pomocí různých metod, kitů a analytických systémů
- dosažena dostatečně nízká nejistota měření

Důsledkem nedostatečné standardizace je existující nesrovnatelnost výsledků, dosažených různými metodami (často i v rámci produkce jednoho výrobce) a vysoká

nejistota výsledků, kontrastující s výše uvedenými přísnými požadavky doporučení.

Produktorem neakceptovatelně vysoké nejistoty je velmi omezená možnost dosažení požadovaných hodnot přesnosti troponinů, přestože se hodnotí homogenní skupiny, používající stejné měřicí systémy. Opakované experimenty některých autorů potvrzují, že přesnost měření troponinů u hodnot blízkých 99. percentilu je spíše  $CV = 20\%$ , než požadovaných  $10\%$ . Jen proložení kalibrační křivky v oblasti hodnoty cut-off bylo v případě cTnT 4. generace zatíženo  $15\%$  chybou.

Výsledky EHK těmito faktům odpovídají. Ani jeden z šesti vzorků s koncentrací pod  $0,1 \mu\text{g.l}^{-1}$  u cTnT nebyl stanoven v letech 2003–2008 v kontrolních cyklech SEKK s přesností  $CV < 10\%$ . V kontrolních cyklech NEQAS v roce 2008 nebylo u 8 vzorků s koncentrací  $0,1 \mu\text{g.l}^{-1}$  dosaženo hodnoty pod  $10\%$  v ani jednom případě u systému Elecsys, nicméně v  $62\%$  případů u systému Modular byla tato podmínka splněna. Kontrolní program RfB DGKL Bonn (Německo) zatím vůbec kontrolní vzorky o koncentracích pod  $0,1 \mu\text{g.l}^{-1}$  nepoužívá, ale i tak nebylo hodnoty přesnosti pod  $10\%$  v roce 2008 dosaženo v tomto programu ani jednou.

Obdobná je situace u cTnI. V programu SEKK bylo dosaženo u koncentrací pod  $0,1 \mu\text{g.l}^{-1}$  požadované přesnosti jen v  $50\%$  případů, v programu NEQAS dokonce jen v  $33\%$ . Program RfB DGKL ani zde tak nízkých koncentrací nepoužívá, přesto přesnosti  $CV \leq 10\%$  bylo v roce 2008 dosaženo jen v  $66\%$  případů.

Typickým trendem vývoje měření cTnI/T je rychlé zvyšování analytické citlivosti. V případě cTnT se nárůst citlivosti projevil poklesem hodnoty 99. percentilu z původní hodnoty  $0,2 \mu\text{g.l}^{-1}$  na současných  $0,01 \mu\text{g.l}^{-1}$ . Také při stanovení cTnI došel vývoj až k hodnotám 99. percentilu asi  $0,03 \mu\text{g.l}^{-1}$  u systémů Beckman a Siemens Bayer Centaur. Skutečná koncentrace troponinů u zdravých lidí bude patrně ještě prakticky o dva řády nižší.

Z hodnoty požadované přesnosti měření cTnT/I je odvozena hodnota tolerančního rozpětí EHK jako trojnásobek této hodnoty, to jest  $30\%$ . Výsledky EHK však ukázaly, že i tato hodnota je pro koncentrace kolem 99. percentilu nerealisticky nízká a že vede k nízké úspěšnosti účastníků.

Při klinickém použití cTnI/T je zřejmá nutnost opakovaných náběrů krve u hospitalizovaných pacientů. Proto je velmi zajímavé a potřebné znát hodnoty biologických variací (proměnlivosti). Ty byly prvně publikovány počátkem roku 2009. Bylo k tomu použito systému Siemens Bayer Centaur s hodnotou 99. percentilu cca  $0,03 \mu\text{g.l}^{-1}$ . Autoři zjistili hodnotu intraindividuální biologické variace v čase mezi 0 až 4 hodinou  $CV_i = 9,7\%$ . To vedlo při analytické přesnosti  $CV = 8,3\%$  k hodnotám kritické difference dvou následných měření v intervalu  $-32\%$  až  $46\%$ . Nízká hodnota indexu individuality ( $II = 0,21$ ) ukazuje, že hodnocení kritických diferencí je užitečnější, než hodnocení podle dolního referenčního limitu (99. percentilu) a že to může změnit i způsob hodnocení výsledků EHK.

Celková reprodukovatelnost stanovení cTnT/I se už několik let nemění. U stanovení cTnT bylo v programu SEKK dosaženo nejlepších výsledků v roce 2005 (CV = 5,9 %), pak došlo k zhoršení a stagnaci. Důvodem je nárůst počtu měřících platform (rozšíření o Modular a Cobas 6000) a velký kvantitativní nárůst počtu šarží reagentů. Podobně je tomu při měření cTnI, kde se navzdory existenci certifikovaného referenčního materiálu reprodukovatelnost měření nemění a zůstává zhruba v intervalu 35 % až 45 %.

Zajímavé jsou rozdíly v povinné účasti laboratoří v programech EQA. UK NEQAS rozesílá 3 vzorky 12× ročně, jde tedy o účast povinnou v každém měsíci. V programu RfB DGKL Bonn mají účastníci k dispozici 2 vzorky 4× ročně. V programu SEKK jsou 2 kontrolní cykly po 2 vzorcích ročně s povinnou účastí v obou cyklech.

1. Tate JR.: Troponin revisited 2008: assay performance. Clin Chem Lab Med 2008 46 (11) 1489–1500.

---

#### EQA OF BIOCHEMICAL MARKERS FOR MYOCARDIAL DAMAGE

---

JOSEF KRATOCHVÍLA  
BEDŘICH FRIEDECKÝ, MAREK BUDINA

SEKK Pardubice  
Czech Republic

Biochemical markers assumed as the evidence for diagnose, monitoring, and prognosis of myocardial damage are troponins cTnI/T for acute coronary syndromes and natriuretic peptides BNP and NTpro-BNP for diagnose, monitoring, and prognosis of chronic myocardial dysfunction.

Common recommendations of laboratory medicine and cardiology suggest  $CV \leq 10\%$  (cTnI/T) and  $CV \leq 15\%$  (BNP, NTpro-BNP). These values of CVs should be achieved in all measurement range starting cut-off value (in case of cTnI/T it is 99. percentile of lower reference limit).

The degree of standardisation of determination of these analytes is low. Comparable results we can obtain only if using identical measuring systems and identical kits. Only little changes in the construction of instrumentation and/or in composition of kits (so called “new generations”) figure as a new source of incomparability. It results in the pressure to define new and new groups of results in the EQA systems. From the patient point of view it is a factor increasing the risk of the care. Results strictly depend on the type of instrumentation used for determination even if it is the instrumentation of one manufacturer (different platforms). Different methods of

cTnI/T return different numbers of the results over the 99. Percentile value. Tate [1] found during testing of 8 methods of determination cTnI/T numbers of patients over 99. Percentile in the interval from 53% to 78%. Indeed there were 8 different sets of numerical results and 8 different values of 99. Percentile.

After investigation of antibodies used by different manufacturers we can see that from 14 methods only 2 are having identical antibodies (orientated to the same epitopes). In metrological language it means that different methods determine different analytes. Well defined analytes represent fundamental condition for establishing of metrological traceability of the results, because it allows us to:

- prepare measurement standard
- achieve comparability of the results obtained by different systems
- achieve reasonably low uncertainty.

The consequence of insufficient standardisation is the existence of incomparable results obtained using different measuring systems (frequently different systems of the same manufacturer) and high uncertainty of results contrasting with the above mentioned strict requirements of the recommendations.

High uncertainty results in the low possibility to achieve required values of CVs despite the fact that we evaluate homogeneous groups (same measuring system). Repeated experiment of many authors confirm that the precision of determination of troponins near 99. Percentile is rather  $CV = 20\%$  instead of required  $CV = 10\%$ . Only the error of the calibration curve regression for 4. Generation of cTnT is about 15%.

EQA results confirm above mentioned facts. The  $CV < 10\%$  was not observed in any of the 6 control samples with concentration of cTnT below  $0,1 \mu\text{g.l}^{-1}$  used in the years 2003–2008 in SEKK. In the surveys NEQAS in 2008 the  $CV < 10\%$  was not achieved for samples with concentration  $0,1 \mu\text{g.l}^{-1}$  for Elecsys, but 62% of Modular results fulfilled this requirement. EQA programme RfB DGKL Bonn (Germany) does not use the samples with concentrations below  $0,1 \mu\text{g.l}^{-1}$ , despite this fact  $CV < 10\%$  was not achieved in any of their survey in 2008.

Situation in cTnI determination is similar. In SEKK programme results of samples with concentration under  $0,1 \mu\text{g.l}^{-1}$  fulfilled requirements only in 50% of cases, in NEQAS only in 33%. RfB DGKL does not use the samples with so low concentrations, but  $CV < 10\%$  was achieved in only 66% cases in 2008.

The trend of cTnI/T determination is increasing of analytical sensitivity. In case of cTnT the 99. Percentile decreased from primary value  $0,2 \mu\text{g.l}^{-1}$  to actual  $0,01 \mu\text{g.l}^{-1}$ . Also for cTnI determination the 99. Percentile developed to the value  $0,03 \mu\text{g.l}^{-1}$  for systems Beckman and Siemens Bayer Centaur. Real concentration of troponins for healthy population is probably 100 times lower.

Tolerance limit used in SEKK EQA was derived from the required precision of cTnI/T measurement

as a triple – it is 30%. But EQA results show, that this value is for concentration near 99. Percentile too narrow and that it produce too much unsuccessful participants.

In clinical application of cTnI/T there is evident the need of repeated blood taking. It is why it is very important to know the values of biological variations which were published in the beginning of 2009. There was used system Siemens Bayer Centaur with value of 99. Percentile about  $0,03 \mu\text{g.l}^{-1}$ . Authors found the value of intraindividual biological variance in time 0 to 4 hours  $CV_i = 9,7\%$ . Using analytical precision  $CV = 8,3\%$  this lead to the values of critical difference of two subsequent measurements between  $-32\%$  and  $46\%$ . Low value of the index of individuality ( $II = 0,21$ ) shows that classification of critical differences is more effective than evaluation based on lower reference limit (99. percentile) and that this can affect evaluation of EQA results.

Overall reproducibility of cTnT/I determination does not change many years. In case of cTnT we observed the best results in 2005 ( $CV = 5,9\%$ ), than the situation get worse and now it stagnate. The reason lies probably in increase of measuring platforms (added Modular and Cobas 6000) and increase of types of kits. Similar situation we can observe in cTnI measurement, where despite the existence of CRM reproducibility does not change and remains in the interval  $35\%$  to  $45\%$ .

It is interesting that there are differences in the number of EQA surveys and samples between the EQA systems. UK NEQAS sends 3 samples 12times per year (monthly participation). RfB DGKL offer 2 samples 4 times per year and SEKK offer 2 samples 2 times per year (mandatory participation).

1. Tate JR.: Troponin revisited 2008: assay performance. Clin Chem Lab Med 2008 46 (11) 1489–1500.

---

## METROLOGICKÁ NÁVAZNOST KALIBRACE A JEJÍ PROBLÉMY

---

JOSEF KRATOCHVÍLA  
BEDŘICH FRIEDECKÝ, MAREK BUDINA

SEKK Pardubice  
Česká republika

### Nový VIM-3 (ISO Guide 99), Směrnice 98/79

Nízká pravdivost a nedostatečná srovnatelnost výsledků měření patří mezi chronické problémy laboratorní medicíny a může být jedním z faktorů rizika zdravotní péče o pacienty. Situace by měla být teoreticky řešena **požadavkem na metrologickou návaznost kalibrátorů**, obsaženým v Směrnici 98/79. Podstata kalibrační hierarchie, která je v procesu návaznosti ustanovována, je popsána v novém metrologickém slovníku VIM-3 a kalibrátory jsou řazeny mezi základní referenční materiály. Tento slovník je v plném znění umístěn na oficiálních webových stránkách IFCC [www.ifcc.org](http://www.ifcc.org). Už z tohoto samotného faktu by bylo možné usuzovat, že výrobci tento bazální text metrologie a analytické chemie respektují a dobře znají. Pokud by takové optimistické představy byly aspoň zčásti naplněny, nebylo by možné zaznamenávat tolik problémů s pravdivostí výsledků měření. Skutečnost je však jiná.

Požadavek metrologické návaznosti je velmi často plněn formálně pouze na podkladě vytvoření patřičné firemní dokumentace. Máme pocit, že výrobcům uniká často smysl návaznosti jako nástroje **zlepšování srovnatelnosti a pravdivosti měření**. Za této situace je nutno počítat se signifikantními hodnotami vychýlení/bias jako se součástí denní praxe činnosti klinických laboratoří a považovat je za významný dílčí zdroj nejistoty výsledků měření, omezené srovnatelnosti výsledků měření a potenciálního zdroje rizik zdravotní péče. Je velmi nepřijemné, že nedostatečná schopnost klinických laboratoří se projevuje v snižování důvěry lékařů.[1]

### Pravdivost měření

Je míra shody výsledku s certifikovanou referenční hodnotou. Kvantifikací pravdivosti je bias. Pravdivost je klíčový problém laboratorní medicíny a vypadá jako magická, nedosažitelná vlastnost. Poslední demonstraci problému lze nalézt v článku [2]. Z něj je (mimo jiné) zřejmé, že nenaplněné sny o pravdivosti výsledků jsou letité a že hodnoty bias v klinických laboratořích jsou příliš vysoké.

### Příčiny:

- Neznalost vlastní struktury analytu. Namísto dobře definovaných analytů jsou často stanovovány jen úseky makromolekul, vymezené epitopy, přičemž výrobci používají různých záchytných i detekčních protilátek. Tyto protilátky jsou obvykle patentově chráněné.

- Neexistující nebo velmi specificky chápána metrologická návaznost. V poslední době lze často pozorovat, že návaznost je chápána jako požadavek pro splnění platné legislativy (Směrnice 98/79) a **ne jako analytický nástroj dosažení srovnatelnosti mezi metodami a akceptovatelné hodnoty bias u jednotlivých metod.**

- Nedostatečné informace o kalibračních funkcích. Tady lze uvést jako klasický problém POCT, kdy řada přístrojů disponuje separátními měřicími moduly pro pacienty a pro kontrolní vzorky. Řada z těchto přístrojů nedisponuje ani formální dokumentací metrologické návaznosti.

#### Následky:

- Zvýšená nejistota výsledků měření, případně její nedostatečná znalost a z toho plynoucí důsledky pro kvalitu péče o pacienta.

- Nesrovnalosti v klinickém hodnocení výsledků a nedůvěra kliniků v laboratoře.

- Nejistá a často rozdílná výpovědní hodnota referenčních intervalů a rozhodovacích limitů [3].

Thienpont LM.: Calculation of measurement uncertainty – Why bias should be treated separately. *Clin Chem* 2008 54/9 1587–1588.

Thienpont LM.: Accuracy in clinical chemistry – who will kiss Sleeping Beauty awake? *Clin Chem Lab Med* 2008 46/9 1220–1222.

Haeckel R., Wosniok W., Arzideh F.: Proposed classification of various limit values (guide values) used in assisting the interpretation of quantitative laboratory test result. *Clin Chem Lab Med* 2009 47/4 494–497.

---

## METROLOGICAL TRACEABILITY OF CALIBRATION AND RELATED PROBLEMS

---

JOSEF KRATOCHVÍLA  
BEDŘICH FRIEDECKÝ, MAREK BUDINA

SEKK Pardubice  
Czech Republic

#### New VIM-3 (ISO Guide 99), Directive 98/79

Insufficient trueness and comparability of the results seems to be a chronic problem of laboratory medicine and should be one of the factors increasing the risk of the patient care. The situation is solved in the theoretical level by the requirement of the metrological traceability of calibrators which is part of the Directive 98/79 (IVD). The fundamental of the calibration hierarchy (which is established in the scheme of traceability) is shown in the new metrological vocabulary VIM-3, where calibrators are sorted under the basic reference materials. This vocabulary is available for free at [www.ifcc.org](http://www.ifcc.org). Thus we can presume that manufacturers know and fulfil this text. But it is not everyday reality and it is why we can observe so many problems concerning the trueness of the results.

The requirement of metrological traceability is often fulfilled in formal way and based only on sufficient paper documentation. We assume that the root of metrological traceability – to serve as a tool of the trueness and comparability improvement – may be lost in this process. In this situation we have to accept the fact that there exist significant bias in many results of the measurement and that this bias contributes to the uncertainty of the results, lowers comparability of results, and increases the risk in healthcare. Additionally the faith of the doctors in the laboratory results should decrease [1].

#### Trueness of the measurement

Trueness describes the degree of agreement between the results and reference value. It is quantified by bias. Trueness is a key problem of laboratory medicine and it seems to be a magic, inaccessible property. The demonstration of this problem should be found in the article [2]. This article shows long lasting dreams of trueness of the results and that the biases are too big in the laboratories.

#### Reasons:

- Unknown structure of the analyte. In place of well defined analytes we often determine only some portions of macromolecules defined by epitopes, and different manufacturer's use different marking and detection antibodies. These antibodies are usually under patent protection.

- Metrological traceability is not established in many cases. Many times the requirement of traceability is met only in legislative level (Directive 98/79) and it is not understood as a tool for establishing comparability of the results and for decreasing its biases.

- Insufficient information about calibration functions. For example many POCT systems offer separate measuring modules for patient samples and for EQA samples. In many times the documentation of metrological traceability is not available for these systems.

#### Consequences:

- Increased uncertainty of the results or low knowledge's about this uncertainty and resulting effects to the patient care quality.

- Discrepancies in clinical interpretation of the results and lowered trust of clinicians.

- Doubts concerning reference intervals and decision limits [3].

Thienpont LM.: Calculation of measurement uncertainty – Why bias should be treated separately. *Clin Chem* 2008 54/9 1587–1588.

Thienpont LM.: Accuracy in clinical chemistry – who will kiss Sleeping Beauty awake? *Clin Chem Lab Med* 2008 46/9 1220–1222.

Haeckel R., Wosniok W., Arzideh F.: Proposed classification of various limit values (guide values) used in assisting the interpretation of quantitative laboratory test result. *Clin Chem Lab Med* 2009 47/4 494–497.

---

**CHALLENGES IN EXTERNAL QUALITY  
ASSURANCE; LABORATORY FOCUS AND  
THE NEW ACCREDITATION STANDARD  
(ISO 17043) OF PROVIDERS**

---

**LOIKKANEN, M. M.**

**Ratamestarinkatu 11, FI-00520 Helsinki  
minna.loikkanen@labquality.fi**

In recent years the accreditation of providers of the External Quality Assurance (EQA) schemes has become a hot, important topic. Also participating laboratories are more aware of the need of qualified EQA programmes and services. All these aspects have given a booster to get an international accreditation standard also for the EQA field. ISO 17043 will be confirmed by the end of 2009. Among the providers of medical EQA programmes some doubts of the suitability of this ISO 17043 standard have been expressed. It has raised up issues if the standard take into account the special nature and challenges of the biological test items which are used and the frequency needed in the EQA of the laboratory medicine.

Many providers have conducted the EQA programmes according to international guides and guidelines (for example ISO/IEC Guide 43-1:1996 and ILAC-G13:2007) when the accreditation standard has been missing. Accreditation bodies have done accreditations in some countries according to these guides or they have given the recognition to the schemes instead of accreditation. Some providers have certification according to ISO 9001:2008 and also they follow the guides mentioned. The situation has been confusing especially because

meaning of the terms accreditation and certification have not been clear in different connections and cultures.

The role of EQA is understood among accredited laboratories. Anyhow participating laboratories have varying expectations what this participation should give and what do they need to improve their quality system. Labquality arranged a large client satisfaction survey in Finland and in its European client countries to get information about laboratories' expectations and needs. The results of this survey will briefly be demonstrated during the presentation. As could be expected the professional personnel, accurate schedule of the surveys and extensive and understandable reports were assessed as the most significant areas. Smooth procedures to send results to the provider and competent pricing were mentioned as issues to be improved.

When laboratories choose their EQA programme and decide which scheme to select they meet wide variety of providers with different kinds of schemes. Comparing the programmes is not simple. Design of the schemes varies on test items, data processing reports etc. The standard ISO 17043 gives criteria for providers to conduct a scheme properly. It also includes one annex (Annex 3) which includes instructions to participating laboratories how to choose the scheme and points out some important aspects to consider.

The standard 17043 will clarify the supplies and harmonise the variety of EQA programmes offered by different providers. It will also open discussion about the future needs of EQA between providers and participating laboratories to fulfil the expectations of the laboratories in their quality work.

---

## WHY EQALM?

---

GUNNAR NORDIN

European committee for External Quality Assessment  
Programmes Laboratory Medicine, Uppsala  
Sweden

In order to improve comparability of measurement results from IVD products the results must, when possible, be traceable to methods of higher order. This is of great value in a situation where data, patients and medical staff communicate over increasing areas. A laboratory result should not only be valid for the local requester, but also valid regionally and – in the optimal case – globally.

The surveillance of the results produced by the medical laboratories is performed by External Quality Assessment schemes (or Proficiency testing schemes) which are not as strictly regulated as the IVD-products. An EQA scheme might serve both as a surveillance of the competence of local laboratory as well as of the competence of the IVD-product as such. The professional EQA organizations are often small, and regionally based. The benefit of a regional based organization is the possibility of comparison of results within the region. The regional organizer does also have knowledge of the local laboratory culture and have the possibility to combine outcome from EQA with proper educational or other efforts to improve quality. But the regional EQA organizations also need the sharing of experiences and results with other regional organizations, because their customers share the same IVD-products.

In order to facilitate such cooperation between EQA-organizers in Europe, the European Committee for External Quality Assurance Programmes in Laboratory Medicine (EQALM) was created 1996 after an initiative from Adam Uldall, Denmark. The organization has today 22 European full member organizations, but members also from Africa, America and Asia. EQALM organizes a yearly symposium open for any EQA organizer, the coming symposium in Berlin July 1<sup>st</sup> 2<sup>nd</sup>. EQALM also connects people in Working Groups (WG) for various topics of mutual interest for the members. Examples of WG areas are the use of Virtual Microscopy for EQA and the optimal frequency by which EQA services should be offered. Experiences from local EQA-schemes are welcomed to be published in regular electronic paper EQAnews. More of the activities can be found on the web page [www.eqalm.org](http://www.eqalm.org).

---

## WHAT DO WE LEARN FROM THE NORDIC REFERENCE INTERVALS PROJECT (NORIP)

---

GUNNAR NORDIN

EQUALIS AB, Uppsala  
Sweden

During the period 2000–2001 more than 100 Nordic laboratories participated in the Nordic Reference Interval Project (NORIP). Each laboratory recruited at least 25 healthy participants who fulfilled specified criteria. Serum, plasma, EDTA-blood and buffy coat were collected and stored in  $-80^{\circ}\text{C}$ . 25 biochemical measurands were measured and a complete blood count were performed at the local laboratory, together with the measurement of 5 reference and control materials for the biochemical variables. All data were collected for central data treatment and common reference intervals were calculated. Through the values assigned to the reference materials most of the reference intervals are traceable to methods of higher order.

With some exceptions, laboratories have adopted the suggested reference intervals. This has been of great value for the users of laboratory results. It has been more convenient and safe to communicate laboratory results, both regarding care of the individual patient, as well as for sharing laboratory results in the scientific community and in education.

All of the NORIP reference intervals, with the suggested grouping according to age and gender may not be absolutely true. However, they have proven to be useful, and are truer than the older, locally defined reference intervals which often lacked traceability to current measurement procedures. The major issues under discussion have so far been:

For the enzymes the uncertainty of the reference intervals are large. They were only calculated for a subset of data using method from one diagnostic company, because the IFCC reference method procedures were not fully implemented at the time of the study.

The NORIP study was conducted under specified pre-analytical conditions, although not unrealistic. In daily routines these conditions are sometimes difficult to achieve. One reason for a measurement result outside the reference intervals can therefore be a preanalytical error not controlled for.

The NORIP reference intervals for creatinine are traceable IDMS reference measurement procedures. At the time of the study many laboratories still used uncompensated Jaffe-methods. A recalculation of the primary data was therefore made. A specific 'creatinine-free' serum has also been made available for laboratories to be used as 'zero



point calibrator' for the Jaffe methods which does not yet compensate for the bias due to non-creatinine chromogens.

One practical consequence of the implementation of reference intervals with metrological traceability is that the laboratories must consider the traceability for their own measurement results.

A future challenge will be to adapt the reference intervals according to changes in analytical methods. As an example the traceability of bilirubin results to a new secondary reference method recently has resulted in lower bilirubin levels. We need to decide on how large changes in the analytical procedures that can be accepted, without the change of the reference intervals.

---

[www.labtestsonline.cz](http://www.labtestsonline.cz)

**A JEHO VÝZNAM PRO PACIENTA I PRO  
PRACOVNÍKY VE ZDRAVOTNICTVÍ**

---

**LENKA NOVÁKOVÁ**

**CzEDMA, Praha  
Česká republika**

Laboratorní medicína (Evidence based medicine) je medicína založená na důkazech, které jsou měřitelné, statisticky zpracovatelné a snadno sdělitelné. Výsledky (důkazy) laboratorních vyšetření se na diagnostických rozhodnutích podílí z 70–80 %.

Lab Tests Online (dále LTO) je nový webový portál původně určený pacientům a dalším laickým uživatelům. Poskytuje ucelené informace o laboratorních vyšetřeních (o testech pomocí diagnostiky in vitro) k jejich lepší orientaci a pochopení jednotlivých vyšetření jak při nemoci, tak i při preventivních programech. Zdravotníkům slouží pro rychlou, aktuální a přehlednou orientaci v laboratorních vyšetřeních.

Projekt LTO (laboratorní testy online) byl vytvořen v roce 2001 v USA a to AACC (Americkou asociací klinické chemie) a velmi rychle expandoval do celého světa. V současné době je LTO překládán, rozšiřován a aktualizován národními odbornými společnostmi laboratorní medicíny ve spolupráci s lokálními profesními asociacemi výrobců IVD (in vitro diagnostika).

Díky licenční smlouvě mezi AACC a EDMA (European Diagnostics Manufactures Association), která byla podepsána v roce 2005, bylo členským státům EU umožněno připojit se k tomuto programu. Práce na překladech, dalším rozvíjení a modifikování obsahu konkrétních jazykových mutací vždy odráží zdravotní politiku a postupy zavedené v jednotlivých zemích, kdy klíčovou roli hraje odborná společnost a spolu s partnery EDMA a profesní národní asociací výrobců IVD (in vitro diagnostika).

LTO je nekomerční, mezinárodní a odborně garantovaný web. Existuje v několika národních verzích (USA, Velká Británie, Austrálie), mnoha jazykových mutacích – němčina, italština, španělština, polština a maďarština, připravuje se řečtina, Brazílie diskutuje s Portugalskem o společném postupu při vytváření portugalské verze, Francie podepsala smlouvu na podzim 2008 a zájem o připojení k tomuto projektu projevila i Čína. LTO v USA je pacienty využíván z 60 %, na evropském kontinentu jej pacienti vyhledávají ze 40 % a 60 % návštěvníků připadá na zdravotnické pracovníky. Návštěvnost 2008: 1,6 mil/měsíc, 1,2 mil. v USA, 0,4 mil v ostatních zemích, roční nárůst kolem 80 %.

Česká republika se připojila k tomuto programu v roce 2007 podepsáním licenční smlouvy o vzájemné spolupráci mezi Českou společností klinické biochemie ČLS JEP, EDMA a CZEDMA (Česká asociace výrobců

ců a dodavatelů diagnostik in vitro) o vytvoření české verze LTO. Prvních 98 testů bylo přeloženo vybranými zástupci ČSKB, kteří je aktualizovali a upravili pro specifické české podmínky v souladu s doporučeními dalších odborných společností. Veřejnosti byl český LTO poprvé představen 10.10.2008 při příležitosti 50. výročí ČSKB. Stránky jsou přístupné na adrese [www.labtestsonline.cz](http://www.labtestsonline.cz).

LTO v ČR okamžitě po svém spuštění zaznamenal zájem médií. Objevily se články v laických i odborných novinách a časopisech, odkaz na LTO poskytují všechny aktuální servery věnované zdraví a proběhlo několik pořadů v rozhlase. V první polovině roku 2009 se připravuje překlad dalších 100 testů a pokračování v cílené propagaci směrem k pacientům a zdravotníkům. Byla uzavřena smlouva s Medical Tribune o mediálním partnerství a podepisuje se smlouva se SÚKL o vzájemném provázání webů určených pacientům a to je LTO a [www.leky.cz](http://www.leky.cz).

Návštěvník LTO se mimo jiné dozví, co to vlastně laboratorní vyšetření jsou, k čemu slouží, jak vypadají výsledky z laboratoře, jak jim porozumět, co to jsou referenční hodnoty a jak je třeba se na laboratorní vyšetření (odběry) připravit. Dále se na rozdíl od mnoha jiných webových „zdravotnických“ portálů dozví, že všechny uvedené informace jsou garantovány odbornou společností (ČSKB JEP), kdy byly aktualizovány a seznam literatury, ze které bylo čerpáno.

V uživatelských podmínkách je jednoznačně uvedeno, že informace z LTO nejsou náhradou konzultace s odborným lékařem, jen lékař je schopen relevantně vzít v úvahu více faktorů – věk, léky, váha, alergie, další onemocnění atd.

U konkrétních vyšetření si čtenář najde název testu event. jeho další názvy, odkazy na související vyšetření a základní informace: proč se nechat vyšetřit, kdy se nechat vyšetřit, požadovaný druh vzorku, co je vyšetřováno, tzn. srozumitelný popis, jaká je funkce vyšetřovaného parametru v krvi, na čem se podílí, k čemu je/není užitečný, jakým způsobem je vzorek pro vyšetření odebrán a jestli je třeba speciální příprava před a při odběru vzorku.

Dále se jednoduchou a pochopitelnou formou seznámí s tím, k čemu je vyšetření využíváno, kdy je vyšetření požadováno, co výsledek vyšetření znamená, tzn. co znamenají zvýšené hodnoty, co naopak snížené hodnoty a další informace v souvislosti s tímto vyšetřením.

Velmi cennou součástí LTO jsou u každého vyšetření „Časté otázky“ sebrané z celého světa, seznam literatury a další odkazy.

#### **Možné motivace pacienta pro návštěvu LTO**

Pacient má žádanku a chce vědět, na jaká vyšetření půjde a k čemu slouží.

Pacient má v ruce laboratorní nález a chce vědět, co uvedené výsledky znamenají, co má/nemá v pořádku a co to znamená.

Pacient má zájem o preventivní testy za úplatu, najde si jejich nabídku a chce vědět, co znamenají, k čemu jsou a za co vlastně platí.

Pacient se trvale léčí, chodí pravidelně na testy a chce vědět více.

#### **Možné motivace zdravotníka pro návštěvu LTO**

Od lékaře se vyžaduje, aby s pacientem komunikoval o celém průběhu léčby. V LTO najde podporu, jakým způsobem lze s pacientem komunikovat o laboratorním vyšetření nebo kam se má pacient obrátit pro další informace.

Od lékaře se vyžaduje, aby se orientoval v aktuální nabídce laboratorních testů, ale laboratorní medicína je rychle expandující obor a možnosti využití jednotlivých testů se díky globálnímu sdílení a vyhodnocování zkušeností lékařů celého světa velmi rychle upřesňují a doplňují. LTO poskytuje globální obraz laboratorní medicíny a jejího využití.

Podobnou motivaci k doplňování znalostí může mít i jakýkoliv další zdravotnický pracovník, student či pracovník ve zdravotnictví s jiným než zdravotnickým vzděláním.

**LTO je přehlednou knihovnou laboratorních vyšetření dostupnou online každému uživateli počítače.**

---

**COMMON REFERENCE INTERVAL CONCEPT.  
A NEED TO DIFFERENTIATE BETWEEN  
REFERENCE INTERVALS AND DECISION LIMITS**

---

**PER HYLTOFT PETERSEN**

Reference interval is a statistical description of reference values from a well defined population/sample whereas decision limit is a value for which consequences are different for measurements below and above this limit – and a reference limit is never a decision limit.

The biological prerequisite for establishing common reference intervals is that the groups to be combined must be homogeneous, i.e., the biology must be common (racial, environmental, gender/age, etc.), the state of health for the reference individuals must be defined, and the sampling conditions, materials and storage conditions must be standardised. The analytical requirements are: the quantity must be well defined and traceable to a reference preparation or method, the procedure must be specific, bias and imprecision must be within acceptable limits, and the analytical method must be controlled by commutable control materials.

Tools are available for validating possible combinations of subgroups, such as 'criteria for partitioning' and 'transformation of distributions into rankit'. Further, it is recommended to separate the data from reference individuals into as many subgroups as possible and then test whether these can be combined.

To obtain low-risk populations the rule-out criteria depends on the quantity under study, e.g. for diabetes, for thyroid diseases, for plasma proteins etc.

For clinical decision models are decisive as the classical bi-modal diagnostic concept differs from the biochemical diagnostic concept; in the first the prevalence of disease is constant (independent of the cut-off), whereas in the latter the prevalence is decided by the chosen cut-off, e.g. plasma-glucose for diagnosis of diabetes.

---

**MONITORING OF  
HEALTHY AND PATIENTS**

---

**PER HYLTOFT PETERSEN**

Biological variation can be predictable or unpredictable. The predictable variation can be within the individual, e.g. circadian (diurnal = during the day) as for serum-cortisol, or between individuals, e.g. age, whereas the unpredictable variation is considered random variation around an individual set-point (within-subject variation, ( $CV_{\text{within-subject}}$ ) and the variation of set-points (between-subject variation ( $CV_{\text{between-subject}}$ )). Data for within- and between-variation are summarised in <http://www.westgard.com/guest36.htm>.

Some of the predictable variation, e.g. hormones during pregnancy can be transformed into a stable estimate according to the mean course by dividing the concentration by the median of the group from the same gestation week (MOM = Multiple Of Median), which facilitates the diagnostic significance.

When the individual (within-person) variations are spread according to a  $\chi^2$ -distribution the values are scattered homogeneous and all individuals can be described by the same estimated  $CV_{\text{within-subject}}$ . If not, the within-person value must be estimated for each single individual.

A popular tool for monitoring is the Reference Change Value (RCV) which is defined from the formula  $RCV = z * 2^{1/2} * CV_{\text{within-subject}}$ , which for  $z = 1.96$  ( $2p = 0.05$ ) results in  $RCV = 2.77 * CV_{\text{within-subject}}$ . This formula is easy to understand and easy to apply, but it has some serious drawbacks. Firstly, applying RCV to a series of consecutive measurements increases the probability of false changes (FP) due to the effect of repeated testing. Secondly, there is no counter hypothesis, so the power of the test is unknown. Thirdly, the probability of detecting changes depends on the sampling frequency, as too frequent sampling may miss changes because each change is too small, whereas infrequent sampling delays the detection of changes.

A solution to the problem could be to apply two different RCV-tests: the same test as RCV, but with a lower probability, e.g.  $2p = 0.002$  ( $z = 3.1$ ) and combine it with another RCV-test (also with a lower probability), but where the latest measurement is compared to the minimum value of the series. Thus the FP is reduced and the TP is optimized.

OLIVER RÁCZ, EVA SEDLÁKOVÁ  
EVA LOVÁSOVÁ, JAROSLAVA NOVÁKOVÁ

Ústav patologickej fyziológie, Lekárska fakulta  
Univerzita P.J. Šafárika  
Košice

Kyselina listová a z nej odvodené foláty sú esenciálne mikronutrienty pre človeka a pre väčšinu zvierat. Biochemické a metabolické účinky folátov a následky ich deficitu sú dobre známe. Zvýšený prívod kyseliny listovej u žien v prekoncepčnom období a v prvých týždňoch gravidity je vysoko účinnou a jednoznačne dokázanou možnosťou prevencie ťažkých foriem rázštepov neurálnej trubice novorodencov. Údaje o priaznivých účinkoch suplementácie kyselinou listovou v prevencii nádorových, kardiovaskulárnych ochorení a poklesu mentálnych funkcií vo vyššom veku sú menej presvedčivé. Kyselina listová a foláty sú rastové faktory, ktoré za určitých experimentálnych okolností (megadávky kombinované s karcinogénmi) môžu zrýchliť delenie malígne transformovaných buniek.

Diskusia o možnom zvýšenom riziku vzniku rakoviny hrubého čreva (a iných malígnít) sa obnovila koncom deväťdesiatych rokov minulého storočia, a to v súvislosti so zavedením povinnej fortifikácie múky kyselinou listovou v USA a v Kanade. Paralelne so zavedením fortifikácie došlo v oboch krajinách k zvýšenej incidencii rakoviny hrubého čreva.

Medzinárodné konzorcium expertov EFSA (European Food Safety Authority), ktorá sa konala v januári 2009 v Uppsale starostlivo zväžila všetky dostupné údaje o možnom škodlivom účinku vysokých dávok (nad 1 mg denne). Poprední odborníci z Európy a USA za spoluúčasti národných expertov Európskej únie konštatovali, že dnes prístupné údaje nevyklúčujú, ale ani nepotvrďujú negatívny účinok vysokých dávok kyseliny listovej na zdravie človeka. Napriek tomu upozornili na skutočnosť, že v krajinách Európskej únie (kde o povinnej fortifikácii sa uvažuje jedine vo Veľkej Británii) mnohí ľudia prijímajú formou rôznych suplementov, fortifikovaných nápojov a potravín viac kyseliny listovej ako 1 mg denne. Ide predovšetkým o skupinu v strednom a vyššom veku, u ktorých je možné predpokladať zvýšený výskyt latentných prekanceróz. Odporúčali upozorniť laickú verejnosť na hornú hranicu denného prívodu tohto mikronutrientu. Ďalšou rizikovou skupinou sú ľudia malignitami alebo s vyliečenou nádorovou chorobou, ktorí sú často aj mierne anemické. Neuvážené podávanie kyseliny listovej u týchto ľudí je vo svetle súčasných, aj keď nie jednoznačne potvrdených údajov nezodpovedné.

ANNA STECOVÁ, ZITA BELICOVÁ  
PETER KILIÁN

Laboratórna diagnostika Medirex, a.s., Bratislava  
Slovensko

Chronické ochorenie obličiek patrí k závažným problémom v zdravotníctve. Laboratórnymi vyšetreniami je možné zistiť už jeho skoré štádiá. Vyšetrenie glomerulovej filtrácie sa považuje za najlepší indikátor obličkovej funkcie. Za vhodné sa považujú hodnoty glomerulovej filtrácie vypočítané u dospelých pomocou rovnice vychádzajúcej z MDRD study (Modified diet in renal diseases study) alebo Cockcroft-Gaultovej rovnice, u detí pomocou Swartzovej rovnice. Samotná koncentrácia kreatinínu v sére nie je vhodná na posúdenie obličkových funkcií. Pri prepočítaní treba brať do úvahy metódu, ktorou pracovisko stanovuje kreatinín, pričom sa doporučuje používať metódy s nadväznosťou na referenčnú metódu (IDMS).

Výpočet pomocou rovníc je orientačný, preto klasické stanovenie clearance kreatinínu so zberom moča treba robiť u vegetariánov, pacientov s malnutríciou a veľmi obéznych pacientov, u ľudí so suplementáciou kreatínu, po amputáciách a strate svalovej hmoty (parézy, chronické svalové ochorenia), pri požiadavke na monitorovanie nutričného stavu, pred začatím dialyzačnej liečby.

Vyšetrenie albuminúrie: za najvhodnejšie sa považuje vyšetrenie z prvého ranného moča prepočítané na vylučovanie kreatinínu (albumín/kreatinín). Vzhľadom k citlivosti metódy, jej možnému ovplyvneniu ortostázou, námahou, ap., sa nedoporučuje vyšetrenie z 24 h zberu moča.

Vyšetrenie proteínúrie: na orientačné vyšetrenie sa môže takisto použiť 1. ranný moč, určuje sa pomer koncentrácie bielkovín v moči ku koncentracii kreatinínu (bielkoviny/kreatinín), pri náleze patologickej proteínúrie sa však naďalej doporučuje 24 h zber moča (kvantitatívna proteínúria).

Hodnotenie pomocou reagenčných prúžkov môže detekovať hematúriu, leukocytúriu, aj baktérie. Vyšetrenie močového sedimentu je nutné pri podozrení na výskyt tubulových epitelových buniek, tukových zložiek, valcov, kryštálov, plesní a parazitov.

KATARÍNA ŠIMOVIČOVÁ

Ambulancia pre deti a dospelých, Bratislava  
Slovensko

Klasickým predstaviteľom pozitívnych proteínov akútnej fázy zápalu je CRP. Bol objavený v roku 1930 v Rockefellerovom v inštitúte vedcami Tilletom Francisom. Títo zistili, že séra chorých s akútnou pneumokokovou pneumóniou precipitujú kapsulárny C-polysacharid baktérie *Streptococcus pneumoniae* a tento proteín nazvali C-reaktívny proteín - CRP. Napriek tomu sa tejto skutočnosti nevenovala mimoriadna pozornosť a až do 80. rokov 20. storočia ostával CRP skoro nepovšimnutý. Začiatkom 90. rokov sa začala „renesancia“ CRP hlavne v súvislosti s kardiovaskulárnymi ochoreniami. Odvtedy si CRP našiel svoje pevné miesto v každodennej praxi - stal sa základným laboratórnym ukazovateľom v diagnostike akútneho aj chronického zápalu a v monitorovaní a efektu jeho liečby. CRP je fylogeneticky stará molekula. Syntetizuje sa odbúrava skoro výlučne v pečňových bunkách. Charakteristickou črtou determinujúcou biologické účinky CRP je jeho schopnosť viazať fosfocholín. Vďaka nej dokáže rozpoznávať cudzie patogény a fosfolipidové súčasti poškodených buniek. Po naviazaní sa na cudzorodé častice a fagocytové bunky aktivuje komplementový systém klasickou cestou a interakciou s humorálnym a bunkovým efektorovým

systémom zápalu sa spúšťa odstraňovanie cieľových buniek. CRP je dominujúcim proteínom akútnej fázy a jeho koncentrácia sa môže za patologických stavov zvýšiť až 1000×. Zvýšená hladina CRP signalizuje spoľahlivo že v organizme prebieha chorobný zápalový proces. Zistenie jeho príčiny si ale vyžaduje ďalšie vyšetrenia aby došlo k spresneniu základnej diagnózy.

V pediatrickej praxi sa vyšetrenie hladiny CRP využíva pri podozrení na bakteriálny pôvod infekcie. Baktérie stimulujú tvorbu CRP najmohutnejšie, menej mycobaktérie a plesne, vírusy minimálne alebo vôbec. Vzostup CRP pri bakteriálnej infekcii je veľmi rýchly, behom 6-10 hod, maximum dosahuje za 24-48 hodín a k normálnym hodnotám sa vracia behom cca 4-5 dní. Všeobecne sa považuje hladina normálnych hodnôt u zdravého jedinca od 3-8 mg/l.

V ambulantnej pediatrickej praxi je stanovenie hladiny CRP veľmi významným pomocníkom pri rozhodovaní o nasadení antibiotika. Podľa pripraveného Odborného usmernenia MZ SR týkajúceho sa racionálnej preskripcie antibiotík v pediatrickej praxi je hodnota CRP 40 mg/l hraničná - pri ktorej má pediater zvážiť ordináciu ATB v súčinnosti s klinickým stavom pacienta v súčinnosti s ostatnými vyšetreniami (mikrobiologické, RTG, sono).

CRP metódou rýchleho testu priamo v ambulancii lekára z kapilárnej krvi odobratej z bruška prsta detského pacienta - kedy je výsledok k dispozícii za 3-5 min je - významným prínosom pre lekára. Môže sa tak rýchlo a čo najsprávnejšie rozhodnúť o nasadení ATB liečby alebo ju odmietnuť aj keď rodič veľmi nalieha. Predchádza tým k rezistencii na antibiotiká, ktorá stále narastá.

LUDEK ŠPRONGL

Centrální laboratoř, Šumperská nemocnice a.s.

Vyšetřování v místě péče (Point-of-care testing, POCT) zahrnuje v současné době vyšetření doma, v ambulancích jak praktických lékařů, tak specialistů, v nemocnici u lůžka a i při různých akcích na veřejnosti. Rozvoj těchto testů závisí na řadě faktorů. Patří sem dostupnost POCT, cena testů, požadavky pacientů na POCT a rozvoj technologií POCT. Hlavním faktorem ale je zřejmě rozvoj technologií a tím i možnosti rozšíření spektra testů v režimu POCT. Toto rozšíření je v zemích západní Evropy a především v USA daleko větší než v našich krajích. Nové technologie totiž umožňují jak provádět testy doma s napojením přes internet na lékaře, tak provést řadu vyšetření v ambulanci či v terénu. Rozvoj nemocničních POCT setrvává na omezeném spektru (ABR, elektrolyty, glukóza, kardiální markery), neboť naprostá většina testů je v centrální laboratoři zajištěna včas, levněji a obvykle i kvalitněji.

Testy typu glukózy, parametry koagulace, CRP, HbA1c, alkohol, laktát, hCG či lipidový profil již jsou běžné i mimo nemocniční péči, nové technologie zde pouze zvyšují zabezpečení kvality výsledků. Nově se uplatňuje v oblasti POCT rozvoj mikro-technologií a nanotechnologií, obecně rozvoj elektroniky a internetu, projekt genomu a další nové analyticko-chemické technologie. Tak lze vyšetřit široké spektrum různorodých testů – novorozenecký bilirubin, PTH, serologie (hepatitidy, HIV), bakteriologická vyšetření (rozvoj souvisí se strachem z teroristů), okultní krvácení.

S rostoucím spektrem a počtem vyšetření POCT ale rostou i nároky na kvalitu výsledků, obdobně jako je tomu v laboratořích. Cílem POCT v jakékoliv formě je péče o pacienta s maximalizací výhod a minimalizací rizik za přiměřenou cenu. Dalším cílem je vyhovět požadavkům lékaře a pomoci mu řešit problém.

Při zajištění jakosti jak celé péče o pacienta, tak jen vyšetření POCT je třeba vědět, kde jsou zdroje chyb. Mohou totiž nastat v mnoha částech celého procesu, včetně chyb při výběru vyšetření, chyby při hodnocení výsledků, chyby či zpoždění při určení diagnózy, chyby v analytickém procesu či chyby v preanalytické fázi. Chyby lze hodnotit, pokud se hodnotí celý proces na principu: správný pacient je vyšetřen vhodným testem, bez záměny vzorku, výsledek je správný a je dodán včas a správně vyhodnocen.

POCT snižuje riziko chyb redukcí kroků v preanalytické a postanalytické části. Navíc současné technologie v režimu POCT jsou zárukou validních výsledků. Úspěšná implementace POCT záleží na systému jeho řízení a správném zařazení do celého systému péče o pacienty.

JAN TRBUŠEK

Abbott Laboratories, s.r.o.; Diagnostic Division

#### ABSTRAKT

Firma Abbott Laboratories má téměř 40ti letou zkušenost v oboru laboratorní diagnostiky a za tuto dobu se její vysoce kvalitní testy a analyzátory staly již nedílnou součástí laboratorního prostředí.

Neustávající dynamický rozvoj oboru laboratorní medicíny a zvyšující se nároky na kvalitu produktů jsou pro firmu Abbott Laboratories impulzem k vývoji nových produktů, a to jak diagnostických testů, tak a analytických systémů.

V letošním roce bude doplněna rodina analyzátorů ARCHITECT o nejmenšího zástupce biochemických systémů, analyzátor ARCHITECT c4000. Jeho propojení se stávajícím imunoanalytickým systémem ARCHITECT i1000<sub>SR</sub> do podoby integrovaného analyzátoru ARCHITECT ci4100 pak umožní i menším laboratořím úspěšnou konsolidaci CC a IA testů na jedné platformě. To dovoluje stanovit široké spektrum parametrů z jedné primární zkumkavky.

Vedle instrumentálního vybavení laboratoří firma uvedla nebo v nejbližší době uvede na trh několik inovativních markerů, které vycházejí vstříc náročným požadavkům kliniků z řady oblastí medicíny, např.:

**MPO** (myeloperoxidáza) – prognostický ukazatel vzniku kardiovaskulárních příhod, **NGAL** – revoluční parametr v diagnostice akutního renálního poškození, nádorové markery malobuněčného karcinomu plic – **ProGRP**, a karcinomu ovaria – **HE4**, **HCV Core Ag** k přímému stanovení viru hepatitidy C aj.

Zcela novou oblastí, ve které se firma Abbott angažuje, je vzdělávání pracovníků laboratoří. V minulé roce byl veřejnosti představen ambiciózní projekt s názvem **CEVA** (Centrum Edukace a Výzkumu Abbott). Jedná se o konzultačně-edukační platformu, která je výsledkem spolupráce společnosti Abbott Laboratories s. r. o. ČR s Lékařskou fakultou Univerzity Karlovy v Plzni a Klatovskou nemocnicí a. s., přičemž se na ní podílejí přední odborníci na různé oblasti laboratorní medicíny i klinických oborů z celé České republiky. Tento inovativní projekt je primárně určen zákazníkům firmy Abbott a je zaměřen na rozvoj kooperace mezi komerčním sektorem, laboratorními obory, klinickou aplikací pro laboratorní diagnostiku a výzkumem. Snahou tvůrců projektu CEVA je vedle poskytování odborných konzultací k interpretaci laboratorních výsledků a podpory odborných diskusí pracovníků v laboratorní medicíně rovněž šíření aktuálních poznatků vědy a výzkumu v oblasti laboratorní diagnostiky, zefektivnění podpory a zlepšení edukce uživatelů diagnostiky a analytických systémů firmy Abbott a rovněž urychlení zavádění nových laboratorních metod do klinické praxe.

Bližší informace o projektu CEVA najdete na stránkách [www.ceva-edu.cz](http://www.ceva-edu.cz).

---

## POCT U PEDIATRICKÝCH PACIENTOV V INTENZÍVNEJ STAROSTLIVOSTI

---

ALENA VASILENKOVÁ<sup>1</sup>  
DAGMAR SYROVÁ<sup>1</sup>, DARINA BEHÚLOVÁ<sup>1</sup>  
JOZEF PONEC<sup>1</sup>, PAVOL KUNOVSKÝ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Oddelenie laboratórnej medicíny  
Detská fakultná nemocnica s poliklinikou, Bratislava,  
<sup>2</sup>Detské kardiocentrum Národného ústavu srdcových  
a cievnych chorôb v Bratislave, a. s.

Pediatrický pacient so svojimi špecifikami (metabolická nestabilita, anatomické a fyziologické odlišnosti, imunologická nezrelosť, vyššia akútnosť ochorení) vyžaduje špeciálny prístup v diagnostickom a liečebnom procese. U kriticky chorých pediatrických pacientov musí byť zabezpečená okamžitá dostupnosť vyšetrenia koncentrácií elektrolytov a krvných plynov z minimálneho objemu vzorky. Tieto požiadavky rieši analýza pri lôžku pacienta (POCT), ktorá výrazne zrýchľuje a optimalizuje diagnostický proces. Systém realizácie vyšetrení pri lôžku pacienta bol v DFNSP Bratislava implementovaný v roku 2001 na oddelení pooperačnej starostlivosti a operačných sálach Detského kardiocentra inštaláciou 2 analyzátorov STAT Profile pHox Plus (Nova Biomedical, USA) na vyšetrenie parametrov acidobázickej rovnováhy, oximetrie, elektrolytov a glukózy. Proces implementácie zahŕňal hlavne zaškolenie a zúčastňujúci sa POCT, zavedenie modelu kontinuálnej kontroly a hodnotenia kvality a efektivity prevádzky. Od roku 2005, po vytvorení samostatného Detského kardiocentra SR, zostali analyzátory pod supervíziou pracovníkov centrálného laboratória OKB DFNSP. Ďalšou etapou zavádzania POCT v DFNSP bola inštalácia analyzátorov STAT Profile Critical Care Xpress (Nova Biomedical, USA) na Jednotke intenzívnej starostlivosti Oddelenia patologických novorodencov a Detskej klinike anestéziológie a intenzívnej medicíny v roku 2008. Tieto analyzátory spĺňajú všetky náročné kritériá pre POCT, sú schopné poskytovať 19 meraných a 30 vypočítaných parametrov urgentnej medicíny z malého objemu vzorky (50–150 µl) s krátkou dobou analýzy. Sú nenáročné na obsluhu, s minimálnou údržbou, s automatickou „on-board“ kontrolou kvality, s intuitívnym softwarom a softwarom pre diaľkovú správu. Nenahraditeľným prvkom sa stal tiež elektronický prenos dát z analyzátoru POCT do LIS centrálného laboratória a do NIS.

Napriek viacerým úskaliam (merania „nelaboratornými“ pracovníkmi, vyššie prevádzkové náklady) analýzy POCT v DFNSP sa významne podieľajú na zlepšení diagnostického a monitorovacieho procesu a tým aj kvality života pediatrických pacientov v intenzívnej starostlivosti.

---

**POCT:  
JEHO MOŽNOSTI A NEDOSTATKY**

---

**TOMÁŠ ZIMA, PETR ŠTERN**

**Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky  
1. LF UK a VFN Praha**

Na počátku 21. století stojí „proti sobě“ dvě oblasti laboratorní diagnostiky, které se rozvíjejí a to POCT a konsolidace a centralizace laboratoří. Často se na tyto směry hledí, že se jedná o protichůdné tendence, avšak tyto trendy laboratorní diagnostiky se musí vzájemně doplňovat. Primární snahou indikujícího lékaře je rychlost získání laboratorní výsledku, která má někdy oprávnění z hlediska rychlého rozhodování (diagnostika akutních stavů) nebo snaha poskytovat kvalitní a rychlé služby pacientovi (vyšetření a diagnostika v rámci jedné návštěvy).

S požadavky na POCT vyšetření se setkáváme zejména v oborech intenzivní medicíny (ARO, JIP, operační sály, kardiocentra, záchranná služba) nebo při vyšetřování v terénu (praktičtí lékaři).

Jedním z příkladů efektivního zavádění POCT je centralizovaný systém glukometrů ve velkých zdravotnických zařízeních, kdy odborným garantem, který vyhodnocuje kvalitu analytických procesů je laboratoř, výsledek je součástí údajů v LIS a lékař jej má okamžitě k dispozici.

Spektrum analytů pro vyšetření POCT neustále narůstá a zahrnuje kromě nejrozšířenějšího stanovení glukózy,

iontů a ABR též kardiomarkery, koagulační parametry, drogový screening, ale i vyšetření infekčních nemocí, renálních funkcí a řadu dalších.

Při rozhodování o zavedení systému POCT musíme zvážit některé faktory – zrychlení diagnostiky a zlepšení kvality péče o pacienta, zajištění kvality stanovení a ekonomickou analýzu.

Výhodou POCT je rychlý výsledek bez transportu materiálu do laboratoře, většinou malý objem odebíraného materiálu, jednoduché a snadné provedení. K nevýhodám POCT patří vyšší náklady na test, nestandardnost provedení, různá kvalita personálu provádějícího vyšetření, riziko nadužívání vyšetření.

Celosvětově stoupá počet POCT vyšetření o cca 10% ročně (klinicko-biochemická vyšetření jen o 1% ročně) a tento trend bude pokračovat a bude se rozšiřovat na testování pacientů či osob doma. Budou se propojovat POCT přístroje prostřednictvím mobilních systémů komunikací s přenosem údajů k lékaři s možností případné okamžité reakce při dosažení kritických hodnot. Přístroje budou miniaturizovány a bude využíváno neinvazivní testování či monitorace parametrů.

Při rozvoji POCT musíme dbát na dodržení několika základních pravidel: edukovat osoby provádějící vyšetření, systémy musí být zapojeny do systému EHK s kontrolou kalibrace přístrojů, přístroje musí splňovat legislativní podmínky pro in vitro diagnostiku, musí být zajištěn kvalifikovaný servis a je třeba znát údaje o porovnatelnosti výsledků s „klasickými“ analytickými systémy. Ve zdravotnických zařízeních by odbornou garancí nad systémy POCT měla provádět laboratoř.



**IN EXTENZO – LABKVALITA  
ČLÁNKY**

---

**ERNDIM - SYSTÉM EXTERNÉHO HODNOTENIA  
KVALITY BIOCHEMICKEJ DIAGNOSTIKY  
DEDIČNÝCH METABOLICKÝCH PORÚCH**

---

**DARINA BEHÚLOVÁ, ANNA ŠALINGOVÁ  
JOZEFÍNA ŠKODOVÁ, DARINA HOLEŠOVÁ  
JOZEF PONEC, JANA PEREČKOVÁ  
CLAUDIA ŠEBOVÁ, MÁRIA OSTROŽLÍKOVÁ**

**Centrum dedičných metabolických porúch  
Oddelenie laboratórnej medicíny  
Detská fakultná nemocnica s poliklinikou, Bratislava  
Slovenská republika**

## SÚHRN

Cieľom práce je charakterizovať medzinárodný systém externého hodnotenia kvality biochemickej diagnostiky dedičných metabolických porúch ERNDIM a analyzovať výsledky, ktoré v ňom dosiahlo Centrum dedičných metabolických porúch (CDMP) Oddelenia laboratórnej medicíny Detskej fakultnej nemocnice s poliklinikou v Bratislave. ERNDIM bol založený v roku 1994. Úlohou jeho neustále sa rozširujúcich činností je zabezpečiť v Európe spoľahlivé a štandardizované vyšetrenia slúžiace na diagnostiku, liečbu a monitorovanie dedičných metabolických porúch. Za týmto účelom poskytuje systém v súčasnosti viac ako 250 špecializovaným biochemicko-genetickým laboratóriám 9 schém externej kontroly kvality. ERNDIM rozvíja navyše bohaté edukačné aktivity. Prostredníctvom svojej webovej stránky podáva účastníkom ERNDIM ako aj širokej odbornej verejnosti užitočné praktické informácie o diagnostike DMP. Úzko spolupracuje s medzinárodnou organizáciou SSIEM a v súčasnosti je zapojený do rozsiahleho projektu Eurogentest. Začiatok účasti CDMP v ERNDIM, s 3 kontrolnými schémami, aminokyseliny kvantitatívne, špeciálne analýzy v sére a v moči, sa datuje do roku 1998. V rokoch 2001 a 2004 sa Centrum zapojilo do 2 ďalších schém Diagnostic Proficiency Testing (DPT) a organické kyseliny kvantitatívne. Dosahované výsledky v 4 schémach boli veľmi dobré, v schéme DPT vynikajúce. V súčasnosti je nutné zdôrazniť, že vykonávanie vysoko sofistikovaných biochemicko-genetických analýz a poskytovanie expertných záverov špecializovaným laboratóriom bez externého hodnotenia kvality môže viesť k nesprávnym nálezom s následným poškodením zdravia až ohrozením života vyšetrovaných pacientov.

**Kľúčové slová:** *dedičné metabolické poruchy, biochemicko-genetická diagnostika, externé hodnotenie kvality, kontrolné schémy*

## SUMMARY

The aim of the paper is to characterize international system of External Quality Assurance of biochemical

diagnosis of inherited metabolic diseases ERNDIM, and to evaluate results achieved in the Centre of Inherited Metabolic Diseases (CIMD) of the Department of Laboratory Medicine in the University Children's Hospital Bratislava. ERNDIM was established in 1994. The goal of its permanently growing activities has been to ensure reliable and standardised procedures for diagnosis, treatment and monitoring of inherited metabolic diseases in Europe. To achieve this goal, the system is providing for more than 250 specialised biochemical genetic laboratories 9 external quality control schemes at present. In addition, ERNDIM has been developing plenty of educational activities. Via own Website it has been offering useful practical information about diagnosis of inherited metabolic diseases to ERNDIM participants as well as to various medical experts. ERNDIM has been cooperating closely with SSIEM and up to date, it is involved in large project Eurogentest. The participation of CIMD in ERNDIM started in 1998 by performing of 3 control schemes: amino acids quantitative, special assays in serum and in urine. Since 2001 and 2004 the Centre has been taking part in further 2 schemes Diagnostic Proficiency Testing (DPT) and organic acids quantitative, respectively. The achieved results were very good in 4 schemes and DPT scheme was evaluated as excellent. Nowadays it is necessary to emphasise that providing of highly sophisticated biochemical genetic analyses and complex expertises by the specialized laboratory without external quality assurance could lead to findings which may harm the health or cause even a life-threatening condition in investigated patients.

**Key words:** *inherited metabolic diseases, biochemical genetic testing, external quality assurance, control schemes*

## ÚVOD

Dedičné metabolické poruchy (DMP) tvoria jedno z najmladších odvetví medicíny. Prvé 4 ochorenia opísal geniálny britský lekár a biochemik Sir Archibald Garrod pred viac ako sto rokmi (4). Enormný vzostup novoobjavených DMP nastal v posledných desaťročiach minulého storočia a začiatkom nového milénia. Počet týchto metabolických ochorení sa pohybuje v súčasnosti okolo 1000 (7). Jednotlivé poruchy sú síce pomerne zriedkavé, avšak kumulatívny výskyt DMP odhadujú skúsení odborníci až na 0,8–0,9 percent živonarodených (8). Znamenalo by to, že najmenej 1 z každých 125 narodených jedincov trpí geneticky podmieneným metabolickým ochorením.

Diagnostiku a monitorovanie pacientov so suspektnými i potvrdenými DMP zabezpečujú na celom svete špecializované biochemicko-genetické laboratória. Vykonáva sa v nich široká škála náročných a vysoko sofistikovaných analýz v telesných tekutinách, ktoré zahŕňajú niekoľko stoviek metabolitov a enzýmov. Na

rozdiel od „klasických“ klinicko-biochemických laboratórií má vyšetrenie pacienta na týchto pracoviskách podstatne komplexnejší charakter. Spočíva nielen v cieľnom vyšetrení markerov. Priamo v laboratóriu sa na základe ich interpretácie musí postaviť, resp. vylúčiť diagnóza konkrétnej DMP u suspektného pacienta, alebo sa musí zhodnotiť metabolická kompenzácia dokázanej DMP u monitorovaného pacienta.

Klinickí lekári sa pri diagnostike, terapii, monitorovaní a celkovom manažmente pacienta s DMP v plnom rozsahu spoliehajú na nálezy a expertné závery špecializovaného laboratória. Nesprávne výsledky alebo nesprávna interpretácia analýz môže mať preto za následok namiesto úpravy metabolickej poruchy jej zhoršenie alebo nástup závažného metabolického rozvratu. K poškodeniu pacienta by viedla aj neadekvátna liečba nasadená na základe nesprávne určenej diagnózy v laboratóriu alebo naopak absencia špecifickej terapie pri prehliadnutí DMP laboratórnym pracoviskom. Ďalšími ďalekosiahlymi následkami nedostatkov pri biochemicko-genetickom vyšetrení môže byť neposkytnutie genetického poradenstva alebo znemožnenie vykonania cieľenej prenatalnej diagnostiky v postihnutej rodine.

Bolo preto zákonité, že v 90. rokoch minulého storočia sa naliehavo prejavila potreba zvýšiť správnosť, presnosť, reprodukovateľnosť a harmonizáciu laboratórneho vyšetrenia na poli DMP. Naplnenie týchto cieľov sa mohlo pritom opierať o dlhoročné skúsenosti dosiahnuté v systémoch internej a externej kontroly kvality „klasickej“ klinickej biochémie implementovaných už v priebehu 70. a 80. rokov 20. storočia (3,6).

#### **ERNDIM – história, ciele, aktivity a štruktúra**

Rozhodnutia klinických lekárov, týkajúce sa diagnostiky, monitorovania, liečby a prognózy pacientov s dedičnými metabolickými poruchami, závisia zásadným spôsobom na výsledkoch biochemických vyšetrení využívajúcich vysoko špecializované technológie a prístroje a na interpretácii týchto nálezov erudovaným personálom laboratórneho pracoviska (1). *Prvé kroky smerujúce k implementácii externého hodnotenia kvality (External Quality Assurance, EQA) na poli biochemicko-genetickej diagnostiky DMP urobili zariadení lekári a biochemici už v roku 1991. Ich žiadosť o grant na ambiciózný projekt Európskej únie (EU) bola neúspešná. Ďalšie úsilie odborníkov z viacerých európskych krajín (Holandsko, Belgicko, Francúzsko, Veľká Británia a ďalšie) sa preto neskôr koncentrovalo na žiadosť o grant EU sústreďujúci sa na Programy hodnotenia kvality BIOMED-1 (Biomedical and Health Research Programme). Po schválení tohto grantu bol v Maastrichte 5. septembra 1994 formálne zaregistrovaný ERNDIM, ktorý sa dodnes štandardne používa ako skratka oficiálneho, ale dlhého názvu European Research Network for evaluation and improvement of screening, Diagnosis and treatment of Inherited disorders of Metabolism. Ako výstup grantu BIOMED-1 sa dosiahlo etablovanie prvých 4 schém kontroly kvality a zapojenie viac ako 100 laboratórií do*

jednej alebo viacerých schém. Napriek mimoriadnemu pokroku bolo nevyhnutné pokračovať a rozširovať celý program, čo sa podarilo v roku 1998 schválením žiadosti o ďalší grant EU BIOMED-2. Vďaka nemu sa postupne zaviedli ďalšie kontrolné schémy, rozšírili sa európske centrá poskytujúce kľúčovú schému Diagnostic Proficiency Testing (DPT), obnovil sa zoznam európskych biochemicko-genetických laboratórií a rozvíjali sa nové edukačné aktivity (1).

Schémy EQA, ktoré zabezpečuje ERNDIM, sú základnou cestou pre zvýšenie kvality, spoľahlivosti a porovnateľnosti výsledkov biochemicko-genetických vyšetrení predovšetkým v rámci Európy. Opierajú sa o medzinárodné normy a odporúčania (3). *Implementácia externej kontroly kvality na poli diagnostiky DMP na národnej úrovni nie je realistická v malých ako aj veľkých štátoch. Počet zúčastnených špecializovaných laboratórií by bol v ktorejkoľvek krajine príliš malý pre zmysluplné štatistické posúdenie výsledkov. Počet účastníkov ERNDIM z európskych i niektorých mimoeurópskych krajín sa zvýšil od roku 1994 do roku 2007 zo 123 na 268 laboratórií. Výsledky týchto pracovísk by mali byť spoľahlivo využiteľné pre diagnostiku, monitorovanie a liečbu pacienta kdekoľvek v Európe, nezávisle od toho, v ktorej krajine bol pacient laboratórne vyšetrený a v ktorej je aktuálne liečený (1,3).*

Okrem EQA sa od svojho založenia ERNDIM sústreďuje aj na rozvíjanie početných *edukačných aktivít*. Za kľúčové sa považujú ERNDIM mítingy organizované na výročných sympóziách prestížnej organizácie SSIEM (*Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism*) združujúcej odborníkov z celého sveta pracujúcich na poli diagnostiky, liečby alebo výskumu DMP. Pre účastníkov DPT schém v 5 európskych centrách sú „povinné“ paralelne a uzavretým spôsobom prebiehajúce stretnutia, počas ktorých sa detailne a veľmi otvorene diskutujú každoročné výsledky. Od roku 2001 na ne nadväzuje ERNDIM míting prístupný pre všetkých účastníkov SSIEM sympózia. Jeho program sa sústreďuje vždy len na jednu skupinu dedičných metabolických porúch s dôrazom na ich klinické prejavy, úskalia laboratórnej diagnostiky a prezentáciu úspešnosti či zlyhania ich analytiky a interpretácie v kontrolných schémach. ERNDIM podporuje tréning pracovníkov biochemicko-genetických laboratórií z menej rozvinutých štátov na špičkových pracoviskách vo vyspelých krajinách, aby sa postupne vyrovnával rozsah a kvalita poskytovaných služieb. Novou spoločnou iniciatívou ERNDIM a SSIEM sú tréningové dni pre laboratórných pracovníkov predchádzajúce výročným sympóziám SSIEM (9).

Mimoriadny význam malo zapojenie ERNDIM do *rozsiahleho medzinárodného projektu EU Eurogentest*. Kľúčovým cieľom bolo rozšírenie účasti biochemicko-genetických pracovísk v EQA v spojení so správnou laboratórnou praxou v internej a externej kontrole kvality. V rámci tejto kooperácie sa každý rok konajú mítingy národných zástupcov všetkých členských štátov EU. Ich náplňou je postupne definovať a hľadať rieše-

nia pre individuálne i všeobecné nedostatky a potreby EQA v biochemicko-genetickej diagnostike v krajinách EU (2,10). Na vynikajúcej úrovni sa podarilo vytvoriť novú spoločnú stránku ERNDIM/Eurogentest (3,9). Nenahraditeľnou pomocou pre odborníkov je na nej novovytvorený zoznam špecializovaných laboratórií s detailnými údajmi o poskytovanej laboratórnej diagnostike. V roku 2007 obsahoval zoznam 130 pracovísk, väčšinou univerzitných centier, ktoré vykonávali 480 rôznych špeciálnych vyšetrení. K ďalším neoceniteľným pomôckam pre odborníkov i širokú verejnosť patria na webovej stránke vypracované vyšetrovacie algoritmy, metabolická mapa a aktuálne informácie z oblasti diagnostiky DMP.

*Organizáciu ERNDIM* zastrešuje Dozorná rada s funkčným obdobím 5 rokov. Tvoria ju 4 až 14 členovia, ktorí pochádzajú najmenej zo 4 členských krajín EU. Rada volí Výkonný výbor, zodpovedný za administráciu všetkých aktivít, pozostávajúci z predsedu, sekretára, pokladníka a zástupcu kontrolných schém. Dozorná rada a Výkonný výbor sú v úzkom spojení s poskytovateľmi kontrolných schém, s Vedeckou radou a s Národnými expertmi v jednotlivých krajinách.

#### ERNDIM – kontrolné schémy

V súčasnosti je v rámci ERNDIM k dispozícii 9 schém kontroly kvality pre biochemickú diagnostiku DMP. Uvedené sú prehľadne v tabuľke 1 spolu s počtom participujúcich laboratórií v roku 2008 a poskytovateľmi schém kontroly kvality. Schémy sa delia na dve skupiny: kvantitatívne a kvalitatívne.

*Kvantitatívne schémy* sú jednoznačnými a najviac priamočiarými typmi EQA. Účastníci kvantifikujú príslušné metabolity v umelo pripravenej zmesi, napr. požadovanú škálu aminokyselín pridaných v známych množstvách do dialyzovaného séra. Performance (výkonnosť) sa hodnotí a vyjadruje na základe správnosti a presnosti bez zapojenia akéhokoľvek prvku interpretácie. Detailne, u účastníkov sa hodnotí správnosť, presnosť, výťažnosť a linearita pre každé laboratórium a porovnávajú sa výsledky medzi laboratóriami. Pri výbere a príprave vzoriek sa kladie dôraz najmä na koncentrácie metabolitov, ktoré musia byť klinicky relevantné a zahŕňajú nízke i vysoké hladiny. Tieto schémy dokážu identifikovať konkrétne problémy individuálnych laboratórií, ale nenaznačujú ich riešenia. Kritériá pre uspokojivú výkonnosť (Satisfactory Performance) boli odvodené empiricky na základe štatistiky v skupine účastníkov bez snahy určiť, aké nastavenie je požadované vo vymedzenej klinickej oblasti (3,6). Do skupiny kvantitatívnych EQA schém patria aminokyseliny, organické kyseliny, špeciálne analýzy v sére a v moči, puríny a pyrimidíny, cystín v leukocytoch.

V *kvalitatívnych schémach* je interpretácia obvykle založená viac na poznaní určitého obrazu ako na presnosti meraní v prirodzených vzorkách biologického materiálu od autentických pacientov. Niektoré schémy pokrývajú analýzu menšej skupiny metabolitov ako sú acylkarnitíny

v suchej kvapke krvi alebo organické kyseliny v moči. Naopak, DPT schéma zahŕňa širokú škálu rôznorodých stanovení. V oboch prípadoch je však cieľom týchto meraní stanovenie alebo vylúčenie diagnózy DMP a odporúčania ďalších vyšetrení pre potvrdenie nálezu v rámci diferenciálnej diagnostiky. Tieto schémy si vyžadujú ako hlboké poznatky o DMP, tak aj analytickú zručnosť. Pri zlyhaní v týchto schémach je možné v jednotlivých prípadoch odhaliť jeho jednotlivé príčiny (analytické, interpretačné, organizačné), čo môže aspoň teoreticky viesť ku kontinuálnej náprave a zlepšovaniu výkonov (5,6). Výrazná edukačná zložka týchto schém spočíva jednak v obdržaní autentických vzoriek od pacientov s DMP, ktorí sa v rutinej praxi môžu vyskytnúť veľmi raritne, jednak v kolektívnej diskusii o výsledkoch na uzavretom DPT mítingu ERNDIM počas výročného sympózia SSIEM, ale aj na iných fórach (6).

Enormný rozvoj biochemicko-genetickej diagnostiky v posledných rokoch vedie k permanentnej potrebe rozvoja nových schém kontroly kvality. V súčasnosti prebiehajú v rámci ERNDIM dve *pilotné štúdie*, ktoré by mali viesť k zavedeniu dvoch nových kontrolných schém pre lyzozómové enzýmy a kongenitálne poruchy glykozylácie.

Tab. 1. Kontrolné schémy, ktoré ERNDIM poskytoval v roku 2008, početnosť zúčastnených laboratórií a poskytovateľa schém

Schéma	Počet účastníkov	Poskytovateľ
Aminokyseliny kvantitatívne	200	SKZL
Špeciálne analýzy v moči	134	SKZL
Špeciálne analýzy v sére	176	SKZL
Organické kyseliny kvantitatívne	76	SKZL
Puríny a pyrimidíny	51	SKZL
Organické kyseliny kvalitatívne	159	Sheffield/ Heidelberg
Acylkarnitíny	75	Londýn
Cystín v leukocytoch	28	Leeds
DPT Amsterdam/Nijmegen	19	Amsterdam/ Nijmegen
DPT Praha	18	Praha
DPT Sheffield	21	Sheffield
DPT Lyon	21	Lyon
DPT Bazilej	22	Bazilej

Vysvetlivky: SKZL – Dutch Foundation for Quality Assessment in Clinical Laboratories, Nijmegen; mestá označujú sídla príslušných univerzitných metabolických centier

Bez ohľadu na počet schém, do ktorých je laboratórium v príslušnom roku zapojené, získava jeden Certifikát o účasti a výsledkoch (Certificate of Participation and Performance) signovaný predsedom ERNDIM. Prehľad-

ne sú na ňom uvedené schémy, ktorých sa pracovisko v danom roku zúčastnilo, a zároveň sú na ňom jasne vyznačené výsledky, ktoré v jednotlivých schémach, resp. vybraných analýzach, dosiahlo v zmysle splnenia alebo nenaplnenia požadovanej uspokojivej výkonnosti (Satisfactory Performance). Okrem Certifikátu laboratórium dostane od poskytovateľa každej schémy, ktorej sa počas daného roku zúčastňovalo, aj Ročnú správu (Annual Report). Sú v nej detailne uvedené všetky výsledky laboratória, ich hodnotenie a porovnanie s výsledkami celej skupiny participujúcich laboratórnych pracovísk v príslušnej schéme.

