

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zdravotně sociální fakulta

## **Verifikace analytické metody stanovení glukosy**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: MUDr. Miroslav Klouda

Autor: Kateřina Illeová

Datum odevzdání: 6.5.2010

## **Abstract**

### **Verification of glucose assessment analytical method**

The topic of laboratory accreditation as well as validation and verification of analytical methods has been very current in recent years. Because of the serious impact of analytical results of the measurement on practice, it is required that the results of the analytical measurements were as accurate as possible. This paper deals with the verification of the analytical method determination of glucose, as proof of achieving optimum measurement uncertainties. The verification of spectrophotometric glucose determination was performed using the Cobas Integra 800 analyzer by enzymatic hexokinase method. For the measurement in time the control materials of internal quality control were used and for the measurement in series the control materials of external quality control were used. From the measured values we specified the necessary statistical data (the arithmetic mean, standard deviation, the coefficient of variation, bias, yield) and using these we specified the values of combined and extended uncertainty. The combined uncertainties of both samples shouldn't be higher than 10 %, according to the SEKK association. The combined uncertainty of our first sample was 6.81 % and the second one had 6.45 %. The extended uncertainty of the first sample was 13.62 % and the second one had 12.90 %. From these data, we can conclude that the verification of analytical methods for the determination of glucose succeeded.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Verifikace analytické metody stanovení glukosy vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích .....

.....  
podpis studenta

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat především svému vedoucímu práce MUDr. Miroslavu Kloudovi za čas, trpělivost a odborné rady, které mi věnoval při sestavování této práce. Dále bych chtěla poděkovat kolektivu biochemicko-hematologické laboratoře Laboma s.r.o za pomoc při analýze vzorků a zpracování výsledků, především paní Ing. Haně Zahradníkové a panu Ing. Jiřímu Kronikovi.

## Obsah

<b>ÚVOD</b> .....	7
<b>1. SOUČASNÝ STAV</b> .....	8
<i>1.1. Akreditace</i> .....	8
<i>1.2. Validace</i> .....	8
<i>1.3. Verifikace</i> .....	9
<i>1.3.1. Nejistota výsledku měření</i> .....	10
<i>1.3.2. Přesnost</i> .....	10
<i>1.3.3. Výtěžnost</i> .....	11
<i>1.3.4. Kombinovaná nejistota</i> .....	11
<i>1.4. Glukosa</i> .....	12
<i>1.4.1. Význam stanovení glukosy</i> .....	12
<i>1.4.2. Metody stanovení glukosy</i> .....	13
<i>1.5. Diabetes mellitus</i> .....	14
<b>2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY</b> .....	16
<i>2.1. Cíle práce</i> .....	16
<i>2.2. Hypotézy</i> .....	16
<b>3. MATERIÁL A METODY</b> .....	17
<i>3.1. Materiál</i> .....	17
<i>3.1.1. Analyty krevního séra</i> .....	17
<i>3.1.2. Precinorm U a Precipath U</i> .....	17
<i>3.2. Metody</i> .....	18
<i>3.2.1. Spektrofotometrie</i> .....	18
<i>3.2.2. Cobas Integra 800</i> .....	18
<i>3.2.3. Hexokinasová metoda</i> .....	21
<i>3.2.4. Pracovní postup</i> .....	22

<b>3.3. Statistické zpracování naměřených hodnot .....</b>	<b>22</b>
3.3.1. Zpracování dat .....	22
3.3.2. Aritmetický průměr a směrodatná odchylka .....	22
3.3.3. Variační koeficient .....	23
3.3.4. Bias a výtěžnost .....	23
3.3.5. Kombinovaná nejistota .....	24
3.3.6. Rozšířená nejistota .....	24
<b>4. VÝSLEDKY .....</b>	<b>25</b>
4.1. Měření v čase - vzorek o koncentraci v referenčním limitu .....	26
4.2. Měření v čase - vzorek o koncentraci nad horní hranicí referenčního limitu .....	27
4.3. Měření v sérii - vzorek o koncentraci v referenčním limitu .....	30
4.4. Měření v sérii - vzorek o koncentraci nad horní hranicí referenčního limitu .....	32
<b>5. DISKUSE .....</b>	<b>36</b>
<b>6. ZÁVĚR .....</b>	<b>41</b>
<b>7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>42</b>
<b>8. KLÍČOVÁ SLOVA .....</b>	<b>46</b>

## Úvod

Téma akreditace laboratoří a s ním související validace a verifikace analytických metod je v posledních letech velmi aktuální. Automatizace analytických postupů, ke které došlo v posledních desetiletích, je bezpochyby výrazným pokrokem v laboratorní medicíně, jelikož zajišťuje rychlejší, levnější, efektivnější a bezpečnější analýzy biologických materiálů s kvalitnějšími výsledky. Toto ale na druhou stranu také vyžaduje mnohem propracovanější systém pro analytickou kontrolu správnosti výsledků měření. Je požadováno, aby výsledky analytických měření byly co nejpřesnější, zvláště proto, že tyto výsledky jsou nedílnou součástí poskytované zdravotní péče a měli by být efektivním nástrojem diagnostiky, terapie a prevence. Tato práce se zabývá problematikou verifikace analytických metod jakožto důležitou součástí systému kontroly kvality v procesu akreditace laboratoří.

## **1. Současný stav**

### ***1.1. Akreditace***

Akreditace představuje mechanismus, který by měl pomoci snižovat variabilitu mezi jednotlivými zdravotnickými zařízeními. Akreditace je úřední uznání způsobilosti laboratoře vykonávat určitou činnost a zahrnuje mimo jiné posouzení shody zavedeného systému managementu kvality laboratoře se všemi kritérii mezinárodní normy řízení kvality ISO 15189, resp. ISO 17025 (Uras 2009, Guzel and Guner 2009). Těmito normami řízení kvality je vyžadována validace metod v klinických laboratořích. O akreditaci si musí laboratoř zažádat u akreditačního orgánu, v České republice je to Český institut pro akreditaci (ČIA). Akreditační proces trvá několik měsíců až let, vytváří se při něm potřebná dokumentace a zavádí se ucelený systém řízení kvality. Akreditační orgán sleduje a posuzuje stav laboratoře prostřednictvím auditů nejen v průběhu přípravy na akreditaci, ale i po jejím získání, při tzv. reakreditacích (Racek et al. 2006).

### ***1.2. Validace***

Validace je proces, při kterém se získávají objektivní důkazy, že metoda, postup či přístroj vykazují vlastnosti, které jsou k danému použití požadovány. Je nezbytným krokem k ukončení vývoje ve všech analytických laboratořích a od roku 2003 je povinná pro všechny laboratorní metody. Hlavním cílem validace je hodnocení analytických a výkonnostních znaků metod, a získání průkazu, že bylo dosaženo požadované úrovně těchto znaků, tedy že výsledky měření jsou efektivním nástrojem diagnostiky, terapie a prevence (Panteghini 2009, Walton 2001). Další informace jsou uvedeny na webové adrese [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org).

Validace provádí výrobci diagnostik, profesionální organizace analytiků i samotné laboratoře (Friedecký et al. 2004). Výrobci diagnostik musí uvádět na trh EU pouze validované měřicí systémy, přičemž postup a rozsah validace je dán normou EN 13612: 2002. Výrobci uvádějící své produkty na trh v USA se musí řídit dokumentem



Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, dostupném na webové adrese <http://www.fda.gov>.

Výrobci diagnostik IVD MD (In vitro diagnostic - medical device) a profesionální organizace analytiků provádí validace ještě před uvedením výrobku na trh. Validace se také provádí při zavádění nové metody do laboratoře, při rozšiřování použití stávající metody o nový účel, při převzetí metody z jiné laboratoře atd. Produktem úspěšné validace je referenční rozmezí, specifická a senzitivita metody a další důležité analytické znaky (Friedecký et al. 2004, Nichols 2009).

### ***1.3. Verifikace***

Verifikace znamená potvrzení získané prostřednictvím zkoumání a poskytnutím objektivních důkazů, že data o analytických znacích poskytnutá výrobcem jsou v dané laboratoři s použitím konkrétního měřicího systému dosažena (Friedecký et al. 2004, Friedecký and Kratochvíla 2007). Validované výrobky IVD MD musí být před uvedením do provozu znovu verifikovány, právě za účelem ověření platnosti validačních údajů výrobce v konkrétní laboratoři (Brdička et al. 2007). Analytické znaky, které jsou předmětem verifikace (ale i validace), tvoří osnovu verifikačního (validačního) plánu. Verifikace se v laboratoři provádí vždy při zavedení nové metody, nového analytického měřicího systému, nového diagnostického kitu, při rozšíření použití stávající metody, např. na další druh biologického materiálu, dále při převzetí metody z jiné laboratoře a při dlouhodobých problémech s kontrolou kvality. Mimo to se vždy po jednom roce provádí reverifikace (Friedecký et al. 2004). Trendem moderního analytického měření je používat validované kity a měřicí systémy a přenést hlavní pozornost laboratoří na odhady nejistot měření, kontrolu kvality, edukaci, soustavné sledování informací, implementaci nových poznatků do praxe laboratorní činnosti (Kallner 2001).

Výstupem verifikace by měla být co nejpřesněji odhadnutá nejistota měření. Je to důležité zvláště kvůli dopadu analytických výsledků měření na praxi, kdy výsledky mohou ovlivnit zdraví, kvalitu života, případně i život pacienta. Protože laboratorní testy tvoří jednu třetinu až tři čtvrtiny informací, které ovlivňují rozhodnutí lékaře

o diagnóze, vyžaduje se, aby výsledky analytických měření byly co nejpřesnější (Westgard and Darcy 2004, Panteghini and Forest 2005, González and Herrador 2007).

#### *1.3.1. Nejistota výsledku měření*

Výsledek měření analytu či parametru danou metodou je v laboratorní medicíně, stejně jako výsledek každého měřicího procesu, jen odhadem skutečné koncentrace. Tento výsledek měření tedy nemůže představovat vlastní exaktní hodnotu bez znalosti přidruženého údaje, kterým je nejistota výsledku. Nejistota výsledku měření představuje interval, ve kterém se nachází s deklarovanou mírou pravděpodobnosti skutečný výsledek měření. Bez znalosti nejistoty není možné odhadnout spolehlivost výsledku při jeho použití v klinické praxi. Z hlediska validace metody lze nejistotu ztotožnit s intervalem, který charakterizuje, zda byly splněny požadavky plynoucí z daného účelu měření (Suchánek et al. 2006, Brdička et al. 2007).

