

Modelový príklad tvorby referenčných materiálov v laboratórnych vyšetrovacích metódach

A model example of the creation of reference materials in laboratory examination methods

Silvia JANEGOVÁ, Katarína KAŠLÍKOVÁ, Zdenka KRAJČOVIČOVÁ, Vladimír MELUŠ

Fakulta zdravotníctva, Trenčianska univerzita Alexandra Dubčeka v Trenčíne, Trenčín

ABSTRAKT

Východiská: V našej štúdií sme sa venovali významu referenčných materiálov v laboratórnych vyšetrovacích metódach.

Ciele: Naším cieľom bolo zistiť nadväznosť vytvoreného referenčného materiálu na presne určené mikrobiologické zdroje a overenie vlastností referenčného biologického materiálu s ohľadom na získaný absorbančný signál pri jednotlivých vlnových dĺžkach. Ďalším cieľom našej práce bolo využitie vytvoreného referenčného materiálu pre overenie miery zhody výsledkov referenčného a overovaného prístroja prostredníctvom párového merania.

Vzorka: Spracovali sme 576 výsledkov stanovenia absorbancie spracovávaného biologického materiálu určeného pre referenčné účely pri troch vlnových dĺžkach (405 nm, 450 nm a 492 nm), pomocou referenčného a overovaného prístroja.

Metódy: Získané dáta sme spracovali v programe MS-Excel. Štatisticky sme spracovali parametre: aritmetický priemer, smerodajná odchýlka, medián, minimálna hodnota, maximálna hodnota a variačný koeficient. Pre účely štatistického overenia zhody výsledkov na overovanom prístroji sme využili Passing-Bablokov regresný model, s pomocou ktorého sme spracovali 216 (z pôvodne použitých 576) výsledkov absorbancie spracovávaného biologického materiálu určeného pre referenčné účely, pri jednotlivých vlnových dĺžkach.

Výsledky: Variačný koeficient opakovaných meraní absorbancie vytvoreného referenčného materiálu bol v rozmedzí 1 – 5 % v prípade referenčného prístroja. V prípade overovaného prístroja dosiahol až 24%. Na základe výsledkov Passing-Bablokovej analýzy konštatujeme, že overovaný prístroj vykazoval so zvyšujúcou sa koncentráciou spracovávaného biologického materiálu určeného pre referenčné účely, menej správne výsledky.

Záver: Naša práca potvrdzuje dôležitosť využívania referenčných materiálov v laboratórnych vyšetrovacích metódach v zdravotníctve a to najmä v oblasti rutinnej laboratórnej diagnostiky.

Kľúčové slová: Referenčné materiály. Laboratórne metódy. Riadenie kvality. Referenčný prístroj. Referenčný kmeň.

ABSTRACT

Background: In our study, we focused on the importance of reference materials in laboratory examination methods.

Objectives: Our objective was to determine the continuity of the created reference material with precisely determined microbiological sources and to verify the properties of the reference biological material with regard to the obtained absorbance signal at individual wavelengths. Another goal of our work was the use of the created reference material to verify the degree of agreement between the results of the reference and verified device through paired measurement.

Sample: We processed 576 results of determining the absorbance of processed biological material intended for reference purposes at three wavelengths (405 nm, 450 nm and 492 nm), using a reference and verified device.

Methods: We processed the obtained data in program MS-Excel. We statistically processed the parameters: arithmetic mean, standard deviation, median, minimum value, maximum value and coefficient of variation. For the purposes of statistical verification of the agreement of the results on the verified device, we used the Passing-Bablok regression model, with the help of which we processed 216 (from the originally used 576) absorbance results of the processed biological material intended for reference purposes, at individual wavelengths.

Results: The coefficient of variation of repeated absorbance measurements of the created reference material ranged from 1% to 5% in the case of the reference device. In the case of the verified device, it reached up to 24%.

Based on the results of the Passing-Bablok analysis, we conclude that the verified device showed less correct results with increasing concentration of processed biological material intended for reference purposes.

Conclusion: Our work confirms the importance of using reference materials in laboratory examination methods in healthcare, especially in the field of routine laboratory diagnostics.

Key words: Reference materials. Laboratory methods. Quality management. Reference device. Reference strain.

ÚVOD

Ako napovedá názov, referenčné materiály sú vzorky a roztoky, ktoré sú dostatočne a kvalitne definované, aby mohli slúžiť na kalibráciu laboratórných prístrojov alebo na overenie kvality výsledkov získaných v laboratóriu, pri použitej metóde stanovenia laboratórných parametrov stanovených za daných experimentálnych podmienok.

Napriek tomu, že referenčné materiály majú dôležitý význam, bežne nie sú „vidieť“. Ich parametre sa nevydávajú s výsledkovými listami pacientov a zostávajú tak vnútorným systémom laboratória, ktorý má výrazný podiel na zabezpečení jeho správnej práci.

LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

Laboratórna diagnostika je súvislý opakujúci sa proces, do ktorého na jednej strane vstupujú materiály, vzorky a spotrebný materiál a s pomocou personálno-technického vybavenia pracoviska sa získajú výsledky, ktoré opúšťajú pracovisko spolu s ostatnými elementami a kruh sa opakuje. Nie je to však samohybný kruh, žiadne „perpetuum mobile“, pretože okrem materiálu, energií a informácií je nutné zabezpečiť jeho trvalý chod v požadovanej kvalite. Kľúčový význam pri tom zohrávajú kontrolné a referenčné materiály, ktorých využitie je úzko spojené so základnými metodologickými „vlastnosťami“ metód.

Presnosť merania - pod týmto pojmom rozumieme mieru rozptýlenia nameraných hodnôt. Inými slovami je to miera zhody číselných výsledkov, získaných opakovaným meraním jednej vzorky, za špecifických podmienok opakovateľnosti. Presnosť merania závisí iba od distribúcie náhodných chýb. Na pravdivú ani konkrétnu hodnotu sa nevzťahuje [1, 2].

Správnosť merania - termín správnosť merania predstavuje tesnosť zhody výsledku merania (nameraná hodnota veličiny) a pravej (skutočnej) hodnoty veličiny. Je to rozdiel medzi aritmetickým priemerom vzorky a teoreticky očakávanou hodnotou. Hodnotenie správnosti spočíva v porovnaní nameraných údajov voči očakávanej hodnote. Ako vzorka sa používa referenčný materiál, certifikovaný referenčný materiál alebo výsledok medzilaboratórneho porovnávania skúšky vhodnej vzorky [3].

Medza detekcie - LOD (z *angl.* Limit of Detection) vo všeobecnosti vyjadruje najnižšiu koncentráciu (množstvo) stanovovaného analytu vo vzorke. V tejto koncentrácii sa jeho prítomnosť môže danou metódou spoľahlivo dokázať. Medza detekcia sa odlišuje od medze blanku (slepý pokus, kontrolná vzorka). Kontrolnú vzorku tvorí roztok, ktorý neobsahuje uvedený analyt. Najčastejšie sa využíva voda alebo fyziologický roztok. Po viacnásobnom meraní týchto vzoriek zistíme intenzitu signálu bez prítomnosti stanovovaného analytu. Miera zvýšenia signálu vzhľadom ku kontrolnej vzorke umožňuje určiť koncentráciu analytu vo vzorke. Všeobecne sa medza detekcie uvádza ako hodnota podielu 3,3-násobku smerodajnej odchýlky merania kontrolnej vzorky a smernice kalibračnej priamky [2, 3].

Medza stanovenia - LOQ (z *angl.* Limit of Quantification) je najnižšia koncentrácia stanovovaného analytu, pri ktorej ho je danou metódou ešte možné stanoviť s prijateľnou hodnotou presnosti (s neistotou určenou vopred). Vypočítame ju ako podiel 10-násobku smerodajnej odchýlky (*s*) merania kontrolnej vzorky a smernice kalibračnej priamky (*a*) [1].

Medza linearity - pod pojmom medza linearity rozumieme schopnosť analytickej metódy poskytujúca odozvu, lineárne závisiacu od koncentrácie analytu. Časť kalibračnej krivky, v ktorej je intenzita signálu priamoúmerná koncentrácii stanovovaného analytu sa označuje ako oblasť linearity. Lineárny rozsah býva ohraničený najnižším a najvyšším bodom kalibračnej krivky. Hornú hranicu tejto oblasti predstavuje medza linearity (LOL, z *angl.* Limit of Linearity) [3].

REFERENČNÉ MATERIÁLY

Referenčný materiál (RM) predstavuje dostatočne homogénny a časovo stály roztok alebo látku. RM môže byť čistá látka na kalibráciu alebo vo forme zmiešaného plynu, kvapaliny alebo pevnej látky. Obsahuje jednu alebo viac vlastností, ktoré sú dobre známe. Takouto vlastnosťou je napríklad stanovovaný analyt v definovanej koncentrácii, prípadne aj vlastnosti matrice roztoku, v ktorom sa analyt nachádza. RM sa zaraďujú pravidelne ku každej sérii vzoriek [4].

V laboratóriách sa využívajú ako RM čisté látkové materiály a matricové materiály. Matricové RM obsahujú analyt v prirodzenej matrici. Ich výhodou je identifikácia matricového efektu, ktorý môže ovplyvniť presnosť procesu chemického merania. Existujú dva typy matricových RM. Prvým typom je certifikovaný RM (CRM), ktorý je vydaný a certifikovaný organizáciou všeobecne akceptovaný ako technicky spôsobilý. Druhým typom je interný RM, vyvinutý laboratóriom pre jeho vlastné interné použitie [5].