#### **ERNDIM - účasť a výsledky dosiahnuté v CDMP**

Centrum dedičných metabolických porúch Oddelenia laboratórnej medicíny Detskej fakultnej nemocnice s poliklinikou Bratislava sa zapájalo do jednotlivých schém kontroly kvality ERNDIM postupne. Účasť v EQA bola determinovaná jednak prístrojovým vybavením, jednak kvalifikovaným personálnym obsadením pracoviska, ktoré umožňovali vykonávanie jednotlivých náročných biochemicko-genetických vyšetrení. V roku 1998 sa CDMP zapojilo do prvých troch kvantitatívnych schém: aminokyseliny, špeciálne analýzy v sére a v moči. V roku 2001 sa laboratórium zaradilo medzi prvých účastníkov kvalitatívnej schémy DPT poskytovanej pražským centrom ERNDIM. Podmienkou participácie bolo vykonávanie spektra analýz umožňujúcich detekciu porúch metabolizmu aminokyselín, organických kyselín, mukopolysacharidov a oligosacharidov, purínov a pyrimidínov. Počas prvých rokov muselo pracovisko využiť v prípade organických kyselín možnosť vykonania týchto vyšetrení vo vybraných vzorkách v tzv. „cluster“ laboratóriu. Stanovenie pyrimidínov a purínov poskytuje až doteraz pre CDMP v Bratislave zahraničné „cluster“ laboratórium, keďže na Slovensku tieto špeciálne vyšetrenia nie sú stále dostupné. V roku 2004 sa Centrum zapojilo do ďalšej kvantitatívnej schémy organické kyseliny, čo zároveň výrazne zjednodušilo schému DPT.

Od roku 2004 je teda *CDMP účastníkom 4 kvantitatívnych schém ERNDIM*. V prvom štvrťroku obdrží od poskytovateľa každej schémy 8 (4 páry) lyofilizovaných vzoriek séra alebo moču. Ide v skutočnosti o vzorky pripravené z poolovaných dialyzovaných biologických materiálov s prídavkami stanovovaných metabolitov. Analýzy sa v každej schéme vykonávajú mesačne od apríla do decembra s prestávkou v auguste. Laboratórium zadáva výsledky na webovú stránku poskytovateľa podľa priloženého kalendára, pričom možnosť odoslania výsledkov sa končí o polnoci príslušného „deadline“ dátumu. *Dosiahnuté výsledky v jednotlivých schémach je možné hodnotiť v CDMP ako veľmi dobré*. Pre ilustráciu uvádzame, že požadovaná uspokojivá výkonnosť bola v roku 2008 priznaná všetkým hodnoteným špeciálnym analýzám, t.j. 4 metabolitom v sére a 6 metabolitom v moči, ďalej 21 aminokyselinám zo spektra 25 hodnotených a taktiež 17 organickým kyselinám v profile 18 hodnotených.

Poskytovateľ *kvalitatívnej DPT schémy pre CDMP*

(ERNDIM DPT Centrum Praha) posíla v priebehu marca 6 prirodzených tepelne opracovaných a konzervovaných vzoriek moču od autentických pacientov. Jedna z nich je vždy tzv. „common sample“ rozosielená do všetkých laboratórií participujúcich v DPT. Medzi vzorky bývajú náhodne zaradené aj moče získané od pacientov bez dedičnej metabolickej poruchy a naopak, ktorýkoľvek z pacientov môže byť postihnutý aj viac ako jednou DMP. Cieľom je imitovať v maximálnom možnom rozsahu rutinnú prácu biochemicko-genetického diagnostického pracoviska. Laboratórium dostane pri každom pacientovi základné informácie o klinickom náleze a o jeho liečbe, ak je podávaná. Do kontrolnej schémy je v laboratóriu zapojený celý tím pracovníkov - analytici, laboranti, lekári. Najprv sa indikujú relevantné vyšetrenia, po ich vykonaní nasleduje vyhodnotenie vedúce k stanoveniu diagnózy konkrétnej DMP a k odporúčaniam o ďalších vyšetreniach, eventuálne liečbe a manažmente pacienta. Kontrolná schéma je rozdelená do 2 cyklov, pričom na diagnostiku 3 patientských vzoriek sú vyčlenené presne 3 týždne. Priložený protokol pre každého pacienta sa vyplňa v angličtine v rozsahu cca 2-3 strán formátu A4 a t.č. sa zasiela poskytovateľovi prostredníctvom e-mailu, výnimočne faxom. Od roku 2010 sa budú údaje zadávať cez web. Všetky DPT centrá majú jednotný skórovací systém, ktorý umožňuje porovnávať výsledky EQA jednotlivých zúčastnených laboratórií. Pri každej vzorke sa hodnotia 3 kritériá. Je to *analytická výkonnosť*: uspokojivá - 2 body pre korektný výber a správne výsledky vyšetrení, 1 bod - čiastočne správne výsledky a ich výber, 0 bodov - nesprávny výber a nesprávne nálezy; *interpretačná schopnosť*: 2 body - za správnu diagnózu, 1 bod - užitočný, ale neúplný diagnostický záver, 0 bodov - nesprávne určená diagnóza, prehliadnutá DMP alebo diagnóza určená u pacienta bez DMP; *odporúčania pre ďalšie vyšetrenia*: 1 bod - správne indikované vyšetrenia, 0 bodov - nesprávne alebo zbytočné analýzy. Body za jednotlivé vzorky a súčet bodov za celý rok sa vyjadruje aj v percentách vychádzajúcich z maximálneho možného počtu dosiahnutých bodov. *Výsledky dosiahnuté v CDMP sú vynikajúce*. V 47 hodnotených vzorkách pracovisko neprehliadlo žiadnu diagnózu, drvivú väčšinu DMP identifikovalo správne. Čiastočne správne (identifikácia správnej skupiny DMP) stanovilo 5 diagnóz a to v dôsledku nedostatočného prístrojového vybavenia. S týmto deficitom súviseli aj parciálne správne výsledky analýz v príslušných vzorkách. Odporúčania boli korektné a špecifické pre všetkých pacientov. Výsledky CDMP a ich porovnanie s priemernými výsledkami všetkých zúčastnených laboratórií (počet pracovísk z vyspelých i menej rozvinutých krajín sa pohyboval od 18 do 22) sú prehľadne uvedené v tabuľke 2.

**Tab. 2. Vzorky vyšetrené v schéme ERNDIM DPT Praha v rokoch 2001–2008, porovnanie priemerných výsledkov dosiahnutých všetkými zúčastnenými laboratóriami s výsledkami CDMP Bratislava**

Rok	Vzor-ka	Diagnóza	Priemer (%)	CDMP (%)
2001	A	$\alpha$ -manozidóza	74	100
	B	3-Hydroxy-3-metylglutarová acidúria	87	100
	C	Heterozygot pre deficit OTC <sup>1</sup>	79	100
	D	Cystinúria	89	100
	G	Metylmalónová acidúria	87	100
	2002	A	Deficit MCAD <sup>2</sup>	74
B		Mukopolysacharidóza typ VII	69	100
C		Tyrozínémia typ I	90	100
D		Pyroglutamová acidúria	93	100
E		Arginínjantárová acidúria	72	100
F		Deficit biotinidázy	69	100
2003	A	Deficit HPRT <sup>3</sup> (Lesch-Nyhan)	71	100
	B	Citrulinémia	93	100
	C	„Normálna vzorka“ („na valproáte“)	73	80
	D	Deficit fumarázy	91	100
	E	Izovalerová acidúria	98	100
	F	Sialidóza	77	100
2004	A	Alkaptonúria	99	100
	B	Deficit adenylosukcinát-lyázy	28	100
	C	Homocystinúria	95	100
	D	Glutarová acidúria typ I	98	100
	E	Mukopolysacharidóza typ III	37	60
	F	Mevalonová acidúria	78	100
2005	A	Canavanova choroba	92	100
	B	Laktátová acidúria (mitoch. och. <sup>4</sup> )	89	100
	C	Fenylketonúria	99	100
	D	Mukopolysacharidóza typ II	75	100
	E	Propionová acidúria	98	100
	F	Tyrozínémia typ II	93	100
2006	A	Aspartylglukozaminúria	64	100

	B	„Normálna vzorka“ (ketonúria)	80	100
	C	Tyrozínémia typ I	98	100
	D	Deficit molybdénového kofaktoru	55	100
	E	D-2-hydroxyglutarová acidúria	91	80
	F	Hypofosfatázia	73	100
2007	A	Mukopolysacharidóza typ VI	84	100
	B	Cystinúria	100	100
	C	Arginínjantárová acidúria	79	100
	D	Deficit adenínfosforibozyl-transferázy Mukopolysacharidóza typ IV	50	70
	E	Heterozygot pre deficit OTC <sup>1</sup>	81	100
	F	Hyperlyzinémia	85	100
2008	A	4-Hydroxybutyrová acidúria	81	100
	B	„Normálna vzorka“ („na valproáte“)	86	100
	C	Deficit adenylosukcinát-lyázy	54	100
	D	Leucinóza	100	100
	E	Hawkinzinúria	64	100
	F	Mukopolysacharidóza typ III	74	100

Vysvetlivky: <sup>1</sup> - ornitíntranskarbamyláza, <sup>2</sup> - acyl-CoA-dehydrogenáza mastných kyselín so stredným reťazcom, <sup>3</sup> - hypoxantín-guanínfosforibozyltransferáza, <sup>4</sup> - mitochondriové ochorenie

## ZÁVER

Počas 15 rokov svojej existencie naplnil ERNDIM svoj pôvodný cieľ a v súčasnosti je považovaný za synonymum EQA biochemicko-genetickej diagnostiky v Európe (3). Poskytovanie mimoriadne náročných biochemických analýz a expertných záverov laboratóriom pre diagnostiku a monitorovanie dedičných metabolických porúch bez v súčasnosti dobre dostupného externého hodnotenia kvality môže viesť k poškodeniu zdravia až k ohrozeniu života vyšetovaných pacientov. Dlhodobá účasť CDMP v 5 kontrolných schémach ERNDIM potvrdila vysokú kvalitu všetkých služieb poskytovaných laboratóriom. Navyše, úzka komunikácia pracovníkov CDMP so zahraničnými odborníkmi viedla aj vďaka ERNDIM k výraznej snahe o rozšírenie a ďalšie zlepšenie biochemickej diagnostiky DMP na Slovensku.

## LITERATÚRA

- Baudouin, F.:** Quality control in inherited disorders of metabolism (IDM) laboratories, ERNDIM schemes and theoretical aspects. ERNDIM BIOMED-2 Newsletters of October 1998 and June 1999.
- Behúlová, D., Gregová, E., Šaligová, J., Chandoga, J., Ponec, J.:** Klinická biochemická genetika prvej dekády 21. storočia – slovenská realita v európskom prostredí (Abstrakt). Laboratórna diagnostika 2006; 11: 73.
- Fowler, B., Burlina A., Kožich, V., Vianey-Saban, C.:** Quality of analytical performance in inherited metabolic disorders: the role of ERNDIM. J Inherit Metab Dis 2008, 31: 680–689.
- Garrod, A.E.:** The Croonian Lectures on Inborn Errors of Metabolism. Delivered before the Royal College of Physicians on June 18th, 23rd, 25th, and 30th. Lancet 1908; 172(4427): 1–7; 172(4428): 73–79; 172(4429): 142–148; 172(4430): 214–220.
- Peters, V., Garbade, S.F., Langhans, C.D., Hoffmann, G.F., Pollitt, R.J., Downing, M. et al.:** Qualitative urinary analysis: Methodological approaches and performance. J Inherit Met Dis 2008; 31: 690–696
- Pollitt, R.J.:** External Quality Assurance of laboratory analyses. J Inherit Metab Dis 2008; 31: 659–660.
- Rinaldo, P., Hahn, S., Matern, D.:** Clinical biochemical genetics in the twenty-first century. Acta Paediatr Suppl 2004; 93(445): 22–26.
- Zeman, J.:** Dědičné poruchy metabolismu – model genetických onemocnění a současné přístupy k léčbě. bioprojekty. lf1.cuni.cz/3381/sylaby/prednasek/dedicne-poruchy-metabolismu.pdf.  
<http://www.erndim.unibas.ch>  
<http://www.eurogentest.org/web/info/unit1/biochemical.shtml>
- MUDr. Darina Behúlová, PhD.  
Centrum dedičných metabolických porúch  
Oddelenie laboratórnej medicíny  
Detská fakultná nemocnica s poliklinikou  
Limbová 1  
833 40 Bratislava  
e-mail: behulova@dfnsp.sk*

---

REFERENCE INTERVALS:  
THE WAY FORWARD

---

FERRUCCIO CERIOTTI<sup>1</sup>  
ROLF HINZMANN<sup>2</sup>, MAURO PANTEGHINI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Diagnostica e Ricerca San Raffaele S.p.A, Milan  
Italy

<sup>2</sup>Sysmex Europe GmbH, Norderstedt  
Germany

<sup>3</sup>Department of Clinical Sciences “Luigi Sacco”  
University of Milan, Milan  
Italy

Corresponding author:

Ferruccio Ceriotti, email: ceriotti.ferruccio@hsr.it

*This article was prepared at the invitation of the Clinical Sciences Reviews Committee of the Association for Clinical Biochemistry.*

## ABSTRACT

New facts have recently enhanced interest in the topic of reference intervals. In particular, the International Organization for Standardization standard 15189, requesting that “biological reference intervals shall be periodically reviewed”, and the directive of the European Union on in vitro diagnostic medical devices asking manufacturers to provide detailed information on reference intervals, have renewed interest in the subject. This review presents an update on the topic, discussing the theoretical aspects and the most critical issues. The basic approach to the definition of reference intervals proposed in the original International Federation of Clinical Chemistry documents still remain valid. The use of data mining to obtain reference data from existing databases has severe limitations. New statistical approaches to discard outliers and to compute reference limits have been recommended. On the other hand, perspectives opened by the improvement in standardization through the implementation of the concept of traceability suggest new models to define “common” reference intervals that can be transferred and adopted by different clinical laboratories in order to decrease the proliferation of different reference intervals not always justified by differences in population characteristics or in analytical methodology.

Ann Clin Biochem 2009; 46: 8–17. DOI: 10.1258/acb.2008.008170

## INTRODUCTION

The concept of “reference intervals” as known today was developed by Gräsbeck and Saris in the late sixties

and presented at a congress of the Scandinavian Society in 1969.<sup>1</sup> Previously, reference intervals were usually named “normal values” or “normal ranges” without a clear definition of the term. Twenty years later, the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) expert panel published the first official IFCC document on the theory of reference values.<sup>2</sup>

Someone could ask why we are still talking about reference intervals in the era of evidence-based medicine, characterized by the use of decision limits, more than 30 years after the publication by Galen and Gambino of the landmark book “Beyond normality”.<sup>3</sup> There are several reasons for reconsidering this “old-fashioned” argument. The most important one is that, while the theory is clearly defined, there is a big gap in its application in everyday life. Moreover, three new facts are driving renewed interest to the topic: the publication of the International Organization for Standardization (ISO) standard 15189: 2007 on requirements for quality and competence of clinical laboratories,<sup>4</sup> the implementation of the European Directive 98/79 on in vitro diagnostic (IVD) medical devices<sup>5</sup> and, indirectly related to the Directive, the creation of the Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM).<sup>6</sup>

The first document<sup>4</sup> states in clause 5.5.5 that “biological reference intervals shall be periodically reviewed” and, particularly, requires that they shall be verified every time a variation in analytical and/or preanalytical procedures takes place. It is difficult for laboratories to comply with this requirement, considering the enormous number of different types of tests and the very rapid evolution of the analytical technology. The issue is not easy for manufacturers either: the IVD Directive requires in Annex I “Essential requirements”, part B, 8.7, statement 1, to include in the information supplied by the manufacturer “the reference intervals for the quantities being determined, including a description of the appropriate reference population”.<sup>5</sup> The third and probably most relevant element is the general requirement of the IVD Directive that for each method “the traceability of values assigned to calibrators and/or control materials must be assured through available reference measurement procedures and/or available reference materials of a higher order”.<sup>5</sup> This element, improving the method’s comparability with other traceable methods, could substantially modify the situation by allowing an easier and more correct definition of reference intervals.

In this review, after an update of the theory underlining the critical aspects, the new perspectives and developments in the field of reference intervals are presented.

## THE THEORY OF REFERENCE VALUES

Reference values evolved with laboratory tests. They do not have a meaning per se but only if referred to in a particular context, usually a physiological situation. Until the 1970s, before Gräsbeck’s publications



and the work of the IFCC expert panel, the term “normal values” was usually used. The use of the term “normal” has, however, been discouraged, because it can assume different meanings: Murphy listed seven of them (statistical – Gaussian distribution – most representative of a class, most commonly present in a class, most suited for survival, that does not harm – in medicine – conventional, ideal).<sup>7</sup> Thus, it may be subjective and ambiguous; moreover, it implies that everything outside the reference range is “abnormal”, however, due to the way it is calculated, this is not true. For these reasons, the IFCC document introduced the term “reference values”.<sup>2</sup> Usually these values are health-associated, but they can also reflect specific physiological conditions like pregnancy, or refer to specific population groups, such as professional athletes. The basic concept is that the values represent a specific population and thus they rely upon the choice of the subjects on which they were obtained. First of all, the criteria for the selection of reference individuals have to be clearly defined; those individuals represent the reference population from which a reference sample group is selected, on which the reference values are measured. The obtained values will assume a certain distribution (reference distribution) and, by analysing it with appropriate statistical methods, reference limits can be calculated. Conventionally, these limits are set to include 95 % of the measured values. The reference interval is defined by the reference limits and includes them. This has a series of consequences:

- (1) The reference interval of a specific measurand depends upon the intra- and inter-individual biological variability of the sample group of the reference subjects; thus, the numbers of selected subjects and their partition into subgroups may gain relevant importance;
- (2) The preanalytical aspects need to be strictly controlled so as to be reproducible when collecting samples from subjects of the general population;
- (3) Analytical aspects are essential. The standardization of the measurements allows comparison of data obtained on different groups of subjects and eventually their application to different populations in places and times different from those where they were obtained;
- (4) The method by which reference limits are calculated may modify significantly the results obtained, e.g. if inappropriate statistical models are applied or if the exclusion of outliers is not correctly performed.

#### **Selection of the reference subjects**

This represents the starting point. Usually, we select “healthy” individuals, but exactly what do we mean by health? How can we define and recognize it? Several commentaries have been written on this topic.<sup>8–10</sup> The World Health Organization’s definition: “a state of complete physical, mental and social wellbeing and not merely absence of disease or infirmity”<sup>11</sup> cannot be a realistic starting point. On the other hand, the concept of health can differ between cultures and countries. In 1975, the Scandinavian Committee on Reference Values

tried to define a list of pathological conditions to be excluded to consider an individual “healthy”.<sup>12</sup> However, when they tried to apply this recommendation it was impractical,<sup>13</sup> especially if aged subjects were involved. When Horn and Pesce<sup>14</sup> looked at the third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III), they found that no more than 10 % of the subjects aged 70–80 fell into the “healthiest” category.

Consequently, a more pragmatic approach is needed and health should be judged subjectively as the absence of signs of disease specifically related to the measurand(s).<sup>8</sup> As clearly stated in the IFCC document,<sup>2</sup> the first step should be the definition of the scope for use of reference intervals and, secondly the definition of the method used to select the reference individuals. The main pathological situations to be excluded are reported in Section 3.3 of the IFCC document.<sup>15</sup> This can be done through an anamnestic questionnaire (an example of such a questionnaire is reported in the document C28-A2 of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI),<sup>16</sup> a physical examination and further investigations (e.g. laboratory tests, imaging studies). The excluded subjects will depend, of course, on the particular analyte evaluated. For example, to determine a reference interval for haemoglobin or related haematological analytes, it would be wise to exclude subjects with iron deficiency, marked vitamin B12 or folic acid deficiency, inflammation or chronic respiratory disease, tumours, genetic abnormalities of haemoglobin synthesis, etc., as all these factors influence haemoglobin synthesis.

When selecting individuals, it is necessary to take into account all variables that can affect the concentration of the analyte: gender, age, environment, lifestyle, ethnicity, etc. In the example of haemoglobin in addition to gender and age, stratification according to the altitude of living and smoking habits is also important. All these biological aspects can be used as partitioning criteria. In general, to determine and consider which factors may be of importance a comprehensive knowledge of physiology (in addition to pathology) is required. As already stated, the width of the reference interval is influenced by three sources of variability: the intra- and inter-individual biological variability of the selected reference individuals and analytical variability of the measurement system. Analytical variability, with the exception of analytes showing very low biological variation, such as electrolytes, usually has minimal influence on reference intervals. Effects of intra- and inter-individual variabilities are inextricably bound together. The relative sizes of these two sources of variability can substantially affect the utility of a reference interval as a tool for interpreting an individual result. Harris demonstrated in 1974 that only if the intra-individual coefficient of variation ( $CV_I$ ) is substantially larger than the inter-individual one ( $CV_G$ ) will the distribution of the results in a single individual span the entire range of the reference interval, so that the reference interval

can be a useful tool to evaluate his state of health.<sup>17</sup> Unfortunately, this is a relatively uncommon situation; usually the  $CV_I$  is smaller than  $CV_G$  and the range of values of an individual span only a limited part of the distribution of the values of the reference population. Consequently, in the majority of cases the reference interval is of limited utility in evaluating the results of a single subject and its sensitivity in finding that abnormal data is low. Harris demonstrated that only if the  $CV_I/CV_G$  ratio (index of individuality) is  $> 1.4$  will the reference interval be a sensitive and useful tool, whereas if the ratio is  $< 0.6$  the utility of the reference interval is low.<sup>18</sup> In this case, the only way to improve the utility of a reference interval is to increase the ratio and, provided that the  $CV_I$  cannot be modified, the only possible intervention is to reduce the  $CV_G$  by stratifying the individuals into more homogeneous subgroups.<sup>18–20</sup>

#### ***A priori vs. a posteriori selection***

Two factors essentially drive the choice whether to decide in advance which individuals to select and how to partition them (a priori criterion) or whether to collect a relevant number of subjects, analyse them and decide thereafter which are to be kept in the reference population and how to partition them (a posteriori criterion): first, knowledge of the biology of the analyte and secondly the available resources.

If the biology of the analyte is well known, the a priori approach is the most convenient one. This approach is recommended in the IFCC document on selection of individuals.<sup>16</sup> The same document however does not explicitly exclude the possibility of utilizing the existing data, primarily not collected for the scope of defining reference intervals, quoting Martin *et al.*<sup>21</sup>

#### **Indirect reference values**

The use of existing databases containing thousands or even millions of patients' records is an exciting opportunity, recently exploited by several authors.<sup>22–30</sup> With appropriate software, it is an inexpensive and relatively rapid procedure. This approach must not be confused with the a posteriori approach, unless the database also contains detailed clinical information. The first papers using this approach were published in the 1960s<sup>31, 32</sup> and were based on the postulate that the majority of laboratory results are "normal". Considering the frequency distribution of results, it should be possible to apply some statistical procedures to eliminate the extremes of the distribution curve, so excluding the less frequent results, typical of "unhealthy" subjects. However, care has to be taken as several relevant limitations may have a negative influence on this approach. First, it does not fulfil the fundamental principle of the theory of reference values, which is the careful definition of the characteristic of the reference population.<sup>33</sup> With this approach we know almost nothing about the subjects we are using. Usually, the applied statistical calculation

is based on a presumed distribution of the results of the studied population, but in some cases the assumed distribution of data may not be correct. For instance, in the case of a skewed distribution the statistical models usually fail.<sup>34</sup> Furthermore, there is little or no control over preanalytical variables. Finally, it is very difficult to provide any demonstration of the metrological traceability of the obtained results; consequently, the observed intervals might be applicable only in the laboratory which produced them and cannot be adopted for use elsewhere.<sup>35</sup> In conclusion, even if information technology provides us with a powerful means of calculation, the data mining approach cannot be endorsed as the best way of defining reference intervals. Only if the original data are obtained with carefully controlled methodology, the laboratory is able to provide traceable results and reliable clinical data are available can this approach be adopted. In the majority of cases, it can only represent a means to confirm and validate the findings obtained with the more scientifically sound a priori selection.

#### **Preanalytical aspects**

The samples for reference interval studies must be collected under conditions representative of those used in clinical practice.<sup>36</sup> Unfortunately, in clinical practice the preanalytical phase is usually poorly standardized. For this reason, when performing a reference interval study it is essential to accurately define and describe the preanalytical conditions to allow others to reproduce the same situation and to understand the effects of certain factors (e.g. the collection device or the posture of the individual). Table 1 shows the most important preanalytical conditions to be taken into account when a blood analyte is evaluated. For body fluids other than blood it may be necessary to include different factors, while, for specific analytes, more information may be needed (e.g. emotional stress level for certain hormones).

#### **Analytical aspects**

This aspect is neglected in many publications on reference intervals. The IFCC document dealing specifically with this topic gave a series of recommendations for documenting the operating procedures, focusing on how internal quality control should be practiced during production and application of reference values.<sup>37</sup> These recommendations are, however, useful if the defined reference intervals are to be applied only within the laboratory who defined them, because it allows the baseline conditions to be properly fixed and then to understand whether the modification of certain analytical aspects may change the reference intervals. On the contrary, the recommended approach is not very effective in providing procedures which define reference intervals that are "transferable" to different laboratories.

In 1991, the concepts of reference measurement systems and of the implementation of metrological traceability (defined as a "property of a measurement

**Table 1. Main preanalytical factors to be considered in the production of reference values**

Subject preparation	Methodological factors	
	Specimen collection	Specimen handling
Fasting vs. non-fasting	Time of day	Transportation
Drug regimen	With or without tourniquet	Time before centrifugation
Physical activity	Body posture during phlebotomy	Centrifugation time and speed
	Type of anticoagulant	Storage conditions before measurement
	Sampling equipment	
	Freedom from haemolysis	

result relating the result to a stated metrological reference through an unbroken chain of calibrations of a measuring system or comparisons, each contributing to the stated measurement uncertainty<sup>38</sup>) were still in an embryonic state. Although reference measurement procedures were already available for some common analytes and the concept of method hierarchy had been introduced more than 10 years ago,<sup>39</sup> systematic application of these concepts was lacking. Only some years later, was the concept of reference measurement systems formalized, based on implementation of reference measurement procedures, preparation of reference materials and identification of reference measurement laboratories.<sup>40</sup> The reference measurement system represents a truenessbased approach in which different commercial methods that provide results traceable to the system are able to produce comparable results in clinical laboratories using these assays. ISO has produced two standards on this concept: ISO 17511: 2003<sup>41</sup> and ISO 18153: 2003.<sup>42</sup>

Only reference intervals obtained with analytical procedures producing results traceable to the same reference measurement system should be transferred between laboratories (see “common reference intervals” section).

#### Calculation of reference limits

This issue has been of most concern to authors dealing with reference values. There are three main problems: (i) the statistical methodology that provides the most effective way to extrapolate the results obtained on a sample population to the whole population itself; (ii) the partitioning of results among different groups (age, gender, etc.); (iii) the detection and discarding of outliers. Here, we give a brief outline of these aspects, referring the readers to more details from two excellent textbooks: *Statistical Bases of Reference Values in*

*Laboratory Medicine* by Harris and Boyd<sup>43</sup> and *Reference Intervals. A User’s Guide* by Horn and Pesce.<sup>44</sup>

#### Statistical methods

Harris and Boyd<sup>43</sup> refer to the approach by Wootton *et al.*<sup>45</sup> who in 1951 applied parametric statistics for the first time to the calculation of reference intervals. However, these authors soon realized that this statistical model was only applicable in a minority of situations and, two years later; they proposed logarithmic transformation of data to achieve a Gaussian-like distribution.<sup>46</sup> However, the incorrect practice of defining the reference interval as the mean  $\pm 2SDs$ , without any preliminary verification of the shape of the distribution of the data, has unfortunately continued for many years and is still sometimes used today.

Several publications on the use of fractiles for the definition of reference intervals appeared in the 1970s and 1980s,<sup>47–50</sup> but the milestone is represented by an IFCC publication in 1987.<sup>51</sup> This document clearly defined a number of elements that, even more than 20 years later, will remain valid. First, it promoted the (arbitrary) choice of using the central 95% of the distribution for the reference interval calculation. If we exclude a few different opinions, such as that of Jørgensen *et al.*<sup>52</sup> who proposed widening the interval to include 99.8% of the observed data to reduce false-positives in cases where a large battery of tests is requested, this approach is still widely accepted today. Secondly, the IFCC document recommended that reference limits should always be presented together with their 90% CIs. The width of the CIs decreases with the increase in the number of evaluated subjects and represents a reliable indicator of the uncertainty of the reference limits. Again, the document recommended the use of a nonparametric statistical method to calculate the reference limits. Even if parametric methods are theoretically more reliable, particularly if the sample of subjects is small, the uncertainty on the real “Gaussianity” of the original distribution (or after its transformation) increases the uncertainty of the final estimate. A proposal for a simple and effective way to calculate reference limits was also included. This method is based on the calculation of the 0.025 and 0.975 fractiles. The  $\alpha$  fractile cannot be calculated unless  $\alpha$  is above  $1/N$ , where  $N$  is the sample size. Thus, the determination of 0.025 and 0.975 fractiles requires at least 40 values ( $\alpha = 1/40 = 0.025$ ). However, with only 40 subjects, the minimum and maximum values represent the lower and the upper limit of the reference interval and it is therefore impossible to estimate their CIs. To calculate the uncertainty around the limits at least 120 subjects are needed: in this case, when the data are arranged in increasing order, the 2.5th centile is the third value in the series and the 97.5th centile is the 118th, while the 90% CI for the lower limit spans from the first to the seventh value and that for the upper limit spans from the 114th to the 120th value.

The IFCC recommendation to use a minimum of 120 individuals per class derives from these considerations. Theoretically, this approach should be easy to apply, but the relatively high number of individuals to be enrolled may create practical difficulties, e.g. for paediatric populations, for expensive tests or for analytes with age and gender dependence that require partitioning among different classes. The number of subjects can be reduced by using parametric statistics, but require the data to have a Gaussian distribution. As an alternative, Horn *et al.*<sup>53, 54</sup> proposed a “robust method” based on the transformation of the original data according to Box and Cox,<sup>55</sup> followed by a relatively complex algorithm, based on robust indicators, able to provide correct answers even for less-than-ideal situations. This “robust” algorithm gives different weights to the data, depending upon their distance from the mean. The use of this approach should allow estimation of correct reference limits with samples of only 20 subjects. To calculate the 90 % CIs around the limits, it is possible to use the so-called “bootstrap” methodology. With this methodology, observations are “resampled”, with replacement, from the data, creating a “pseudosample”. From each pseudosample the reference interval is derived. This process is repeated a large number of times (1000–2000), yielding a distribution of upper and lower reference limits. From this distribution, the 5th and the 95th quantiles may be used to determine the 90 % CI for each limit. A critical drawback of this approach is that the 90 % CIs can be very wide if the sample size is small (at least 80 individuals are needed to obtain acceptably small 90 % CIs). Regression analysis has been proposed as an alternative technique to deal with small sample sizes and has been applied to the determination of age-dependent reference intervals.<sup>56–58</sup>

### Partitioning criteria

As discussed in the section on the selection of reference subjects, the decision of whether or not to separate different groups is extremely important and several statistical methodologies have been proposed to achieve this. An intuitive approach is based on the calculation of the statistical significance of the difference between the mean values of two subclasses. This approach can lead to the identification of different subclasses, even for very small differences that are indeed statistically significant although clinically irrelevant, especially when the number of subjects per class is high. Sinton *et al.*<sup>59</sup> suggested two classes should be separated only if the difference between the respective means is greater than 1/4 of the interval calculated from 95 % of the individuals of the combined distribution. This criterion was originally proposed for specific analytes (i.e. calcium, inorganic phosphate and alkaline phosphatase), but did not allow adequate separation when applied to other analytes.<sup>60</sup>

The most popular partitioning method was proposed by Harris and Boyd<sup>43, 61</sup> and subsequently endorsed by the

CLSI document C28-A2.<sup>16</sup> In their studies, the authors first considered the idea that partitioning should lead to reduced inter-individual variability in the subgroups compared with that of the entire data group. However, they found that a worthwhile reduction in inter-individual variation was hard to achieve, even with large differences between subgroup means. Therefore, they abandoned the goal of inter-individual variability reduction as the basis for establishing partitioning criteria and focused on the proportions of the subgroups outside the reference limits of the entire population and suggested that “the problem of whether or not to compute separate pairs of 95 % reference limits for subgroups of the population may be reduced to the question: Does a single pair of limits, derived from a combined sample of subpopulations, come close enough to satisfying this criterion of 2.5 % below and 2.5 % above for each subpopulation?”.<sup>61</sup> The problem is in deciding at which level to set the acceptability limit. Harris and Boyd proposed that if the percentage is higher than 4 % or lower than 1 %, it is necessary to define different reference limits. This criterion appears valid because it considers not only the means but also the standard deviations of the subgroups, as a different standard deviation by itself may produce different reference limits. Their proposed test consists of two steps: first, evaluation of the difference between the means and secondly, comparison of their standard deviations. Further details and practical examples may be found in the CLSI C28-A2 document.<sup>16</sup> However, this approach works well only with Gaussian distributions and with subclasses of similar size and standard deviation.<sup>60</sup>

To overcome these limitations Lahti *et al.*<sup>62–64</sup> have proposed a method based on similar concepts, but allowing the estimation specifically of the percentage of subjects in a subclass outside the reference intervals of the entire population in any situation. Following the criteria based on biological variability presented by Gowans *et al.*<sup>65</sup> they proposed the creation of a subclass when more than 4.1 % or less than 0.9 % of the subjects of the subgroup fall outside the limits of the entire group. If the percentage is <3.2 % or >1.8 %, they suggest combining the groups. For intermediate (marginal) situations, the choice to combine or not should be based on clinical criteria.

### Detection of outliers

Whatever the method used for the calculation of the reference interval, the presence of outliers can significantly modify the limits, even if complex mathematical and statistical methods are applied.<sup>53, 54</sup> Thus, correct detection and exclusion of outliers is important. A simple but effective method to detect outliers is visual inspection of the distribution of the data. If an outlier is detected and if there are no obvious reasons to discard it (such as conditions of the subject, analytical problems, calculation or transcription errors), it is useful to apply statistical methods to justify its exclusion.

The most popular statistical method is the one proposed by Dixon,<sup>66</sup> which is based on the D/R ra-

tio, where D is the absolute value of the difference between the outlier and the next or preceding value and R represents the entire range of the observations (maximum–minimum), outlier included. According to Reed *et al.*<sup>47</sup> the CLSI C28-A2 document proposes one-third as the limit for this ratio. The test is, however, not very sensitive; in particular, when there is more than one outlier, the presence of a less extreme outlier may mask the other(s). In this case, the suggestion is to first evaluate a less extreme suspected outlier and, if the test identifies it as a true outlier, also discard the second more extreme outlier. Horn *et al.*<sup>67</sup> have proposed a more sophisticated two-step algorithm in which the data are first transformed using the Box and Cox method,<sup>55</sup> to obtain a Gaussian distribution, then the outlier identified using the Tukey robust approach.<sup>68</sup> This method identifies the extremes using the central 50% of the distribution, thus eliminating the confounding effects of more outliers and involves the computation of lower and upper quartiles (25th and 75th percentiles) of the transformed data ( $Q_1$  and  $Q_3$ ) from which the interquartile range (IQR) ( $Q_3 - Q_1$ ) is calculated. Finally, the lower and upper “fences” are computed: the lower fence as  $Q_1 - 1.5 \times \text{IQR}$  and the upper fence as  $Q_3 + 1.5 \times \text{IQR}$ . Any data point outside the fences is considered an outlier and discarded.

## CURRENT SITUATION AND FUTURE DEVELOPMENTS

In 1960, Schneider wrote that “... practical medicine is basically founded on comparison. If medicine is to be scientific, we must not only understand the structural, functional and chemical relations operating in individuals, but we must also understand the bases of our comparisons”.<sup>69</sup> From all the issues discussed above, we could conclude that the target that Schneider drew in his publication has been reached. Unfortunately, while the theory is well-defined, its practical application in the everyday life of most clinical laboratories is far from optimal. Laboratories often use different reference intervals without any valid reason, such as variations in analytical methodology or population served. A typical example of the situation can be derived from a survey on the reference intervals used in Italy in 2005 for alanine aminotransferase.<sup>70</sup> In 93 laboratories, all claiming to use the IFCC procedure with pyridoxal phosphate addition (even though on different analytical platforms), the upper reference limit for adult males spanned from 40 U/L to 72U/L, while the lower limit ranged from 0 U/L to 30U/L. This was partly related to differences in reference intervals suggested by the manufacturers in their package inserts, although not every laboratory adopted manufacturers’ values. This common situation is dangerous and misleading both for clinicians and patients (the same analytical result can be considered “normal” in one laboratory and “abnormal” in another,

according to the reference interval in use). Moreover, it hampers the creation of common databases, i.e. the combination of data from different laboratories.

The reasons for these differences are multifactorial; possible reasons are adoption of literature data or manufacturers’ values without any critical appraisal, e.g. changes in analytical methodologies are not accompanied by corresponding changes in reference intervals. Establishing reference intervals based on the laboratory’s own served population is a very costly and demanding process, requiring recruitment of appropriate reference individuals. Laboratories have easy access to pathological samples but rarely to samples from apparently healthy subjects. For certain types of samples, e.g. from paediatric subjects, access to healthy individuals is particularly difficult since ethical issues may prevent phlebotomy simply for establishing reference intervals. Furthermore, it is very time-consuming to establish reference intervals for all analytes and to repeat the work for any change in methods or analytical systems.

A possible alternative to overcome this situation is the development and implementation of “common” reference intervals.

### Common reference intervals

The basis for adopting common reference intervals are simple: if analytical methods are the same or yield comparable results because they are correctly standardized, and the population has the same characteristics or, alternatively, it is known that the specific analyte is not influenced by ethnicity or environment, the same, i.e. common reference intervals can be used. Unfortunately, the practical application of this simple concept is not as easy as it would appear. A number of prerequisites, summarized in Table 2, will need to be in place before adopting it.

### Establishing common reference intervals

Assuming that, for a given analyte, a reference measurement system exists, the most demanding task for producing common reference intervals which can be adopted by any clinical laboratory that operates under similar preanalytical and analytical conditions are the definition of an adequate set of reference values. This should include subjects from different ethnic groups and from various environments in order to document whether clinically significant differences exist, which would prevent the use of common reference intervals. The best way to obtain this information is to conduct a multicentre study, involving clinical laboratories in different regions or countries. This approach has been pursued in Spain<sup>71–75</sup> and further developed in the Nordic countries.<sup>76–80</sup> In particular, it requires:

- An a priori selection of reference individuals according to well-defined criteria, as specified before. The number of participating centres and enrolled individuals should be determined according to the number of subjects required for partitioning by age, gender, race, lifestyle, etc.

**Table 2. Necessary pre-requisites for production and use of common reference intervals**

Category	Pre-requisite	Responsibility for implementation
Analytical	Existence of a reference measurement system (trueness-based)	IFCC, JCTLM, national metrological institutes
	Existence of traceable routine methods	Manufacturers
	Correct implementation of methods in clinical laboratories	Clinical laboratories
	Control of the performance of routine methods to keep them within stated limits for uncertainty	Clinical laboratories, EQAS organizers
Clinical	Accurate definition of reference intervals, providing information on the influence of biological and environmental factors	Joint effort between IFCC, manufacturers and clinical laboratories
	Comparable preanalytical phase	Clinical laboratories
	Validation of applicability of common reference intervals to the laboratory's own population	Clinical laboratories
	Adoption of common reference intervals	Clinical laboratories

IFCC, International Federation of Clinical Chemistry; JCTLM, Joint Committee on Traceability in Laboratory Medicine; EQAS, External Quality Assessment Scheme

To obtain sufficiently narrow CIs for the reference limits, the optimal number of individuals within each group should be around 500,<sup>78</sup> the minimal sample size to allow for non-parametric calculation of the confidence limits being 120. The criteria for partitioning should be according to Lahti *et al.*,<sup>62-64</sup>

- A clear definition of the preanalytical phase. Ideally, to reproduce sample handling within clinical laboratories, the analyses should be performed on fresh samples. However, to reduce analytical variability it is usual to freeze the samples and analyse them in a single or minimum number of batches. This approach is only acceptable if it has been demonstrated that freezing does not affect the analyte. If sample stability is confirmed, storage of additional aliquots for further use is highly recommended;
- The use of methods providing results traceable to the reference measurement system and high interlaboratory comparability. Traceability to the reference measurement system must be verified through the use of two or more commutable materials (e.g. frozen pools) with values assigned by the reference measurement procedure,

possibly by a number of reference laboratories. The interlaboratory comparability must be checked using common quality control materials. An internal quality control programme must be implemented in each participating laboratory with clearly defined a priori criteria, for acceptance or rejection of each analytical run;

- Proper data analysis for the calculation of reference limits. The data from the different centres must be compared to identify the presence of any analytical bias (from the quality control data) or atypical distribution of the reference values. Finally, before calculating reference limits, possible outliers must be detected and eliminated.

#### Adopting common reference intervals

In order to be able to apply common reference intervals, a clinical laboratory has to verify the similarity of the preanalytical conditions to those adopted in the production of the intervals, the performance of the analytical system employed, and the characteristics of the population served.

#### Preanalytical conditions

The reference intervals can only be used if the same preanalytical conditions are applied (e.g. specimen type, fasting subjects, etc.), or if it is possible to demonstrate that any introduced modification has no significant effect, e.g. demonstrated equivalence between results obtained with heparin plasma and serum samples, analyte concentrations are not modified by meals, etc.

#### Analytical aspects

- (1) The method in use must produce results traceable to the reference measurement system for that specific analyte. For European countries, if the analytical system is "CE-marked" it should be used according to the manufacturer's specifications. However, even though the European Directive on IVD medical devices<sup>5</sup> stipulates traceability as an essential requisite, a number of routine analytical systems may still be significantly biased when compared with the internationally accepted reference systems, as was recently demonstrated for the measurement of some enzymes.<sup>81</sup>
- (2) The analytical quality of the method in use should be controlled in order to keep its total error within stated limits. Targets for allowable total error can be derived from the criteria related to biological variability.<sup>82</sup> A list of estimated within-subject and between-subject biological variations and analytical quality specifications can be found at Westgard's website.<sup>83</sup> The magnitude of the total error can be checked through participation in External Quality Assessment Schemes (EQAS), provided that the control samples are commutable and their target values are assigned by laboratories using reference methods.

#### Characteristics of the population served by the laboratory

In a recent publication by Ichihara *et al.*<sup>84</sup> large between-city differences were demonstrated for several

analytes in six Asian cities. If these results are confirmed and the observed differences considered large enough to merit separate reference intervals, the possibility of adopting common reference intervals is reduced to the analytes demonstrating no or low interpopulation variability.<sup>85</sup>

In general, if race or life-style are known not to influence reference intervals, it is sufficient to verify the preanalytical and analytical aspects. If ethnicity or lifestyle are known to influence reference intervals or if no information is available, it is advisable that the clinical laboratory validates them on a small sample group derived from its own population, before their adoption. This validation can be done according to the CLSI document C28-A2, paragraph 8.2.<sup>16</sup>

The advice is to examine 20 individuals representing the local apparently healthy population and satisfying the selection criteria. After discarding outliers, if no more than two of the 20 tested values fall outside the common interval, it can be adopted. If three or more values fall outside the common reference limits, the experiment should be repeated with another 20 subjects. If no more than two of the 20 repeat values fall outside the common interval, adopt the interval; if three or more values again fall outside, it probably means that the populations differ and a specific reference interval is needed, provided that all the preanalytical and analytical aspects are controlled. This type of binomial test works well if the reference values have a Gaussian-like distribution, but it is very insensitive if the distribution is skewed. In the latter case, more powerful statistical tests should be carried out, e.g. the Kolmogorov-Smirnov test which compares the full dataset from tested reference individuals with the 20 reference specimens for a given laboratory.

A further approach may be the calculation of reference intervals from the values of 20 subjects using a robust statistical algorithm, like that proposed by Horn *et al.*<sup>53, 54</sup> to check whether the obtained experimental limits are within the confidence limits of the common reference limits.

Finally, an alternative approach could be the application of one of the previously described statistical methods for data mining to the laboratory's stored data.<sup>24, 31, 32</sup> The comparison of the reference limits obtained, with those of the proposed common reference interval can allow judgement of their applicability.

The approach described for adopting common reference intervals is not straightforward. Development of reference measurement systems and compliance by manufacturers with calibration traceability can be a slow process.

Establishing robust reference intervals is time-consuming and expensive. Clinical laboratories are usually disinclined to modify reference intervals as this is a demanding task, which also requires education of clinicians and patients.

Large multicentre studies are needed for the correct

definition of common reference intervals, at least for certain analytes, in order to make real progress in this field and bridge the large gap existing between sound theory and poor practice.

#### Adoption of validated reference intervals

If all the previously defined organizational, preanalytical and analytical requirements are fulfilled not only can reference intervals obtained experimentally in multicentre studies be adopted as common reference intervals, but also reference intervals defined by a single laboratory. The IFCC Committee on Reference Intervals and Decision Limits (C-RIDL) has recently published a paper on the validation of already published reference intervals for creatinine in serum.<sup>58</sup> Obviously, when adopting a validated reference interval developed in a single centre, the preliminary verification of the interval on the local population acquires greater importance.

#### Reference intervals vs. decision limits

The main characteristics related to these two concepts are reported in Table 3. Some confusion can arise from the use of previously defined reference intervals as decision limits in specific circumstances, e.g. in the screening of blood donors, all subjects above the upper reference limit for alanine aminotransferase could be excluded from donation. However, while reference intervals describe the biological characteristics of a well-defined (usually apparently healthy) population, decision limits depend upon the diagnostic question and are obtained from specific clinical studies in order to define the probability for the presence of a certain disease or for a different outcome. The decision limits selected are usually based on the level of overlap of two

**Table 3 Differences between reference intervals and decision limits**

	Reference intervals	Decision limits
Conditions influencing them	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Type of population</li> <li>• Age group</li> <li>• Gender</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Clinical question</li> <li>• Patient category</li> </ul>
Information gathered	Being or not being part of the reference population	Patient eligible for a certain procedure ("treatment")
Statistics	95 % central range of the distribution curve	ROC curves and predictive values
Data number	Two (lower and upper limits)	One or more, according to the likelihood of clinical situation or different clinical questions ROC, receiver-operating characteristic

populations (diseased/non-diseased) and on the desired degree of clinical sensitivity and specificity.

The scope of these limits, as defined by the word itself, is to lead to decisions: individuals with values above or below the decision limit should be treated differently.

### Individual reference intervals

Although Harris<sup>86</sup> defined the theoretical basis and the statistical methods for individual reference intervals more than 30 years ago, their implementation represents a challenge for the future. Today, the development of information technology allows us to archive a huge amount of data and to retrieve and process them rapidly. On the other hand, implementation of traceability concepts and the consequent improvement of assay standardization will increase result stability and comparability over time and location for many analytes. These premises will permit transformation of theory into practice. The experimental model is quite simple and requires the collection of several samples from the same individual during a period of stable health. The results of measurements on these samples for a given analyte will produce a temporal series, forming a baseline against which future results will be judged. A fundamental issue is the number of samples needed to define the baseline value with acceptable approximation. This depends upon the biological variability of the analyte, its analytical reproducibility and the applied mathematical models.<sup>87</sup> In clinical practice, this approach is already used in doping control programmes, in which the baseline values of haematological parameters for athletes are recorded and individual reference intervals calculated. This allows detection of the use of illegal substances causing significant changes in the individual's haematological analytes.<sup>88, 89</sup>

### CONCLUSIONS

Even though a large number of publications on the topic of reference intervals already exist, it is clear that much work is needed to reach an optimal situation. In general, modifying the existing reference intervals is always a delicate task, requiring a culture of commitment to inform clinicians and their patients. The definition of common reference intervals will hopefully significantly reduce the number of different reference intervals employed for the same analyte, providing the clinician with more congruent and effective information. Laboratorians need to increase their efforts in these areas, trying to overcome the undoubted practical difficulties and the inactivity that sometimes characterized the past. Otherwise, the improvements in the theory will not be translated into clinical practice and patients will not obtain the expected advantages.

### ACKNOWLEDGEMENTS

F. Ceriotti has been the chair of the IFCC Scientific Division Committee on Reference Intervals and Decision Limits (C-RIDL) since its creation in 2005. R. Hinzmann was the liaison between the Scientific Division Executive Committee and C-RIDL between 2005 and 2007.

This article, written by Ferruccio Ceriotti (Diagnostica e Ricerca San Raffaele S. p. A, Milan, Italy) originally appeared in *ANNALS OF CLINICAL BIOCHEMISTRY* 2009; 46: 8–17. It has been reprinted with kind permission of the Editor of *Annals of Clinical Biochemistry* published by RSM Press on behalf of the Association for Clinical Biochemistry.

### REFERENCES

1. **Gräsbeck R., Saris N. E.:** Establishment and use of normal values. *Scand J Clin Lab Invest* 1969; 26 (Suppl. 110): 62–3.
2. **Solberg H. E.:** International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Scientific Committee, Clinical Section. Expert Panel on Theory of Reference Values International Committee for Standardization in Haematology (ICSH), Standing Committee on Reference Values. Approved recommendation (1986) on the theory of reference values. Part 1. The concept of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987; 25: 337–42. (*Clin Chim Acta* 1987; 165: 111–8; *Labmedica* 1987; 4: 27–31; *Ann Biol Clin* 1987; 45: 237–41).
3. **Galen R. S., Gambino S. R.:** Beyond Normality: The Predictive Value and Efficiency of Medical Diagnoses. New York, USA: John Wiley and Sons, 1975.
4. **International Organization for Standardization.** Medical Laboratories – Particular Requirements for Quality and Competence ISO 15189. Geneva: ISO, 2007.
5. **Directive 98/79/EC** of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices. *Offic J Eur Commun* 7 December 1998, L331/1-L331/37.
6. **See** <http://www.bipm.fr/en/committees/jc/jctlm/> (last checked on 26 February 2008).
7. **Murphy E. A.:** The normal, and the perils of the sylleptic argument. *Perspect Biol Med* 1972; 15: 566–82.
8. **Gräsbeck R.:** The evolution of the reference value concept. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 692–7.
9. **Petitclerc, C.:** Normality: the unreachable star. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 698–701.
10. **Ritchie R. F., Palomaki, G.:** Selecting clinically relevant populations for reference intervals. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 702–9.
11. **World Health Organization.** Constitution in Basic Documents. Geneva: WHO, 1948.
12. **Alstroöm T., Gräsbeck R., Hjelm, M., Skandsen S.:** Committee on Reference Values, Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology. Recom-



- mendations concerning the collection of reference values in clinical chemistry and activity report. *Scand J Clin Lab Invest* 1975; 35 (Suppl. 144): 1–74.
13. **Berg B., Nilsson J. E., Solberg H. E., Tryding N.:** Practical experience in the selection and preparation of reference individuals: empirical testing of the provisional Scandinavian recommendations. In: **Gräsbeck R., Alström T. eds.:** *Reference Values in Laboratory Medicine*. John Wiley & Sons, 1981: 55–64.
  14. **Horn P. S., Pesce A. J.:** Reference intervals: an update. *Clin Chim Acta*, 2003; 334: 5–23.
  15. **PetitClerc C., Solberg H. E.:** International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 2. Selection of individuals for the production of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987; 25: 639–44. (*Clin Chim Acta* 1987; 170: S3–12).
  16. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline (CLSI document C28-A2). 2nd edn. PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2000.
  17. **Harris E. K.:** Effects of intra- and interindividual variation on the appropriate use of normal ranges. *Clin Chem* 1974; 20: 1535–42.
  18. **Hyltoft Petersen P., Fraser C. G., Sandberg S., Goldschmidt H.:** The index of individuality is often a misinterpreted quantity characteristic. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: 655–61.
  19. **Fraser, C. G.:** Inherent biological variation and reference values. *Clin Chem Lab Med*, 2004; 42: 758–64.
  20. **Gellerstedt M., Petersen P. H.:** Partitioning reference values for several subpopulations using cluster analysis. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 1026–32.
  21. **Martin H. F., Hologgitas J. V., Driscoll J., Fanger H., Gudzinowicz B. J.:** Reference values based on populations accessible to hospitals. In: **Gräsbeck R., Alström T., eds.:** *Reference Values in Laboratory Medicine* Chichester: Wiley, 1981: 233–62.
  22. **Naus A. J., Borst A., Kuppens P. S.:** The use of patient data for the calculation of reference values for some haematological parameters. *J Clin Chem Clin Biochem* 1980; 18: 621–5.
  23. **Baadenhuijsen H., Smit J. C.:** Indirect estimation of clinical chemical reference intervals from total hospital patient data: application of a modified Bhattacharya procedure. *J Clin Chem Clin Biochem* 1985; 23: 829–39.
  24. **Kairisto V., Hänninen K. P., Leino A. et al.:** Generation of reference values for cardiac enzymes from hospital admission laboratory data. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1994; 32: 789–96.
  25. **Kouri T., Kairisto V., Virtanen A. et al.:** Reference intervals developed from data for hospitalized patients: computerized method based on combination of laboratory and diagnostic data. *Clin Chem* 1994; 40: 2209–15.
  26. **Krøll J., Saxtrup O.:** On the use of patient data for the definition of reference intervals in clinical chemistry. *Scand J Clin Lab Invest*, 1998; 58: 469–73.
  27. **Bock B. J., Dolan C. T., Miller G. C. et al.:** The data warehouse as a foundation for population-based reference intervals. *Am J Clin Pathol*, 2003; 120: 662–70.
  28. **Grossi E., Colombo R., Cavuto S., Franzini C.:** The REALAB project: a new method for the formulation of reference intervals based on current data. *Clin Chem* 2005; 51: 1232–40.
  29. **Haeckel R., Wosniok W., Arzideh F.:** A plea for intra-laboratory reference limits. Part 1. General considerations and concepts for determination. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 1033–42.
  30. **Arzideh F., Wosniok W., Gurr E. et al.:** A plea for intra-laboratory reference limits. Part 2. A bimodal retrospective concept for determining reference limits from intra-laboratory databases demonstrated by catalytic activity concentrations of enzymes. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 1043–57.
  31. **Hoffmann H. G.:** Statistics in the practice of medicine. *J Am Med Assoc* 1963; 185: 864–73.
  32. **Bhattacharya, C. G.:** A simple method of resolution of a distribution into Gaussian components. *Biometrics* 1967; 23: 115–35.
  33. **Solberg H. E.:** Using a hospitalized population to establish reference intervals: pros and cons. *Clin Chem* 1994; 40: 2205–6.
  34. **Ferre-Masferrer M., Fuentes-Arderiu X., Puchal-Ane R.:** Indirect reference limits estimated from patients' results by three mathematical procedures. *Clin Chim Acta* 1999; 279: 97–105.
  35. **Cerioti F., Schumann G., Panteghini M.:** Redefining reference limits needs more attention to the analytical aspects. *Liver Int* 2006; 26: 1155–6.
  36. **Solberg H. E.:** PetitClerc C, International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Scientific Committee, Clinical Section. Expert Panel on Theory of Reference Values (EPTRV). Approved recommendation (1988) on the theory of reference values. Part 3. Preparation of individuals and collection of specimens for the production of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988; 26: 593–8 *Clin Chim Acta* 1988; 177: S1–12.
  37. **Solberg H. E., Stamm D.:** International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), Scientific Committee, Clinical Section. Expert Panel on Theory of Reference Values. Approved recommendation (1991) on the theory of reference values. Part 4. Control of analytical variation in the production, transfer and application of reference values. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991; 29: 531–5. (*Clin Chim Acta* 1991; 202: S5–12).
  38. **International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology (VIM) ISO VIM (DGUIDE 99999).** Geneva: International Organization for Standardization, 2004
  39. **Tietz N. W.:** A model for a comprehensive measurement system in clinical chemistry. *Clin Chem* 1979; 25: 833–9.
  40. **Müller M. M.:** Implementation of reference systems in laboratory medicine. *Clin Chem* 2000; 46: 1907–9.
  41. **International Organization for Standardization.** In vitro diagnostic medical devices – Measurement of quantities

- in biological samples – Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials. Geneva: ISO, 2003 (EN ISO 17511: 2003)
42. **International Organization for Standardization.** In vitro Diagnostic Medical Devices – Measurement of Quantities in Samples of Biological Origin – Metrological Traceability of Values for Catalytic Concentration of Enzymes Assigned to Calibrators and Control Materials. Geneva: ISO, 2003 (EN ISO 18513: 2003).
  43. **Harris E. K., Boyd J. C.:** Statistical Bases of Reference Values in Laboratory Medicine. NY, USA: Marcel Dekker, 1995.
  44. **Horn P. S., Pesce A. J.:** Reference Intervals. A User's Guide. Washington, DC: AACC Press, 2005.
  45. **Wootton I. D. P., King E. J., Maclean Smith J.:** The quantitative approach to hospital biochemistry: normal values and the use of biochemical determinations for diagnosis and prognosis. *Br Med Bull* 1951; 7: 307–11.
  46. **Wootton I. D. P., King E. J.:** Normal values for blood constituents. Interhospital differences. *Lancet* 1953; 1: 470–1.
  47. **Reed A. H., Henry R. J., Manson W. B.:** Influence of statistical method used on the resulting estimate of normal range. *Clin Chem* 1971; 17: 275–84.
  48. **Hanie E. K., Demets D. L.:** Estimation of normal ranges and cumulative proportions by transforming observed distributions to Gaussian form. *Clin Chem* 1972; 18: 605–12.
  49. **Boyd J. C., Lacher D. A.:** A multi-stage Gaussian transformation algorithm for clinical laboratory data. *Clin Chem* 1982; 28: 1741–53.
  50. **Shultz E. K., Willard K. E., Rich S. S., Connelly D. P., Critchfield G. C.:** Improved reference-interval estimation. *Clin Chem* 1985; 31: 1974–8.
  51. **Solberg H. E.:** International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Scientific Committee, Clinical Section. Expert Panel on Theory of Reference Values (EPTRV) International Committee for Standardization in Haematology (ICSH), Standing Committee on Reference Values. Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987; 25: 645–56. (*Clin Chim Acta* 1987; 170: S13–32).
  52. **Jørgensen L. G. M., Brandslund I., Hyltoft Petersen P.:** Should we maintain the 95 percent reference intervals in the era of wellness testing? A concept paper. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 747–51.
  53. **Horn P. S., Pesce A. J.:** Copeland BE. A robust approach to reference interval estimation and evaluation. *Clin Chem* 1998; 44: 622–31.
  54. **Horn P. S., Pesce A. J., Copeland B. E.:** Reference interval computation using robust vs. parametric and nonparametric analyses. *Clin Chem* 1999; 45: 2284–5.
  55. **Box G. E. P., Cox D. R.:** An analysis of transformations. *J R Stat Soc* 1964; B26: 211–52.
  56. **Virtanen A., Kairisto V., Irjala K., Rajamäki A., Uusi-paikka E.:** Regression-based reference limits and their reliability: example on hemoglobin during the first year of life. *Clin Chem* 1998; 44: 327–35.
  57. **Virtanen A., Kairisto V., Uusipaikka E.:** Parametric methods for estimating covariate-dependent reference limits. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 734–8.
  58. **Ceriotto F., Boyd J. C., Klein G. et al.:** Reference intervals for creatinine concentrations in serum: assessment of the available data for global application. *Clin Chem* 2008; 54: 559–66.
  59. **Sinton T. J., Crowley D., Bryant S. J.:** Reference values for calcium, phosphate, and alkaline phosphatase as derived on the basis of multichannel-analyzer profiles. *Clin Chem* 1986; 32: 76–9.
  60. **Lahti A.:** Partitioning biochemical reference data into subgroups: comparison of existing methods. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 725–33.
  61. **Harris E. K., Boyd J. C.:** On dividing reference data into subgroups to produce separate reference ranges. *Clin Chem* 1990; 36: 265–70.
  62. **Lahti A., Hyltoft Petersen P., Boyd J. C., Fraser C. G., Jørgensen N.:** Objective criteria for partitioning Gaussian-distributed reference values into subgroups. *Clin Chem* 2002; 48: 338–52.
  63. **Lahti A., Hyltoft Petersen P., Boyd J. C.:** Impact of subgroup prevalences on partitioning Gaussian-distributed reference values. *Clin Chem* 2002; 48: 1987–99.
  64. **Lahti A., Hyltoft Petersen P., Boyd J. C., Rustad P., Laake P., Solberg H. E.:** Partitioning of nongaussian distributed biochemical reference data into subgroups. *Clin Chem* 2004; 50: 891–900.
  65. **Gowans E. M. S., Hyltoft Petersen P., Blaabjerg O., Hørder M.:** Analytical goals for acceptance of common reference intervals for laboratories throughout a geographical area. *Scand J Clin Lab Invest* 1988; 48: 757–64.
  66. **Dixon W. J.:** Processing data for outliers. *Biometrics* 1953; 9: 74–89.
  67. **Horn P. S., Feng L., Li Y., Pesce A. J.:** Effect of outliers and nonhealthy individuals on reference interval estimation. *Clin Chem* 2001; 47: 2137–45.
  68. **Tukey J. W.:** Exploratory Data Analysis. Reading, MA, USA: Addison-Wesley, 1977.
  69. **Schneider A. J.:** Some thoughts on normal, or standard, values in clinical medicine. *Pediatrics* 1960; 26: 973–84.
  70. **Ceriotto F.:** Gli intervalli di riferimento nel nuovo millennio. *Biochim Clin* 2007; 4: 254–66.
  71. **Fuentes-Arderiu X., Ferré-Masferrer M., Gonzales-Alba J. M., Escola-Aliberas J., Balsells-Rosello D., Blanco-Cristobal C.:** Multicentric reference values for some quantities measured with Tina-Quant reagents systems and RD/Hitachi analysers. *Scand J Clin Lab Invest* 2001; 61: 273–6.
  72. **Ferré-Masferrer M., Fuentes-Arderiu X., Alvarez Funes V., Güel-Miró R., Castiñeiras-Lacambra M. J.:** Multicentric reference values: shared reference limits. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35: 715–8.
  73. **Ferré-Masferrer M., Fuentes-Arderiu X., Gomà-Llongueras M. et al.:** Regional reference values for some quantities measured with the ADVIA Centaur analyser. A model of co-operation between the in vitro diagnostic

- industry and clinical laboratories. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39: 166–9.
74. **Fuentes-Arderiu X., Ferré-Masferrer M., González-Alba J.M. et al.:** Multicentric reference values for some quantities measured with the Elecsys 2010 analyser. *Clin Chim Acta* 2001; 304: 143–6.
  75. **Fuentes-Arderiu X., Mas-Serra R., Alumá-Trullás A., Martí-Marcet M.I., Dot-Bach D.:** Guideline for the production of multicentre physiological reference values using the same measurement system. A proposal of the Catalan Association for Clinical Laboratory Sciences. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 778–82.
  76. **Bäck S. E., Nilsson J. E., Fex G., Jeppsson J. O., Rosén U., Tryding N.:** Towards common reference intervals in clinical chemistry. An attempt at harmonization between three hospital laboratories in Skåne, Sweden. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: 573–92.
  77. **Rustad P., Felding P., Lahti A.:** Proposal for guidelines to establish common biological reference intervals in large geographical areas for biochemical quantities measured frequently in serum and plasma. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 783–91.
  78. **Hyltoft Petersen P., Rustad P.:** Prerequisites for establishing common reference intervals. *Scand J Clin Lab Invest* 2004; 64: 285–92.
  79. **Rustad P., Felding P., Franzson I. et al.:** The Nordic Reference Interval Project 2000: recommended reference intervals for 25 common biochemical properties. *Scand J Clin Lab Invest* 2004; 64: 271–84.
  80. **Rustad P., Felding P., Lahti A., Hyltoft Petersen P.:** Descriptive analytical data and consequences for calculation of common reference intervals in the Nordic Reference Interval Project 2000. *Scand J Clin Lab Invest* 2004; 64: 343–70.
  81. **Jansen R., Schumann G., Baadenhuijsen H. et al.:** Trueness verification and traceability assessment of results from commercial systems for measurement of six enzyme activities in serum: an international study in the EC4 framework of the Calibration 2000 project. *Clin Chim Acta* 2006; 368: 160–7.
  82. **Cotlove E., Harris E.K., Williams G.Z.:** Biological and analytic components of variation in long-term studies of serum constituents in normal subjects. III. Physiological and medical implications. *Clin Chem* 1970; 16: 1028–32.
  83. **See** <http://www.westgard.com/biodatabase1.htm> (last checked on 26 February 2008)
  84. **Ichihara K., Itoh Y., Lam C.W.K. et al.:** Sources of variation for commonly measured serum analytes among 6 Asian cities and consideration of common reference intervals. *Clin Chem* 2008; 54: 356–65.
  85. **Boyd J. C.:** Caution in the adoption of common reference interval. *Clin Chem* 2008; 54: 238–9.
  86. **Harris E. K.:** Some theory of reference values. II. Comparison of some statistical models of intraindividual variation in blood constituents. *Clin Chem* 1976; 22: 1343–50.
  87. **Queraltó, J. M.:** Intraindividual reference values. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 765–77.
  88. **Sharpe K., Ashenden M., Schumacher Y.:** A third generation approach to detect erythropoietin abuse in athletes. *Haematologica* 2006; 91: 356–63.
  89. **Ashenden M.:** A strategy to deter blood doping in sport. *Haematologica* 2002; 87: 225–34 (Accepted 17 September 2008)

---

REFERENCE VALUES: FROM PHILOSOPHY TO  
A TOOL FOR LABORATORY MEDICINE

---

JOSEPH HENNY<sup>1</sup>, PER HYLTOFT PETERSEN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Biologie Clinique, Centre de Médecine Préventive, 54501 Vandoeuvre-les-Nancy, France

<sup>2</sup>Department of Clinical Biochemistry, Odense University Hospital, Odense, Denmark, and NOKLUS, Norwegian centre for external quality assurance of primary care laboratories, Division for General Practice, University of Bergen, Norway

The concept of reference values was introduced for the first time by Saris and Gräsbeck in 1969 (1). During the subsequent fifteen years, several working groups from European countries and North America contributed largely to clarifying the content and, especially, the philosophy as mentioned by Gräsbeck in this issue (2). Since then, this concept has been widely accepted by professionals in laboratory medicine, and many national and international organizations refer to this concept in official documents (EC4 Group from the FESCC, ISO 15189-2003 norm, NCCLS recommendations). The Directive 98/79/CE of the European Community obliged kit manufacturers to provide reference limits (including the description of reference population) in package inserts with reagent kits. It also recommended that clinical chemists check that this information is applicable to the working conditions of their laboratories. This is particularly true in France in the official regulation "Guide de bonne exécution des Analyses" (GBEA). We can say that the reference values concept is officially and internationally applied and recognized.

In this case, devoting a special issue of CCLM to a topic well-recognized by the Professional Bodies and Scientific Societies could be considered superfluous. There are, however, strong arguments in favor of such a publication.

- a. Some laboratory scientists are publishing interesting scientific papers without following the official recommendation of Scientific Bodies using the desirable rigor.
- b. Selecting reference individuals and/or populations is hard work, often out of reach of most clinical laboratories. In addition, useful and/or necessary clinical data are not always available. Two examples illustrate this fact: in a recent article Kallner et al. proposed a simple method for determining reference limits from primary

health care patient data (3). If this method is acceptable for some quantities, the authors showed the limitations of this methodology, in particular for glucose due to lack of adapted selection criteria related to the observed populations. This is why the contribution of health examination centers could be essential for solving this problem as proposed by Siest (4). These centers invite presumably healthy individuals and collect numerous physiological, clinical and biological data. Secondly, in this issue, Dhondt highlights the difficulties encountered in the selection of reference individuals for determining reference intervals for rare analytes or for special fluids such the cerebrospinal fluid (5).

- c. The manufacturers are obliged to provide reference limits for their reagent kits. This is an expensive and cumbersome process. During these past several years, progress in standardization has considerably reduced the differences observed between analytical techniques for common analytes. One could expect that reference limits should no longer be method-dependent. However, this issue should be carefully considered as there are many examples of significant analytical differences (e.g., for the measurement of transaminases activity with or without pyridoxal phosphate or between methods used in routine and decentralized laboratories (POCT) etc.). As manufacturers now distribute their products worldwide, they are confronted with biological variability (due to differences in ethnicity, genetic and the environmental conditions of life); these differences add to the problem of transferability of reference values from one country to another and from one analytical system to another. Some authors have attempted to find answers to this question. In this issue, Fuentes-Arderiu et al. suggest techniques for determining multicenter reference values (6). This is an original and attractive idea for manufacturers. Tasks and costs associated with the selection of reference populations can be shared between different laboratories where a high level of quality control is required (through an adapted EQAS) (7). However, the method should only be applied to biologically homogenous populations. The second proposal for determining common reference values illustrates a very fine scheme of using commutable materials. Unfortunately, this scheme requires an extremely sophisticated interlaboratory organization which few countries, other than perhaps the Scandinavian countries, have at their disposal (8).

These three examples demonstrate the limitations of the use of the reference value concept in current practice. Nevertheless, many scientific works have been published on the subject over the past twenty years. In particular, methodological and statistical articles including some of which are presented in this issue. Of particular note are those of Lahti who compares the existing methods of partitioning biochemical reference data into subgroups (9); Rustad et al. who propose a method for producing common reference intervals for

---

Corresponding author:

J. Henny, Centre de Médecine Préventive,  
2 Avenue Doyen J. Parisot - 54501 Vandoeuvrelès-Nancy, France  
Phone: +33 3 83 44 87 20, Fax: +33 3 83 44 87 21  
E-mail: joseph.henny@cmp.u-nancy.fr

usual quantities (8); Hyltoft Petersen et al. who show that the rankit transformation and simple graphical test for non-homogeneity is a useful tool for the description of reference values and for prediction of extreme fractions (10); and Virtanen et al. who review parametric methods that have been used, or which could be used for the estimation of reference limits from clinical chemistry data (11). Numerous other papers concern applications, particularly determination of reference limits. On the other hand, ever since the publication of the last article from the Reference Values Expert Panel of the IFCC (12) in 1991, some controversial and sensitive subjects have been forgotten. For these subjects, scientific and official recommendations are missing. Yet, numerous fields still remain to be explored. For example:

1. **The knowledge of relevant biological variability.** This is the key for selecting reference individuals. As pointed out by Claude Petitclerc, the definition of normality in laboratory medicine is challenging due to the virtual impossibility of selecting an unbiased healthy population (13). IFCC recommendations clearly emphasize the need for a homogeneous reference population in a well-defined state of health. The objective is to reduce inter-individual variability. For example, in producing reference values for serum-Creatinine protein, it is essential that all individuals with any history of inflammation be eliminated. In practice, despite all efforts to gather this critical information, one still encounters analytically validated outlying values that are likely due to some undetected inflammatory processes (14, 15). In this type of event, statistical tools are largely developed and used; some of which are presented in this issue (6, 7, 15). An alternate approach to this problem is suggested in this issue by Jørgensen et al. These authors present a method for the selection of reference individuals for fasting plasma glucose, and describe how to decide if disease groups share reference interval with an ideal population. This method, based on statistical methods (randomization), may be used to validate a reference with respect to an investigated disease and to stratify the relative importance of risk factors for the analyte measured (16). In a comparable study on the thyroid hormone TSH, Jensen et al. (17) excluded all individuals with thyroid antibodies or a family history of thyroid disease. Correspondingly, Ritchie and Palomaki (18) question the relevance of a single reference interval based on healthy individuals, as they suggest that each specific disease state may require a specific reference interval. This proposal may lead to variable decision limits or cut-off points. Other powerful tools, like multiple regression analysis, are sometimes used for assessing the influence or significance of biological and physiological factors. This method is simple to implement and can take into account an almost unlimited number of variables; only the significant biological criteria need to be retained. Therefore, there are not commonly recognized rules. The criteria to retain variables may be different

from one analyte to another. Some impressive examples were published recently for bone markers (19), serum prostate specific antigen (PSA) (20) and for the most commonly measured biochemical and hematological tests (21). These articles quantify and describe, in careful detail, the pre-analytical biological criteria to be retained in the determination of reference values. However, these scientific works are not exhaustive and do not cover all the fields of laboratory medicine. A core scientific work would be extremely useful, notably for the analytes that are not currently measured. This task concerns the expert of the parameter considered. This is a huge undertaking, but essential.

Other particular aspects of biological variability need to be better clarified: special emphasis should be placed on variability as a function of age. Nowadays, with longer life expectancy and improvement in the global health status of the elderly, it is becoming necessary to produce reference values for elderly people. Many papers have been published on the subject, but they are unsatisfactory as the concept of health in the elderly is not clearly defined. Many biological, physiological and psychological criteria remain to be defined (such as medication or no medication, "supposed" healthy people only or not,...). Also, should we describe different reference intervals for each age group (22)? The race and/or the ethnicity of individuals have been proposed as factors to subdivide a reference interval (23). Other recent articles mentioned this fact. For example, the differences observed between Algerian and European populations (French and Irish) for blood lipids (cholesterol, triglycerides, HDL- and LDL-cholesterol) led the authors to suggest decision limits adapted to the population observed (24). In this issue, two articles from Ichihara et al. (25) and Johnson et al. (26) evaluate regional and racial differences in plasma proteins and claim that environmental and life-style-related factors seem to have a great influence on many of these analytes. Other clinical scientists from developing countries claim that the production of appropriate reference values for their countries must take into account the existence of multiple ethnic groups and different ways of life (27). At this time, the effect of ethnicity for the natives and/or the migrants on various analytes has not been systematically studied. The biological variability of indigenous population living in developing countries is one of the major fields to explore since nobody knows the exact situation. The results of some publications from these countries are difficult to compare with results produced in developed countries. This is due primarily to the use of different analytical methods. This question of ethnicity introduces the problem of the transferability of reference values.

2. Many theoretical statistical papers have been devoted to the **transferability of reference values**. The main question for the laboratory scientist is whether the laboratory can use the reference limits proposed either

by the manufacturers (from the application sheet of the reagent kit) or by other scientists as reported in the scientific literature. Another question is whether this information can be adapted to the population and analytical system unique to each laboratory. Despite efforts to solve this problem with use of new statistical methods, the lack of practical knowledge is obvious, especially with respect to the variability between different groups within a population and between different techniques and/or analytical systems (as mentioned before). Concerning the latter point, progress in standardization has considerably reduced the extent of the problem for the most common tests, but remain unsolved for many others such as immunochemistry tests (28). This is why the manufacturers of analytical systems and reagents have a great responsibility in this field and need to involve themselves to a greater extent in this process. They should describe more precisely the conditions used in the production of the reference limits that are published in the application sheet and/or package inserts. This includes such things as a careful description of the reference population, statistical methodology (IFCC, NCCLS, others), and name of the laboratory which has determined the reference values. Some manufacturers exclude themselves from this responsibility, asking the user to check the proposed reference limits with respect to his/her own working conditions. That leaves the most important question: What shall the clinical chemist do alone in his/her lab!...

3. Determining reference values and intervals is **the responsibility of laboratory scientists**. This is a complex task which implies a high degree of knowledge in physiopathology and which cannot be reduced to simple statistical processing of data in the laboratory.