#### *1.3.2. Přesnost*

Verifikační plán obsahuje minimálně 2 analytické znaky - přesnost a výtěžnost. Přesnost metody je definována jako míra shody mezi navzájem nezávislými výsledky měření získanými opakovanou analýzou téhož vzorku za předem stanovených podmínek. Odhad se provádí měřením rozptýlenosti výsledků vhodného počtu stanovení (Ambrožová 2005). Je nutné dbát na to, aby byl počet opakování dostatečně velký, obvykle 20 a více analýz. Přesnost se vyjadřuje jako opakovatelnost a reprodukovatelnost a kvantifikuje náhodnou chybu měření. Opakovatelnost se také označuje jako přesnost v sérii, protože se analýzy provádí najednou v krátkém časovém období, na stejném zařízení a jednou obsluhou. Pro reprodukovatelnost se užívá označení přesnost v čase. Stanovení se provádí postupně, 1x denně, na stejném zařízení, případně i jinými pracovníky a nejméně 20 dní po sobě. Je nutné zajistit stabilitu analytu v kontrolním vzorku po celou dobu měření. Výsledky je třeba statisticky zhodnotit a určit aritmetický průměr, směrodatné odchylky výběru a variační koeficienty, případně další veličiny (Brdička et al. 2007, Friedecký et al. 2004, Ambrožová 2005). Další informace jsou uvedeny na webové adrese [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org).

### *1.3.3. Výtěžnost*

Výtěžnost je definována jako poměr výsledku měření k přijaté referenční hodnotě a vyjadřuje kvantifikaci hodnoty bias (vychýlení metody). Cílem určení bias je odhadnout systematické chyby měření pomocí analýzy referenčního nebo vhodného kontrolního materiálu. K tomu je třeba minimalizovat náhodnou chybu měření použitím dostatečného počtu opakovaných měření. Nejlepšími vzorky pro stanovení bias měření jsou matricové certifikované referenční materiály, ve kterých jsou hodnoty analytů získané referenčními postupy měření. Tyto vzorky jsou však pro rutinní laboratoř nedostupné, proto se v praxi používají kontrolní materiály použité předtím v programech externího hodnocení kvality. Tyto materiály se měří za podmínek opakovatelnosti. Hodnota bias získaná za podmínek opakovatelnosti je vhodná pro vyhodnocení nejistoty měření. Kromě přesnosti a výtěžnosti může laboratoř v případě potřeby verifikovat další analytické znaky, jako jsou linearita, pracovní rozsah měření, mez detekce, mez stanovitelnosti atd. (Brdička et al. 2007, Friedecký et al. 2004). Další informace jsou uvedeny na webové adrese [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org).

### *1.3.4. Kombinovaná nejistota*

Kombinovaná nejistota se skládá z náhodných a systematických složek nejistoty výsledku měření. Náhodné složky (nejistota typu A) se zjišťují přímým měřením v laboratorním experimentu a vyhodnocují se s použitím statistických metod. Zahrnují hodnoty variačního koeficientu získaného za podmínek reprodukovatelnosti, standardní nejistotu (směrodatnou odchylku průměru) a hodnoty bias. Systematické složky (nejistota typu B) jsou získávány z externích zdrojů (obvykle z pracovní dokumentace výrobce, certifikátů referenčních materiálů či odborné literatury) a nejdůležitější z nich je nejistota referenčního materiálu. Dílčí hodnoty nejistoty se musí vyjádřit stejným způsobem, nejlépe jako směrodatné odchylky nebo relativní směrodatné odchylky, a poté se převedou do formy kombinované nejistoty metodou kovariance (Suchánek et al. 2006, Ambrožová 2005).

#### ***1.4. Glukosa***

Glukosa je monosacharid ze skupiny aldohexos, přirozeně se vyskytuje jako D-izomer a je hlavním sacharidem přítomným v periferní krvi. Oxidace glukosy je hlavním zdrojem energie pro buňky lidského těla, kromě toho se glukosa také podílí na intermediálním metabolismu. Glukosa, pocházející z potravy, je v játrech před uložením přeměněna na glykogen nebo na mastné kyseliny a skladována v tukové tkáni. Koncentrace glukosy v krvi je udržována v poměrně úzkých mezích a to prostřednictvím mnoha hormonů, z nichž nejdůležitější jsou produkovány pankreatem. Nejčastější příčinou hyperglykémie je diabetes mellitus, vznikající z nedostatečné sekrece nebo účinků insulinu. Ke zvýšené hladině glukosy v krvi přispívá i řada dalších faktorů, např. pankreatitis, dysfunkce štítné žlázy, renální poškození a jaterní choroby. Hypoglykémie je pozorována méně často a její příčinou může být např. insulinom, hypopituitarismus nebo hypoglykémie indukovaná insulinem.

Stanovení glukosy v krevní plasmě se používá v diagnostice a sledování poruch uhlovodíkového metabolismu, tedy především diabetes mellitus a idiopatické hypoglykémie. Vyšetření glukosy v moči je používáno k vyhledávání diabetes mellitus a také jako měřítko k posouzení glykosurie, dále k odhalení renálních tubulárních poruch a při léčbě diabetes mellitus. Vyšetření glukosy v CSF je používáno při hodnocení meningitidy, komplikací u mozkových tumorů a jiných neurologických poruch. Další informace jsou uvedeny na webové adrese [www.roche-diagnostics.cz](http://www.roche-diagnostics.cz).

##### ***1.4.1. Význam stanovení glukosy***

Důvodem pro zvolení právě metody stanovení glukosy je její využívání při diagnostice a sledování výše zmíněných poruch sacharidového metabolismu. Klinické laboratoře mají velkou roli jak v diagnostice diabetu, tak v celoživotním sledování účinnosti léčby diabetických pacientů a vyhledávání pacientů se zvýšeným rizikem rozvoje diabetu (Racek et al. 2006).

#### 1.4.2. Metody stanovení glukosy

Metody stanovení glukosy rozdělujeme na redukční, kondenzační, enzymatické a elektrochemické (Černý et al. 1998, Dastych et al. 2008).

Redukční metody patří mezi původní metody stanovení glukosy a zakládají se na redukčních vlastnostech látek, které vznikají z monosacharidů varem v silně alkalickém prostředí. Tyto látky reagují s ionty  $\text{Cu}^{2+}$  nebo  $\text{Fe}^{2+}$  nebo s kyselinou pikrovou a nejsou specifické, protože stejně jako glukosa reaguje např. i fruktosa, kyselina askorbová nebo kyselina močová. Mezi redukční metody patří např. Hagedorn-Jensenova metoda, nejstarší a nejdéle používaná metoda stanovení glukosy. Používá  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  a množství zredukovaného  $\text{Fe}^{2+}$  se stanovuje jodometricky nepřímou titrací. Tyto metody se však v běžné praxi již nepoužívají.

Metody kondenzační jsou mnohem specifičtější. V několikastupňové reakci se nejprve z glukosy v horkém prostředí koncentrovaných kyselin tvoří hydroxymethylfural, který se poté kondenzuje s vhodným fenolem nebo primárním aromatickým aminem na barevnou látku podobnou trifenylmethanu. Intenzita této látky je přímo úměrná koncentraci původní glukosy a měří se spektrofotometricky.

Nejspecifičtějšími metodami jsou metody enzymatické. Patří mezi ně metody s glukosaoxidasou, s glukosodehydrogenasou a s hexokinasou. U glukosaoxidasové reakce se glukosa přítomná ve vzorku oxiduje glukosaoxidasou na glukonolakton a peroxid vodíku. Peroxid vodíku se poté stanoví např. Trinderovou reakcí s fenolem a 4-aminoantipyrinem v přítomnosti peroxidasy za vzniku chinonmonoiminového barviva. Glukosodehydrogenasová metoda je založena na oxidaci glukosy v přítomnosti  $\text{NAD}^+$  pomocí glukosodehydrogenasy na glukonolakton a redukcí  $\text{NAD}^+$  na  $\text{NADH}$ . Tato metoda ale není příliš využívána. Další enzymatickou metodou je hexokinasová metoda, která byla použita ke stanovení glukosy v rámci této práce. Podrobně je popsána v kapitole 3. Materiál a metody (v podkapitole 3.2.3. Hexokinasová metoda).

Posledním typem metod stanovení glukosy jsou elektrochemické metody. Patří sem například biosenzory s membránou se zakotvenou glukosaoxidasou, u kterých dochází k oxidaci glukosy na peroxid vodíku na platinové elektrodě elektrometrického článku a proud elektrody je přímo úměrný koncentraci glukosy ve vzorku. Kromě toho

existují glukometry, což jsou přenosné přístroje využívající elektrochemické metody s detekcí specifickými enzymovými metodami.

### ***1.5. Diabetes mellitus***

Termín diabetes mellitus popisuje skupinu závažných metabolických onemocnění z různých příčin, charakterizovaných chronickou hyperglykemií s poruchami metabolismu sacharidů, tuků a bílkovin (WHO 1999). Tyto poruchy vyplývají ze snížené sekrece a/nebo účinnosti insulinu. Prevalence tohoto onemocnění se ve středoevropské populaci pohybuje v rozmezí 6 - 7,5 % a předpokládá se, že v období od roku 1995 do roku 2025 vzroste celosvětová prevalence až o 35 % (Reinauer et al. 2002). V současné době není diagnostikováno až 50 % lidí s diabetem.

Běžným a zároveň nejlepším indikátorem pro screening diabetu je stanovení koncentrace glukosy nalačno (stanovení glykémie, FPG - fasting plasma glucose). Nejobvyklejším biologickým materiálem pro stanovení glykémie je plazma venózní krve, kterou je třeba odebrat do odběrové nádoby s protisrážlivým činidlem (EDTA) a stabilizátorem (NaF), který brání enzymatickému rozkladu glukosy v krvi (Friedecký 2006).