Hierarchia RM pozostáva z piatich hlavných stupňov kvality, od národných metrologických a iných primárnych štandardov či analytických štandardov až po RM a CRM. S každou vyššou úrovňou sa zvyšuje aj úroveň požiadaviek na certifikáciu a vysledovateľnosť [6].

Dôvody používania referenčných materiálov v humánnej laboratórnej diagnostike

Využitie RM spočíva napríklad v kalibrácii prístrojov (kalibrácia laboratórnej metódy). Ďalším využitím je kontrola kvality a priradovanie hodnôt materiálom. Ich použitie v humánnej laboratórnej diagnostike zaručuje metrologickú nadväznosť výsledkov vyšetrenia voči medzinárodným štandardom. Medzi hlavné dôvody používania RM v laboratórnych vyšetrovacích metódach patrí pomoc s vývojom a validáciou presných metód analýzy a zabezpečenie sledovateľnosti výsledkov merania, overenie aktuálne používaných testovacích metód, zabezpečenie dlhodobej primeranosti a integrity programov zabezpečovania kvality merania a taktiež používanie vo forme testovacích materiálov pre medzilaboratórne porovnávanie a programy testovania odbornej spôsobilosti [4, 6, 7].

Požiadavky na vlastnosti referenčných materiálov

Medzi požiadavky na vlastnosti RM patrí jasne definovaná meraná veličina, ľahká dostupnosť, uvedený výsledok merania, stabilita pri definovaných skladovacích podmienkach, homogenita a známa čistota so súvisiacou neistotou (primárne RM) [7].

Neistota merania predstavuje parameter, spájajúci sa s výsledkom merania. Charakterizuje ho rozptyl hodnôt, ktoré možno pripísať meranej veličine.

Vysledovateľnosť (*angl.* traceability) znamená vlastnosť výsledku merania alebo hodnoty štandardu, ktorá zvyčajne súvisí s národnými alebo medzinárodnými štandardmi, prostredníctvom nepretrhovaného reťazca porovnávaní, pričom všetky majú uvedené neistoty [6].

CIELE

V našej štúdii sa zameriavame na spracovanie dát biologického materiálu stanovovaného optickými laboratórnymi metódami pre účely simulácie definovania RM s dôrazom na:

- nadväznosť vytvoreného RM na presne určené mikrobiologické zdroje,
- overenie stability referenčného biologického materiálu s ohľadom na získaný absorbančný signál pri jednotlivých vlnových dĺžkach,
- využitie vytvoreného materiálu pre overenie výsledkov z iného analyzátora

MATERIÁL A METÓDY

Prístroje

Výrobca nami používaného referenčného prístroja pre stanovenie absorbancie mikrotitračných platní Apollo11 LB 913 je BERTHOLD TECHNOLOGIES so sídlom v Nemecku. Alternatívnou náhradou za uvedený prístroj predstavoval analyzátor Humareader fy HUMAN (MIOS junior), ktorý je kompaktný fotometrický systém na všeobecné použitie.

Biologický materiál

Spracovaným kmeňom bola *E. coli* (CCM 3954; Česká sbírka mikroorganizmů, Masarykova univerzita Brno) [8]. Pri príprave RM bola použitá Christensenova metóda, ktorej princíp spočíva v adherencii baktérií na steny mikrotitračnej platničky, premývaní PBS (z *angl.* Phosphate-buffered saline, fosfáto-pufrovaný fyziologický roztok), fixovaní, farbení a finálnom meraní optickej denzity buniek pri vlnovej dĺžke, ktorá je v pôvodnej metóde 590 nm. Vzorky jednotlivých kmeňov boli stanovené jednorazovo v triplikátoch. Táto kvantitatívna metóda v mikrotitračných platničkách je považovaná za zlatý štandard medzi metódami detekcie biofilmov [9].

Pre účely našej štúdie sme spracovali tri rôzne úrovne miery adherencie patogénu (v ďalšom texte uvádzané ako: level 1, level 2, level 3), avšak v porovnaní s pôvodnou Christensenovou metódou sme optickú denzitu vzorky v mikrotitračných platničkách stanovili pri troch odlišných vlnových dĺžkach: 405 nm, 450 nm a 492 nm.

Štatistické spracovanie dát

Ako základné štatistické parametre popisnej štatistiky získaných dát boli využité počet vzoriek, aritmetický priemer, smerodajná odchýlka, medián, minimálna a maximálna hodnota.