4. **The concept of reference values is not used** by laboratory scientists and the clinicians as rigorously as it should. In addition, there is confusion between the notion of "reference values" and "reference limits" and that of "decision limits". This could be due to the fact that the **use of the concept of reference values** has not formed the subject of appropriate scientific works, like the description of a reference population and the production of reference values, which have been carefully studied. It is strange that the expert panel of the IFCC did not take an interest in this topic. The Reference Values Working Group of the SFBC (Société Française de Biologie Clinique) proposed in 1982 a preliminary article on this topic which should be now revisited (29). For this topic, three approaches could be investigated: the first and most common of these, concerns the interpretation of an observed value. The comparison of a laboratory result to reference limits and decision limits is obvious for laboratorians. This way of thinking seems too conceptual for clinicians; for him/her, the cut-off value (decision limit) alone will be taken into account. It has been reported that this treatment

of laboratory data leads some laboratory scientists to "adapt" the reference limits on their laboratory reports and to replace them by "alert thresholds"! We are quite far away from the recommendation of the IFCC (95 % reference intervals). The 95 % reference interval is also the theme of Jørgensen et al.'s contribution on the increasing use of test results in wellness testing (30). This technique results in a high percentage of false-positive results when the traditional description of reference values as 95 % reference intervals is used. A second approach concerns the use of individual reference values. In this issue, Queraltó (31), starting again the previous work of Williams (32), proposes a clear statistical methodology for achieving this goal and he provides practical examples of an individual as his/her own reference. Dhondt (33) reaches the same conclusion from a study on reference values of 5-hydroxyindoleacetic acid and homovanillic acid. This idea is also the main thrust of Fraser's contribution (34) to this special issue. He provides an irrefutable argument for better use of individual specific reference values. When available, these are far better than conventional reference values for monitoring individuals. The medical diagnosis is generally based on a multifactorial approach that combines laboratory tests, clinical examination and anamnesis. This multifactorial thinking helps to illustrate the third technique. Boyd (35) gives a comprehensive example in this issue where he clearly explains how to determine bi- or multidimensional reference limits from a statistician's point of view. An outstanding practical example is given in a recent issue of "Thyroid" Journal, where a scattergram of bidimensional reference limits for TSH and free thyroxin is presented (36). The serum TSH/free thyroxin relationship in different clinical conditions (primary hypothyroid, hyperthyroid, central hypothyroid) and euthyroid is readily apparent. This is also the same message from Klee (37), who compares reference limits and decision limits, and makes it clear that the reference limits should not be used as cut-off points in general. He also points out the costs related to incorrect diagnosis and stresses the need for improving analytical and clinical quality.

5. It is clear that the lack of acceptance and misunderstanding of reference values is largely the result of a deficiency in the **teaching of the reference values concept and use**; irrespective of the fact that the situation is very different from one country to another. The concept of reference values remains a concept of laboratory scientists, and clinicians have some difficulties appreciating this. The importance of teaching is fundamental. One could be inspired by a recent article from Young conveying the importance of the preanalytical phase, and transposing this, at least partly, to the concept of reference values (38). In order to do this, great efforts need to be made in four directions: First, towards the education of medical students (who will be the clinicians of tomorrow) directing training towards the use

of the concept of reference values for interpretation of laboratory results. Second for laboratory scientists, training will be extended to the production of reference values. Advanced course could also be organized for laboratory scientists who wish to broaden their knowledge and invest in scientific works. Third, accreditation agencies could be extremely helpful. Finally, it should be acknowledged that a large amount of information concerning biological variability, available reference limits, and criteria of selection should be easily available to the community of laboratorians and clinicians. The production of central data bases (validated) could solve this problem. Other useful support, such as multimedia, could be developed.

6. **The Journal's editors** also share this responsibility. The articles on the subject, noticeably those dedicated to studies on the biological variability, proposing reference limits should be in accordance with officially recognized guidelines from the Scientific Societies. As mentioned above, it is true that this is not always the case. It could be suggested that acceptance criteria for articles on the topic of reference values could be regulated by an agreement between the editors of clinical chemistry journals. They should be inspired by the STARD initiative which trends to improve the quality of reporting of diagnostic studies published in medical journals (39). The STARD published a checklist that assists authors and reviewers to understand each of the items on the checklist, the reasons for its inclusion and how it should be interpreted (40).

7. **The management of quality** is one of the most critical issues in the production of reference values, especially intralaboratory (long-term variability) and interlaboratory (common reference values). In this area, the recommendations of the IFCC are clear and well presented (41). Further information is given in this issue by Westgard (42), an usual and well-known method in order to calculate critical systematic error, and by Thienpont et al. (43), who point to the responsibility of clinical chemists for understanding the need of metrological traceability of routine measurement. The control of quality depends on both the clinical chemists determining reference values, and on the manufacturers producing analytical systems. The latter must guarantee quality in the performance characteristics of a method and quality in lot-to-lot consistency and long-term stability of an analytical procedure, such as described in this issue by Klein and Junge (44). This last point is critical, particularly a calibrator's lot-to-lot consistency and the stability of analytical procedures over the long term. This is why manufacturers should notify clinical chemists of any alterations before implementation.

8. Companies conceiving **Laboratory Information Systems** should be incited to develop software that includes reliable information on biological variability

and multidimensional reference limits. The presentation of results should be also taken into account. Is there an alternative to the reference concept with reference individuals, reference values and reference intervals etc.? Henk Goldschmidt (45) has established such a vision, "The NEXUS vision", which looks provocative and can serve as the basis for future discussions. This special issue of CCLM on "reference values and reference intervals" has revealed that the reference value concept still forms a valid and firm basis for laboratory medicine. But, multiple new aspects of the theory and practical applications are flowering as ideas and as completed projects. The concept of health is still a matter of dispute. There are new statistical models, the interpretation of reference limits as decision points is a problem, the selection of reference individuals is a challenge for each quantity, there is an increasing pressure for establishing common reference intervals for homogeneous groups across laboratories/methods/countries and a need for high-quality analytical standardization with traceable concentration values. However, we do not need too much standardization within this dynamic field of reference values and reference intervals as this might inhibit natural developments. However, these aspects should be addressed by scientific organizations in order to explore the many relevant problems, ideas and applications and to stimulate education of clinical chemists as well as clinicians and medical students.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This article, written by Joseph Henny (Laboratoire de Biologie Clinique, Centre de Médecine Préventive, 54501 Vandoeuvre-les-Nancy) originally appeared in *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM) Clin Chem Lab Med* 2004; 42(7): 686-691 2004 by Walter de Gruyter "Berlin" New York. It has been reprinted with kind permission of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM) published by Walter de Gruyter Publishers in Association with the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine and the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.

#### REFERENCES

1. **Gräsbeck R., Saris N. E.:** Establishment and use of normal values. *Scand J Clin Lab Invest* 1969;26 Suppl 110: 62-3.
2. **Gräsbeck R.:** The evolution of the reference value concept. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 692-7.
3. **Kallner A., Gustavsson E., Hendig E.:** Can age and sex related reference intervals be derived for non-healthy and nondiseased individuals for results and measurements in primary health care? *Clin Chem Lab Med* 2000; 38: 633-54.

4. **Siest G.:** Study of reference values and biological variation: a necessity and a model for Preventive Medicine Centers. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 810–6.
5. **Dhondt J. L.:** Difficulties in establishing reference intervals for special fluids: the example of 5-hydroxyindoleacetic acid and homovanillic acid in cerebrospinal fluids. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 833–41.
6. **Fuentes-Arderiu X., Mas-Serra R., Alumà -Trullàs A., Martí-Marçet M. I., Dot-Bach D.:** Guideline for the production of multicentre physiological reference values using the same measurement system. A proposal of the Catalan Association for Clinical Laboratory Sciences. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 778–82.
7. **Ricoós C., Doménech M. V., Perich C.:** Analytical quality specifications for common reference intervals. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 858–62.
8. **Rustad P., Felding P., Lahti A.:** Proposal for guidelines to establish common biological reference intervals in large geographical areas for biochemical quantities measured frequently in serum and plasma. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 783–91.
9. **Lahti A.:** Partitioning biochemical reference data into subgroups: comparison of existing methods. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 725–33.
10. **Hyltoft Petersen P., Blaabjerg O., Andersen M., Jørgensen L. G. M., Schousboe K., Jensen E.:** Graphical interpretation of confidence curves in rankit plots. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 715–24.
11. **Virtanen A., Kairisto V., Uusipaikka E.:** Parametric methods for estimating covariate-dependent reference limits. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 734–8.
12. **Solberg H. E.:** The IFCC recommendations on estimation of reference intervals. The Refval Program. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 710–4.
13. **Petitclerc C.:** Normality: the unreachable star? *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 698–701.
14. **Henny J., Steinmetz J., Herbeth B., Wagner C., Siest G.:** High sensitivity C-reactive protein: biological variations and reference limits. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38: 1003–11.1
15. **Henny J., Petitclerc C., Fuentes Arderiu X., Hyltoft Petersen P., Queraltó J. M., Schiele F., Siest G.:** Need for revisiting the concept of reference values. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38: 589–95.
16. **Jørgensen L. G. M., Brandslund I., Hyltoft Petersen P., Stahl M., de Fine Olivarius N.:** Creation of a low-risk reference group and reference interval of fasting venous plasma glucose. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 817–23.
17. **Jensen E., Hyltoft Petersen P., Blaabjerg O., Hansen P. S., Brix T. H., Kyvik K. O. et al.:** Establishment of a thyroid serum stimulating hormone (TSH) reference interval in healthy adults. The importance of environmental factors, including thyroid antibodies. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 824–32.
18. **Ritchie R. F., Palomaki G.:** Selecting clinically relevant populations for reference ranges. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 702–9.
19. **Vesper H. W., Demers L. M., Eastell R., Garnero P., Kleerekoper M., Robins S. P. et al.:** Assessment and recommendations on factors contributing to preanalytical variability of urinary pyridinoline and deoxypyridinoline. *Clin Chem* 2002; 48: 220–35.
20. **Price C., Allard J., Davies G., Dawnay A., Dufty M. J., France M. et al.:** Pre-and postanalytical factors that may influence use of serum prostate specific antigen and its isoforms in a screening programme for prostate cancer. *Ann Clin Biochem* 2001; 38: 188–216.
21. **Siest G., Henny J., Schiele F., editors.:** *Références en biologie clinique.* Paris: Editions Scientifiques Elsevier, 1990: 679 p.
22. **Joosten E., Lesaffre R., Riezler R.:** Are different reference intervals for methylmalonic acid and total homocystein necessary in elderly people? *Eur J Haematol* 1996; 57: 222–6.
23. **Horn P. S., Pesce A. J.:** Effect of ethnicity on reference intervals. *Clin Chem* 2002; 48: 1802–4.
24. **Mediene-Bechekor S., Brousseau T., Richard F., Benhamamouch S., Amouyel P., and the ECTIM study group:** Blood lipid concentrations and risk of myocardial infarction. *The Lancet* 2001; 358: 1064–5.
25. **Ichihara K., Itoh Y., Min W. K., Yap S. F., Lam C. W. K., Kong X. T. et al.:** Diagnostic and epidemiological implications of regional differences in serum concentrations of proteins observed in six Asian cities. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 800–9.
26. **Johnson A. M., Hyltoft Petersen P., Whicher J. T., Carlström A., MacLennan S.:** on behalf of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Committee on Plasma Proteins. Reference intervals for plasma proteins: similarities and differences between Caucasian and Asian Indian males in Yorkshire, UK. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 792–9.
27. **Sakande J., Coulibaly J. L., Njikeutchi F. N., Bouabre A., Boukary A., Guissou I. P.:** Etablissement des valeurs de référence de 15 constituants biochimiques sanguins chez l'adulte burkinabe à Ouagadougou (Burkina-Faso). *Ann Biol Clin* 2004; 62: 230–5.
28. **Horn P. S., Perce A. J.:** Reference intervals: an update. *Clin Chim Acta* 2003; 334: 5–23.
29. **Siest G., Henny J., Guize L., Sachs C.:** Utilisation des valeurs de référence. *Ann Biol Clin* 1982; 40: 697–708.
30. **Jørgensen L. G. M., Brandslund I., Hyltoft Petersen P.:** Should we maintain the 95 percent reference intervals in the era of wellness testing? A concept paper. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 747–51.
31. **Queraltó J. M.:** Intraindividual reference values. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 765–77.
32. **Williams R. S.:** *Biochemical individuality.* New York: Wiley and Sons, 1956: 47.
33. **Dhondt J. L., Forzy G.:** Etablissement des valeurs usuelles pour les acides 5-hydroxy indolacétique et homovanillique dans le liquide céphalorachidien. *Ann Biol Clin* 2003; 61: 69–75.
34. **Fraser C. G.:** Inherent biological variation and reference values. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 758–64.



35. **Boyd J. C.:** Reference regions of two or more dimensions. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 739–46.
36. **Demers L. M., Spencer C. A., editors.:** Laboratory medicine practice guidelines. Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. *Thyroid* 2003; 13: 33–44.
37. **Klee G. G.:** Clinical interpretation of reference intervals and reference limits. A plea for assay harmonization. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 752–7.
38. **Young D. S.:** Conveying the importance of the preanalytical phase. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 884–87.
39. **McQueen M.:** Evidence-based laboratory medicine: addressing bias, generalisability and applicability in studies on diagnostic accuracy. The STARD initiative. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 1.
40. **Bossuyt P. M., Reitsma J. B., Bruns D. E., Gatsonis C. A., Glasziou P., Irwig L. M. et al.:** Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 68–73.
41. **Solberg H. E., Stamm D.:** International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Scientific Division. Approved recommendation on the theory of reference values. Part 4. Control of analytical variation in the production, transfer and application of reference values. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991; 29: 531–5.
42. **Westgard J. O.:** Design of internal quality control for reference value studies. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 863–7.
43. **Thienpont L. M., Van Uytvanghe K., Rodríguez Caba-leiro D.:** Metrological traceability of calibration in the estimation and use of common medical decision-making criteria. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 842–50.
44. **Klein G., Junge W.:** Creation of the necessary analytical quality for generating and using reference intervals. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 851–7.
45. **Goldschmidt H. M. J.:** The NEXUS vision: an alternative to the reference value concept. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 868–73.

---

## BIOLOGICAL VARIATION OF THYROID AUTOANTIBODIES AND THYROGLOBULIN

---

ESTHER JENSEN<sup>1,\*</sup>, PER HYLTOFT PETERSEN<sup>2</sup>,  
OLE BLAABJERG<sup>1</sup> AND LASZLO HEGEDÜS<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Biochemistry, Odense  
University Hospital, Odense, Denmark

<sup>2</sup>NOKLUS, Norwegian quality improvement of  
primary care laboratories, Division for General  
Practice, University of Bergen, Bergen, Norway

<sup>3</sup>Department of Endocrinology and Metabolism,  
Odense University Hospital, Odense, Denmark

### ABSTRACT

**Background:** It has been shown that the level of serum thyroid antibodies affects serum thyrotropin (TSH) concentrations in men and women, and that these autoantibodies in combination with serum TSH are predictive of future thyroid disease. As the biological variation of these autoantibodies is unknown, we investigated this in fertile women during one complete regular menstrual cycle.

**Methods:** A total of 24 healthy women (23–46 years) were investigated twice a week between 07:30 and 11:00 h. Antibodies against thyroid peroxidase (TPOAb), thyroglobulin (TgAb), and thyrotropin receptor (TRAb) were measured in serum, as well as thyroglobulin (Tg). TPOAb, TgAb and Tg were determined on an AutoDEL-FIA system (Perkin Elmer/Wallac) and TRAb by a radioreceptor assay from Brahms Diagnostica.

**Results:** All 24 women had measurable levels of TPOAb and TgAb in all samples, and nine women had antibodies above the upper reference limit of the laboratory (6 had TPOAb >10 kIU/L, 6 had TgAb >20 kIU/L and 1 had TRAb >0.75 IU/L). Eight women had Tg below the lower reference limit, five of whom had elevated TgAb. Variations in the thyroid antibodies were random and not related to the menstrual cycle. For TPOAb (2.5–258 kIU/L), the CV biological was 11.3%, while the CV analytical was 10.6%. For TgAb (5.6 to 148 kIU/L) CV biological was 8.5% and CV analytical was 9.0%. The woman with TRAb had a CV biological of 4.8%, while the analytical variation in duplicates was 3.9% at a level of 2.8 IU/L.

**Conclusions:** It is possible to measure TPOAb and TgAb in all samples with the AutoDEL-FIA. There is no systematic variation in autoantibodies during the

menstrual cycle. The biological coefficient of variation for TPOAb and TgAb was 11.3% and 8.5%, respectively. Clin Chem Lab Med 2007;45:1058–64.

**Key words:** biological variation; healthy women; thyroglobulin (Tg); thyroglobulin antibodies (TgAb); thyroid peroxidase antibodies (TPOAb); thyrotropin receptor antibodies (TRAb).

### INTRODUCTION

The presence of thyroid autoantibodies increases the likelihood of having or developing subclinical or overt thyroid disease. Therefore, elevated serum thyroid peroxidase antibodies (TPOAb) and/or thyroglobulin antibodies (TgAb) often result in treatment with thyroxine, sometimes regardless of clinical symptoms and whether serum thyrotropin (TSH) is elevated (1, 2). Furthermore Tg and TgAb play an important role in diagnosis and follow-up of thyroid cancer.

For most of the naturally occurring quantities measured in serum, plasma and blood, biological within- $(CV_{\text{within-subject}})$  and between-subject  $(CV_{\text{between-subject}})$  coefficients of variation have been estimated and the results are available in data banks, published in scientific journals, and on the Internet (3–7).

$CV_{\text{within-subject}}$  and  $CV_{\text{between-subject}}$  values for TSH and Tg have been published (8), and it has been demonstrated that Tg and TgAb are interrelated following subtotal thyroidectomy, with release of Tg and subsequent decrease in TgAb (9). Data for biological variation of thyroid antibodies are, however, not available.

Thyroid size varies during the menstrual cycle and increases by approximately 20% from day 2 to 23, with a comparable variation in Tg (10). Numerous other components such as estrogens, progesterone, lutropine and follitropine are also known to vary in fertile women.

Consequently, the aim of our study was to estimate within-subject biological variation of thyroid autoantibodies in fertile women and to investigate whether there is a systematic variation related to the menstrual cycle.

### SUBJECTS AND METHODS

#### Subjects

A total of 24 healthy women with a median age of 35.5 years (range 23–46 years) were recruited from the Department of Clinical Biochemistry of Odense University Hospital, Denmark. The women were self-reported healthy, fertile and had regular menstrual cycles; only one was taking medication.

Blood samples were obtained twice a week from all 24 women. Owing to variations in cycle length, 20 women had nine blood samples drawn, while the remaining four individuals had 7, 8, 10 and 11 samples drawn. The sampling period varied between 25 and 36 days. An overlap

---

\*Corresponding author: Esther Jensen, Department of Clinical Biochemistry, Odense University Hospital, 5000 Odense C, Denmark  
Phone: +45-65-412865, Fax: +45-65-411911,  
E-mail: esther.jensen@ouh.fyns-amt.dk

between the first and last blood sample in individual cycles was allowed. Six women were on oral estrogen and four were regular cigarette smokers. Median body mass index (BMI) was 22.9 kg/m<sup>2</sup> (range 17.2–28.3 kg/m<sup>2</sup>). Pertinent descriptive data are presented in Table 1.

All samples were collected by one laboratory technologist to reduce the pre-analytical variation. Blood samples were obtained from each individual between 07:30 and 11:00 h from a cubital vein. Prior to blood collection, each individual sat for 5 min. The first day of the present menstrual cycle was registered, as well as exercise habits, alcohol intake, intake of medications during the previous week and smoking habits. Height and weight were recorded, and the time interval since the last intake of food or liquid for each blood sample.

Samples of 11 ml of serum were frozen at -808 °C in 1 ml tubes within 3 h of sampling. Samples from each individual were run in duplicates next to each other.

Written informed consent was obtained from all participants.

### Analytical methods

Serum concentrations of TPOAb, TgAb and Tg were measured using solid-phase time-resolved fluoroimmuno-metric assays (AutoDelfia, Perkin Elmer/Wallac, Turku, Finland).

TSH receptor antibodies (TRAb) were measured using the improved DYNtest® TRAK human radioreceptor assay (Brahms Diagnostica, Berlin, Germany) (11). Radioactivity was measured in a WIZARD 1470 automatic gamma counter equipped with the Multicalc data management program (Perkin Elmer, Turku, Finland). Calibrators traceable to international reference preparations were used: NIBSC 66/387 for TPOAb, 1st IRP 65/93 for TgAb, WHO 90/672 for TRAb, and CRM 0457 (IRMM) for Tg. According to the manufacturer, the detection limits for TPOAb, TgAb, TRAb, and Tg were <1.0 kIU/L, <1.0 kIU/L, <0.3 IU/L and 0.2 µg serum, respectively. Characteristics of these assays have previously been described (11–13). S-IgG, traceable to Certified Reference Material CRM 470, was measured turbidimetrically on an Integra 700 system using reagents from Roche (Mannheim, Germany).

The 95 % reference intervals (decision limits) for thyroid antibodies are: TPOAb, 2.1–9.8 kIU/L (14.5 kIU/L); and TgAb, 2.9–19.2 kIU/L (30.7 kIU/L) (12). For TRAb the upper reference limit is 0.75 IU/L and no decision limit is defined (11).

### Calculations and statistical methods

#### Test of the relationship between concentration of component (measurand) and time in the menstrual cycle

**Harmonization of the menstrual cycle** The length of the menstrual cycle was 28 days for women using estrogens as contraceptives and varied from 25 to 36 days for the remaining women. Consequently, specimens were

ordered from the first cycle day for each woman, and for each sample the “harmonized day” was calculated as “day in the menstrual cycle” multiplied by 28 and divided by the “actual length of the cycle”. Then the “harmonized days” were ranked in groups of 4 days, resulting in seven subgroups.

**Normalization of measured concentrations** For each woman and for each component the mean concentration was calculated and each measured concentration was divided by this mean, resulting in values distributed around 1.0 for each woman. Consequently, the calculated standard deviation, *s*, has no unit and is equal to the coefficient of variation, as  $CV = s/1.0$  and  $CV\% = 100 \times s/1.0$ .

**Estimation of coefficients of variation** One-way analysis of variance was applied to the seven subgroups with the normalized values as replicates, and coefficients of variation ( $s/100 = s$ ) were calculated for within- and between-variation of the seven subgroups (14, 15). Considerable betweenvariation compared to within-variation indicates a systematic course through the menstrual cycle.

### Estimation of parameters of coefficients of variation

**Between-subject variation and pooled (common) withinsubject variation** For each component (value *Y*) the natural logarithm (ln or loge) was calculated and analysis of variance for repeated sub-sampling at three levels was applied to the ln concentrations, resulting in the parameters  $CV_{\text{between-subject}}$  and  $CV_{\text{within-subject}}$ , together with  $CV_{\text{analytical}}$  (14, 15). The CV values can be expressed either as fractions or percentages:  $CV\% = CV \times 100$ .

**Within-person variation for each individual** The individual variation for each person,  $CV_{\text{within-person}}$ , was estimated for each woman based on ln concentration values.

By using ln-values, the estimated standard deviations,  $s_{\ln x}$ , are the best estimates of coefficients of variation:  $CV \sim s_{\ln x}$  (and thus the standard deviation of ln values should not be divided by the mean of these ln values). The more correct formula is  $CV = [\exp(s_{\ln x}^2) - 1]^{1/2}$  (16, 17), but up to a directly calculated value of CVs0.400 the underestimation is negligible, as the more correct value is  $CV = 0.417$ , which is less than 5 % underestimation.

### Description of variability

The individual concentrations and  $CV_{\text{within-person}}$  values are illustrated in a diagram (Figure 2) showing the geometric mean and 95 % interval for each individual on a logarithmic concentration scale. In addition, the reference intervals are indicated, as well as decision limits for the antibodies.

### Test of variance homogeneity

Sample variances from the same population are “homogeneous” and consequently the ranked and cumulative distributions of these variances are distributed as  $\chi^2/DF$  ( $\chi^2$  distribution for degrees of freedom, DF,

according to the sample size). When different variances are distributed according to  $\chi^2/DF$ , they are considered as variance homogeneous.

This hypothesis is illustrated by cumulating the ranked individual coefficients of variation,  $CV_{\text{within-person}}$  values, and plotting them as fractions in a rankit plot (18, 19) together with the theoretical pooled  $CV_{\text{within-subject}} \times (\chi^2/DF)^{1/2}$ . If the curve for cumulative CV values follows the theoretical curve, then the variances can be considered homogeneous. Variance homogeneity can also be tested with Bartlett's test (14) or Cochran's test (20), but neither of them is precise and both are sensitive to the many assumptions needed for reliable tests.

### Illustration of relationship between Tg and TgAb

The relationship between Tg and its autoantibody TgAb is illustrated in a simple x-y plot.

The 90 % confidence intervals for variances are estimated from the formula  $DF \times s^2/\chi_{0.95}^2 < \sigma^2 < DF \times s^2/\chi_{0.05}^2$  (90 % CI) (14, 15).

The analytical quality specification for imprecision (desirable analytical performance) is calculated from the formula:  $CV_{\text{analytical}} < 1/2 CV_{\text{biological}}$  (19, 21).

The reference change value (RCV) is calculated for each of the parameters as  $(z \times \sqrt{2 \times CV_{\text{total}}})$ , where  $z = 1.96$  and  $CV_{\text{total}} = (CV_{\text{total analytical}}^2 + CV_{\text{within-subject}}^2)^{1/2}$  (19, 22). The 90 % confidence interval for fraction p is calculated as  $p \pm 1.64 [p(1-p)/n]^{1/2}$  (15).

## RESULTS

### General

All 24 women had measurable values of TPOAb and TgAb in all samples. Nine women had antibody levels above the upper reference limit of the laboratory (6 had TPOAb > 10 kIU/L, 6 had TgAb > 20 kIU/L, and 1 had TRAb > 0.75 IU/L). Eight women had Tg below the lower reference limit of 2 µg/L, five of whom had elevated TgAb (Table 1). The prevalence of antibodies was 38 % (90 % CI 22 %–54 %).

### Relationship between concentration of measurand/component and time in menstrual cycle

All six women using estrogens had a menstrual cycle length of 28 days, whereas the length was harmonized to 28 days for the rest of the women. Moreover, the days of corrected sampling were arranged into seven groups of 4 days each. Every concentration was normalized by division by the mean concentration for the same woman, and the within and between-group coefficients of variation were calculated by one way analysis of variance. There were no systematic variations during the menstrual cycle for the total group of 24 women for any of the investigated components, as shown in Table 2. The between-group CV values are below 3 % compared to the within-group variation of 10 %–18 %. For the six women taking oral contraceptives, however, there was a decrease of approxi-

mately 20 % in Tg concentration from the first to the next period of 4 days in the menstrual cycle, followed by a slow increase to the original value during the remaining cycle. For these women, the between-group variation was 9.6 %, which is of the same order as the within-group variation of 12.5 %, as illustrated in Figure 1, where the shadowed area indicates the 95 % band ( $\text{mean} \pm 2 \times CV$ ) for women using estrogens. The lack of systematic changes for the rest of the women is illustrated by the individual 15 courses of normalized Tg concentrations (3 women had Tg concentrations below the detection limit). There was no systematic course for the thyroid autoantibodies in the six women using estrogen.

### Illustration of within- and between-subject variations

Figure 2 shows the individual means and 95 % confidence intervals on a logarithmic scale for all 24 women for TPOAb, TgAb and Tg, together with the relevant reference intervals, as well as the decision limits for the autoantibodies. For three women, most Tg values were below the detection limit, so these are indicated by three arrows to the left.

### Variance homogeneity

The dispersion of homogeneous variances is expected to follow a  $\chi^2$  distribution with  $DF = n - 1$  and the 24 CV values are consequently cumulated according to rank and compared to  $CV_{\text{pooled}} \times (\chi^2/8)$  in a rankit plot (Figure 3). The distribution of TPOAb CV values does not follow a  $\chi^2$  distribution and is therefore not homogeneous (Figure 3A). Separating CV values below and above the upper reference limit also results in inhomogeneous distributions of both (data not shown).

The TgAb distribution, however, is close to  $\chi^2$ , as if all values came from the same common Gaussian distribution (Figure 3B). Only one woman had all TRAb measurements above the detection limit, so there is no distribution of individual CV values. For Tg, three women had several measurements below the detection limit, implying that the distribution, by definition, may be considered inhomogeneous.

### Estimated parameters for biological variation

Estimates of the biological within- and between-subject CV for the three antibodies and Tg are shown in Table 3.  $CV_{\text{between-subject}}$  values are shown in parentheses, as several women had values above the upper reference limit, and therefore the index-of-individuality was not calculated. Values of  $CV_{\text{within-subject}}$  are approximately 10% for TPOAb and TgAb and are mainly the same below and above the upper reference limits. The analytical imprecision for both is of similar size and approximately twice the analytical quality specifications for imprecision.  $CV_{\text{within-subject}}$  for TRAb is approximately 5 %, but based on only one subject. For Tg,  $CV_{\text{within-subject}}$  is approximately 16 %, whereas the analytical imprecision is low and within the quality specification. The calculated 95 % RCVs are between 35 % and 45 % for TPOAb, TgAb and Tg.

**Table 1. Basic data and measured values of the participants**

Number	Samples n	Basic data				Mean concentration for each individual			
		Age years	BMI kg/m <sup>2</sup>	Cycle days	Working in shifts	TPOAb kIU/L	TgAb kIU/L	TRAb IU/L	Tg mg/L
<b>No estrogen intake</b>									
1	9	46	24.0	27	Yes	258	42	<0.75	0.8
2 <sup>a</sup>	9	33	23.2 3	2	No	5	9	<0.75	13.2
3	9	37	20.1	26	No	9	35	<0.75	0.0
5	9	24	22.6	32	No	31	14	2.8	16.3
6	11	33	22.5	36	Yes	4	6	<0.75	5.4
7	10	31	21.5	31	No	2	6	<0.75	6.0
8	8	36	20.4	30	No	4	11	<0.75	3.4
9	9	35	26.2	30	No	3	6	<0.75	16.3
10	9	26	25.1	26	Yes	4	14	<0.75	1.9
11	9	42	18.9	27	No	47	11	<-0.75	6.1
12	9	34	23.5	27	No	4	8	<0.75	7.7
13	9	45	25.2	29	No	247	16	<0.75	0.3
14	9	29	17.2	30	No	4	7	<0.75	10.5
15	9	41	28.3	27	No	6	50	<0.75	0.0
18	9	37	28.0	26	No	182	146	<0.75	0.0
19	9	37	27.0	26	No	15	23	<0.75	3.9
20	9	37	22.1	25	No	5	10	<0.75	3.5
24	9	35	19.8	26	Yes	6	8	<0.75	12.0
<b>Estrogen intake</b>									
4 <sup>a</sup>	9	23	21.5	28	No	3	6	<0.75	15.0
16	9	40	24.1	28	No	2	6	<0.75	6.4
17	9	28	22.4	28	Yes	3	13	<-0.75	0.2
21 <sup>a</sup>	7	31	25.4	28	No	4	9	<0.75	25.9
22 <sup>a</sup>	9	25	19.6	28	No	3	30	<0.75	1.9
23	9	29	27.3	28	Yes	6	9	<0.75	12.7

\*Smokers.

### Relationship between Tg and TgAb

Tg and the TgAb concentrations are expected to be interrelated. In Figure 4 the combined values for each blood sample in all 24 women are illustrated. It is evident that Tg concentrations >5 µg/L correspond to TgAb concentrations within the reference interval.

Below Tg values of >5 µg/L there is a crude inverse relation with TgAb concentrations. The combinations of the two components are very reproducible within each woman.

## DISCUSSION

### General

This investigation was performed to establish the biological variation for thyroid antibodies in healthy

**Table 2 Biological variation of TPOAb, TgAb and Tg in fertile women**

Component	CV <sub>within-group</sub> %	CV <sub>between-group</sub> %
TPOAb (n=24)	13.0	1.2
TgAb (n=24)	10.3	1.8
Tg (n=21)*	17.9	2.7
Tg (n=6) <sup>b</sup>	12.5	9.6

For each woman the length of the menstrual cycle was harmonized to 28 days. The concentration measured in each sample was normalized by division by the mean concentration obtained for each subject. All normalized values are grouped in 4-day periods. Coefficients of variations for within and between groups were estimated by analysis of variance. \*Three women had Tg concentrations below the detection limit. <sup>b</sup>Six women were taking oral contraceptives.

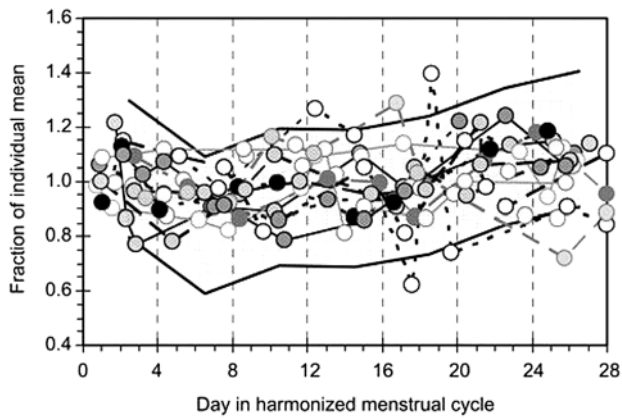


Figure 1. Fractional Tg concentrations as a function of harmonized menstrual cycle in 21 fertile women. Menstrual cycles were harmonized to 28 days and ordered in seven groups of 4 days. Fractional Tg concentrations were calculated by dividing each measured concentration by the mean for the same woman. The hatched area illustrates mean  $\pm 2s$  in each group for the six estrogen users, while the individual courses are shown for the remaining 15 women. Three women had Tg concentrations below the detection limit.

fertile women. Surprisingly, nine of 24 (38%) healthy volunteers had a thyroid antibody concentration above the upper reference limit. The prevalence of elevated antibody levels was 25% (6 of 24) for TPOAb, 25% (6 of 24) for TgAb, and 4% (1 of 24) for TRAb.

This prevalence of elevated TPOAb is higher than the 14% found in another Danish investigation using the same methods (12) and in other studies using various criteria for antibody presence (23, 24). However, the latter studies applied more rigorous rule-out criteria based on other parameters, e.g., ultrasound scanning and use of medication or having a family history of thyroid disease. The total prevalence of 38% for elevation of

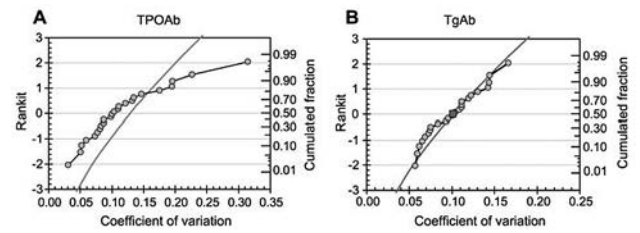


Figure 3. Plots illustrating variance homogeneity. Cumulated coefficients of variation for TgAb and TPOAb compared to the ideal  $\chi^2$  distribution (DF = 8). Ranked and cumulative fractions of individual within-subject coefficients of variation on a rankit scale as a function of the coefficient of variation. For comparison to the theoretical homogeneous distributions, the functions of CV pooled  $\times (\chi^2 / DF)^{1/2}$  for DF = 8 are shown. (A) TPOAb and (B) TgAb.

any thyroid antibody, combined with borderline values of TSH and triiodothyronine, suggests that some could have subclinical thyroid disease.

However, the estimated CV<sub>within-subject</sub> for TPOAb and/ or TgAb is calculated for the present range of antibodies.

We have not carried out a follow up to test if overt thyroid disease evolved and we cannot distinguish between “low-risk” and “high-risk” antibodies (12). We have not investigated the biological variation of these antibodies in overt thyroid disease.

#### Influence of the menstrual cycle on variability of the components

We found no systematic variation in concentrations of TPOAb and TgAb in relation to the menstrual cycle (Table 2), and the within-group variations for the two components were slightly greater than 10%. Findings for serum Tg were comparable, but the six women on oral estrogens demonstrated an unexplained systematic

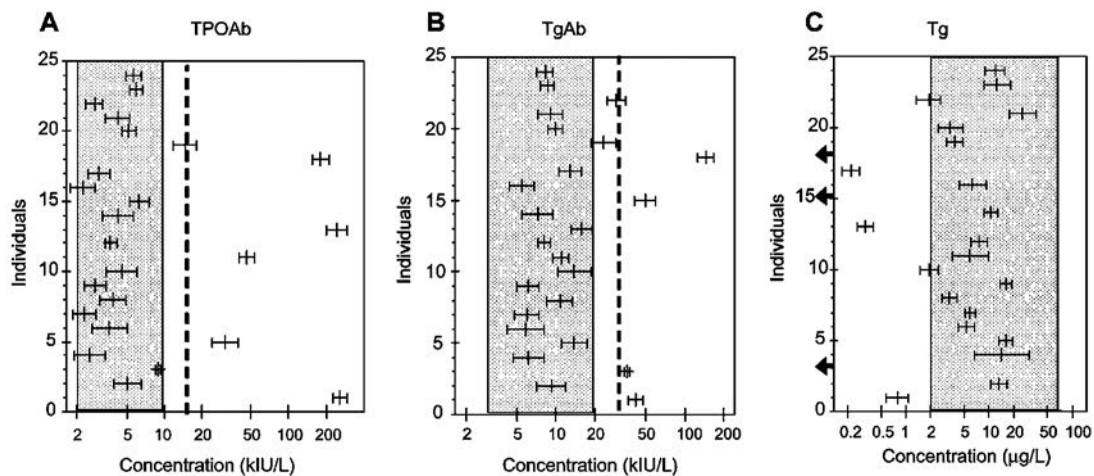
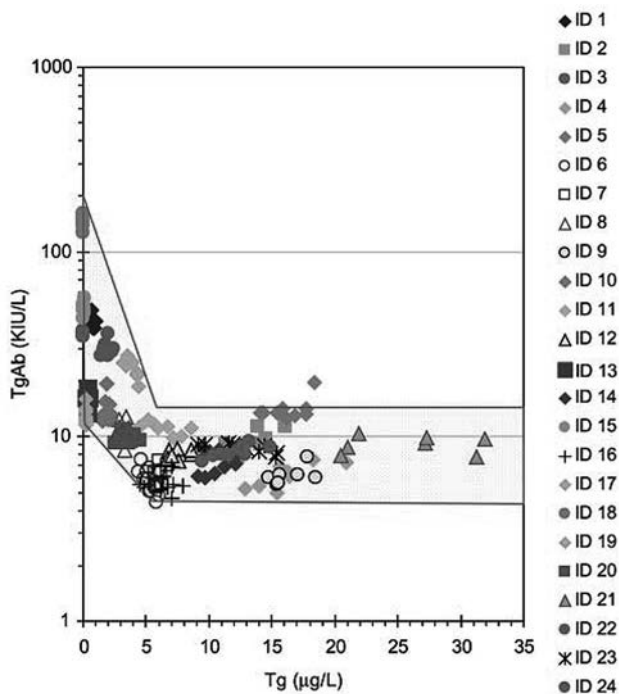


Figure 2. Biological variation for 24 healthy women. Mean  $\pm 2s$  on a logarithmic scale ( $\text{mean}_{\text{in}} \pm 2s_{\text{in}}$ ) for each of the 24 women for (A) TPOAb, (B) TgAb and (C) Tg. Hatched areas illustrate the reference intervals. For TPOAb and TgAb the vertical dotted lines indicate the decision limits. The three women with Tg concentrations below the detection limit are illustrated by arrows to the left.

**Table 3** Estimates of biological and analytical coefficients of variation with analytical quality specifications for imprecision and reference change values in 24 women.

Component	Unit	Range of means	CV <sub>bs</sub> %	CV <sub>ws</sub> %	CV <sub>ws</sub> , %		CV <sub>a</sub> %	CV <sub>a</sub> specification %	RCV(95%) %
					<URLc	>URLc			
TPOAb	kIU/L	2–258	147	11.3	11.8	9.5	10.6	5.7	42.9
TgAb	kIU/L	6–148	82	8.5	9.0	6.8	9.0	4.3	34.3
TRAb <sub>a</sub>	IU/L	0–2.8		4.8			3.9	2.4	17.2
Tgb	µg/L	0–26	128	16.2			2.9	8.1	45.6
IgG	g/L	7–18	22	3.0			1.0	1.5	8.8

Blood was drawn nine times during a single complete menstrual cycle. CV<sub>bs</sub>, between-subject coefficient of variation; CV<sub>ws</sub>, within-subject coefficient of variation; URL, upper reference limit; CV<sub>a</sub>, analytical coefficient of variation; RCV, reference change value. <sup>a</sup>Only one woman had TRAb concentrations above the detection limit. <sup>b</sup>Results for 21 women (3 women had at least one Tg concentration below the detection limit and were consequently excluded). <sup>c</sup>Six women had TPOAb concentrations above the upper limit, and six had TgAb levels above the upper limit.



**Figure 4** TgAb as a function of Tg. All combinations of TgAb and Tg for the 24 women with different symbols for each woman. The hatched area illustrates, for Tg concentrations above 5 µg/L, the lack of relation between the two components, and the inverse relation for Tg concentrations below 5 µg/L. The points for each woman are clustered within narrow areas. For three women the Tg measurements were below 0.2 µg/L.

decrease of approximately 20% from the first to the second 4-day period (Figure 1).

**Variance homogeneity and estimated parameters**

The variances of TgAb are  $\chi^2$ -distributed and thus homogeneous, which means that the same CV is a pli-

cable to all women when monitoring serum TgAb (Figure 3B), and the small difference between concentrations below and above the upper reference limit (Table 3) is of hardly any significance. In contrast, TPOAb variances are not homogeneous, and use of one CV within-subject value for all women may lead to erroneous interpretation of measured differences when compared to RCVs. This is because an individual with a narrow variation needs greater changes – as calculated in individual CV values – to surpass the RCV, which is based on the common pooled CV, whereas a woman with a high CV may show an increased fraction of false positive differences. Thus, the RCV can be applied to TgAb without limitations, whereas for TPOAb caution is suggested. For TPOAb, estimations of biological within-person variation in each single individual, previous to clinical use, would be very valuable. It may be questioned whether analytical noise might interfere with specific measurements of the autoantibodies, but the variance homogeneity of TgAb points to the fact that we measure the same antigen in all individuals. Furthermore, for TPOAb the CV values above and below the upper reference limit are similar. These data support the conclusion that analytical noise has negligible influence on the estimated CV values.

The measured thyroid antibodies are of the IgG type. Consequently, the estimated within-subject variation of approximately 10% should be compared to the within-subject variation of IgG, which is estimated to be 3.0% in the same samples. This factor of approximately three may be explained by the fact that the individual specific antibodies each has its own turnover, whereas total IgG includes many different antibodies with varying synthesis and catabolism, and therefore variation of the total IgG is equalized.

According to Ricos et al. (6) the median value for published data is 4.5%. This is somewhat higher than our estimate, but confirms the order of difference between the specific antibodies and total IgG.

There are no calculations of index-of-individuality, as the between-subject variations of TPOAb and TgAb are extremely high, due to the fact that 25% of the women had concentrations above the upper reference limits.

#### Relationship between serum Tg and TgAb

TgAb and Tg are interrelated. A high serum concentration of TgAb reduces Tg considerably, and this may result in Tg concentrations below the detection limit (Figures 2 and 4). This is expected from the direct relation between antigen and antibody as described by Feldt-Rasmussen et al. (9). They demonstrated that subtotal thyroidectomy released Tg in high concentrations, which could reduce TgAb considerably, and diminish levels to below the detection limit if the previous TgAb concentration was moderate. When the release of Tg stopped, TgAb could increase to the original levels within 2 days. It follows that the level of TgAb is sensitive to changes in Tg. With the homogeneous variances of TgAb, the conditions for using RCV to disclose clinically important changes in TgAb are present.

Our within-subject variation for serum Tg was approximately 16%, which is of the same order of magnitude as found by Feldt-Rasmussen et al. (8).

The value of 0.1 for 0.1% in the database of Ricos et al. (6) refers to (8), where biological variations are reported as fractions. As a consequence, the value of 0.1 in (6) must be a misinterpretation of 0.13 (s13%).

Our high between-subject variation seems to be due to the considerable scatter (also without the women with Tg concentrations below the detection limit), whereas the older study (8) comprised only five women, who by chance showed only a slight degree of scatter, with a value of 25%.

The above is of importance when deciding whether there is a change in an individual's antibody level. For individuals with an assumed concentration of 28 µg/L Tg, 28 kIU/L TPOAb, 28 kIU/L TgAb and 2.8 IU/L TRAb, the next measurement should exceed 41, 40, 38 and 3.3, respectively, to exceed the 95% RCV.

#### CONCLUSIONS

We were able to measure TPOAb and TgAb in all samples. There was no relationship between the concentration of TPOAb or TgAb and time in the menstrual cycle.

The biological within-subject variation and imprecision for TPOAb at a serum concentration of 2.4–258 IU/L was 11.3% and 10.6%, respectively.

TgAb at a serum concentration of 5.6–148 IU/L, these were 8.5% and 9.0%, respectively.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The excellent assistance of laboratory technologist Nina Brøgger is gratefully acknowledged. We would also like to thank laboratory technologists Maria Knudsen,

Anny Kokholm and Vivi Snedevind Moeller, Department of Clinical Biochemistry, Odense for their assistance. This work was presented at the 13th International Thyroid Congress, Buenos Aires, Argentina, October 30th to November 4th, 2005, poster 13.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This article, written by Per Hyltoft Petersen (NOK-LUS, Norwegian centre for external quality assurance of primary care laboratories, Division for General Practice, University of Bergen, Norway) originally appeared in *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM) Clin Chem Lab Med* 2007; 45(8): 1058–1064 2007 by Walter de Gruyter "Berlin" New York. It has been reprinted with kind permission of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM) published by Walter de Gruyter Publishers in Association with the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine and the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.

#### REFERENCES

1. Vanderpump M. P., Tunbridge W. M., French J. M., Appleton D., Bates D., Clark F. et al.: The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Whickham Survey. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995; 43: 55–68.
2. Surks M. I., Ortiz E., Daniels G. H., Sawin C. T., Col N. F., Cobin R. H. et al.: Subclinical thyroid disease: scientific review and guidelines for diagnosis and management. *J Am Med Assoc* 2004; 291: 228–38.
3. Fraser C. G.: The application of theoretical goals based on biological variation data in proficiency testing. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112: 404–15.
4. Fraser C. G.: Biological variation in clinical chemistry. An update: collated data, 1988–1991. *Arch Pathol Lab Med* 1992; 116: 916–23.
5. Ricos C., Alvarez V., Cava F., Garcia-Lario J. V., Hernandez A., Jimenez C. V. et al.: Current databases on biologic variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest* 1999; 59: 491–500.
6. Ricos C.: Update 2006. [www.westgard.com/guest32.htm](http://www.westgard.com/guest32.htm). Accessed December 11, 2006.
7. Sebastiaán-Gámbaro M. Á., Lirón-Hernández F. J., Fuentes-Arderiu X.: [www.westgard.com/intra-inter.htm](http://www.westgard.com/intra-inter.htm). Accessed December 11, 2006.
8. Feldt-Rasmussen U., Hyltoft Petersen P., Blaabjerg O., Horder M.: Long-term variability in serum thyroglobulin and thyroid related hormones in healthy subjects. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1980; 95: 328–34.
9. Feldt-Rasmussen U., Hyltoft Petersen P., Date J., Madsen C. M.: Sequential changes in serum thyroglobulin (Tg) and its autoantibodies (TgAb) following subtotal



- thyroidectomy of patients with preoperatively detectable TgAb. *Clin Endocrinol* 1980; 12: 29–38.
10. **Rasmussen N.G., Hornnes P.J., Hegedus L., Feldt-Rasmussen U.:** Serum thyroglobulin during the menstrual cycle, during pregnancy, and post partum. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1989; 121: 168–73.
  11. **Jensen E., Hyltoft Petersen P., Blaabjerg O., Hansen P.S., Hegeduus L.:** Improved sensitivity of a thyrotropin-receptorantibody assay. *Clin Chem* 2005; 51: 2186–7.
  12. **Jensen E., Hyltoft Petersen P., Blaabjerg O., Hansen P.S., Brix T.H., Hegeduus L.:** Establishment of reference distributions and decision values for thyroid antibodies against thyroid peroxidase (TPOAb), thyroglobulin (TgAb) and the thyrotropin receptor (TRAb). *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 991–8.
  13. **Jensen E., Hyltoft Petersen P., Blaabjerg O., Hansen P.S., Brix T.H., Hegeduus L.:** Establishment of a serum TSH reference interval in healthy adults. The importance of environmental factors, including thyroid antibodies. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 824–32.
  14. **Bliss C.I.:** *Statistics in biology.* New York: McGraw-Hill, 1967–1970: 1068 pp.
  15. **Altman D.G.:** *Practical statistics for medical research.* London: Chapman & Hall, 1991: 611 pp.
  16. **Dahler-Eriksen B.S., Flensted Lassen J., Hyltoft Petersen P., Dalsgaard Lund E, Lauritzen T, Brandslund I.:** Evaluation of a near-patient test for C-reactive protein used in daily routine in primary healthcare by use of difference plots. *Clin Chem* 1997; 43: 2065–75.
  17. **von Eyben F.E., Hyltoft Petersen P., Blaabjerg O., Lindgaard Madsen E.:** Analytical quality specifications for serum lactate dehydrogenase isoenzyme 1 based on clinical goals. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: 553–61.
  18. **Aarsand A.K., Petersen P.H., Sandberg S.:** Estimation and application of biological variation of urinary delta-aminolevulinic acid and porphobilinogen in healthy individuals and in patients with acute intermittent porphyria. *Clin Chem* 2006; 52: 650–6.
  19. **Kringle R.O., Bogovich M.:** Statistical procedure. In: **Burtis C.A., Ashwood E.R., editors:** *Tietz textbook of clinical chemistry*, 3rd ed. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1999: 265–309.
  20. **Neuilly M.:** CETAMA. Modeling and estimation of measurements errors. Paris: Intercept Ltd, 1999: 54–5.
  21. **Cotlove E., Harris E.K., Williams G.Z.:** Biological and analytical components of variation in long-term studies of serum constituents in normal subjects. *Clin Chem* 1970; 16: 1028–32.
  22. **Harris E.K., Yasaka T.:** On the calculation of a “reference change” for comparing two consecutive measurements. *Clin Chem* 1983; 29: 25–30.
  23. **Hollowell J.G., Stachling N.W., Flanders W.D., Hannon W.H., Gunter E.W., Spencer C.A. et al.:** Serum TSH, T4, and thyroid antibodies in the United States population (1998 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 489–99.
  24. **Völzke H., Alte D., Kohlmann T., Lüdemann J., Nauck M., John U. et al.:** Reference intervals of serum thyroid function tests in a previously iodine-deficient area. *Thyroid* 2005; 15: 279–85.

---

VÝZNAM KVALITY V LABORATÓRIU  
PRE NOVÝ TREND PREDIKTÍVNEJ, PREVENTÍVNEJ  
A PERSONALIZOVANEJ MEDICÍNY

---

MARKO KAPALLA<sup>1,2</sup>, DAGMAR KAPALLOVÁ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Alpha medical a.s., Podhora 47, 034 01 Ružomberok

<sup>2</sup>Board of Directors, European Association for Predictive,  
Preventive and Personalised Medicine, Brussels  
Belgium

E-mail: marko.kapalla@alphamedical.sk  
kapalla@epmanet.eu

Kvalitu v laboratóriu, ako komplexný pojem, nemôžeme zredukovať iba na koeficient variácie a bias bez chápania ďalších vzťahov v rámci poskytovaných služieb. Tejto téme, v zmysle indikátorov kvality, sme venovali pozornosť v roku 2007, kde sme prezentovali náš pohľad na komplexné chápanie pojmu „kvalita“ v laboratóriu [1].

Koncom roka 2008 bola založená medzinárodná nezisková asociácia, so sídlom v Bruseli, pod názvom „European Association for Predictive, Preventive and Personalised Medicine“ – EPMA, s cieľom presadzovania konceptu prediktívnej, preventívnej a personalizovanej medicíny pre prospech pacienta, ktorý je stredobodom jej záujmu [2]. Viac informácií o tejto asociácii je možné získať na jej web stránke [www.epmanet.eu](http://www.epmanet.eu).

S presadzovaním nového konceptu prediktívnej, preventívnej a personalizovanej medicíny (P3M) sa ešte viac rozširuje chápanie kvality v laboratóriu a naopak, kvalita v laboratóriu sa stáva ešte dôležitejšou, pretože laboratórna diagnostika hrá v celom koncepte jednu z kľúčových úloh [3], keďže musí poskytovať maximálne spoľahlivé informácie, ktoré je možné následne použiť na vypracovanie relevantných predpovedí, preventívnych krokov resp. individuálneho prístupu k liečbe.

**Hlavné atribúty kvality v laboratóriu, prispievajúce k rozvoju konceptu prediktívnej, preventívnej a personalizovanej medicíny:**

- kvalifikovaný personál,
- analytická kvalita,
- široká paleta vyšetřovaných parametrov,
- spektrum spolupracujúcich lekárov a ich aktívna spätná väzba,
- komplexnosť a množstvo údajov v databázach,
- úroveň spracovania údajov nástrojmi súčasných informačných technológií,
- aktívna účasť na výskume v oblasti laboratórnej diagnostiky a aplikácia výsledkov v praxi – translational research,
- aktívna účasť na vzdelávaní spolupracujúcich lekárov, sestier, pacientov, zástupcov ZP a zákonodarcov.

**Príspevok konceptu prediktívnej, preventívnej a personalizovanej medicíny k ďalšiemu rozvoju laboratórnej diagnostiky:**

- definovanie laboratórnej diagnostiky ako kľúčovej zložky pre celý koncept P3M,
- pravidelná odborná komunikácia s Európskou komisiou pri vypracovávaní plánov na vyčleňovanie finančných prostriedkov pre grantové programy v oblasti zvyšovania úrovne zdravotnej starostlivosti v EÚ (8. rámcový program),
- spolupráca s Európskym parlamentom pri vytváraní novej potrebnej legislatívy,
- podpora výskumu a aplikácie nových prediktívnych biomarkerov do rutínnej praxe laboratórií v spolupráci s diagnostickým priemyslom,
- podpora preventívnych diagnostických činností a z toho vyplývajúca dôležitosť kvalitných a spoľahlivých laboratórií,
- aktívna podpora pri komunikácii so ZP a patientskými organizáciami,
- podpora publikačnej činnosti pre členov EPMA,
- kontinuálne monitorovanie rozvoja konceptu P3M prostredníctvom vlastného elektronického časopisu, ktorý je zameraný na najnovšie poznatky v oblasti predikcie, prevencie a personalizovaného prístupu k liečbe pacienta,
- zvyšovanie všeobecného povedomia všetkých zainteresovaných účastníkov v procese zdravotnej starostlivosti v rámci celej EÚ.

**Čo by sa malo v laboratórnej diagnostike zlepšiť v zmysle zvyšovania kvality ako príspevku pre koncept prediktívnej, preventívnej a personalizovanej medicíny?**

- Využívanie informačných systémov,
- využívanie doterajších ako aj najnovších vedeckých aj technologických poznatkov,
- prístup pacienta, ako konečného užívateľa kvality služieb v zdravotnej starostlivosti, ktorý často nemá nijakú predstavu o význame laboratórnej diagnostiky pre jeho zdravie,
- prístup zdravotných poisťovní, ktoré stále chápu laboratórnú diagnostiku iba ako príčinu na nutnú stratu „svojich“ finančných zdrojov, bez jasnej analýzy ekonomického prínosu podpory tejto oblasti,
- zvýšiť počet akreditovaných laboratórií,
- systematickejší prístup k medzinárodnej spolupráci na vytváraní certifikovaných referenčných materiálov.

Súčasná situácia s informačnými tokmi v systéme zdravotnej starostlivosti nielen na Slovensku, ale všade vo svete, je veľmi málo koordinovaná, čím sa dramaticky znižuje možnosť využívania síce existujúcich, ale ťažko dostupných informácií, ktoré by bolo možné nástrojmi súčasných informačných technológií transformovať na spoľahlivé vedomosti, ktoré sú potrebné ako základ pre predikciu, včasnú prevenciu aj personalizovaný prístup. Dnešnú situáciu ako aj situáciu, ku ktorej by sme sa mohli v budúcnosti priblížiť sme načrtli schematicky v kapitole práve uvádzanej knihy [4]. Veľmi veľkú dôležitosť využívaniu informačných systémov v zdravot-

níctve prikladá aj nový plán amerického prezidenta B. Obamu na zavedenie systému elektronických lekárskych záznamov do roku 2014, na ktorý vyčlenil 19 miliárd dolárov, ako sa uvádza v editoriále časopisu Nature z 19. marca 2009 [5].

## ZÁVER

### Ako by mohla vyzeráť budúcnosť prediktívnej diagnostiky?

Analytická kvalita v laboratóriu patrí k základom a práve na tomto základe je potrebné stavať ďalšie služby s vysokou pridanou hodnotou pre pacienta. Na základe súčasného trendu sa jednou z potenciálne významných služieb stáva prediktívna diagnostika, preventívny prístup a personalizovaná medicína. Služby s takouto pridanou hodnotou je možné stavať len za predpokladu, že sa začnú maximálne využívať súčasné informačné technológie a zároveň sa budú do praxe čo najrýchlejšie dostávať najnovšie poznatky z oblasti základného výskumu. To si samozrejme bude vyžadovať aktívny prístup legislatívy, zdravotných poisťovní aj laboratórií, nevynímajúc ani vzdelávacie inštitúcie a pacienta.

Či v budúcnosti môžeme očakávať takú úroveň, že pre každého jednotlivca bude možné vytvoriť jedinečný a komplexný počítačový model, ktorý umožní spoľahlivé predpovede vývoja jeho zdravotného stavu, tak ako sme

už načrtli je zatiaľ otázne [4]. To, že nič také nevznikne, ak sa o to aspoň nepokúsime, je možné predpovedať s pravdepodobnosťou, ktorá limitne hraničí s istotou. Aj potenciálny úspech však so sebou prináša úskalia, a to vo forme vážnych etických otázok, ktorým bude nutné venovať veľkú pozornosť a riešiť ich za aktívnej účasti tých, ktorých sa to týka, teda pacientov, a teda nás všetkých.

## REFERENCIE

1. **Kapalla, M.:** Komplexnosť a kvalita – pohľad na indikátory kvality pre klinické laboratóriá. *Laboratórna diagnostika*, 1: 2007, **2007**, s. 64–65.
2. **Kapallová D., Kapalla M.:** Začiatok nového smerovania medicíny v Európe, *Konzílium*, 1, **2009**, s. 14.
3. **Kapalla, M., Kapitallová D.:** Kľúčová úloha laboratórnej diagnostiky pre prediktívnu medicínu, *Zborník prednášok z 8. Klinického dňa Alpha medicalu, Ružomberok*, 16. apríl, **2009**, s.
4. **Kapalla, M. Kapitallová D.:** Information systems as an essential component of prediction in laboratory diagnostics, In: **Golubnitschaja O., ed.:** *Predictive Diagnostics and Personalized Treatment*, Nova Science Publishers, ISBN 978-1-60692-737-3, New York, **2009** (v tlači).
5. Editorial, *Health highway*, *Nature*, 458, **2009**, s.259–260.

GUSTÁV KOVÁČ<sup>1,2</sup>, KATARÍNA RUMANOVÁ<sup>1</sup>  
PETER LEDNICKÝ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Inštitút laboratórnej diagnostiky, Alpha medical a.s.  
Bratislava

<sup>2</sup>Ústav chémie, klinickej biochémie a laboratórnej medicíny  
Slovenská zdravotnícka univerzita Bratislava

## ÚVOD

Cieľom príspevku je zhrnúť doterajšie skúsenosti s reštrukturalizáciou laboratórnej diagnostiky ako aj upozorniť na jej niektoré nové aspekty. Príspevok vychádza zo skúseností získaných pri reštrukturalizácii nemocničných oddelení ako aj z skúseností získaných pri plánovaní a implementácii reštrukturalizácie reťazca laboratórií. Osobitnú časť predstavujú skúsenosti získané z aktuálnej analýzy faktorov vonkajšieho prostredia.

## METÓDA

V príspevku sa zaoberáme problematikou reštrukturalizácie

- nemocničných laboratórií,
- reťazca laboratórií,

diskutujeme problematiku

- nemocničného prostredia,
- prostredia reťazca laboratórií,
- vonkajšieho prostredia,

z hľadiska financovateľa a poskytovateľa zdravotníckej starostlivosti.

## VÝSLEDKY

Problematika reštrukturalizácie laboratórnej diagnostiky (integrácie a konsolidácie laboratórnej diagnostiky ako aj centralizácie) na Slovensku sa rieši od roku 1995 v SR na domácej aj medzinárodnej úrovni a doterajšími najvýznamnejšími výstupmi v tejto oblasti sú:

- založenie odboru laboratórna medicína v r. 1998,
- založenie Slovenskej spoločnosti pre laboratórnu medicínu v r. 2000,
- vznik prvého integrovaného a konsolidovaného pracoviska – Kliniky laboratórnej medicíny – v nemocnici akademika L. Déreya v Bratislave na Kramároch v r. 2002,
- vznik Ústavu pre chémiu, klinickú biochémiu a laboratórnu medicínu na Slovenskej zdravotníckej univerzite v r. 2004,

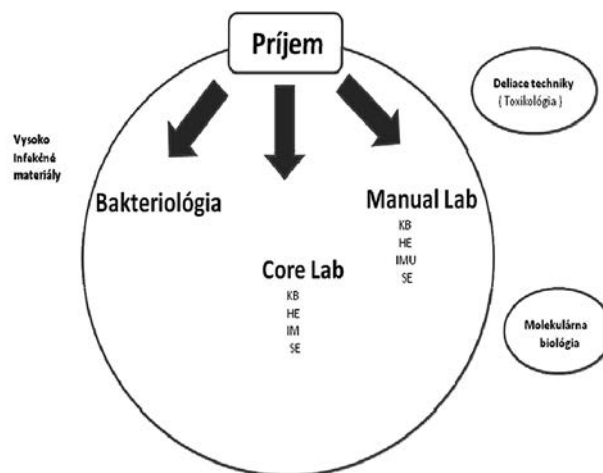
- výchova doteraz najmenej 10 špecialistov s atestáciou z laboratórnej medicíny v SR.

## Reštrukturalizácia nemocničných laboratórií

Príkladom úspešnej reštrukturalizácie bol vznik Kliniky laboratórnej medicíny v období v období 1995–2002. Za 7 rokov sa podarilo vytvoriť z izolovaných oddelení klinickej biochémie, hematológie a transfúziológie, klinickej mikrobiológie a klinickej imunológie Kliniky laboratórnej medicíny s novou štruktúrou laboratória III. Generácie:

- centrálného príjmu,
- core laboratória (integrovaná automatizovaná laboratórna diagnostika),
- manuálneho laboratória (integrovaná manuálna laboratórna diagnostika, flow cytometria),
- špecializovaných oddelení toxikológie (HPLC, GC, GC MS) a bakteriológie (kultivačné techniky, PCR).

Štruktúra moderného laboratória III.generácie vo všeobecnosti je na **obr. č. 1**:



Tejto štruktúre sa prispôbili aj žiadanky

- akútna,
- rutínna,
- špeciálna,
- ďalšie.

Z redukcie

- pôvodnej plochy na cca 1/5,
- pôvodného počtu pracovníkov na cca 1/3,

vyplynuli podstatné úspory a nadväzujúci vzostup výkonov o cca 30 % prispel k podstatnému zlepšeniu hospodárskeho výsledku po reštrukturalizácii.

## Reštrukturalizácia laboratórneho reťazca

Cieľom reštrukturalizácie laboratórneho reťazca je vybudovanie *centrálnych laboratórií* poskytujúcich komplexnú laboratórnu klinicko-biochemickú, hematologickú, mikrobiologickú a imunologickú diagnostiku v plnom rozsahu a podľa potrieb a možností najlepšie 24 hodín, *špecializovaných laboratórií* poskytujúcich špecializovanú

- prevažne genetickú a patologicko anatomickú laboratórnu diagnostiku, *rutinných laboratórií* poskytujúcich laboratórnu diagnostiku pre ambulantných lekárov všeobecných a špecialistov v centrách, kam sa zväžia biologický materiál a *zberných miest* zabezpečujúcich zber a spracovanie vzoriek ako aj akútnu diagnostiku - rozumej diagnostiku parametrov, kde nie je možný transport vzoriek z dôvodov nestability biologického materiálu alebo z nutnosti urobiť laboratórne vyšetrenie pri ohrození života.

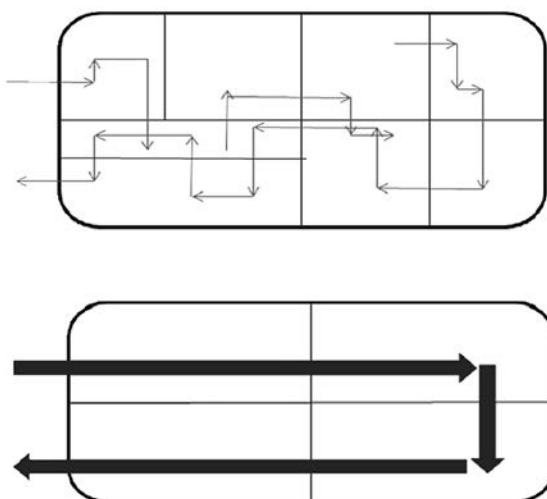
## DISKUSIA

### Problematika nemocničného prostredia

Hlavným problémom nemocničného prostredia je kultúra „verejných služieb“ ako aj „monovalentná kultúra“, v ktorej ťažko hľadáte stakeholderov na reštrukturalizáciu, lebo riaditeľ nemocnice sa bojí a zamestnanci oddelenia sa obávajú zmien a problémov, ktoré proces prinesie. Všetko závisí na vytvorení core teamu motivovaných pracovníkov, ktorí v čiastočnej polo ilegality sú ochotní realizovať zmeny. Existuje pritom veľké riziko zo zastavenia procesu z nedostatku zdrojov, príležitostných zlyhaní ako aj celého radu ďalších okolností. S takmer 100% pravdepodobnosťou sa dá tvrdiť, že získané úspory a zdroje sa stratia v nereštrukturalizovaných štruktúrach nemocnice, ktoré chronicky produkuje stratu. Pozitívnu stránkou, aspoň doteraz, bol relatívny dostatok času na možnosť dôkladnej prípravy na zmeny.

### Reštrukturalizácia procesov

Procesy, prakticky na všetkých oddeleniach a pracoviskách reťazca sa vyznačujú komplikovanosťou, prekrývaním a početnými rozhraniami. Tento stav znázorňuje prvý z obrázkov (obr. č. 2) uvedených nižšie:

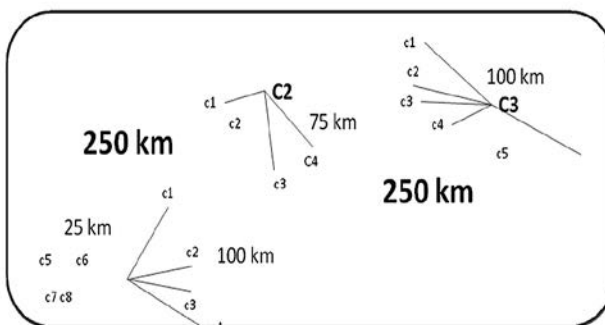


Uvedený stav je zdrojom strát a zdrojom chýb. Cieľom je vytvoriť priamočiare procesy s minimom rozhraní, čo odstráni časové straty zdroje chýb. Cieľový stav znázorňuje druhý z obrázkov uvedených vyššie (obr. č. 3).

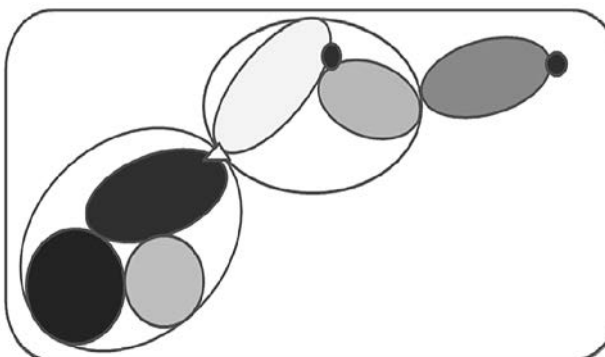
### Problematika prostredia reťazca laboratórií

Hlavným problémom reťazca laboratórií je problém fenomén „veľa kuchárov pokazí polievku“ a rovnako ako u nemocničného prostredia, prevažujúca „monovalentná kultúra“. V reťazci zväčša existuje niekoľko riaditeľov, ďalej garanti laboratórnej diagnostiky (laboratórna medicína, klinická biochémia, hematológia, mikrobiológia, imunológia, genetika, patologická anatómia) a napokon vedúci oddelení - pokiaľ ide o oddelenia s viacerými odbormi. Na vyššej úrovni prevažuje obsadenie funkcií pracovníkmi s nemedicínskym vzdelaním, na nižšej úrovni existuje prevaľa pracovníkov s medicínskym (klinicko-laboratórnym vzdelaním). Problémom „kultúry veľa kuchárov“ je nezáujem o zmenu, odmietanie nových moderných princípov vedúcich k automatizácii pracovísk, nedostatočné dodržiavanie základných princípov manažmentu, niekedy aj nedostatok skúseností. Problémom monovalentnej kultúry je boj za obranu vlastných záujmov odborov, v rámci ktorého sa zvyšuje riziko nevyužitia efektu zdieľania a potenciácie zdrojov a nadväzujúceho efektu „economy of scale“. Za hlavné pozitíva tejto kultúry považujeme drive na zmenu a podporu zo strany vrcholového manažmentu.

Základným predpokladom fungovania reťazca je zabezpečenie plynulého transportu medzi centrami a satelitmi navzájom tak, aby ošetrojúci lekári reštrukturalizáciu reťazca vôbec nepocítili. Základnú koncepciu načrtávajú obr. č. 4



a obr. č. 5:



I smena: zberné miesta a rutina: 8:00 – 11:00  
 II smena: špecializovaná a centrálna: 11:00 – 14:00  
 III smena: centrálna navzájom: 14:00 – 17:00

## Problematika vonkajšieho prostredia reštrukturalizácie

S problematikou reštrukturalizácie úzko súvisia

- atestácie z laboratórnej medicíny,
- zriadenie sekcie pre laboratórnu medicínu pri SLK,
- indikátory kvality,
- harmonizácia prostredia s chartou UEMS pre medicínsku biopatológiu,
- žiadanky,
- katalóg výkonov.

Cieľom reštrukturalizácie nemocničných oddelení a laboratórnych reťazcov je zvýšenie efektivity a kvality laboratórnej diagnostiky – inými slovami zabezpečiť lepšiu a lacnejšiu laboratórnu diagnostiku. K úsporám a kvalite musia byť jednotliví účastníci laboratórneho procesu motivovaní. Nástroj na zvýšenie motivácie ku kvalite predstavuje hodnotenie jednotlivých oddelení laboratórnej diagnostiky na základe kritérií vychádzajúcich z indikátorov kvality. Motiváciou k úsporám môže byť podpora centralizácie laboratórnej diagnostiky umožnením presunov limitov poisťovňami medzi regiónmi a krajmi a ponukou lacnejšej diagnostiky zo strany poskytovateľov. Uzatvorený koniec v systéme laboratórnej diagnostiky zabezpečí fundholding indikujúcich lekárov spoločne s dodržiavaním zásad racionálnej indikácie laboratórnych vyšetrení.

## ZÁVER

Reštrukturalizácia môže nadobúdať dve základné formy – integráciu/konsolidáciu a centralizáciu.

Integrácia je zlučovanie predanalytickej, analytickej a postanalytickej fázy do jedného celku. Konsolidácia je proces zlučovania viacerých odborov laboratórnej medicíny do jedného celku.

Pomocou oboch procesov sa snažíme o vytvorenie polyvalentnej, organizačnej a funkčnej jednotky – s čo najväčším počtom vyšetrovacích postupov (napr. zavedenie jednej konsolidovanej automatickej/robotizovanej platformy do core laboratória). Jedná sa o reštrukturalizáciu v rámci jedného miesta výkonu – pod jednou strechou – v konečnom dôsledku vytvorenie oddelenia laboratórnej medicíny. Ide o typickú reštrukturalizáciu laboratórií z „nemocničného prostredia“ – ako príklad môže slúžiť vytvorenie Kliniky laboratórnej medicíny v NsP akademika L. Déreera v Bratislave. Podobne je možné postupovať v rámci ďalších väčších nemocničných ale aj nie nemocničných laboratórií.

Centralizácia je proces prepojenie viacerých, doteraz nezávislých, laboratórií (miest výkonu), v zmysle vytvorenia buď sieťovej alebo pyramídovej, ale v každom prípade centrálne riadenej štruktúry, keď pod centrálnu kontrolu dostávame väčší počet laboratórií v priestore určitého regiónu.

Kľúčovými cieľmi je v oboch prípadoch je štandardizácia, kvalita a kontrola nákladov. Jedná sa však o dva rozdielne procesy. Každý z nich má svoje špecifiká.

Chceme zdôrazniť, že využitie oboch z nich v reštrukturalizácii firmy predstavuje unikátnosť takéhoto riešenia v rámci celej strednej a východnej Európy.

Poskytovatelia zdravotnej starostlivosti, najmä súkromní, vyvíjajú veľkú snahu, aby využívali najmodernejšie technológie a akreditovali pracoviská podľa medzinárodných noriem za účelom poskytnutia pacientom v SR čo najkvalitnejšie služby. Tento proces si vyžaduje veľa zdrojov.

Táto snaha o progres nie je zatiaľ zo strany zdravotných poisťovní opätovaná. Sme toho názoru, že zdravotné poisťovne by mali prispôbovať svoj prístup novým trendom, čím by umožnili poskytovanie zdravotnej starostlivosti vo vyššej kvalite a za nižšie náklady. Prešľapovanie na mieste v tejto oblasti považujeme do budúcnosti za problematické.

## ODPORUČENIA

V rámci implementácie stratégie reštrukturalizácie a by bolo vhodné venovať pozornosť:

1. manažmentu zmeny v súvislosti s problematikou rastu firmy,
2. excelentným procesom,
3. rádiových frekvenčnej identifikácii,
4. automatizácii bakteriologickej diagnostiky,
5. integrovanej laboratórnej diagnostike,
6. prenosu rizika v oblasti biznisu,
7. POCT v súvislosti s poskytovaním laboratórnej diagnostiky,
8. kontrole kvality genetickej ( zapojiť sa do aktivít v rámci EuroGenu), imunologickej, mikrobiologickej, hematologickej a POCT diagnostiky,
9. indikátorom kvality a financovania laboratórnej diagnostiky,
10. mikročipovým a mikrofluidickým technológiám a molekulárne biologickým technikám,
11. cost benefit prístupu k hodnoteniu laboratórnej diagnostiky v rámci reťazca.

K reštrukturalizácii treba motivovať jednak jej poskytovateľov, jednak jej financovateľov zdravotníckej starostlivosti. Motiváciu poskytovateľov pre kvalitnú laboratórnu diagnostiku predstavuje vytvorenie transparentnej súťaže na základe definovaných indikátorov kvality. Motiváciu k úsporám predstavuje možnosť presunu limitov medzi jednotlivými regiónmi v rámci reťazca zo strany poisťovní na strane jednej a ponuka zabezpečenia väčšieho objemu laboratórnej diagnostiky v nezmenenej kvalite za nezmeneného objemu ponúkaných limitov zo strany poskytovateľov na strane druhej. Uzatvorený koniec financovania laboratórnej diagnostiky predstavuje fundholding indikujúcich lekárov spoločne so zmluvným záväzkom dodržiavať zásad racionálnej indikácie laboratórnych vyšetrení a definitívne určenie zákonnou formou, na čo a pri akej diagnóze má pacient nárok z verejného zdravotného poistenia.

## LITERATÚRA

- Kováč G., Porubenová A.:** Laboratórna medicína – všeobecné pojmy, *Via Practica*, 2008, 5, (11), 359–361.
- Kováč G., Porubenová A.:** Laboratórna medicína – základné pojmy, *Via Practica*, 2008, 5 (10), 449–451.
- Kováč G., Porubenová A.:** Laboratórna medicína – špecifické pojmy, *Via Practica*, 2008, 5 (12), 539–542.
- Kováč G., Porubenová A.:** Evaluation of the Quality of Clinical laboratories in the Slovak republic: conceptual and contextual remarks, *Accred Qual Assur*, (2008), 13: 165–171.
- Kováč G., Porubenová A.:** Súčasný trendy určujúce vývoj v laboratórnej medicíne, *Laboratórna diagnostika v medicíne*, (2008), 1, 9–12.
- Kováč G., Porubenová A., Trupl Jan, Blažíček P.:** Je laboratórna medicína medicínsky alebo organizačný odbor?, *Laboratórna diagnostika v medicíne* (2008), 1, 13–14.
- Kováč G., Porubenová A.:** Quality and Privatisation of Laboratory Diagnostics in Slovakia, *Laboratórna diagnostika v medicíne*, (2008), 1, 14–15.
- Gustáv Kováč, Anna Porubenová, Pavel Blažíček, Ján Trupl, Michal Farkaš, Ján Balla:** Development, organisation and content of polyvalent medical biopathology in Slovakia, *Clin. Chem. Lab. Med.* 2008, 46, 8, A69.