Referenční hodnoty pro koncentraci glukosy nalačno jsou 4,1 - 5,5 mmol/l. Ve snaze o jednotu a přehlednost postupu při laboratorní diagnostice diabetu u dospělých byl vypracován algoritmus laboratorní diagnostiky diabetu u dospělých (Fig.1), vycházející z doporučení WHO a schválený výborem České společnosti klinické biochemie a výborem České diabetologické společnosti. Podle společného doporučení těchto společností je diagnóza diabetu stanovena, jestliže koncentrace glukosy v plazmě nalačno je větší nebo rovna 7,0 mmol/l, náhodně stanovená glykémie v plazmě přesáhne 11,0 mmol/l (při současné přítomnosti klinických symptomů) nebo koncentrace glukosy v plazmě 2 hodiny po provedení perorálního glukosového tolerančního testu přesáhne 11,0 mmol/l. K učinění závěru o diagnóze je nezbytné výsledek potvrdit měřením z dalšího odběru za několik dní. Hodnota glykémie v séru či plazmě, která naopak vylučuje diabetes mellitus, je nižší než 5,6 mmol/l nalačno nebo nižší než 7,8 mmol/l dvě hodiny po jídle. Plazmatická glykémie v rozmezí 5,6 - 6,9 mmol/l se nazývá

hraniční glukosa nalačno (dříve se užíval pojem porušená glukosová tolerance) a charakterizuje osoby se zvýšeným rizikem diabetu (Friedecký 2006, Franeková 2005, American Diabetes Association 2005).

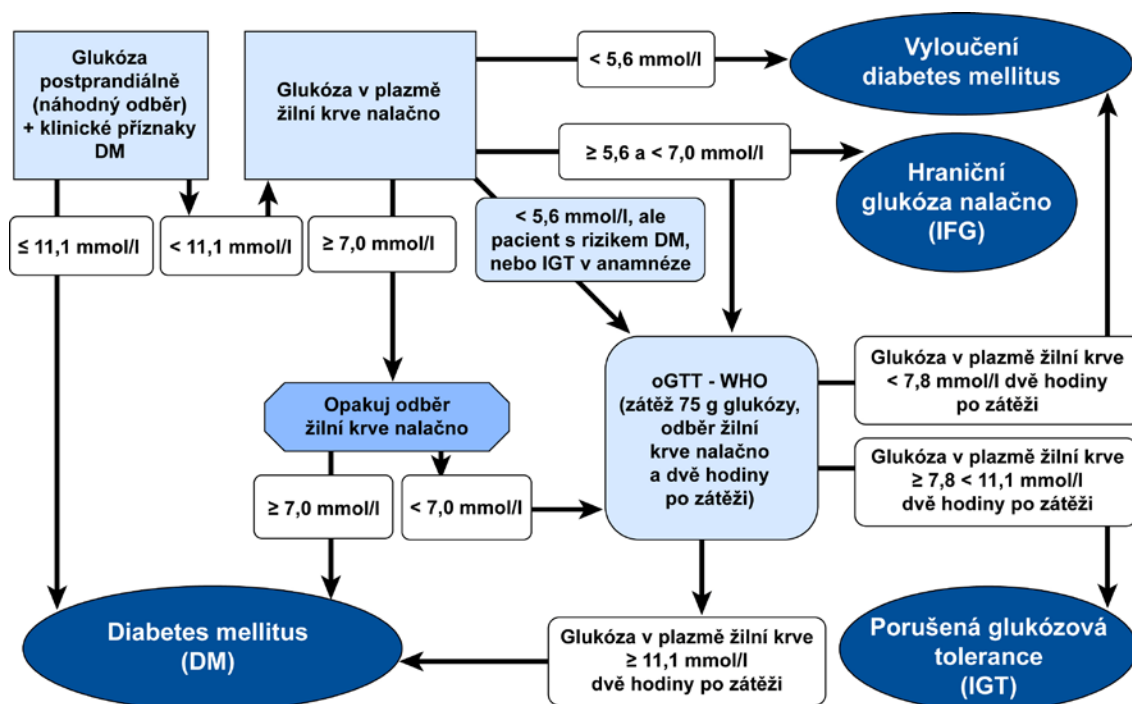


Fig.1 Algoritmus laboratorní diagnostiky DM u dospělých podle ČDS a ČSKB, popisující diagnostický postup z levého horního rohu (Franeková 2005).

## **2. Cíle práce a hypotézy**

### **2.1. Cíle práce**

Cílem práce je vysvětlení pojmů validace a verifikace analytických metod a jejich významu pro praxi klinické laboratoře, samotné provedení verifikace analytické metody stanovení glukosy a následné zpracování a zhodnocení výsledků včetně statistických výpočtů následované porovnáním výsledků s validačními údaji výrobce a další dostupnou literaturou.

### **2.2. Hypotézy**

Předpokládá se, že výsledky provedené verifikace budou přibližně shodné s validačními údaji, které udává výrobce, i s další dostupnou literaturou. Druhým předpokladem je, že verifikace analytické metody stanovení glukosy proběhne úspěšně.



### **3. Materiál a metody**

#### **3.1. Materiál**

K verifikačnímu měření byli použiti 2 typy materiálu. Pro měření v sérii jsme použili validovaný kontrolní materiál Analyty krevního séra (AKS) 2333 a 2337 používaný v rámci externí kontroly kvality. Pro měření v čase jsme použili kontrolní materiál Precinorm U (PNU) a Precipath U (PPU) ze sady COBAS INTEGRA Glucose HK Gen.3 dodávané firmou Roche Diagnostics, který se používá pro interní kontrolu kvality.

##### *3.1.1. Analyty krevního séra*

AKS je kontrolní materiál, který byl validován na základě Certifikátu referenčních měření materiálu, vydaného Referenčním institutem pro bioanalytiku DGKL v Bonnu, a Vyhodnocení použití kontrolního materiálu v kontrolním cyklu AKS3/09 v rámci externí kontroly kvality. Typem kontrolního materiálu je lyofilizované lidské sérum, které obsahuje validované hodnoty 32 analytů, včetně glukosy. Kontrolní materiál AKS 2333 obsahuje 4,31 mmol/l glukosy s rozšířenou nejistotou 0,043 mmol/l, která odpovídá 1%. Kontrolní materiál AKS 2337 obsahuje 11,01 mmol/l glukosy s rozšířenou nejistotou 0,11 mmol/l, což odpovídá 1%.

Kontrolní materiál se skladuje v lednici při teplotě +2°C až +8°C. Před použitím je třeba lahvičku s lyofilizátem vytemperovat na teplotu laboratoře a rozpustit. Princip rozpouštění spočívá v přidání 5 ml redestilované nebo deionizované vody stejné teploty, poté se lahvička uzavře a nechá 30 minut rozpouštět mimo přímé osvětlení za občasného promíchání pomalým kroužením. Takto rozpuštěný kontrolní materiál se uchovává za laboratorní teploty a použije týž den. (Friedecký et al. 2009)

##### *3.1.2. Precinorm U a Precipath U*

Precinorm U (PNU) a Precipath U (PPU) se používají ke kontrole kvality pro in vitro test pro kvantitativní stanovení glukosy na systémech Cobas Integra. Jedná se opět o lyofilizované lidské sérum, které je třeba před použitím rozpustit stejným způsobem

jako AKS. Precinorm U obsahuje množství glukosy, které se nachází v referenčním rozmezí, v našem případě to je hodnota 5,09 mmol/l. V materiálu Precipath U se koncentrace glukosy pohybuje v patologickém rozmezí, tedy nad horní hranicí referenčního rozmezí, zde konkrétně jde o hodnotu 13,40 mmol/l. Kromě glukosy tyto kontrolní materiály obsahují dalších 26 analytů, mají nižší návaznost než Analyty krevního séra a nemají stanovenou nejistotu. Další informace jsou uvedeny na webové adrese [www.roche-diagnostics.cz](http://www.roche-diagnostics.cz).

## **3.2. Metody**

### *3.2.1. Spektrofotometrie*

Absorpční spektrofotometrie je jeden z nejčastěji využívaných oborů analytické chemie. Jedná se o optickou metodu kvantitativního stanovení látek absorbujících elektromagnetické záření ve viditelné, ultrafialové nebo infračervené oblasti. Spektrofotometry odečítají hodnotu absorbance, která je přímo úměrná koncentraci stanovované látky, při dvou vlnových délkách (Štern et al. 2004, Černý et al. 1998).