Pre účely štatistického overenia zhody výsledkov na overovanom prístroji sme využili Passing-Bablokov regresný model. Ide o neparametrickú metódu, ktorá nepredpokladá normálne rozloženie nameraných hodnôt. Ďalšou výhodou tejto štatistickej metódy je necitlivosť k náhodným chybám oboch porovnávaných metód, čo je dôležité predovšetkým v prípade intra- a interindividuálnej variability, ktorá je bežná pre živé biologické systémy [10].

VÝSLEDKY

Vytvorenie modelového referenčného materiálu a overenie jeho vlastností

Výsledky stanovenia absorpcie spracovávaného biologického materiálu určeného pre referenčné účely pri vlnovej dĺžke 405 nm referenčným prístrojom uvádzame v tabuľke 1. Z výsledkov je zrejmé, že priemerná hodnota (aritmetický priemer) dosiahla najvyššiu hodnotu 1,578 (level 3). Naopak najnižšiu hodnotu, aj podľa očakávania, má tzv. blank (slepý pokus) a to konkrétne 0,209. Ďalším spracovaným parametrom je smerodajná odchýlka, ktorej najvyššia hodnota predstavuje 0,0493 pri najvyššej koncentrácii a v prípade slepého pokusu je najnižšia (0,0081). Medián sa pohybuje od hodnoty 0,210 až po hodnotu 1,553, pričom vo všetkých prípadoch je číselná hodnota mediánu veľmi podobná alebo aj rovná číselnej hodnote aritmetického priemeru. Pri danej vlnovej dĺžke a danom prístroji je najmenšia nameraná hodnota 0,196 pri slepom pokuse a so stúpajúcou koncentráciou sa zvyšuje. Celkovo najvyššia nameraná hodnota v tomto prípade je 1,674 pri najvyššej koncentrácii. Hodnota variačného koeficientu 5 % vyšla pri najnižšej koncentrácii a naopak najnižšiu hodnotu variačného koeficientu 1 %, sme získali pri strednej koncentrácii (level 2). Analogicky sme vyhodnotili aj výsledky stanovenia absorpcie pri ostatných dvoch zvolených vlnových dĺžkach 450 nm a 492 nm na referenčnom prístroji, pričom variačný koeficient nepresiahol 5 % (tab. 1).

Následne sme vykonali identické laboratórne stanovenie na overovanom prístroji (tabuľka 2). Vidíme, že v prípade stanovenia absorpcie pri vlnovej dĺžke 405 nm najvyššia hodnota aritmetického priemeru predstavuje v prípade najvyššej koncentrácie číslo 1,197. Táto hodnota je o 0,381 nižšia ako pri meraní referenčným prístrojom pri rovnakej vlnovej dĺžke. Najnižšiu priemernú hodnotu 0,437 má slepý pokus. Rozmedzie mediánu je od číselnej hodnoty 0,438 až po hodnotu 1,291 pri najvyššej koncentrácii. Zistili sme, že takmer vo všetkých prípadoch je jeho číselná hodnota veľmi podobná číselnej hodnote aritmetického priemeru. Najmenšia nameraná hodnota zo všetkých nameraných hodnôt je 0,261, netypicky pri najvyššej koncentrácii. Celkovo najvyššia nameraná hodnota 1,330 bola zistená pri najvyššej koncentrácii, pričom sa líši o 0,344 v porovnaní s celkovo najvyššou hodnotou získanou pri meraní prístrojom pri rovnakej vlnovej dĺžke. Hodnota variačného koeficientu 24 % vyšla pri najvyššej koncentrácii. Táto odľahlá hodnota je spôsobená tým, že najnižšia nameraná hodnota sa výrazne líši od ostatných nameraných hodnôt v prípade najvyššej koncentrácie.

Najnižšiu hodnotu variačného koeficientu 2 %, pozorujeme pri strednej koncentrácii (level 2), čo je zároveň aj najnižšia hodnota variačného koeficientu, ktorá sa v tabuľke 2 nachádza. Analogicky sme postupovali aj v prípade laboratórneho stanovenia absorpcie na overovanom prístroji pri vlnových dĺžkach 450 nm a 495 nm, pri ktorom sme však nezaznamenali zásadne vysokú hodnotu variačného koeficientu (tab. 2).