**REFERENČNÉ HODNOTY  
U PATOLOGICKÝCH STAVOV:  
PROBLEMATIKA INTERPRETAČNÝCH STRATÉGIÍ  
LABORÁTORNEHO NÁLEZU**

**GUSTÁV KOVÁČ<sup>1,2</sup>, ANNA PORUBENOVÁ<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Inštitút laboratórnej diagnostiky Alpha medical a.s.  
<sup>2</sup>Ústav chémie, klinickej biochémie a laboratórnej medicíny,  
SZU, Bratislava

## ÚVOD

Úloha klinického laboratória sa posúva od prezentácie laboratórnych dát k prezentácii laboratórnej informácie. Cieľom príspevku je pokúsiť sa v tomto kontexte o zhodnotenie významu patologických referenčných hodnôt a ukázať ich súčasné postavenie v svetle nových poznatkov.

## METODIKA

V príspevku sa zaoberáme:

- referenčnými hodnotami zdravej populácie
- referenčnými hodnotami patologickej populácie
- vlastnými skúsenosťami z stanovenia patologických referenčných hodnôt u nemocničnej populácie – menovite: AST u infarktu myokardu, kalcia u endokrinopatií a porúch metabolizmu a cholesterolu dyslipoproteinémií
- problematikou interpretačných stratégií.

## VÝSLEDKY

### Referenčné hodnoty zdravej populácie

Pojem referenčných hodnôt prešiel vývojom

- od normálnych
- cez fyziologické
- k referenčným.

Pojem referenčné hodnoty zaviedli v r. 1969 fínski laboratórni experti Ralph Graesbeck a Nils Saris. Pod referenčnými hodnotami zdravej populácie rozumieme 95 % distribúcie hodnôt získaných vyšetrením biologického materiálu zdravej populácie. Pod zdravou referenčnou populáciou rozumieme zjednodušene povedané populáciu skladajúcu sa z na prvý pohľad zdravých jedincov s normálnym fyzikálnym nálezom, ktorí môžu denne fajčiť obmedzené množstvo cigariet a požívať denne obmedzené množstvo alkoholu.

### Referenčné hodnoty patologickej populácie

Pod pojmom patologických referenčných hodnôt rozumieme referenčné hodnoty získané laboratórnym vyšetrením biologického materiálu u jedincov nemocničnej populácie alebo vyšetrením skupín pacientov s defino-

vanou diagnózou. Pre získavanie referenčných hodnôt patologických stavov platia tie isté postupy a definície ako pri získavaní bežných referenčných hodnôt.

### Referenčné hodnoty AST u infarktu myokardu

Referenčné hodnoty AST u infarktu myokardu sme zisťovali u pacientov hospitalizovaných na I. internej klinike FNsP akademika L. Déreera v Bratislave. Za účelom získania prehľadu sme stanovovali patologické referenčné hodnoty AST osobitne pre každý deň priebehu ochorenia – spolu pre prvých 6 dní. Patologické referenčné hodnoty v porovnaní s referenčnými hodnotami zdravej populácie sú uvedené v **Tab. č. 1:**

**Patologické referenčné hodnoty AST u infarktu myokardu  
( $\mu$ kat/l)**

Deň	Priemer	SD	RH	N
1	1,21	1,41	0,18-5,67	107
2	2,39	2,93	0,28-6,75	102
3	1,86	1,6	0,31-6,28	83
4	1,73	2,04	0,33-1,87	53
5	1,75	2,16	0,3-8,11	32
6	1,45	1,54	0,45-6,28	17

**Referenčné hodnoty AST zdravej populácie**

0,14–0,34  $\mu$ kat/l

### Referenčné hodnoty kalcia endokrinopatií a porúch metabolizmu

sú uvedené v **Tab. č. 2:**

#### Referenčné hodnoty Ca u porúch metabolizmu a endokrinopatií

##### Pôvodná distribúcia

Aritmetický priemer	2,37	mmol/l
Štandardná odchýlka	0,18	mmol/l
Najnižšia hodnota	1,67	mmol/l
Najvyššia hodnota	2,97	mmol/l

##### Referenčný interval

Dolná hranica	1,91	mmol/l
Horná hranica	2,69	mmol/l

**Referenčné hodnoty Ca u zdravej populácie**

2,15–2,5 mmol/l

### Referenčné hodnoty cholesterolu u pacientov s dyslipoproteinémiami

sme zisťovali u pacientov dispenzarizovaných na metabolickej ambulancii Kliniky biochémie NsP akademika L. Déreera. Ich hodnoty sú uvedené v **Tab. č. 3:**



### Referenčné hodnoty cholesterolu u dyslipoproteinémii

#### Pôvodná distribúcia

Aritmetický priemer	5,64	mmol/l
Štandardná odchýlka	1,33	mmol/l
Najnižšia hodnota	2,25	mmol/l
Najvyššia hodnota	10,94	mmol/l

#### Referenčný interval

Dolná hranica	3,17	mmol/l
Horná hranica	8,43	mmol/l

### Referenčné hodnoty cholesterolu u zdravej populácie

3,1–5,2 mmol/l

## DISKUSIA

Hlavným problémom referenčných hodnôt je definovať a nájsť referenčné individua, ktoré by boli dostatočne podobné pacientom, ktorých laboratórne výsledky treba interpretovať. Ideálnym prípadom by bol pacient sám – keby sa dali porovnávať hodnoty pred a po začiatku choroby. Do tohto procesu zasahujú analytická variácia a biologická intraindividuálna variácia. „Reference change values“ (referenčné hodnoty zmeny) sa získavajú od zdravých jedincov vyšetrením dvoch vzoriek toho istého jedinca v dvoch rôznych časoch. Reference change value/referenčná hodnota zmeny predstavuje rozdiel medzi hodnotou druhej a prvej vzorky. Ak je biologická a analytická variácia náhodná, distribúcia hodnôt je symetrická. Pre „reference values“ a „reference change values“ platí rovnaká terminológia a zákonitosti. Použitím koeficientov analytickej variácie, biologickej intraindividuálnej variácie je možné vypočítať totálnu intraindividuálnu variáciu, ako aj referenčné hranice zmeny pre 95 % distribúcie a z nich vyplývajúci klinicky významný rozdiel. Tieto sú uvedené pre najčastejšie hodnotené laboratórne parametre v **Tab. č. 4:**

Analyt	Analytická variácia %	Biologická variácia %	Celková variácia %	Klinicky významný rozdiel %
ALT	8	15	17	48
Albumín	2	4	4	11
AP	2	10	10	28
Amyláza	2	9	9	25
Bi	4	19	19	54
Ca	1	2	3	8
Cl	1	1	2	5
Cholesterol	2	7	7	19
CK	3	23	23	65
Kreatinín	3	6	6	18

Glukóza	2	5	5	15
GGT	5	13	14	38
HbA1c	3	2	3	10
HDL	2	6	6	17
LDH	3	10	11	29
LDH1	3	6	7	20
P	3	10	10	28
K	1	5	5	13
Na	1	1	1	3
TG	3	21	21	60
K. močová	2	8	8	2
Hb	1	2	3	8
Leu	2	11	11	32
Tromb	6	7	8	24

Referenčné hodnoty zdravej populácie definujú interval, v rámci ktorého sa budú s definovanou pravdepodobnosťou nachádzať laboratórne výsledky zdravých jedincov. Pre klinickú interpretáciu a diagnózu choroby je nevyhnutné vedieť, ako daná choroba ovplyvní laboratórny výsledok. Ak existujú k dispozícii referenčné hodnoty patologickej populácie, potom interpretácia výsledku by nemala byť založená na referenčných hodnotách zdravej populácie, ale na diagnostickej hodnote, ktorú daný parameter poskytuje – senzitivite, špecificite, pozitívnej a negatívnej prediktívnej hodnote ako aj klinicky významnom rozdiel.

Každý kvantitatívny laboratórny výsledok je nositeľom predanalytickej, analytickej a biologickej variácie. Ideálny laboratórny test by mal mať nízku hodnotu interindividuálnej variácie, vysoký index individuality a malú kritickú diferenciu.

## ZÁVER

1. Patologické referenčné hodnoty AST u infarktu myokardu počas prvých 6 dní ochorenia sú:

Deň	RH
1	0,18 – 5,67
2	0,28 – 6,75
3	0,31 – 6,28
4	0,33 – 1,87
5	0,3 – 8,11
6	0,45 – 6,28

V porovnaní s referenčnými hodnotami zdravej populácie (0,14–0,34  $\mu$ kat/l) predstavujú jednoznačný posun doprava.

2. Patologické referenčné hodnoty vápnika u endokrinopatií a metabolických porúch sú:

Dolná hranica	1,91	mmol/l
Horná hranica	2,69	mmol/l

V porovnaní s referenčnými hodnotami zdravej populácie (2,15–2,50 mmol/l) je ich distribúcia širšia.

3. Patologické referenčné hodnoty cholesterolu u dyslipoproteinémií sú 3,17–8,43 mmol/l, čo v porovnaní s referenčnými hodnotami zdravej populácie (3,1–5,2 mmol/l) predstavuje významný posun doprava.

## ODPORUČENIA

Laboratórne vyšetrenia sa najčastejšie využívajú na monitoring priebehu choroby a sledovanie výsledkov terapie. V takomto prípade je prirodzeným východiskom posledný laboratórny výsledok a jeho porovnanie so súčasným. Tu je najvhodnejšie použiť klinicky významný rozdiel.

V prípade diagnózy novej choroby existuje obvykle celý rad iných a významnejších informácií než laboratórne výsledky. V takomto prípade referenčné hodnoty zdravých predstavujú dostatočný základ pre klinické rozhodovanie.

V situácii, kde pre stanovenie diagnózy existuje k dispozícii len laboratórny výsledok (napr. skrining), referenčné hodnoty zdravých nepostačujú a narastá význam patologických referenčných hodnôt. Ak poznáme distribúciu zdravých aj patologických referenčných hodnôt, potom je možné definovať optimálnu rozhodovaciu hranicu na základe ROC kriviek.

Názov referenčné hodnoty by sa nemali používať bez popisu spôsobu ich získania a bez návodu ako ich používať. Prehlasovať referenčné hodnoty za normálne hodnoty nie je správne. Hranice referenčných intervalov

musia zohľadňovať charakter distribúcie. Preberať referenčné hodnoty z iných zdrojov bez kontroly relevancie adekvátnosti pre definované podmienky je neprípustné.

Súhrn interpretačných stratégií laboratórneho nálezu znázorňuje **Tab. č. 5**:

Cieľ	Najvhodnejší typ RH	Interpretačné limity
monitoring	patologické referenčné hodnoty	klinicky významný rozdiel
diagnóza	referenčné hodnoty zdravých	referenčné intervaly
skrining	referenčné hodnoty patologické aj zdravých	pomocou ROC stanovený rozhodovací limit

## LITERATÚRA

- Alberty R., Albertyová D.:** Biologická variácia v klinickej biochémií, *Diagnóza* 2, 1995, 39–43
- Kováč G.:** Referenčné hodnoty, *Diagnóza*, 1997, 2, 57–61
- Kairisto V.:** Reference Values, *Diagnóza*, 1997, 3, 83–86
- Kairisto V.:** Graphroc: Software na výpočet referenčných hodnôt a základných charakteristík laboratórnych testov, *Diagnóza*, 1998, 1, 23–24
- Černá K., Halický P., Špaček L., Illek B.:** Referenčné hodnoty cholesterolu u pacientov s dyslipoproteinémiami, *Diagnóza*, 1998, 3, 90
- IFCC:** Reference Values Framework, *Diagnóza*, 1998, 3, 91–96
- Kováč G.:** Referenčné hodnoty vápnika v sére u pacientov s poruchami metabolizmu a endokrinopatií, *Diagnóza*, 1999, 1, 24–35
- Svobodová A. a kol.:** Patologické referenčné hodnoty AST u infarktu myokardu, *Diagnóza*, 1999, 2, 44–45
- Burtis C. A., Ashwood E. R.:** Teitz Fundamentals of Clinical Chemistry, Saunders 2001, 995–1028

ALENA KRŇÁČOVÁ

Ústav klinickej biochémie  
Fakultná nemocnica Ostrava

**Motto:** *POCT nie je pojem, ktorý by bol všeobecne známy medzi zdravotníkmi. Ešte menej je známe pozadie úspešného a účinného využívania POCT techniky.*

**Definícia POCT:** Proces zahrnujúci prevažne laboratórnu analýzu priamo na mieste starostlivosti o pacienta. A práve slovo „laboratórny“ implikuje otázky: zaškolenie personálu a jeho znalosti, údržbu prístrojov, kontrolu kvality, preanalytickú fázu, nezhody typu výsledkov verzus klinický stav pacienta, prenos výsledkov, archivácia dát v informačných systémoch, vykazovanie poisťovniam...

FN Ostrava v súčasnosti využíva point-of-care-testing v oblasti biochémie cca 90 osobných glukometrov, 7 acidobázických analyzátorov a 2 prístrojoch na stanovenie CRP.

#### Glukometry

Príprava na akreditáciu SAK znamenala zlom v oblasti používania glukometrov. Oddelenia žiadali potvrdenie o kontrole alebo kalibrácii glukometrov. Množili sa sťažnosti na nezrodu výsledkov získaných z glukometrov a výsledkov nameraných na ÚKB na SesnoStare (amperometrický princíp, GOD, plná riedená krv). Neznalosť situácie tak klinických, ako laboratórnych pracovníkov v oblasti glukometrov bola ďalším impulzom, aby sa otvorila táto problematika.

**Riešenie:** Naplánovali sme tri etapy. V prvej bolo cieľom zmapovať situáciu, v druhej navrhnuť a overiť systém kontroly kvality a v poslednej etape implementovať kompletný systém kontroly kvality do rutinného procesu (vrátane trvalej edukácie a primeranej dokumentácie) s koncovým stavom napojenia glukometrov do LIS/NIS.

**Prvá etapa:** Zostavili sme dotazníky pre klinické oddelenia (názov oddelenia, kontaktná osoba, telefón, názov glukometra, firma, výrobné číslo, umiestnenie, inventárne číslo, dátum kontroly) a analyzovali odpovede. Výsledok bol 72 glukometrov od 6 firiem a 13 rôznych typov glukometrov. Žiadna kontrola pomocou firemných roztokov na oddeleniach.

**Druhá etapa:** Vypracovali sme postup na overovanie osobných glukometrov, ktorý zohľadňoval odporúčenie ČSKB: „Maximálna povolená odchýlka hodnoty stanovenej glukometrom v krvi od hodnoty stanovenej metódou vykonanou v laboratóriu garanta v tej istej krvi (plazme) je 15 % od cieľovej hodnoty.“ Snaha bola zachovať jednotnú maticu overenia stanovených hodnôt – plnú krv. Zvolili sme krv s prídavkom K3EDTA z laboratórneho procesu

(na stanovenie HbA1c). Vyberali sme dve hladiny s hodnotami cca 4 a 10 mmol/l glukózy. Cieľové hodnoty sme získavali pomocou už spomínaného analyzátoru SensoStar (GOD, riedená plná krv). Veľmi rýchlo sme zistili, že glukometry môžu mať kalibráciu na plazmu alebo na plnú krv. Nastal prvý problém v rozdielnosti zmeraných hodnôt i medzi samotnými glukometrami. Hodnoty získané z glukometrov kalibrovaných na plazmu boli vyššie i o niekoľko mmol/l oproti cieľovým hodnotám alebo hodnotám získaným z glukometrov kalibrovaných na plnú krv. Pri súčasnom použití glukometrov kalibrovaných na plazmu a testovacích prúžkov Optium Plus, výrobca uvádza informáciu: „Výsledky glukózy z plnej krvi získané analyzátorom YSI se násobí hodnotou 1.12 pro dosažení plazma-ekvivalentních glukózových hodnot ke kalibraci testovacích proužků pro měření glukózy v krvi Optium Plus.“ Kvôli porovnaniu takto získaných hodnôt sme delili výsledky spomínaným faktorom 1.12. Hodnoty hematokritu v používanej krvi neboli stanovené a niektoré výsledky namerané v plnej krvi a prepočítané faktorom boli neporovnateľné (overenie koncentrácie v plazme na AU 640). Prvotná snaha o zachovanie jednotnosti matrice bola prehodnotená. Pri glukometroch kalibrovaných na plazmu sme začali porovnávať získané hodnoty s hodnotami K3EDTA plazmy na automatickom analyzátoru AU 640 (metóda HK). Ďalší problém nastal pri prúžkoch firmy Johnson&Johnson a ich glukometroch kalibrovaných na plazmu. Výrobca uvádza interferenciu K3EDTA. Zvolili sme krv s heparinom-Li opäť z laboratórneho procesu (na stanovenie krvných plynov). Zmenili sme tiež prístroj na získanie cieľových hodnôt, novo zakúpený ABL 835 Flex (GOD, neriedená plná krv). Výsledkom bola skutočnosť, že 26 % z overených glukometrov sme doporučili k výmene.

**Tretia etapa:** V súčasnej dobe evidujeme 87 glukometrov od 5 firiem a 10 rôznych typov. Overujeme systém glukometer – testovací prúžok s frekvenciou 2× ročne a vydávame protokol o overení. Overujeme taktiež každý nový glukometer. Všetky evidované glukometry majú svoj „Provozní deník přístroje“ (formulár). Glukometry kalibrované na plazmu overujeme na prístroji AU 640 (HK). Glukometry kalibrované na plnú krv overujeme na ABL 835 Flex (GOD). Používame krv s heparinátom lítym podľa typu kalibrácie glukometra (plazma, plná krv). Projekt zakúpenia nemocničných glukometrov napojiteľných na LIS a NIS je v stave riešenia.

#### Nedostatky v používaní osobných glukometrov v nemocniciach:

1. Nedodržuje sa žiadna kontrola kvality na oddeleniach a účasť v kontrole na ÚKB nie je 100-percentná
2. Ignorujú sa šarže testovacích prúžkov (preexpirované, miešanie šarží)
3. Neznalosť obmedzení osobných glukometrov, nedostatočná edukácia užívateľov
4. Rôzna kalibrácia (plná krv, plazma) – problematické porovnávanie výsledkov
5. Príliš veľká dôvera v získané výsledky

6. Glukometry sú často dar – nekontrolovateľnosť počtu
7. Poisťovňami nepreplatené stanovenia okrem ambulancií určitých odborností
9. Je prakticky nemožná dlhodobá elektronická archivácia výsledkov

#### Acidobázické analyzátory

Na rozdiel od glukometrov boli acidobázické prístroje vždy aspoň pod čiastočnou supervíziou laboratória. Väčšinou však laboratórni pracovníci pôsobili v roli servisu a apelovali na dodržiavanie kontroly kvality. Nákup POCT prístrojov a spotrebného materiálu si riadia jednotlivé oddelenia sami. Z tohto hľadiska je komplikovanejšia supervízia a všetko závisí od komunikácie a ochoty spolupracovať. Snaha ÚKB je zaistiť edukáciu, viesť dokumentáciu, pomáhať v údržbe prístrojov, vykazovať vyšetrenia poisťovňam a predovšetkým dohliadať na analytickú kvalitu.

**Súčasný stav:** V súčasnosti je v procese POCT využívaných 7 prístrojov od 4 rôznych firiem. Pri prístrojoch s automatickou kontrolou kvality, sa stanovujú všetky parametre na 2–3 hladinách kontrolných materiálov každých 8 hodín. V prípade manuálnej kontroly kvality sú všetky parametre stanovované minimálne 1x denne a hladiny sa striedajú. Každé dva mesiace sú tieto prístroje porovnávané s cieľovými hodnotami získanými v centrálnom laboratóriu pomocou štyroch patientskych vzoriek (2 arteriálne, 2 venózne) na prístroji ABL 835 Flex. Ako vnútornú povolenú chybu sme prevzali „Cílovou nejistotu měření pro EHK“ zo SEKKu. Do medzilaboratórnej kontroly sú od tohto roku zapojené 4 prístroje (Stat profile CCX, OMNI S6, Cobas b221 a Premier Gem 3000). CCX a OMNI S6 mali 100-percentnú úspešnosť. Pri Premier Gem 3000 v jednom vzorku nevyšlo pH a pri Cobas b221 taktiež v jednom vzorku nevyšiel laktát. Obidva prípady riešia distribútori analyzátorov vzhľadom na fakt, že prístroje takmer ukázkovo vychádzajú v závislej internej kontrole kvality. Nadhodnocovanie laktátu bolo zistené práve pri kontrole na patientskych vzorkách. Zvyšné tri prístroje čaká upgrade. Každý prístroj má svoj prevádzkový denník, v ktorom sa zaznamenávajú: výmeny elektród a membrán, servis, údržba, uchovávajú kontrolné záznamy, manuály, pracovné inštrukcie, certifikáty, osvedčenia...

Preškolenie ošetrojúceho personálu vrátane preanalytickej fáze prebieha 1x ročne supervízorom, podľa potreby staničnou sestrou. Napojenie acidobázických prístrojov na LIS a NIS je v stave riešenia.

**Citlivé oblasti:** Opakované nedostatky ošetrojúceho personálu v oblasti preanalytickej fázy: aerobný odber, nedostatočná heparinizácia vzorku, státie vzorku, monitorovanie pacienta – kombinácia výsledkov získaných na POCT a v laboratóriu (FNO nemá potrubnú poštu). Na niektorých oddeleniach chýba väčšia zodpovednosť za tieto prístroje. Zo servisných zásahov cca 90 % padá na supervízora, zvyšných 10 % na firemný servis. Nie je zabezpečený prenos dát do LIS/NIS. Oddelenia vedú záznamy o počte vyšetrení a nasledujúci deň tento záznam posielajú na ÚKB, aby bol zadaný do LIS a vyúčtovaný.

#### CRP prístroje

Problematika týkajúca sa prevažne praktických lekárov. Aby sa dosiahlo dodržiavanie kontroly kvality u týchto prístrojov a ich správne využívanie, platí v ČR nasledujúce pravidlo: Vyšetrenia je možné vykazovať poisťovni len pri doloženej účasti na úvodnom odbornom certifikovanom školení o tejto metóde usporadúvanom na akreditovanom pracovisku v spolupráci odborných spoločností a pracovísk zaisťujúcich postgraduálne vzdelávanie podľa jednotnej metodiky. Pri uskutočňovaní výkonu bude rešpektované Odporúčenie odborných spoločností o analýze laboratórnych vyšetrení v režime POCT a bude zaistená **vnútorná kontrola kvality**, vrátane riadne vedeného záznamu o nej a účasť v systéme medzilaboratórnych porovnávacích skúšok (**externé hodnotenie kvality**).

**Súčasný stav:** I keď v nemocnici sú len dva tieto prístroje, postoj k nim zatiaľ nie je zrovna ideálny. Závislá interná kontrola kvality prebieha s každým novým kitom (cca každých 14 dní) a je zaznamenávaná v denníku prístroja. Do externej kontroly kvality nie sú prístroje prihlásené. Porovnávanie získaných výsledkov s cieľovými hodnotami z laboratória sú nepravidelné.

#### Na čom pracujeme v rámci zlepšovania manažmentu POCT vo FNO:

- Vydanie základného celonemocničného dokumentu pojednávajúceho o problematike POCT v nemocnici (nastavenie pravidiel v oblasti nákupu POCT, používania, servisu, finančných analýz a povinností ÚKB a oddelení voči POCT)
- Vytvorenie POCT tímu
- Nutnosť opakovaného školenia ošetrojúceho personálu v oblasti preanalytickej fázy
- Prepojenie prístrojov s LIS a NIS
- Plánujeme finančno-prevádzkové analýzy zamerané na zefektívnenie využívania POCT
- Po uprade acidobázických prístrojov, zapojenie do medzilaboratórnej kontroly kvality
- Zapojenie prístrojov na stanovenie CRP do medzilaboratórnej kontroly kvality
- Nový problém – poisťovne plánujú preplácať len 4 ABR vyšetrenia na pacienta (podmienka zadokumentovať reakciu lekára na daný výsledok)

#### ZÁVER

POCT musí byť chápané ako riadený proces s vysokým podielom zodpovednosti laboratórnych pracovníkov. Z vlastných skúseností predovšetkým odporúčame čo najskôr definovať všetky pravidlá a vydať celonemocničným dokumentom POCT a vytvoriť POCT tím (predpokladom je podpora vedenia nemocnice). Uľahčí to medziodborovú spoluprácu, riešenie problémov, zavedenie jednotného prístupu k POCT v celom zdravotníckom zariadení a pomôže sa odstrániť chaos v tejto problematike.

JÁN LEPEJ<sup>1,2</sup>, KATARÍNA LEPEJOVÁ<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Inštitút nukleárnej a molekulárnej medicíny, Košice

<sup>2</sup>Ústav sociálnych vied a zdravotníctva bl. P. P. Gojdiča,  
VŠZaSP sv. Alžbety s.r.o. Bratislava

<sup>3</sup>ROCHE Slovensko, s.r.o.

## SÚHRN

Autori uvádzajú výsledky ankety vykonanej počas akademických rokov 2006/7, 2007/8 a 2008/9 medzi študentkami diaľkového štúdia v študijnom odbore ošetrovateľstvo, ktoré odpovedali na otázku: „vymenujte aspoň tri najzávažnejšie problémy pri vašej spolupráci s oddeleniami laboratórnej diagnostiky“. Z 217 študentiek, ktoré mali priemernú dĺžku praxe  $12,9 \pm 7,3$  roku odpovedalo 166 (76,5 %) opýtaných. Okrem 15 pozitívnych konštatovaní (3,6 %) o dobrej spolupráci, uviedli celkovo 396 problémov týkajúcich sa celého laboratórneho cyklu. Najviac odpovedí sa týkalo postanalytickej (41,4 %) a predanalytickej fázy (39,2 %) na ktorých sa sestry v určitých činnostiach aj priamo podieľajú. Kriticky hodnotili aj vlastné chyby pri označení (18 vyjadrení) a odbere (28) vzoriek, kde vidia najčastejší zdroj chýb v predanalytickej fáze. Všimli si aj diskrepancie vo výsledkoch pri opakovaných testoch a technické problémy laboratórii (chyby v analytickej fáze - 8,0 %). V postanalytickej fáze boli konštatované aj tri najčastejšie ponosy na prácu laboratória: Dlhé čakanie na výsledky „statimových“ vyšetrení a informovanie o ich výsledkoch až po urgencii (spolu 52×); dlhé čakanie na výsledky „špeciálnych“ vyšetrení (43-krát); a neochotná až agresívna telefonická komunikácia (35×). Niektoré z problémov trápili skôr sestry na lôžkových oddeleniach a iné prevládali v ambulancijnej sfére. Takisto boli zistené charakteristické rozdiely medzi jednotlivými typmi oddelení. Z ankety vyplýva nutnosť kontinuálnej edukácie, trvalé zlepšovanie komunikácie medzi laboratóriom a klinickými pracoviskami - hlavne pri najčastejšom priamom telefonickom kontakte. Mnohé zo zistených problémov sú pomerne ľahko odstrániteľné zlepšením spolupráce, ktorá je podstatou znižovania chýb v predanalytickej a postanalytickej fáze. Anketa vyvracia mnohé mýty o práci sestier a poukazuje na skutočnosť, že sú dôležitý aktívny prvok v laboratórnej diagnostike. Táto anketa by snáď mohla byť inšpiráciou pre podobné, ale aj podrobnejšie prieskumy na jednotlivých laboratórnych pracoviskách.

**Kľúčové slová:** Anketa, chyby v laboratórnej diagnostike, predanalytická fáza, analytická fáza, postanalytická fáza, kvalita laboratórnej diagnostiky, komunikácia medzi laboratóriom a klinickými pracoviskami, transport biologického materiálu, akútna „statim“ laboratórna diagnostika.

## ÚVOD

V laboratóriu sa len zriedka osobne stretávame s pacientom, ktorý je hlavný cieľ nášho snaženia a významný motivujúci faktor pre kvalitu zdravotnej starostlivosti. Pretože v laboratóriách tento motivačný faktor chýba, potrebujeme aj iné mechanizmy na sledovanie kvality. Naša práca je hlavne služba pre pracoviská, ktoré nám posielajú vzorky na analýzy. Zriedka máme spätnú väzbu, ktorá by nám pomáhala zistiť problémy súvisiace s nekvalitou a tak usmerniť systém práce nášho laboratória (našich pracovníkov).

Pred viac ako desaťročím (1997) Plebani a Carraro [1] zistili, že v rámci laboratórnej diagnostiky vzniká v predanalytickej fáze 68,2 %, v analytickej fáze 13,3 % a v postanalytickej fáze 18,5 % chýb. Metódy sledovania kvality v klinickom laboratóriu sú veľmi dobre prepracované a viedli k ďalšiemu významnému poklesu chýb v analytickej fáze. Nakoľko oblasť predanalytiky a postanalytiky zostáva aj naďalej problémom, považujeme za potrebné venovať im zvýšenú pozornosť. Hodnotenie týchto dvoch častí laboratórnej diagnostiky je zložitejšie. Môže sa vykonávať napríklad pomocou priameho zisťovania indikátorov kvality [2]. Aká je kvalita laboratórnej diagnostiky, sa dá usudzovať aj z pohľadov našich priamych spolupracovníkov z klinických oddelení [3]. Tieto názory môžeme zistiť jednoduchou metódou používanou na prieskumy v ošetrovateľstve, ktorou je anketa [4].

## CIEĽ PRÁCE

Sestry na oddeleniach nemocníc a v ambulanciách sú tie, ktoré vykonávajú prevažnú časť odberov, vypisujú žiadanky a tak zabezpečujú podstatnú časť predanalytickej fázy mimo laboratórium. Okrem toho komunikujú s laboratóriom a zabezpečujú registráciu a založenie výsledkov do chorobopisu či karty, čím sa podieľajú aj na postanalytickej fáze. Cieľom nášho príspevku bolo pomocou jednoduchej ankety urobiť základnú sondu a primárnu analýzu pohľadu na kvalitu práce laboratórií práve u tejto skupiny zdravotníckych pracovníkov.

## MATERIÁL A METÓDA

Počas troch akademických rokov 2006/7, 2007/8 a 2008/9 sme anketovali 217 študentiek diaľkovej formy I. stupňa vysokoškolského štúdia - sestry (bakalárka). Väčšina z nich pochádzala z regiónu východného Slovenska. Na anketu obsahujúcu jedinou otázku týkajúcu sa laboratórnej diagnostiky: „vymenujte aspoň tri najzávažnejšie problémy pri vašej spolupráci s oddeleniami laboratórnej diagnostiky“ aktívne odpovedalo 166, čo bolo 76,5 % opýtaných. Súčasne sme sa spýtali na dĺžku praxe a typ oddelenia (lôžko alebo ambulancia). Uvedujeme si, že takto postavená anketa je veľmi stručná a málo komplexná. Formulácia otázky bola smerovaná

len na odhalenie najvypuklejších problémov a ako sonda pre možný podrobnejší prieskum. Sme si vedomí, že nedostatočne vyjadrovala pozitívne aspekty práce laboratórií. Napriek tomu 15 respondentiek poukázalo na dobrú spoluprácu ich oddelenia s laboratóriom a neuviedlo žiadne problémy. Z mnohých odpovedí sestier vyplýval záujem o riešenie problémov pri svojej každodennej práci a aktívny, kvalifikovaný prístup.

Pretože sestry pochádzali z viacerých pracovísk, posudzované boli laboratóriá v pomerne veľkej geografickej oblasti. Preto výsledky musíme hodnotiť ako jeden z možných uhlov pohľadu na laboratóriá na východnom Slovensku.

Zastúpenie jednotlivých oddelení v anketovanej skupine bolo veľmi široké preto sme ich zoradili do niekoľkých skupín (ako ukazuje tabuľka 1). Posudzované skupiny mali niektoré spoločné charakteristiky a boli dostatočne veľké pre štatistické hodnotenie.

**Tabuľka 1. Rozdelenie podľa skupín pracovísk a miera aktívne odpovedajúcich sestier**

Oddelenie	počet	odpovedalo	% odpovedí
Manažment, administratíva	6	5	83,3 %
Ošetrovateľské agentúry	8	8	100,0 %
Dialýza, nefrológia a transplantáčne oddelenia	8	7	87,5 %
Neurológia	9	9	100,0 %
Gynekologické a urologické oddelenia	10	9	90,0 %
Ambulancia praktického lekára, stomatológia	11	7	63,6 %
Chirurgia a sestry na operačných sálach	15	13	86,7 %
Traumatológia a ortopédia	17	12	70,6 %
Detské oddelenie	17	13	76,5 %
Jednotky intenzívnej starostlivosti, záchranka, anestézia	21	16	76,2 %
Geriatra, psychiatria, pracoviská sociálnej starostlivosti	27	19	70,4 %
Iné oddelenia (hematológia, onkológia, rehabilitácia a iné)	30	21	70,0 %
Interné oddelenia rôzneho typu (kardiológia, diabetológia)	31	26	83,9 %
neuvedené	7	1	14,3 %
<b>Celkovo</b>	<b>217</b>	<b>166</b>	<b>76,5 %</b>

V našej skupine bolo 102 sestier zamestnaných pri lôžku (v nemocnici) a 64 v ambulantnej sfére (alebo na iných úsekoch zdravotnej starostlivosti). Počty odpovedí z nerovnako veľkých skupín sme normalizovali na percentuálny údaj. Percentuálne zastúpenie odpovedí medzi 45-55 % hodnotíme ako nevýrazný rozdiel medzi

skupinami. Takáto zhoda sa najčastejšie dosahovala, ak problém bol spôsobený v laboratóriu.

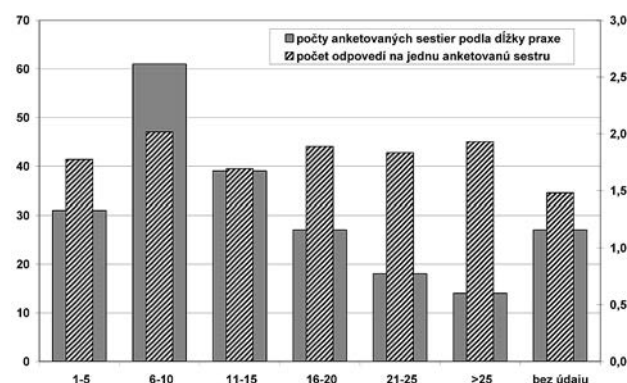
**Pracovné skúsenosti sestier** boli rozdielne. Zo 190 odpovedí (27 neuviedlo dĺžku praxe) vychádza **priemerná dĺžka praxe 12,9±7,3 roku** – rozpätie od 1 do 33 rokov (medián – 11 rokov).

Aj keď v zadaní anketu sa vyžadovalo pomenovať 3 problémy, počet odpovedí kolísal od 0 do 8. Žiaľ, 3 a viac problémov vymenovalo, a zadanie tak plne splnilo, len 63 z 217 (t.j. 29%). Je možné, že 102 respondentiek (47%), ktoré uviedli len 1-2 problémy, v skutočnosti ani viaceré nedostatky nepozorovali. Pomenovanie problémov nebolo klasifikované podľa závažnosti. Počet anketovaných sestier sa v skupinách s rozdielnou dĺžkou praxe menil (tabuľka 2 a graf 1). Počet odpovedí na jednu anketovanú sestru sa tesne pohyboval okolo priemeru 1,8 a nezávisel od dĺžky praxe. Anketu, čo do počtu odpovedí, môžeme hodnotiť ako stredne úspešnú.

**Tabuľka 2. Rozdelenie anketovaných sestier podľa dĺžky praxe**

Charakteristika/dĺžka praxe [roky]	1-5	6-10	11-15	16-20	21-25	>25	?	SUM
počet anketovaných sestier	31	61	39	27	18	14	27	217
počet odpovedí	55	123	66	51	33	27	40	395
počet odpovedí na anketovanú sestru	1,8	2,0	1,7	1,9	1,8	1,9	1,5	1,8

**Graf 1. Rozdelenie respondentiek podľa dĺžky praxe a počet odpovedí na jednu anketovanú sestru v jednotlivých skupinách**



## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Počet všetkých odpovedí na anketovú otázku, ktoré charakterizovali problémy pri spolupráci s oddeleniami laboratórnej diagnostiky, bol 395. Tieto odpovede sme následne analyzovali z viacerých hľadísk.

### Rozdelenie podľa fáz laboratórneho cyklu

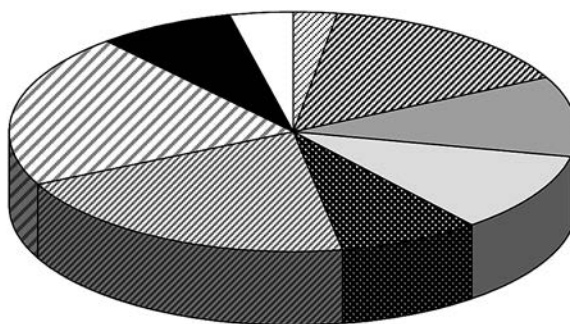
Na predanalytickú fázu laboratórneho cyklu bolo orientovaných 161 konštatovaní (39,2%). Na možné chyby súvisiace s analýzou vzoriek upozornilo 33 anketovaných (8,0%). Nedostatky v postanalytickej fáze boli uvedené 170 krát (41,4%) a 32 odpovedí (t.j. 7,8%) tvorili iné problémy pri zabezpečení prevádzky.

Uvedomujeme si, že subjektívne hodnotenie respondentiek, nie je možné plne porovnávať so skutočnou chybovosťou v laboratóriách. Pretože upozorňuje na jav a nie je vyjadrením frekvencie javov (napríklad konštatovanie o zrazenej krvi nehovorí o skutočnom počte znehodnotených vzoriek). Napriek tomu, podobne, ako je z literatúry známe [1], aj z ankety vyplýva, že najproblematickejšie sú predanalytická a postanalytická fáza. Podrobnejšie budeme analyzovať jednotlivé skupiny problémov uvedených v tabuľke 3. Preberieme jednotlivé skupiny odpovedí podrobnejšie, so zameraním na rozdiely medzi ambulatnou a nemocničnou zdravotnou starostlivosťou.

**Tabuľka 3. Rozdelenie výsledkov ankety podľa fáz laboratórneho cyklu. Legenda: Percentá v zátvorke predstavujú podiel na vyššie uvedenej skupine (vytlačenej boldom)**

Fáza laboratórneho cyklu	odpovede	%	zodpovednosť
DOBRÁ spolupráca nemajú problémy	15	<b>3,6</b>	práca laboratória
<b>Predanalytická fáza</b>	<b>161</b>	<b>39,2</b>	
Indikácia a výber laboratória	10	(6,2)	ordinujúci lekár
Vypísanie žiadanky a odber materiálu	62	(38,5)	sestra
Transport	44	(27,3)	sanitár/sestra/ dopravná služba
Predanalytická fáza laboratória	45	(28,0)	laborantky
<b>Analýza a technické vybavenie</b>	<b>33</b>	<b>8,0</b>	VŠ špecialista
<b>Postanalytická fáza</b>	<b>170</b>	<b>41,4</b>	
Postanalytická fáza v laboratóriu	85	(50%)	laborantky
Problémy komunikácie s oddeleniami	85	(50%)	laborantky a čiastočne aj sestry
<b>INÉ problémy pri zabezpečení prevádzky</b>	<b>32</b>	<b>7,8%</b>	VŠ špecialista
<b>SUMA</b>	<b>411</b>	<b>100%</b>	

**Graf 2. Počty negatívnych hodnotení pri podrobnejšom rozdelení laboratórneho cyklu**



- ▣ Indikácia a výber laboratória
- ▣ Vypísanie žiadanky a odber materiálu
- ▣ Transport vzoriek
- ▣ Predanalytická fáza laboratória
- ▣ Analýza a technické vybavenie
- ▣ Postanalytická fáza v laboratóriu
- ▣ Problémy komunikácie s oddeleniami a pošta
- ▣ INÉ problémy pri zabezpečení prevádzky
- ▣ DOBRÁ spolupráca nemajú problémy / zlepšenie

### Dobrá spolupráca s laboratóriami

Nie všetky odpovede boli kritické, hoci tak znela otázka v anke. Vyslovene pozitívne hodnotenie bolo v 15 prípadoch (3,7%). Predpokladáme, že pozitívne hodnotenie by bolo vo vyššom percente prípadov, ak by bola anketová otázka smerovaná neutrálne. V 2 prípadoch bolo konštatované zlepšenie práce laboratória po prechode na nových vlastníkov. Našli sme aj niekoľko odporúčaní, ktoré sa týkali jednotlivých fáz laboratórneho diagnostického procesu preto ich budeme postupne definovať v nasledujúcom texte.

### Problémy predanalytickej fázy – indikácie vyšetrení a výberu laboratória

V 5 prípadoch bolo považované za nevhodné využívať služby rôznych laboratórií ako súčasť „laboratórnej turistiky“. Na príkaz lekára sestra vzorky posielala do vzdialeného laboratória, aj keď rovnako dobré laboratórium je v areáli, kde ambulancia pôsobí. Tento fakt z 86% konštatovali hlavne ambulantné sestry. Podobne aj konštatovania o nadbytočných indikáciách vyšetrení (10 odpovedí) pochádzalo z ambulancií.

Napriek tomu, že za túto oblasť diagnostického procesu je zodpovedný ordinujúci lekár, je vážne, keď si uvedomíme, že na problémy „laboratórnej turistiky“, ktorá je dosť markantná, upozorňujú sestry. Mnohé z nich si aj uvedomujú možné vážne dôsledky, ktoré z tohto faktu vznikajú hlavne pri monitorovaní tumorových markerov a predlžovaní čakacej doby na výsledok (TAT).

### Problémy predanalytickej fázy – vypísanie žiadanky a odber materiálu

Táto oblasť je kritikou do vlastných radov. Pozitívne je, že sa respondentky nezdráhali dobrovoľne uviesť aj

konštatovania nedostatkov vlastnej práce, a to pomerne vo vysokom počte. Najzávažnejší problém sa uvádza nesprávny postup pri odberoch – až 28 krát. Tento sa častejšie vyskytuje v ambulancii. Iste by tomu pomohli manuály a štandardné odberové postupy, na ktoré, ako z dotazníka vyplýva, upozornili dve sestry.

Druhý závažný problém, ktorý sa vyskytol 18 krát, je chyba zápisu údajov do žiadanky. Táto bola takmer rovnako častá na oddelení aj v ambulancii. Naopak, na zvyšovanie administratívnej náročnosti si sťažovali častejšie sestry v nemocnici. Tieto sú viacej zafixované, pri nárazových odberoch. Počet odpovedí (menej ako 5) je však malý. Na nedostatok odberového materiálu rovnako v nemocnici aj ambulanciách upozornili 5x a rovnako 5x aj na možné zámenny skúmaviek či materiálu. Tento problém si všimli častejšie sestry v ambulanciách.

**Tabuľka 4. Problémy predanalytickej fázy mimo laboratórium. (AMB) – ambulancia, (ODD) – oddelenia nemocníc. (LAB) – laboratórium, % vyjadruje zastúpenie ambulancie, alebo oddelenia normalizované na nerovnako veľké skupiny**

Problémy predanalytickej fázy mimo LAB	celkom	AMB	ODD	AMB %	ODD %
chyba zápisu dát do žiadanky sestrou	18	6	12	44,3%	55,7%
administratívna náročnosť zvýšená	4	1	3	34,7%	65,3%
nedostatok odberového materiálu	5	2	3	51,5%	48,5%
nesprávny postup pri odberoch	28	17	11	71,7%	28,9%
chýba manuál a štandardy pre odber	2	0	2	0,0%	100,0%
zámena skúmaviek alebo iného materiálu	5	4	1	86,4%	13,6%

Odpoveď jednej sestry bola charakteristická pre túto (a čiastočne aj nasledujúcu) časť predanalytickej fázy: „Už 6 rokov pracujem v zahraničí a nemala som problémy s laboratóriom, pretože odbery robia laboratórni pracovníci“. Sheppard a spol. [5] uvádzajú, že keď sa vykonávali odbery na urgentnom prijíme vyčlenenými laboratórnymi pracovníkmi, došlo k redukcii celkového TAT (turn around time) a kontaminácia vzoriek klesla z 5,0% na 1,1%. Podobne sa uvádza [3], že podiel znehodnotených vzoriek je nižší u špecializovaných odberových pracovníkov ako u sestier.

#### Transport materiálu a problémy predanalytickej fázy v laboratóriu

Transport materiálu pri slovenskom systéme odberov – vykonávaných prevažne v ambulanciách – je častým zdrojom chýb. Niekedy je ťažké odlišiť, či niektoré z predanalytických chýb zistených v laboratóriu (ako je hemolýza či rozbitie/strata skúmavky) sú spôsobené transportom, alebo pri spracovaní materiálu v laboratóriu, alebo v prípade hemolýzy, zrazenej krvi alebo jej nedostatku je príčina spôsobená odberom. Preto ich analyzujeme (nie celkom správne) spoločne. Ako je uvedené v tabuľke 5

**Tabuľka 5. Problémy predanalytickej fázy spoločné, v doprave a v laboratóriu. Vysvetlenie skratiek uvedené pri tabuľke 4**

Problémy predanalytickej fázy	celkom	AMB	ODD	AMB %	ODD %
neskoré dodanie vzoriek	5	2	3	51,5%	48,5%
problémy dopravy alebo transportu materiálu	22	12	10	65,7%	34,3%
strata materiálu alebo sprievodného lístku	17	7	10	52,7%	47,3%
zrazená krv alebo hemolýza	24	6	18	34,7%	65,3%
rozbitie alebo strata skúmavky	21	8	13	49,5%	50,5%

Neskoré dodanie vzoriek nie je uvádzané tak často, ako strata materiálu či sprievodného lístku. Podobne aj strata či rozbitie skúmavky sú náhodné, aj keď nie zriedkavé javy. Preto sa vyskytujú prakticky rovnako v oboch skupinách (ambulancia, oddelenie). Rozdiely nachádzame v ďalších dvoch významných skupinách problémov. Na rôzne dôsledky transportu si sťažujú častejšie ambulancie (65,7%) a naopak, zrazená krv a hemolýza je problém udávaný prevažne sestrami z lôžkových oddelení (65,3%). Je to otázka kvality odberového materiálu? Odpoveď by si zaslúžila do budúcnosti podrobnejšiu analýzu, prípadne aj dlhodobé sledovanie.

Mnohé z uvedených problémov sa dajú riešiť buď špecializovaným personálom prichádzajúcim na oddelenia (ako už bolo povedané), alebo vytvorením odberových miest pre ambulancných pacientov v laboratóriách. Jeden takýto prípad bol pozitívne hodnotený aj v našej ankete. V prípadoch, kde to nie je možné, je potrebné vytvoriť nielen kvalifikovaný systém transportu, ale aj ciele odporúčania na prevenciu predanalytických chýb [6].



### Analytická fáza

Sem môžeme zaradiť pomerne malú skupinu konštatovaní o niektorých nedostatkoch. Tieto sa týkajú hlavne sťažností na nekvalitnú, často poruchovú techniku. Na tento fakt bolo upozornené 14× rovnako ambulanciami aj oddeleniami. Veľmi zaujímavé je, že tu nachádzame časovú závislosť. V roku 2007 bolo 9 konštatovaní o zastaranej a poruchovej technike. V roku 2008 len 5 a v roku 2009 ani jedna sestra nespomenula problémy s technikou v laboratóriách, ktorá by sa prejavila v ich práci (napríklad nedodané analýzy). Určite stav laboratórnej technológie sa na východnom Slovensku v ostatných rokoch zlepšil, ale pretože zastúpenie respondentiek z jednotlivých pracovísk nie je reprezentatívne, nemožno s uvedeného vyvodzovať záver, že niet čo zlepšovať.

Na problém s klinikou nekorešpondujúcich výsledkov, ktoré po vyžiadanom zopakovaní boli v poriadku, upozornili respondentky 18 krát. Tento jav trápi častejšie sestry na špecifických lôžkových oddeleniach (62%) než v ambulanciách.

### Problémy postanalytickej fázy

Môžeme rozdeliť do dvoch skupín: problémy komunikácie medzi laboratóriom a oddeleniami (ambulanciami) a vlastné chyby v postanalytickej fáze. Uvedomujeme si, že niektoré konštatovania (ako napríklad dlhá čakacia doba) majú pravdepodobne komplexnejšie príčiny (problém prístroja, organizácie, vyhodnotenia výsledkov a i.). Ich zaradenie do postanalytickej fázy nie je celkom čisté, avšak na základe odpovedí z ankety ich nebolo možné presnejšie zaradiť.

Do tejto skupiny patria aj tri najčastejšie ponosy na prácu laboratória. Sú to:

1. Dlhé čakanie na výsledky „špeciálnych“ vyšetrení (43) – niekedy snáď ospravedlniteľné,
2. Dlhé čakanie na výsledky „statimových“ vyšetrení (35) – zriedka ospravedlniteľné,
3. Agresívna a neochotná telefonická komunikácia (35) – profesionálne neospravedlniteľné.

Podrobnejšie problémy tejto fázy ukazuje tabuľka 6

**Tabuľka 6. Problémy postanalytickej fázy v laboratóriu a vzájomnej komunikácie. Vysvetlenie skratiek uvedené pri tabuľke 4**

Problémy postanalytickej fázy	celkom	AMB	ODD	AMB %	ODD %
dlhé čakanie na výsledky statimových testov	35	4	31	17,1%	82,9%
dlhé čakanie na výsledky špeciálnych testov	43	14	29	43,5%	56,5%
hlásia statimové výsledky po urgovaní	17	5	12	39,9%	60,1%

agresívne telefonovanie (neochota) prac. LAB	35	15	20	54,4%	45,6%
LAB neupozorní na chybu odberu / zápisu	9	3	6	44,3%	55,7%
LAB neupozorní na kritickú patológiu	4	0	4	0,0%	100,0%
potrebujeme viac komunikovať	4	1	3	34,7%	65,3%
popletenie, zámena a nečitateľný výsledok	7	4	3	68,0%	32,0%
nedodanie alebo strata výsledku	12	6	6	61,4%	38,6%
výsledky zaslané na inú adresu	4	0	4	0,0%	100,0%

Ako sme už konštatovali, dlhé čakanie na výsledky „špeciálnych vyšetrení“ je veľmi nepresné konštatovanie (nevieme ani aké boli tie špeciálne vyšetrenia). Aj keď táto sťažnosť (kde mierne prevládajú oddelenia bazirujúce práve na skorých výsledkoch) je často vysvetliteľná, asi by bolo potrebné, aby v tejto skupine testov bolo odberateľovi známe a dostatočne jasne uvedené, za aký čas možno výsledok testu očakávať.

Veľmi vážny je problém „statimových“ výsledkov, ktoré pochopiteľne najviac trápia sestry na oddeleniach (až v 82,9%). Nielenže je to druhý najčastejší problém (hlásené sú neskôr ako za 2 hodiny) ale niekedy sú oznámené, až po urgenciách (v 17 prípadoch). Ak tieto dva problémy spojíme, vychádza nám, že sťažností na statimové výsledky bolo až 52-krát, čo predstavuje 12,7% všetkých odpovedí!

Výsledok, z ktorý nás nemilo prekvapil, a ktorý stojí za zamyslenie, je konštatovanie o nekorektnom jednaní laboratórnych pracovníkov so sestrami pri vzájomnej telefonicko-komunikácii. Sestra na oddelení, či v ambulancii je de facto zákazníkom. Niektorí iste namietne, že niekedy si za to sestry môžu sami, keď nervózne telefonujú na stále obsadené číslo v laboratóriu.

Neuvedomujeme si, žiaľ, že pacienti majú v bezvedomí a doktor im nadáva, keď nevie, čo má s pacientom robiť. Tieto situácie by si asi niektoré z našich pracovníčok mali vyskúšať na vlastnej koži aj z druhej strany. 35 sťažností na problémy komunikácie je veľa. Na druhej strane zisťujeme, že nie sú rozdiely v počtoch odpovedí medzi lôžkovými a ambulantnými sestrami. To znamená, že stresový faktor pochádzajúci z oddelení nie je taký významný, ako sa predpokladá. Pravdepodobne viac sa prejavuje vplyv stresu (nervozita) pochádzajúci z laboratória.

K problémom komunikácie môžeme zaradiť aj neupozornenie na chybu odberu, alebo zvlášť závažného nálezu (kritický výsledok testu) hneď po ich zistení. Spofahnutie sa na oznámenie nálezu poštou veľmi spomaľuje diagnostický proces a nenapomáha dobrým vzťahom. Tento problém sa znásobí, ak sa oznam omylom pošle na inú adresu (4×).

Nedodanie, zámena, strata a popletenie výsledku je jav, ktorý viac kritizujú sestry z ambulancií (61–68%). Pravdepodobne sa to deje preto, že doručenie pošty do detašovaných ambulancií býva zložitejšie.

#### Iné problémy a zabezpečenie prevádzky laboratória

Do tejto, viac menej, neurčitej skupiny sme zaradili tie odpovede, ktoré nemali svoje jednoznačné miesto v predchádzajúcich častiach. Patria sem problémy v súvislosti s informačným systémom (chýbanie alebo zlyhávanie), ktoré narúšajú nielen predanalytickú, ale hlavne postanalytickú fázu diagnostického cyklu. Neskoré zadávanie výsledkov do NIS sme zaradili k neskoro dodaným výsledkom (predchádzajúca časť). Poruchy NIS sa vyskytli 12× a mali rovnaký dopad na ambulancie aj lôžka. Na chýbajúci informačný systém si sťažovali 4 respondentky. To neznamená, že na všetkých ostatných pracoviskách je NIS k dispozícii.

Sťažnosti na trvalo nedostatočný sortiment testov v spolupracujúcom laboratóriu neboli časté (5×) a trápili len sestry z oddelení (zrejme malých nemocníc). Prechodné výpadky v sortimente testov si všimli len dve respondentky. Tento problém môže mať viacero príčin. Predpokladáme, že na časti neskoro dodávaných výsledkov špeciálnych vyšetrení sa podieľali aj iné faktory (finančné problémy, nedostatočné zásobenie a podobne).

**Tabuľka 7. Problémy iného charakteru vznikajúce najčastejšie alebo s dopadom na laboratórium. Vysvetlenie skratiek uvedené pri tabuľke 4**

Problémy	celkom	AMB	ODD	AMB %	ODD %
výpadky v sortimente testov – prechodné	2	1	1	61,4%	38,6%
LAB nerobia všetky vyšetrenia – trvalé	5	0	5	0,0%	100,0%
zlá komunikácia zadávanie a zlyhávanie NIS	12	5	7	53,2%	46,8%
chýba nemocničný informačný systém	4	1	3	34,7%	65,3%
nedostatočné limity od zdravotných poisťovní	9	4	5	56,0%	44,0%

Posledný problém týkajúci sa nedostatočných limitov od poisťovní (zrejme argument niektorých laboratórií, pri obmedzovaní prevádzky) sa vyskytol 9× a trápil približne rovnako sestry z oboch táborov (ambulancie aj lôžka).

#### Aké sú najčastejšie problémy vybraných oddelení s laboratóriami

Čo najviac trápi sestry z rôznych oddelení pri spolupráci s laboratóriami, charakterizuje čiastočne aj ich štýl práce. Vymenujme si niektoré z problémov: Dlhé čakacie doby na výsledky urgentných „statim“ vyšetrení udávajú ako najväčší problém: gynekologické a urologické oddelenia (67%), traumatológia a ortopédia (42%) ale aj detské oddelenie (23%). Jedná sa o oddelenia, ktoré vyžadujú riešenie závažných a naliehavých stavov. Dlhé čakanie na výsledky špeciálnych testov udávajú: interné oddelenia (46%), iné špecializované oddelenia (29%) a chirurgické oddelenia (23%). Sú to pracoviská, kde sa najčastejšie vykonáva špeciálna diagnostika. Na neochotu až agresivitu pracovníkov laboratórií si najviac sťažujú sestry z ambulancií praktického lekára a stomatológie (43%), z neurológie (33%) a sestry z geriatrickej, psychiatickej a pracovísk sociálnej starostlivosti (32%). Veľké odchýlky v opakovaných výsledkoch si najviac všimli sestry z dialýzy, nefrológie a transplantáčného oddelenia (43%), z jednotiek intenzívnej starostlivosti, záchranky a anestézie (31%). Sú to tie oddelenia, kde sa systematicky sledujú vybrané laboratórne údaje. Nesprávny postup pri odberoch vidia ako najčastejší problém sestry z ošetrovateľských agentúr (50%) a sestry z ambulancií praktického lekára a stomatológie (43%). To iste nevyžaduje komentár.

Ako sme už uviedli aj pri tomto hodnotení si musíme uvedomiť, že uvedené percentá predstavujú iba mieru upozornenia na daný problém a nie skutočný počet chýb alebo výskyt nedostatkov.

#### ZÁVERY

Pri svojej práci sa stávame často zajatcami vlastných rutinných postupov. Neuvedomujeme si pomaly sa meniacu situáciu, ktorá vyžaduje zmenu nášho prístupu. Pritom zotrúvanie v nezmenenom spôsobe jednania môže byť nebezpečné, ak si svoje nedostatky, ktoré nás znevýhodňujú voči konkurencii, uvedomíme príliš neskoro.

Úlohou tejto malej sondy bolo nastaviť zrkadlo ako nás vidia tí, s ktorými spolupracujeme a ktorí sa často môžu rozhodnúť, či nám pošlú svoje vzorky.

Predstavili sme jednoduchú metódu, ako pomôcť pri zlepšovaní kvality našej práce. Táto malá anketa by snáď mohla byť inšpiráciou pre podobné, ale aj podrobnejšie ankety na jednotlivých laboratórnych pracoviskách.

Sonda poukázala na niektoré známe fakty, ktoré stále nie sú vyriešené a niekde pretrvávajú. Ukazuje sa, že chýbajú hlavne školenia a podrobné informácie (príručky a manuály) pre ambulancie a oddelenia o spôsoboch odberu, prípravy a transportu materiálu; dôležitosť jednorazového odberového materiálu, alebo nedostatky v získavaní spätných informácií o strate a znehodnotení vzoriek.

Ako jeden z najzávažnejších problémov sa zdá byť neschopnosť rýchlo reagovať na požiadavky oddelení

a to v oblasti akútnej „statim“ diagnostiky, hlavne pri skracovaní čakacej doby, ktorá je pre mnohé oddelenia zásadná. Z ankety vyplýva nutnosť trvale zlepšovať komunikáciu medzi laboratóriom a klinickými pracovníkmi – hlavne pri najčastejšom priamom telefonickom kontakte. Mnohé sestry si uvedomujú aj svoj podiel na problémoch pri komunikácii a jedna napísala: „ako sa do laboratória volá, tak sa z neho ozvú“. Takisto ako príčinu mnohých problémov sestry vidia v prílišnej záťaži pracovníkov laboratória, pri zvyšovaní „produktivity práce“ nad únosnú mieru.

Mnohé z problémov s ktorými sme sa stretli sú pomerne ľahko odstrániteľné zlepšením spolupráce, ktorá je podstatou znižovania chýb v predanalytickej a postanalytickej fáze.

Analýzou odpovedí na anketu zisťujeme, že niektoré dosiaľ zaužívané mýty neplatia, napríklad:

1. Nie je pravda, že si sestry nevšímajú kvalitu prístrojovej techniky a ich dopad na plynulosť vyšetrení.
2. Nie je pravda, že sestry si nevšímajú aké chodia výsledky u pacientov a ako zodpovedajú klinickému stavu – spozorujú veľké odchýlky vo výsledkoch.
3. Nie je pravda, že si sestry nevšímajú negatívne dôsledky „laboratórnej turistiky“ namiesto využívania služieb porovnateľného miestneho laboratória. (predĺžovanie TAT a narušenie kontinuity sledovaných parametrov, častejšia strata vzoriek a výsledkov).
4. Nie je pravda, že sa sestry nevedia postaviť kriticky aj k vlastným chybám a že im nezáleží na dobrej spolupráci. My v laboratóriách máme v myslení zakódovanú

presnosť v meraní (až na úroveň počtu molekúl), a sme schopní sledovať počty chýb a rôznym spôsobom „zvnútra“ hodnotiť našu prácu. Možno si málo uvedomujeme, že „menej presný“ pohľad na nás „zvonku“ môže byť niekedy dôležitejší. Aj keď je založený na subjektívnych úsudkoch, motivuje postoje prostredia, v ktorom pôsobíme a tak nielen nepriamo ovplyvňuje, to ako často a ako radi budú využívať naše služby.

#### LITERATÚRA (Endnotes)

1. **Plebani, M., Carraro, P.:** Mistakes in a stat laboratory: Types and frequency. Clin Chem 1997;43:1348-1351s.
2. **Ricós, C. A.:** Quality indicators for medical laboratories, (Indikátory kvality a špecifikácie pre medicínske laboratórium), Labkvalita 07, Sielnica 11.9.2007.
3. **Nagasree, E. L., Ratnakar, K. S.:** Clinical Laboratory Errors: Source & Rectification dostupné na <http://www.expresshealthcaremgmt.com/200605/diagnostic01.shtml>.
4. **Žiaková, K. et. al.:** *Ošetrovatelstvo: teória a vedecký výskum*. 1. vyd. Martin: Osveta, 2003. 319 s. ISBN 80-8063-131-X.
5. **Sheppard, C., Franks, N., Nolte, F. et al:** Improving quality of patient care in an emergency department. Am J Clin Pathol. 2008;130: 573-577s
6. **Plumhoff, E. A., Masoner, D., Dale, J. D.:** Preanalytic Laboratory Errors: Identification and Prevention, Mayo Medical Laboratories. *communiqué*, 2008, 33, dec No. 1.

---

ANALÝZA OLIGOKLONÁLNYCH PÁSOV  
V CEREBROSPINÁLNO M LIKVORE U PACIENTOV  
SO SUSPEKTNOU SKLERÓZOU MULTIPLEX

---

MARTA ONDRKALOVÁ, TERÉZIA KALNOVIČOVÁ  
PETRA HENKRICHOVÁ, PETER TURČÁNI

Prvá neurologická klinika  
Lekárskej fakulty UK a FNsP Bratislava

## SÚHRN

Dôkaz intratekálnej syntézy imunoglobulínov G (IgG) a prítomnosti oligoklonálnych IgG pásov (OP) v cerebrospínálnom likvore (CSF) je kľúčovým nálezom na podporu diagnózy sklerosis multiplex (SM). Predmetom štúdie bolo analyzovať CSF pacientov so suspektnou SM a porovnať analyzované biochemické a cytologické parametre u pacientov s pozitívnym a negatívnym nálezom CSF OP. Prítomnosť CSF OP sme zistili len u 25,8 % pacientov. V porovnaní s touto skupinou, pacienti s absenciou CSF OP sa vyznačovali negatívnou hodnotou intratekálnej syntézy IgG podľa Reibera (RIG = O), absenciou lymfoplazmatických a plazmatických buniek v CSF a mierne zvýšenou beta - albumínovou frakciou v sére bez štatistickej významnosti.

**Kľúčové slová:** Oligoklonálne IgG pásy, skleróza multiplex, sérum, cerebrospínálny likvor

## SUMMARY

Intrathecal immunoglobulin G (IgG) synthesis and the presence of oligoclonal bands (OCB) in the cerebrospinal fluid (CSF) are hallmarks of multiple sclerosis (MS). Because of the high sensitivity of OCB test, investigation of CSF for OCB is strongly recommended to support the diagnosis of MS. The aim of this study was to analyse OCB in patients with suspected MS and to compare some biochemical parameters in both the positive group on CSF OCB and the CSF OCB(-) group. Our study demonstrates the presence of CSF OCB only in 25,8 % patients. Compare to this group, CSF OP (-) patients had RIG=O (negative intrathecal synthesis IgG), absence of lymphoplasmatic and plasmatic cells in CSF and mild increased serum beta-albumin fraction without statistic significance.

**Key words:** Oligoclonal IgG bands, multiple sclerosis, serum, cerebrospinal fluid

## ÚVOD

Približne pred 70 rokmi sa zistilo, že protilátky prítomné v cerebrospínálnom likvore (CSF) majú dvojaký pôvod, pochádzajú „z krvi aj z cerebrospínálneho tkaniva.“ O pár rokov neskôr sa pri analýze bielkovín v CSF u pacientov s ochorením centrálného nervového systému (CNS), najmä u pacientov s neurosyfilisom, ale aj so sklerózou multiplex (SM), dokázala prítomnosť zvýšených hodnôt gamma globulínu, pri ich normálnych hodnotách v sére (8). Použitím filtračného papiera pri separácii proteínov v CSF a korešpondujúcom sére, boli zvýšené hladiny gamma proteínu, na rozdiel od celkových proteínov, nájdené u 70 % pacientov s SM, čo nepriamo potvrdzovalo, že zdrojom tohto zvýšeného gamma globulínu je CNS (22). Tieto pozorovania boli čoskoro aplikované do praxe a stali sa súčasťou diagnostických vyšetrení pri neurologických ochoreniach. Počas nasledujúcich rokov sa vyšetrovacie metódy zlepšovali. Bola objavená izoelektroforetická fokusácia ako citlivá metóda pre separáciu proteínov. Agarová elektroforéza odhalila prítomnosť oligoklonálnych pásov (OP) u 90 % SM pacientov. Prítomnosť OP sa zistila aj u pacientov s inými zápalovými neurologickými ochoreniami, a v niektorých prípadoch aj u pacientov s nezápalovými chorobami CNS, napr. pri degeneratívnych, cerebrovaskulárnych ochoreniach, migréne, alebo epilepsii (10). Zaujímavé bolo zistenie, že u pacientov s klinickým izolovaným syndrómom, s akútnou optickou neuritídou, ktorá môže byť prvým klinickým prejavom SM, vzor oligoklonálnych pásov zostáva nemenný a každý človek má svoj charakteristický vzorec (15). Z vyšetrení CSF u SM pacientov má dôkaz prítomnosti oligoklonálnych IgG pásov v CSF kľúčové postavenie.

Do 60. rokov 20. storočia sa diagnostika sclerosis multiplex opierala o klinické Schumacherove diagnostické kritériá, v 80. rokoch to boli Poserove kritériá, doplnené o vtedy dostupné laboratórne a neurofyziologické vyšetrenia. Pretože tieto kritériá nezohľadňovali informácie o dynamike chorobného procesu pomocou magnetickej rezonancie, vypracovala v roku 2001 americká spoločnosť pre SM návrh nových diagnostických kritérií, známych ako McDonaldove kritériá (12) pomenované podľa Iana McDonalda, ktorý predsedal medzinárodnému panelu pre diagnostiku SM, ktoré boli revidované v roku 2005 (16) so zámerom zlepšenia a zvýšenia spoľahlivosti diagnostiky SM a obmedzenia falošne pozitívnej diagnózy. Vyšetrenie OP v CSF má popri klinickom a MRI vyšetrení postavenie doplňujúcej diagnostickej požiadavky.

V predloženej práci sme analyzovali oligoklonálne IgG pásy v súbore pacientov so suspektnou SM za účelom potvrdenia tejto diagnózy a porovnávali sme namerané biochemické a cytologické parametre medzi skupinou pacientov s pozitívnym dôkazom OP v CSF so skupinou pacientov s absenciou OP v CSF.

## PACIENTI A METÓDY

Bol analyzovaný súbor zložený zo 151 pacientov s predpokladanou klinickou diagnózou skleróza multiplex (SM) s priemerným vekom 38,2 +/- 13,2 rokov (97 žien a 54 mužov). U pacientov sa vykonalo cytologické vyšetrenie CSF a merali sa sérové a CSF základné biochemické parametre. Intratekálna syntéza IgG sa zisťovala kvalitatívne vyšetrením prítomnosti oligoklonálnych IgG pásov (OP) v sére a v CSF metódou izoelektrickej fokusácie na polyakrylamidovom géle. Kvantitatívne hodnotenie intratekálnej syntézy IgG sa vykonalo pomocou Reiberovho vzťahu (RIG) (17). Koncentrácia IgG a albumínu sa stanovila nefelometricky. Funkcia hematolikorovej bariéry sa hodnotila pomocou albumínového kvocientu QAlb (QAlb = CSF albumín/albumín v sére). Cytologické mikroskopické vyšetrenie likvoru: kvantitatívne hodnotenie vo Fuchsovej-Rosenthalovej komôrke, počet jadrových elementov sa odčítal po zafarbení kyslým fuchsínom (mononukleáry, polynukleáry), pri kvalitatívnom cytologickom hodnotení sa použilo základné farbenie podľa Pappenheima. Výsledky sú prezentované ako aritmetický priemer +/- SD a sú spracované štandardnými štatistickými postupmi (Kolmogorovov-Smirnov test). Významnosť medzi priermi bola testovaná pomocou t-testu.

## VÝSLEDKY

V analyzovanom súbore pacientov (n=151) s predpokladanou klinickou diagnózou SM sa na základe vyšetrenia CSF a séra (materiál zaslaný z iných pracovísk SR v období od 22. 10. 08 do 4. 3. 09) zistila prítomnosť intratekálnej syntézy IgG a prítomnosť oligoklonálnych IgG pásov (OP) len u 25,8% (39/151, 25 žien, 15 mužov) SM pacientov. Priemerný vek tejto skupiny pacientov (OP+) je signifikantne nižší (34,4 +/- 10,4, (17-57), p<0,05) ako je vek SM pacientov s absenciou OP v CSF (39,5 +/- 13,8, (10-73 rokov)). Počet oligoklonálnych IgG pásov sa u SM pacientov pohyboval od 6 do 28 OP. OP(+) skupina pacientov sa v porovnaní s OP(-) skupinou vyznačovala signifikantne vyššími likvorovými hladinami IgG (p=3,78.10<sup>-8</sup>) a signifikantne zvýšenými likvorovými hladinami celkových bielkovín (p<0,05) (Tab. 2). Pri elektroforéze bielkovín sa zistili signifikantné rozdiely len v likvorových hladinách gama-globulínov, (zvýšenie u OP(+); p=2,8.10<sup>-8</sup>). Pacienti s absenciou OP sa vyznačovali s vyššou priemernou sérovou hodnotou beta globulínovej frakcie, ale tento rozdiel nebol signifikantný (Tab. 3). Analýza cytologického vyšetrenia likvoru poukázala, že SM pacienti s dôkazom prítomnosti OP v CSF mali v porovnaní s OP(-) skupinou signifikantne zvýšený počet mononukleárov (p=7,8.10<sup>-5</sup>), lymfoplazmatických buniek (p=1,9.10<sup>-5</sup>) a plazmatických buniek (p=4,9.10<sup>-9</sup>) bez výskytu neutrofilov, eozinofilov a makrofágov (Tab. 4).

**Tab. 1. Frekvencia výskytu IgG oligoklonálnych pásov (OP) v cerebrospinálnom likvore (CSF) u pacientov so sklerózou multiplex (SM) a pacientov s nezápalovými neurologickými chorobami (OND) v európskych krajinách**

Krajina	SM OP	OND OP	Cit.
Anglicko	95%	9%	McLean <i>et al.</i> , 1999
Belgicko	91%	7%	Delmotte, Gonsette (1977)
Česko	81%	7%	Bednárová <i>et al.</i> , 2005
Dánsko	96%	7%	Sellebjerg a spol., 2000
Francúzsko	85%	5%	Bourahoui <i>et al.</i> , 2004
Francúzsko	91%	4%	Caudie <i>et al.</i> , 2005
Nórsko	100%	9%	Lundig <i>et al.</i> , 2000
Nórsko	93%	4%	Mygland <i>et al.</i> , 2007
Portugalsko	83%	18%	Sa <i>et al.</i> , 2005
Španielsko	96%	1%	Villar <i>et al.</i> , 2005
Švédsko	95%	14%	Link a Kostulas, 1983
Švédsko	88%	0	Olsson <i>et al.</i> , 1984
Švédsko	100%	9%	Kostulas <i>et al.</i> , 1987
Slovensko	89%		Rot a Mesec, 2006
Srbsko	97%		Dujmovic <i>et al.</i> , 2004
Taliansko	89%		Annunziata <i>et al.</i> , 2006

**Tab. 2. Biochemické parametre v sére a v cerebrospinálnom likvore (CSF) v skupine pacientov so sklerózou multiplex (SM) s prítomnosťou (OP>0, n=39) a bez prítomnosti oligoklonálnych pásov (OP=0, n=112) v CSF**

Parameter	OP > 0	OP = 0	Ref. hodnoty
OP	14,9 +/- 4,4 (6-28)	0	0
IgG (sérum)	11,92 +/- 2,58 (6,71-7,9) < 7,0 = 2,6%, > 17,0 = 5,1%	11,15 +/- 2,26 (6,26-18,1) < 7,0 = 0,9%, > 17,0 = 2,7%	7,0-17,0 g/L
IgG (CSF)	81,56 +/- 77,60 (34-503) >40 = 79,5%	32,57 +/- 25,42** (10-173) >40 = 21,4%	0-40 mg/L
RIG	34,29 +/- 33,75 (2,39-148)	0	0 mg/L
CSF-Bielkoviny	583,2 +/- 609,9 (335-3416) >430 = 48,7%	428,8 +/- 230,2* (153-1611) >430 = 29,5%	150-430 mg/L
Albumín (sérum)	44,45 +/- 4,65 (37,0 -52,7)	43,75 +/- 4,45 (37,1-59,2) >53 = 0,9%	37-53 g/L
Albumín (CSF)	274,23 +/- 238,2 (104-1568) >350 = 5,1%	262,02 +/- 155,0 (90-968) >350 = 21,4%	0-350 mg/L
QALB	6,23 +/- 5,12 (5,66-37,6) >7,4 = 10,2	6,13 +/- 3,91 (2,13-26,4) >7,4 = 24,1%	do 7,4

## DISKUSIA

Skleróza multiplex (SM) patrí medzi najčastejšie chronické neurologické ochorenia. SM je zápalové, neurodegeneratívne ochorenie centrálného nervového systému, pri ktorom dochádza k demyelinizácii a axonálnej strate v CNS. Na základe patologickej imunologickej reakcie vzniká multiložiskové poškodenie mozgu a miechy, ktoré sa prejavuje funkčným zneschopením pacienta s typickým kolísavým priebehom. Toto ochorenie postihuje ľudí v produktívnom veku. Doteraz nie je známa účinná prevencia SM, preto je cieľom úsilia včasná diagnostika a skorá terapeutická intervencia do patologického procesu, ktorým by sa predišlo, alebo by sa spomalil rozvoj ťažkého zneschopenia, ktoré obmedzuje bežné denné aktivity. Včasná a správna diagnóza sklerózy multiplex (SM) je kľúčovým faktorom, ktorý môže významne ovplyvniť ďalší osud pacienta. Okrem klinického vyšetrenia a MRI a evokovaných potenciálov sa na potvrdenie diagnózy SM vyžaduje aj analýza cerebrospinálneho likvoru (CSF). Vyšetrenie CSF nadobúda

**Tab. 3. Elektroforéza bielkovín v sére a v cerebrospinálnom likvore (CSF) v skupine pacientov so sklerózou multiplex (SM) s prítomnosťou (OP > 0, n=39) a bez prítomnosti (OP = 0, n=112) oligoklonálnych pásov v CSF**

Parameter	OP > 0	OP = 0	Referenčné hodnoty
<b>sérum</b>			
<b>Albumín</b>	61,7 +/- 4,4 (54,0-68,0)	61,9 +/- 3,4 (53,4-68,5)	52-68 %
<b>Alfa-1 globulín</b>	3,78 +/- 0,49 (2,9 -4,9)	3,88 +/- 0,59 (2,9-5,0)	2-5 %
<b>Alfa-2 globulín</b>	8,35 +/- 1,18 (7,0 -11,4)	8,37 +/- 1,26 (7,0-13,0)	7-1 %
<b>Beta globulín</b>	11,86 +/- 1,64 (9,0-15,0)	16,67 +/- 2,19 (13,0-22,0)	9-14 %
<b>Gama globulín</b>	14,32 +/- 2,73 (8,5-22,1)	13,59 +/- 1,91 (10,0-20,5)	12-20 %
<b>cerebrospinálny likvor</b>			
<b>prealbumín</b>	3,77 +/- 0,66 (2,0-5,0)	3,94 +/- 0,62 (1,5-7,5)	1,85-4,5 %
<b>Albumín</b>	56,6 +/- 4,0 (46,4-62,5)	60,32 +/- 4,1 (38,2-67,2)	52,7-68,3 %
<b>Alfa-1 globulín</b>	3,41 +/- 0,49 (2,6-4,7)	3,60 +/- 0,62 (2,9-6,1)	2,6-6,4 %
<b>Alfa-2 globulín</b>	4,73 +/- 1,10 (3,9-10,1)	4,59 +/- 0,72 (3,9-6,3)	3,8-7,8 %
<b>Beta globulín</b>	16,1 +/- 2,0 (13,0-20,1)	16,7 +/- 2,2 (13,0-22,0)	13,0-22,0 %
<b>Gama globulín</b>	15,1 +/- 3,9** (11,4-28,1)	10,6 +/- 3,0 (6,0-29,9)	5,6-11,4 %

**Tab 4. Počet bunkových elementov v cerebrospinálnom likvore (CSF) v skupine pacientov so sklerózou multiplex (SM) s prítomnosťou (OP > 0) a bez prítomnosti oligoklonálnych pásov (OP = 0) v CSF**

Parameter	OP > 0 n=15	OP = 0 n=40	Ref. hodnoty
<b>Mononukleáry</b>	22,5 +/- 14,1** (2-56)	9,07 +/- 8,57 (0-45)	15/3
<b>Polynukleáry</b>	0,87 +/- 0,72 (0-2) >0 =66,7%	0,55 +/- 0,92 (0-4) >0 =32,5%	0
<b>Monocyty</b>	25,1 +/- 3,2 (22-34)	27,8 +/- 6,5 (20-56)	20
<b>Lymfocyty malé</b>	60,2 +/- 5,0 (55-67)	64,4 +/- 13,3 (0-80)	80
<b>Lymfocyty veľké</b>	3,2 +/- 3,9 (0-12) >0 = 60,0%	2,0 +/- 2,8 (0-12) >0 = 54,0%	0
<b>LP - bunky</b>	4,9 +/- 1,7** (1-7) >0 =100%	0,13 +/- 0,4 (0-2) >0 = 10,8%	0
<b>Plazmatické bunky</b>	2,9 +/- 1,1** (2-6) >0 =100%	0,11 +/- 0,38 (0-2) >0 = 8,1%	0
<b>Neutrofilly</b>	(0,06 +/- 0,24) (0-1) >0 = 6,7%	0,18 +/- 0,51 (0-2) >0 =13,5%	0
<b>Eozinofily</b>	0	0,16 +/- 0,36 (0-1) >0 = 16,2%	0
<b>Makrofágy</b>	0	0,21 +/- 0,52 (0-2) >0 = 16,2%	0

dôležitý diagnostický význam hlavne pri objavení sa prvých neurologických príznakov s negatívnym nálezom na MRI. Charakteristickým likvorovým znakom u SM pacientov je prítomnosť intratekálnej syntézy imunoglobulínov triedy IgG (IgG), ktorá sa môže vyjadriť kvantitatívne pomocou IgG indexu (alebo iných navrhnutých vzťahov, napr. podľa Reibera (17)) a kvalitatívne pomocou dôkazu prítomnosti oligoklonálnych IgG pásov (OP). Detekcia dvoch a viac OP v likvore bez ich nálezu v krvnom sére poukazuje na chronický imunopatologický proces prebiehajúci v nervovom tkanive. Informácie získané analýzou CSF u SM pacientov nadobúdajú hlavne význam v diagnosticky neistých prípadoch. Likvorové oligoklonálne IgG pásy (OP) sú pozitívne u prevažnej väčšiny SM pacientov. Frekvencia výskytu OP v CSF u SM pacientov v našich geografických podmienkach je okolo 90-95 % (Tab. 1).