### *3.2.2. Cobas Integra 800*

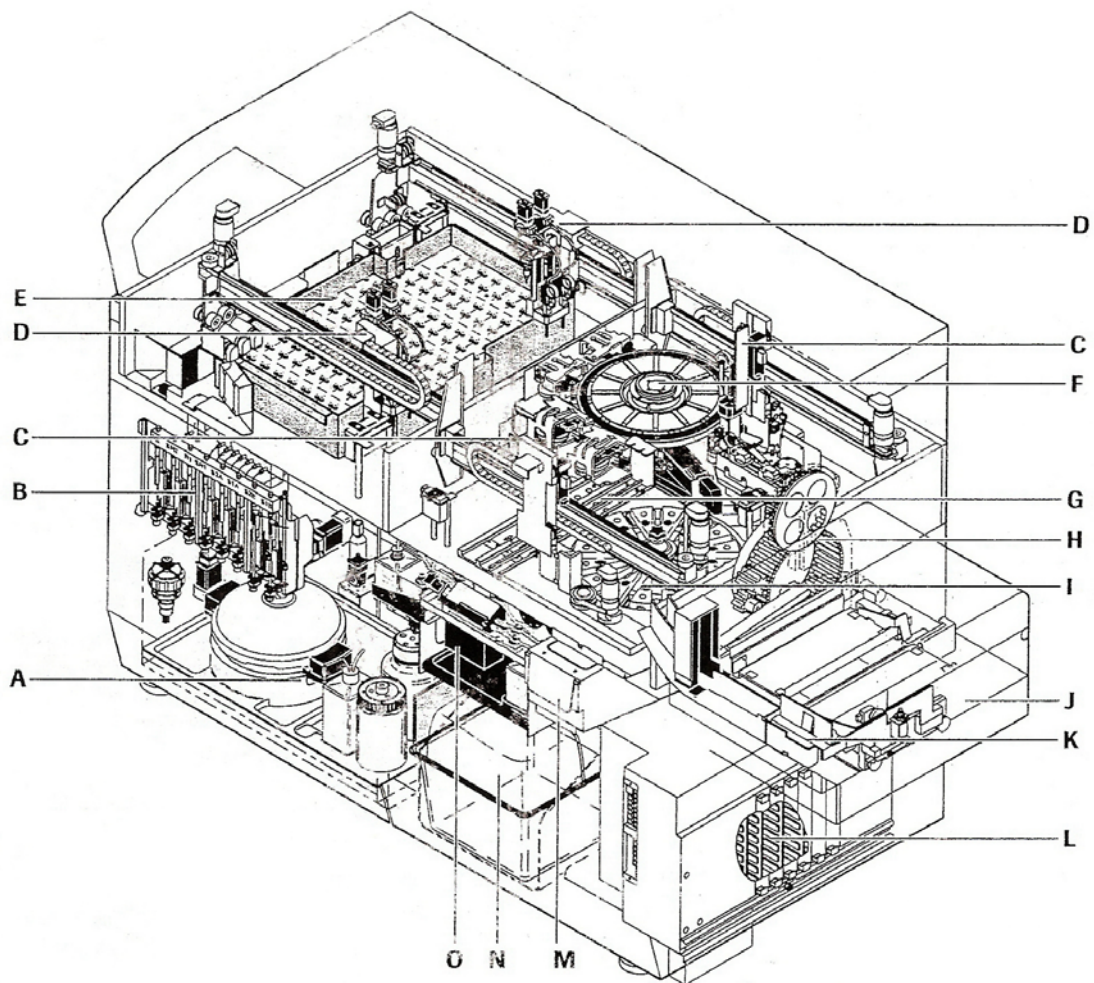
Samotné měření vzorku bylo provedeno na biochemickém analyzátoru Cobas Integra 800 od společnosti Roche Diagnostic Systems (Fig.2). Jedná se o přístroj s uzavřeným systémem, který provádí všechny požadavky na testy automaticky a je opatřen měřicími moduly pro absorbanční fotometrii, fluorescenční polarizaci, turbidimetrii a potenciometrické měření ion-selektivními elektrodami (ISE). Přístroj využívá 72 různých metod na palubě s více než 150 aplikacemi. Analyzátor se skládá z vlastního přístroje a datové stanice složené z PC, LCD monitoru, klávesnice, myši, tiskárny a software. Součásti vlastního přístroje jsou schematicky znázorněny na Fig.3. Další informace jsou uvedeny na webové adrese [www.roche-diagnostics.cz](http://www.roche-diagnostics.cz).

Posloupnost analýzy v přístroji při stanovení glukosy je následující. Před zahájením analýzy je založena nová kyveta a stanovena její absorbance v rámci měřící

otáčky rotoru. Do ní je napipetováno 28  $\mu\text{l}$  reagensie 1, mezím probíhá další měřicí otáčka a poté je kyveta protřepána. Následuje přidání 12  $\mu\text{l}$  diluentu, kterým je  $\text{H}_2\text{O}$ , měřicí otáčka a další protřepání kyvety. Poté jsou do kyvety napipetovány  $\mu\text{l}$  vzorku a 16  $\mu\text{l}$  diluentu, je provedena měřicí otáčka a kyveta je opět protřepána. Posledním krokem je přidání 1  $\mu\text{l}$  startovní reagensie a 2  $\mu\text{l}$  diluentu a protřepání. Poté ještě následuje poslední měřicí otáčka, při které je změřen nárůst absorbance vzorku při vlnových délkách 340 a 652 nm.



**Fig.2 Biochemický analyzátor Cobas Integra 800 od společnosti Roche Diagnostic Systems. Převzato z [www.cobas.at](http://www.cobas.at).**

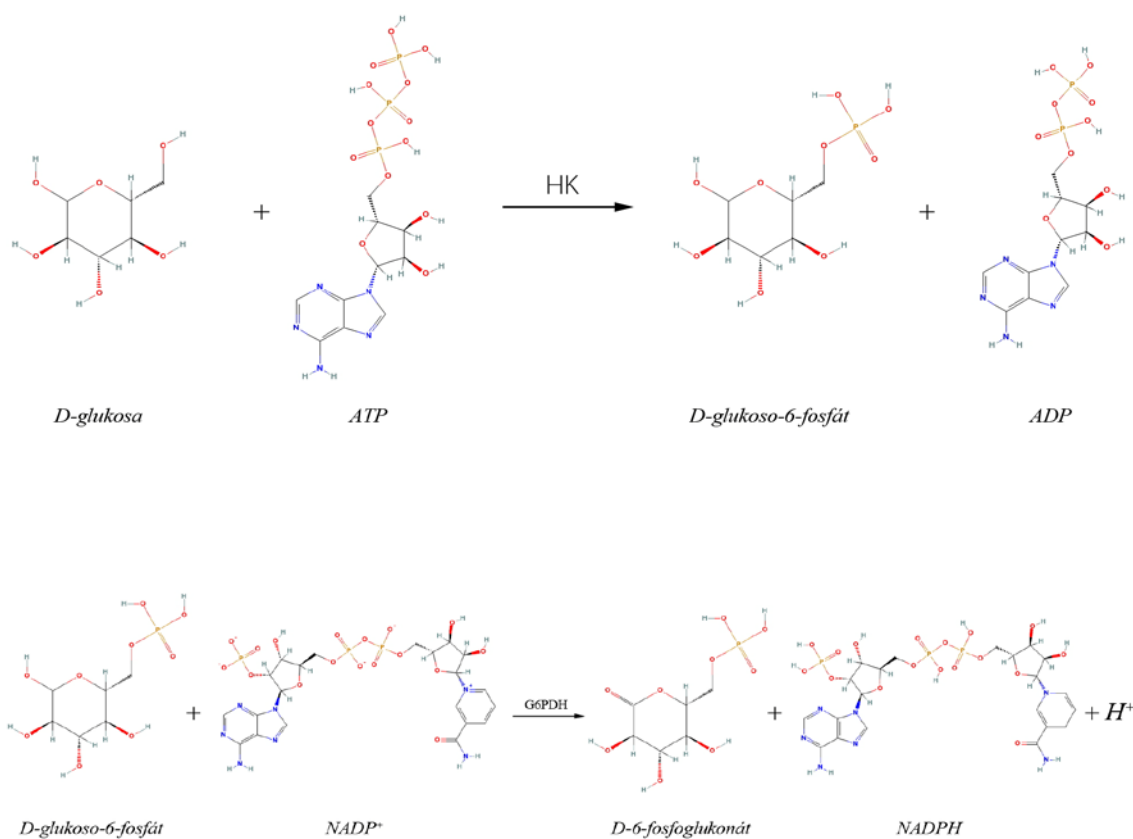


- |   |                            |   |
|---|----------------------------|---|
| A Systém kapalin  | G Prostor pro stojánky     | L Elektronické součásti                         |
| B Pipetovací modul  | H Transportní systém kyvet | M Zásobník na kyvety                            |
| C Vzorková ramena   | I Karusel                  | N Odpadní nádoba<br>(pro kyvety a ISE kapaliny) |
| D Reagenční ramena  | J Plošina                  | O ISE modul                                     |
| E Plošina pro kazety                                      | K Pozice pro STAT stojánek |   |
| F Rotor analyzátoru s pracovními stanicemi, měřicí moduly |                            |   |

**Fig.3 Schéma analyzátoru Cobas Integra 800 s popisem jednotlivých součástí.**

### 3.2.3. Hexokinasová metoda

Hexokinasová metoda je enzymatickou referenční metodou pro stanovení glukosy. Hexokinasa (HK) katalyzuje fosforylaci glukosy pomocí adenosin trifosfátu (ATP) za přítomnosti  $Mg^{2+}$  na glukoso-6-fosfát a adenosin difosfát (ADP). V následné reakci se druhý enzym - glukoso-6-fosfátdehydrogenasa (G6PDH) - užívá ke katalýze oxidace glukoso-6-fosfátu pomocí oxidovaného nikotinamid adenin dinukleotid fosfátu ( $NADP^+$ ) za vzniku 6-fosfoglukonátu a redukovaného NADPH. Koncentrace vytvořeného NADPH je přímo úměrná koncentraci glukosy. Stanovuje se měřením nárůstu absorbance při 340 nm. Analyzátor automaticky spočítá koncentraci analytu ve vzorku.



#### 3.2.4. Pracovní postup

Prvním krokem je zadání údaje o vzorku a volba typu testu do počítače. Poté se napipetovaný vzorek o objemu 300 µl vloží do stojánku na pozici určenou počítačem. Následně se otevře kryt plošiny určené pro stojánky se vzorky, vloží se stojánek a kryt se opět zavře. Kliknutím na tlačítko Start se spustí vlastní měření. Po skončení měření se automaticky vytisknou výsledky.

### 3.3. Statistické zpracování naměřených hodnot

#### 3.3.1. Zpracování dat

Naměřené hodnoty byly zpracovány pomocí aplikace Microsoft Office Excel 2003. Byly zde vytvořeny tabulky a grafy a vypočteny potřebné charakteristiky statistického souboru - aritmetický průměr, směrodatná odchylka, variační koeficient, výtěžnost a bias. Kombinovaná nejistota byla vypočtena pomocí kalkulátoru nejistot, dostupným na [www.naskl.cz](http://www.naskl.cz).

#### 3.3.2. Aritmetický průměr a směrodatná odchylka

Aritmetický průměr  $AM$  byl vypočten podle vzorce:

$$AM = \frac{\sum x_i}{n}$$

Při verifikačních měřeních používáme směrodatnou odchylku výběru, která vyjadřuje míru přesnosti (Ambrožová 2005). Čím je přesnost menší, tím je výběrová směrodatná odchylka větší. Směrodatná odchylka výběru se značí  $SD$ , udává se ve stejných jednotkách jako naměřené hodnoty (zde mmol/l) a vzorec pro její výpočet zní:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - AM)^2}{n - 1}}$$

kde  $x_i$  = naměřená hodnota koncentrace,

$n$  = počet měření.