Tabuľka 1 Absorbancia biologického materiálu stanovená na referenčnom prístroji Apollo11 LB 913

Vlnová dĺžka	Level	<i>n</i>	\bar{x}	<i>sd</i>	x_m	<i>min.</i>	<i>max.</i>	<i>Vk</i>
405 nm	1	60	0,850	0,0389	0,852	0,750	0,946	5%
	2	12	1,013	0,0135	1,013	0,984	1,034	1%
	3	12	1,578	0,0493	1,553	1,516	1,674	3%
	blank	12	0,209	0,0081	0,210	0,196	0,225	4%
450 nm	1	60	0,665	0,0324	0,662	0,593	0,743	5%
	2	12	0,815	0,0096	0,818	0,790	0,828	1%
	3	12	1,414	0,0469	1,396	1,357	1,500	3%
	blank	12	0,128	0,0044	0,128	0,122	0,140	3%
492 nm	1	60	0,550	0,0286	0,549	0,490	0,614	5%
	2	12	0,685	0,0103	0,686	0,665	0,702	1%
	3	12	1,300	0,0488	1,280	1,234	1,390	4%
	blank	12	0,096	0,0046	0,096	0,090	0,109	5%

Legenda: *n* – počet vzoriek, \bar{x} – aritmetický priemer, *sd* – smerodajná odchýlka, x_m – medián, *min.* – minimálna hodnota, *max.* – maximálna hodnota, *Vk* – variačný koeficient

Tabuľka 2 Absorbancia biologického materiálu stanovená na overovanom prístroji MIOS junior

Vlnová dĺžka	Level	<i>n</i>	\bar{x}	<i>sd</i>	x_m	<i>min.</i>	<i>max.</i>	<i>Vk</i>
405 nm	1	60	0,870	0,0235	0,869	0,819	0,925	3%
	2	12	0,961	0,0169	0,958	0,927	0,992	2%
	3	12	1,197	0,2846	1,291	0,261	1,330	24%
	blank	12	0,437	0,0161	0,438	0,411	0,463	4%
450 nm	1	60	0,682	0,0213	0,681	0,641	0,742	3%
	2	12	0,762	0,0161	0,757	0,745	0,804	2%
	3	12	1,069	0,0275	1,073	1,009	1,106	3%
	blank	12	0,352	0,0189	0,354	0,323	0,380	5%
492 nm	1	60	0,563	0,0200	0,560	0,527	0,636	4%
	2	12	0,637	0,0160	0,633	0,615	0,676	3%
	3	12	0,929	0,0251	0,927	0,879	0,970	3%
	blank	12	0,298	0,0225	0,298	0,260	0,336	8%

Legenda: *n* – počet vzoriek, \bar{x} – aritmetický priemer, *sd* – smerodajná odchýlka, x_m – medián, *min.* – minimálna hodnota, *max.* – maximálna hodnota, *Vk* – variačný koeficient

Ďalším cieľom štúdie bolo využiť vytvorený RM pre účely overenia výsledkov z iného analyzátoru. V našom prípade bol referenčným prístrojom Apollo11 LB 913 a overovaným prístrojom MIOS junior. Mikrotitračné platničky boli stanovené na oboch prístrojoch a jednalo sa o párové meranie. Z dôvodov obmedzenej výpočtovej kapacity excelovej aplikácie sme z každej hladiny (level 1, level 2 a level 3) zaradili pre každú vlnovú dĺžku 12 meraní (spolu 36). Slepý pokus sme neoverovali. Základné štatistické parametre spolu s uvedením zistenej regresnej rovnice podľa Passing-Babloka uvádzame v tabuľke 3.

Tabuľka 3 Porovnanie prístrojov s pomocou Passing-Bablokovho modelu

Level	Prístroj	<i>n</i>	\bar{x}	<i>sd</i>	x_m	<i>min.</i>	<i>max.</i>	Lineárny model*
1	Referenčný	36	0,72	0,13	0,70	0,54	0,95	$y = 0,04 + 0,96x$
	Overovaný	36	0,73	0,13	0,70	0,56	0,91	
2	Referenčný	36	0,84	0,14	0,82	0,67	1,03	$y = -0,06 + 1,01x$
	Overovaný	36	0,79	0,14	0,76	0,62	0,99	
3	Referenčný	36	1,43	0,13	1,40	1,23	1,67	$y = -0,65 + 1,22x$
	Overovaný	36	1,07	0,20	1,07	0,26	1,33	

Legenda: *n* – počet pacientov, \bar{x} – aritmetický priemer veku v rokoch, *sd* – smerodajná odchýlka, x_m – medián, *min.* – minimálna hodnota, *max.* – maximálna hodnota, * vo všeobecnej rovine $y = a + bx$;