V našom súbore pacientov sme identifikovali prítomnosť OP v CSF len 25,8 % pacientov (Tab. 2). Z tohto

dôvodu nás zaujímalo, ako sa pacienti so suspektnou SM bez CSF OP líšia od skupiny SM pacientov, u ktorých bola dokázaná prítomnosť oligoklonálnych IgG pásov (OP+) v CSF. V likvorologických nálezoch u SM (OP+) pacientov je prevažne prítomná ľahká mononukleárna pleiocytóza, v cytologickom obraze aktivované lymfocytárne bunky (Tab. 4). Okrem toho sú v likvore normálne alebo mierne zvýšené celkové bielkoviny (Tab. 2), zvýšená intratekálna syntéza IgG vyjadrená Reiberovým vzťahom (RIG) (Tab. 2), alebo gama frakcia pri imunoelektroforéze likvoru (Tab. 3). Významným rozdielom medzi týmito dvomi skupinami pacientov je, že u skupiny OP(-) v súlade s absenciou likvorových oligoklonálnych IgG pásov nie je potvrdená intratekálna produkcia IgG vyjadrená Reiberovým vzťahom (RIG = 0) a aktivácia lymfocytárnych buniek (Tab. 4).

Cytologický obraz SM OP(+) pacientov poukazuje na aktiváciu imunitného systému (Tab. 4). SM sa v súčasnosti považuje za ochorenie sprostredkované Th1 bunkami (CD4+ bunky typu 1). Po svojej aktivácii produkujú Th1 lymfocyty prozápalové cytokíny (INF-gama, TNF-alfa a beta, IL-2). Na povrchu T buniek a na povrchu endoteliálnych buniek sa exprimujú tzv. adhezívne molekuly, ktoré umožnia prienik T buniek do CNS. V perivaskulárnom prostredí prostredníctvom zápalových cytokínov sa aktivujú makrofágy, ktoré spolu so zápalovými cytokínmi zodpovedajú za deštrukciu myelínu. Aktivované T bunky zahajujú spoluprácu s B lymfocytmi, a tie sa menia na plazmatické bunky tvoriace protilátky.

Pre diagnózu SM je pri vyšetrení cerebrospinálneho likvoru najpodstatnejší nález oligoklonálnej skladby protilátok IgG pri izoelektrickej fokusácii. Táto metóda je vysoko senzitivná, ale jej špecificta je nižšia v dôsledku možného výskytu oligoklonálnej skladby imunoglobulínov aj pri iných ochoreniach. Okrem sclerosis multiplex, prítomnosť oligoklonálnych pásov môže byť zistená aj pri iných zápalovo podmienených ochoreniach, pri paraneoplastických ochoreniach, systémovom lupus erythematodes napádajúcom CNS, neurosarkoidóze, cerebelárnej angiopatii. Mnoho infekcií CNS ako aseptická meningitída, neuroborelióza, neurosifilis sú v rôznej miere spojené s prítomnosťou OP. Pacienti s dokázanými oligoklonálnymi pásmi v likvore by mali byť z uvedeného dôvodu testovaní aj na prítomnosť protilátok proti vírusom a baktériám (7).

## ZÁVER

Skleróza multiplex je heterogénne ochorenie, ktoré okrem klinického obrazu a nálezov magnetickej rezonancie mozgu a miechy vyžaduje pre určenie diagnózy SM aj vyšetrenie likvoru na prítomnosť oligoklonálnych IgG pásov (CSF OP). Vo vyšetrovanej skupine pacientov so suspektnou SM sme zistili prítomnosť CSF OP len u 25,8 % pacientov. V porovnaní s touto skupinou, pacienti s absenciou CSF OP sa vyznačovali negatívnou hodno-

tu intratekálnej syntézy IgG podľa Reibera (RIG = 0), absenciou lymfoplazmatických a plazmatických buniek v CSF a mierne zvýšenou beta-albuminovou frakciou v sére bez štatistickej významnosti.

## LITERATÚRA

1. Annunziata, P., Giorgio, A., De Santi, L., Zipoli, V., Portaccio, E., et al.: *Absence of cerebrospinal fluid oligoclonal bands is associated with delayed disability progression in relapsing-remitting MS patients treated with interferon-beta*. J. Neurol. Sci. 2006; 244 (1-2): 97-102.
2. Bednárová, J., Štourač, P., Adam, P.: *Relevance of immunological variables in neuroborreliosis and multiple sclerosis*. Acta Neurol Scand 2005; 112: 97-102.
3. Bourahoui, A., de Seze, J., Gutierrez, R., et al.: *CSF isoelectrofocusing in a large cohort of MS and other neurological diseases*. Eur. J. Neurol. 2004; 11: 528-529.
4. Caudie, C., Birouk, A.M., Bancel, J.: *Cytoimmunological profile of CSF in diagnosis of MS*. Pathol. Biol. 2005; 53: 68-74.
5. Delmotte, P., Gonsette, R.: *Biochemical findings in multiple sclerosis: IV. Isoelectric focusing of the CSF gamma globulins in multiple sclerosis (262 cases) and other neurological diseases (272 cases)*. J. Neurol. 1977; 215: 27-37.
6. Dujmovic, I., Mesaros, S., Pekmezovic, T., Levic, Z., Drulovic, J.: *Primary progressive multiple sclerosis: clinical and paraclinical characteristics with application of the new diagnostic criteria*. Eur. J. Neurol. 2004; 11 (7): 439-444.
7. Hans, L., Yu-Min, H.: *Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: An update on methodology and clinical usefulness*. J. Neuroimmunol. 2006, 180: 17-28
8. Kabat, E. M., Moore, D. H., Landow, H.: *An electrophoretic study of the protein components in cerebrospinal fluid and their relationship to the serum proteins*. J. Clin. Invest. 1942; 21: 571-577.
9. Kostulas, V., Link, H., Lefvert, A.K.: *Oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid. Principles for demonstration and interpretation based on findings in 1114 neurological patients*. Arch Neurol 1987; 44: 1041-1044.
10. Leterre, E. C., Callewaert, A., Heremans, J. F., Sfaello, Z.: *Electrophoretic morphology of gamma globulins in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis and other disease of the nervous system*. Neurology 1970; 20: 982-990.
11. Link, H., Kostulas, V.: *Utility of isoelectric focusing of cerebrospinal fluid and serum on agarose evaluated for neurological patients*. Clin. Chem. 1983; 29: 810-815.
12. McDonald, W. I., Compston, A., Edan, G., et al.: *Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis*. Ann Neurol 2001; 50: 121-27.
13. McLean, B. N., Luxton, R. W., Thompson, E. J.: *A study of IgG in the cerebrospinal fluid of 1007 patients with suspected neurological disease using isoelectric focusing and Log IgG-index. A comparison and diagnostic applications*. Brain 1990; 113: 1269-1289.

14. Mygland, A., Tryda, T., Vinje, B. U., Vedeler, C.: Isoelectric focusing is superior to immunofixation electrophoresis in diagnosing CNS inflammation. *Acta Neurol Scand* 2007; 115(2): 122–125.
15. Olsson, T., Kostulas, V., Link, H.: *Improved detection of oligoclonal IgG in cerebrospinal fluid by isoelectric focusing in agarose, double-antibody peroxidase labeling, and avidin-biotin amplification.* *Clin. Chem.* 1984; 30: 1246–1249.
16. Polman et al.: *2005 Revision MS Diagnostic.* *Ann. Neurol.* 2005; 58: 840–946
17. Reiber, H., Peter, J.B.: *Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs.* *J. Neurol. Sci.* 2001;184:101-122.
18. Rot, U., Mesec, A.: *Clinical MRI, CSF and electrophysiological findings in different stages of multiple sclerosis.* *Clin. Neurol. Neurosurg.* 2006; 108: 271–274.
19. Sa, M. J., Sequeira, L., Rio, M. E., Thompson, E. J.: *Oligoclonal IgG bands in the CSF of Portuguese patients with MS.* *Arq. Neuro-psiquiatr.* 2005; 63: 375–379.
20. Sellebjerg, F., Jense, C. V., Christiansen, M.: *Intrathecal IgG synthesis and autoantibody-secreting cells in multiple sclerosis.* *J. Neuroimmunol.* 200; 180 (1–2): 207–215.
21. Villae, L. M., Masjuan, J., Sadaba, M. C. et al.: *Early differential diagnosis of multiple sclerosis using a new oligoclonal band test.* *Arch. Neurol.* 2005; 62(4): 574–577.
22. Yahr, M. D., Goldensohn, S. S., Kabat, E. A.: *Further studies on gammaglobulin content of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis and other neurological disease.* *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1954; 68: 613.

Adresa pre korešpodenciu:

Prof. MUDr. Peter Turčáni, PhD.

I.neurologická klinika LF UK

Mickiewiczova 13

813 64 BRATISLAVA

e-mail: peter.turcani@faneba.sk



VILIAM PÄTOPRSTÝ

Slovenský metrologický ústav, Karloveská 63  
842 55 Bratislava  
Slovenská Republika  
e-mail: patoprsty@smu.gov.sk

## ÚVOD

Jedným zo základných predpokladov získania správnych výsledkov chemických i biochemických meraní je zabezpečenie nadväznosti hodnôt meranej veličiny. Pojem nadväznosti má pôvod v metrologii. Medzinárodný metrologický slovník (VIM) [1] ju definuje ako vlastnosť výsledku merania prostredníctvom ktorej ho možno vzťahovať na vhodné referencie (najčastejšie etalóny, vo všeobecnosti národné, prípadne medzinárodné), prostredníctvom neprerušeného reťazca porovnaní s hodnotami štandardných neistôt tvoriacimi príspevky k neistote výsledku merania. Tieto spôsoby porovnávaní hodnôt reprodukovateľných meradiel s hodnotami realizovanými etalónmi sa označujú ako kalibrácie.

Koncepcia nadväznosti je založená na troch základných pilieroch.

Prvým je idea najdokonalejšej realizácie hodnoty (hodnôt) jednotky (stupnice) danej fyzikálnej veličiny prostredníctvom etalónu - sofistikovaného zariadenia, prípadne relatívne vysoko stabilného artefaktu, ako nositeľov hodnôt veličiny, konvenčne považovaných za jednotkové.

Druhým je idea medzinárodnej porovnateľnosti takýchto hodnôt a tretím je idea najsprávnejšieho prenosu tejto hodnoty prostredníctvom jej priameho porovnania s inou hodnotou, a tým jej prenesenie až na úroveň praktických meraní.

Nepriame merania (ktoré v praxi tvoria viac ako 90 % všetkých meraní) vnášajú do prenosu okrem neistôt hodnôt spôsobených vplyvovými veličinami i neistoty platnosti príslušnej funkčnej závislosti.

S prvou ideou sú spojené problémy s dokonalou realizáciou hodnoty jednotky, resp. stupnice hodnôt. Jednotky fyzikálnych veličín sice definované sú, avšak ich realizácia podľa definície (minimálne v prípade základných fyzikálnych veličín) je veľmi obtiažna ak nie nemožná. Tieto definície spravidla vychádzajú z predpokladov spojených s rôznymi abstrakciami (najčastejšie geometrickými). Vo väčšine prípadov však chýbajú definície príslušných veličín, ktoré by mali byť dostatočne univerzálne a formulované vhodným kvantifikovateľným spôsobom.

V prípade základnej veličiny látkové množstvo je problémom navyše skutočnosť, že v definícii jej jednotky - mólu, je zahrnutá kvalitatívna požiadavka (definovanie

entít). Chemických entít je obrovské množstvo, ktoré sa navyše neustále zvyšuje objavovaním ďalších chemických zlúčenín, takže najsť jedinú dokonale stereospecifickú metódu, ktorá by umožnila definovať jednotku pre každú chemickú entitu je nesmierne obtiažne. Z tohto dôvodu sa v chémii, možno viac ako v oblasti fyziky výraznejšie prejavuje konvencionalizmus. Bohužiaľ, spoločným znakom konvencií je ich limitovaná platnosť, ku koncu ktorej spravidla pôsobia kontraproduktívne a v danom prípade existujúce konvencie občas ignorujú základné metrologické požiadavky, resp. požiadavky teórie merania.

Z hľadiska činnosti analytického laboratória je to však problém, ktorý prakticky leží mimo jeho možnosti ovplyvnenia. Priamo sa laboratória dotýka až druhá idea zabezpečenia nadväznosti - zabezpečenie najsprávnejšieho prenosu hodnoty realizovanej etalónom.

S touto ideou tiež súvisí problém - výber najvhodnejšej metódy kalibrácie a taktiež samotnej metódy merania. Z dôvodov nedostatočnej ponuky metód zabezpečenia prenosu hodnôt jednotky sa na rovnakú kvalitatívnu úroveň kladú metódy odlišné z hľadiska princípu formulácie funkčnej závislosti fyzikálnej veličiny realizovanej etalónom (napr. CRM) a ovplyvňujúcimi fyzikálnymi veličinami. V dôsledku nesmiernej rozmanitosti chemických jedincov a teda i chemických veličín takisto zostáva zabezpečenie prenosu hodnôt veličiny na požadovanej úrovni správnosti. Preto sa konvenčne pristupuje k náhradným riešeniam, ktoré predstavujú najlepšie riešenie daného problému v danom čase.

Spoločným faktorom všetkých realizácií chemických veličín, odlišným od realizácie fyzikálnych veličín, je kvalitatívna požiadavka prvotnej identifikácie realizovanej veličiny, teda danej chemickej entity. Chemik, na rozdiel od fyzika, si nikdy nie je úplne istý či meraná veličina je veličinou ktorú chce merať.

Okrem nutnosti zabezpečenia tejto požiadavky si však zabezpečenie nadväznosti chemických meraní vyžaduje i niektoré ústupky. Sú spôsobené existujúcim stavom poznania v danej oblasti, ktorý neumožňuje realizovať všetky chemické veličiny pomocou etalónových zariadení.

Z tohto dôvodu sa definovali tzv. primárne metódy merania, ktoré trocha necitlivým spôsobom zahŕňajú spolu s metódami ktoré môžu slúžiť ako etalónové i metódy inej kategórie. I napriek tomuto ústupku, stále ostáva veľká časť chemických, resp. biochemických entít nezabezpečená. Preto sa pristúpilo (hlavne v oblasti biochemických, prípadne biologických meraní) k ďalším ústupkom. Nadväznosť sa v takýchto prípadoch nerealizuje na hodnotu veličiny, realizovanú etalónovým zariadením a prostredníctvom neho na príslušný CRM, ale napríklad na špeciálnu metódu merania. Tento fakt je zohľadnený i v medzinárodnej normatívnej dokumentácii, vrátane dokumentácie kvality, a je nutné i napriek niektorým výhradám metrologov ho akceptovať (napr. považovanie počítania kolónii v biochemických aplikáciách za meranie), i keď samotné vyhodnocovanie takéhoto procesu prináša so sebou určité problémy.

Základným problémom tejto oblasti je úroveň poznania, resp. fakt, že v niektorých prípadoch je veľmi obtiažne hovoriť o subjektoch hodnotenia ako o veličinách a o príslušnej metóde hodnotenia ako o meraní.

Zamerajme sa však najskôr na tie oblasti, v ktorých možno jednoznačne hovoriť o veličinách a o meraní. Základnou požiadavkou merania je zabezpečenie kalibrácie meradla.

### Kalibrácia a referenčné materiály

Kalibrácia meradla predstavuje jediný spôsob zabezpečenia nadväznosti výsledku merania získaného daným meradlom.

Musíme si však predovšetkým uvedomiť, že **zabezpečenie nadväznosti ešte nie je zárukou získania spoľahlivých výsledkov – je iba ich nutnou podmienkou**. Ďalším krokom pri zabezpečovaní spoľahlivosti výsledkov merania môže byť validácia použitej metódy merania. (V oboch týchto činnostiach sa využívajú certifikované referenčné materiály (CRM). Pochopiteľne, na CRM používané v týchto dvoch rozdielnych činnostiach sú tiež kladené rozdielne požiadavky.)

Kalibrácia sa uskutočňuje spravidla jedným z dvoch spôsobov [2]:

- **komparatívnou metódou** (referenčné a porovnávacie zariadenie pracujú buď súčasne alebo striedavo v kalibračnom cykle, v rámci ktorého dochádza k priamemu porovnaniu hodnôt veličiny meranej oboma zariadeniami, s možnosťou zavedenia korekcií na porovnávanom zariadení)
- **substitučnou metódou** (funkčný vzťah medzi výstupnou hodnotou meracieho zariadenia a všeobecne akceptovanou pravou hodnotou sa stanoví náhradou vstupnej hodnoty veličiny vhodnou materiálou mierou – napr. závažím, alebo certifikovaným referenčným materiálom).

(Druhý spôsob zároveň uvádza využitie jednej kategórie certifikovaných referenčných materiálov – CRM pre kalibračné účely. Certifikovaný referenčný materiál teda predstavuje artefakt, ktorý je nositeľom určitej hodnoty (alebo viacerých hodnôt) fyzikálnej veličiny.) V procese kalibrácie sa stanovujú systematické rozdiely, ktoré môžu existovať medzi meracím systémom a „referenčným systémom“ reprezentovaným certifikovaným referenčným materiálom, a ich akceptované hodnoty. Základným predpokladom pochopiteľne je, aby certifikovaná hodnota CRM i hľadaná neznáma hodnota meranej vzorky (reprezentujúce stanovovanú veličinu) boli vyjadrené v rovnakých jednotkách, a pre oba systémy – tak CRM ako i vzorku, platili rovnaké závislosti medzi meranou veličinou a stanovovanou veličinou. Tento druh CRM plní v procese merania funkciu etalónu.

Druhú kategóriu (v súlade so základnými medzinárodnými predpismi, týkajúcimi sa certifikovaných referenčných materiálov [3–8]) predstavujú CRM určené pre kontrolu jednotnosti merania (V metrologii, resp. vo vede všeobecne, je zaužívanou zvyklosťou, že ak nevieme dostatočne dobre modelovať skutočnosť,

uchylujeme sa ku konvencii. V prípade metrologie, ak nevieme zabezpečiť realizáciu nadväznosti v zmysle vyššie uvedenej schémy, snažíme sa ju suplovať zabezpečením tzv. jednotnosti merania), tiež označované ako referenčné materiály slúžiace na hodnotenie spoľahlivosti metódy analýzy, validáciu metódy merania, prípadne na určenie niektorých štatistických parametrov metódy merania, použitej pri analýze materiálov charakteru blízkeho zloženiu príslušného CRM.

Predstaviteľom takéhoto druhu CRM sú okrem iných i tzv. maticné CRM, realizované spravidla prírodnou maticou (pôdy, rudy, materiály rastlinného pôvodu...), maticou charakterizujúcou výsledok výrobného procesu (zliatiny, trosky, sklá...) s certifikovanými hodnotami koncentrácie požadovanej chemickej entity, prípadne CRM iného druhu. Hodnota vlastnosti reprodukovaná prostredníctvom CRM sa zisťuje medzi laboratórnymi analýzami, za účasti viacerých laboratórií, so stochastickým priradením „správnej“ (konvenčne) hodnoty reprodukovanej vlastnosti. Takýto druh referenčného materiálu je vhodný na hodnotenie a porovnávanie metód merania, na validáciu analýz..., teda prvoradým cieľom jeho aplikácie je kontrola kvality v zmysle jednotnosti. Táto druhá kategória referenčných materiálov, na rozdiel od prvej kategórie, slúži na hodnotenie chemického zloženia materiálov reprezentovaných príslušnou maticou a na hodnotenie fyzikálnych vlastností (veličín) sa prakticky nepoužíva. Resp. ak sa používa, zloženie matrice sa nezisťuje.

### Nepriame merania

Z praktického hľadiska predstavuje meranie porovnávanie neznámej hodnoty fyzikálnej veličiny so známou hodnotou – referenciou danej veličiny. Ak dochádza k priamemu porovnaniu oboch hodnôt, hovoríme o priamom meraní. V praxi však predstavujú priame merania iba nepatrný zlomok celkového počtu meraní. Prevažnú väčšinu všetkých meraní tvoria nepriame merania.

V prípade nepriamych meraní je predpokladom realizácie merania existencia závislosti

$$X_i = F(C_p, \alpha_p, \beta_p, \gamma_p, \delta_p) \quad (1)$$

medzi meranou veličinou (hodnotou meraného signálu, prípadne jej transformáciou na hodnotu zobrazeného signálu)  $X_p$ , stanovovanou veličinou  $C_i$  vonkajšími vplyvovými veličinami (stavové veličiny, intenzita elektromagnetického poľa, intenzita korpuskulárnych vplyvov...)  $\alpha_p$ , vplyvovými veličinami meraného systému (viskozita, hustota, iónová sila...)  $\beta_p$ , vplyvmi parametrov meracieho systému (citlivosť detektora, účinnosť prevodníkov..., vrátane eventuálnej funkcie prevodníka signálu)  $\gamma_i$  a fyzikálnymi konštantami  $\delta_i$ . Táto závislosť má dostatočne všeobecnú platnosť a spravidla je funkčná. Pri realizácii primárnych meraní sa uprednostňuje vzťah založený na niektorom zo základných fyzikálnych zákonov, modifikovaný na vplyvy parametrov použitého etalónového zariadenia.

V procese kalibrácie potom okrem zabezpečenia nadväznosti hodnôt jednotlivých veličín tejto tzv. kalibračnej funkcie tiež potvrdzujeme jej platnosť.

Výsledkom kalibračnej procedúry je teda kalibračná funkcia, ktorá sa uplatňuje pri transformácii výsledkov budúcich meraní. Poskytuje pravidlo, ako priradiť nameranej hodnote fyzikálnej veličiny (signálu) hodnotu stanovovanej fyzikálnej veličiny.

V ďalšom kroku potom po zmeraní signálu vzorky zisťujeme z inverznej – analytickej funkcie hodnotu stanovovanej veličiny  $C_x$

$$C_x = F^{-1}(X_x, \alpha_x, \beta_x, \gamma_x, \delta_x) \quad (2)$$

Medzi takéto druhy metód patrí v chemických meraniach napríklad coulometrická metóda, alebo metóda založená na znížení teploty tuhnutia meraného roztoku.

V chémii sú však takéto závislosti medzi oboma veličinami so všeobecnou platnosťou skôr výnimkou ako pravidlom. Spravidla je tvar závislosti neznámy, prípadne závislosť môže byť stochastická. Považujeme závislosť za funkčnú. Pri neznámom tvare funkcie  $F$  sa v matematickej analýze táto nahrádza inou funkciou  $\varphi$ , ktorá v určitom zmysle napodobňuje funkciu  $F$ .

Problematika aproximácie funkcií je jednou zo základných úloh numerických metód matematickej analýzy. Takáto funkcia  $\varphi$  sa v nej nazýva aproximácia funkcie  $F$ . V chémii sa pri riešení problému navyše obmedzujeme na závislosť iba dvoch premenných (predpoklad, že na hodnotu signálu okrem meranej veličiny žiadna iná veličina nemá vplyv, resp. má konštantný vplyv v celom rozsahu jej stanovovaných hodnôt), a na relatívne úzky rozsah hodnôt stanovovanej veličiny (koncentrácie), v ktorom sa snažíme tvar závislosti aproximovať [9]

Vo všeobecnosti sa pri výbere aproximácie najskôr volí systém jednoduchých základných funkcií  $\varphi_0, \varphi_1, \varphi_2, \dots, \varphi_n$ , takých, ktoré sa ľahko matematicky spracovávajú, alebo sa s nimi dobre pracuje na počítači. Danú funkciu  $F$  potom zvyčajne aproximujeme polynómom  $\varphi$  (polynóm predstavuje lineárnu kombináciu funkcií)

$$\varphi(c) = a_0 \varphi_0(c) + a_1 \varphi_1(c) + \dots + a_n \varphi_n(c) \quad (3)$$

Z pohľadu matematickej analýzy je tento postup úplne korektný a je v súlade s tzv. Weierstrassovým teorémom, podľa ktorého možno ľubovoľnú matematickú funkciu s dostatočnou presnosťou aproximovať polynómom.

Pretože aproximácia  $\varphi$  daná výrazom (3) závisí na parametroch (koeficientoch)  $a_0, a_1, \dots, a_n$  lineárne, hovoríme, že tento vzťah predstavuje aproximáciu lineárneho typu. Otázka výberu aproximácie sa potom prevádza na určenie hodnôt parametrov  $a_i$ .

Iným typom aproximácií sú aproximácie nelineárneho typu (pomocou racionálnych funkcií), ktorých riešenie je spravidla značne komplikovanejšie ako v prípade lineárnych aproximácií.

Otázka výberu aproximujúcej funkcie súvisí s chybou aproximácie  $E(c)$

$$E(c) = F(c) - \varphi(c) \quad (4)$$

Pochopiteľne, funkciu  $\varphi$  sa snažíme vybrať tak, aby bola chyba aproximácie minimálna.

Možností ako posudzovať hodnotu funkcie  $E$  v relatívne úzkom rozsahu hodnôt stanovovanej veličiny je celá rada. (Môžeme napríklad požadovať, aby táto hodnota bola v rámci celého rozsahu hodnôt stanovovanej veličiny menšia ako nejaké dané číslo  $\varepsilon$ , prípadne aby bola malá hodnota integrálu funkcie  $E$  v danom intervale...). Rozlišujeme pri tom dva základné druhy prístupu k hodnoteniu kritérií chyby aproximácie – podľa toho, či sa posudzuje vo všetkých bodoch (spojitý prípad), alebo len vo vybranom súbore bodov (diskrétne prípad).

Predpokladajme, že sme pre posudzovanie chyby aproximácie zvolili kritérium všeobecného tvaru

$$|\rho(F, \varphi)| \geq 0, \text{ také, že platí}$$

$$0 \leq \rho(F, \varphi^*) \leq \rho(F, \varphi) \quad (5)$$

kde  $\varphi^*$  predstavuje najlepšiu aproximáciu. Je však potrebné brať do úvahy, že z praktického hľadiska je spravidla primárnou požiadavkou, aby bola chyba aproximácie menšia ako určité číslo (požadovaná presnosť). Na splnenie tejto požiadavky nie je vždy nutné používať najlepšiu aproximáciu (občas je to i neefektívne).

V spojitom prípade sa chyba aproximácie hodnotí napr. pomocou veličiny

$$\rho_p(F, \varphi) = \left( \int |F(c) - \varphi(c)|^p dc \right)^{1/p}, p \geq 1, \quad (6)$$

V praxi je najpoužívanejšie kritérium

$$\rho_2(F, \varphi) = \left( \int |F(c) - \varphi(c)|^2 dc \right)^{1/2} \quad (7)$$

Najlepšia aproximácia sa podľa tohto kritéria nazýva najlepšia  $L_2$  - aproximácia. Niekedy je výhodné toto kritérium prispôsobiť riešenej úlohe tak, aby sa v ňom výraznejšie uplatňovali hodnoty chyby aproximácie v niektorých častiach uvažovaného intervalu. Možno to dosiahnuť použitím veličiny

$$\rho_{2,\omega}(F, \varphi) = \left( \int |F(c) - \varphi(c)|^2 \omega(c) dc \right)^{1/2} \quad (8)$$

kde  $\omega$  predstavuje spojitú a kladnú funkciu na danom intervale hodnôt, nazývanú váhová funkcia, ktorá uvedené lepšie prispôsobenie umožňuje.

Kritériá spojitého typu sa uplatňujú hlavne v prípade funkcií zadaných analytickým výrazom. Pri spracovaní výsledkov merania a v rade numerických metód matematickej analýzy sa používajú ich diskkrétne analógie.

V diskrétnom prípade môže byť funkcia  $F$ , ktorú chceme aproximovať, zadaná rôznymi spôsobmi. V prípade nameraných hodnôt, zapísaných do tabuľky

$\{(c_i, F(c_i)), i = 0, 1, \dots, m\}$

prechádza vzťah (8) do podoby

$$\rho^m(F, \varphi) = (\sum |F(c) - \varphi(c)|^2)^{1/2} \quad (9)$$

alebo

$$\rho^m_{2,\omega}(F, \varphi) = (\sum |F(c) - \varphi(c)|^2 \omega_i)^{1/2} \quad (10)$$

kde váhy  $\omega_i$  predstavujú pevne zvolené čísla. Pri tomto postupe predpokladáme, že **namerané hodnoty predstavujú exaktné odozvy hodnôt príslušnej stanovovanej veličiny**.

Najlepšie aproximácie sa označujú ako najlepšie diskkrétne aproximácie. Najlepšia diskkrétne  $L_2$  - aproximácia sa tiež nazýva **aproximácia metódou najmenších štvorcov** (pozri vzťah 8 alebo 10).

Ako už bolo uvedené, ako aproximujúca funkcia sa veľmi často používajú polynómy (hlavne v prípadoch keď nie je známy racionálny vzťah medzi premennými), ktoré v daných bodoch nadobúdajú daných hodnôt odpovedajúcich pôvodnej, neznámej funkcii. Pomocou nich možno spojitú funkciu aproximovať s rôznou úrovňou presnosti.

Pri tomto prístupe je potrebné pamätať na to, že pôvodný fyzikálny problém sa zredukoval na čisto matematickú záležitosť a získané koeficienty polynómu nemajú žiaden fyzikálny zmysel, ani súvislosť s hodnotami vplyvových veličín. Výsledné riešenie totiž nepredstavuje matematickú formu závislosti hľadanej fyzikálnej veličiny, ale iba optimálny tvar závislosti hodnôt hľadanej veličiny na hodnotách zobrazovanej veličiny, bez precíznejšej požiadavky na exaktnosť hodnôt zobrazovanej veličiny. Z metrologického, alebo fyzikálneho hľadiska došlo totiž k drastickej zmene situácie, keď pôvodná závislosť viacerých premenných (veličín) sa zredukovala na závislosť dvoch premenných (signál verzus meraná veličina).

### Praktický postup

Pri praktickej realizácii aproximácie sa v chémii vychádza zo súboru nameraných hodnôt signálov látok podobného zloženia ako má analyzovaná látka, ktorých hodnoty stanovovanej veličiny dostatočne dobre poznáme - kalibračných vzoriek, pripravených z certifikovaných referenčných materiálov. Rozsah hodnôt stanovovanej veličiny v kalibračných vzorkách sa volí taký, aby pokryl očakávanú hodnotu stanovovanej veličiny v analyzovanej látke. Samotná formulácia závislosti však predstavuje iba prvý krok v procese analýzy, resp. interpretácie samotného merania, pretože ako hodnoty koncentrácie a signálov kalibračných vzoriek použitých na vytvorenie analytickej, resp. kalibračnej závislosti, tak i hodnoty nameraného signálu analyzovanej látky majú vplyv na výsledok stanovovanej hodnoty veličiny analyzovanej látky a jeho štandardnú neistotu.

Procedúra interpretácie takéhoto druhu merania zahŕňa nasledovné kroky:

a) Špecifikácia analytického rozsahu, t.j. rozsahu koncentrácií kalibračných roztokov a prijateľnej úrovne neistoty výsledku.

b) Špecifikácia podmienok merania (teplota, ...).

c) Špecifikácia typu matematickej funkcie, ktorá sa použije ako analytická funkcia  $C = G(X)$

Napr.

lineárna funkcia

$$C = b_0 + b_1 X \quad (11)$$

polynóm druhého stupňa

$$C = b_0 + b_1 X + b_2 X^2 \quad (12)$$

polynóm tretieho stupňa

$$C = b_0 + b_1 X + b_2 X^2 + b_3 X^3 \quad (13)$$

mocninová funkcia

$$C = b_0 + b_1 X^{b_2} \quad (14)$$

exponenciálna funkcia

$$C = b_0 + b_1 \exp(b_2 X) \quad (15)$$

Ústredným bodom problému aproximácie je kritérium pre voľbu parametrov aproximačnej funkcie.

Parametre  $b$  analytickej funkcie sa stanovujú regresnou analýzou zo súboru kalibračných údajov, získaných z nameraných hodnôt kalibračných roztokov.

d) Špecifikácia počtu požadovaných kalibračných bodov  $n$ , v závislosti na type matematickej funkcie, ktorá sa použije ako analytická funkcia.

Odporúčaná minimálny počet bodov pre jednotlivé typy uvažovaných funkcií je nasledovný:

3 pre lineárnu funkciu

5 pre polynóm druhého stupňa

7 pre polynóm tretieho stupňa

5 pre mocninovú funkciu

5 pre exponenciálnu funkciu.

e) Výber (príprava) kalibračných roztokov v súlade s požiadavkou bodu a).

f) odhad štandardných neistôt kalibračných roztokov  $u(c_i)$ .

Tieto roztoky sa spravidla pripravujú zriedovaním zásobného roztoku (CRM, napr. roztok kovového iónu s deklarovanou hodnotou koncentrácie, štandardnou neistotou a definovanou nadväznosťou,...). Pred prípravou kalibračných roztokov je vhodné najskôr vytvoriť schému zriedovania zásobného roztoku

zásobný roztok (napr. s  $c = 1000 \text{ mg.l}^{-1}$ )

zriedenie  $1:z_1$  (napr. 1:10)

zriedenie  $1:z_2$  (napr. 1:20)

zriedenie  $1:z_3$  (napr. 1:10)

0,5  $c_1$  (0,5  $\text{mg.l}^{-1}$ )

zriedenie  $1:z_4$  (napr. 1:5)

0,1  $c_2$  ..... atď.

Na výpočet neistoty spojennej s každou z koncentrácií  $c_1, c_2, \dots$  je nevyhnutné neistotu v zriedovacom refazci

a tieto neistoty kombinovať s neistotou hodnoty koncentrácie zásobného roztoku. V procese zriedovania sa vyskytujú tri zdroje neistôt – teplota, opakovateľnosť a neistoty objemu odmerných nádob.

Počas zriedovania bude teplota v podstate konštantná, takže vplyv teplotných zmien na jednotlivé zriedovacie stupne neuvažujeme. Avšak výsledná koncentrácia pri teplote kalibrácie odmerných nádob bude ovplyvnená teplotným rozdielom. Neistoty spôsobené opakovateľnosťou sa odhadnú zo smerodajnej odchýlky získanej z opakovaného procesu váženia nominálnych objemov.

Ku získaniu neistôt pre každý zriedovací krok je najjednoduchšie pristupovať ku každému

kroku ako k aplikácii zriedovacieho faktora, tvoreného objemami dvoch odmerných nádob, použitých v každom kroku. Pretože v každom zriedovacom kroku sa vyskytuje neistota spojená s počiatočným a výsledným objemom, zriedovací faktor každého kroku má tiež neistotu spojenú s týmito objemami. Rovnaká neistota zriedovacieho faktora môže byť aplikovaná na rovnaké zriedenie, hoci sa v praxi často stáva, že sa nepoužívajú tie isté odmerné nádoby.

Každý zriedovací faktor možno vypočítať ako pomer

$$f = V_f / V_i \quad (16)$$

kde

$V_f$  je konečný objem

$V_i$  je počiatočný objem

(Teda napr. pre zriedenie 1:20 je odpovedajúci zriedovací faktor  $f = V_{100} / V_5 = 20$ )

Pretože faktor sa počíta ako podiel pre príslušnú neistotu platí:

$$u(f) / f = \{ [ u(V_f) / V_f ]^2 + [ u(V_i) / V_i ]^2 \}^{1/2} \quad (17)$$

čo predstavuje relatívnu neistotu hodnoty funkcie  $f$ .

Ak zriedovací proces vyžaduje vykonať opakované zriedenia, pre koncentráciu takéhoto kalibračného roztoku platí

$$c_i = c_0 / (f_1 \times f_2 \times f_3 \times \dots) \quad (18)$$

výraz obsahuje iba delenie a násobenie, teda neistoty je výhodné vyjadrovať ako relatívne neistoty

$$u(c_i) / c_i = \{ [ u(c_0) / c_0 ]^2 + [ u(f_1) / f_1 ]^2 + [ u(f_2) / f_2 ]^2 + \dots \}^{1/2} \quad (19)$$

V tomto prístupe nie je uvažovaný vplyv laboratórnej teploty (konštantnej) na proces zriedovania. Vplyv možno odhadnúť zo známych koeficientov objemovej rozťažnosti a odchýlky laboratórnej teploty od teploty kalibrácie odmerných nádob.

Stanovenie hodnôt signálov jednotlivých kalibračných roztokov  $x_i$  spolu s ich štandardnými neistotami  $u(x_i)$ .

Výpočet parametrov  $b_i$  matematickej funkcie simulujúcej analytickú funkciu.

Súbor vstupných údajov pre tento výpočet pozostáva z hodnôt koncentrácií kalibračných roztokov, príslušných

štandardných neistôt, hodnôt signálov týchto koncentrácií a ich štandardných neistôt. Parametre sa počítajú zovšeobecnenou metódou minimálnych štvorcov. Princíp metódy je nasledovný:

Pre každý kalibračný bod  $(x_i, c_i)$  sa určí nastavený bod  $(x_i^*, \hat{c}_i)$  tak, aby odpovedajúca suma štvorcov odchýlok, vážená prevrátenou hodnotou štvorcov združených neistôt bola minimálna.

$$S = \sum [ [ | \hat{c}_i - c_i |^2 / u(c_i)^2 ] + [ | x_i^* - x_i |^2 / u(x_i)^2 ] ] = \text{minimum} \quad (20)$$

Podmienkou je aby súradnice  $x_i^*, \hat{c}_i$  nastavených bodov vyhovovali rovnici navrhutej ako analytická funkcia

$$\hat{c}_i = G(x_i^*) \text{ pre } i = 1, 2, \dots, n \quad (21)$$

V prípade lineárnej analytickej funkcie táto podmienka znamená, že tieto nastavené body ležia na priamke. Pri nelineárnom modeli funkcie body ležia na príslušnej krivke.

Vložením podmienky  $\hat{c}_i = G(x_i^*)$  do výrazu pre súčet  $S$ , tento nadobudne tvar:

$$S = \sum [ [ | G(x_i^*) - c_i |^2 / u(c_i)^2 ] + [ | x_i^* - x_i |^2 / u(x_i)^2 ] ] = \text{minimum} \quad (22)$$

Kde analytická funkcia  $G$  závisí od špecifikovaného počtu parametrov  $b_i$ . Problémom je teda súčasne stanoviť optimálne hodnoty parametrov  $b_i$  a súradnice  $\hat{c}_i$  nastavených bodov, tak aby bola suma  $S$  minimálna. Za týmto účelom sa nahradí podmienka  $S = \text{minimum}$  sústavou rovníc pre neznáme parametre  $b_i$  a pre súradnice  $\hat{c}_i$ , takzvanými normálnymi rovnicami.

Podmienkou minima funkcie viacerých premenných je, aby boli prvé derivácie funkcie podľa jednotlivých premenných rovné nule. Takto sú optimálne hodnoty parametrov  $b_i$  a súradnic  $\hat{c}_i$  dané riešením nasledovnej sústavy  $(M+1) + n$  rovníc

$$\partial S / \partial b_k = 0 \quad (k = 0, 1, \dots, M) \quad (23)$$

$$\partial S / \partial \hat{c}_i = 0 \quad (i = 1, 2, \dots, n) \quad (24)$$

Tieto rovnice sa riešia numericky. Procedúra predstavuje iteráciu v dvoch krokoch, v prvom kroku sa počítajú odhady parametrov analytickej funkcie a v druhom kroku nastavené súradnice. Tieto kroky sa striedajú pokiaľ sa nedosiahne konvergencia.

Stanovenie hodnoty signálu (odozvy) analyzovanej látky z niekoľkých opakovaných meraní, spolu s jej štandardnou neistotou, za rovnakých podmienok merania ako pri meraní kalibračných roztokov.

Výpočet obsahu analytu  $c_x = G(x_x)$ , použitím analytickej funkcie stanovenej vyššie uvedeným postupom. Vstupnú hodnotu pre výpočet predstavuje hodnota signálu analytu  $x_x$ .

Výpočet štandardnej neistoty koncentrácie analytu  $u(c_x)$  aplikáciou zákona šírenia sa neistôt

$$u(c_x)^2 = \sum_{k=0}^M (\partial G / \partial x_k)^2 u(x_k)^2 + \sum_{k=0}^M (\partial G / \partial b_k)^2 \text{var}(b_k) + 2 \sum_k \sum_l (\partial G / \partial b_k) (\partial G / \partial b_l) \text{cov}(b_k, b_l) \quad (25)$$

kde  
 $u(c_x)$  je štandardná neistota koncentrácie analytu  
 $u(x_x)$  je štandardná neistota hodnoty signálu  
 $\text{var}(b_k)$  je variancia parametra  $b_k$  analytickej funkcie  
 $\text{cov}(b_k, b_l)$  je kovariancia parametrov  $b_k, b_l$  analytickej funkcie

Vstupné údaje, ktoré sú potrebné pre výpočet hodnoty štandardnej neistoty podľa tohto vzťahu sa získajú nasledovným spôsobom:

- parciálne derivácie sa získajú zderivovaním matematickej funkcie navrhutej ako analytická funkcia
- štandardná neistota hodnoty signálu je určená v kroku i)
- variancie a kovariancie sa získajú podľa nasledovných vzťahov:

$$\text{var}(b_k) = \sum_i (\partial b_k / \partial c_i)^2 \text{var}(c_i) + \sum_j (\partial b_k / \partial x_j)^2 \text{var}(x_j) + 2 \sum_i \sum_j (\partial b_k / \partial c_i) (\partial b_k / \partial c_j) \text{cov}(c_i, c_j) \quad (26)$$

$$\text{cov}(b_k, b_l) = \sum_i (\partial b_k / \partial c_i) (\partial b_l / \partial c_i) \text{var}(c_i) + \sum_i (\partial b_k / \partial x_i) (\partial b_l / \partial x_i) \text{var}(x_i) + \sum_i \sum_j [(\partial b_k / \partial c_i) (\partial b_l / \partial c_j) + (\partial b_l / \partial c_i) (\partial b_k / \partial c_j)] \text{cov}(c_i, c_j) \quad (27)$$

kde  
 $\text{var}(c_i)$  je variancia koncentrácie analytu  
 $\text{var}(x_i)$  je variancia odpovedajúcej odozvy  
 $\text{cov}(c_i, c_j)$  je kovariancia koncentrácií analytu v kalibračných roztokoch  $i, j$

Vstupné údaje pre výpočet parametrov variancií a kovariancií podľa týchto vzťahov sa stanoví nasledovne - príslušné derivácie sa získajú numericky zo vzťahu medzi  $b$  a  $c$ , resp.  $x$ , podľa vyššie uvedeného regresného algoritmu, variancie  $\text{var}(c_i)$ ,  $\text{var}(x_i)$  sú dané štvorcami štandardných neistôt  $u(c_i)^2$ ,  $u(x_i)^2$ .

Vzhľadom na určité nedostatky tejto metódy sú snahy o zdokonalenie metódy najmenších štvorcov [10-13], napríklad využitím neistôt kalibrácie ako váhovej funkcie namiesto pôvodne uvažovaných smerodajných odchýlok, alebo zahrnutím aj derivácií vyšších rádov

Z vyššie uvedeného je však zrejme do akej úrovne sme sa vzdialili od podstaty problému. Okrem výraznej náročnosti pravidelného používania takýchto postupov je zrejme, že každý ďalší krok procedúry vnáša nové a mnohokrát ťažko odhadnuteľné neistoty hodnotenia. V tejto situácii sa maximálne zjednodušenie celej procedúry stáva imperatívom.

V súčasnosti sa za korektný prístup považuje ak sa v prvej fáze na základe analýzy rozptylov získaných z experimentálnych údajov podrobne zhodnotia štandardné neistoty jednotlivých príspevkov a uvedú sa v tabuľke (uncertainty budget). Príspevky, ktoré majú preukázateľne štatisticky nevýrazný vplyv na výslednú hodnotu neistoty možno pri ďalších hodnoteniach zanedbať, čo čiastočne zjednodušuje celú procedúru hodnotenia neistôt v ďalších fázach a umožňuje vytvoriť najúspornejší model. Mnohé z faktorov boli do pôvodného modelu merania zhrnuté napriek tomu, že sa neočakával ich významný vplyv, ale z dôvodu poistenia sa pre prípad ich štatistickej významnosti. Preto je ich eliminácia z pôvodného modelu opodstatnená.

### Biochemická a klinická analýza

V medicínskych laboratóriách predstavuje požiadavka zabezpečenia nadväznosti výsledkov pravdepodobne najdôležitejšiu stratégiu pri dosahovaní štandardizácie. Ako však už bolo uvedené, v tomto procese z objektívnych dôvodov dochádza k značnému odklonu od klasického metrologického prístupu. Keďže úroveň poznania v mnohých prípadoch neumožňuje definovanie skúmaného objektu na úrovni veličiny, je obtiažna exaktná realizácia takéhoto objektu v podobe etalónu a jeho následného medzinárodného porovnania s objektmi podobnej úrovne alebo prenos takto realizovanej hodnoty na objekty kvalitatívne nižšej úrovne. Pochopiteľne súvisí to s náročnosťou požiadavky dokonalej a nespochybniteľnej špecifikácie skúmaného objektu.

V snahe zaviesť vyššiu úroveň takýchto skúšok (meraní) sa pristupuje k substitúcii požiadavky správnosti výsledkov požiadavkou jednotnosti výsledkov. Vytvárajú sa pri tom rozličné schémy, ktorých snahou je čo najlepšie definovanie spôsobu a úrovne hodnotenia jednotlivých objektov skúmania, aby sa tak vytvoril predpoklad pre budúcu transformáciu hodnôt po dosiahnutí vyššej úrovne poznania v danej oblasti. Jednou z takýchto schém je vytvorenie tzv. referenčného systému, založeného na spojení požiadaviek na referenčný postup, referenčný materiál a referenčné laboratórium. Nie je však celkom jasné v tejto oblasti, ktorý medzinárodný orgán alebo agentúra by mali byť zodpovedné za formálnu autorizáciu takýchto referenčných systémov, alebo ich kompetentných materiálov, postupov, či laboratórií.

V snahe o administratívne i organizačné zabezpečenie riešenia tohto problému v roku 2002 po vzájomnej dohode CIPM, IFCC a ILAC založili Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTML) - spoločný výbor na podporu a usmerňovanie medzinárodného uznávania a akceptovania ekvivalencie meraní v medicínskych laboratóriách a nadväznosti ich meraní na vhodné etalóny. Výbor tvorí súčasť štruktúry BIPM a má dve pracovné skupiny - WG1, ktorá zodpovedá za identifikáciu medzinárodne akceptovaných referenčných postupov merania a RM a WG2, zodpovedajúcou za identifikáciu referenčných laboratórií. Obe pracovné skupiny využívajú pri svojej činnosti revízne tímy vy-

braných odborníkov. Oblasť, ktoré doteraz pokrývajú možno rozdeliť na viacero skupín: elektrolyty a krvné plyny, krvné skupiny, počítanie krvných buniek, koagulačný faktor, liečivá, enzýmy, metabolity a substráty, mikrobiologická serológia, kovy netvoriace elektrolyty, nepeptidické hormóny, nukleové kyseliny, proteíny, vitamíny a systémy kvality. Každá z týchto podskupín je riadená vedúcim tímu a má štyroch až osem členov. (viac info: [www.bipm.org/en/committees/jc/jctml](http://www.bipm.org/en/committees/jc/jctml))

Čo sa týka stavu zabezpečenia jednotlivých oblastí referenčného systému, zdá sa, že relatívne najlepšia je situácia v prípade referenčných materiálov. Na trhu je viacero renomovaných výrobcov (IRMM, NIST), a dopĺňujúce užitočné materiály, hoci spravidla na nižšej metrologickej úrovni poskytuje i WHO. Uznatie týchto materiálov je otázkou vzájomnej akceptácie.

Referenčné postupy zahŕňajú požiadavky ako sú napr. v prípade enzýmov: druh substrátu a jeho koncentrácia, aktivátory a ich koncentrácie, smer katalyzovanej reakcie, zložka indikátora, tlmivý systém a hodnota pH, teplota merania, materiál použitý na východiskovú reakciu, čakacia doba, reakčná doba...

Situácia v oblasti autorizácie referenčných postupov a referenčných laboratórií je trochu zložitejšia. Pochopiteľne vzniká tu otázka ako by sa mala implementovať koncepcia nadväznosti. Pokusom o príspevok k riešeniu tohto problému sú medzinárodné dokumenty ISO 17511, ISO 18153, ISO FDIS 15194, ISO 15193, či ISO 15195. Týmito predpismi sa riadia obe pracovné skupiny JCTML.

Prvý z uvedených dokumentov predpokladá, že predanú meranú veličinu je k dispozícii vhodný RM i referenčný postup. Vždy to však nemusí platiť. V skutočnosti sa vyskytuje päť rôznych situácií [14]:

1. RM i referenčný postup existujú a sú schopné zabezpečiť nadväznosť (napr. glukóza, kreatinín)
2. RM i postup sú k dispozícii, ale nie sú schopné zabezpečiť nadväznosť
3. referenčný postup existuje, nie je však dostupný RM (napr. koagulačné faktory)
4. RM existuje, postup nie je uznaný (napr. transferín, imunoglobulíny...)
5. ani RM ani postup nie sú k dispozícii.

V poslednom prípade predstavuje najmenšie zlo kalibrácia kalibrátora pomocou dostupného materiálu príbuzných vlastností.

Stratégia vytvorenia referenčného systému závisí na charaktere analytu.. V prípade nízko molekulových substancií, elektrolytov, organických substrátov a metabolitov ako sú cholesterol, kreatinín alebo steroidné hormóny, ako aj niektoré liečivá je jediným zmysluplným riešením zabezpečiť nadväznosť výsledkov v metrologickom slova zmysle. Medzičlánok spájajúci národné metrologické inštitúcie (vlastníci etalónov, prípadne producenti CRM) a prax predstavujú akreditované medicínske laboratóriá, prípadne referenčné laboratóriá. Tieto laboratóriá musia mať vyvinuté vlastné referenčné postupy. Hoci sú tieto subjekty akreditované, prípadne autorizované,

z medzinárodného hľadiska zostáva otvorenou otázkou „referenčnosť“ ich metód [15].

Skutočnosť, že stanovenie niektorých enzýmov, ako sú kreatín kináza, laktát dehydrogenázy, aspartát aminotransferázy, alanín aminotransferáza, alkalín fosfatáza amyláza... patria medzi najčastejšie požadované testy klinických laboratórií [15] zvyšuje dôležitosť dosahovania správnych výsledkov a tým i zabezpečenie nadväznosti.

Napriek značnému úsiliu v tomto smere vo vzťahu k enzymatickým skúškam stále dochádza k značnému rozptylu vo výsledkoch – od -60 % po +30 % skúšanej hodnoty [16]. Táto otázka sa v procese akreditácie rieši účasťou laboratória na medzilaboratórnych porovnaníach a dosiahnutými výsledkami v nich.

Stratégia zavádzania nadväznosti v prípade mimo sústavových (SI) veličín je odlišná. Týka sa to veľkého množstva analytov, ktorým nemožno jednoznačne definovať molekulovú štruktúru (enzýmy, glykoproteíny, proteohormóny, tumorové markery a kardiakálne markery...). Skôr ako sa môže vytvoriť referenčný systém je potrebné definovať meranú veličinu [17]. Následne definícia meranej veličiny spolu s návrhom referenčného systému by mali byť predmetom rokovania pracovných skupín JCTLM.

Prostredníctvom takto vytvoreného referenčného systému sa odhaduje referenčná hodnota metódy (RMV), pričom hodnoty použitých korekčných faktorov sa odhadujú na základe skúseností referenčného laboratória a ich neistoty sa odhadujú z použitého postupu, prípadne prístrojovej adjustácie. Táto hodnota sa odhadne ako súčin priemernej hodnoty zisťovanej vlastnosti a jednotlivých korekčných faktorov. Napríklad [18]:

$$\text{RMV} = \frac{C_{\lambda} \times C_{\text{absorb}} \times C_{\text{pH}} \times C_{\text{tepl}} \times C_{\text{konc}} \times C_{\text{séria}} \times C_{\text{obj. zlomok}}}{C_{\text{čas}} \times C_{\text{vypar}} \times C_{\text{starnutie}} \times C_{\text{lin}} \times \dots}$$

(28)

Vo väčšine prípadov sú hodnoty jednotlivých korekčných faktorov rovné jednej. Ich neistoty však nemajú nulové hodnoty a pri odhade kombinovanej neistoty je potrebné zahrnúť ich do výpočtu.

Nedostatkom tohto prístupu je, že stavia na vrchol hierarchie nadväznosti nie realizáciu hodnoty veličiny prostredníctvom konkrétneho zariadenia alebo artefaktu, ale tzv. štandardný operačný postup (SOP), ktorý je ovplyvnený kvalitou požitého zariadenia i subjektívnymi faktormi operátora. Je však potrebné si uvedomiť, že idea vzájomného prepojenia metód prostredníctvom aplikácie referenčného systému nepodmieňuje jednoduchú koreláciu medzi metódami pracujúcimi na odlišných princípoch merania [19].

Schopnosť laboratória použiť takýto SOP sa demonštruje prostredníctvom štúdie uskutočniteľnosti na komerčne dostupných kontrolných materiáloch. V procese certifikácie laboratória sa potom výsledky štúdie uskutočniteľnosti prikladajú k výsledkom medzilaboratórnych porovnaní (aspoň 3). Takéto SOP by

mali byť publikované ako referenčné metódy na web stránke BIPM-JCTML.

## ZÁVER

Zabezpečenie metrologickej nadväznosti chemických meraní predstavuje kľúčový problém, riešenie ktorého umožňuje odhady štandardných neistôt výsledkov merania na korektnej báze. V chemických meraniach je v absolútnej väčšine prípadov nadväznosť zabezpečovaná prostredníctvom referenčných materiálov, resp. certifikovaných referenčných materiálov. CRM slúžia na mnohé účely. V súlade s ich určením je potenciálne možné že ten istý materiál sa môže vhodne používať v jednom laboratóriu a nevhodne v inom.

Jedným zo súčasných problémov prevádzkových laboratórií je nedostatočná znalosť využitia a dostupnosti RM. Príliš veľa materiálov je považovaných za „certifikované“, čo naznačuje, že mnohé laboratória exaktne nevedia čo CRM v skutočnosti je a ako sa pripravuje. Preto ako najurgentnejšia sa javí potreba poskytovania informácií. Laboratória by mali byť informované o všetkých dostupných typoch RM, o tom ako ich správne používať, prípadne byť schopní prípravy vo vlastnej réžii sekundárnych RM šitých na mieru vlastných potrieb či požiadaviek na laboratórium..

Nárast množstva predpisov, hlavne z oblasti požiadaviek životného prostredia, zdravotníctva a s ním spojené zabezpečovania kvality, spôsobuje nárast požiadaviek na rôzne druhy RM. V tejto situácii je jasné že existujúci výrobcovia nemôžu pokryť budúce požiadavky i vďaka kráteniu rozpočtov rozpočtových organizácií v prípade niektorých vládnych programov.

V prípade biochemických analýz predstavuje zabezpečenie nadväznosti v mnohých prípadoch problém, ktorý si vyžaduje špeciálne prístupy, veľakrát spojené so zavádzaním konvencií, v mnohých prípadoch zdanlivo nezlučiteľných s fyzikálnym princípom metrologickej nadväznosti. Tieto prístupy sú však podmienené existujúcou úrovňou poznania v danej oblasti a spravidla predstavujú optimálny kompromis, ktorý by mal zabezpečiť bezproblémovú transformáciu získaných hodnôt veličín alebo vlastností po doplnení stavu poznatkov na požadovanú úroveň. Celkovo však platí, že systematickú chybu metódy možno redukovať lepšou kalibráciou tvoriacou súčasť medzinárodne akceptovaných referenčných systémov. Prístup s využitím referenčných systémov môže klinickým laboratóriám a medicínskej komunite poskytnúť do istej miery univerzálny nástroj, ktorý zvyšuje komparabilitu existujúcich pracovných metód alebo podporiť preferenciu jednej metódy pred inou. JCTML, riadiace orgány, profesijné spoločnosti i výrobcovia IVD hrajú pri podpore zabezpečenia nadväznosti kalibrátorov, štandardizácii skúšok i globálnej harmonizácii kľúčovú úlohu. Jednotlivé klinické laboratória sú však zodpovedné za výber vhodných metód schopných demonštrovať metrologickú nadväznosť a dodržanie klinických noriem

navrhovaných guidami laboratórnej medicíny. Mali by tiež nepretržite hodnotiť svoje rutinné metódy a zabezpečiť aby boli schopné produkcie správnych a medicínsky užitočných výsledkov.

Nachádzame sa v džungli informácií. Budujeme svoju cestu za sebou ako postupujeme dopredu.

## LITERATÚRA

- [1] *Vocabulaire international des termes fondamentaux de metrologie (VIM III)*, ISO, Geneva, 2007
- [2] **Steffen B., Kallio H.**: *Traceable Calibration and Uncertainty of Measurements and Tests*, Espoo, Finland, 1994
- [3] **ISO Guide 30**: 1992, Terms and definition used in connection with reference materials
- [4] **ISO Guide 31**: 2000, Reference materials – Contents of certificates and labels
- [5] **ISO Guide 32**: 1997, Calibration in analytical chemistry using certified reference materials
- [6] **ISO Guide 33**: 2000, Uses of certified reference materials
- [7] **ISO Guide 34**: 2000, General requirements for the competence of reference materials producers
- [8] **ISO Guide 35**: 1989, Certification of reference materials – General and statistical Principles
- [9] **Pätoprstý V.**: *Kalibrácia v chémii – aplikácia CRM*, Zborník z konferencie „Referenční materiály a mezilaboratorní porovnávání zkoušek v chemické analýze“, 2 THETA, Medlov, 2003
- [10] **AOAC/ISO/IUPAC. 1993**, the International Harmonised Protocol for the Proficiency testing of (Chemical) Analytical Laboratories
- [11] **Lisý J. M., Cholvadová A., Drobná B.**: *Comput. Chem.* 15, 135 (1990)
- [12] **Lisý J. M., Cholvadová A., Drobná B.**: *Comput. Chem.* 16, 127 (1991)
- [13] **Bremser W., Hässelbarth W.**: *Anal. Chim. Acta* 61, 348 (1997)
- [14] **Armbruster D., Miller R. R.**: *Clin. Biochem. Rev. Vol.* 28, 105, 2007
- [15] **Infusino I., Bonora R., Panteghini M.**: *Clin. Biochem. Rev. Vol.* 28, 155, 2007
- [16] **Órnemark U., Van Nevel L., Smeyers P., Harper C., Taylor P.**: *IMEP-17, EUR 20694EN, Report*, 2007
- [17] **Siekmann L.**: *IVD Technology Magazine*, Jan.. 2001, p.41
- [18] **Schumann G.**: *VII. Czech National Congress of Clinical Biochemistry*, Olomouc, 2005
- [19] **Jansen R., Schumann G., Baadenhuijsen H., Franck P., Kruse R., Kuypers A.**: *Clin. Chim. Acta* 368, 160, 2006



---

## GRAPHICAL INTERPRETATION OF CONFIDENCE CURVES IN RANKIT PLOTS

---

PER HYLTOFT PETERSEN<sup>1,2,\*</sup>, OLE BLAABJERG<sup>1</sup>,  
MARIANNE ANDERSEN<sup>3</sup>, LONE G. M. JØRGENSEN<sup>4</sup>,  
KAROLINE SCHOUSBOE<sup>5</sup> AND ESTHER JENSEN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Biochemistry

Odense University Hospital, Odense, Denmark

<sup>2</sup>NOKLUS, Norwegian centre for external quality assurance  
of primary care laboratories, Division for General Practice,  
University of Bergen, Norway

<sup>3</sup>Department of Endocrinology, Odense University Hospital,  
Odense, Denmark

<sup>4</sup>Department of Clinical Biochemistry

Vejle County Hospital, Vejle, Denmark

<sup>5</sup>The Danish Twin Register

University of Southern Denmark, Odense, Denmark

### ABSTRACT

A well-known transformation from the bell-shaped Gaussian (normal) curve to a straight line in the rankit plot is investigated, and a tool for evaluation of the distribution of reference groups is presented. It is based on the confidence intervals for percentiles of the calculated Gaussian distribution and the percentage of cumulative points exceeding these limits.

The process is to rank the reference values and plot the cumulative frequency points in a rankit plot with a logarithmic (lnslope) transformed abscissa. If the distribution is close to ln-Gaussian the cumulative frequency points will fit to the straight line describing the calculated ln-Gaussian distribution. The quality of the fit is evaluated by adding confidence intervals (CI) to each point on the line and calculating the percentage of points outside the hyperbola-like CI-curves.

The assumption was that the 95% confidence curves for percentiles would show 5% of points outside these limits. However, computer simulations disclosed that approximate 10% of the series would have 5% or more points outside the limits.

This is a conservative validation, which is more demanding than the Kolmogorov-Smirnov test. The graphical presentation, however, makes it easy to disclose deviations from ln-Gaussianity, and to make other interpretations of the distributions, e.g., comparison to

non-Gaussian distributions in the same plot, where the cumulative frequency percentage can be read from the ordinate. A long list of examples of

ln-Gaussian distributions of subgroups of reference values from healthy individuals is presented. In addition, distributions of values from well-defined diseased individuals may show up as ln-Gaussian.

It is evident from the examples that the rankit transformation and simple graphical evaluation for non-Gaussianity is a useful tool for the description of sub-groups.

**Keywords:** confidence intervals; logarithmic Gaussian distributions; rankit transformation; reference intervals.

### INTRODUCTION

Parametric and non-parametric methods used for estimation of reference intervals have been discussed for many years. When the IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) made recommendations for estimation of reference intervals in the late eighties, both methods were described (1). The choice of model is highly influenced by the scientists' statistical background and the purpose of the investigation.

Thus, scientists with interests in computer simulations and bootstrap re-sampling of data (2), or with large sample sizes of reference individuals for many quantities, prefer the non-parametric estimation of reference intervals (3, 4). However, investigators looking for methods to decide on partitioning into subgroups (5–10), prediction of extreme percentiles (10, 11), description of distributions as function of time, e.g., after a glucose tolerance test (12), and estimation of analytical quality specifications (13–20) need to use parametric statistics to perform their prediction and validation.

In relation to the parametric treatment of reference individual data, the question of validity of the parametric application has been answered by performance of different tests of significance, such as that for like skewness and kurtosis, and the Kolmogorov-Smirnov and Anderson-Darling tests (1). A special graphical test, based on probit/rankit transformation, is widely described in textbooks on statistics (21–23), but is not commonly used in the description of reference intervals in scientific reports. However, in contrast to the tests for significance, this graphical evaluation gives a clear visual description of the whole population under investigation, and this transformation of reference data has successfully been applied in some publications (5, 8–20, 24, 25).

The question of validation of the probit/rankit model, when applied to reference values, was previously outlined by Hald in 1952 (21). However, it has not been formalised in the same way as the significance tests for goodness of fit such as those tests for skewness and kurtosis, as

---

\*Corresponding author:

Per Hyltoft Petersen, Department  
of Clinical Biochemistry, Odense University Hospital, 5000  
Odense C, Denmark

Phone: +45 65 41 28 36, Fax: +45 65 41 19 11,

E-mail: per.hyltoft.Petersen@ouh.fyns-amt.dk

well as the Anderson-Darling and Kolmogorov-Smirnov tests (1). Therefore, the aim of this investigation is to re-introduce Hald's evaluation (21) and to relate the parametric descriptions to interpretation of distributions and sub-distributions of reference values.

## THEORY

### Description of the transformation

The Gauss distribution is defined by the equation

$$f(x) = (\sigma^2 \cdot 2\pi)^{-1/2} \cdot e^{-1/2[(x-\mu)/\sigma]^2}$$

where  $x$  is the variable, and  $m$  and  $s$  are the parameters, mean and standard deviation, respectively. This describes the frequency distribution or probability density distribution, illustrated in Figure 1A, where the abscissa denotes the variable after normalisation, i. e., standardised deviation from the mean,  $X = (x - \mu) / \sigma$ , and thus corresponds to the well-known  $z$ -statistics (21, 23).

By summation of the function from  $-\infty$ , the fraction of the total area of the bell-shaped curve, the cumulated frequency function, describes an S-shaped curve as illustrated in Figure 1B, where the values for  $X$  of  $-1.96$ ,  $0$ , and  $1.96$  correspond to the well-known fractions of  $0.025$ ,  $0.50$ , and  $0.975$ , respectively.

The standardised (normalised) variable  $(x - \mu) / \sigma$  can be written as  $x / \sigma - \mu / \sigma$ , and thus the formula can be written as  $y = x / \sigma - \mu / \sigma$ ; the equation for a straight line. The  $y$  is called Rankit (or (Probit -5), as Probit originally was defined as the normalised variable to avoid negative values) and thus describes a straight line in a rankit plot, as illustrated in Figure 1C. In this Figure, it is seen that the fractions of the area, or cumulated frequency, has been changed and now have values of  $0.00$  at  $-\infty$  and  $1$  at  $\infty$  which cannot be described in the plot. However, the ordinate for cumulated frequency has the value  $0.50$  at the rankit  $= 0$ , and the fractions are "diluted" from this central value, e.g., with  $0.025$  at rankit  $= -1.96$ . Thus, the bell-shaped Gaussian curve is described as a straight line in the rankit plot. The transformation from fractions to rankit values can be performed in spreadsheet programs such as QuattroPro and Excel using the commands @NORMSINV(fraction) and NORMINV (fraction;  $\mu$ ;  $\sigma$ ), respectively. In QuattroPro the value is normalised, whereas in Excel, the mean and standard deviation should be used,  $0$  and  $1$ .

The inverse function, plotting cumulative frequency data from a reference population in a rankit plot in order to disclose whether the cumulative data describes a straight line, is illustrated in Figure 2A. This example uses simulated values from randomly selected values from a Gaussian distribution (25 random values from a Gaussian distribution with mean = 100 and standard deviation = 8). The process is to rank the reference values and calculate the cumulative fractions. The IFCC recommends computing the cumulative fraction from the rank number, i. e., as the fraction,  $p_i = i / (N + 1)$ ,

where  $N$  is the total number of reference values (1). Altman (23) defines the fraction  $p_i = (i - 3/8) / (N + 1/4)$ , and Linnet (2) as  $p(i) = (i - 0.5) / N$ .

Of these, Altman and Linnet's formulas are better suited to describe the low and high cumulated fractions.

Linnet's formula is considered the best and used in this paper. Thus the rankits are calculated from  $R = @NORMSINV(p_i)$  or  $R = NORMINV(p_i; \mu; \sigma)$ .

The cumulated fractions in Figure 2A appear to fit a straight line, and the best description of such a line is based on the estimated Gaussian parameters  $m$  and  $s$ . By selecting two values of the rankit,  $R$ , e.g.,  $-2.5$  and  $2.5$ , these values can be used to calculate the corresponding  $x$ -values from  $x = \mu + R \cdot \sigma$ , where  $\mu = 99.3$  and  $\sigma = 8.2$ , which give  $79.0$  and  $119.7$ .

### Confidence intervals

The confidence intervals for the percentiles of a Gaussian distribution are defined as

$$CI = \mu + z_1 \cdot \sigma \pm z_2 \cdot SE$$

where  $z_1$  and  $z_2$  are the  $z$ -statistics for a Gaussian distribution depending on the chosen probability.  $z_1$  is used as a variable, and  $R = \mu + z_1 \cdot \sigma$  describes the straight line (the Gaussian distribution) in Figure 2B.  $z_2$  is the  $z$ -statistic denoting the chosen probability for the confidence interval, e.g.,  $1.96$  for a 95 % confidence interval (95 % CI) and  $SE$  is the standard error defined as

$$SE = [\sigma^2 / n + (z_1 \cdot s)^2 / 2n]^{1/2}$$

which equals the  $SE$  of a mean for  $z_1 = 0$ , and increases for higher numerical values of  $z_1$ . Occasionally the denominator,  $2n$ , is formulated as  $(2n + 1/2)$ , but this is only applicable for very low values of  $n$ .

In Figure 2C, the 90 % CI ( $z_2 = 1.64$ ) for  $R$ -values from  $-2.5$  to  $2.5$  are shown as continuous curves, like hyperbolas, around the cumulated curve.

### Goodness of the fit

Altman (23) says that "departures of the sample data from normality are thus easily seen as departures from a straight line". This is true, but some scientists do not rely on visual inspection. Thus, Hald's assessment (21) is that the points of the cumulated curve "must be expected to fall within the confidence interval on about 95 % of occasions (when 95 % limits are used)". Hald also points to the extreme values (near to 0 and 100 %) where the deviation of points from the theoretical line are larger. Further, he points to the fact that the points "are not stochastically independent, each cumulative frequency depending on the preceding value" (see Appendix).

The criterion therefore is that only 5 % of the cumulative frequency points are allowed outside the 95 % CI-limits (or 10 % outside the 90 % CI-limits). Using

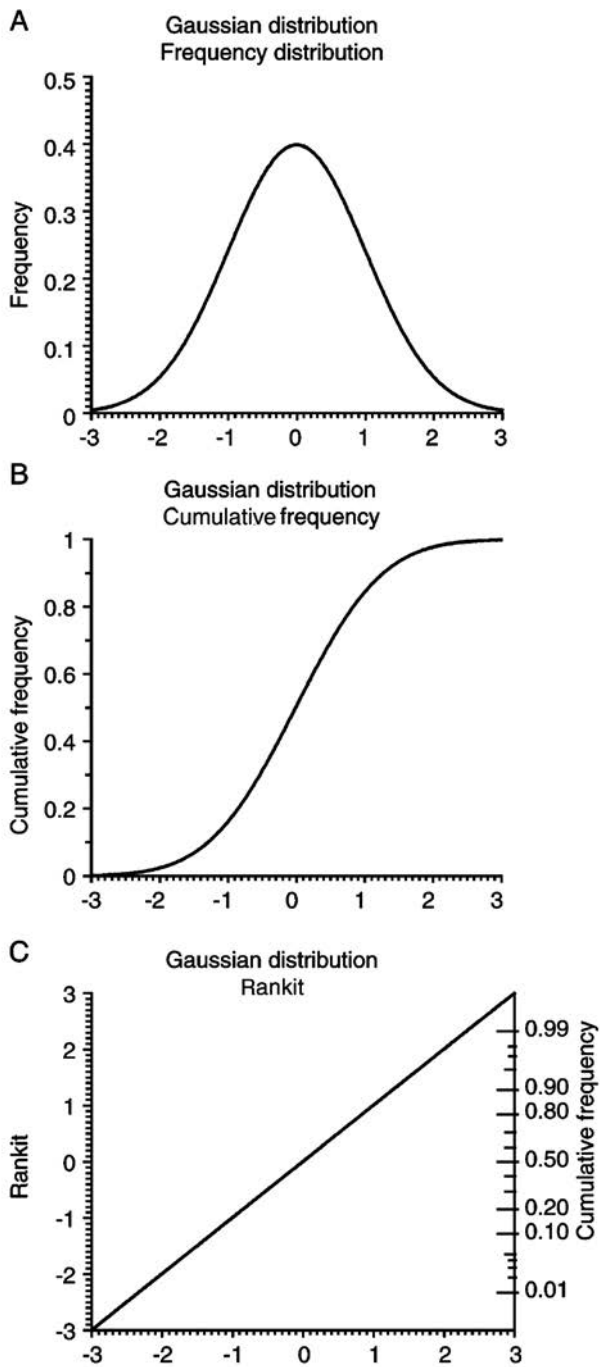


Figure 1. Transformation of the bell-shaped Gaussian distribution to a straight line in a rankit plot. A. Plot of Gaussian frequency distribution as function of the normalised standard deviate. B. Cumulative frequency of the Gaussian distribution where the accumulation starts from  $-\infty$ , resulting in an S-shaped curve. C. Transformation of the cumulative frequency, resulting in a straight line, which thus describes the cumulative bell-shaped curve.