### 3.3.3. Variační koeficient

Variační koeficient neboli relativní směrodatná odchylka se značí  $CV$ , nejčastěji je udáván v procentech a vyjadřuje podíl směrodatné odchylky a aritmetického průměru podle vzorce:

$$CV = 100 \cdot \frac{SD}{AM}$$

### 3.3.4. Bias a výtěžnost

Bias  $B$  je diference aritmetického průměru opakovaných měření v sérii od uznávané referenční hodnoty (Suchánek et al. 2006). Stanovuje se analýzou validovaného (certifikovaného) referenčního materiálu za podmínek opakovatelnosti a vyjadřuje se v procentech. Představuje míru pravdivosti, tedy čím nižší je bias, tím je větší je pravdivost. Výpočet se provádí podle vzorce:

$$B = \frac{AM - RMP}{RMP} \cdot 100$$

kde RMP = referenční hodnota.

Výtěžnost  $R$  vyjadřuje jiným způsobem stejný parametr jako bias. Jedná se o procentuální poměr aritmetického průměru a referenční hodnoty podle vzorce:

$$R = \frac{AM}{RMP} \cdot 100$$

### 3.3.5. Kombinovaná nejistota

Kombinovaná nejistota  $u_{r,tot}$  je univerzální mírou k vyjadřování nejistoty výsledku měření. Vypočte se kombinací odhadů dílčích nejistot, vyjádřených v procentech, metodou kovariance podle vzorce:

$$u_{r,tot} = \sqrt{u_{r, repro}^2 + B_r^2 + u_{r, ref}^2 + u_{r, xp}^2}$$

kde  $u_{r, repro}$  = variační koeficient získaný za podmínek reprodukovatelnosti,

$B_r$  = bias,

$u_{r, ref}$  = relativní nejistota referenčního materiálu,

$u_{r, xp}$  = relativní standardní nejistota průměru.

Relativní standardní nejistota průměru  $u_{r, xp}$  je dána opakovatelností měření a jejich počtem a je vypočtena podle vztahu:

$$u_{r, xp} = \frac{u_{xp}}{x_p} \cdot 100$$

kde  $u_{xp}$  = standardní nejistota (směrodatná odchylka průměru) =  $SD/\sqrt{n}$ ,

$x_p$  = aritmetický průměr.

### 3.3.6. Rozšířená nejistota

Rozšířená nejistota  $U_{r,tot}$  udává míru nejistoty jako interval v okolí výsledku měření, ve kterém leží skutečná hodnota veličiny s určitou pravděpodobností. Touto pravděpodobností je nejčastěji hodnota 0,95, odpovídající 95% intervalu spolehlivosti. Rozšířenou nejistotu získáme z kombinované nejistoty podle vzorce:

$$U_{r,tot} = k \cdot u_{r,tot}$$

kde  $k$  = koeficient rozšíření a volí se obvykle  $k = 2$ , která odpovídá oboustrannému testu na hladině významnosti  $\alpha = 5 \%$  pro normální rozdělení.

Hodnota výsledku měření  $x_i$  spolu s nejistotou měření se uvádí ve tvaru  $x_i \pm U_{r,tot}$ .



#### **4. Výsledky**

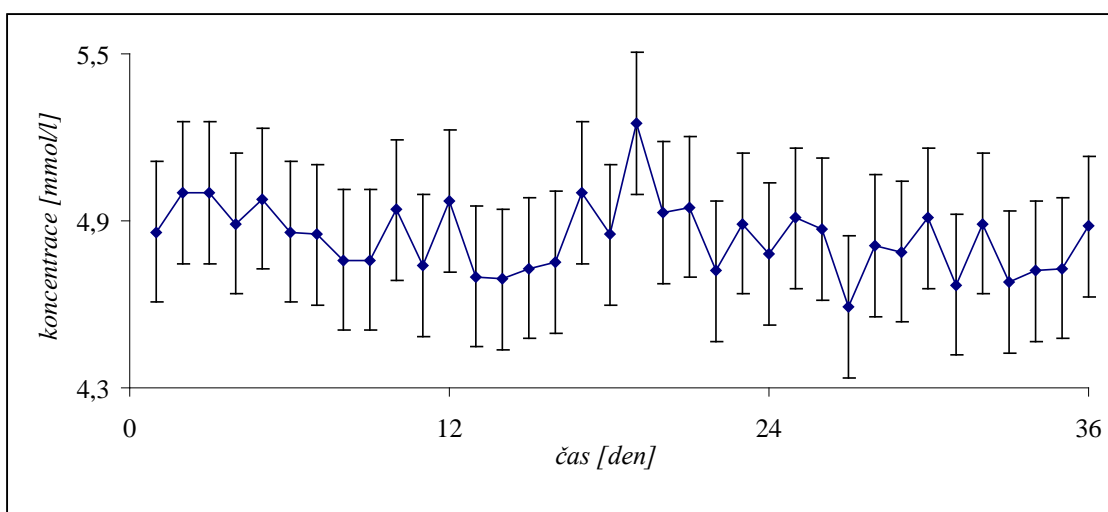
Provedli jsme verifikaci analytické metody stanovení glukosy. Naměřili jsme hodnoty koncentrace glukosy v kontrolních vzorcích za podmínek reprodukovatelnosti a opakovatelnosti, ze získaných výsledků stanovili potřebné charakteristiky statistického souboru a vytvořili verifikační protokol (Fig.9), který je nedílnou součástí celého procesu verifikace. V následujících podkapitolách jsou uvedeny tabulky s naměřenými hodnotami a z nich vypočtenými statistickými veličinami a dále grafy znázorňující kolísání těchto naměřených hodnot.

#### 4.1. Měření v čase - vzorek o koncentraci v referenčním limitu

V kontrolním vzorku PNU o koncentraci glukosy v referenčním limitu, který jsme měřili v 36 po sobě jdoucích pracovních dnech za podmínek reprodukovatelnosti (Tab.1) byla nejnižší naměřená hodnota 4,59 mmol/l, nejvyšší naměřená hodnota pak 5,25 mmol/l. Změny naměřených hodnot jsou patrné v grafu Fig.4, který obsahuje také chybové úsečky o velikosti dvou směrodatných odchylek. Vypočetli jsme statistické veličiny pro měření v čase (Tab.2). Aritmetický průměr naměřených hodnot se rovnal 4,84 mmol/l, směrodatná odchylka 0,13 mmol/l a variační koeficient 2,63 %. Referenční hodnota koncentrace glukosy v tomto vzorku byla 5,09 mmol/l.

**Tab.1 Hodnoty koncentrace glukosy naměřené v rámci verifikačního měření za podmínek reprodukovatelnosti v po sobě jdoucích 36 dnech u kontrolního vzorku o koncentraci glukosy v referenčním limitu.**

den	koncentrace [mmol/l]	den	koncentrace [mmol/l]
1	4,86	19	5,25
2	5,00	20	4,93
3	5,00	21	4,95
4	4,89	22	4,72
5	4,98	23	4,89
6	4,86	24	4,78
7	4,85	25	4,91
8	4,76	26	4,87
9	4,76	27	4,59
10	4,94	28	4,81
11	4,74	29	4,79
12	4,97	30	4,91
13	4,70	31	4,67
14	4,69	32	4,89
15	4,73	33	4,68
16	4,75	34	4,72
17	5,00	35	4,73
18	4,85	36	4,88



**Fig.4** Změny koncentrace glukosy naměřené v rámci verifikačního měření za podmínek reprodukovatelnosti v po sobě jdoucích 36 dnech u kontrolního vzorku o koncentraci glukosy v referenčním limitu.

**Tab.2** Charakteristiky statistického souboru získané z hodnot naměřených v rámci verifikačního měření za podmínek reprodukovatelnosti v po sobě jdoucích 36 dnech u kontrolního vzorku o koncentraci glukosy v referenčním limitu.

<b>veličina</b>	<b>hodnota</b>
počet měření	36
AM [mmol/l]	4,84
RMP [mmol/l]	5,09
SD [mmol/l]	0,13
CV [%]	2,63

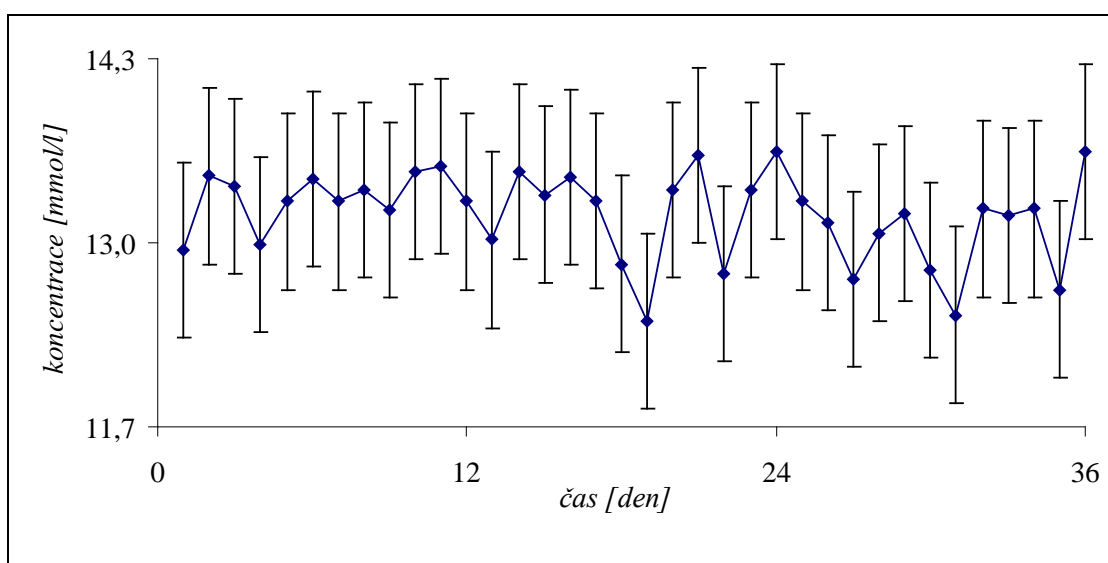
#### **4.2. Měření v čase - vzorek o koncentraci nad horní hranicí referenčního limitu**

V kontrolním vzorku PPU o koncentraci glukosy nad hodnotou horní hranice referenčního limitu, který jsme měřili v 36 po sobě jdoucích pracovních dnech za podmínek reprodukovatelnosti byla nejnižší naměřená hodnota 12,45 mmol/l, nejvyšší naměřená hodnota pak 13,64 mmol/l (Tab.3). Změny naměřených hodnot jsou

vyjádřeny v grafu Fig.5, který obsahuje také chybové úsečky o velikosti dvou směrodatných odchylek. Vypočetli jsme statistické veličiny pro měření v čase (Tab.4). Aritmetický průměr naměřených hodnot byl 13,20 mmol/l, směrodatná odchylka 0,31 mmol/l a variační koeficient 2,34 %. Referenční hodnota koncentrace glukosy v tomto vzorku byla 13,40 mmol/l. Z analyzátoru jsme získali souhrnný graf (Fig.10) pro měření v čase, který znázorňuje rozptyl hodnot kolem hodnoty aritmetického průměru (x).