Ak interval spoľahlivosti priesečníka nezahŕňa číslo 0 alebo ak interval spoľahlivosti smernice nezahŕňa číslo 1, považujeme výsledky získané na testovanom prístroji za rozdielne a nezlučiteľné s výsledkami referenčného prístroja. V tabuľke 4 vidíme, že v prípade level 1 sa interval spoľahlivosti priesečníku pohybuje v rozsahu od 0,00 do 0,08 a teda zahŕňa nulu. Interval spoľahlivosti smernice je od 0,89 do 1,00 čiže zahŕňa číslo 1. Preto môžeme konštatovať, že overovaný prístroj MIOS junior pri úrovni miery adierencie 1 poskytuje zhodné výsledné hodnoty s referenčným prístrojom Apollo11 LB 913. V prípade level 2 pozorujeme, že interval spoľahlivosti priesečníku sa pohybuje v rozsahu od -0,09 do -0,02 a nezahŕňa nulu. Interval spoľahlivosti smernice je od 0,96 do 1,06 a teda nezahŕňa číslo 1. Môžeme preto konštatovať, že overovaný prístroj MIOS junior neposkytuje pri úrovni miery adierencie 2 zhodné výsledné hodnoty s referenčným prístrojom Apollo11 LB 913. V prípade levelu 3 vidíme, že interval spoľahlivosti priesečníku sa pohybuje v rozsahu od -0,97 do -0,37 takže nezahŕňa nulu. Interval spoľahlivosti smernice je od 1,02 do 1,45 a nezahŕňa číslo 1. Podľa toho môžeme konštatovať, že overovaný prístroj MIOS junior neposkytuje pri zvyšujúcej sa úrovni miery adierencie zhodné výsledné hodnoty s referenčným prístrojom Apollo11 LB 913.

Tabuľka 4 Interpretácia rozdielov medzi prístrojmi Passing-Bablokovým modelom

Level	Prístroj	Lineárny model*	a	IS(a)	b	IS(b)
1	Referenčný	$y = 0,04 + 0,96x$	0,04	0,00; 0,08	0,96	0,89; 1,00
	Overovaný					
2	Referenčný	$y = -0,06 + 1,01x$	-0,06	-0,09; -0,02	1,01	0,96; 1,06
	Overovaný					
3	Referenčný	$y = -0,65 + 1,22x$	-0,65	-0,97; -0,37	1,22	1,02; 1,45
	Overovaný					

Legenda: n – počet pacientov, \bar{x} – aritmetický priemer veku v rokoch, sd – smerodajná odchýlka, x_m – medián, $min.$ – minimálna hodnota, $max.$ – maximálna hodnota, * vo všeobecnej rovine $y = a + bx$; a – priesečník, b – smernica, IS – 95%-né intervaly spoľahlivosti priesečníka a smernice

DISKUSIA

Prvým cieľom štúdie bolo modelové spracovanie RM, ktorým bol biologický materiál, konkrétne štandardný kmeň *E. coli* zo zbierky mikroorganizmov, pre potreby optických laboratórnych vyšetrovacích metód a určenie jeho základných parametrov (priemerná hodnota, smerodajná odchýlka, medián, minimum, maximum a variačný koeficient).

V tomto momente sa naša práca zdanlivo dostáva do rozporu s klasickými definíciami RM, ktoré vychádzajú predovšetkým z koncepcie ich klasického chápania (čistota, identita, obsah, stabilita, homogenita, atď...) najmä v oblasti analytickej chémie ale aj biochémie. Musíme však zdôrazniť, že laboratórne vyšetrovacie metódy v zdravotníctve sú často syntézou poznatkov aj postupov viacerých „analytických“ disciplín. Na druhej strane, mikrobiológia používa horeuvedené „analytické“ pojmy iba zriedkavo. Oveľa častejšie využíva pojem „referenčný“ kmeň, ktorý je napríklad „klasickej“ anorganickej chémii úplne cudzí. V našom prípade teda využívame laboratórnu vyšetrovaciu metódu ako príklad syntézy viacerých laboratórnych disciplín, pričom pôvodné „akademicko-šablónovité“ chápanie RM je nutné modifikovať tak, aby zodpovedalo každodennej rutine laboratórnych vyšetrovacích metód v zdravotníctve.

Vzhľadom na nadväznosť zdroja biologického materiálu sme vychádzali z experimentálnych vlastností (tvorba biofilmu). Pre účely našej štúdie boli spracované tri rôzne úrovne miery adierencie (level 1 – 3) patogénu stanovované pri troch vlnových dĺžkach. Primárne vlastnosti nášho RM sme si určili základným štatistickým spracovaním. Takto vytvorený RM sme následne využili pre porovnanie presnosti stanovenia absorpcie na dvoch prístrojoch. Tu chceme zdôrazniť, že cieľom našej štúdie nebolo zaoberať sa samotnou mierou adierencie a tvorby biofilmu daného mikroorganizmu, pretože sme ju pre účely našej štúdie využívali iba ako nástroj, nie cieľ.

Z aspektu využitia optickej metódy merania sme vychádzali z práce [11], v ktorej bolo opakované stanovenie absorpcie $n = 11$ pri všetkých riedeniach vzorky okrem slepého pokusu v prístroji B, kedy sa počet opakovaní $n = 8$. Použitie vlnové dĺžky boli 590 nm v prípade prístroja A a 600 nm pre použitý

prístroj B. Ich variačný koeficient predstavoval $V_k =$ od 0,97 do 126,05 s použitím prístroja A a $V_k =$ od 1,84 do 126,63 pre prístroj B.