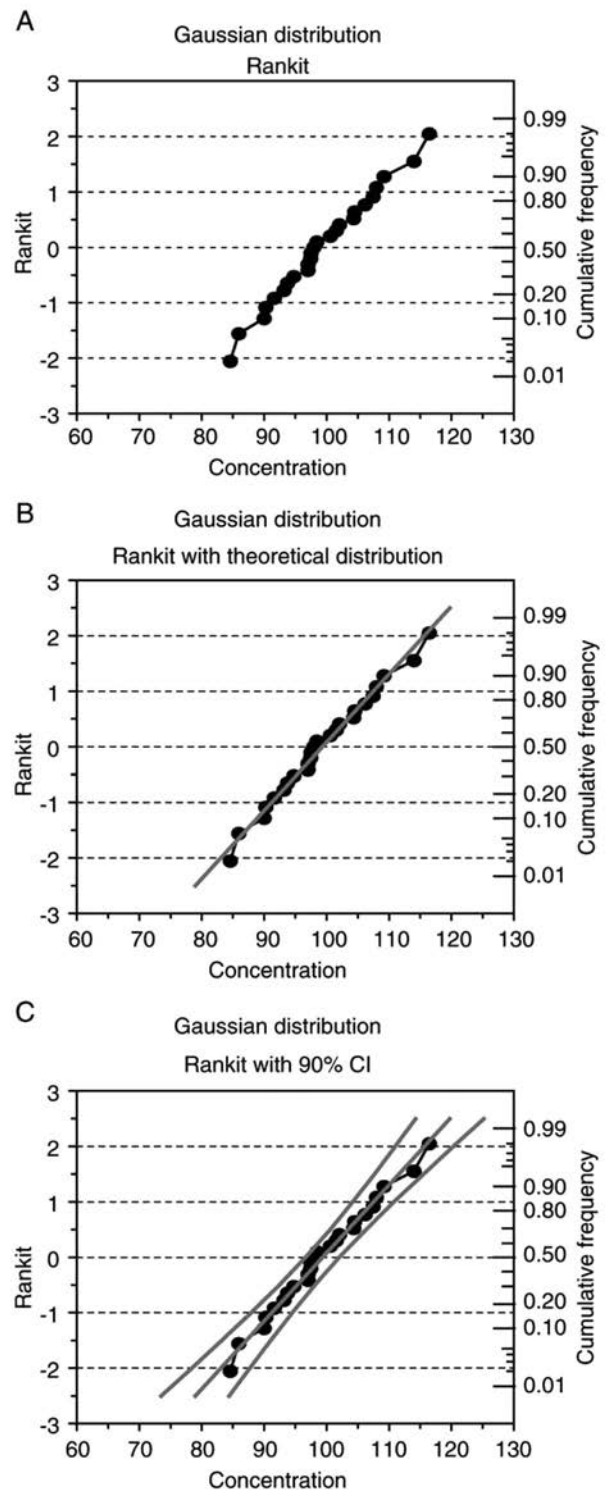


Figure 2. Accumulation of 25 Gaussian distributed random numbers after ranking. The simulation was based on mean,  $\mu=100$  and standard deviation,  $\sigma=8$ , and the corresponding estimates are 99.3 and 8.2, respectively. A. Cumulative frequency of the 25 values in a rankit plot. B. Same with the line for the parametric distribution, based on the estimated values for  $m$  and  $s$  drawn. The cumulative points fit appropriately to the straight line. C. Same as B, but with 95% confidence intervals for the fractiles (cumulative frequency). All the points are within the area between confidence curves.

this procedure, we may miss some distributions that might be acceptable, as seen from the simulation in the Appendix. We are, however, convinced by the acceptability of the parametric description, when no points are outside the CI-limits. This is exemplified in Figure 2C where no points are outside the CI-limits.

The principle holds true, also for summation over intervals, but the fewpoints (usually -20) mean that no cumulative points exceed the CI-limits

### Comparison to the Kolmogorov-Smirnov test

It is difficult to compare this test to the tests of skewness and kurtosis, as well as Anderson-Darling. These tests summarise all the information from the distribution in overall estimates. The Kolmogorov-Smirnov test, however, is also a test of each cumulative frequency.

A graphical comparison between the two validations is shown in Figure 3, where the continuous limits for the Kolmogorov-Smirnov test are drawn together with the confidence limits; Kolmogoro-Smirnov for a significance limit of 0.05 and the confidence interval for 95 % CI. Around the 0.50 cumulative frequency, the limits are very close, whereas the Kolmogorov-Smirnov test allows for much larger deviations in the low and high regions.

The 95 % CI evaluation in a rankit plot is a visual inspection of a distribution, from which the type of deviation from Gaussianity is easily demonstrated. However, it is very demanding if used as a test (see Appendix).

### Logarithmic transformation

Often, a biological distribution is not Gaussian, but the logarithmic values are Gaussian distributed. The log-transformation can be performed with the base 10 or e, but the loge-transformation (ln transformation) has

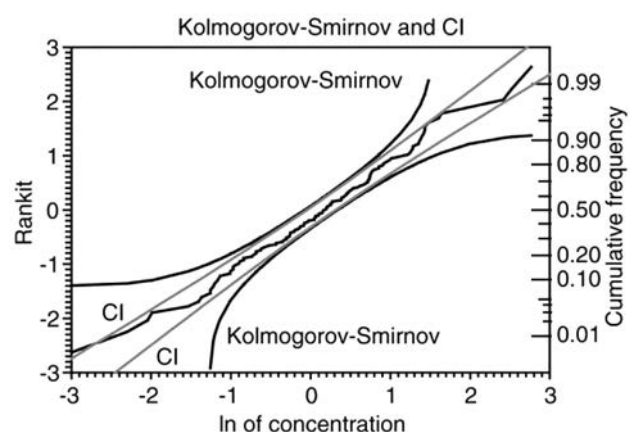


Figure 3. Comparison between the 95 % CI evaluation and Kolmogorov-Smirnov test, for the same Gaussian cumulative frequency. The two sets of curves are very close for values around 0.50, but the CI-evaluation is much more narrow in the tails, and thereby more demanding

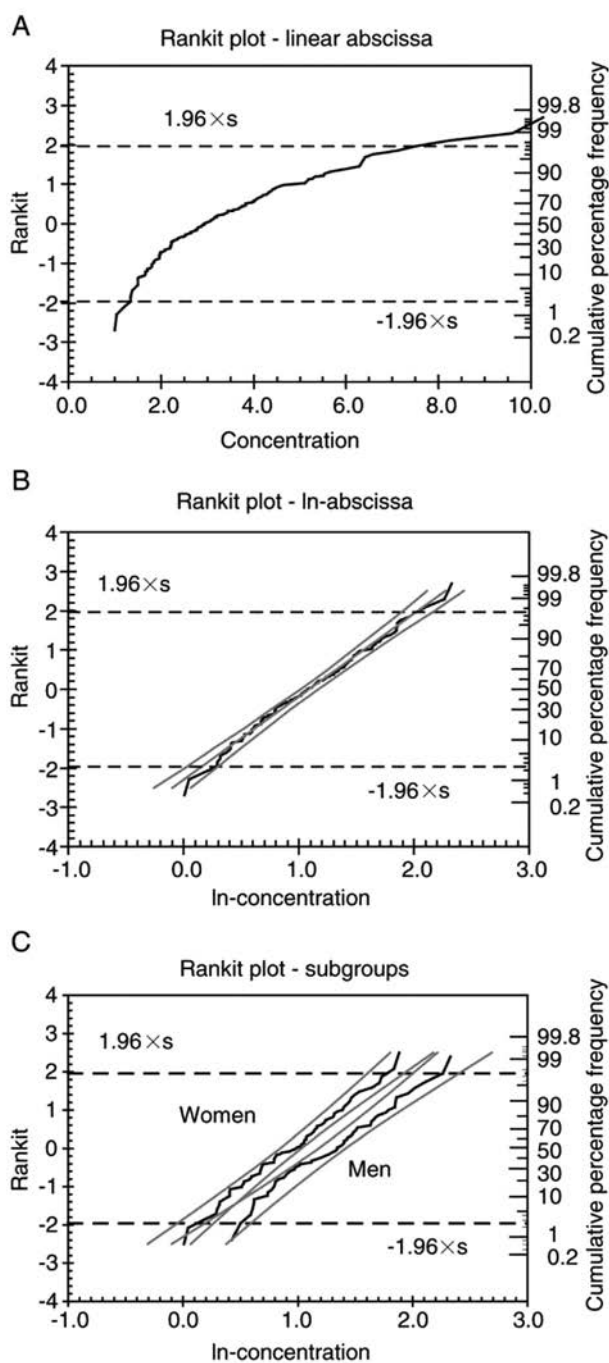


Figure 4. In-transformation and partitioning. A. A logarithmic Gaussian distribution shown in a rankit plot with simple abscissa. The curve is far from a straight line. B. Same data as in A after ln-transformation. The cumulative frequency now fits to the estimated ideal ln-Gaussian distribution, as also indicated by the course between the 95 % CI limits. C. Partitioning into subgroups (illustrated as men and women) of the values in B.

the advantage that the standard deviation of ln values is the best estimate of the coefficient of variation of the original values (20).

When the distribution is ln-Gaussian, the cumulated frequency will show up as a curve in a rankit plot with

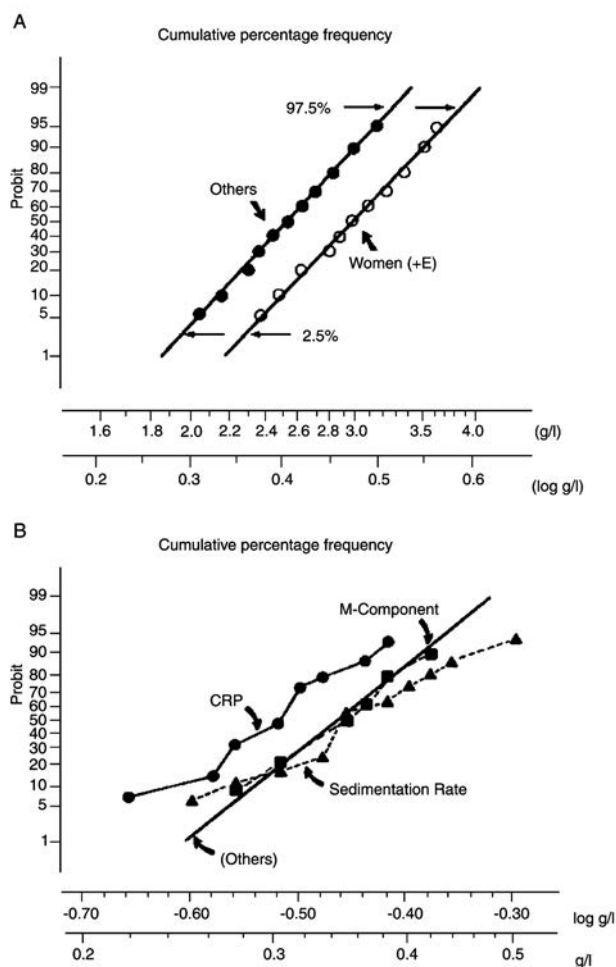


Figure 5. Figures from the Nordic protein project. A. Cumulative frequencies of serum transferrin (in intervals) of reference values for women using oestrogens (E) and the remainder of the reference population. The distributions show up as straight parallel lines. From "Reference Intervals for Plasma Proteins. Principles for Estimation of Reference Intervals" by Hyltoft Petersen and Blaabjerg from *Upsala J Med Sci* 1994; 99:3 07–13 (8) with permission. B. Cumulative frequencies of serum prealbumin for values from individuals ruled out according to criteria on high serum CRP values, elevated sedimentation rate, and presence of M-components. The cumulative frequencies for these discharged groups are compared to the reference distribution. It is evident, that the individuals with high CRP values present a distribution with lower serum prealbumin concentrations. From "Reference Intervals Based on a Danish Population" by Blaabjerg et al. from *Upsala J Med Sci* 1994; 99: 315–38 with permission (9).

linear abscissa, as illustrated in Figure 4A. When the curve has this shape, it is most probably a ln-Gaussian distribution, and the values should be transformed before the process is repeated with the ln-values as illustrated in Figure 4B. Other transformations may be tested, but for biological distributions, the ln-transformation is most relevant.

Moreover, a two-step transformation may result in erroneous estimates (26).

### Subgroups and comparison of groups

When distributions are heterogeneous, they may still show up as ln-Gaussian (or Gaussian), but will often have another shape than a straight line in the rankit plot. All reference values should be separated into subgroups according to relevant criteria before plotting in rankit plots, as heterogeneity will often result in a poor fit to a straight line. Thus, when a distribution deviates from ln-Gauss (or Gauss), there is reason to attempt further division into subgroups. Figure 4C illustrates two subgroups, separated according to gender, that when combined, resulted in the ln-Gaussian distribution seen in Figure 4B. In this example all three groups show up as straight lines. However, if straight lines were not observed, further subdivision should be taken into consideration. In principle, the combined distribution cannot be ln-Gaussian when both subgroups are. However, this cannot always be detected due to the size of confidence intervals.

According to Lahti et al. (7), partitioning according to subgroups should always be done when the difference between the reference limits between subgroups exceeds 0.75 times the smaller standard deviation, either for the difference between the lower limits or for the upper limits. In this example, the lower limits deviate by 0.67 s and the upper limits by 1.04 s, so with the difference between upper limits exceeding the test value, partitioning should be performed.

### EXAMPLES (parametric descriptions)

#### Example 1: Serum transferrin and effect of oestrogens

In a Nordic project on common reference intervals for plasma proteins, more than 500 reference values were produced, and the cumulative percentage frequencies plotted in probit-plots (same type as rankit, see above). In Figure 5A (8) the distributions for serum transferrin are shown for women taking oestrogens and the rest of the reference individuals.

The Figure indicates that there is no heterogeneity according to age and gender. Both distributions of cumulative frequencies of log-values show up as straight lines. Moreover, the two lines are parallel which indicates a rather uniform proportional effect of oestrogens. The cumulative values are based on accumulation over intervals (as in histograms), therefore, the number of points are fewer.

#### Example 2: Serum prealbumin and the effect of ruleout criteria

In another evaluation (9) of the same project on common reference intervals (see ref. (8)), the distributions of discharged values according to rule-out criteria, including C-reactive protein (CRP) 10 mg/l, elevated sedimentation rate and presence of M-components, were compared to the accepted reference values. In Figure 5B, the straight line denotes the distribution

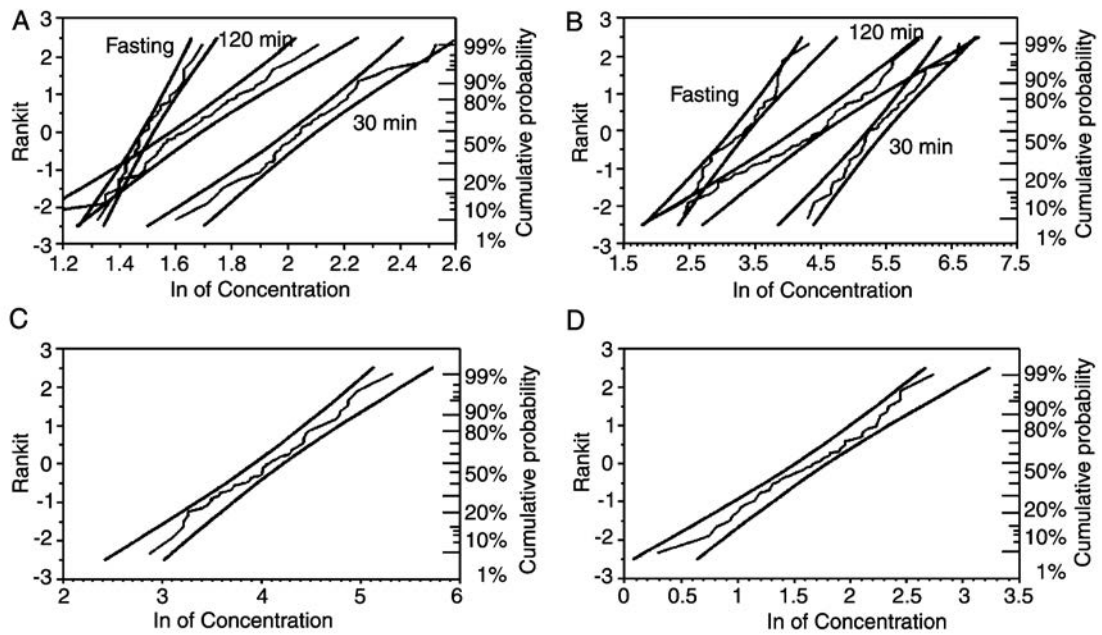


Figure 6. Data for blood glucose (A), serum insulin (B), calculated “insulin secretion” during the test (C) and “insulin sensitivity” (D) during oral glucose tolerance test performed on healthy individuals. The data are shown in rankit plots with ln-concentrations as abscissa, and for all distributions, the cumulative frequencies are within the curves for 95% confidence limits. From “Reproducibility of S-insulin and B-glucose responses in two identical oral glucose tolerance tests” by Schousboe et al. from *Scand J Clin Lab Invest* 2002; 62: 623–30 with permission of Taylor & Francis AS (12).

of all results of serum prealbumin, except from young women not taking oestrogens, and, in addition, the cumulated frequency distributions of the three discharged subgroups are shown. It is clear from the Figure, that individuals with high CRP values have lower concentrations of serum prealbumin and thus are different

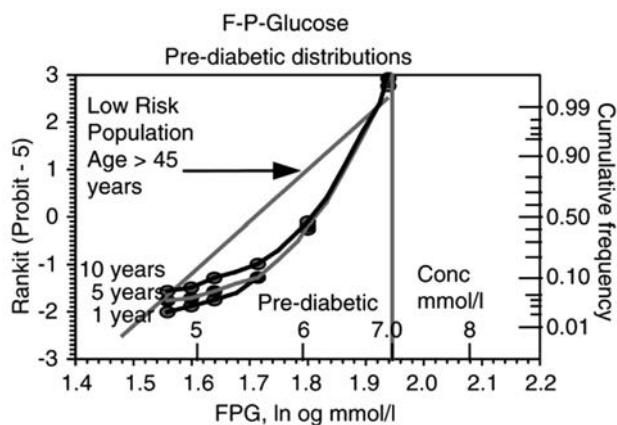


Figure 7. Distributions of prediabetic FPG concentrations 1, 5 and 10 years before diagnosis, presented as cumulative frequencies in a rankit plot with ln-abscissa (data from Dinneen et al. (27)). These non-Gaussian data are compared to the parametric distribution of low-risk reference individuals (data from Jørgensen et al. (10)). For all pre-diabetic distributions, more than half of the values are between 6 and 7 mmol/l.

from the accepted reference group. On the contrary, an increased sedimentation rate and the presence of Mcomponents have no effect. Although there are only 10 to 15 individuals in each subgroup, the information is convincing.

### Example 3: Effects of oral glucose tolerance tests

In an investigation of oral glucose tolerance tests (12), concentrations of capillary blood glucose and serum insulin were measured from fasting individuals before performance of the tolerance test, and 30 and 120 min after receiving glucose. In addition, two derived variables were calculated, “insulin secretion” and “insulin sensitivity”. The cumulative frequency curves for ln-values are shown in Figure 6. It is clear that all curves are within the 95% CI with the exception of some single points for some of the curves. These results are fully in accordance with ln-Gaussian distributions.

### Example 4: Distributions of pre-diabetic patients In

Figure 7, results from two different investigations are shown. The rankit plot shows ln-concentrations of fasting plasma glucose (FPG), and the diagnostic decision limit of 7.0 mmol/l is indicated by the vertical line. The three crooked curves illustrate distributions of FPG, 1, 5 and 10 years before the patients were diagnosed as diabetic due to a FPG value above 7.0 mmol/l, as determined from the curves in the publication from Dinneen et al. (27). These curves are not close to be-

ing linear, but they still provide significant amounts of information. Thus, it is clear that more than half of the newly diagnosed diabetics have FPG values between 6.0 and 7.0 mmol/l, and the distributions are similar 1 to 10 years before the diagnosis.

Further, the line for distribution of reference individuals representing the low-risk population for diabetes (10) is indicated. The Figure supplies a lot of information, which could not be easily obtained using any other presentation form.

## DISCUSSION

The two strategies, which have been outlined in the description of reference values are transformation to Gaussianity and separation into subgroups (1, 28). Boyd and Lacher (29) introduced a multi-stage Gaussian transformation algorithm, which was discharged (together with other transformation models) by Miller et al. (30). The material on which this conclusion was made, however, was not homogeneous, as the creatine kinase (CK) values were determined by two different methods. One CK method was transferred to the other, and CK values vary with physical activity; the latter concern was not described and partition criteria not applied in the investigation. Therefore, the conclusion is questionable.

The present contribution points to the sorting of reference values into as many relevant subgroups as possible, which will often lead to appropriate In-Gaussian distributions with parallel lines in the rankit plot. The distributions can be further investigated for the appropriateness of partitioning, according to Lahti et al. (7). If partitioning is not relevant, such as when genotypes are unknown or further subgrouping is impossible, the reference intervals must be calculated using non-parametric methods (1).

In this paper, we have presented a tool for better revealing lack of homogeneity of reference values, which should lead to further partitioning into subgroups. We have demonstrated a few examples of such processes, but there are many other examples. The examples from the Nordic project on common reference intervals for plasma proteins (8, 9) have In-Gaussian distributions for subgroups of the following proteins: albumin, prealbumin, orosomucoid, transferrin (Figure 5A), immunoglobulin A (IgA), IgG and IgM. However,  $\alpha$ 1-antitrypsin had to be separated into MZ, MS and MM genotypes to show In-Gaussian distributions, and haptoglobin had another distribution, probably due to subtypes, which was not investigated in the project.

Jørgensen et al. (10) investigated the distribution of FPG values in individuals selected according to social security number. The aggregate population was clearly not homogeneous, but after eliminating values from individuals at risk for diabetes and individuals with high values of HbA1c, the distribution turned out to be

appropriate In-Gaussian. Even the subgroups classified according to gender, age and body mass index clearly showed In-Gaussian distributions. In the same reference individuals investigated for HbA1c, Jørgensen et al. (11) found that the distribution of reference values was so narrow, that it was difficult to determine whether the distribution was logarithmic; 0.5% of the lowest values fell outside the confidence limits in both plots, but this was without interest for the interpretation, which was concentrated on the highest values.

Blood glucose and serum insulin showed In-Gaussian distributions, even during the oral glucose tolerance test. In addition, derived variables followed In-Gaussian distributions (Figure 6) (12). The same type of distribution was also seen for serum concentrations of growth hormone (24) and for serum lactate dehydrogenase isoenzyme-1 in a reference group of men who underwent surgical exploration of a testicle due to suspicion of malignancy, but without neoplasia (20). Further, serum concentrations of soluble CD 163, a surface protein on macrophages, behaved In-Gaussian (25), but not FPG in pregnant women, where a moderate heterogeneity was disclosed, but not explained (31).

Often, the measured concentrations of diseased groups are best described as In-Gaussian distributions. This is demonstrated for blood thyroid-stimulating hormone (TSH) concentrations in newborns with congenital hypothyroidism (13), for serum CK-BB (14) and serum myoglobin (15) in patients with acute myocardial infarction, and for serum transferrin and serum ferritin in patients with haemochromatosis (18) in rankit plots. Of these In-Gaussian distributions, confidence intervals were further applied to FPG (10) and HbA1c (11), to blood glucose and serum insulin, and derived values obtained during oral glucose tolerance test (12), to serum lactate dehydrogenase isoenzyme-1 (20), to serum concentrations of growth hormone (24) and to serum concentrations of soluble CD 163 (25). All these examples support the assumption that homogeneous groups of reference values are distributed In-Gaussian after partitioning into relevant sub-groups according to relevant criteria. In the simple evaluation, the probability of obtaining a point outside the 95 % CI could be expected to be 5 %, if the points were independent, but they are not. A cumulative value outside the limit will enhance the probability for the next point being outside to the same side. Thus, the simulations in the Appendix show that approximately 10 % of series generated randomly from a Gaussian distribution have 5 % or more points outside the 95 % confidence curves. The simulations further show that this confidence-evaluation is more demanding than the Kolmogorov-Smirnov and Anderson-Darling tests.

The evaluation seems reasonable for rankit plots where all cumulative values are presented as long as the sample size is between 50 and 150. Accumulation of values over intervals results in fewer points. Thus, it is not safe to accept points outside the 95 % CI limits.

On the other hand, large sample sizes result in narrow confidence intervals, which may disclose minor deviations from the ideal distribution. A method to make the evaluation for large samples more equal would be to apply the 95 % confidence limits for  $N = 120$  also for larger sample sizes.

The advantage of this graphical evaluation is that the whole distribution is demonstrated. Therefore, deviations from linearity are clearly shown and it may be determined whether the deviation influences parameters such as the estimated reference interval, clinical decision making, or the clinical problem itself. This is in contrast to the generally applied tests, such as those for skewness, kurtosis, and the Kolmogorov-Smirnov and Anderson-Darling tests, where all the information is reduced to a single test value. A further advantage is that non-Gaussian distributions can be presented in the same rankit plot as the parametric one, thereby disclosing the differences as seen in Figure 7 where the FPG distributions of pre-diabetic individuals clearly deviate from the low-risk population. Moreover, in this plot, it is possible to ascertain from the pre-diabetic curves that more than half of the new diabetics had FPG values between 6 and 7 mmol/l 1 year and 10 years before, and that less than 5 % of patients with concentrations below 5 mmol/l developed diabetes.

From the examples, it seems reasonable to assume that most distributions of reference values can be divided into subgroups, which are ln-Gaussian distributed, when relevant partitioning criteria are applied. When not ln-Gaussian, the most probable explanation is that the subgroup is still heterogeneous. In this type of scenario the rankit plot with confidence curves is a powerful tool. A further advantage of the rankit plot is that several distributions can be easily compared in the same plot.

#### Appendix: Comparison of confidence curves to Kolmogorov-Smirnov and Anderson-Darling tests

Using the Microsoft Excel programme, random Gaussian distributed values were generated in a series of 100 values. A total of 500 series of distributions (= 50,000 single values) were generated. For each series, the arithmetic mean and standard deviation was calculated together with the functions for 95 % confidence (CI) intervals for percentiles; the simulated values were ranked and the value for each accumulation of the frequency distribution was compared to the corresponding CI-limits. This is illustrated in the Appendix Figure 8. The percentages of points exceeding the CI-limits were calculated, and further the percentages of series with five or more points exceeding the CI-limits were calculated.

In addition, the Kolmogorow-Smirnov and Anderson-Darling tests were performed for each series as well, and the percentages of tests considered significant at the 5 % level were calculated (Appendix Table 1).

The result of simulations are that about 2.5 % (values

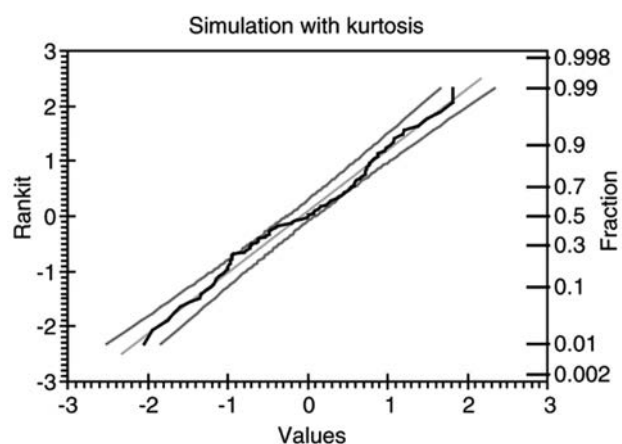


Figure 8. Illustration of a series of 100 simulated Gaussian distributed values, where the Anderson-Darling test is positive, but there is less than 5 % points outside the 95 % CI-limits.

Table 1. Comparison between percentage outside the 95 % CI-limits and Kolmogorov-Smirnov and Anderson-Darling. Percentage of 500 simulations of 100 Gaussian distributed values

	Estimated percentage
Limits corresponding to 5 % outside (95 % CI)	
CI-percentage of all*	2.7 %
Limits corresponding to 5 % outside (95 % CI)	
CI-percentages of distributions with 5 % or more outside**	11.0 %
Traditional tests Kolmogorov-Smirnov 5 % level of significance	3.6 %
Anderson-Darling 5 % level of significance	6.0 %
Comparison: CI to Kolmogorov-Smirnov	
CI 5 %s1 and KSs1***	3.2 %
CI 5 %s1 and KSs0***	7.8 %
CI 5 %s0 and KSs1***	0.4 %
Comparison: CI to Anderson-Darling	
CI 5 %s1 and ADs1***	5.4 %
CI 5 %s1 and ADs0***	5.6 %
CI 5 %s0 and ADs1***	0.6 %

\* – Percentage single values of all 50,000 values outside the 95 % CI-limits. \*\* – Percentage series with more than 5 % of values outside the 95 % CI-limits. \*\*\* – 1 means more than 5 % of values outside the 95 % CI-limits or significant test. The percentage of series with the combination of 1 and 1, 1 and 0, and 0 and 1

2.7 %) of single values are outside the 95 % CI. This is only half of that expected from the 95 % interval and must be related to the fact that cumulative points are interrelated. Thus, when a value is outside one side, there is not a free probability for the neighbour-point to be outside the limits, as the probability for exceed-



ing the same limit is higher and the probability for exceeding the opposite limit is much lower.

The percentage of series with more than 5 % points outside the 95 % CI-limits is about 10 % (value = 11 %), which is approximately double that expected from the 95 % interval. The explanation seems to be of same origin as for the single points, but with another effect.

For comparison, both the Kolmogorov-Smirnov and Anderson-Darling tests are shown for a 5 % confidence level. Kolmogorov-Smirnov shows approximately 3.5 % (3.6 %) and Anderson-Darling approximately 5 % (6 %) of significant values, respectively, for the same simulations as for the 95 % CI-limits. The low percentage for Kolmogorow-Smirnov is in accordance with the expectations from Figure 3.

The Table also shows the percentage agreement, i.e., both tests positive for the same simulations, and disagreement (as illustrated with 1 for positive test and 0 for negative test). As expected from the first results, there is an excess of 95 % CI and a deficit for Kolmogorov-Smirnov test. In about 0.5 % of cases, Kolmogorov-Smirnov (0.4 %) and Anderson-Darling (0.6 %) are positive and the 95 % CI-limits negative. This is illustrated in Appendix Figure 8 for a situation where there is a moderate kurtosis.

The conclusion is that the evaluation of more than 5 % of points exceeding the 95 % confidence limits is a stronger test for deviations from Gaussian distribution than Anderson-Darling and definitely than Kolmogorov-Smirnov.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This article, written by Per Hyltoft Petersen (NOK-LUS, Norwegian centre for external quality assurance of primary care laboratories, Division for General Practice, University of Bergen, Norway) originally appeared in *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* Clin Chem Lab Med 2004;42(7):715-724 2004 by Walter de Gruyter "Berlin" New York. It has been reprinted with kind permission of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM) published by Walter de Gruyter Publishers in Association with the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine and the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.

## REFERENCES

1. **Solberg HE.** International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987; 25: 645–56.
2. **Linnet K.**: Nonparametric estimation of reference intervals by simple and bootstrap-based procedures. *Clin Chem* 2000; 46: 867–9.

3. **Rustad P.**: Reference intervals for 25 of the most frequently used properties in clinical chemistry. Proposal by Nordic Reference Interval Project (NORIP). *Klinisk Biokemi I Norden* 2003; 15: 10–7.
4. <http://www.furst.no/norip/>
5. **Harris E. K., Boyd J. C.**: On dividing reference data into subgroups to produce separate reference ranges. *Clin Chem* 1990; 36: 265–70.
6. **Harris E. K., Wong E. T., Shaw S.T.**: Statistical criteria for separate reference intervals: race and gender groups in creatine kinase. *Clin Chem* 1991; 37: 1580–2.
7. **Lahti A., Hyltoft Petersen P., Boyd J. C., Fraser C. G., Jørgensen N.**: Objective criteria for partitioning Gaussian-distributed reference values into subgroups. *Clin Chem* 2002; 48: 338–52.
8. **Hyltoft Petersen P., Blaabjerg O.**: Reference intervals for plasma proteins. Principles for estimation of reference intervals. In: Hyltoft Petersen P, Blaabjerg O, Irjala K, editors. *Assessing quality in measurements of plasma proteins*. *Upsala J Med Sci* 1994; 99: 307–13.
9. **Blaabjerg O., Nørgaard I., Blom M., Rahbek Nørgaard J., Hyltoft Petersen P., Gry H., et al.**: Reference intervals based on a Danish population. In: Hyltoft Petersen P, Blaabjerg O, Irjala K., editors: *Assessing quality in measurements of plasma proteins*. *Upsala J Med Sci* 1994; 99: 315–38.
10. **Jørgensen L. G. M., Stahl M., Brandslund I., Hyltoft Petersen P., Borch-Johnsen K., de Fine Olivarius N.**: Plasma glucose reference interval in a low-risk population 2. Impact of the newWHO and ADA recommendations on diagnosis of diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest* 2001; 61: 181–190.
11. **Jørgensen L. G. M., Brandslund I., Stahl M., Hyltoft Petersen P., Iversen S., Klitgaard N. et al.**: Upper reference limit, analytical quality specifications and clinical use of haemoglobin A1C. *Scand J Clin Lab Invest* 2002; 62: 609–22.
12. **Schousboe K., Henriksen J. E., Kyvik K. O., Sørensen T. I. A., Hyltoft Petersen P.**: Reproducibility of S-insulin and Bglucose responses in two identical oral glucose tolerance tests. *Scand J Clin Lab Invest* 2002; 62: 623–30.
13. **Hyltoft Petersen P., Rosleff F., Rasmussen J., Hobolth N.**: Studies on the required analytical quality of TSH measurements in screening for congenital hypothyroidism. *Scand J Clin Lab Invest* 1980; 40 Suppl. 155: 85–93.
14. **Hørder M., Hyltoft Petersen P., Groth T., Gerhardt W.**: Influence of analytical quality on the diagnostic power of a single S-CK B test in patients with suspected myocardial infarction. *Scand J Clin Lab Invest* 1980; 40 Suppl 155: 95–100.
15. **Nørregaard-Hansen K., Hyltoft Petersen P., Hangaard J., Simonsen E. E., Rasmussen O., Hørder M.**: Early observations of S-myoglobin in the diagnosis of acute myocardial infarction. The influence of discrimination limit, analytical quality, patient's sex and prevalence of disease. *Scand J Clin Lab Invest* 1986; 46: 561–9.

16. **Gowans E.M.S., Hyltoft Petersen P., Blaabjerg O., Hørder M.:** Analytical goals for the acceptance of common reference intervals for laboratories throughout a geographical area. *Scand J Clin Lab Invest* 1988; 48: 757–64.
17. **Hyltoft Petersen P., Gowans E.M.S, Blaabjerg O., Hørder M.:** Analytical goals for the estimation of non-Gaussian reference intervals. *Scand J Clin Lab Invest* 1989; 49: 727–37.
18. **Wiggers P., Dalhøj J., Hyltoft Petersen P., Blaabjerg O., Hørder M.:** Screening for haemochromatosis: influence of analytical imprecision, diagnostic limit and prevalence on test validity. *Scand J Clin Lab Invest* 1991; 51: 143–8.
19. **Hyltoft Petersen P., Groth T., deVerdier C.H.:** Guidelines for assessing analytical quality requirements. In: **deVerdier C.H., Groth T., Hyltoft Petersen P., editors:** Medical need for quality specifications in clinical laboratories. *Upsala J Med Sci* 1993; 98: 221–40.
20. **von Eyben F.E., Hyltoft Petersen P., Blaabjerg O., Lindegaard Madsen E.:** Analytical quality specifications for serum lactate dehydrogenase isoenzyme 1 based on clinical goals. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: 553–61.
21. **Hald A.:** Statistical theory with engineering applications. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1952.
22. **Bliss C.I.:** Statistics in biology. Statistical methods for research in the natural sciences, vol 1. New York, St Louis, San Francisco, Toronto, London, Sydney: McGraw-Hill Book Company, 1967.
23. **Altman D.G.:** Practical statistics for medical research. London, Glasgow, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Chapman & Hall, 1994.
24. **Andersen M., Hansen T.B., Støving R.K., Bertelsen J., Hangaard J., Hyltoft Petersen P. et al.** The Pyridostigmine-growth-hormone-releasing-hormone test in adults. The reference interval and a comparison with the insulin tolerance test. *Endocrinol Metabolism* 1996; 3: 197–206.
25. **Møller H.J., Hyltoft Petersen P., Rejnmark L., Moestrup S.K.:** Biological variation of soluble CD163. *Scand J Clin Lab Invest* 2003; 63: 15–22.
26. **Linnet K.:** Two-stage transformation systems for normalization of reference distributions evaluated. *Clin Chem* 1987; 33: 381–6.
27. **Dinneen S.F., Maldonado D., Leibson C., Klee G.G.:** Effect of changing diagnostic criteria on the risk of developing diabetes. *Diabetes Care* 1998; 21: 1408–13.
28. **Harris E.H., Boyd J.C.:** Statistical bases of reference values in laboratory medicine. New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker, Inc., 1995: 361.
29. **Boyd J., Lacher D.A.:** A multi-stage Gaussian transformation algorithm for clinical laboratory data. *Clin Chem* 1982; 28: 1735–41.
30. **Miller W.G., Chinchill V.M., Gruemer H.D, Nance W.E.:** Sampling from a skewed population distribution as exemplified by estimation of the creatine kinase upper reference limit. *Clin Chem* 1984; 30: 18–23.
31. **Jørgensen L. G. M., Schytte T., Brandslund I., Stahl M., Hyltoft Petersen P., Andersen B.:** Fasting and post-glucose load-reference limits for peripheral venous plasma glucose concentration in pregnant women. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 187–99.

LUBOMÍR ŠPAČEK<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Poradenská činnosť systémov manažerstva kvality  
v zdravotníckych laboratóriách, Bratislava

<sup>2</sup>Ústav laboratórných vyšetrovacích metód  
OÚSA, s.r.o., Bratislava

Práca pojednáva o nasledovných požiadavkách ISO 15189 a rutinnej praxi v neakreditovaných medicínskych laboratóriách:

- referenčné intervaly (RI)
- kritické hodnoty (KH).

Práca taktiež pojednáva o možnosti odborných spoločností a stavovských organizácií vplývať na akreditáciu medicínskych laboratórií.

Akreditačný štandard pre medicínske laboratória ISO 15189 má vysoký potenciál pre zabezpečenie skutočnej kvality a dôveryhodnosti činnosti a výsledkov poskytovaných vyšetrení medicínskym laboratóriom. Norma ISO 15189 vo viacerých článkoch explicitne vyjadruje viaceré požiadavky, ktoré môžu byť inšpirujúce pre každé medicínske laboratórium.

## REFERENČNÉ INTERVALY (RI)

V kap. 5.5 Vyšetrovacie postupy, v článku 5.5.3 sú uvedené v položkách štandardného pracovného postupu pod bodom „1) biologické referenčné intervaly“ a v článku 5.5.5 sa uvádza:

„Biologické referenčné intervaly sa musia pravidelne kontrolovať. Ak laboratórium má dôvod domnievať sa, že konkrétny biologický interval už nie je vhodný pre referenčnú populáciu, musí sa vykonať prieskum a ak je potrebné, následne aj nápravné opatrenie. Ak je potrebné, biologické referenčné intervaly sa musia skontrolovať, aj keď laboratórium zmení vyšetrovací postup alebo postup pred vyšetrením.“

V kap. 5.8 Uvádzanie výsledkov, v článku 5.8.3 uvádzajúcom požiadavky na položky výsledkového listu ktorý v bode i) požaduje „*biologické referenčné intervaly, kde je vhodné.*“

Nebudem sa zaoberať rôznymi teoretickými prístupmi k získavaniu a používaniu RI z ktorých mnohé sú už dobre prepracované.

Ako to však vyzerá v rutinnej praxi v medicínskych laboratóriách?

**RI ktoré sa väčšinou v medicínskych laboratóriách používajú môžu mať nasledovný pôvod:**

**1) RI prebraté od výrobcu** (súpravy alebo analytického systému)

Toto je najčastejší pôvod RI v medicínskych laboratóriách. Môžeme tu však rozlišovať rôzne varianty týchto výrobcov uvádzaných RI a taktiež rôzne varianty v prístupe medicínskeho laboratória k týmto RI.

Výrobcovia môžu RI prezentovať nasledovným spôsobom:

- výrobca neudáva RI
- výrobca udáva RI bez akejkoľvek informácii o ich pôvode, referenčnej populácii, demografických charakteristikách a geografickom pôvode, preanalytických podmienkach, deatailoch analytického postupu a štatistických charakteristikách súboru nameraných hodnôt, spôsobe štatistického spracovania a pod.
- výrobca udáva RI s odkazom na všeobecnú literatúru (Thomas a pod.), to znamená, že RI neboli získané použitím daného setu alebo analytického systému
- výrobca udáva RI s odkazom na originálny článok
  - môže sa jednať o štúdiu v ktorej bol použitý princíp stanovenia zhodný s daným setom ale nie realizovaný konkrétnym setom
  - práca používa tento konkrétny set

Originálna práca môže alebo nemusí dostatočne špecifikovať všetky potrebné detaily pre charakterizáciu referenčnej populácie, detaily štatistického spracovania atď.

- výrobca udáva RI s dostatočnou charakterizáciou referenčnej populácie, detaily štatistického spracovania atď.

Tieto údaje môže výrobca prezentovať v príbalovom letáčku, v manuáli k analytickému systému alebo ďalšej firemnej literatúre. Niekedy to distribučná firma dodá len na špeciálne požiadanie.

## 2) RI získané z vlastných dát

Toto je zriedkavejší spôsob a obtiažne aplikovateľný v celom spektre poskytovaných vyšetrení. Výrobcovia diagnostických systémov k tomuto často v svojich materiáloch medicínske laboratória vyzývajú ale v praxi sa to z viacerých dôvodov neuplatňuje. Je obtiažne zachovať všetky požiadavky, ktoré si spracovanie RI vyžaduje.

## 3) RI prebraté z literatúry

Niekedy, ak nieje iná možnosť, preberajú sa RI z literatúry ak sa v laboratóriu presne reprodukuje v literatúre popísaná metóda.

## 4) RI tradované v laboratóriu z minulosti

Niekedy sa v laboratóriách používajú „tradované“ RI, často bez jasného pôvodu, kedy, kým a na základe čoho boli zavedené.

Z vyššie uvedeného vyplýva, že takéto RI majú rôznu validitu a hodnotu z hľadiska použitia pre interpretáciu výsledkov poskytovaných medicínskym laboratóriom.

## PRESKÚMANIE RI

Ak v zmysle požiadaviek normy ISO 15189 má medicínske laboratórium zabezpečiť laboratórne vyšetrenia pre maximálny prospech pacienta, na odborných pracovníkov laboratória to kladie omnoho vyššie nároky než sa bežne v medicínskych laboratóriách zabezpečuje.

Medicínske laboratórium musí pre každé vyšetrenie zabezpečiť preskúmanie RI, zdokumentovať ich výber.

Minimálne to znamená preskúmať všetku dokumentáciu danej metódy alebo analytického systému dostupnú od výrobcu. Zadovážiť si citované originálne štúdie a preštudovať ich. Na základe preskúmania tohto materiálu vyhodnotiť charakteristiky a validitu uvádzaných RI a urobiť záver ohľadom potvrdenia ich platnosti pre používanie na hodnotenie výsledkov získavaných danou metódou.

Pracovníci zodpovední za kontrolu výsledkov, poskytovanie informácií a konzultácii by mali detailne poznať validitu a obmedzenia používaných RI.

V zmysle požiadaviek normy ISO 15189 má medicínske laboratórium pravidelne preskúmať platnosť RI. To je možné hodnotiť na základe korelovania viacerých parametrov a klinických údajoch o pacientovi. Bežný LIS umožňuje sledovať tzv. patientské priemery. Tam, kde je dostatočná početnosť vyšetrení daného analytu to môže poskytovať cennú informáciu.

## ZMENA VYŠETROVACIEHO POSTUPU A RI

Slabým miestom býva zmena vyšetrovacieho postupu. V niektorých laboratóriách to býva neúnosne často. V každom páde by sa mali tiež preskúmať RI. Tu je potrebné k vyššie uvedenému postupu pridať porovnanie hodnôt výsledkov získaných pôvodnou a novou metódou na rovnakom súbore patientských vzoriek.

Toto sa v mnohých laboratóriách nerobí, je to nákladné, pracné a niekedy pri „bleskových“ zmenách sa to ani nestihne. Aj samotná interpretácia a praktické závery takéhoto porovnávania môžu byť nie len pracné ale i problematické. (Ak nechceme mať problémy, radšej neporovnávajme!).

Avšak dáta získané z takéhoto porovnávania metód, analytických systémov môžu dať neoceniteľné informácie pre zhodnotenie a výber RI a jednak pre náležitý postup pri ich interpretácii. Najmä u dlhodobu monitorovaných pacientov pri následných kontrolách bez týchto dát nie je možné urobiť primerané hodnotenie dynamiky výsledkov. Ide o dynamiku v stave pacienta alebo dôsledok zmien v metóde?

Tento aspekt sa často zanedbáva. Zjednodušene sa považuje za dostatočné len uvedenie nového RI. Nie vždy to vyriešia len nové RI. V skutočnosti to nemusí byť tak jednoduché.

Pri porovnaní RI dvoch metód podľa údajov výrobcov môžu nastať a i nastávajú nasledovné situácie:

- A)  $RI_1 = RI_2$
- B)  $RI_1 \neq RI_2$

- B1)  $RI_1$  je širší alebo užší ako  $RI_2$
- B2)  $RI_1$  je celkovo posunutý jedným smerom oproti  $RI_2$
- B3)  $RI_1$  je z jednej strany zúžený alebo rozšírený oproti  $RI_2$
- B4)  $RI_1$  a  $RI_2$  nie sú v rovnakých jednotkách

Jednoduchá je situácia A), zhoda v RI pôvodnej ( $RI_1$ ) a novej ( $RI_2$ ) metódy. V praxi však nastávajú všetky ďalšie uvedené možnosti, keď sa RI pôvodnej a novej metódy nezhodujú.

### Porovnanie novej a pôvodnej metódy na súbore pacientov

Porovnanie novej a pôvodnej metódy (súpravy alebo analytického systému) na výsledkoch súboru patientských vzoriek môže taktiež poskytnúť rôzne situácie, ktoré môžeme zhrnúť do nasledovných možností:

Priemery	Štandardné odchýlky	Korelačný koeficient	Parametre regresnej priamky	
Priemer <sub>1</sub> = Priemer <sub>2</sub> Priemer <sub>1</sub> ≠ Priemer <sub>2</sub>	$s_1 = s_2$ $s_1 \neq s_2$	$r = 1$ $r \neq 1$	$a = 1$ $a \neq 1$	$b = 0$ $b \neq 0$

Tieto jednotlivé parametre získané porovnávaním dvoch metód môžu byť v rôznych vzájomných kombináciách. Nie je výnimočné, že výsledky vzájomného porovnávania nie sú vôbec v súlade s tým, čo by sa dalo očakávať z porovnania RI udávaných výrobcom. Napr. pre očakávanú zhodu  $RI_1 = RI_2$  porovnanie metód na súbore pacientov môže ukazovať nezgodu priemerov, štandardných odchýlok a regresných parametrov. Môže nastať i situácia, že výrobcom uvádzané RI pre novú metódu sú vyššie ale porovnania pacientov dá hodnoty nižšie!

Zvažovanie, pre ktorý RI sa potom rozhodnúť, nemusí byť vôbec jednoduché. Znalosť týchto informácií však umožňuje aby výber RI bol zodpovedný a taktiež dáva možnosť zodpovedne vykonávať konzultačnú činnosť a poradenstvo pri interpretácii laboratórnych výsledkov.

Práve táto garancia odbornosti sa od zodpovedných pracovníkov v medicínskom laboratóriu očakáva. Poskytovanie dôveryhodných výsledkov, kvalitných informácií a služieb.

### KRITICKÉ HODNOTY (KH)

V kap. 5.5 Vyšetrovacie postupy, v článku 5.5.3 sú uvedené v položkách štandardného pracovného postupu pod bodom „n) varovné hodnoty, ak je vhodné“.

V kap. 5.8 Oznamovanie výsledkov je článok 5.8.7 sa uvádza:

„Ak sa zistí, že výsledky vyšetrenia rozhodujúcich parametrov sa nachádzajú vo „výstražných“ alebo „kritických“ intervaloch, laboratórium musí mať postupy na okamžité oznámenie tejto skutočnosti lekárovi (alebo inému klinickému pracovníkovi, ktorý je zodpovedný za starostlivosť o pacienta)“.

Článok 5.8.8 uvádza:

„Aby sa mohli plniť miestne klinické potreby, laboratórium musí po dohode s lekármi, ktorí sú používateľmi laboratórnych služieb, určiť kritické vlastnosti a ich výstražné/kritické intervaly pre všetky vyšetrenia, vrátane nominálnych a ordinálnych vlastností.“

Článok 5.8.10 uvádza:

„Laboratórium musí udržiavať záznamy o opatreniach prijatých k výsledkom, ktorých hodnoty boli v kritických intervaloch. Tieto záznamy musia obsahovať dátum, čas, meno zodpovedného laboratórneho pracovníka, meno oboznámenej osoby a výsledky vyšetrení. Každý problém, ktorý sa vyskytne pri plnení tejto požiadavky sa musí zaznamenať a preskúmať počas auditov.“

Problematika KH nie je nová. V neakreditovaných laboratóriách sa však KH v prevažnej miere doteraz rutinne nepoužívajú. Až v súvislosti s akreditáciou medicínskych laboratórií, najmä podľa ISO 15189, sú laboratória nútené zaujímať o problematiku KH. Odkiaľ ich zobrať, ktoré vyšetrenia do KH zahrnúť, aké konkrétne hodnoty zvoliť, ako ošetriť ich oznamovanie a pod.

Existujú viaceré publikácie odkiaľ je možné čerpať inšpiráciu. KH môžu byť uvádzané buď ako absolútne hodnoty alebo ako relatívne násobky príslušnej hodnoty (dolnej alebo hornej) RI pre daný analyt. Tieto relatívne hodnoty sa ľahšie prenášajú medzi rôznymi metodicky závislými RI.

V každom prípade by medicínske laboratórium malo návrh zoznamu vyšetrení, návrh hodnôt pre KH a navrhovaný spôsob hlásenia prejednať s potenciálnymi užívateľmi.

V niektorých prípadoch môžu byť vhodné používať diferencovaný prístup podľa typu klinického pracoviska (iné napr. pre ambulanciu všeobecného lekára a iné pre špecializované lôžkové oddelenie).

Možnosti odborných spoločností a stavovských organizácií vplyvať na akreditáciu medicínskych laboratórií

Proces akreditácie jednoznačne prispieva k zvyšovaniu kvality a dôveryhodnosti služieb poskytovaných medicínskym laboratóriom. Norma ISO 15189, vypracovaná špecificky pre medicínske laboratóriá, tlačí laboratória do aktivít orientovaných na rozvoj ich medicínskeho charakteru a služieb pre prospech pacienta.

Napriek tomu, že proces akreditácie medicínskych laboratórií bol v SR naštartovaný už pred viac než 10 rokmi, počet akreditovaných medicínskych laboratórií nezodpovedá pôvodným očakávaniam. Ako odbor bola pôvodne lídrom KB, dnes sa ním stáva napr. klinická patológia a cytológia.

Domnievam sa, že jeden s faktorov, ktorý zbrzdil nástup akreditácie medicínskych laboratórií v SR bola nejednotnosť postojov v odborných spoločnostiach a profesijných organizáciách. Boli to roky opakovane predkladaných diskusií, či certifikácia alebo akreditácia, či SNAS alebo niečo „vlastné“ zdravotníckej a pod. Snahy jednej skupiny neboli podporené inou skupinou v neprospech kvality v odbore.

Na Slovensku máme národný akreditačný orgán SNAS, ktorý je medzinárodne akceptovaný a má dostatočné skúsenosti s akreditáciou medicínskych laboratórií či už podľa staršej všeobecnejšej normy ISO 17025 alebo normy špeciálne vypracovanej pre akreditáciu medicínskych laboratórií ISO 15189.

V procese akreditácie akreditujúcim sa medicínskym laboratóriám ale taktiež posudzovateľom SNAS chýbajú oficiálne slovenské odborné stanoviská, metodické doporučenia a štandardy o ktoré by sa mohli oprieť pri konkretizácii požiadaviek všeobecne formulovaných v spomínaných akreditačných štandardoch. Tu je pre odborné spoločnosti a profesijné organizácie dostatočný priestor na uplatnenie slovenských špecifik a prístupov. Proklamovaný záujem o kvalitu sa môže stať skutočnosťou.

SNAS je otvorený spolupráci s odbornými spoločnosťami a profesijnými organizáciami. Je tu priestor na uplatňovanie odborných hľadísk pre aplikáciu akreditačných štandardov a pod.

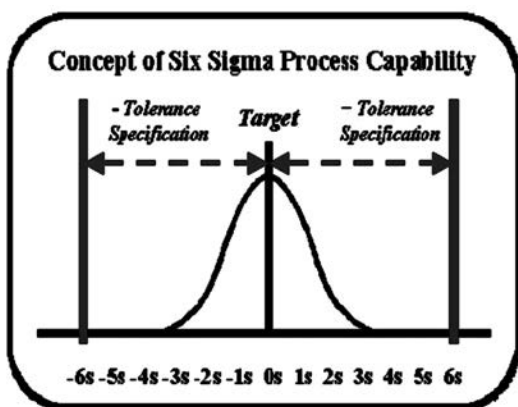
**PRAKTICKÉ VYUŽITÍ METODOLOGIE SIX SIGMA  
V KLINICKÉ LABORATOŘI**

**LUDEK ŠPRONGL**

**Centrální laboratoř  
Šumperská nemocnice a.s.**

Pojem six sigma se poprvé objevuje v roce 1967 ve firmě Motorola, kde byla vytvořena nová strategie přístupu ke kontrole kvality. Ta se brzy stala synonymem „světově uznávané kvality“. Cílem této strategie bylo minimalizovat chybovost na maximálně 3,4 ppm či dpm (part per million, defect per million), tedy 3,4 chyb (špatných výrobků) na jeden milion procesů (výrobků celkem), což lze uplatnit i pro výsledky laboratorních analýz. Název six sigma je odvozen z toho, že v Gaussově (normálním) rozdělení je 0,00034 % výsledků mimo vzdálenost  $6\sigma$  (SD) od středu.

Obrázek 1: Koncept six sigma metodologie:



Strategie six sigma vychází z předpokladu, že proces (v klinické laboratoři výsledky opakovaných měření) má normální rozložení. Dále se předpokládá, že nelze dosáhnout toho, aby střední hodnota procesu (průměr měření) byla totožná s cílovou hodnotou (TV). Obvykle se tyto dvě veličiny od sebe liší a strategie six sigma předpokládá maximální odchylku 1,5 SD ( $\sigma$ ), což odpovídá 12,5 % tolerančního pole (z Gaussova rozdělení). Počet chyb za daných předpokladů je uveden v následující tabulce:

sigma	počet chyb (ppm)	
	TV = $\mu$	posun $\mu$ o 1,5 sigma
1	317311	691462
2	45500	308538
2,5	12419	158655

3	2700	66807
305	465	22750
4	63,3	6210
4,5	6,8	1350
5	0,573	233
5,5	0,038	31,7
6	0,002	3,4

Další aplikací této tzv. sigmametricky je definice či určení maximální povolené chyby  $TE_a$  jednoho procesu (měření). Cílem zlepšování kvality podle uvedené strategie pak je dosáhnout toho, aby velikost sigma, která se vypočte jako poměr maximální povolené chyby ( $TE_a$ ) a relativní směrodatné odchylky ( $s_r$ ), byla  $\geq 6$ :

$$\sigma = \frac{TE_a}{s_r}$$

kde  $TE_a$  je definována jako rozdíl tolerančních mezí:  $TE_a = USL - LSL$ .

Zhruba kolem roku 2000 se začala metodologie six sigma zavádět i do klinických laboratoří. Westgard pro výpočet  $\sigma$  zavádí vzorec:

$$\sigma = \frac{TE_a - bias}{s_r}$$

a tím pro analýzy s odlišnou cílovou hodnotou a průměru, což platí pro naprostou většinu analytických metod v klinické laboratoři, se ještě zpřísňují kritéria strategie six sigma. Pro praktické použití v klinické laboratoři obvykle postačí výpočet  $\sigma$  bez použití hodnoty bias (a to i vzhledem k problematičnosti stanovení bias, ať již z důvodů „nejistoty“ cílových hodnot v kontrolních materiálech, nebo malého počtu měření při aplikaci doporučeného způsobu stanovení bias apod.).

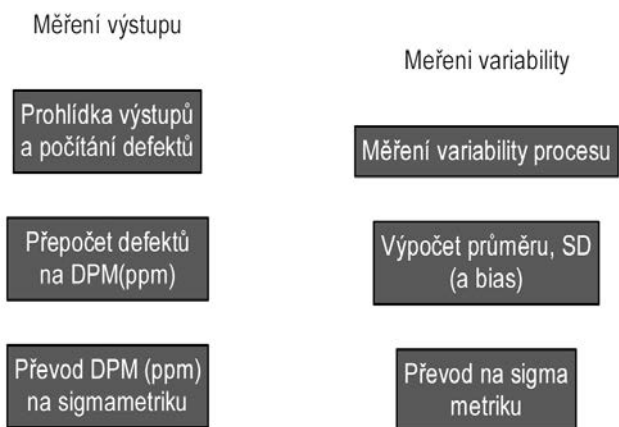
**Jak tedy aplikovat sigmametricku do praxe klinických laboratoří?**

Při zavádění sigmametricky by měly být splněny následující předpoklady:

- nepřítomnost autokorelace mezi daty
- normální tvar rozložení
- stabilita střední hodnoty

K sigmametricky v obecném smyslu existují dvě cesty znázorněné na následujících schématech – cesta měření výstupu (počítání defektů), která je vhodná pro automatické, vysoce čítné procesy výroby a cesta měření variability, která se aplikuje v klinických laboratořích.

Výhodou prostředí klinických laboratoří je jasně definovaný proces a přesné, v oboru dlouhodobě používané charakteristiky – směrodatná odchylka jako míra variability (přesnosti resp. nepřesnosti) a bias (odchylka) jako míra vychýlení. V laboratořích také existuje propracovaný systém sběru kontrolních dat a obvykle nechybí zkušenosti se statistikou při jejich zpracování. Je zde však obvykle problém, jak definovat nebo převzít



toleranční interval. Obecně je možné definovat tři cesty k získání tolerančního intervalu

- analytická kritéria výsledku ( $TE_a$ , TMU)
  - odvozená z biologické variability
  - kritéria mezilaboratorních srovnávání (PT kritéria)
- klinická kritéria výsledku ( $D_{int}$ )
- individuální kritéria pro s, bias

Co je tedy výhodou metodologie six sigma v laboratoři? Především zjednodušení vyjádření kvality měřicího procesu. Není nutné charakterizovat vztah mezi nepřesností metody a celkovou povolenou nejistotou (TMU), který je charakteristický pro každou jednotlivou metodou. Cílem kvalitní laboratorní činnosti by mělo být dosažení hodnot sigma 4–5. Za minimum lze v laboratoři považovat dosažení hodnoty sigma 3. Nižší hodnoty signalizují problematickou kvalitu sledované metody. Hodnoty sigma tak jsou patrně neobjektivnějším, nejjednodušším a především nejpřehlednějším měřítkem procesu zlepšování kvality.

Dále lze podle hodnot sigma velmi jednoduše nastavovat kontrolní pravidla – samozřejmě platí čím vyšší hodnota sigma, tím jednodušší kombinace kontrolních pravidel. Hodnoty sigma lze využít ve všech postupech, kde se dříve pracovalo s hodnotami variačních koeficientů.

Ale – v praktickém životě není vše tak jednoduché, jak nám nabízí teorie. Existují metody, kde velmi těžko dosáhnete hodnoty 3, na druhé straně je řada metod s lehce dosažitelnými hodnotami nad 6. V prvním případě buď není obecně analytická část procesu na dobré úrovni, třeba i z objektivních příčin. Pak se musíme se stavem smířit a používat komplikovanější kontrolní systém. Někdy ale stačí změnit metodiku či dodavatele. V případě s hodnotami sigma nad 6 je třeba se zamyslet nad správně nastavenou hodnotou TMU. Dalším problémem je, pna které hladině koncentrace analytu určit hladinu sigma jako vyjádření kvality procesu. Principiálně by to měla být ta nejhorší. Při nastavení kontrolního procesu v těchto případech je potřebné nastavit jiná kontrolní pravidla pro jednotlivé hladiny kontrolních měření. V následující tabulce je reálný stav hodnot sigma u některých metod v reálné laboratoři. Jako TMU jsou brány hodnoty z EHK organizovaného SEKK

Metoda	Sigma hladina 1	Sigma hladina 2	Sigma hladina 3
pH	25,2	18,3	19,1
LD	7,8	9,25	9,12
K	2,68	3,15	3,25
P	1,58	3,34	6,55
ALP	2,4	6	9,2
ALT	5,8	9,7	7
Ca	3,5	6,7	7,4
Albumin	11	13,5	21,4
Glukosa	3,7	6,4	8,9
IgA	4,4	4,6	6
APO B	2,4	2,8	3,1
TnI	2,5	4,8	6,1
AFP	5,5	4,5	
PSA	2,8	4,1	
ft4	2,5	3,1	3,3
E2	2,8	3,8	4,2
APTT	10,8	4,7	4,2
Fibrinogen	2,8	3,7	2,0
WBC	5,1	10,6	16,9
RBC	22,2	15	12
Neutrofily	8,0	8,1	10,5

Samozřejmě by bylo zajímavé vztáhnout hodnoty sigma k teoretickým TMU (počítaných z biologických variabilit). Pak by například u albuminu byly hodnoty sigma třetinové, u ALT naopak ještě 2× vyšší. Při porovnání této tabulky a tabulky počtu chyb (viz výše) lze odhadnout, kolik chybných výsledků (mimo toleranční meze) pro danou metodu laboratoř pravděpodobně vydá. Pro hodnotu sigma 6 jsou to 3 chybné výsledky na milion měření, tedy v podstatě jedna chyba na 300 000 výsledků...

Závěrem lze shrnout, že metodologie six sigma je účinným pomocníkem v procesu zlepšování kvality v laboratoři. Nelze ji však aplikovat bez hlubšího porozumění a dodržení všech uváděných předpokladů pro její použití. Zatím je vhodné pracovat jak s klasickými metodami, tak s touto metodologií a postupně na ní přecházet.

#### LITERATURA:

- Friedecký, B.:** Six sigma. Universální indikátor kvality laboratorních vyšetření v budoucnost? FONS 2/2007, 24–26.
- Šprongl, L. a kolektiv:** Příručka k vnitřní kontrole kvality, ČSKB, 2008, ISBN 978-80-254-1130-8.
- Westgard, J. O.:** Six Sigma Quality – Design and Rules, 2006, ISBN 1-886958-23-8, www.westgard.com.

OTO ÜRGE<sup>1,2</sup>, JAROSLAVA STRNOVÁ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinika pre deti a dorast A. Getlíka SZU  
FN Bratislava

<sup>2</sup>Synlab.SK s.r.o., Limbová 5  
Bratislava

Fenylketonúria (FKÚ) je autozómovo recesívna dedičná metabolická porucha aminokyselín. U kaukazskej populácie patrí medzi najčastejšie monogénové ochorenia s vysokou priemernou incidenciou asi 1 : 10 000. Príčinou klasickej formy fenylketonúrie je geneticky podmienená zmena v štruktúre génu pre fenylalanínhydroxylázu (FAH). Lokus pre tento enzým je umiestnený na 12 chromozóme. V súčasnosti je známych viac ako 500 identifikovaných mutácií v géne pre FAH. Chýbanie alebo nedostatočná aktivita enzýmu fenylalanínhydroxylázy spôsobuje hromadenie aminokyseliny fenylalanínu, nedostatok tyrozínu a vylučovanie fenylketónov močom. Každé zvýšenie koncentrácie fenylalanínu v krvi má za následok predovšetkým poškodenie centrálného nervového systému. V klinickom obraze u neliečených pacientov dominuje mentálna retardácia a kŕče. Deti majú väčšinou svetlé vlasy, modré oči, svetlú pokožku a ekzémy.

V súčasnej dobe vieme zabezpečiť primeraný somatický a psychický vývin detí s fenylketonúriou včasným záchytným ochorením, ktorý je realizovaný kvalitným novorodeneckým skríningom a rýchlym započatím liečby. U každého pacienta sa zvolí najoptimálnejší liečebný režim, ktorý vyžaduje aj pravidelné a komplexné sledovanie efektívnosti liečby a vývinu dieťaťa, spoluprácu s rodinou a dodržiavanie liečebných odporúčaní.

Zabezpečenie starostlivosti o pacientov s fenylketonúriou na Slovensku sa riadi Metodickým pokynom uverejneným vo Vestníku Ministerstva Zdravotníctva SR. Fenylketonúria (hyperfenylalaninémia) patrí do skupiny dedičných metabolických porúch, ktoré sú v dnešnej dobe úspešne liečiteľné. Priekopníkom v liečbe FKÚ sa stal nemecký profesor Horst Bickel, ktorý už v roku 1953 ako prvý publikoval prácu o vplyve nízkofenylalanínovej diéty na hladinu Phe v krvi a tým aj na klinický stav dieťaťa. Od toho času liečba fenylketonúrie výrazne pokročila. Dnes už vieme aj to, že HPA je rôznorodým ochorením, čím sa liečba stala opäť zložitejšou. Nie všetky typy FKÚ možno liečiť nízko bielkovinovou diétou so suplementáciou aminokyselinových zmesí bez fenylalanínu. V niektorých prípadoch je táto liečba neúčinná, v iných prípadoch zbytočná.

Väčšinu pacientov tvorí tzv. hyperfenylalaninémia (HPA) typu I. – t.j. klasická FKÚ. Povinnosťou klinických pracovníkov je oddiferencovať tento typ HPA od ostatných a zabezpečiť dodržiavanie určitej „odporúčenej“ stratégie.

Súčasná moderná liečba FKÚ je založená na prísnej nízko bielkovinovej diétnej liečbe v kombinácii s kvalitnými prípravkami (aminokyselinové zmesi), ktoré spĺňajú aj tie najnáročnejšie kritériá. U prípravkov ide hlavne o presný pomer jednotlivých aminokyselín, minerálnych látok, stopových prvkov a vitamínov potrebných pre jednotlivé vekové kategórie a v závislosti od hmotnosti pacienta.

Dôležité je aj presné dodržiavanie dávky bielkovín a energie pre negatívny vplyv katabolizmu a tým paradoxné zvýšenie koncentrácií fenylalanínu v krvi, ktorý pochádza z odbúravania vlastných bielkovín v organizme. Veľmi dôležité je pravidelné podávanie aminokyselinových zmesí rozdelené do 3 až 5 dávok za deň.

Osobitné postavenie má liečba novorodenca s fenylketonúriou. Nové moderné liečebné prípravky bez fenylalanínu s dostatočným obsahom bielkovín a energie umožňujú takmer u všetkých prípadoch kombináciu diétnej liečby a dojčenia. Ide o významnú zmenu v doterajšej stratégii liečby FKÚ, pri ktorej dojčenie bolo pre menej kvalitné prípravky kontraindikované.

Názory na trvanie diétnej liečby sa taktiež vyriešili. Fenylketonúria je považovaná za celoživotné ochorenie, liečba sa neprerušuje a je celoživotná.

Zvláštna pozornosť sa v súčasnej dobe venuje hlavne pacientkam s fenylketonúriou. Dokázalo, že zvýšená koncentrácia fenylalanínu (Phe) v krvi matky vplyva v gravidite negatívne na vývoj plodu. Príčinou možného poškodenia plodu môže byť neplánovaná gravidita, nedodržanie diéty pred koncepciou, nesprávne diétne prípravky resp. aj nezistená a tým aj neliečená hyperfenylalaninémia. Najrizikovejším obdobím u maternálnej fenylketonúrie je prvý trimester gravidity. Je dokázané, že aj mierne zvýšené hodnoty fenylalanínu môžu vyvíjajúci sa plod poškodiť. Ide najčastejšie o abortus, malformácie (dysmorfia tváre), poškodenie CNS s následnou mentálnou retardáciou, mikrocefalus, vrodené chyby srdca a nízku pôrodnú hmotnosť (pod 2500 g). Až 90 % detí matiek s maternálnou formou FKÚ, ktoré mali počas gravidity zvýšené koncentrácie fenylalanínu v krvi, býva poškodených.

#### Stratégia diétnej liečby

- Stratégia liečby fenylketonúrie v dnešnej dobe pozostáva vo vyváženom príjme aminokyselinových zmesí (tzv. dietetických prípravkoch)
- v nízkobielkovinovej diétnej liečbe s presne vypočítaným obsahom fenylalanínu v strave
- v dostatočnom príjme energie
- z pravidelného monitorovania koncentrácií fenylalanínu v sére pacienta

#### A. AMINOKYSELINOVÉ ZMESI

Základom liečby fenylketonúrie sú aminokyselinové zmesi – tzv. **základné prípravky**. Ich podávanie zabezpečuje dostatočný prívod aminokyselín bez fenylalaní-



nu, čím sa kompenzuje znížený príjem bielkovín pri nízkobielkovinovom diétnom režime. Aminokyseliny sa vyrábajú metódou génového inžinierstva. Samozrejme ich súčasťou je aj zodpovedajúce množstvo minerálov, stopových prvkov a vitamínov pre konkrétnu vekovú skupinu. Napriek ich vysokej kvalite majú aj určité nedostatky, ako sú vôňa, chuť a rozpustnosť.

### Rozdelenie aminokyselinových zmesí.

V liečbe FKÚ v poslednej dobe nastal pomerne veľký rozvoj. Na trh sa dostali nové prípravky, ktoré čiastočne eliminujú negatívne chuťové vlastnosti základných prípravkov. V súčasnosti môžeme dostupné aminokyselinové zmesi rozdeliť na

1. základné prípravky (rôzne druhy podľa veku pacienta)
2. doplnkové prípravky – práškové a iné formy
3. doplnkové prípravky – tekuté formy

#### 1. Základné prípravky

Uvedený typ tvorí základ liečby fenylketonúrie. Takmer všetky prípravky tejto skupiny sú plne hradené zo zdravotného poistenia. Väčšinou sú balené v dózach po 500 gramov, pričom dávkovanie je individuálne a riadi sa vekom a hmotnosťou pacienta. Pre liečbu novorodencov so zistenou fenylketonúriou sú k dispozícii špeciálne základné prípravky, ktoré pripomínajú bežné preparáty umelej výživy obohatené o optimálne zloženie mastných kyselín, zabezpečujúcich primeraný vývin centrálného nervového systému.

#### 2. Doplnkové prípravky (práškové formy)

V snahe kompenzovať negatívne vlastnosti základných prípravkov a všeobecne uľahčiť život pacientom s fenylketonúriou sa objavili na trhu nové prípravky. Väčšinou sa jedná o modifikovaný základný prípravok, ktorý je v praktickom približne 30 gramovom balení (sáčky), často už ochutený s lepšou rozpustnosťou a niekedy aj s menším celkovým objemom. Podobne aj tieto prípravky sú rozdelené podľa vekových kategórií. Ich použitie môže byť vo forme nápoja alebo aj polievky. Pomerne významnou zmenou v tejto skupine prípravkov bolo pridávanie esenciálnych mastných kyselín optimálneho zloženia pre najmladšiu vekovú skupinu detí. Tieto napomáhajú optimálnemu vývinu centrálného nervového systému a zraku.

#### 3. Doplnkové prípravky (tekuté formy)

Úplnou novinkou pre pacientov bol príchod tekutých foriem. Tieto prípravky významne uľahčujú diétny režim mnohým pacientom s fenylketonúriou v adolescentnom veku a v dospelosti. Ide o aminokyselinové zmesi v tekutej forme v praktickom najčastejšie 125 alebo 250 ml balení. Všetky prípravky tejto skupiny sú ochutené (lesné ovocie, tropické ovocie, citrus, pomaranč). Ich praktickosť spočíva v tom, že nevyžadujú žiadnu prípravu a sú vhodné na použitie hlavne v škole, práci, výletoch, zábave a pod.

## B. NÍZKOBIELKOVINOVÁ DIÉTNEJ LIEČBA

Druhou najdôležitejšou súčasťou komplexnej liečby pacientov s fenylketonúriou je špeciálny nízkobielkovinový diétny režim. Jeho podstatou je presne vypočítaná dávka fenylalanínu v strave pacienta, ktorá je prísne individuálna podľa tzv. tolerancie fenylalanínu. Tolerancia fenylalanínu je u každého pacienta iná podľa typu FKÚ, preto aj jedálny lístok pacientov je trochu odlišný. Určenie množstva prijatého fenylalanínu v strave sa mení a upravuje podľa koncentrácií Phe v sére, ktoré musia byť v prípustných bezpečných hodnotách. Podstatou stravy pacientov sú nízkobielkovinové potraviny. Ich ponuka sa v poslednom čase výrazne zlepšila a sú aj súčasťou zoznamu dietetických potravín hradených zo zdravotného poistenia.

### Dostatočný príjem energie

Veľmi dôležité je aj dodržiavanie dostatočného príjmu energie pre negatívny vplyv katabolizmu a tým paradoxné zvýšenie koncentrácií fenylalanínu v krvi, ktorý pochádza z odbúravania vlastných bielkovín v organizme. V niektorých prípadoch sme nútení kontrolovať a aj zvyšovať príjem energie podľa individuálnej záťaže pacienta a jeho potrieb. Aj keď cukry a tuky v diétnom stravovaní neobmedzujeme, často sa zlepšia kontrolné hodnoty Phe v krvi až po pridaní špeciálnych oligosacharidov (maltodextrín).

### Monitorovanie koncentrácií fenylalanínu v sére

S diétnou liečbou úzko súvisí pravidelné monitorovanie koncentrácií fenylalanínu v krvi pacienta. Zo získaných výsledkov sa zisťuje tolerancia organizmu na fenylalanín a upravuje sa diétny režim. Stanovenie fenylalanínu sa v praxi vykonáva priamo zo séra, zo suchej kvapky alebo aj kompletným vyšetrením aminokyselín v sére a v moči v pravidelných intervaloch v závislosti na veku a dodržiavaní diéty.

### Najnovšie poznatky

V posledných rokoch sa objavili v odbornej literatúre informácie o možnosti liečby určitých typov fenylketonúrie kofaktorom enzýmu fenylalanínhydroxylázy (FAH) – **tetrahydrobiopterinom** (BH4). Jeho možné použitie v bežnej praxi vyžaduje ešte klinické štúdie. Doterajšie výsledky poukazujú na to, že na liečbu BH4 reagujú hlavne pacienti s aspoň čiastočne zachovanou aktivitou enzýmu (FAH), ktorý je priamo zodpovedný za vznik ochorenia. Ide väčšinou o miernu alebo ľahkú formu fenylketonúrie. Klasická forma s ťažkým deficitom aktivity enzýmu je na liečbu rezistentná.