**Tab.3 Hodnoty koncentrace glukosy naměřené v rámci verifikačního měření za podmínek reprodukovatelnosti v po sobě jdoucích 36 dnech u kontrolního vzorku o koncentraci glukosy nad hodnotou horní hranice referenčního limitu.**

<b>den</b>	<b>koncentrace [mmol/l]</b>	<b>den</b>	<b>koncentrace [mmol/l]</b>
1	12,95	19	12,45
2	13,47	20	13,37
3	13,40	21	13,62
4	12,99	22	12,78
5	13,29	23	13,37
6	13,45	24	13,64
7	13,29	25	13,29
8	13,37	26	13,14
9	13,23	27	12,74
10	13,50	28	13,07
11	13,54	29	13,21
12	13,29	30	12,81
13	13,02	31	12,49
14	13,50	32	13,24
15	13,34	33	13,19
16	13,46	34	13,24
17	13,30	35	12,67
18	12,85	36	13,64



**Fig.5** Změny koncentrace glukosy naměřené v rámci verifikačního měření za podmínek reprodukovatelnosti v po sobě jdoucích 36 dnech u kontrolního vzorku o koncentraci glukosy nad hodnotou horní hranice referenčního limitu.

**Tab.4** Charakteristiky statistického souboru získané z hodnot naměřených v rámci verifikačního měření za podmínek reprodukovatelnosti v po sobě jdoucích 36 dnech u kontrolního vzorku o koncentraci glukosy nad hodnotou horní hranice referenčního limitu.

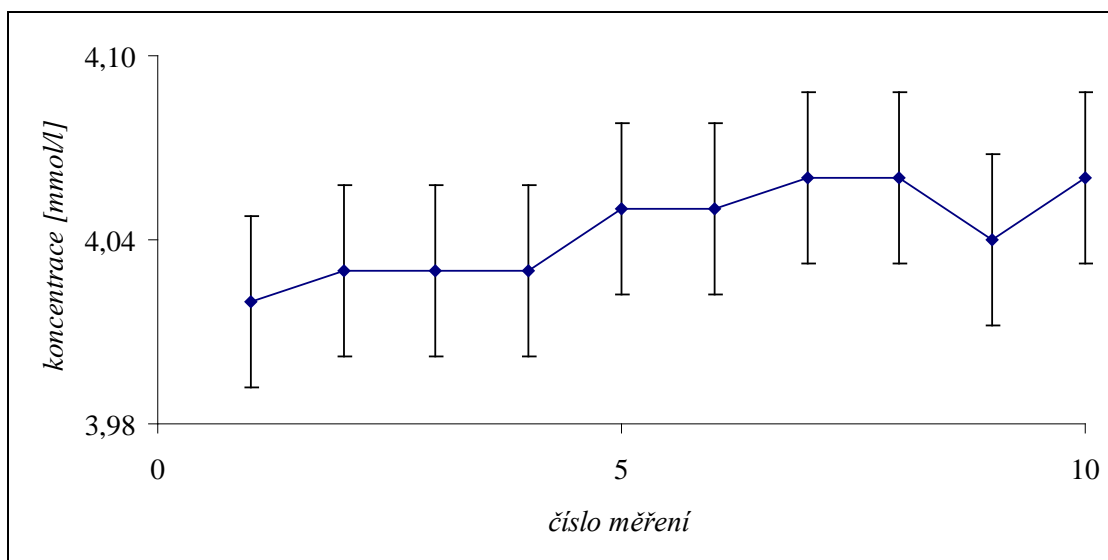
veličina	hodnota
počet měření	36
AM [mmol/l]	13,20
RMP [mmol/l]	13,40
SD [mmol/l]	0,31
CV [%]	2,34

#### 4.3. Měření v sérii - vzorek o koncentraci v referenčním limitu

V kontrolním vzorku AKS 2333 o koncentraci glukosy v referenčním limitu, který jsme měřili v 10 následných měření provedených za podmínek opakovatelnosti byla naměřena nejnižší hodnota 4,02 mmol/l, nejvyšší hodnota pak 4,06 mmol/l (Tab.5). Změny naměřených hodnot ukazuje graf Fig.6, který obsahuje také chybové úsečky o velikosti dvou směrodatných odchylek. Vypočetli jsme statistické veličiny pro měření v sérii (Tab.6). Hodnota aritmetického průměru naměřených hodnot byla 4,04 mmol/l, směrodatná odchylka měla hodnotu 0,01 mmol/l a variační koeficient 0,35 %. Referenční hodnota koncentrace glukosy v tomto vzorku byla 4,31 mmol/l při nejistotě referenčního materiálu 0,5 %. Dále jsme určili výtěžnost  $R$ , která byla rovna 93,74 % a bias  $B$ , který byl -6,26 %. Pomocí těchto veličin jsme stanovili kombinovanou nejistotu, která byla 6,81 %. Rozšířená nejistota, získaná z kombinované nejistoty po vynásobení koeficientem rozšíření, měla hodnotu 13,62 %. Z toho vyplývá, že skutečná hodnota koncentrace leží s 95% pravděpodobností v intervalu 3,72 - 4,90 mmol/l.

**Tab.5 Hodnoty koncentrace glukosy naměřené v rámci verifikačního měření za podmínek opakovatelnosti v 10 měřeních u kontrolního vzorku o koncentraci glukosy v referenčním limitu.**

číslo měření	koncentrace [mmol/l]
1	4,02
2	4,03
3	4,03
4	4,03
5	4,05
6	4,05
7	4,06
8	4,06
9	4,04
10	4,06



**Fig.6** Změny koncentrace glukosy naměřené v rámci verifikačního měření za podmínek opakovatelnosti v 10 měřeních u kontrolního vzorku o koncentraci glukosy v referenčním limitu.

**Tab.6** Charakteristiky statistického souboru získané z hodnot naměřených v rámci verifikačního měření za podmínek opakovatelnosti v 10 měřeních u kontrolního vzorku o koncentraci glukosy v referenčním limitu.

<b>veličina</b>	<b>hodnota</b>
počet měření	10
AM [mmol/l]	4,04
RMP [mmol/l]	4,31
nejistota referenčního materiálu [%]	0,50
SD [mmol/l]	0,01
CV [%]	0,35
R [%]	93,74
B [%]	-6,26
kombinovaná nejistota [%]	6,81
rozšířená nejistota [%]	13,62

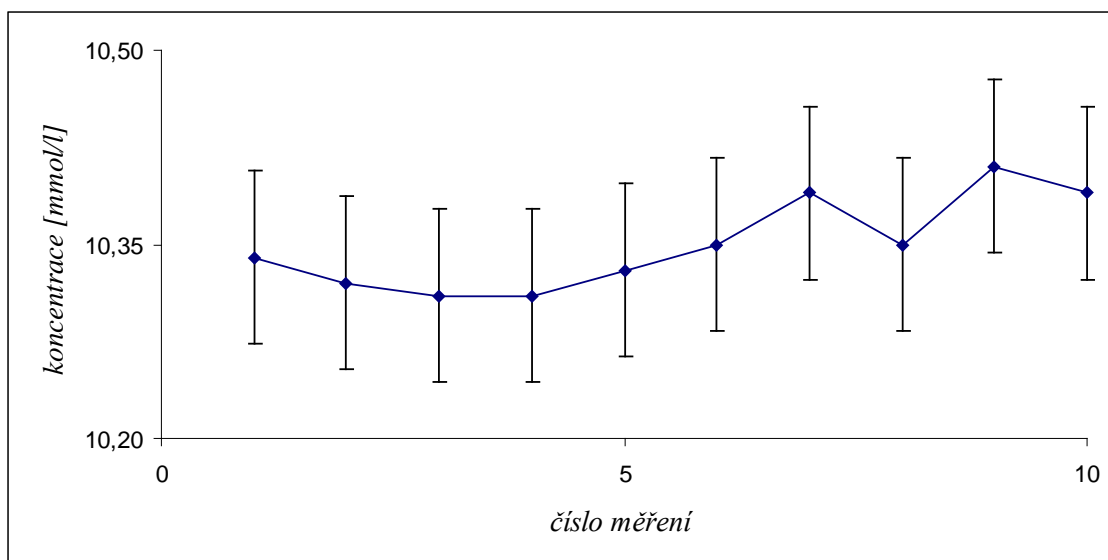
#### **4.4. Měření v sérii - vzorek o koncentraci nad horní hranicí referenčního limitu**

V kontrolním vzorku AKS 2337 o koncentraci glukosy nad hodnotou horní hranice referenčního limitu, který jsme měřili v 10 následných měření provedených za podmínek opakovatelnosti byla naměřena nejnižší hodnota 10,31 mmol/l, nejvyšší hodnota pak 10,41 mmol/l (Tab.7). Změny naměřených hodnot ukazuje graf Fig.7, který obsahuje také chybové úsečky o velikosti dvou směrodatných odchylek. Vypočetli jsme statistické veličiny pro měření v sérii (Tab.8). Hodnota aritmetického průměru naměřených hodnot byla 10,35 mmol/l, směrodatná odchylka se rovnala 0,03 mmol/l a variační koeficient 0,33 %. Referenční hodnota koncentrace glukosy v tomto vzorku byla 11,01 mmol/l při nejistotě referenčního materiálu 0,5 %. U měření v sérii jsme dále určili výtěžnost, která činila 94,01 % a bias, který byl -5,99 %. Pomocí těchto veličin jsme stanovili kombinovanou nejistotu, která byla 6,45 %. Rozšířená nejistota měla hodnotu 12,90 %. Z toho vyplývá, že skutečná hodnota koncentrace leží s 95% pravděpodobností v intervalu 9,59 - 12,43 mmol/l.