V prípade našich výsledkov sme zistili, že pri opakovanom stanovení absorpcie $n = 60$ v prípade najnižšieho riedenia vzorky (level 1) a $n = 12$ v prípade strednej a najvyššej koncentrácie vzorky (level 2 a level 3) pri vlnových dĺžkach 405 nm, 450 nm a 492 nm odchýlky, $V_k =$ od 1 % do 5 % pre referenčný analyzátor a $V_k =$ od 2 % do 24 % pre overovaný analyzátor. V tabuľke 2 vidíme, že v prípade overovaného prístroja MIOS junior došlo pri vlnovej dĺžke 405 nm v prípade najvyššieho riedenia vzorky k výrazne odchýlnej hodnote $V_k = 24$ %.

Pre spracovanie dát RM sme využili vlnové dĺžky 405 nm, 450 nm a 492 nm merania a Christensenovu metódu. Vychádzali sme z práce [9], v ktorej bola táto metóda využitá. Hoci je pôvodne uvedená vlnová dĺžka 590 nm, v literatúre sa uvádza rozpätie vlnových dĺžok od 570 nm do 620 nm, v ktorom je stanovovanie možné. Keďže nám nešlo o využitie Christensenovej metódy ale o definovanie „modelového“ RM, (pri využití všetkých kultivačných médií a chemikálií p.a. čistoty a vody s definovanou vodivosťou) preto sme si v rámci „vývoja“ dovolili využiť meranie absorpcie pri oveľa nižších vlnových dĺžkach. Zistili sme, že vo všetkých troch prípadoch to referenčný aj overovaný prístroj bol schopný detegovať. Level dva a tri dosahujú najvyššiu koncentráciu, stačí 12 dát a napriek tomu je variačný koeficient (V_k) pomerne nízky. Naopak, v prípade levelu 1 máme síce 60 dát, avšak variačný koeficient (V_k) je vyšší, a to priemerne 5 %. Aj samotný slepý pokus je ukazovateľom tejto chyby.

Ďalším cieľom bolo overenie miery zhody výsledkov referenčného a overovaného prístroja prostredníctvom párového merania vytvoreného RM. Porovnanie parametrov RM sa teda uskutočnilo na dvoch rôznych prístrojoch, ktoré využívajú identické optické metódy stanovenia. Overovaný prístroj (MIOS junior) je starší a tomu zodpovedajú aj menej správne namerané údaje.

Pre účely štatistického overenia zhody výsledkov na overovanom prístroji sme využili Passing-Bablokov regresný model, ktorý využíva štatistické parametre [12]: počet pacientov (n), aritmetický priemer (\bar{x}) veku v rokoch, smerodajnú odchýlku (sd), medián (x_m), minimálnu a maximálnu hodnotu ako aj lineárny model vo všeobecnej rovine $y = a + bx$ a na overenie zhody stanovenia: priesečník (a), smernicu (b) a 95% intervaly spoľahlivosti priesečníka a smernice (IS). Vo výsledkovej časti štúdie uvádzame v tabuľke 3 nami získané základné štatistické parametre porovnania prístrojov.

Metodologicky sme vychádzali z práce [10], v ktorej sa stanovovali parametre Cys C, CRP (C-reaktívny proteín) a INR (z anglického International Normalised Ratio, medzinárodný normalizovaný pomer) pomocou POCT (z anglického Point of Care Testing) analyzátor a laboratórneho analyzátor a následne sa overila miera zhody výsledkov, rovnako ako v našej práci, neparametrickou metódu regresie podľa Passing-Babloka. Hoci rozdiel našich prác spočíva v rozdielnych prístrojoch aj v meraných vzorkách, môžeme potvrdiť efektivitu uvedenej štatistickej metódy.

Istým obmedzením bolo využitie bezplatného výpočtového modulu pre MS-Excel, ktorého početnosť bola obmedzená na 50 jednotiek. To je aj vysvetlením rovnakého počtu štatistických jednotiek ($n = 36$) pre všetky tri vlnové dĺžky spolu. Pre level 1 sme zredukovali počet na základný dvanásť-jamkový riadok mikrotitračnej platničky s vynechaním ostatných meraní a meraní slepého pokusu.

ZÁVER

Používanie RM je kľúčové pre zabezpečenie spoľahlivosti výsledkov testov laboratórnych vyšetrovacích metód, čím sa zvyšuje kvalita poskytovaných zdravotníckych služieb. Slúžia ako referenčné body napríklad na porovnávanie a kalibráciu testovaných metód a prístrojov. Pochádzajú od certifikovaných výrobcov a sú charakterizované presne známou zložkou alebo koncentráciou určitej látky a pomáhajú zabezpečiť, že merania sú v súlade s normami a predpismi.