Inou perspektívnou možnosťou liečby FKÚ v budúcnosti by mohlo byť používanie **enzýmu fenylalaninamóniumlyázy** (PAL) v mikrokapsulách. Ide o bakteriálny enzým, ktorý v zažívacom trakte dokáže premeniť časť stravou prijatého fenylalanínu na neškodné zlúčeniny, čím sa zredukuje množstvo fenylalanínu, ktoré sa dostane do krvi.

Posledným perspektívnym prípravkom by mohli byť aminokyselinové zmesi **veľkých neutrálnych aminokyselín** (LNAA = large neutral amino acids). Ich účinok sa vysvetľuje tým, že fenylalanín s neutrálnymi a rozvetvenými aminokyselinami súťaží o transport cez hematoencefalickú bariéru. Keď je koncentrácia fenylalanínu v krvi vysoká, vyhráva v súťaži o transportný mechanizmus a dostáva sa do mozgu na úkor iných aminokyselín. Zvýšený prísun LNAA zvýhodní ich transport na úkor fenylalanínu, čo spôsobí v mozgu zníženie koncentrácií fenylalanínu a zmierni deficit týchto aminokyselín.

Pravdepodobne definitívnym liečebným postupom bude u pacientov s fenylketonúriou **génová terapia**. V súčasnosti existuje klonovaný gén, zvierací model, skúšajú sa „prenášače“ genetickej informácie, tzv. vírusové vektory. Nedoriešenými otázkami ostáva krátky efekt liečby, bezpečnosť a problém imunitnej reakcie. Vyriešenie týchto problémov bude znamenať revolučné zmeny v liečbe fenylketonúrie ako aj ostatných metabolických porúch.

Fenylketonúria je ochorením celoživotným. Súčasná moderná liečba tohto ochorenia umožňuje všetkým pacientom žiť plnohodnotným životom. Neprerušenie diétnej liečby u pacientov s fenylketonúriou je v dnešnej dobe už samozrejmosťou. Vďaka novým liečebným postupom sme svedkami toho, že liečba je zo strany pacientov plne akceptovaná, umožňuje im dosiahnuť vzdelanie na najvyššej úrovni ako aj uplatnenie v živote.

## LITERATÚRA

1. **Strnová, J.:** Hyperphenylalaninaemiae v Buchanec, J., a kol.: Vademékum pediatria. Martin, Osveta. 2001, s. 649–652.
2. **Hyánek, J. et al.:** Maternal hyperphenylalaninemia in a population of healthy Czech women. 18 years experience with mass screening, diet therapy and metabolic monitoring. Čas. Lék. čes., 1996, 135, 50, s. 87–90
3. **Procházková D., Konečná P., Kozák L., Hrabincová E., Severová J., Vinohradská H., Hrstková H.:** Maternální fenylketonurie (PKU) v regionu Moravy. Čsl. Pediat., 60, 2005, č. 5, s. 251–256.
4. **Ůrge, O., Strnová, J., Mosendzová, B.:** Fenylketonúria adolescentov a dospelých na Slovensku. Čsl. Pediat., 58, 2003, č. 7, s. 423–425
5. **Ůrge, O., Strnová, J.:** Vzdelanie a možnosti spoločenského uplatnenia pacientov s fenylketonúriou. Lekársky obzor, 55, 2006, 4, s. 148–51
6. **Strnová, J., Ůrge, O., Nogeová, A.:** Je možná korelácia medzi fenotypom a genotypom u pacientov s fenylketonúriou. Čsl. Pediat. 62, 2007, č. 5, s. 345–346

Autor:

MUDr. Ůrge Oto

Synlab.SK s.r.o.

Limbová 5, 831 01 Bratislava

tel.: 02/32 660 713

mail: oto.urge@szu.sk, oto.urge@synlab.sk

**IN EXTENZO**  
**PÔVODNÉ PRÁCE**

---

## STANOVENIE 25(OH)-VITAMÍNU D<sub>3</sub> METÓDOU HPLC A ELEKTROCHEMILUMINISČNOU (ECL) METÓDOU

---

EDITA DOBÁKOVÁ, EVA BÁTOROVÁ  
ANNA STECOVÁ, PETER KILIÁN

Laboratórna diagnostika Medirex a.s.  
Bratislava

### SÚHRN

Vitamín D patrí do skupiny v tukoch rozpustných pro-hormónov. Je biologicky neaktívny a aby sa stal aktívnym 1,25 dihydroxyvitamínom D, musí sa dvakrát hydroxylovať, v pečeni a v obličkách. Dve najvýznamnejšie formy vitamínu D sú vitamín D<sub>3</sub> (cholecalciferol) a vitamín D<sub>2</sub> (ergocalciferol). Vitamín D<sub>3</sub> vzniká z 7-dehydrocholesterolu, nachádzajúceho sa v koži, po expozícii ultrafialovým žiarením. Viac ako 95 % 25(OH)-vitamínu D merateľného v sére tvorí 25(OH)-vitamín D<sub>3</sub>, zatiaľ čo 25(OH)-vitamín D<sub>2</sub> dosahuje merateľné hodnoty iba u pacientov, ktorým je podávaný medikamentózne. V práci sme porovnali analytické možnosti, výhody, nevýhody a validačné charakteristiky dvoch metód stanovenia 25(OH)-vitamínu D<sub>3</sub>, ktoré boli uvedené v minulom roku do klinickej laboratórnej praxe. Sú to metódy založené na rôznych princípoch merania.

### SUMMARY

Vitamin D belongs to the group of fat-soluble pro-hormones. It has no hormone activity itself, but is converted to active hormone (1,25 dihydroxyvitamin D) through hydroxylation in skin and kidney. The two major forms of vitamin D are vitamin D<sub>3</sub> (cholecalciferol) and vitamin D<sub>2</sub> (ergocalciferol). Vitamin D<sub>3</sub> is produced from 7-dehydrocholesterol in skin exposed to ultraviolet radiation. More than 95 % of 25(OH)-vitamin D detectable in serum is found to be 25(OH)-vitamin D<sub>3</sub>, whereas 25(OH)-vitamin D<sub>2</sub> is measurable only in supplemented patients. In the present study we have compared two analytical methods of measuring 25(OH)-vitamin D<sub>3</sub> concentrations in human serum, that have been recently introduced into clinical laboratories, from the point of view of analytical possibilities, advantages, disadvantages and validation characteristics. These two methods are based on different measuring principles.

### ÚVOD

Vitamín D nespĺňa klasické kritéria definície pre vitamín, teda látku, ktorú organizmus potrebuje, ale nevie si ju syntetizovať. Ide o v tukoch rozpustný prekurzor steroidného hormónu, ktorý je produkovaný hlavne v koži po vystavení slnečnému žiareniu. Syntéza pôsobením slnečného

žiarenia by mala stačiť na pokrytie až 80 % dennej potreby, v závislosti na zemepisnej šírke a ročnom období. V potravinách sa vitamín D nachádza v rybom tuku, vaječnom žĺtku, mlieku a rastlinách (1).

Existujú dve významné formy vitamínu D: D<sub>3</sub> (cholecalciferol) a D<sub>2</sub> (ergocalciferol) líšiacie chemickou štruktúrou v bočných reťazcoch. Ergocalciferol je látka rastlinného pôvodu, cholecalciferol je tvorený in vivo. V koži prítomný 7-dehydrocholesterol je konvertovaný pôsobením UV žiarenia na 7-dehydrocholecalciferol. Termickou izomerizáciou je ďalej syntetizovaný vlastný vitamín D<sub>3</sub>. Účinnosť prieniku svetla je pod kontrolou kožného pigmentu. Pôsobením enzýmu 25-hydroxylázy sa v pečeni hydroxyluje na 25(OH)-vitamín D<sub>3</sub>. K ďalšiemu metabolickému kroku dochádza v obličkách, a to v mitochondriách buniek proximálneho tubulu (podľa najnovších poznatkov aj v distálnom tubule a v zberných kanálikoch), kde pôsobením enzýmu 1- $\alpha$ -hydroxylázy dochádza k premene 25(OH)-vitamínu D<sub>3</sub> na hlavný metabolit 1,25 (OH)<sub>2</sub>-vitamín D<sub>3</sub> (2).

Podobne je aktivovaný aj vitamín D<sub>2</sub>. Zatiaľ čo dominantným aktivátorom tohto enzýmu je parathormón, najvýraznejšími inhibítormi sú kalcium, fosfát a 1,25 (OH)<sub>2</sub>-vitamín D<sub>3</sub>. Centrálny enzým metabolizmu vitamínov D<sub>3</sub> a D<sub>2</sub>; 1- $\alpha$ -hydroxyláza – je aktivovaný stimuláciou špecifických receptorov v epitelových bunkách obličkových kanálikov cestou klasických i novo objavených bunkových poslov (2).

Vitamín D a jeho hydroxylované metabolity sú lipofilné látky, málo rozpustné vo vode. Podliehajú enterohepátalnému obehu. Lipofilné molekuly sú v plazme prenášané k cieľovým tkanivám transportnými bielkovinami. Najdôležitejšie z nich sú  $\alpha$ 1-globulín a špecifický proteín viažuci vitamín D- transkalciferín (DBP-vitamín D binding protein). DPB sa vyznačuje vysokou afinitou zvlášť k 25(OH)-vitamínu D<sub>3</sub>. Naopak, pomerne slabo viaže 1,25 (OH)<sub>2</sub>-vitamín D<sub>3</sub>, čím sa tento hormón stáva biologicky ľahko dostupný (2).

Metabolizmus 25(OH)-vitamínu D<sub>3</sub> je pomerne pomalý a spätná väzba regulácie jeho produkcie menej tesná. Z tohto dôvodu sa hladina 25(OH)-vitamínu D<sub>3</sub> v sére zvyšuje úmerne s príjmom vitamínu D; je tak dobrým ukazovateľom metabolizmu celkového množstva vitamínu D v organizme. Väčšina merateľného vitamínu D ( $\geq 95\%$ ) v sére sa nachádza vo forme 25(OH)-vitamínu D<sub>3</sub>, zatiaľ čo 25(OH)-vitamín D<sub>2</sub> sa objavuje iba u suplementácie vitamínom D<sub>2</sub>.

Vitamín D je dôležitým diagnostickým ukazovateľom metabolizmu kostí v kombinácii s parathormónom a ďalšími kostnými ukazovateľmi. Nedostatok vitamínu D je najbežnejšou príčinou sekundárnej hyperparathyroidózy, ale aj následkom vzniku ďalších ochorení.

Možnosti stanovenia vitamínu D vychádzajú z jeho fyzikálno-chemických vlastností:

**Chemické metódy** (fotometrické a fluorimetrické) sú málo citlivé a špecifické a sú limitované koncentráciou a čistotou vzorky, ktorá nesmie obsahovať ďalšie vitamíny rozpustné v tukoch (napr. vitamín A).

**Chromatografické metódy** (príklady sú v tabuľke 1). Výhodou týchto metód je ich špecifita a selektivita, nevýhodou technická a časová náročnosť.

**Tab. 1. Príklady stanovenia vitamínu D chromatografickými metódami**

Analyt	Metóda, materiál	Príprava vzorky	detekcia
25(OH) - vitamín D <sub>2</sub> , 25(OH) - vitamín D <sub>3</sub>	GC, plazma	Deproteinácia acetonitrilom, SPE: C18 silica	MS
1,25 (OH) <sub>2</sub> - vitamín D <sub>3</sub>	GC, plazma	Deproteinácia chloroform Metanol, Sephadex LH-20	MS
25(OH) - vitamín D <sub>3</sub>	LC, fortifikované mlieko	Extrakcia etanol +NH <sub>4</sub> OH+dietyéter+ hexán Zorbax Si 10 µm Hexan-2-propanol(98:2)	UV 265 nm
25(OH) - vitamín D <sub>2</sub> 25(OH) - vitamín D <sub>3</sub>	LC, sérum	Deprot.acetonitril, SPE: C18, Zorbax Si 0µm Hexan-2-propanol (98:2)	UV 254 nm
25(OH) - vitamín D <sub>2</sub> 25(OH) - vitamín D <sub>3</sub>	LC, sérum	Deproteinácia metanolom Extrakcia hexánom Ultrasil ODS, 10µm	UV 264 nm

Legenda:

GC - plynová chromatografia, LC - kvapalinová chromatografia, MS - hmotnostná spektrometria

**Imunochemické metódy.** Výhodou je aj krátka doba analýzy a možnosť aplikácie na autoamtické analyzátory. V tabuľke 2 sú príklady niektorých imunochemických metód.

V našej práci sme stanovili 25(OH)-vitamín D<sub>3</sub> dvoma metódami, ktoré boli uvedené v minulom roku (2007) do klinickej laboratórnej praxe. Úlohou bolo porovnať analytické možnosti, výhody a nevýhody, validačné charakteristiky metód založených na rôznych princípoch stanovenia.

## MATERIÁL A METÓDY

25(OH)-vitamín D<sub>3</sub> sme stanovili v súbore 77 premenopauálnych žien vo veku 20-40 rokov HPLC systémom (LC-20 AD, SHIMADZU - Japonsko) s UV detekciou a diagnostickou súpravou firmy Chromsystems. Ako biologický materiál sme použili sérum získané odberovou súpravou so separačným gélom. Odber sa robil v jesenných mesiacoch roku 2007.

Princípom HPLC metódy je izolácia 25(OH)-vitamínu D<sub>3</sub> a 25(OH)-vitamínu D<sub>2</sub> zo séra deproteináciou, s následnou niekoľkonásobnou selektívnou extrakciou pomocou SPE kolóniek. Po premytí a elúcii SPE kolóniek sa získaný eluát separuje na analytickej kolóne izokratickým systémom, pričom sa obidva metabolity, 25(OH)- vitamín

**Tab. 2. Príklady stanovenia vitamínu D imunochemickými metódami**

Analyt	Metóda, materiál	Príprava vzorky, kolóna	Detekcia
25(OH) - vitamín D <sub>3</sub>	RIA plazma	Deproteinácia acetonitrilom, Nucleosil-10-NO <sub>2</sub> , 10µm	Kompetitívna reakcia
1,25 (OH) <sub>2</sub> - vitamín D <sub>3</sub>	RIA plazma	Extrakcia benzénom RSIL-silica, 5 µm Hexan-2-propanol	Kompetitívna reakcia
25(OH) - vitamín D <sub>3</sub> 1,25 (OH) <sub>2</sub> - vitamín D <sub>3</sub> 24,25(OH) <sub>2</sub> - vitamín D <sub>3</sub>	RIA plazma	Deproteinácia Metanol-HCl, SPE C18	Kompetitívna reakcia
25(OH) - vitamín D <sub>3</sub> (ROCHE)	Chemiluminiscencia sérum	Bez úpravy	Kompetitívna reakcia

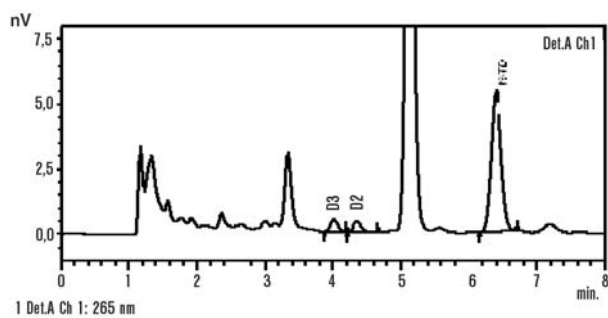
D<sub>3</sub> a 25(OH)- vitamín D<sub>2</sub> detegujú na UV-VIS detektore pri 264 nm.

Technicky náročným krokom je príprava vzorky. K analýze je potrebných 500 mikrolitrov vzorky (sérum, plazma, kalibrátor, kontrola). Schéma prípravy vzorky na stanovenie obsahuje 2 kroky - extrakciu rozpúšťadlom a následne fázu čistenia na chromatografickej SPE kolónke. Záleží na polarite použitého rozpúšťadla, či extrakcia zahŕňa vitamín D vrátane jeho metabolitov, alebo je orientovaná selektívne.

Stabilita pripravenej vzorky je 2 týždne pri teplote 2-8 °C bez prístupu svetla. Obidva metabolity vitamínov kvantifikujeme na interný štandard (4).

Druhou metódou bola bolo stanovenie súpravou firmy Roche na imunochemickom analyzátore Modular E170 (Roche, Švajčiarsko), založenou na princípe kompetície s elektrochemiluminiscenčnou (ECL) detekciou.

Elektrochemiluminiscencia je proces, v ktorom je chemiluminiscenčná reakcia a následná emisia svetla zo zlúčeniny ruténia iniciovaná elektricky, a to vystavením roztoku vzorky elektrickému napätiu. Dve elektrochemicky aktívne substancie - ruténium značená protilátka a tripropylamín (TPA), ktorý je zložkou meracieho tlmivého roztoku, vstupujú do reakcií, ktorých dôsledkom je emisia svetla. Ión ruténium-tris(bipyridyl)<sup>2+</sup> v excitovanom stave prechádza do pôvodného stabilného stavu. Do excitovaného stavu sa dostáva redukciou Ru(bpy)3<sup>3+</sup> na Ru(bpy)3<sup>2+</sup>. Redukcia je sprostredkovaná TPA. Na povrchu elektródy je TPA oxidovaný na TPA•+ - kladne nabitý radikál, ktorý samovoľne uvoľňuje protón, čím sa stáva nestabilným. Tento radikál v ďalšom kroku odovzdáva svoj elektrón komplexu Ru(bpy)3<sup>3+</sup>, ktorý tak prechádza do excitovaného stavu Ru(bpy)3<sup>2+</sup>. Excitovaný stav sa stráca emisiou svetla detegovateľnou pri 620 nm. Obe reakcie prebiehajú súčasne. Tento efekt sa dosiahne aplikovaním napätia na imunochemický komplex, ktorý je pritiažený



Detektor UV-VIS 265 nm

Analyt	Retenčný čas (min.)	Koncentrácia (µg/l)
25(OH) - vitamín D <sub>3</sub>	4,011	29,348
25(OH) - vitamín D <sub>2</sub>	4,348	28,443
Interný štandard	6,397	0,000

Obr. 1. Chromatografické stanovenie vitamínu D

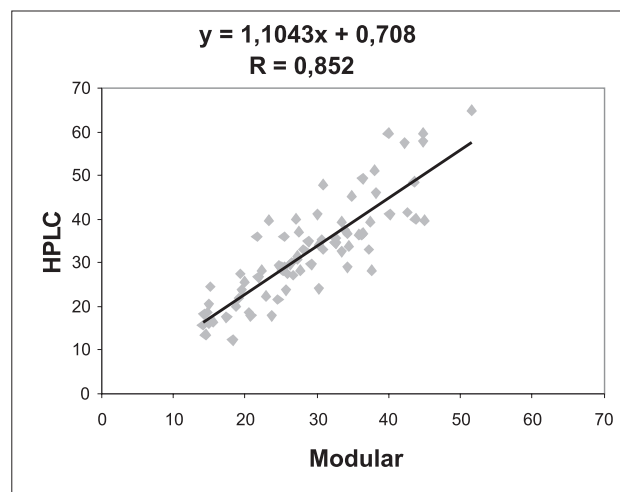
väzbou na magnetickej častici k povrchu elektródy v meracej cele systému (5).

V prípade stanovenia vitamínu D<sub>3</sub> diagnostickou súpravou firmy Roche ide o kompetitívnu elektrochemiluminescenciu: 25(OH)-vitamín D<sub>3</sub> vo vzorke (35 µl) (za súčasnej deaktivácie väzbového proteínu) súťaží s biotínom značeným vitamínom D<sub>3</sub> o väzbové miesto špecifickej protilátky značenej ruthénium (6). Vytvorený imunokomplex je v ďalšom kroku naviazaný na magnetické mikročastice potiahnuté streptavidínom. Reakčná zmes je nasatá do meracej cely, kde sú mikročastice zachytené magnetickým poľom na povrchu elektródy a následne dochádza ku detekcii už vyššie spomínaným procesom elektrochemiluminescencie.

Výsledky sú vyhodnotené na základe kalibračnej krivky. Reagencie sú vybavené čiarovým kódom, ktorý slúži nielen na automatickú identifikáciu príslušnej súpravy, ale zároveň obsahuje aj údaje týkajúce sa balenia (vyžadovanú technológiu, pipetované objemy, parametre základnej kalibračnej krivky, atď.) (7). Test je štandardizovaný oproti kvapalinovej chromatografii s tandemovou hmotnostnou spektrometrickou detekciou LC-MS-MS (6).

## VÝSLEDKY

25(OH)-vitamín D<sub>3</sub> sme vyšetrili v súbore 77 premenopauzálnych žien vo veku 20–40 rokov. Výsledky sa pohybovali v rozsahu od 12,3 µg/l do 64,9 µg/l. Porovnaním metód sme získali koreláciu ( $y = 1,1043x + 0,708$ )  $R = 0,852$  (obr. 2). Výsledky získané metódou založenou na princí-



	N	Min (µg/l)	Max (µg/l)
ECL	77	14,1	51,5
HPLC	77	12,3	64,9

Obr. 2. Korelácia medzi výsledkami ECL a HPLC metódy

pe ECL vykazujú v priemere 13% negatívnu odchýlku od výsledkov získaných metódou HPLC. Nespornou výhodou HPLC metódy je simultánne stanovenie aj metabolitu 25(OH)-vitamín D<sub>2</sub> (obr 1), čo však má význam iba u pacientov suplementovaných vitamínom D<sub>2</sub>.

## DISKUSIA

25(OH)-vitamín D<sub>3</sub> sme merali metódami s rôznym princípom stanovenia. Meranie HPLC systémom je technicky náročné. Dôležitým krokom je manuálna príprava vzorky, ktorej spotreba (500 µl) je oproti stanoveniu ECL princípom (35 µl) oveľa väčšia. Výhodou HPLC metódy je možnosť stanoviť súčasne aj 25(OH)-vitamín D<sub>2</sub>. Má tiež širší merací rozsah (1,4–250 µg/l).

Pri stanovení 25(OH)-vitamínu D<sub>3</sub> diagnostickou súpravou firmy Roche odpadá práca s predprípravou vzorky, výrazne sa tak skráti čas analýzy (z 3,5 hodín na 18 minút!). Proces je automatizovaný a je možnosť pracovať s primárnou skúmavkou.

## ZÁVER

Porovnaním výsledkov HPLC a ECL metód sa zistila pomerne dobrá korelácia. Napriek tomu, že HPLC metóda patrí medzi doporučované metódy, automatizované stanovenie 25(OH)-vitamínu D<sub>3</sub> princípom ECL prináša nesporné množstvo výhod pre dennú laboratórnu prax.

## LITERATÚRA

1. **Holick M.:** Vitamin D: the underappreciated D-lightful hormone that is important for skeletal and cellular health. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 2002; 9 (1), 87–98.
2. **Vávrová J. a kol.:** Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi: Vitaminy a stopové prvky 2007, 35–40, 52, 61–62.
3. **Hart G.R. et al.:** Measurement of vitamin D Status: background, clinical use and methodologies. *Clin Lab* 2006; 52, 335–343.
4. **Aplikačný manuál firmy Chromsystems.**
5. **Operator's Manual cobas e 411 analyzer, Roche.**
6. **Atest (príbalový list) Elecsys® Vitamin D3 25 (OH), Roche.**
6. **Heriban V.:** Elecsys® - nové možnosti bioanalytika v imunochemickej analýze, *Labotatórna diagnostika* 1997 (2), 83–87.

---

## KONCENTRÁCIE VITAMÍNU D U PREMENOPAUZÁLNYCH ŽIEN NA SLOVENSKU

---

ANNA STECOVÁ<sup>1</sup>, EVA BÁTOROVÁ<sup>1</sup>, JURAJ PAYER<sup>2</sup>  
ZDENKO KILLINGER<sup>2</sup>, PETER KILIÁN P.<sup>1</sup>,  
EDITA DOBÁKOVÁ<sup>1</sup>, ZLATICA KMEČOVÁ<sup>3</sup>,  
PAVOL MASARYK<sup>4</sup>, VIERA SPUSTOVÁ<sup>5</sup>,  
SOŇA TOMKOVÁ<sup>6</sup>, PETER VAŇUGA<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Laboratórna diagnostika Medirex, a.s., Bratislava

<sup>2</sup>V. interná klinika Lekárskej fakulty

Univerzity Komenského a Fakultnej nemocnice, Bratislava

<sup>3</sup>Roosveltova FNŠP, Banská Bystrica

<sup>4</sup>NURCH Piešťany

<sup>5</sup>SZU Bratislava

<sup>6</sup>Osteocentrum Košice-Šaca

<sup>7</sup>NEDU Lubochňa

### SÚHRN

Zo skupiny vitamínov D sú najdôležitejšie vitamín D<sub>3</sub> (cholecalciferol) a vitamín D<sub>2</sub> (ergocalciferol). Väčšinu potrebného vitamínu D<sub>3</sub> si organizmus tvorí v koži účinkom ultrafialového žiarenia na 7-dehydrocholesterol. Iba malú časť prijíma potravou živočíšneho pôvodu, ako sú vaječný žltok alebo olej z rybej pečene. V organizme sa nachádzajú v niekoľkých formách: 25(OH)-vitamín D<sub>3</sub> a 25(OH)-vitamín D<sub>2</sub> sú najdôležitejšími metabolitmi vitamínov D nachádzajúcich sa v krvi a sú odrazom ich zásob v organizme. V spolupráci s osteocentrami v Košiciach, Lubochni, Banskej Bystrici, Piešťanoch a Bratislave sme urobili epidemiologickú štúdiu, ktorej cieľom bolo zistiť koncentrácie 25(OH)-vitamín D<sub>3</sub> v populácii premenopauzálnych žien na Slovensku. Štúdie sa zúčastnilo 162 zdravých žien vo veku 23–41 rokov. Odber materiálu sa robil v jesenných mesiacoch roku 2007, sérum bolo až do vyšetrenia zmrazené pri -20°C. Analýzy sa robili vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou (LC-20 AD, Shimadzu- Japonsko) s UV detekciou, reagenčným kítom firmy Chromsystems. Hodnoty 25(OH)-vitamínu D<sub>3</sub> sa pohybovali v rozmedzí 32,58 ± 12,25 µg/l (priemer ± SD). Rozdelenie hodnôt nebolo gausovské, krivka bola posunutá k nižším hodnotám. 49,38 % žien mala hodnoty nižšie ako 30 µg/l, najnižšie koncentrácie boli u žien vo veku 38–43 rokov, najvyššie koncentrácie boli u žien vo veku 23–25-ročných, rozdiely však neboli štatisticky významné.

**Záver: Deficit 25(OH)-vitamín D<sub>3</sub> sme našli až u 49,38 % sledovaných zdravých slovenských premenopauzálnych žien.**

### SUMMARY

Vitamin D<sub>3</sub> (cholecalciferol) and vitamin D<sub>2</sub> (ergocalciferol) are the most important members of vitamin D family. They are produced in the skin by UV radiation. Only a small amount is naturally present in a limited number of foods, such as egg yolks and fish liver oils. Vitamin D is metabolised in the organism and its form 25(OH)-vitamin

D, present in the blood, is the best indicator of vitamin D status. In cooperation with osteologic centers in 6 Slovak towns (Košice, Stará Ľubochňa, Banská Bystrica, Piešťany and Bratislava), we carried out an epidemiologic study examining 25(OH)-vitamin D<sub>3</sub> levels in pre-menopausal women in Slovakia. Blood of 162 healthy women (23–41 years) was drawn in the morning during the autumn of 2007. Serum was stored frozen at -20°C. The analysis was performed by HPLC with UV detection (LC-20 AD, Shimadzu, Japan), using reagent kits available from Chromsystem. The average concentration of 25(OH)-vitamin D<sub>3</sub> was 32,58 ± 12,25 µg/l (mean ± SD). Distribution of results was non-Gaussian, there was a shift to lower levels. 49,38% of examined women had concentrations of 25(OH)-vitamin D<sub>3</sub> below 30 µg/l. Although the older women (38–43 years) had the lowest concentrations in comparison with the younger ones (23–25 years), the differences were not statistically significant. Conclusion: We found a significant deficit of 25(OH)-vitamin D<sub>3</sub> in 49,38% of healthy pre-menopausal women in Slovakia.

### ÚVOD

Vitamín D je syntetizovaný v koži účinkom ultrafialového žiarenia typu beta (UVB) pri vlnovej dĺžke 290–315 nm. Najvyššia účinnosť je pri vlnovej dĺžke 295–297 nm (7). Táto forma žiarenia sa vyskytuje v našich podmienkach iba na jar a v lete, keď slnečné lúče dopadajú na Zem pod uhlom väčším ako 45 stupňov. Predpokladá sa, že dostatočná syntéza vitamínu D<sub>3</sub> je zabezpečená pri pobyte na slnku približne 5–30 min 2-krát týždenne, ak je odhalená tvár, ruky, prípadne nohy alebo chrbát a nie sú použité opalovacie krémy s ochrannými faktormi (1). Krém s ochranným faktorom 8 znižuje syntézu vitamínu D o 95 %, s ochranným faktorom 15 až o 99 % (7).

Až 90%–100% vitamínu D je tvorených týmto spôsobom. Vitamín D<sub>3</sub>, cholecalciferol, vzniká zo 7-dehydrocholesterolu, ktorý je živočíšneho pôvodu, vitamín D<sub>2</sub>, ergocalciferol, vzniká z ergosterolu, ktorý má rastlinný pôvod. Takto vzniknuté vitamíny D sú biologicky neaktívne. Aktívnymi sa stávajú až po ich 25-hydroxylácii v pečeni a nasledujúcej 1-hydroxylácii v obličkách. Biologicky najúčinnjšou formou je 1-alfa, 25-dihydro-cholecalciferol, 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamín D<sub>3</sub>. Odrazom zásob vitamínu D v organizme je jeho forma 25(OH)-vitamín D<sub>3</sub>.

UV žiarenie 290–315 nm spôsobuje otvorenie beta-kruhu 7-dehydrocholesterolu s premiestnením dvojitych väzieb, čím vzniká pre-vitamín D<sub>3</sub>. Tento je okamžite zachytený membránou epidermálnych keratinocytov a fibroblastov, kde sa pod vplyvom telesnej teploty mení na stabilnejší vitamín D<sub>3</sub>. V priebehu tohto procesu je zároveň vitamín D<sub>3</sub> vylúčený z plazmatickej membrány do krvného riečiska a naviazaný na vitamín D-viažúci proteín (7). Prolongovaný pobyt na slnku nevedie k excesívnej produkcii vitamínu D, pretože nadbytočné množstvo sa ihneď mení na neúčinné formy, lumisterol a tachysterol (10).

Menšie množstvo vitamínu D<sub>3</sub> sa prijíma v tuku rýb (losos, tuniak, makrela) a vo vaječnom žltku, i keď množstvo



vitamínu D<sub>3</sub> je tu veľmi variabilné (7). Vynikajúcim zdrojom vitamínu D<sub>3</sub> je trešcia pečeň (7). Malé množstvá sa nachádzajú aj v hovädzej pečeni a syroch (1). Vitamín D<sub>2</sub> obsahujú predovšetkým kvasnice a niektoré huby po ožiarení UV žiarením. Vitamín D<sub>3</sub> sa považuje za biologicky účinnejší (1).

### Účinky vitamínu D

Vitamín D pôsobí cestou receptora pre vitamín D (VDR) v jadre bunky viacerých cieľových orgánov, napr. mozog, srdce, koža, gonády, prostata, prsia, črevo, obličky, kosti, prištítna telieska, monocyty, T a B bunky a ďalšie (8). Spojením vitamínu D a VDR vzniká transkripčný faktor modulujúci expresiu génov transportných proteínov (TRPV6, calbindín), ktoré ovplyvňujú absorpciu vápnika v čreve, udržiavanie rovnováhy vápnika a fosforu (bez vitamínu D sa resorbuje iba 10–15 % prijatého vápnika a 60 % fosforu), proliferáciu a diferenciáciu buniek, imunitný systém. Vitamín D cez calbindín má kľúčovú úlohu v udržiavaní rovnováhy vápnika:

- a) zvyšuje účinnosť resorpcie vápnika a fosforu z tenkého čreva stimuláciou vstupu vápnika do enterocytov a zvýšením jeho prechodu z enterocytov do krvného obehu,
- b) zvyšuje resorpciu vápnika z kostí,
- c) reguluje hladinu PTH,
- d) ovplyvňuje syntézu proteínov kostnej matrix (osteocalcín, kolagén typ I, alkalická fosfatáza, osteopontín).

V prípade nedostatku vápnika v strave 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamín D interaguje s receptormi na osteoblastoch a indukuje expresiu receptora aktivujúceho ligand nukleárneho faktoru  $\kappa$ B, ktorý zasa interaguje s receptorom na preosteoklastoch, čím indukuje ich premenu na osteoklasty (7).

Vitamín D stimuluje diferenciáciu buniek a znižuje ich proliferáciu. Je považovaný za potentný imunomodulátor. Bolo zistené, že VDR sa nachádza na väčšine imunokompetentných buniek. 25(OH)-1-hydroxyláza je okrem obličiek produkovaná aj v epiteliálnych, mezenchymálnych a imunokompetentných bunkách, ktoré sú preto schopné tvoriť aktívny 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamín D. Sú štúdie, ktoré dokazujú, že vitamín D zvyšuje získanú imunitu a znižuje sklon k autoimúnnym ochoreniam (4, 25). Koncentrácia 25(OH)-vitamínu D<sub>3</sub> je signifikantným nezávislým prediktorom rizika vzniku karcinómov, pretože aktivita extrarenálnej 25(OH)-1-hydroxylázy je závislá na koncentrácii 25(OH)-vitamínu D<sub>3</sub>, ktorý je jej substrátom (5, 26). Epidemiologické dáta zamerané na kolorektálne karcinómy a adenómy ukazujú na protektívny účinok vyšších koncentrácií vitamínu D (15).

VDR sa nachádza na inzulín-sekrétujúcich bunkách Langerhansových ostrovčekov pankreasu. Predpokladá sa, že vitamín D zvyšuje sekréciu inzulínu pri jeho zvýšených požiadavkách. Deficit vitamínu D je spojený so zníženou sekréciou inzulínu a poruchou glukózovej tolerancie (23). 1,25(OH)<sub>2</sub> - vitamín D tiež znižuje expresiu génu pre renín, čím znižuje riziko vysokého tlaku. Štúdie ukazujú inverznú asociáciu medzi stavom vitamínu D v organizme a krvným tlakom (6, 22).

Na základe medicíny založenej na dôkazoch sa udáva, že na udržiavanie homeostázy vápnika je potrebná hladina

25(OH)-vitamínu D najmenej 20 µg/l. Táto zabezpečuje, aby nedošlo k rozvoju sekundárnej hyperparatyroidózy. Na správny metabolizmus kostí, ako aj na zabezpečenie ostatných spomínaných funkcií vitamínu D, je nutná najmenej koncentrácia 30 µg/l (8).

### CIELE PRÁCE

Vzhľadom k významu vitamínu D sme robili štúdiu, úlohou ktorej bolo zistiť koncentrácie 25(OH)-vitamínu D<sub>3</sub> u zdravej populácie premenopauzálnych slovenských žien. 25(OH)-vitamín D<sub>3</sub> je najdôležitejším cirkulujúcim metabolitom vitamínu D<sub>3</sub>. Hoci aktívnou formou je 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamín D<sub>3</sub>, jeho stanovovanie nie je vhodné na posúdenie stavu vitamínu D. Pri deficite 25(OH)-vitamínu D<sub>3</sub> vzniká porucha resorpcie vápnika v čreve, s nasledujúcim uvoľnením PTH do cirkulácie. Zvýšený PTH zabezpečuje obnovu koncentrácie vápnika zvýšením jeho reabsorpcie v obličkách, mobilizácie z kostí a zvýšenou produkciou 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamínu D<sub>3</sub>. Koncentrácia 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamínu D<sub>3</sub> je preto pri deficite vitamínu D v organizme zvyčajne normálna alebo dokonca zvýšená (24).

### Probandi a metódy:

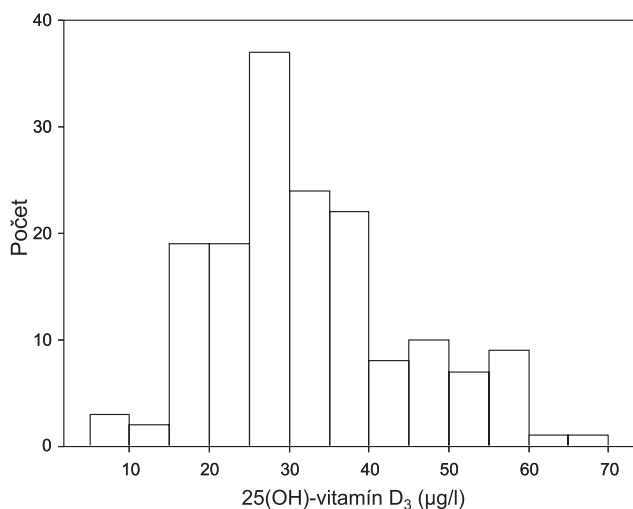
Štúdie sa zúčastnilo 6 osteologických centier na Slovensku – Košice, Lubochňa, Banská Bystrica, Piešťany a 2 centrá v Bratislave. Spolu sme vyšetrili 162 zdravých žien vo veku 23–41 rokov. U žiadnej z nich neboli prítomné rizikové faktory osteoporózy. Sledované ženy neužívali žiadne lieky a mali normálnu kostnú densitu (vyšetrenú pomocou DXA). Odber krvi sa robil v jednotlivých centrách ráno nalačno v jesenných mesiacoch roku 2007, sérum bolo až do vyšetrenia zmrazené pri –20 °C.

Analýzu 25(OH)-vitamínu D<sub>3</sub> sme robili vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou (LC-20 AD, Shimadzu – Japonsko) s UV detekciou, reagenčným kitom firmy Chromsystems.

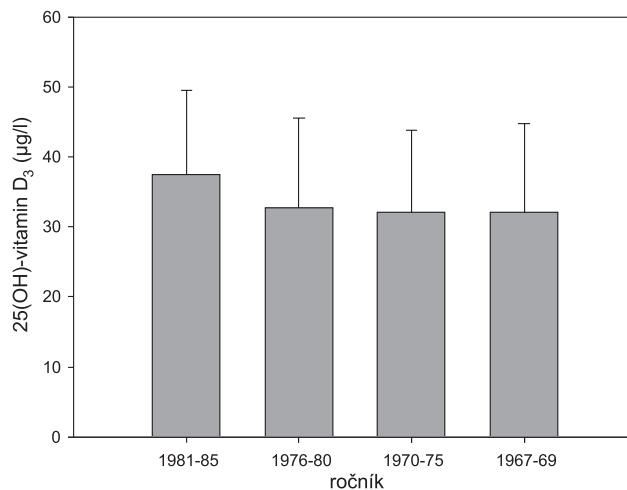
Štatistické spracovanie sa robilo za pomoci programov Microsoft Excel a Systat SigmaStat. Hodnoty koncentrácií boli vyjadrené ako priemer ± smerodajná odchýlka.

### VÝSLEDKY

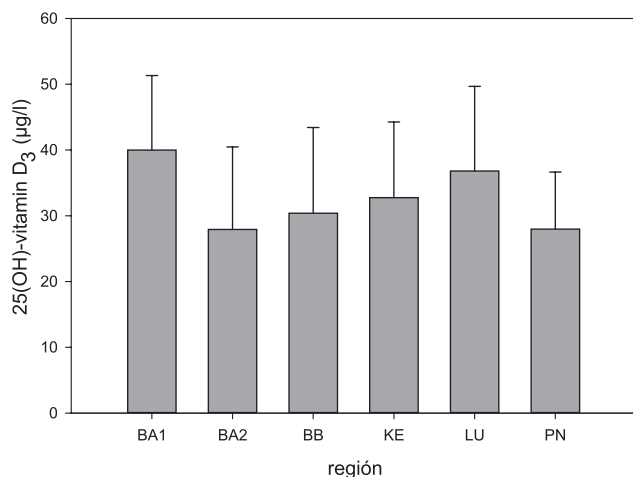
Výsledky sú uvedené v tabuľke č. 1. Medián aj priemer hodnôt sú na dolnom rozmedzí doporučenej koncentrácie 25(OH)-vitamínu D<sub>3</sub> pre zdravú populáciu (30–80 µg/l). Grafické znázornenie ukazuje, že rozdelenie hodnôt nie je gausovské, koncentrácie sú posunuté k nižším hodnotám (graf č. 1). Mladšie ženy mali koncentrácie vyššie, ako ženy vo vyšších vekových skupinách, ale rozdiely neboli štatisticky významné (graf č. 2). Distribúciu rozdelenia v závislosti na regionálnom členení ukazuje graf č. 3. Nenachádzame rozdiely v koncentráciách 25(OH)-vitamínu D<sub>3</sub> v jednotlivých regiónoch Slovenska. Tabuľka č. 2 a graf č. 4 ukazuje rozčlenenie súboru z hľadiska deficitu 25(OH)-vitamínu D<sub>3</sub>, 49,38 % sledovaných žien malo hodnoty 25(OH)-vitamí-



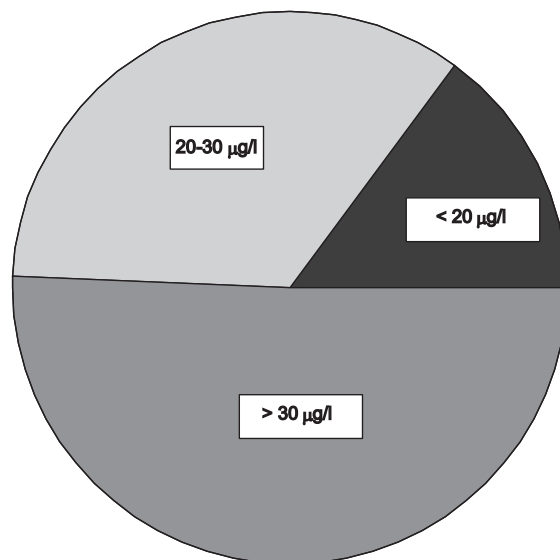
**Graf 1. Histogram hodnôt 25(OH)-vitamínu D<sub>3</sub> u zdravých premenopauzálnych slovenských žien**



**Graf 2. Koncentrácie 25(OH)-vitamínu D<sub>3</sub> v závislosti na veku**



**Graf 3. Distribúcia hodnôt 25(OH)-vitamínu D<sub>3</sub> v regiónoch**



**Graf 4. Distribúcia hodnôt 25(OH)-vitamínu D<sub>3</sub> v sledovanom súbore**

**Tab. 1. Koncentrácie 25(OH)-vitamínu D<sub>3</sub> u zdravých premenopauzálnych žien**

n	medián	priemer	SD	5. percentil	95. percentil
162	30,21	32,58	12,25	16,2	57,47

Údaje sú v µg/l

**Tab. 2. Distribúcia hodnôt 25(OH)-vitamínu D<sub>3</sub>**

25(OH)-vitamín D <sub>3</sub>	n	(%)
< 20 µg/l	24	14,81
20-30 µg/l	56	34,57
> 30 µg/l	82	50,62

nu D<sub>3</sub> pod doporučenou hladinou 30 µg/l. 24 žien (14,81 %) malo jasný deficit 25(OH)-vitamínu D<sub>3</sub> s koncentráciou pod 20 µg/l.

## DISKUSIA

Výšetrenia 25(OH)-vitamínu D<sub>3</sub> sa robili na začiatku jesenného obdobia, keď aj v našich podmienkach jeho koncentrácie u zdravej mladej populácie odzrkadľujú expozíciu slnečnému žiareniu, a teda jeho tvorbu v lete, a mali by byť v doporučených hodnotách. Koncentrácie vitamínu D bývajú v tomto období najvyššie, samozrejme, závisia od dĺžky pobytu vonku (16). Ukazuje sa, že vyššie koncentrácie vitamínu D v septembri korelujú s vyššími koncentraciami

v marci, takže vyšší príjem a tvorba vitamínu D v letnom období pomáha udržať jeho hladiny aj v zime (14). V súčasnosti sa veľa mladých ľudí venuje aj v lete predovšetkým aktivitám vo vnútri, čo sa spája s vyššou prevalenciou deficitu vitamínu D (16, 17). Deficit vitamínu D sa neobjavuje iba v rizikových skupinách (stari ľudia, minoritné skupiny, ap.), ale aj u ľudí v mladom a strednom veku. Vo Veľkej Británii až 60% populácie malo suboptimálne hodnoty vitamínu D v priebehu roka (16). V štúdií s adolescentnými dievčatami sa pozorovali insuficientné hladiny až u 48% sledovaných (14). Dokonca aj na slnečnej Floride sa zistil deficit vitamínu D u vysokého percenta žien (11).

Pohľad na doporučené koncentrácie je kontroverzný - na základe štúdií sa predpokladá, že koncentrácia 25(OH)-vitamínu D<sub>3</sub> by nemala byť nižšia, ako 20 µg/l, ak sa má predísť problémom s kostným metabolizmom. Niektorí autori doporučujú 30 µg/l, ako hodnotu dôležitú pre zdravú diferenciáciu buniek a ostatné účinky vitamínu D, predovšetkým zabránenie sekundárnej hyperparatyroidóze (8). Pri tomto cut-off sa však predpokladá, že vysoké percento populácie, v Európe až 80% a celosvetovo 50%, bude mať deficit vitamínu D (9). V našej štúdií je prekvapujúce, že po skončení letnej sezóny mala polovica sledovaných žien hodnoty nižšie, ako 30 µg/l a asi 14% dokonca nižšie, ako 20 µg/l. Je pritom známe, že UV žiarenie stimuluje epidermálnu produkciu a uvoľnenie beta-endorfinu, opioиду, ktorý sa za normálnych okolností uvoľňuje z hypofýzy a je zodpovedný za pocit príjemného stavu, napr. po dlhodobom cvičení (10). Na druhej strane, medzi nežiaduce účinky UV žiarenia patrí vyššia náchylnosť pokožky k starnutiu a tvorbe vrások, ako aj zvýšená prevalencia kožných nádorov. Kožné karcinómy tvoria až polovicu všetkých karcinómov u človeka (10). Nálezy, že opakované pobyty na slnku sú asociované so zvýšeným výskytom melanómu, viedli k doporučeniam, že excesívny pobyt na slnku treba vylúčiť (12). Výsledkom doporučení, ktoré bránili každému priamemu pobytu na slnku, je, že deficit vitamínu D sa stal pandemický (18). Zodpovedajú tomu aj nálezy v našej štúdií, kde sme nenašli rozdiely v koncentráciách 25(OH)-vitamínu D<sub>3</sub> v jednotlivých regiónoch Slovenska, na základe čoho predpokladáme vplyv používania krémov s ochrannými faktormi a nedostatočný čas venovaný aktivitám vonku. Bolo pritom vypočítané, že u osôb s kožným fototypom II je pobyt na letnom poludňajšom slnku v trvaní 5 minút 2-3krát týždenne adekvátnym časom na získanie dostatočného množstva vitamínu D (10).

Odpoveď kože na UV žiarenie, vznik karcinómov a invazívneho melanómu, ako aj fotosyntéza vitamínu D inverzne súvisia s farbou kože a obsahom melanínu (10). Je to z toho dôvodu, že melanín absorbuje časť UV žiarenia, ktoré je zodpovedné za fotochemické reakcie kože, ale aj za tvorbu vitamínu D. Opakovaná expozícia UV vedie tiež k alterácii imunitného systému a zmenám kožnej anatómie a zvýšenému výskytu infekcií. Najvyššie riziko poškodenia je u adolescentov a mladých ľudí so svetlou pokožkou (20). Na druhej strane sa ukazuje, že expozícia slnku je inverzne asociovaná s rizikom smrti na melanóm. Osoby, ktoré sa aspoň raz spálili a osoby, ktoré boli opakovane exponované

mali nižšiu pravdepodobnosť úmrtia na melanóm, ako osoby, ktoré neboli nikdy spálené slnkom alebo sa veľmi málo exponovali slnku (12). Z hľadiska pohľadia je u žien nižšie riziko vzniku melanómu, ako u mužov (12).

Adekvátna substitúcia vitamínom D je dôležitá v puberte a v mladom veku z hľadiska maximálnej tvorby kostnej hmoty. Toto obdobie je charakterizované rýchlym rastom a mineralizáciou kostí. Vitamín D hrá integrálnu úlohu v mineralizácii kostí jednak tým, že stimuluje resorpciu vápnika v čreve, ale aj stimuláciou aktivity osteoblastov (14). Kostná denzita je u dospelých pozitívne asociovaná s koncentraciami 25(OH)-vitamínu D (14). Táto závislosť je daná nielen v nižších, ale aj v normálnych koncentráciách vitamínu D, nad 40 µg/l, a to u mladých aj starších žien. V štúdií s libanonskými moslimskými ženami deficit vitamínu D viedol k zvýšenému kostnému obratu (21). Z ďalších faktorov, ktoré vitamín D ovplyvňuje, je závažná prevencia fraktúr, kde sa ukazuje, že optimálna koncentrácia vitamínu D, asociovaná s najnižšou prevalenciou fraktúr femuru a iných nonvertebrálnych fraktúr je okolo 36-40 µg/l (15). Hladina vitamínu D ovplyvňuje tiež správnu funkciu svalov, pravdepodobne tým, že 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamín D sa viaže na vitamín-D špecifický nukleárny receptor v svalovom tkanive, ktorého dôsledkom je syntéza proteínov, rast svalových buniek a zlepšenie svalovej funkcie (15, 19).

V niektorých krajinách, napr. v Kanade, USA a ďalších, sa z uvedených dôvodov robí fortifikácia potravín vitamínom D, resp. sa doporučuje primeraný príjem vitamínu D z iných zdrojov. Pre populáciu zdravých premenopauzálnych žien je to najmenej 200 UI denne (1). Niektorí autori udávajú oveľa vyššiu potrebu, až 800-1000 UI (27). Toto množstvo sa ešte zvyšuje pri rôznych patologických stavoch (ochorenia obličiek, osteoporóza, ap.), pričom treba brať do úvahy aj prípadnú prítomnú poruchu metabolizmu vápnika a zmeny v koncentráciách parathormónu. Holick a kol. však upozorňujú, že aj pri fortifikácii potravín musí byť zabezpečený adekvátny pobyt na slnku, vzhľadom k tomu, že obsah vitamínu D vo fortifikovaných potravinách nedokáže pokryť jeho dennú potrebu (27).

## ZÁVER

Vyšetrili sme hladiny 25(OH)-vitamínu D<sub>3</sub> u 162 zdravých premenopauzálnych žien a zistili sme jeho deficit u 49,38%. Zdá sa preto, že úloha osvetly, prípadne snaha o fortifikáciu potravín vitamínom D, bude v našich podmienkach nevyhnutná.

## LITERATÚRA

- Dietary Supplement Fact Sheet: Vitamin D.** Office of Dietary Supplements. National Institute of Health. <http://ods.od.nih.gov/factsheets/vitaminD.asp>
- Wolpowitz, D., Gilcrest, B.A.:** The vitamin D questions: how much do you need and how should you get it? *J Am Acad Dermatol* 2006, 54, 301-317.

- WU, K., Feskanich, D., Fusch, C. S., Wilent, W. C., Hollis, B. W., Giovanucci, E. L.:** A nested case control study of plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations and risk of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2007, 99 (14), 1120-9.
- Gonanjar, E., Sumariyono, Setiati, S., Setiyohadi, B.:** Vitamin D and autoimmune disease. *Acta Med Indones*, 2007, 39 (3), 133-41.
- Lappe, J. M., Travers-Gustafson, D., Davies, M. K., Recker, R. R., Heaney, R. P.:** Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomised trial. *Am J Clin Nutr*, 2007, 85 (6), 1586-1591.
- Scragg, R., Sowers, M. F., Bell, C.:** Serum 25-hydroxyvitamin D, ethnicity, and blood pressure in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Hypertension*, 2007, 20 (7), 713-719.
- Holick, M. F.:** Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune disease, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*, 2004, 80 (Suppl), 1678-88.
- Holick, M. F.:** Vitamin D: A millenium perspective. *J Cell Biochem*, 2003, 88, 296-307
- Bouillon, R., Norman, A. W., Lips, P.:** To the editor. *N Engl J Med* 357, 2007, 19.
- Lim, H. W., Gilchrest, B. A., Cooper, K. D., Bischoff-Ferrari, H. A., Rigel, D. S., Cyr, W. H., Miller, S., DeLeo, V. A., Lee, T. K., Demko, C. A., Weinstock, M. A., Young, A., Edwards, L. S., Johnson, T. W., Stone, S. P.:** Sunlight, tanning booths, and vitamin D. *J Am Acad Dermatol*, 2005, 52, 868-76.
- Cava, R. C.:** To the editor. *N Engl J Med* 357, 2007, 19
- Berwick, M., Armstrong, B. K., Ben-Porat, L., Fine, J., Kricke, A., Eberle, C., Barnhill, R.:** Sun exposure and mortality from melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2005, 97, 195-7.
- Baroncelli, G. I.:** To the editor. *N Engl J Med* 357, 2007, 19.
- Sullivan, S. S., Rosen, C. J., Haltzman, W. A., Chen, T. C., Holick, M. F.:** Adolescent girls in Maine are at risk for vitamin D insufficiency. *J Am Diet Assoc* 2005, 105, 971-974.
- Bischoff-Ferrari, H. A., Giovannucci, E., Willett, W. C., Dietrich, T., Dawson-Hughes, B.:** Estimation of optimal serum concentrations of 25-OH-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr* 2006, 84, 18-28.
- Hyppönen, E., Power, C.:** Hypovitaminosis D in British adults at age 45y: Nationwide cohort study of dietary and lifestyle predictors. *Am J Nutr* 2007, 85, 860-8.
- Tangpricha, V., Turner, A., Spina, C., Decastro, S., Chen, T. C., Holick, M. F.:** Tanning is associated with optimal vitamin D status (serum 25-hydroxyvitamin D concentration) and higher bone mineral density. *Am J Clin Nutr* 2004, 80, 1645-9.
- Vieth, R., Bischoff-Ferrari, H. A., Boucher, B. J.:** The urgent need to recommend an intake of vitamin that is effective. *Am J Clin Nutr* 2007, 85, 649-50.
- Bonnen, S., Bischoff-Ferrari, H. A., Cooper, C., Lips, P., Ljunggren, O., Meunier, P. J., Reginster, J. Y.:** Addressing the musculoskeletal components of fracture risk with calcium and vitamin D: a review of the evidence. *Calcif Tissue Int* 2008, 78, 257-70.
- Gilchrest, B. A.:** Sun protection and vitamin D: three dimension of obfuscation. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007, 103 (3-5), 655-63.
- Diamond, T. H., Levy, S., Smith, A., Day P.:** High bone turnover in Muslim women with vitamin D deficiency. *Med J Aust* 2002, 177, 139-141
- Li, Y. Ch., Kong, J., Wei, M., Chen, Z. F.:** 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a negative endocrine regulator of angiotensin system. *J Clin Invest* 2002, 110 (2), 229-238.
- Chiu, K. C., Chu, A., Go V. L. W., Saad, M. F.:** Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and  $\beta$  cell dysfunction. *Am J Clin Nutr* 2004, 79 (5), 820-825.
- Holick, M. F.:** High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc*, 2006, 81 (3), 353-373.
- DeLuca, H. F., Cantorna, M. T.:** Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB J*, 2001, 15, 2579-85
- Peterlik, M., Cross, H. S.:** Dysfunction of the vitamin D endocrine system as common cause for multiple malignant and other chronic disease. *Anticancer Res*, 2006 Jul-Aug, 26(4A), 2581-8.
- Holick, M. F.:** Sun exposure, vitamin D metabolism, and skin cancer - replay. *Mayo Clin Proc* 2004, 79, 694-709.

KALNOVIČOVÁ TERÉZIA  
TURČÁNI PETER

1. neurologická klinika  
Lekárskej fakulty UK a FNsP Bratislava

## SÚHRN

Kyselina močová (KM), prirodzene sa vyskytujúci produkt metabolizmu purínov, je antioxidantom - silným skvendžerom peroxynitritu, ktorý pôsobí toxicky na neuróny, axóny a gliálne bunky. Viaceré štúdie preukázali, že pacienti so sklerózou multiplex (SM) a tiež s retrobulbárnou neuritídou, ktorá býva často prvým príznakom SM, majú v porovnaní so zdravými osobami nižšie sérové hladiny KM. V práci sú prezentované experimentálnymi dôkazmi podložené predstavy o mechanizmoch, ktorými redukované hladiny KM môžu prispievať ku vzniku a progresii sklerózy multiplex.

**Kľúčové slová:** kyselina močová, skleróza multiplex, sérum

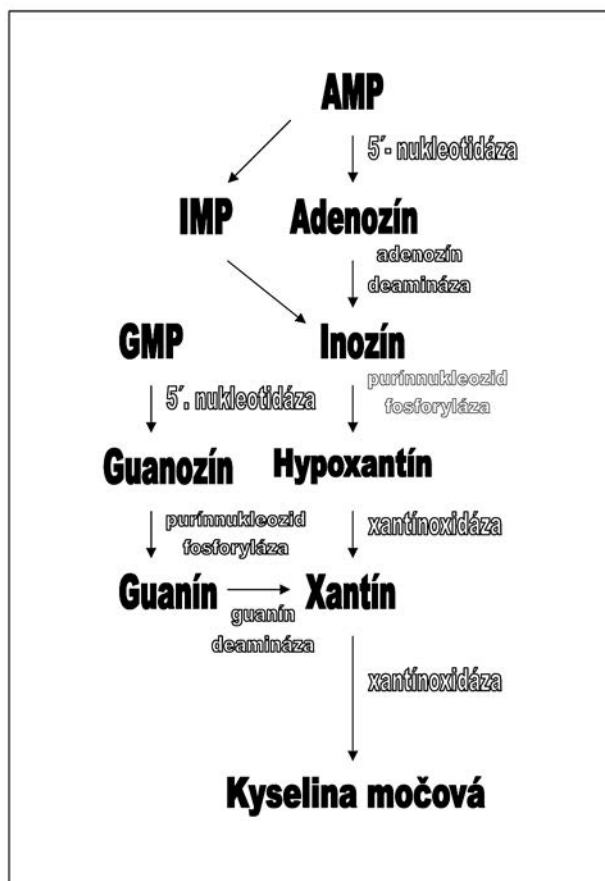
## SUMMARY

Uric acid (UA), the naturally occurring product of purine metabolism, is a strong peroxynitrite scavenger, which exerts a toxic effect on neurons, axons and glia cells and enhances apoptosis. Reduced serum uric concentrations have been linked to a variety of diseases states including multiple sclerosis (MS) and optic neuritis (ON) that is often the first symptom of MS. In this article we summarize some of the mechanisms by which low UA levels can be associated with the development and progression of MS.

**Key words:** uric acid, multiple sclerosis, serum

## ÚVOD

Kyselina močová je u človeka koncovým degradačným produktom purínových nukleotidov (obr. 1). Väčšina cicavcov degraduje kyselinu močovú na alantoin, ktorý vzniká z KM pôsobením urát oxidázy. Metódami molekulárnej biológie sa zistilo, že ľudia majú v oblasti génu pre urát oxidázu niekoľko „nonsense“ mutácií, a preto k expresii tohto génu u človeka nedochádza. Kyselina močová v ľudskom organizme nie je len odpadovým produktom metabolizmu purínov. Po primárnej filtrácii a sekrécii kyseliny močovej v obličkách sa jej



Obr. 1. Metabolizmus purínových nukleotidov.  
Vznik kyseliny močovej.

Degradácia adenozinmonofosfátu (AMP) na inozín sa môže uskutočniť dvomi cestami. AMP sa môže meniť pôsobením adenylátdeaminázy (EC 3.5.4.6) na inozínmonofosfát (IMP) a 5'-nukleotidázou (EC 3.1.3.5) defosforylovať na inozín. Druhou možnosťou je defosforylácia AMP enzýmom 5'-nukleotidáza na adenozin s následnou deamináciou účinkom adenozindeaminázy (EC 3.5.4.4.) na inozín. Inozín sa degraduje pôsobením purinnukleozidfosforylázy (EC 2.4.2.1.) na hypoxantín a pôsobením xantín oxidázy (EC 1.2.3.2.) na xantín a kyselinu močovú (KM). Vznik kyseliny močovej z guanozinmonofosfátu (GMP) sa uskutočňuje degradáciou GMP pôsobením enzýmu 5'-nukleotidáza so vznikom guanozínu, ktorý sa purinnukleotidfosforylázou konvertuje na guanín a guanindeaminázou (EC 3.5.4.3.) na xantín. Xantín môže vznikáť aj degradáciou guanozínu účinkom guanozindeaminázy (EC 3.5.4.15) a premenou vzniknutého xantozínu na xantín pôsobením enzýmu purinnukleozidfosforyláza

prevažná časť (asi 90%) spätne resorbuje do cirkulácie. Experimentálne štúdie in vitro jednoznačne dokázali jej významné antioxidantné vlastnosti. Kyselina močová pri fyziologických koncentráciách bráni tvorbe oxohémových oxidantov, ktoré vznikajú pri reakcii hemoglobínu s peroxidmi, chráni izolované membrány erytrocytov pred lipoperoxidáciou, zabraňuje lýze erytrocytov vplyvom peroxidického poškodenia a reaguje s mnohými reaktívnymi formami kyslíka, ktoré sa môžu tvoriť v orga-

nizme (1). Predpokladá sa, že fyziologickou úlohou KM u ľudí je udržiavať integritu hematoencefalickej bariéry (BBB) a zabráňovať jej poškodeniu vplyvom toxického peroxynitritu ( $\text{ONOO}^-$ ), ktorý je produkovaný aktivovanými monocytmi a je implikovaný v patogenéze rozmanitých zápalových ochorení centrálneho nervového systému, vrátane sklerózy multiplex (SM).

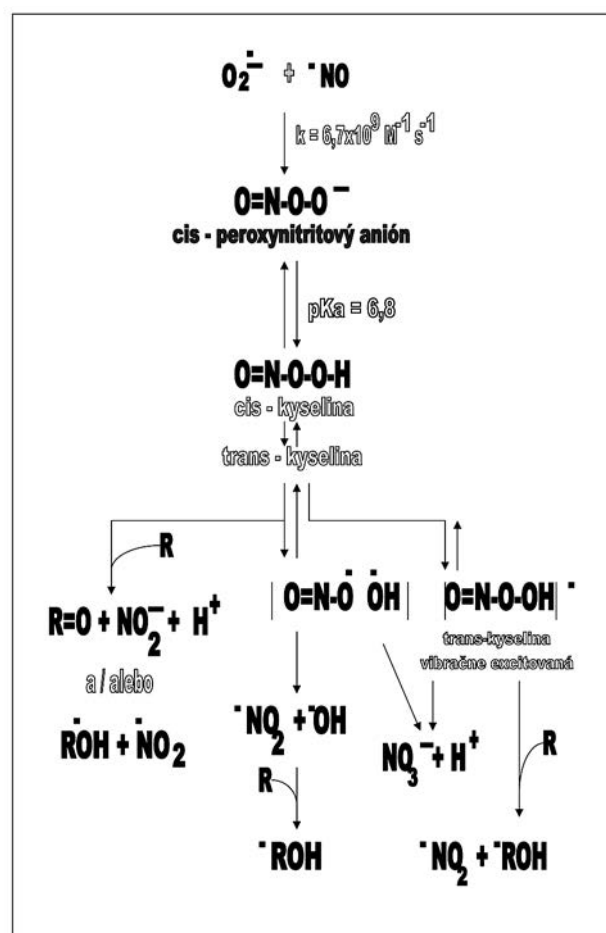
Zmeny v hladinách kyseliny močovej nad alebo pod fyziologické hodnoty sú asociované s množstvom chorobných stavov. Hoci v niektorých prípadoch určité alterácie hladín KM môžu byť dôsledkom ochorenia, existujú dôkazy, že KM má významnú úlohu tiež pri vývoji a v prevencii mnohých ochorení. KM môže pôsobiť ako antioxidant (hlavne v plazme), alebo prooxidant (hlavne v bunke) (19).

#### Oxidačné reakcie a produkty kyseliny močovej

Luminolová chemiluminiscencia spôsobená rôznymi systémami, ktoré generujú hydroxylový radikál, je zhasaná prítomnosťou kyseliny močovej už v koncentráciách pod fyziologickou hladinou (18). Práca, ktorá opisuje elektrochemickú oxidáciu kyseliny močovej ako modelovú reakciu pre enzýmové štúdie, dokumentuje vznik chinoidných diimínových štruktúr. Ako pri elektrochemickej, tak pri enzýmovej oxidácii (peroxidáza /hydrogénperoxid) kyseliny močovej boli identifikované močovina, oxid uhličitý, aloxan, alantoin, 5-hydroxyhydantoikarboxamid a parabanová kyselina (27). Rádiolýza roztoku KM perfundovaného vzduchom poskytla komplexnú zmes produktov s prevažujúcim zastúpením alantoinu a kyseliny parabanovej (6). Zistil sa vznik aj určitého množstva hydrogénperoxidu kyseliny močovej. Analýzy vzniku alantoinu u ľudí naznačujú, že jeho možným zdrojom môže byť oxidácia kyseliny močovej cytochrómom c (14). KM je prirodzený antioxidant s vysokým oxidačným potenciálom. Skevedžerová aktivita KM pre voľné radikály sa v ľudskej krvi odhaduje až na 60%. Vychytáva peroxynitrit, hydrogénperoxid, hydroxylové radikály a singletový kyslík. Zúčastňuje sa nepriamo v odstraňovaní superoxidového radikálu ochranou superoxidizmutázy, ktorá je zodpovedná za inaktiváciu superoxidu. Odstraňovaním superoxidu sa blokuje jeho reakcia s NO, a tým tvorba peroxynitritu. KM je účinným skevendžerom peroxynitritu. Jeho inaktiváciou zabráňuje peroxynitritu nitrovať tyrozínové zvyšky proteínov, čím chráni celulórne enzýmy pred inaktiváciou a cytoskelet pred modifikáciou. Ďalšou protektívnou vlastnosťou KM je jej schopnosť viazať Fe a inhibovať Fe-dependentnú oxidáciu askorbátu. Zabráňuje tým zvýšenej produkcii voľných radikálov, ktoré by mohli ďalej prispievať k oxidačnému poškodeniu (13).

#### Kyselina močová, peroxynitrit a plazma

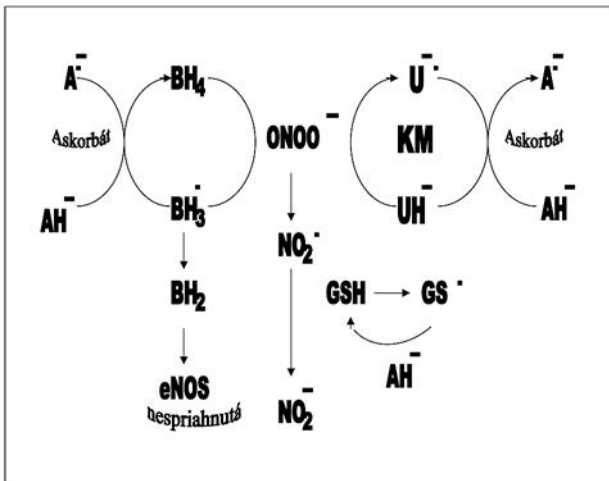
Pri ochoreniach spojených s oxidačným stresom dochádza k bunkovému poškodeniu vplyvom vysoko reaktívneho peroxynitritového aniónu ( $\text{ONOO}^-$ ), ktorý vzniká reakciou oxidu dusnatého so superoxidovým radikálom. Nízke koncentrácie  $\text{ONOO}^-$ , ktoré sa tvoria



Obr. 2. Tvorba voľných radikálov a reaktívnych molekúl z peroxynitritového aniónu.

Peroxynitritový anión ( $\text{ONOO}^-$ ) vzniká reakciou oxidu dusnatého ( $\text{NO}$ ) so superoxidovým radikálom ( $\text{O}_2^-$ ).  $\text{ONOO}^-$  je v rovnováhe s jeho protonizovanou formou ( $\text{ONOOH}$ ,  $\text{pK}_a = 6,8$ ). Peroxynitritový anión je relatívne stabilný, ale jeho protonizovaná forma sa pri absencii oxidovateľných substrátov rýchle rozkladá a tvorí nitrát. Homolytickým štiepením  $\text{ONOOH}$  vznikajú  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{OH}^-$  radikály, ktoré môžu oxidovať ďalšie molekuly.  $\text{ONOOH}$  reaguje aj cez aktivovaný izomér, trans-formu. V tejto forme oxiduje molekuly priamo a tvorí voľnoradikálové intermediáty (Vasquez-Vivar *et al.*, 1996)

za fyziologických podmienok, sa správajú podobne ako NO. Môžu spôsobovať vazorelaxáciu, znižovať agregáciu krvných doštičiek, redukovať adhéziu leukocytov na cievnú stenu, vyvolávať cytoprotektívne efekty a pôsobiť ako donor NO. Vyššie koncentrácie peroxynitritu sú však cytotoxické, môžu viesť k OH radikálovej toxicite a k modifikácii proteínov nitráciou aminokyselín. K takejto situácii môže dôjsť, keď eNOS produkuje menej NO a viac superoxidu, pri zvýšenom prísune superoxidu xantinoxidázou a NAD(P)H oxidázami, z leukocytárných myeloperoxidáz a lipooxygenáz. Tieto patologické situácie bývajú sprevádzané aj indukciou iNOS, s následnou vysokou produkciou NO a uvoľňovaním superoxidového radikálu (29).



Obr. 3. Vychytávanie peroxynitritu (ONOO<sup>-</sup>) kyselinou močovou. Reakciou urátu (UH) s peroxynitritom vzniká urátový radikál (U<sup>-</sup>), ktorý je inhibovaný askorbátom (AH<sup>-</sup>) a cysteínom (GSH). Oxidácia tetrahydrobiopterínu (BH<sub>4</sub>), kofaktoru eNOS (endotelovej syntázy oxidu dusnatého), peroxynitritom vedie k zníženej produkcii NO, k zvýšenej tvorbe superoxidového radikálu a k dysfunkcii endotelu (Weissmann et al. 2005).

Endotelové bunky a aktivované fagocyty produkujú NO a superoxid. Vznikajúci peroxynitrit môže pôsobiť toxicky priamo alebo nepriamo prostredníctvom svojich rozkladných produktov (obr. č. 2). Experimenty s ľudskou krvnou plazmou poukázali, že peroxynitrit spôsobuje depléciu dôležitých antioxidantov plazmy a poškodzuje plazmatické proteíny a lipidy. Pridanie peroxynitritu do plazmy vedie k rýchlej oxidácii kyseliny askorbovej, kyseliny močovej a plazmatických SH - skupín. Peroxynitrit reaguje s fyziologickými hladinami KM 16 krát rýchlejšie ako s askorbátom a 3 krát rýchlejšie ako s cysteínom. Pri reakcii KM s peroxynitritom vzniká popri iných radikáloch aj urátový radikál s nespáreným elektrónom na uhlíku, ktorý podlieha inhibícii vplyvom askorbátu a cysteínu (Obr. č.3). In vitro pokusy demonštrujú, že skevendžerová aktivita KM je v prítomnosti askorbátu a cysteínu oveľa vyššia ako dôsledok neutralizácie vznikajúcich urátových radikálov (28).

### Hladiny kyseliny močovej v sére u pacientov so sklerózou multiplex

Koncentrácia kyseliny močovej (KM) v sére je determinovaná rovnováhou medzi jej produkciou a renálnou exkréciou. Existuje množstvo údajov, ktoré naznačujú, že alterácie hladín KM v sére sú asociované so vznikom a progresiou mnohých ochorení. Viaceré štúdie preukázali, že pacienti so sklerózou multiplex majú v porovnaní so zdravými osobami nižšie sérové hladiny KM (Tab.1). Nie všetky štúdie však tieto rozdiely potvrdili (16, 21). Hladiny KM v sére u pacientov so sklerózou multiplex sú ovplyvnené aktivitou ochorenia a funkčnosťou hematoencefalickej bariéry (BBB) (Tab.1). SM pacienti s dysfunkciou BBB majú významne nižšie

Tab. 1. Sérové a plazmatické (pl) hladiny kyseliny močovej (KM) u pacientov so sklerózou multiplex (SM)

Diagnóza	Kyselina močová (μmol/l)	Citácia
Optická neuritída Ženy (n=22) Muži (n=5) Kontrola	202,8 ± 71,6 p = 0,002 226,6 ± 89,5 p<0,005	Papadopoulos et al., 2008
RRSM (n=68) RRSM-porucha BBB ONND (n=30)	214,0 ± 55,6 (pl) 171,8 ± 43,3 p<0,05 237,0 ± 51,8	Kalnovičová et al., 2007
Optická neuritída Ž (n=17) M (n=4) Kontrola Ženy Muži	184,4 ± 55,1 p=0,003 305 ± 52,1 NS 235,2 ± 50,2 328 ± 80,4	Knapp et al., 2004
RRSM (n=63) OIND (n=20) Kontrola (n=20) RRSM-relaps RRSM-remisia RRSM-normálna BBB RRSM-porucha BBB	193,9 ± 49,1 p=0,000 242,7 ± 46,7 p=0,001 292,7 ± 58,6 161,5 ± 23,6 p=0,000 234,4 ± 42,0 252,5 ± 25,9 163,9 ± 26,1 p=0,000	Toncev et al., 2002
Aktivna SM Inaktivna SM	202,6 ± 67,1 p=0,046 226,5 ± 78,6	Drulovič et al., 2001
SM (n=10) SM po GAA	240,0 303,0 p = 0,035	Constantinescu et al., 1999

SM - skleróza multiplex, RRSM - relaps-remitujúca SM,  
OIND - iné zápalové neurologické choroby,  
ONND - iné nezápalové neurologické choroby,  
BBB - hematoencefalická bariéra,  
GAA - glatiramer acetát (6-mesačná terapia), pl - plazma

hladiny KM ako SM pacienti s normálne funkčnou BBB a pacienti v relapse majú signifikantne nižšie hladiny KM ako SM pacienti v remisii (Tab.1). Znížené sérové hladiny KM sa zistili aj u pacientov s retrobulbárnou neuritídou (ON), zápalovým demyelinizačným ochorením optického nervu, ktoré je často prvým príznakom SM (10). Nízke hodnoty KM môžu byť indikátorom aktivity ochorenia alebo aj markerom vysokej pravdepodobnosti konverzie ON na klinicky definitívnu SM. Znížené hladiny KM v týchto prvých štádiách ochorenia môžu odrážať redukovanú antioxidantnú kapacitu spôsobenú zápalovou demyelinizáciou.

### KM a jej možná úloha v patogenéze SM

Skleróza multiplex je autoimunitné chronické zápalové demyelinizačné ochorenie bielej hmoty CNS charak-

terizované masívnou fokálnou infiltráciou T-bunkami a makrofágmi, poškodením axónov a stratou neurologickej funkcie. V skorých štádiách rozvoja lézií dochádza k poruche hematoencefalickej bariéry a k invázii hematogénnych monocytov a T-buniek do tkaniva mozgu, ktorých následná aktivita predstavuje základ pre začiatok a progresiu ochorenia. Oxid dusnatý (NO), ktorý sa tvorí aktivovanými imunitnými bunkami, mikroglia, astrocytmi, oligodendrocytmi, makrofágmi a v endotelových bunkách, je jednou z molekúl, ktoré participujú na vzniku lézií pri SM. K indukcii iNOS, čo je spojené s nadmernou produkciou NO, dochádza v makrofágoch a v iných bunkách, ktoré invadujú nervový systém a participujú v zápalovej reakcii spojennej s produkciou voľných radikálov. Tkanivo nervového systému generuje reaktívne formy kyslíka konštantne ako súčasť fyziologického fungovania. Ich tvorba narastá po aktivácii v zápalových demyelinizačných léziách. Voľné kyslíkové radikály a voľné radikály odvodené od dusíka môžu poškodiť tkanivo CNS lipoperoxidáciou, depléciou intracelulárnych energetických zásob v dôsledku inhibície mitochondriálneho elektrónového transportného reťazca, spotrebou intracelulárnych antioxidantov a poškodením DNA (4).