**Tab.7 Hodnoty koncentrace glukosy naměřené v rámci verifikačního měření za podmínek opakovatelnosti v 10 měřeních u kontrolního vzorku o koncentraci glukosy nad hodnotou horní hranice referenčního limitu.**

<b>číslo měření</b>	<b>koncentrace [mmol/l]</b>
1	10,34
2	10,32
3	10,31
4	10,31
5	10,33
6	10,35
7	10,39
8	10,35
9	10,41
10	10,39



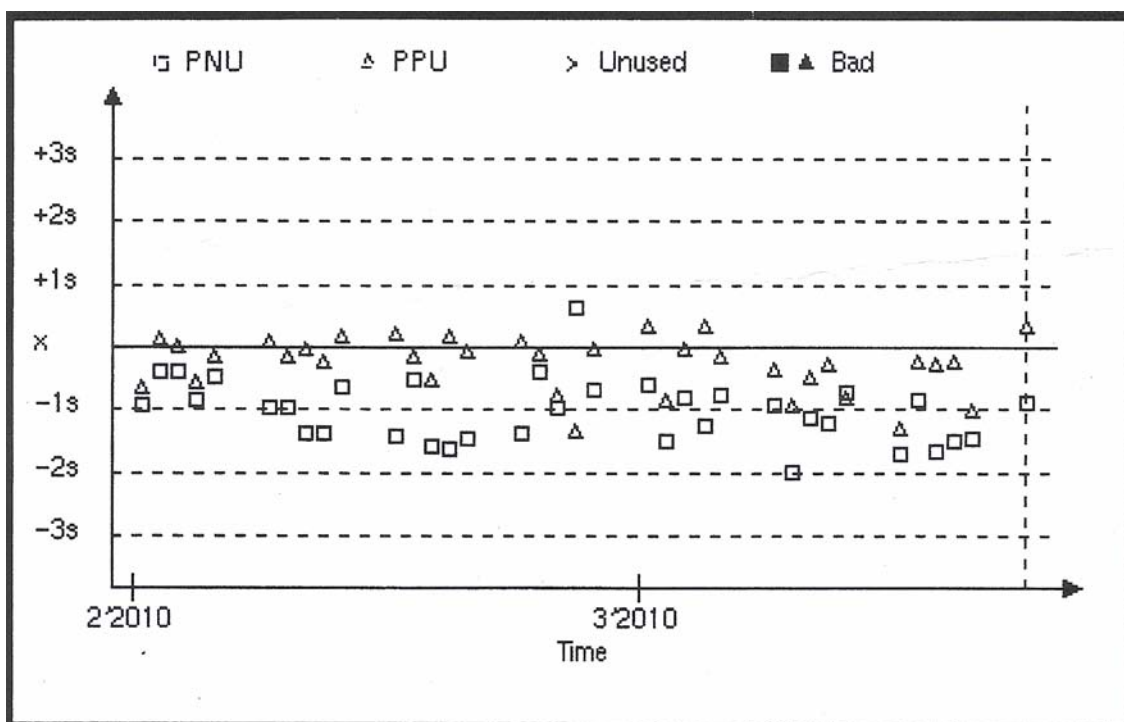


**Fig.7** Změny koncentrace glukosy naměřené v rámci verifikačního měření za podmínek opakovatelnosti v 10 měřeních u kontrolního vzorku o koncentraci glukosy nad hodnotou horní hranice referenčního limitu.

**Tab.8** Charakteristiky statistického souboru získané z hodnot naměřených v rámci verifikačního měření za podmínek opakovatelnosti v 10 měřeních u kontrolního vzorku o koncentraci glukosy nad hodnotou horní hranice referenčního limitu.

<b>veličina</b>	<b>hodnota</b>
počet měření	10
AM [mmol/l]	10,35
RMP [mmol/l]	11,01
nejistota referenčního materiálu [%]	0,50
SD [mmol/l]	0,03
CV [%]	0,33
R [%]	94,01
B [%]	-5,99
kombinovaná nejistota [%]	6,45
rozšířená nejistota [%]	12,90





**Fig.10** Rozptyl hodnot koncentrace glukosy naměřených v kontrolních materiálech PNU a PPU za podmínek reprodukovatelnosti, nacházející se v intervalu aritmetický průměr  $(x) \pm 2$  směrodatné odchylky (s).

## 5. Diskuse

Oblast klinické biochemie zaznamenala v posledních 50 letech velký pokrok. V padesátých letech minulého století se ve většině zdravotnických zařízení mnoho laboratorních testů nedělalo (Masopust 2003). Většinou se jednalo pouze o kvalitativní testování moče, stolice a krve. Kvantitativní analýza vycházela z metod anorganické chemie, vyžadovala velké množství biologického materiálu a její přesnost se zdaleka nepřibližovala té dnešní. Až rozvoj kolorimetrických a fotometrických technik rozšířil možnosti analýzy biologických materiálů. Lékaři si podle svého uvážení volili různé metody, sami si je upravovali, připravovali si v laboratoři potřebné reagenty a také vyvíjeli metody nové. Metody ovšem byly pracné, časově náročné a v některých případech vyžadovaly po laboratorních pracovnících manipulaci s nebezpečnými látkami, některé reakce také probíhaly při vyšších teplotách (var). V průběhu dalších desítek let docházelo k významným změnám. Vícestupňové reakce byly postupně nahrazeny reakcemi jednostupňovými. Postupně byla vyloučena agresivní činidla a vysoké reakční teploty a zavedla se činidla enzymatická s vysokou specificitou. V přístrojové technice se přecházelo z manuálních metod na mechanické, které byly v posledních letech nahrazeny v procesech automatizace a robotizace inteligentními automatickými analyzátoři.

Také metody stanovení glukosy prošly v průběhu let velkým vývojem. Od původních nespecifických redukčních metod (např. metody Hagedorn-Jensenova nebo Nelsonova), používajících k detekci titrace a kolorimetrické techniky, přes metody kondenzační, využívající varu s kyselinami a kondenzace s fenoly a aminy, až po dnešní vysoce specifické enzymatické metody, mezi které patří často používaná glukosooxidasová a referenční hexokinasová metoda (Černý et al. 1998, Dastych et al. 2008).

Jedním z cílů práce bylo porovnat vlastní výsledky s validačními údaji, které udává výrobce, protože toto srovnání hodnot zjištěných v laboratoři je vlastní podstatou verifikace (Friedecký 2007). Validační údaje jsou dostupné pouze pro kontrolní materiály PNU a PPU. Získané hodnoty směrodatné odchylky a variačního koeficientu

musí být nižší než hodnoty dané výrobcem. U konkrétní šarže 180425 materiálu PNU výrobce uvádí referenční hodnotu 5,09 mmol/l, směrodatnou odchylku 0,25 mmol/l a variační koeficient 4,9 %. U šarže 150415 materiálu PPU je uvedena referenční hodnota 13,40 mmol/l, směrodatná odchylka 0,70 mmol/l a variační koeficient 5,2 %. Jiné veličiny výrobce neuvádí. Srovnání daných hodnot s hodnotami získanými vlastním měřením je znázorněno v Tab.9. Je zde patrné, že naměřené hodnoty a z nich získané statistické veličiny mají nižší hodnotu než validované údaje výrobce. To znamená, že data poskytnutá výrobcem jsou v konkrétních podmínkách laboratoře a s použitím konkrétního analytického systému splněna.

**Tab.9 Srovnání validačních údajů od výrobce pro kontrolní materiály PNU a PPU s hodnotami získanými vlastním měřením.**

	validované hodnoty		naměřené hodnoty	
	PNU	PPU	PNU	PPU
RMP/AM [mmol/l]	5,09	13,40	4,84	13,20
SD [mmol/l]	0,25	0,70	0,13	0,31
CV [%]	4,9	5,2	2,63	2,34

Kontrolní materiály AKS 2333 a 2337 byly použity v kontrolním cyklu externí kontroly kvality AKS3/09 provozovaném společností SEKK (Friedecký et al. 2009). Výsledky tohoto cyklu jsou dostupné online na [www.sekk.cz](http://www.sekk.cz). Průměrné výsledky skupiny účastníků cyklu, která využívá metodu s hexokinásou a analyzátor firmy Roche, jsou následující. Pro kontrolní materiál AKS 2333 byl zjištěn aritmetický průměr 4,22 mmol/l, směrodatná odchylka 0,088 mmol/l a variační koeficient 2,08 %. Kontrolní materiál AKS 2337 měl hodnotu aritmetického průměru 10,74 mmol/l, směrodatné odchylky 0,234 mmol/l a variačního koeficientu 2,17 %. Kombinované nejistoty nebyly určeny pro jednotlivé skupiny, stanoveny byly pouze celkové kombinované nejistoty pro všechny použité metody stanovení glukosy. Celková maximální kombinovaná nejistota pro AKS 2333 byla 5,90 % a pro AKS 2337 byla 7,60 %. Hodnoty bias a výtěžnosti zdroj neuvádí. Všechny uvedené statistické veličiny

mají hodnoty vyšší než veličiny našeho měření s výjimkou kombinované nejistoty materiálu AKS 2333, která je nižší (Tab.10). To ovšem může být způsobeno nesourodostí metod stanovení.

**Tab.10 Srovnání výsledků kontrolního cyklu externí kontroly kvality pro kontrolní materiály AKS 2333 a AKS 2337 s hodnotami získanými vlastním měřením.**

	SEKK		vlastní měření	
	AKS 2333	AKS 2337	AKS 2333	AKS 2337
AM [mmol/l]	4,22	10,74	4,04	10,35
SD [mmol/l]	0,088	0,234	0,01	0,03
CV [%]	2,08	2,17	0,35	0,33
kombinovaná nejistota [%]	5,90	7,60	6,81	6,45

Dokument Laboratorní diagnostika a sledování stavu diabetes mellitus udává následující požadavky (Friedecký 2006). Přesnost vyjádřená jako reprodukovatelnost by měla mít variační koeficient menší nebo roven 2,5 %, pravdivost vyjádřená jako hodnota bias by neměla přesáhnout hodnotu 2 % a celková kombinovaná nejistota by se měla pohybovat v rozmezí 5 - 7 %. Při dosažení těchto hodnot reprodukovatelnosti a bias je dosaženo vysoké pravděpodobnosti, že četnost falešných diagnostických klasifikací nepřekročí hodnotu 5 %, pokud jsou provedena dvě nezávislá měření u jednoho pacienta. Těmto požadavkům nevyhovuje variační koeficient získaný z měření kontrolního materiálu PNU a bias obou materiálů AKS (Tab.11). Variační koeficient se ovšem od požadované hodnoty liší pouze o 0,13 %. Oproti tomu kombinované nejistoty leží v požadovaném intervalu a jsou pro hodnocení kvality rozhodující.