Z výsledkov našej práce môžeme konštatovať, že nami overovaný prístroj MIOS junior poskytol so zvyšujúcou sa koncentráciou spracovávaného biologického materiálu určeného pre referenčné účely, menej správne namerané údaje. Dôvodom tejto skutočnosti je pravdepodobne jeho skorší rok výroby oproti referenčnému prístroju Apollo11 LB 913.

Naša práca potvrdzuje dôležitosť využívania RM v laboratórnych vyšetrovacích metódach v zdravotníctve a to najmä v oblasti rutínnej laboratórnej diagnostiky.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

- [1] MELUŠ V., KAŠLÍKOVÁ K., KRAJČOVIČOVÁ Z. *Riadenie kvality laboratórnych vyšetrovacích metód v zdravotníctve*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita Brno a Trenčianska univerzita Alexandra Dubčeka v Trenčíne, 2019. 91 s. ISBN 978-80-210-9335-5.
- [2] LABUDA J., TARAPČÍK P., GARAJ J., HUTTA M. Terminológia v oblasti analytických chemických meraní. [online] 30.11.2011 [cit. 19.12.2022] Dostupné na: https://www.fchpt.stuba.sk/buxus/docs/oddelenie_analytickej_chemie/ternologia.pdf
- [3] ČAJDOVÁ J. 2020. *Objektívizácia faktorov životného a pracovného prostredia I. pre študijný odbor Verejné zdravotníctvo*. 1. vyd. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, 2020. 100 s. ISBN: 978-80-8187-096-5.
- [4] LABORATORY QUALITY MANAGEMENT SERVICES P/L. Use of reference materials in the laboratory. [online] 24.07.2002 [cit. 19.12.2022] Dostupné na: <http://www.lqms.com.au/files/resources/Use%20of%20Reference%20Material%20in%20the%20Laboratory.pdf>
- [5] EUROPEAN ACCREDITATION. The Selection and Use of Reference Materials. 15 s. [online] 16.6 2015 [cit. 16.12. 2022] Dostupné na: <https://european-accreditation.org/wp-content/uploads/2018/10/ea-4-14-inf-rev00-february-2003-rev.pdf>
- [6] MERCK. How to Choose the Correct Reference Material Quality Grade, Darmstadt, Germany. [s.a.] [16.12. 2022] Dostupné na: <https://www.sigmaaldrich.com/SK/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/calibration-qualification-and-validation/how-to-choose-the-correct-reference-material-quality-grade>
- [7] GIOVANNI E. European Reference Materials. Ako vybrať certifikované (referenčné) materiály. Application Note 9. 3 s. [online] 8.5. 2020 [cit. 02.11.2023] Dostupné na: https://crm.jrc.ec.europa.eu/graphics/cms_docs/erm9_slovakian.pdf
- [8] Masarykova univerzita Brno. Prírodovedecká fakulta. Česká sbírka mikroorganismů. *Escherichia coli* (Migula 1895) Castellani and Chalmers 1919^{AL}. CCM 3954. [s.a.] [cit. 27.2. 2023] Dostupné na: <https://www.sci.muni.cz/ccm/bakterie/htmlb/3954>
- [9] KAŠLÍKOVÁ K., MELUŠ V., KRAJČOVIČOVÁ Z., GRABCZAK P. Sledovanie tvorby biofilmu u bakteriálnych kmeňov izolovaných z prostredia nemocníc. *Zdravotnícke listy*. 2022; 10 (2): 93-99. ISSN 2644-4909.
- [10] NETRIOVÁ J., KRAJČOVIČOVÁ Z., MELUŠ V., ČERNICKÝ M. Testovanie zhody výsledkov laboratórneho stanovenia C-reaktívneho proteínu, cystatínu C a INR s výsledkami získanými na analyzátoch v mieste starostlivosti o pacienta. *Chem. Listy*. 2016; 110 (3): 190-193.
- [11] KAŠLÍKOVÁ K., KRAJČOVIČOVÁ Z., ČERNICKÝ M. et al. Possibilities of a quick orientative verification of the accuracy of the absorbance measurement results on routine diagnostic instruments. *University Review*. 2019; 13 (2): 1-3. [cit. 27.2. 2023] Dostupné na: https://ur.tnuni.sk/fileadmin/dokumenty/UR_V13_ISS-2_01to03_Kaslikova_et_al.pdf
- [12] KELLER T. ACOMED štatistika. Štatistické nástroje ACOMED pre analýzu validácie metód a kriviek ROC [s.a.] [cit. 8.3. 2023] Dostupné na: <https://www.acomed-statistik-tools.de/>