Zápalový proces spojený s porušením BBB, ktorý je najvýraznejší v aktívnych léziách a v miernom stupni perzistuje aj v chronických plakoch (15), môže v dôsledku deplécie antioxidantov viesť k zníženiu antioxidantnej ochrany CNS. Organizmus v snahe chrániť CNS pred voľnými radikálmi mobilizuje antioxidanty, ktoré môžu preniknúť cez funkčnú hematollikvorovú bariéru. Pri nedostatočnej antioxidantnej ochrane mozog pravdepodobne využíva albumín spolu s kyselinou močovou, ktoré sa do mozgu dostávajú už cez porušenú hematollikvorovú bariéru. Pri sledovaní hladín nízkomolekulových antioxidantov v demyelinizovaných pláchoch a v bielej hmote SM pacientov sa zistilo, že redukovaná hladina glutationu (jedného z najvýznamnejších antioxidantov CNS spolu s kyselinou askorbovou) korelovala so zvýšenou hladinou KM.

Existujú určité nejasnosti, či nízke hladiny KM v sére sú príčinou alebo následkom neurodegeneratívnych ochorení. Existuje možnosť, že pacienti s nízkou sérovou hladinou KM nie sú schopní zabrániť voľnoradikálovej toxicite, čo potom vedie k zápalu a k deštrukcii tkaniva. Inou možnosťou je, že zápal, ktorý je súčasťou patogenézy SM, vedie k spotrebe kyseliny močovej v dôsledku jej skevendžerovej aktivity pri nadmernej tvorbe voľných radikálov.

Experimentálne štúdie na zvieracích modeloch SM podporili názor, že nízke hladiny KM sú príčinou a nie následkom ochorenia. Ak sa myšiam pred nástupom klinickej experimentálnej autoimunitnej encefalitídy (EAE) podávali terapeutické dávky KM, kyselina močová zabránila invázii zápalových buniek do CNS a vzniku ochorenia. U myší s aktívnou EAE, exogénne aplikovaná KM penetrovala už porušenou BBB do oblasti zápalu v tkanive miechy a znižovala zvýšenú permeabilitu BBB (7). Terapeutický efekt sa pozoroval aj po podaní

prekuzora KM inozínu (20). Tento efekt bol spojený so zvýšením hladín KM v tkanive CNS a s inaktiváciou peroxynitritu a zodpovedajúcich látok, ktoré boli produkované monocytmi a prispievali k zvýšenej permeabilite BBB a následnej tkanivovej patológii CNS.

Toncev a spol. (24) sledovali SM pacientov, ktorým sa orálne podával inozín, prekuzor kyseliny močovej, v terapeutickú dávku 1–2 g, 2 × denne, v priebehu 37,6 +/- 6,5 mesiacov. Ako kontrolu na porovnanie terapeutického účinku inozínu použili skupinu SM pacientov bez terapie (okrem obdobia relapsov) s podobným vekom, pohlavím, trvaním ochorenia a funkčnou disabilitou. Zistili, že pacienti, ktorým sa podával inozín mali v porovnaní s kontrolnou skupinou nižšiu frekvenciu relapsov a nižšiu disabilitu. Výsledky poukázali, že liečba zameraná na zvýšenie hladín KM v sére môže mať pre niektorých SM pacientov priaznivý efekt. Zvýšenie sérových hladín KM je spojené aj s terapeutickým efektom metylprednisolou (23), Interferónu beta a glatiramer acetátu (2,5).

## ZÁVER

Pacienti so sklerózou multiplex majú znížené sérové hladiny kyseliny močovej. Alterácie KM v sére u týchto pacientov sú asociované s aktivitou ochorenia a dysfunkciou hematollikvorovej bariéry. Redukcia koncentrácie KM môže u týchto pacientov znižovať schopnosť organizmu chrániť sa pred peroxynitritom a inými voľnými radikálmi, ktoré pôsobia na celulórne komponenty a poškodzujú bunky. V tomto smere by analýza sérových hladín KM mohla prispieť k posúdeniu stupňa antioxidantnej ochrany pacienta pri monitorovaní priebehu ochorenia a terapeutická stratégia zameraná na zvýšenie sérových hladín KM by mohla mať u SM pacientov gliaľno-neuroprotektívny efekt (11).

## LITERATÚRA

1. Becker, B. F.: *Towards the physiological function of uric acid*. Free Radic. Biol. Med. 1993; 14: 615–631.
2. Constantinescu, C. S., Freitag, P., Kappos, L.: *Increase in serum levels of uric acid, an endogenous antioxidant, under treatment with glatiramer acetate (GAA) for multiple sclerosis*. Multiple Sclerosis 1999; 5(Suppl1): S104.
3. Drulović, J., Dujmović, I., Stojsavljević, N., Mesaros, S., Andjelković, S., Miljković, D. et al.: *Uric acid levels in sera from patients with multiple sclerosis*. J. Neurol. 2001; 248(2): 121–126.
4. Giovannoni, G., Heales, S. J., Land, J. M., Thompson, E. J.: *The potential role of nitric oxide in multiple sclerosis*. Mult. Scler. 1998; 4(3): 212–216.
5. Guerrero, A. L., Martín-Polo, J., Laherrán, E., Gutiérrez, F., Iglesias, F., Tejero, M. A., Rodríguez-Gallego, M., Alcazar, C.: *Variation of serum uric acid levels in multiple sclerosis during relapses and immunomodulatory treatment*. Eur. J. Neurol. 2008; 14(4): 394–397.



6. Hicks, M., Wong, L.S., Day, R.O.: *Identification of products from oxidation of uric acid induced by hydroxyl radicals*. Free Radic. Res. Commun. 1993; 18: 337–351.
7. Hooper, D.C., Scott, G.S., Zborek, A., Mikheeva, T., Kean, R.B., Koprowski, H., Spitsin, S.V.: *Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes, and tissue damage in mouse model of multiple sclerosis*. FASEB J. 2000; 14(5): 691–698.
8. Kalnovičová, T., Traubner, P., Turčáni, P.: *Plazmatické hladiny kyseliny močovej u pacientiek so sklerózou multiplex-klinický význam*. Lab. diagnostika 2007; 12(1): 11–15.
9. Kandár, R., Čegan, A., Zuber, R., Skalický, J.: *Stavení alantoinu v lidské plazmě*. Klin. Biochem. Metab. 2000; 8(29): 124–129.
10. Knapp, C.M., Constantinescu, C.S., Tan, J.H., McLean, R., Cherryman, G.R., Gottlob, I.: *Serum uric acid levels in optic neuritis*. Mult. Scler. 2004; 10(3): 278–280.
11. Koch M., De Keyser J.: *Uric acid in multiple sclerosis*. Neurol. Res. 2006; 28(3): 316–319.
12. Koprowski, H., Spitsin, S.V.: *Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes, and tissue damage in mouse model of multiple sclerosis*. FASEB J. 2000; 14(5): 691–8.
13. Kutzing, M.K., Firestein, B.L.: *Altered uric acid levels and disease states*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2008; 324: 1–7.
14. Martrens, M.E., Storey, B.T., Lee, C.P.: *Generation of allantoin from the oxidation of urate by cytochrome c and its possible role in Rey's syndrome*. Arch. Biochem Biophys. 1987; 252: 91–96.
15. Mattle H.P., Lienert C., Greeve I.: *Uric acid and multiple sclerosis*. Ther. Umsch. 2004; 61(9): 553–555.
16. Mostert, J.P., Ramsarasing, G.S., Heersema, D.J., Heerings, M., Wilcyak, N., De Keyser, J.: *Serum uric acid levels and leucocyte nitric oxide production in multiple sclerosis patients outside relapses*. J. Neurol. Sci. 2005; 231(1–2): 41–4.
17. Papadopoulos, K., Koutoula, O., Paschalidou, M., Tascos, N.: *Serum uric acid in optic neuritis: a study in the population of northern Greece*. EFNS Eur. J. Neurol. 2008; 15: 369.
18. Radi, R., Rubbo, H., Thomson, L., Prodanov, E.: *Luminol chemiluminescence using xanthine and hypoxanthine as xanthine oxidase substrates*. Free Radic. Biol. Med. 1990; 7: 121–126.
19. Sautin, Y.Y., Johnson, R.J.: *Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox*. Nucleotide Nucleotides Nucleic Acids 2008; 27(6): 608–619.
20. Scott, G.S., Spitsin, S.V., Kean, R.B., Mikheeva, T., Koprowski, H., Hooper, D.C.: *Therapeutic intervention in experimental allergic encephalomyelitis by administration of uric acid precursors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002; 99(25): 16393–8.
21. Sotgiu, S., Paugliatti, M., Sanna, A., Sotgiu, A., Fois, M.L., Arru, G., Rosati, G.: *Serum uric acid and multiple sclerosis*. Neurol. Sci. 2002; 23(4): 183–188.
22. Toncev, G., Milicic, B., Toncev, S., Samardzic, G.: *Serum uric levels in multiple sclerosis patients correlate with activity of disease and blood-brain barrier dysfunction*. Eur. J. Neurol. 2002; 9(3): 221–226.
23. Toncev, G., Milicic, B., Toncev, S., Samardzic, G.: *High-dose methylprednisolone therapy in multiple sclerosis increases serum uric acid levels*. Clin. Chem. Lab. Med. 2002; 40(5): 505–508.
24. Toncev, G.: *Therapeutic value of serum acid levels increasing in the treatment of multiple sclerosis*. Vojnosanit. Pregl. 2006; 63(10): 879–882.
25. Van der Vliet, A., Smith, D., O'Neill, C.A., Kaur, H., Darley-Usmar, V., Cross, C.E., Halliwell, B.: *Interactions of peroxynitrite with human plasma and its constituents: oxidative damage and antioxidant depletion*. Biochem. J. 1994; 303(Pt1): 295–301.
26. Vasquez-Vivar, J., Santos, A.M., Junqueira, V.B.C., Augusto, O.: *Peroxy-nitrite-mediated formation of free radicals in human plasma: EPR detection of ascorbyl, albumin-thiyl and uric acid-derived free radicals*. Biochem. J. 1996; 314: 869–876.
27. Volk, K.J., Yost, R.A., Brajter-Toth, A.: *On-line mass spectrometric investigation of the peroxidase-catalysed oxidation of uric acid*. J. Pharm. Biomed. Anal. 1990; 8: 205–215.
28. Weissmann, N., Harrison, D.G., Dikalov, S.: *Interactions of peroxynitrite with uric acid in the presence of ascorbate and thiols: Implications for uncoupling endothelial nitric oxide synthase*. Biochem. Pharmacol. 2005; 70(3): 343–354.
29. Whiteman, M., Ketsawatsakul, U., Halliwell, B.: *A re-assessment of the peroxynitrite scavenging activity of uric acid*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2002; 962: 242–259.

Adresa pre korešpodenciu:  
 Prof. MUDr. Peter Turčáni, PhD.  
 1. neurologická klinika LF UK  
 Mickiewiczova 13  
 813 64 BRATISLAVA  
 e-mail: peter.turcani@faneba.sk

---

**BIOCHEMICKÉ VYŠETRENIE  
MOZGOVOMIECHOVÉHO MOKU -  
ODPORÚČANIE DOPORUČENIE PRI DIAGNOSTIKE  
SCLEROSIS MULTIPLEX, REVÍZIA 2008**

---

**Odporúčanie Sekcie SM  
pri Slovenskej neurologickej spoločnosti**

**RUDOLF GAŠKO<sup>1</sup>  
ELEONÓRA KLÍMOVÁ<sup>2</sup>, JÁN BALLA<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Bioštatistická jednotka  
Železničná nemocnica s poliklinikou, Košice  
<sup>2</sup>Neurologická klinika, FNsP J. A. Reimana  
FZ PU, Prešov

<sup>3</sup>Analyticko-diagnostické laboratórium, s.r.o., Prešov

## SÚHRN

Upravené McDonaldove diagnostické kritériá sclerosis multiplex (2005) zakotvili diagnostickú relevanciu niektorých vyšetrení mozgovomiechového moku (liquor cerebrospinalis, CSL). Predkladaný materiál presne v línii uvedených kritérií podrobnejšie rozoberá metodiku stanovenia a interpretáciu dvoch zásadných vyšetrení, stanovenia oligoklonálnych pásov v moku a krvnom sére, a IgG indexu. Vzhľadom na skutočnosť, že metodika izoelektrickej fokusácie (IEF) nie je t.č. ešte v laboratóriách v SR bežne dostupná, popisuje sa spôsob interpretácie vyšetrenia náhradnou metódou imunofixačnej elektroforézy. Predkladaný materiál je určený rovnako neurológom aj laboratórnym pracovníkom.

## ÚVOD

Sclerosis multiplex (SM), s odhadovanou incidenciou na našom území od 50 do 150/100 000 obyvateľov (1), je po úrazoch najčastejším a najzávažnejším neurologickým ochorením invalidizujúcim osoby v produktívnom veku. Diagnostika klinicky potvrdenej SM je založená na anamnéze, klinickom neurologickom náleze, dôkaze pre SM typických demyelinizačných lézií pri vyšetrení mozgu alebo miechy magnetickou rezonanciou (MR) a vyšetrení CSL, fakultatívne na vyšetrení multimodalitných evokovaných potenciálov (najmä zrakových - Visual Evoked Potential - VEP) a voliteľných ďalších vyšetreniach pri diferenciálno diagnostických nejasnostiach. V tejto dekáde sa medzinárodným štandardom diagnostických kritérií pre roztrúsenú sklerózu sclerosis multiplex stali McDonaldove kritériá, aktuálne ich revízia úprava z roku 2005 (2,3). V týchto kritériách sú uvedené dve vyšetrenia CSL cerebrospinalného likvoru: „dôkaz oligoklonálnych pásov imunoglobulínu IgG pásov izoelektrickou fokusáciou s imunofixáciou“ a „zvýšený IgG index“, ako alternatívna metodika pri nedostupnosti IEF, a spôsob

ich zabudovania do diagnostických kritérií a spôsob ich zabudovania do diagnostických kritérií.

Úroveň vyšetrovacích možností CSF je na veľkej väčšine oddelení klinickej biochémie v SR nedostatočná (4,5), i keď v poslednom čase badať tendenciu zlepšujúcej sa diagnostiky CSL, aspoň v niektorých laboratóriách. Zohľadňujúc vtedajšie možnosti, boli v roku 2001 (6) vypracované odporúčania na diagnostiku CSL pri sclerosis multiplex výboru To dolo dôvodom zostavenia odporúčania Slovenskej spoločnosti klinickej biochémie roku 2001 (X0). Po doplnení nových poznatkov vydávame túto revíziu odporúčania.

## Minimálny štandard

**1. Dôkaz intratekálnej syntézy imunoglobulínu IgG.** Nutné vyšetrenia: Albumín a Imunoglobulín G (IgG) v CSF, paralelne albumín a IgG v krvnom sére (S). Metodika: Albumín v S aj v CSF je možné stanovovať bežne používanými metódami. Stanovenie Q je nezávislé od použitej analytickej metódy (7). Tým, že Q vyjadrujú pomer koncentrácií sledovaných látok v dvoch tekutinách a nie ich absolútne hodnoty odpadajú komplikácie spojené so štandardizáciou rôznych použitých analytických metód. Turbidimetrické metódy sú dostatočne senzitivne na stanovenie IgG v oboch tekutinách.

Interpretácia: Výpočet IgG indexu podľa vzorca:

$$(CSF\_IgG/CSF\_albumín)/(S\_IgG/S\_albumín)$$

Hraničná hodnota je medzi 0,66 až 0,85 (rôzni autori, rôzne hodnoty). Výpočet kvocientov albumínu a IgG podľa vzorca:  $Q\_albumín = CSF\_albumín / S\_albumín$ ,  $Q\_IgG = CSF\_IgG / S\_IgG$ . Dosadenie kvocientov Q do Reiberovho grafu a interpretácia výsledkov (8,9). Pozor! Profesor Hansotto Reiber odvodil a publikoval postupne viacero grafov, ktoré sa v literatúre označujú podľa roku publikácie Reiber, 1980, 1987, 1994. Používanie prvého je obsolentné, používanie druhého sa akceptuje v statickom modeli, používanie tretieho sa odporúča pre dynamický model interpretácie.

**2. Dôkaz oligoklonálnych pásov imunoglobulínu IgG.** Vyšetrenie: mozgovomiechový mok a paralelne sérum. Metodika: Jedinou dostatočne senzitivnou a špecifickou metódou je izoelektrická fokusácia (7,8,10). Vzhľadom k tomu, že v SR t.č. minimum pracovísk s potrebným prístrojovým vybavením (izoelektrickú fokusáciu vykonáva jediné likvorologické pracovisko v Bratislave, I. Neurologická klinika, FN Bratislava, priaznivá perspektíva sa javí pre východoslovenský kraj, kde sa začína s IEF v laboratóriu LABMED), s prihliadnutím na publikované referencie o senzitivite a špecifite iných elektroforetických metód (13,11,12,13), je nutné sa uspokojiť s vyšetrením imunofixačnou elektroforézou.

Interpretácia: Vizualne zisťovanie prítomnosti oligoklonálneho pásu alebo viacerých pásov, a to paralelne v sére a v CSF. Interpretácia je zásadne závislá od hodnôt senzitivity a špecifity, ktoré dosahuje použitá elektroforetická metóda. Pri popise musí byť preto použitá metóda uvedená.

## Analytika a kontrola kvality

Pre spoľahlivé stanovenie albumínu v likvore a v sére odporúčame používať:

1. imunochemické metódy - radiálna imunodifúzia RID, imunonefelometria IN alebo imunoturbidimetria IT,
2. optimálnu inštrumentáciu (prístroje Roche, Dade-Behring, Coulter-Beckman, Orion),
3. kalibračné materiály s chemickou nadväznosťou merania na IFCC a WHO štandard CRM 470,
4. IQC s kontrolnými materiálmi CSF Bio-Rad, Dade-Behring, Beckman, Randox, a
5. pravidelnú, regulárnu účasť v externom hodnotení kvality EQA.

## Predanalytická fáza

**Odber:** Mozgovomiechový mok - štandardné skúmanky bez protizrážavých prostriedkov. Krv - štandardné skúmanky bez protizrážavých prostriedkov (sérum), použitie seoparačných gélov a akcelerátorov zrážania je možné.

**Spracovanie:** Na biochemické vyšetrenia je možné použiť likvor, ktorý je centrifugovaný do 3 hodín po odbere. Skladovanie: Centrifugovaný mok a sérum je možné skladovať pre dodatočné analýzy (predovšetkým stanovenie špecifických proteínov) do 1 týždňa pri teplote +4 až +8 °C, do 1 roka pri teplote -20 °C, opakovane nerozmrazovať (14,15).

## KOMENTÁR

1. Uvedený návrh predstavuje minimum vyšetrení, ktoré by sa mali vykonať pri podozrení na SM, ktoré viedlo ku odboru cerebrospinálneho likvoru. McDonalдове kritériá, revízia 2005 (3) uvádzajú „dôkaz oligoklonálnych IgG pásov izoelektrickou fokusáciou s imunofixáciou“ a „zvýšený IgG index“. Pri cielej diagnostike SM, sledovaní priebehu ochorenia SM a pri diferenciálnej diagnostike SM (akútne neuroinfekcie, tzv. MS-like syndrómy) sa používa podstatne širšie spektrum vyšetrení (16,17,18,19,20). Za lege artis považujeme každé takéto vyšetrenie vykonané laboratórnou metódou, ktorá je pod kontrolou. Zvlášť upozorňujeme na diagnostický význam metodicky pomerne jednoduchého, ale na „ľudský faktor“ veľmi citlivého stanovenia kvalitatívnej cytologie moku (20).
2. Izoelektrická fokusácia je jediná metóda elektroforetického vyšetrenia proteínov v CSF, ktorú vyhodnocujú EQA. Imunofixačná elektroforéza nie je, podľa našich vedomostí, v žiadnom systéme EQA vyhodnocovaná. Možnosť externej kontroly imunofixačnej elektroforézy je preto problémová.
3. Pri elektroforetickom vyšetrení proteínov je zásadným paralelné vyšetrenie krvného séra a CSF a paralelné hodnotenie nálezov v oboch tekutinách zrakom.
4. Nie je bežnou praxou klinických laboratórií poskytovať ku výsledku vyšetrenia aj charakteristiku metódy, ktorou sa ku výsledku dospelo. Z dôvodov uvedených v tej

to správe a podrobnejšie popísaných v (21) pokladáme za veľmi užitočnú a zásadnú informáciu podrobný popis metódy a údajov o spôsobe zahustenia pri elektroforéze proteínov v CSF. SM je chronické, roky až desaťročia trvajúce ochorenie, u ktorého dochádza opakovane ku spätnému študovaniu a možnému prehodnocovaniu všetkých klinických aj paraklinických nálezov, rôznymi lekármi na rôznych neurologických pracoviskách. Negatívny nález oligoklonálnych pásov má úplne rozdielnú validitu pri rôznych použitých metódach elfo. Z toho vyplýva úplne iná interpretácia, ktorá môže rozhodovať o správnosti stanovenia diagnózy, priebehu ochorenia a liečby SM! Zdravotníctvo v Európskej únii, včítane našej republiky, vstupuje do časovej etapy zavádzania postupov eHealth, včítane elektronického zdravotného záznamu. Realitou blízkej budúcnosti je vzájomné prepájanie databáz so zdravotnými údajmi pacientov v rámci celého jedného štátu. Reálnou víziou nie príliš vzdialenej budúcnosti je elektronický preklad formalizovaných zdravotných záznamov a tým prepojenie databáz zdravotných záznamov pacientov v rámci celej EÚ, aj plánované vytváranie národného registra pacientov so SM, ktorí McDonalдове kritériá spĺňajú. Preto by malo byť našou snahou, sa im aj za daných možností vyšetrenia CSL v SR čo najviac priblížiť. Neposkytnutie informácie o použitej elektroforetickej metóde a spôsobe zahustenia CSF pokladáme za non lege artis postup!

## LITERATÚRA

1. Klímová, E., Gaško, R., Szilasiová, J., Veselá, D.: Úvodná prierezová štúdia chorobnosti na sclerosis multiplex v Košickom a Prešovskom kraji. Slov. Lekár, 11(25), 2001, č. 7-8, s. 284-287.
2. McDonald, W. I., Compston, A., Edan, G. et al.: Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. Ann. Neurol., 50, 2001, s. 121-127.
3. Polman, Ch. H., Reingold, S. C., Edan, G. et al.: Diagnostic criteria for multiple sclerosis: - 2005 revisions to the „McDonald Criteria“. Ann. Neurol., 58, 2005, č. 6, s. 840-846.
4. Gaško, R., Klímová, E.: Likvorológia - nové poznatky a stav ich aplikácie v praxi. Lekárske listy, 2000, č. 9, 21, s. 8.
5. Gaško, R., Klímová, E., Škvarlová, A.: Stav likvorologického vyšetrenia vo vzťahu ku skleróze multiplex vo vsl. regióne a pokus o jeho ovplyvnenie. Slov. Lekár, 9(23), 1999, č. 10-11, s. 420-423.
6. Gaško, R., Klímová, E., Balla, J.: Biochemické vyšetrenie cerebrospinálneho likvoru - minimálny štandard pri diagnostike roztrúsenej mozgovomiechovej sklerózy (návrh). Lab Diagnostika, 6, 2001, č. 1-2, s. 69-71.
7. Reiber, H.: External quality assessment in clinical neurochemistry. Survey of analysis for cerebrospinal fluid (CSF) protein based on CSF/Serum quotients. Clin. Chem., 41, 1995, č. 2, s. 256-263.

- 8. Racek, J. a spol.:** Klinická biochemie, 2., preprac. vyd., Galén, Praha, 2006, s. 257–258. Aktualizovať citáciu podľa 2. vydania!
- 9. Reiber, H.:** Cerebrospinal fluid – physiology, analysis and interpretation of protein patterns for diagnosis of neurological diseases. *Multiple Sclerosis*, 1998, 4, s. 99–107.
- 10. Anderson, M. a spol.:** Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: consensus report. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 57, 1994, č. 8, s. 897–902.
- 11. Cavuoti, D., Baskin, L., Jialal, I.:** Detection of oligoclonal bands in cerebrospinal fluid by immunofixation electrophoresis. *Am. J. Clin. Pathol.*, 109, 1998, č. 5, s. 585–588.
- 12. Verbeek, M.M., de Reus, H.P.M., Weykamp, C.W.:** Comparison of methods for the detection of oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid and serum: results of the Dutch Quality Control Survey. *Clin. Chem.*, 48, 2002, s. 1578–1580.
- 13. Villar, L.M., Garcia-Barragan, N., Sadaba, M.C. et al.:** Accuracy of CSF and MRI criteria for dissemination in space in the diagnosis of multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.*, 266, 2008, č. 1–2, s. 34–37.
- 14. Doporučení k vyšetřování mozkomíšního moku.** *Klin. Biochem. Metab.*, 14(35), 2006, č. 2, s. 125–127.
- 15. Heil, W., Koberstein, R., Zawta, B.:** Reference ranges for adults and children. Pre-analytical considerations. Boehringer Mannheim, 2004, s. 186.
- 16. Reiber, H., Otto, M., Trendelenburg, Ch., Wormek, A.:** Reporting cerebrospinal fluid data: Knowledge base and interpretation software. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 39, 2001, č. 4, s. 324–332.
- 17. Sindic, Ch.J.M., Van Antwerpen, M.P., Goffette, S.:** The intrathecal humoral immune response: Laboratory analysis and clinical relevance. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 39, 2001, č. 4, s. 333–340.
- 18. Sobek, O., Adam, P., Táborský, L. a spol.:** Proteinové frakce a další likvorové parametry u pacientu s roztroušenou sklerózou. *Klin. Biochem. Metab.*, 8(29), 2000, č. 4, s. 209–212.
- 19. Kalnovičová, T., Volaříková, V., Ondrkalová, M., Traubner, P., Turčáni, P.:** Degradované produkty purinových nukleotidov ako marker tkanivovej deštrukcie u pacientov so sklerózou multiplex. *Lab. Diagnostika*, 11, 2006, č. 1–2, s. 26–30.
- 20. Klímová, E., Bertová, D.:** Kvalitatívna cytológia likvoru – jej význam v diagnostike sclerosis multiplex. *Lab. Diagnostika*, 7, 2002, č. 2–3, s. 40–43.
- 21. Gaško, R., Klímová, E., Bertová, D.:** Vyšetrenie cerebrospinálneho likvoru – minimálny štandard pri diagnostike roztrúsenej sklerózy. *Diagnóza*, 2000, č. 4, s. 104–106.

Adresa pre korešpondenciu:  
 MUDr. Rudolf Gaško  
 Bioštatistická jednotka  
 Železničná nemocnica s poliklinikou  
 040 01 Košice, Masarykova 9  
 E-mail: gasko@zzke.sk  
 Tel.č.: 055/229 5865

**RESTY Z MINULÉHO ČÍSLA**

---

FELLOWSHIP OF THE EUROPEAN BOARD  
OF MEDICAL BIOPATHOLOGY

---

GUSTAV KOVÁČ  
ANNA PORUBENOVÁ

Institute for Chemistry  
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine  
Slovak School of Medicine Bratislava  
Alphamedical Bratislava

**Introduction and History:** UEMS was founded 1962. Individual sections has represented various medical specialties. These sections included a specialist section devoted to laboratory medicine. 1988 Anatomical Pathology was split and formed its own specialist section. The remaining specialist section was renamed Medical Biopathology. 1992 it was recognized, that Medical Biopathology consists of five specialties: medical microbiology, Clinical Chemistry, Hematology, Immunology and Polyvalent medical biopathology. Section has formed European Board of medical biopathology. Board and Section consist of representatives of all EU countries and from other countries outside EU. The members are nominated by National Medical Organisations. Board and sections have president and secretary.

**Aims:** Standards required for training in Medical Biopathology. Proposals in relation to the quality and content of training programmes. Recommend procedures to facilitate the free movement of Biopathologists throughout the EU. Recommend the criteria to which Training centres should conform. Examine the content and quality of training programmes. Facilitate the exchange of specialist trainees between training centres in various countries. Institute the recognition of quality and competence by establishing the Fellowship of the European Board of Medical Biopathology.

**Fellowship of European Board of Medical Biopathology:** Individual has to fulfil the criteria for the recognition of quality and competence. Individuals registered medical specialties in one of EU have automatic right to practice in another EU country. Fellowship confers no additional rights and is not mandatory qualification. It facilitates travel and movement and helps in aligning the practice of MB in various countries of EU and provides uniform standard for training.

**Conditions for awarding the Fellowship:** Candidate must be recognized specialist in MB for at least 3 years. He or she should demonstrate appropriate expertise in field of MB. It should be proved and shown the continuing scientific interest. The candidate will be asked to take an examination of his training and competence by examining board appointed by EB of MB. Documentary evidence will be for majority of candidates sufficient. Examination will be conducted in English or French. Criteria: diplomas, certificates, training period of 4–5 years in training centres fulfilling the requirements of quality, registration as a specialist in one of the specialties in MB in the home country for at least 3 years (national qualification will be recognized – examina-

tion board will examine the training programme and conditions), practice of 3 years in Post Specialist Registration Work, proving the continuing scientific interest in Medical Biopathology – Continual Medical Education – Continuing Professional Development – EACCME credits.

**The Structure of the Examination:** European Board of Medical Biopathology is responsible for conducting the examination. It appoints the examination Panel and its Director, proceedings conducted in English or French guidelines, produced by EB of MB. Panel of examiners: representative of UEMS Board for Medical Biopathology, representative of the country of candidates origin in the specialty, representatives of academic life, practitioners in the specialty from other country than the candidates originates. Paying a level of fee determined by EB of MB in advance.

**Foundation Fellowship:** Granted to individuals who are practising MB for at least 10 years. They are required to demonstrate the hold of registered medical qualification. Foundation fellowship will be available for a period of four years from the date of conferring the first Fellowship.

**Honorary Fellowship:** Distinguished individuals in Medical Biopathology is limited. It has to be unanimous approval of EB of MB.

**Appeal against the decisions:** Candidate for fellowship of EB of MB will have a right to appeal any decision to the president of the specialist section of MB. President appoints the panel of three individuals to review the decision. At the next meeting of specialist sections the majority of votes will decide.

**Revocation of the Fellowship:** Covers special circumstances. Removing from register in the country of his origin or in country where he or she is practising.

---

UEMS CHEMICAL BIOPATHOLOGY  
TRAINING PROGRAM

---

GUSTAV KOVÁČ, ANNA PORUBENOVÁ

Institute for Chemistry  
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine  
Slovak School of Medicine Bratislava  
Alphamedical Bratislava

**Definition:** Chemical biopathology is medical discipline that employs biochemical knowledge and measurements to diagnose diseases and monitor effects of treatment through chemical investigations of body fluids. Chemical biopathology has its skills in the interface between clinical knowledge, pathogenic mechanisms, biochemistry, molecular biology and information technology.

**Central Monitoring Authority:** *Commission of the Specialists Section Chemical Biopathology* accepts national

standards, institutions and teachers for each country, will review national standards and work towards the harmonisation over next few years, will work towards european system of formative and summative assessment of training, convenes meetings with specialists in each country, collaborates closely with recognized national bodies to initiate and maintain manpower planing.

**General Aspects of Training:** *Individual:* 5 years training duration, 1 year common trunk, 1 year clinical practice, logbook. *Global:* competitive selection of trainees, trained chemical biopathologist, system of quality assurance and assessment of training in specialty, controlling entry into the training process (manpower planing), arrangements currently available in most EU countries: financial support.

#### **General Objectives of Training**

*Competence:* anatomy, physiology, biochemistry and pathobiochemistry, pathogenetic mechanisms and epidemiology, biochemical tests and organ functions tests, indication and interpretation, laboratory methods and technology, quality systems, research and scientific knowledge, continual medical education, information technology, management and communication, legal and safety aspects, teaching, clinics.

**Requirements for Training Institutions:** national standards, nationally recognized training centres, structural educations visits of EU standards, trainers medical specialists in Chemical biopathology for 5 years, training in more than one centre

**Requirements for Teachers:** *Chief of training:* head of the department, practicing in the specialty for more than 5 years. *Trainers:* must be recognized by the national authority for specialists training, should be knowledgeable in research work. *Training of individuals* should meet requirements of national rules, EU directives, UEMS recommendations, close personal monitoring of the trainees.

**Requirements for Trainees:** *Experience:* performing sufficient number of practical procedures, management of clinical laboratories, linguistic ability - international literature, balance between supervised and unsupervised training time, Logbook, clinical training in internal medicine mandatory for 1 year. *Curriculum:* biochemical aspects of diseases, analytical techniques, data management, laboratory training, logistics and automation, quality control and quality assurance, basic investigations in analytical methods, health and safety, laboratory Management and communication skills, clinical training research development, clinical audit, continuing study. *Common Trunk:* Data management, Skills in the statistical interpretation of laboratory and population data, nomenclature, units, reference intervals and biostatistics, Computer application within the laboratory - spreadsheets, databases, statistical packages, IT, informatics, Logistics and automation, request forms, sample identification, information technology, work flow, instrument interfacing, reporting of results, Quality Control and Assurance, IQ, EQ, Interpretation and course of action, Near patient testing, Basic investigation in analytical techniques, Health and safety, Regulatory and other aspects of health and safety, Laboratory management and communication skills, Research and Development, Clinical

Audit, Clinical training, *Biochemical aspects of diseases:* Biological variability, Diseases of GIT pancreas, liver, Protein structure, metabolism, disorders, Basic immunology, Kidney and urinary tract diseases, Pulmonary function, Disturbances of oxygen/CO<sub>2</sub> transport and H<sup>+</sup> metabolism, Disturbances of water and electrolytes metabolism, Disturbances of lipid and carbohydrate metabolism, Disturbances of calcium phosphate and magnesium metabolism, Other disorders of bone and connective tissue, Clinical enzymology, Diseases caused by nutritional disturbances, Basic molecular biology, Inherited metabolic disorders (including molecular genetics, Basic molecular biology, Principles of screening, Disorders of hemoglobina and porphyrin, Nervous system disorders, Cardiovascular system disorders, Disorders of the endocrine system, Toxicology and TDM, Paediatric biochemistry, Metabolic effects of trauma, Diagnosis and monitoring of trauma, Interferences and drug effects on laboratory investigation. *Laboratory training:* Analytical and general laboratory procedures, Understanding of methods development, performance and application, Spectrophotometry, flame emission photometry, Automated instrumentation, Electrochemical methods, Osmometry, Enzymology, Radioisotope counting, Chemoluminescent methods, Immunochemical methods, Immunoassay, Electrophoretic methods, Chromatography, Drug analysis. Solid phase chemistry, AAS / metal analysis, Mass spectrometry, DNA/RNA analyses, Cell culture techniques, Miscellaneous analyses (occult blood, calculi, urinary pigments, faecal fat), POCT, Specimen collection, handling, storage, Standardisation and calibration, Preparation and storage of reagents.

**Continuing Study:** Lifelong habits of using literature, databases, consultations, scientific meeting, presentation of scientific work, Plan should be written by tutor, Regular contact with the department of internal medicine

---

### VÝUČBOVÁ BÁZA PRE LABORATÓRNU MEDICÍNU A KLINICKÚ BIOCHÉMIU - KRITÉRIA A AUDIT UEMS

---

GUSTAV KOVÁČ  
ANNA PORUBENOVÁ

**Institute for Chemistry  
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine  
Slovak School of Medicine Bratislava  
Alphamedical Bratislava**

**Úvod:** V príspevku sa špecifikujú podmienky, ktoré musí spĺňať výučbová báza pre postgraduálnu výučbu v laboratórnej medicíne alebo v monovalentných špecializačných odboroch medicínskej biopatológie

**Organizácia:** Podmienky pre výučbu musia umožňovať rotáciu medzi laboratóriami v rámci oddelenia, v prípade potreby aj medzi nemocnicami, alebo inými inštitúciami.

Získanie skúsenosti s prácou v zahraničných laboratóriách je vítané. Všetky výučbové bázy by mali prejsť procesom akreditácie.

**Rozsah laboratórnej diagnostiky:** Laboratória výučbovej bázy musia poskytovať dostatočne široký rozsah laboratórnych vyšetrení pre odbory vnútornej medicíny, chirurgie, gynekológie a pôrodnictva, pediatrie ako aj paramedicínskym centráram a hygiene. Výučbová база nemusí nutne pokrývať všetky oblasti, musí však byť schopná zabezpečiť rotáciu externe v chýbajúcich oblastiach.

**Laboratórne zdroje:** Zariadenie a analytická technika musia poskytovať štandard konformný s bežnou praxou v EU. IT a počítačové vybavenie musia zodpovedať štandardom pre činnosť a výučbu požadovaným v EU. Priestory a vybavenie laboratória musí zodpovedať bežným štandardom pre požiarnu ochranu a bezpečnosť v práci. Zabezpečenie aktuálnou domácou a zahraničnou literatúrou (učebnice, časopisy, príručky) je nevyhnutné. Predpokladá sa prístup k elektronickým zdrojom informácií.

**Urgentná laboratórna diagnostika:** Laboratórium musí poskytovať akútnu laboratórnu diagnostiku 24 hodín.

**Kvalita:** Laboratória výučbovej bázy sa musia zúčastňovať procesov, internej a externej kontroly kvality, zdokonaľovania kvality, akreditácie a snažiť sa o totálny manažment kvality v oblasti laboratórnej diagnostiky a jej výučby.

**Konzultácie a interpretácia:** Štýl práce laboratória musí byť orientovaný interaktívne s klinickou praxou tak, aby školenec mal možnosť nadobudnúť v praxi skúsenosti s konzultátnou činnosťou a interpretáciou laboratórnych výsledkov a nálezov v klinickej praxi.

**Personálne vybavenie:** Výučbu v medicínskej biopatológii musí zabezpečovať graduovaný medicínsky biopatológ s najmenej 10 ročnou praxou v medicínskej biopatológii.

**Rôzne:** Na výučbovej báze musí existovať dostatočný počet kvalifikovaných školiteľov ako aj pracovníkov, aby zvládli pracovnú záťaž tak, aby zodpovedala kritériám kvality v oblasti laboratórnej diagnostiky a jej praktickej a teroetickej výučby.

Štýl práce výučbovej bázy by mal umožniť školencovi získať skúsenosť aj v oblasti vedeckej a publikačnej činnosti, ako aj v oblasti laboratórneho manažmentu

---

## NOVÉ TRENDY V LABORÁTORNEJ DIAGNOSTIKE

---

GUSTAV KOVÁČ, ANNA PORUBENOVÁ

Institute for Chemistry  
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine  
Slovak School of Medicine Bratislava  
Alphamedical Bratislava

**RFID:** RFID = Radio Frequency Identification je identifikácia objektu aprenosu dát o ňom pomocou rádiových vln. Využívajú sa vlnové dĺžky od 0,5 do 10 m. Ako nástroj na prenos sa používa „Tag = visačka“, ktorým sa daný objekt

označuje. Tento prístup je výhodný pre komplexný prenos informácií. Nevýhoda je, že závisí od prostredia a povolených vlnových frekvencií. Metóda sa využíva sa pri identifikácii batožiny na letiskách namiesto čiarových kódov. Príkladom využitia v laboratórnej diagnostike môže slúžiť aplikácia RFID na transfúznom oddelení. Ide o aplikáciu prenosu informácií o procesoch a subjektoch pomocou rádiových vln na transfúznom oddelení. Visačka dokáže merať teplotu v transfúznom reťazci, obsahuje plnú informáciu o pacientovi, produkte, dokáže sledovať cestu a čas produktu, pacienti sú pozitívne identifikovaní visačkou rovnako ako zamestnanci. Zamestnanci nemajú radi visačku, lebo sledujú ich pohyby a čo robia počas pracovnej doby.

**Využitie optických senzorov v kontrole kvality laboratórnej diagnostiky:** Čítacie kamery nahrádzajú ľudské videnie – a navyše dokážu realizovať monitoring na rozdiel od ľudského oka pozdĺž celého spektra všetkých vlnových dĺžok (rtg, UV, IČ). Najznámejšie firmy v odbore sú: Cognex, Heuft. V priemysle takéto zariadenia skontrolujú viac 3 000 fliaš za minútu. V zdravotníctve čítajú v laboratóriu bar cody (Beckman, Olympus), triedia skúmavky, hladiny séra, hemolýzu, používajú sa tiež na verifikáciu. Sú potrebné doplnky pre automatizáciu a robotizáciu.

**Autovalidácia v mikrobiológii:** Autovalidácia je automatická validácia výsledkov laboratórnych vyšetrení pomocou validačného softvéru na základe nastavených kritérií. Rozdiel medzi autovalidáciou v klinickej chémii a mikrobiológii je v reťazci: vzorka – príjem – administratíva – **spracovanie – výsledok** – správa uvedený boldom. Vzorky v mikrobiológii / bakteriológii treba totiž opakovane vyšetrovať a posudzovať podľa výsledku kultúr počas jednotlivých dní. Ale aj tento proces sa dá automatizovať a previesť na model klinickej chémie napríklad pomocou fotografovania platní, automatického posunu misiek, ap. Autovalidačné pravidlá sú však zložitejšie.

**Optimálny model vzťahov medzi odberateľom a dodávateľom v laboratórnej diagnostike:** Potreby laboratórií v súčasnosti predstavujú široké spektrum požiadaviek: rekonfigurácia dizajnu laboratória, elektronické žiadanky, štítky, penumatická pošta, automatizácia – predanalytiky, integrácia automatov, konsolidácia – diagnostického procesu a laboratórnych disciplín, decentralizácia diagnostiky kde je to výhodné – POCT. Konečné riešenie musí poskytovať pridanú hodnotu včítane manažmentu rizika. Otázka dodávateľa dnes vyvstáva vo forme – skôr ako dlhodobého flexibilného partnera. Zmluva o manažmente diagnostiky (managed services contract) obsahuje: klinické potreby, operačné potreby, zabezpečenie nevyhnutnej fluidity procesov a fiskálny benefit. Existujú špeciálne agentúry (napr. Asterol – Vendor) nezávislé na firmách, ktoré vytvárajú takéto dlhodobé vzťahy – zmluvy na 15 rokov medzi dodávateľmi a odberateľmi.

**Zvyšovanie účinnosti laboratória pomocou princípov LEAN:** Filozofiu LEAN možno charakterizovať ako orientáciu na potreby zákazníka (kvalita, rýchlosť, lacnosť), orientáciu na potreby laboratória (kvalita, servis, produktivita, kapacita, nízke náklady). Hlavné ciele Lean predstavujú: vyššia kvalita, kratší TAT, zvýšená produktivita, zvýšená



kapacita, znížené náklady. Medzi metódy LEAN patrí aj kaizen a kontinuálne zdokonaľovanie kvality. Medzi charakteristické črty LEAN patria: tok procesov, ich analýza a štandardizácia ako aj meranie výkonu. Pokiaľ ide o vzťah automatizácie a princípov LEAN platí pravidlo: najskôr presadiť lean princípy a až potom automatizácia.

**Diagnostická paradigma budúcnosti – spojenie laboratórnych a zobrazovacích metód:** Diagnostickú paradigmu dneška predstavuje existencia integrovaného klinického laboratória a samostatného oddelenia zobrazovacích techník. Diagnostická paradigma, ktorá nasleduje bude predstavovať Integráciu oddelení laboratórnej diagnostiky s oddeleniami zobrazovacích techník. V budúcnosti zrejme zanikne rozdiel medzi In vivo a in vitro a ostane len integrovaná diagnostika. Hlavným hráčom vo vyššie uvedených oblastiach je firma Siemens.

---

## NOVÉ TRENDY V KVALITE LABORÁTORNEJ DIAGNOSTIKY

---

GUSTAV KOVÁČ  
ANNA PORUBENOVÁ

Institute for Chemistry  
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine  
Slovak School of Medicine Bratislava  
Alphamedical Bratislava

**Kontinuálne zdokonaľovanie kvality v laboratórnej medicíne:** Proces kontinuálneho zdokonaľovania kvality je výsledkom procesu, ktorý začal štokholmským vyhlásením, pokračoval Európskym modelom nadácie pre kvalitu, akreditačnými normami a antwerpským vyhlásením. Kontinuálne zdokonaľovanie kvality je princíp, ktorým sa implementuje udržiavanie a zabezpečuje rozvoj kvality na pracovisku. V súvislosti s kvalitou však existujú isté mýty v laboratórnej medicíne

Prvým mýtom je, že sa vo všeobecnosti predpokladá, že analytická kvalita je v porovnaní hlavne s predanalytickou, ale aj postanalytickou kvalitou dostatočná a že sa teda nemusíme starať o jej ďalšie zdokonaľovanie a rozvoj. Druhým mýtom je, že laboratórna medicína založená na dôkazoch poskytuje vedecké dôkazy a argumenty. Vyššie uvedené premisy, často považované za axiómy však často skôr zahmlievajú skutočnosť, než by prispievali k odhaľovaniu skutočností a súvislostí, ktoré stále v oblasti kvality laboratórnej diagnostiky zostávajú neobjasnené. Kvalita laboratórnej diagnostiky je charakterizovaná týmito parametrami: dokumenty a záznamy, organizačná štruktúra, personál, vybavenie a zariadenie, nákup a inventár, kontrola a riadenie procesov, manažment informácií, manažment rizika, externá a interná kontrola kvality a bezpečnosť.

**Metrika six sigma:** Silnou stránkou six sigma metriky je, že umožňuje jednoduchú kategorizáciu výkonu v oblasti kvality na základe definovanej totálnej chyby a bias u každej

metodiky. Sigma metrika umožňuje porovnania kvality laboratórnej diagnostiky s kvalitou v iných odvetviach. Poradie odvetví podľa six sigma metriky je možné charakterizovať smerom od najlepšej k najhoršej kvalite takto: bezpečnosť železničnej dopravy, bezpečnosť leteckej dopravy, automobilový priemysel, meškanie vlakov, laboratórna diagnostika. Vyššie uvedené svedčí pre skutočnosť, že laboratórna diagnostika v oblasti kvality v porovnaní s ostatnými odvetvami má rezervy a musí sa zlepšovať. Budúcnosť laboratórnej diagnostiky spočíva aj v aplikácii six sigma metriky na princípy biologickej variácie a analytickej neistoty vo všetkých oblastiach laboratórnej diagnostiky. Kategorizácia úrovne kvality metód na základe sigma metriky využíva pri výpočte sigmy totálnu chybu, variáciu a bias a umožňuje tak definovať úroveň kvality každej metodiky. To má významné dôsledky pre ekonomiku, pretože vyššie uvedený prístup umožňuje jednoduchšie definovať opatrenia na zlepšenia, vyčísliť náklady na ich implementáciu ako aj úspory z nich vyplývajúce.

**Význam indikátorov kvality pri rozhodovaní o investíciách do analytickej techniky:** bežnou praxou je, že o investíciách do analytickej techniky rozhodujú riaditelia, ktorí nepoznajú problematiku laboratórnej diagnostiky, ale nesú zodpovednosť za jej kvalitu. Preto je nevyhnutné definovať systém indikátorov kvality tak, aby jasne charakterizovali „výkon“ analytickej techniky aj pre „laika“ v laboratórnej diagnostike.

**Analýza potenciálu zlyhania:** predstavuje jedno z možností pri manažmente rizika. Riziko sa v laboratórnej diagnostike vyskytuje v dvoch oblastiach – biznisu (odberateľsko – dodávateľské vzťahy) a analytiky (pravdepodobnosť výskytu zlyhania v rámci workflow alebo vlastnej metodiky). Ide v podstate o samoučiaci sa systém, ktorý vychádza z empirických alebo predpokladaných hodnôt, ktoré sa overujú a upresňujú v praxi. Na základe overenia a vyhodnotenia sa potom stanovujú priority a plánuje sa zlepšenie postupov.

**Integrácia diagnostiky:** laboratórna diagnostika prešla vývojom od manuálnych metód cez automatizované ku integrovaným a konsolidovaným metódam, ktoré nerobia rozdiel medzi odbormi. Laboratórna diagnostika začína dnes predstavovať kompaktný, integrovaný a konsolidovaný útvar, ktorý sa dá jasne definovať rovnako ako požiadavky na kvalitu jeho činnosti. Zobrazovacie techniky (RTG, USG, CT, NMR in vivo a in vitro, PET a iné) sa tiež začínajú koncentrovať v oddelení zobrazovacích metód. Budúci model diagnostiky bude predstavovať integráciu laboratórnych a zobrazovacích techník do kompaktného balíka jednotných diagnostických informácií. Tento vývoj je podporovaný technologickým pokrokom, ako aj ekonomickou motiváciou a snahou poskytovať za každých okolností čo najkvalitnejšiu diagnostiku.

**Inovovaný Demingov cyklus – zdravotnícka starostlivosť orientovaná na procesy:** Jednou z metód na zlepšovanie kvality je postup – cyklus – ktorý definoval Deming a ktorý sa vývojom inovoval. Jeho súčasťou je takáto: definuj, meraj, analyzuj, inovuj, zdokonaľ, vyhodnoť a znovu opakuj celý vyššie uvedený cyklus.

Aplikáciou inovovaného Demingovho cyklu v klinickej praxi je vytváranie oddelení, na ktorých sa používajú štan-

dardizované metódy na štandardizované choroby. To má za následok zvýšenie kvality a zníženie nákladov na laboratórnu diagnostiku.

## KVALITA INTERPRETÁCIE LABORATÓRNEHO NÁLEZU

GUSTAV KOVÁČ  
ANNA PORUBENOVÁ

Institute for Chemistry  
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine  
Slovak School of Medicine Bratislava  
Alphamedical Bratislava

**Úvod:** Laboratórny nález sa bežne interpretuje porovnaním aktuálneho výsledku s referenčným rozsahom. Ak výsledok presiahne hornú a v niektorých prípadoch dolnú hranicu referenčného rozsahu, považuje sa za patologický. U epidemiologických štúdií hlavne z oblasti štúdií rizika ochorenia alebo úmrtia na komplikácie aterosklerózy sa zvyknú udávať namiesto referenčných hodnôt cieľové/ ideálne hodnoty (pri ktorých je najnižšie riziko výskytu ochorenia alebo úmrtia)

**Definície:** Na kvalitnú interpretáciu laboratórneho nálezu je nevyhnutné poznať referenčné hodnoty, analytickú variáciu, biologickú variáciu a totálnu variáciu, ďalej poznať rozdiel medzi koncepciou chyby a neistoty, poznať princíp zistenie klinicky významného rozdielu ako aj indexu individuality. *Presnosť* je miera schopnosti analytickej metodológie dosiahnuť čo najmenšiu odchýlku pri opakovanom meraní danej vzorky. *Správnosť* je miera schopnosti analytickej metodológie namerať hodnotu, ktorá sa čo najviac blíži ku skutočnej hodnote danej vzorky. *Intraindividuálna variácia* predstavuje kolísanie hodnoty parametra okolo homeostatického bodu na základe cirkadiánneho rytmu, menštruačného cyklu, sezónnych alebo iných cyklov. *Interindividuálnu variáciu* určuje pohlavie, rasa, vek, prostredie. *Totálna variácia* sa skladá z analytickej chyby (presnosť + správnosť = spoľahlivosť), biologickej variácie (intraindividuálna variácia + interindividuálna variácia = biologická variácia). *Totálna chyba* potom predstavuje súčet analytickej chyby + biologická variácia. *Koncepcia chyby* laboratórneho výsledku je založená na predstave, že je možné presne stanoviť analytickou metódou skutočnú hodnotu. *Koncepcia neistoty* laboratórneho výsledku naopak predpokladá, že nie je možné stanoviť jednu hodnotu ale len interval, v ktorom sa hodnota nachádza. *Klinicky významný rozdiel je definovaný rovnicou:*  $CD(\%) = 1.96 \times 2^{1/2} (VK_{AN}^2 + VK_{BI}^2)^{1/2} = 2.77 \times (VK_{AN}^2 + VK_{BI}^2)^{1/2}$ . *Index individuality* sa zaoberá problematikou citlivosti referenčných intervalov. Harrisov v tejto súvislosti udáva pomer intra a inter individuálnej variácie a delí laboratórne parametre do jednotlivých kategórií: menej ako 0.6 (málo senzitivne - 0.2: enzýmy, 0.4: cholesterol) do 1.0 (kreatinín, KM), viac ako 1.0 (Na, K).

**Výsledky:** Laboratórny výsledok sa interpretuje „mechanicky“ a „intuitívne“. Je dosť poznatkov na „vedecký“ prístup k interpretácii laboratórneho výsledku. Základnými nástrojmi na interpretáciu laboratórneho výsledku sú znalosti o referenčných hodnotách, analytickej variácii a biologickej variácii. Laboratórny výsledok je možné interpretovať na základe konceptu chyby alebo princípu neistoty laboratórneho výsledku. Bez ohľadu na vyššie uvedené princípy je možné pri interpretácii využívať kalkuláciu klinicky významného rozdielu.

Príklady analytickej variácie (AV), intraindividuálnej (BI) a interindividuálnej (BII) biologickej variácie a totálnej variácie (TV) u vybraných lipidových parametrov:

PARAMETER	AV	BI	BII	TV
Cholesterol	4 %	8 %	12 %	14 %
LDL	7 %	14 %	25 %	27 %
HDL	6 %	12 %	23 %	26 %
TG	11 %	22 %	23 %	34 %

Pre výpočet klinicky významného rozdielu u cholesterolu u daného pacienta je treba použiť analytickú variáciu (AV) a intraindividuálnu biologickú variáciu (BI). Pre hodnoty AV=4%, BI=8% a počet meraní n=2 nadobúda CD hodnotu:  $CD = 2.77 (4^2 + 8^2)^{1/2} = 2.77 (16 + 64)^{1/2} = 2.77 \times 8.9 = 25\%$ . Pre hodnoty AV=2%, BI=8% a počet meraní n=2, nadobúda CD hodnotu:  $CD = 2.77 (2^2 + 8^2)^{1/2} = 2.77 (4 + 64)^{1/2} = 2.77 \times 8.24 = 23\%$ . Pre hodnoty cholesterolu CH 1=8 mmol/l a CH2=7 mmol/l a ich rozdiel CH 1-CH 2=8-7=1, nadobúda CD nadobúda hodnotu  $CD \% = ((8-7)/7) \times 100 = 14\%$ . Podobne pre hodnoty cholesterolu CH1=8 a CH2=6.5 nadobúda CD hodnotu 23%, resp. pre hodnoty cholesterolu CH1=8 a CH 2=6 CD% 28%. Pre výpočet klinicky významného rozdielu u epidemiologických štúdií je treba brať do výpočtu totálnu biologickú variáciu.  $TBV = (VK_{BI}^2 + VK_{BII}^2)^{1/2}$ . Cholesterol =  $(8^2 + 12^2)^{1/2} = 14\%$ . LDL =  $(14^2 + 25^2)^{1/2} = 27\%$ , HDL =  $(12^2 + 23^2)^{1/2} = 26\%$ , TG =  $(22^2 + 23^2)^{1/2} = 34\%$ . Klinicky významný rozdiel potom bude nadobúdať pre skupinu hodnoty podľa vzorca  $CD = 2.77 (VK_A^2 + VK_{B2})^{1/2}$  pre cholesterol =  $2.77 (4^2 + 12^2)^{1/2} = 34\%$ , pre LDL =  $2.77 (7^2 + 25^2)^{1/2} = 75\%$ , HDL =  $2.77 (6^2 + 23^2)^{1/2} = 66\%$ , pre TG =  $2.77 (11^2 + 23^2)^{1/2} = 70\%$ .

**Záver:** Parametre kvality postanalytickej fázy nie sú jasne definované, nevenuje sa im adekvátna pozornosť. Kvalita postanalytickej fázy je na nízkej úrovni a predstavuje výzvu pre lekárov - jej zlepšenie môže mať významné ekonomické dôsledky. Kvantifikáciu ovplyvnenia laboratórneho vyšetrenia analytickými a biologickými faktormi umožňuje výpočet klinicky významného rozdielu. Zvyšovanie vplyvu analytickej spoľahlivosti na výsledok je limitované biologickou variáciou a u väčšiny parametrov neprinesie podstatné zvýšenie kvality. Klinicky významný rozdiel parametrov lipidového metabolizmu u monitorovaného jedinca predstavuje 25 % (cholesterol), 40 % (LDL), 50 % (HDL), 65 % (TG). Klinicky významný rozdiel parametrov lipidového metabolizmu

u skupinových štúdií predstavuje 34 % (cholesterol), 75 % (LDL), 66 % (HDL), 70 % (TG).

**Doporučenia:** Nemali by sme používať referenčné hodnoty bez popisu metódy a referenčnej populácie, deklarovať referenčný interval ako normu, vypočítavať referenčné hodnoty bez ohľadu na distribúciu, prísne dodržiavať referenčné hranice bez kontroly ich relevantnosti. Je nevyhnutné vynaložiť úsilie na implementáciu princípu neurčitosti do klinickej praxe. Je nevyhnutné sústrediť pozornosť na definíciu a zvýšenie parametrov kvality v postanalytickej fáze.

---

## LABMED BRATISLAVA 2008

---

GUSTAV KOVÁČ  
ANNA PORUBENOVÁ

Institute for Chemistry  
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine  
Slovak School of Medicine Bratislava  
Alphamedical Bratislava

**Úvod:** V dňoch 10–12 apríla 2008 sa konal pod záštitou Európskej únie medicínskych špecialistov jubilejný 10 ročník sympózia s medzinárodnou účasťou Labmed Bratislava 2008. Jeho hlavnými organizátormi boli: Slovenská zdravotnícka univerzita, Slovenská spoločnosť pre laboratórnu medicínu, Slovenská lekárska spoločnosť, Alpha Medical sro.

**Program:** Hlavné témy rokovania boli: 55 rokov inštitucionálneho ďalšieho vzdelávania zdravotníckych pracovníkov na Slovensku, 10 výročie organizácie sympózií Labmed, Cena Pera Hyltofta Petersena, Európska únia medicínskych špecialistov a medicínska biopatológia, Kvalita interpretácie laboratórneho výsledku, Laboratórna medicína v Európskej únii, Laboratórna medicína na Slovensku, Audit študijných špecializačných náplní, logbookov a systému prípravy y skúšok v laboratórnej medicíne na Slovensku

**Účastníci:** *Zahraniční prednášatelia:* Bernard Maillet (Belgicko) generálny sekretár UEMS, Utz Merten (Nemeccko) prezident výboru UEMS pre medicínsku biopatológiu, Lena Norlund (Švédsko) tajomník výboru UEMS pre medicínsku biopatológiu, Augusto Machado (Portugalsko) prezident sekcie UEMS pre polyvalentnú medicínsku biopatológiu, Damiano Castelli (Švajčiarsko) prezident sekcie UEMS pre hematologickú biopatológiu, Per Hyltoft Petersen (Dánsko), prezident výboru pre udeľovanie ceny PHP, Ana Stavljenic Rukavina (Chorvátsko), laureátka ceny PHP (Pera Hyltofta Petersena) za rok 2008. *Domáci prednášatelia:* Ján Štencl, Danka Farkašová, Alojz Rakús, Roman Kováč, Stanislav Oravec, Gustáv Kováč. *Poslucháči:* 10 apríl 2008: štvrtok: 117, 11 apríl 2008: piatok: 90, 12 apríl 2008: sobota: 36. *Firmy:* Roche, Asco, Olympus, Biomedica, Siemens, Stapro, Marián Blina a syn, Randox, Sysmex, Trigon, Eurolab Lambda, Pliva Lachema, Merck

**Problémy:** Spolupráca s SLS, slabá účasť tých, ktorých sa problematika nepríjemne dotýka – monovalentných špe-

cialistov, nedôslednosti v činnosti organizačného výboru, organizácia na posledný chvíľu.

**Záver:** Päťdesiat päť rokov inštitucionálneho ďalšieho vzdelávania zdravotníckych pracovníkov na Slovensku predstavuje významný medzník a vyžaduje si ďalšie úsilie v hramonizácii. 10 rokov organizácie sympózií Labmed Bratislava etablovalo toto podujatie do pozície lídra v oblasti inovácie laboratórnej diagnostiky. Cena Pera Hyltofta Petersena bola udelená týmto kandidátom: Dieter Johannes Vonderschmitt (Švajčiarsko), Aake Holmgard (Švédsko), Marek Dominiczak (UK), Pavel Blažíček (SR), Rita Andrea Horvath (Maďarsko), Anders Kallner (Švédsko), Ana Stavljenic Rukavina (Chorvátsko). Slovensko má zastúpenie v Európskej únii medicínskych špecialistov menovite v sekcii medicínska biopatológia. Kvalita interpretácie laboratórneho výsledku sa zvyšuje, pokiaľ sa zohľadňuje prevalencia výskytu choroby. Potvrdilo sa, že polyvalentná laboratórna medicína v Európskej únii prevláda, hoci jej názvy sú rôzne. Laboratórna medicína na Slovensku zapustila korene, stále však prevláda nedôvera a pokusy o revíziu stavu. Správa o výsledkoch auditu postgraduálneho štúdia v laboratórnej medicíne bude vypracovaná do mesiaca.

**Doporučenia:** Pokračovať v doterajšom výbere inovačných tém, cieľovú skupinu klientov okrem laboratórnych pracovníkov rozšíriť na klinikov, podujatie systematicky pripravovať celý rok na základe dlhodobého plánu, systematicky spolupracovať s kmeňovým poslucháčstvom, prehľbovať kontakty s firmami, stabilizovať organizačný a programový výbor, spolupracovať s UEMS.

---

## POSTGRADUÁLNE VZDELÁVANIE V LABORATÓRNEJ MEDICÍNE A KLINICKEJ BIOCHÉMII

---

GUSTAV KOVÁČ, ANNA PORUBENOVÁ  
TRUPL J., DRAKULOVÁ M., KELEOVÁ A., ÚRGE O.

Institute for Chemistry  
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine  
Slovak School of Medicine Bratislava  
Alphamedical Bratislava

**Postgraduálne vzdelávanie v klinickej biochémii a laboratórnej medicíne:** vychádza z dokumentov SR ako aj z dokumentov EU. V práci sa zaoberáme súčasným stavom postgraduálneho vzdelávania v laboratórnej medicíne a klinickej biochémii – menovite: študijnými špecializačnými náplňami (curriculum), záznamníkmi výkonov a iných aktivít (logbook), zaraďovaním, systémom prípravy, systémom overovania vedomostí. V práci diskutujeme problémy súvisiace so súčasným stavom a navrhujeme ich riešenie. **Postgraduálny špecializačný program (curriculum):** Slovenská zdravotnícka univerzita ktorá je garantom postgraduálneho vzdelávania v laboratórnej medicíne a klinickej biochémii schválila: *Postgraduálny špecializačný program (curriculum)*

pre laboratórnu medicínu ktorý vychádza z charty UEMS pre medicínsku biopatológiu, (5 rokov trvanie, 1 rok klinika, 4 roky laboratórium) učebnice: Keneth MC Clatchey: Clinical Laboratory Medicine (klinické laboratórium, molekulárna patológia, klinická chémia, mikroskopia a analýza moča, cytogenetika, hematológia, hemostáza, HLA, imunopatológia, mikrobiológia, krvná banka a transfúzna medicína). *Postgraduálny špecializačný program (curriculum) pre klinickú biochémiu* ktorý vychádza z charty UEMS pre medicínsku biopatológiu, (5 rokov trvanie, 1 rok klinika, 4 roky laboratórium), sylabu EC 4 pre klinickú chémiu - Clinical Chemistry (klinická chémia, klinická prax, rozšírená hematológia, rozšírená mikrobiológia (viroológia, mykológia, parazitológia, bakteriológia).

**Záznamník zdravotných výkonov a iných odborných aktivít:** Pre oba druhy postgraduálneho štúdia existujú má tieto časti: klinická prax, prehľad účasti na školiacich akciách, vedeckých podujatiach, študijných pobytoch, prehľad prednáškovej a publikačnej činnosti, záznam o výkonoch I = viac ako 100, záznam o výkonoch II = menej ako 100, súčet výkonov.

**Zaraďovanie:** Do postgraduálneho vzdelávania môže byť zaradený lekár, iný zdravotnícky pracovník (po absolvovaní prípravy pre výkon práce v zdravotníctve), laborant s vysokoškolským vzdelaním.

**Systém prípravy:** *Učebné texty:* Kolektív členov ústavu pre Chémiu, klinickú biochémiu a laboratórnu medicínu SZU vypracoval a autorizoval za obdobie jún - december 2007 prednášky pre vstupný kurz z laboratórnej medicíny a klinickej biochémie, ktorý pokrýva všetkých 11 oblastí z laboratórnej medicíny a je v power pointovom formáte. *Vstupný kurz:* Ústav chémie, klinickej biochémie a laboratórnej medicíny poskytuje každoročne pre študentov zaradených do postgraduálneho vzdelávania vstupný 4 týždňový kurz v letnom a zimnom semestri (v júni a decembri) zameraný na praktické a teoretické základy hlavných oblastí laboratórnej medicíny a klinickej biochémie ( laboratórny

manažment, klinická biochémia, hematológia, mikrobiológia a imunológia). *Teoretická a praktická príprava* spočíva v individuálnom štúdiu, praxi na „domovskom“ pracovisku, účasti na vedeckých podujatiach, školiacich akciách a kongresoch, prednáškovej a publikačnej činnosti (kontinuálnom vzdelávaní).

**Overovanie vedomostí:** *Termín:* koniec januára a koniec mája (skúšobné obdobe letný a zimný semester). *Odbor,* klinická biochémia, laboratórna medicína

*Skúšobná komisia:* prof. MUDr. RNDr. Gustáv Kováč CSc MBA, MUDr. Anna Porubenová CSc, prof. RNDr. Jan Trupl CSC, prof. MUDr. Štefan Nyulassy DrSc, prof. MUDr. Ivan Pecháň DrSc., MUDr. Monika Drakulová, Pharm.Dr. Anna Keleová CSc., PaedDr. Zdena Konečná CSc.

**Problémy:** Interferencia s pregraduálnou výučbou predmetoch chémie, biochémie, funkčná a laboratórna diagnostika, manažment v laboratórnej medicíne v dennom, externom a diaľkovom štúdiu na lekárskej fakulte, fakulte špecializačných štúdií, fakulte verejného zdravotníctva a fakulte ošetrovateľstva Slovenskej zdravotníckej univerzity. Formulácia kategórií iných zdravotníckych pracovníkov v nariadení vlády a jej interpretácia pri definícii typov monovalentného a polyvalentného vzdelávania. Zaraďovanie iných zdravotníckych pracovníkov do monovalentného alebo polyvalentného štúdia - nevhodná definícia vstupných podmienok (vysoké školy). Uznávanie dĺžky praxe u laborantov s vysokoškolským vzdelaním. Rozdiely medzi kritériami UEMS a praxou na Slovensku v postgraduálnom vzdelávaní v medicínskej biopatológii

**Záver:** Postgraduálne vzdelávanie v laboratórnej medicíne a v klinickej biochémií má zadefinovaný systém štúdia, ktorý spočíva na študijných špecializačných náplniach, záznamníkoch, zaraďovaní, vstupnom kurze, učebných textoch, individuálnom štúdiu, praxi a overovaní vedomostí.

**Doporučenia:** Vo všetkých vyššie uvedených oblastiach (u niektorých viac, u iných menej) je potrebné prehlbovať harmonizáciu s Chartou UEMS pre medicínsku biopatológiu.



# Integrované analyzátořy ARCHITECT *ci16200/ci8200* pro Vaši chytrou laboratoř

## Společné prvky rodiny analyzátořů Architect

- Ekvivalentní výsledky ze všech analyzátořů ARCHITECT *i* Systems™ a ARCHITECT *c* Systems™
- Identické technologie, reagentie a protokoly metod
- Identický software
- Univerzální stojánky zkumavek ARCHITECT

## Integrace bez kompromisů

- SmartWash™ technologie zaručuje klinicky bezvýznamnou kontaminaci vzorku mezi zkumavkami (pod 0,1 ppm)
- Robotický podavač vzorků (RSH) eliminuje omezení průchodnosti vzorků analyzátořy a upřednostňuje urgentní vzorky
- Okamžité zpracování STAT vzorků zvyšuje čas odezvy
- Až 90 chlazených pozic pro reagentie plus patentované ISE
- Kapacita podavače až 365 zkumavek včetně 35 prioritních pozic
- Kontinuální přísun vzorků
- Výkon analyzátořu ARCHITECT *ci16200* až 1800 klinickochemických a až 200 imunochemických testů za hodinu. Výkon analyzátořu ARCHITECT *ci8200* až 1200 klinickochemických a až 200 imunochemických testů za hodinu.



## Vyjímečné technologie a metody

- CHEMIFLEX® technologie poskytuje flexibilní protokoly s vyjímečnou detekcí a širokými rozsahy linearit
- ISE technologie v podobě bezúdržbového ICT čipu pro měření Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> a Cl<sup>-</sup> s minimální spotřebou vzorku 15μl a vynikající přesností (1% a méně)
- Detekce sraženin a bublin založená na monitorování tlakových poměrů v aspiračním systému zajišťuje přesné dávkování vzorků a reagentií

**Více než 100 analytických jednotek ARCHITECT instalovaných v laboratořích v Česku a na Slovensku**

**Abbott Laboratories, s.r.o.**  
Hadovka Office Park  
Evropská 2590/33d  
166 00 Praha 6  
tel.: +420 267 292 111  
www.abbottdiagnostics.cz

 **Abbott**  
A Promise for Life

## Kvalitní a spolehlivé řešení pro laboratoře a POCT



Libovolná kombinace parametrů • Jednoduchá obsluha • Minimální údržba

### ACIDOBÁZE

pH	cCl <sup>-</sup>	cGlu	ctHb
cH <sup>+</sup>	cCa <sup>2+</sup>	cLac	sO <sub>2</sub>
pCO <sub>2</sub>	cK <sup>+</sup>	cCrea	FO <sub>2</sub> Hb
pO <sub>2</sub>	cNa <sup>+</sup>	ctBil	FCOHb
			FMetHb
			FHHb
			FHbF

### IMUNOCHEMIE

Troponin I, T  
CK-MB  
Myoglobin  
NT-proBNP  
CRP  
βhCG  
D-dimer

Simpler, faster, better

**RADIOMETER s.r.o.**

**zastoupení pro ČR a SR**

Křenova 3, 162 00 Praha 6, Tel.: +420 - 220 400 300

Mail: office@radiometer.cz, Web: www.radiometer.com

**RADIOMETER** 



...riešenie pre Vaše laboratórium

## PRÍPRAVA VZORIEK ANALÝZA VZORIEK SKLADOVANIE VZORIEK

- ▲ centrifúgy a ultracentrifúgy
- ▲ laminárne boxy, biohazardy, digestory
- ▲ chovné systémy pre laboratórne zvieratá
- ▲ chladiace, mraziace a hlbokomraziace boxy
- ▲ termostaty, sušiarne, autoklávy
- ▲ anaeróbne a hypoxické boxy
- ▲ laboratórne umývačky a sušičky skla
- ▲ PCR cykléry, PCR boxy, hybridizačné pecky
- ▲ mikroplatničkové fotometre, premývačky, dispensory
- ▲ bio-imaging - gelová analýza a dokumentácia
- ▲ lyofilizátory, vákuové koncentrátory
- ▲ automatické počítače kolónií
- ▲ monitoring teploty a vlhkosti
- ▲ pipety FINNPIPETTE® a špičky FINNTIPS®

**STATE-OF-ART DIZAJN  
UNIKÁTNA TECHNOLOGIA  
SPOĽAHLIVÝ SERVIS**

exclusive representation of companies  
THERMO SCIENTIFIC - Laboratory Equipment Division  
(Jouan/Heto - Holten/Heraeus/H+P/Hybrid/Forma/Labsystems/Savant/Sorvall/Barnstead)  
EVERmed - LANCER - RUSKINN - SYNGENE - SYNBIOSIS - TECNIPLAST

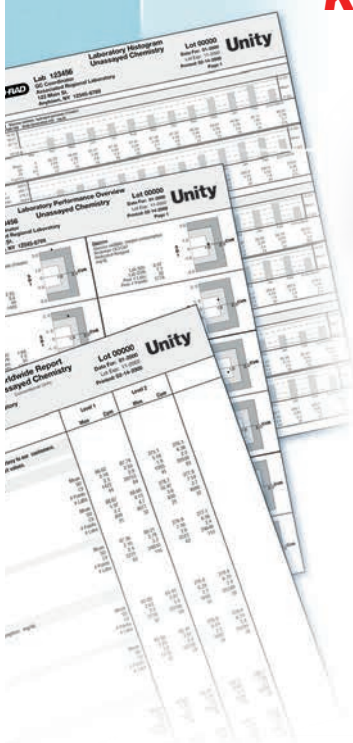
TRIGON, s.r.o., Štefánikova 13, 821 03 Bratislava 2  
tel./fax: +421 2 635 31 241, +421 905 707 597 - 728 896  
tel./fax: +421 2 635 31 240, servis: +421 905 215 212  
e-mail: mail@trigon-plus.sk, http:// www.trigon-plus.sk



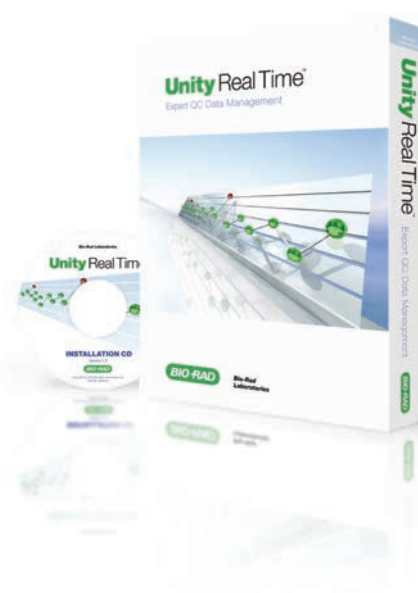
**BIO-RAD**

**Bio-Rad  
Laboratories**

## **KOMPLETNÝ SYSTÉM KONTROLY KVALITY PRE KLINICKÉ LABORATÓRIÁ**



- Immunoassay Plus Control
- Anemia Control
- Fertility Control
- Maternal Serum Control
- Tumor Marker Control
- TDM Control
- Lipids Control
- Pediatric Control
- Urine Chemistry Control
- Urine Toxicology Control
- Immunology Control
- Spinal Fluid Control
- Hematology Control
- Diabetes Control
- Blood Gas Control
- Cardiac Markers Control
- Urine Metals Control
- Urine Bone Markers Control
- Endocrine Control
- Infectious Disease Control
- Assayed / Unassayed Chemistry Control



**takecontrol**  
With the Complete QC System from Bio-Rad Laboratories

## **PROGRAMY EXTERNEJ KONTROLY KVALITY - EQAS**

- Clinical Chemistry Program
- Urine Chemistry Program
- Hematology Program
- Immunoassay Programs
  - Program 1 tyroidálne funkcie, tehotenstvo, metabolizmus železa
  - Program 2 všeobecná a reprodukčná endokrinológia
  - Program 3 špecifické a patologické proteíny
  - Program 4 onkológia
- Therapeutic Drug Monitoring Program
- Hemoglobin Program

**BIO-RAD**

Mlynské Nivy 54, 821 05 Bratislava  
Tel.: +421 43634487 fax: +421 43634488  
Mobil: +420 905531649-50  
e-mail: halasa@bio-rad.sk

**www.bio-rad.com**  
**www.qcnet.com**