**Tab.11 Srovnání hodnot získaných vlastním měřením s požadavky uvedenými v článku Laboratorní diagnostika a sledování stavu diabetes mellitus.**

	Friedecký	vlastní měření	
		PNU/AKS 2333	PPU/AKS 2337
CV [%]	$\leq 2,5$	2,63	2,34
B [%]	$\leq 2$	-6,26	-5,99
kombinovaná nejistota [%]	5 - 7	6,81	6,45

V Doporučení pro určení odhadů nejistot výsledků měření/klinických testů v klinických laboratořích je uveden příklad odhadu nejistot u stanovení koncentrace glukosy v krevním séru (Suchánek et al. 2006). Hodnoty reprodukovatelnosti zde byly stanoveny vyhodnocením výsledků vnitřní kontroly kvality za rok 2004. Průměrný variační koeficient získaný ze dvou kontrolních materiálů byl 2 % a směrodatná odchylka výběru byla 0,114 mmol/l. Výsledky měření referenčního materiálu za podmínek opakovatelnosti byly získány v sérii 10 měření, kdy hodnota výtěžnosti byla 100,5 % a hodnota bias 0,5 %. Nejistota referenčního materiálu měla hodnotu 0,3 % a relativní standardní nejistota průměru byla 0,41 %. Kombinací dílčích nejistot byla získána hodnota kombinované nejistoty 2,1 % a rozšířené nejistoty 4,2 %. Porovnání s hodnotami vlastního měření jsou patrné v Tab.12. Většina veličin je menších než veličiny získané z vlastního verifikačního měření, kromě hodnoty relativní standardní nejistoty, z čehož se dá soudit, že měření provedené pro potřeby výše zmíněného článku je přesnější. Není zde ovšem uvedeno, která metoda a přístroj byly použity, proto může být porovnávání těchto hodnot zavádějící.

**Tab.12 Srovnání hodnot získaných vlastním měřením s příkladem odhadu nejistot uvedeným v Doporučení pro určení odhadů nejistot výsledků měření/klinických testů v klinických laboratořích.**

	Suchánek	vlastní měření	
		PNU/AKS 2333	PPU/AKS 2337
CV [%]	2,3	2,63	2,34
SD [mmol/l]	0,114	0,13	0,31
R [%]	100,5	93,74	94,01
B [%]	0,5	-6,26	-5,99
nejistota referenčního materiálu [%]	0,3	0,5	0,5
relativní standardní nejistota [%]	0,41	0,1	0,1
kombinovaná nejistota [%]	2,1	6,81	6,45
rozšířená nejistota [%]	4,1	13,62	12,90



## 6. Závěr

Provedli jsme verifikaci analytické metody stanovení glukosy hexokinasovou metodou na analyzátoru Cobas Integra 800 opakovaným měřením kontrolních vzorků v čase a v sérii. Z naměřených hodnot jsme vypočetli potřebné charakteristiky statistického souboru - aritmetický průměr, směrodatnou odchylku, variační koeficient, výtěžnost, bias, kombinovanou nejistotu a rozšířenou nejistotu. Z porovnání s dostupnou literaturou a z hodnot kombinovaných nejistot jsme vyvodili závěr, že verifikace proběhla úspěšně.

Ukázali jsme, jak složitý proces verifikace je a co všechno je potřeba k získání odhadu nejistoty měření. Z tohoto zjištění vyplývá, že je velmi důležité, aby měl laboratorní personál dostatečné znalosti v oblasti této problematiky, k čemuž může tato práce přispět.

## 7. Seznam použité literatury:

[1] AKS3/09\_Com [online]. 2009 [cit. 2010-03-26]. SEKK. Dostupné z WWW: <[http://www.sekk.cz/EQA/2009/AKS309\\_Com.pdf](http://www.sekk.cz/EQA/2009/AKS309_Com.pdf)>.

[2] AKS3/09\_PGMI [online]. 2009 [cit. 2010-03-26]. SEKK. Dostupné z WWW: <[http://www.sekk.cz/EQA/2009/AKS309\\_PGMI.pdf](http://www.sekk.cz/EQA/2009/AKS309_PGMI.pdf)>.

[3] Ambrožová, J. (2005). Nejistota měření - příspěvek k diskuzi. Labor Aktuell 3: 11-18.

[4] American Diabetes Association (2005): Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 28: S37-S42.

[5] Brdička, R., Vraná, M., Otáhalová, E., Štambergová, A., Čamajová, J. (2007): Analytická validace metod molekulární genetiky určených pro analýzu lidského genomu. Klin Biochem Metab 15: 58–62.

[6] Cobas [online]. 2006-11-22 [cit. 2010-04-12]. COBAS INTEGRA 800. Dostupné z WWW: <[http://www.cobas.at/cobas/upload/Bilder/Filka/Integra\\_800.jpg](http://www.cobas.at/cobas/upload/Bilder/Filka/Integra_800.jpg)>.

[7] Černý, B., Prokeš, J., Vulterin, K. Chemické principy metod klinické biochemie. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1998. 66 s. ISBN 80-7184-449-7.

[8] Dastych, M., Breinek, P. a kol. Klinická biochemie. 1. vyd. Brno: MU, 2008. 232 s. ISBN 978-80-210-4572-9.

[9] Eurachem. The fitness for purpose of analytical methods [online]. 1st edition. 1998 [cit. 2009-09-21]. Dostupné z WWW: <<http://www.eurachem.org/guides/valid.pdf>>. ISBN 0-948926-12-0.

- [10] Franeková, J. (2005): Laboratorní diagnostika a sledování stavu diabetes mellitus u dospělých – pohled lékaře z praxe. *Klin Biochem Metab* 13: 155-158.
- [11] Friedecký, B. (2006): Laboratorní diagnostika a sledování stavu diabetes mellitus. *Klin Biochem Metab* 14: 54-65.
- [12] Friedecký, B. (2007). Evaluační protokoly CLSI a hodnocení analytických metod prováděných výrobky IVD. *Fons* 4: 28-30.
- [13] Friedecký, B., Kratochvíla, J. (2007): Verifikace (ověření) laboratorních měření a ISO 15189. *FONS* 1: 29-30.
- [14] Friedecký, B., Kratochvíla, J., Uhlířová, M. (2009): Validační protokol pro kontrolní materiál Analyty krevního séra. SEKK.
- [15] Friedecký, B., Šprongl, L., Kratochvíla, J. ČSKB: Validace a verifikace metod [online]. 2004 [cit. 2009-12-11]. Dostupný z WWW: <<http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni-validace-a-verifikace-metod>>.
- [16] González, A.G., Herrador, M.A. (2007): A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends Anal Chem* 26: 227-238.
- [17] Guzel, O., Guner, E.I. (2009): ISO 15189 Accreditation: Requirements for quality and competence of medical laboratories, experience of a laboratory I. *Clin Biochem* 42: 274-278.
- [18] Kallner, A. (2001): International standards in laboratory medicine. *Clin Chim Acta* 307: 181-186.

- [19] Masopust, J. (2003). Jaké to bylo ve zdravotnických laboratořích před půl stoletím a jak se klinická biochemie rozvíjela. *Labor Aktuell* 2: 27-30.
- [20] Nichols, J.H. (2009): Verification of method performance for clinical laboratories. *Adv Clin Chem* 47: 121-137.
- [21] Panteghini, M. (2009): Traceability as a unique tool to improve standardization in laboratory medicine. *Clin Biochem* 42: 236-240.
- [22] Panteghini, M., Forest, J.C. (2005): Standardization in laboratory medicine: New challenges. *Clin Chim Acta* 355: 1-12.
- [23] Racek, J. et al. *Klinická biochemie*. 2. vyd. Praha: Galén, 2006. 329 s. ISBN 80-7262-324-9.
- [24] Reinauer, H., Home P.D., Kanagasabapathy, A., Heuck, C.C. *Laboratory Diagnosis and Monitoring of Diabetes Mellitus*. Geneva: WHO, 2002. 26 s.
- [25] Roche Diagnostic [online]. 2009 [cit. 2010-03-01]. Glucose HK Gen.3. Dostupné z WWW: <<http://www.roche-diagnostics.cz/objednavky/info/04404483pi.pdf>>.
- [26] Suchánek, M., Friedecký, B., Kratochvíla, J., Budina M., Bartoš, V. (2006): Doporučení pro určení odhadů nejistot výsledků měření/klinických testů v klinických laboratořích. *Klin Biochem Metab* 14: 43-53.
- [27] Štern, P., Kocna, P. et. al. *Základy obecné a klinické biochemie* [online]. Praha: ÚKBLD 1.LFUK a VFN, 2004 [cit. 2010-11-25]. Dostupné z WWW: <<http://ukb.lf1.cuni.cz/skripta/index.htm>>.

[28] Uras, F. (2009): Quality regulations and accreditation standards for clinical chemistry in Turkey. Clin Biochem 42: 263-265.

[29] Walton, R. (2001): Validation of laboratory tests and methods. Semin Avian Exot Pet Med 10: 59-65.

[30] Westgard, J.O., Darcy, T. (2004): The truth about quality: medical usefulness and analytical reliability of laboratory tests. Clin Chim Acta 346: 3-11.

[31] WHO. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Geneva: WHO, 1999. 59 s.

## **8. Klíčová slova**

verifikace

validace

akreditace

glukosa

nejistota měření

diabetes mellitus

## **Key words**

verification

validation

accreditation

glucose

measurement uncertainty

diabetes mellitus