



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta
Ústav laboratorní diagnostiky a veřejného zdraví

Bakalářská práce

Verifikace akreditované analytické metody
stanovení triglyceridů druhé generace
na biochemickém analyzátoru Advia[®] 1800

Vypracoval: Helena Jandová
Vedoucí práce: Mgr. Eliška Rezková

České Budějovice 2016

Abstrakt

Triglyceridy patří do velké skupiny lipidů. Jsou to biologicky velmi významné látky pro lidský organismus. Z chemického hlediska se jedná o glyceroly, na které jsou esterovou vazbou navázány mastné kyseliny. Triglyceridy přijímáme potravou, a aby náš organismus triglyceridy strávil, musí být štěpeny na glycerol a mastné kyseliny, a teprve potom jsou resorbovány a transportovány ke tkáním. Stanovení triglyceridů ze séra, popř. z plazmy, je důležité především v prevenci aterosklerózy, což je nejčastější příčina kardiovaskulárního onemocnění, dále při obezitě nebo diagnostikování diabetu mellitu.

Pro zavedení metody stanovení triglyceridů druhé generace na biochemických analyzátoch Advia[®] 1800, na úseku klinické biochemie Centrálních laboratoří Nemocnice Strakonice, a.s., byla potřeba provést verifikaci dané metody. Tato verifikace se řídí požadavky ČSN EN ISO 15189 Zdravotnické laboratoře – Zvláštní požadavky na kvalitu a způsobilost, podle které jsou Centrální laboratoře Nemocnice Strakonice, a.s., akreditovány. A dále se řídí Postupem při validaci/verifikaci metody, SOPO-C-06, vypracovaného naší laboratoří. Výsledky verifikace/validace slouží pro hodnocení nejistot měření a ke stanovení návaznosti a porovnatelnosti výsledků měření. Na základě uvedeného dokumentu bylo provedeno měření triglyceridů v séru na dvou biochemických analyzátoch Advia[®] 1800. Tato měření vedla k vyhodnocení preciznosti za podmínek opakovatelnosti, preciznosti za podmínek reprodukovatelnosti a přesnosti. Preciznost za podmínek opakovatelnosti byla proměřována na dvaceti patientských vzorcích o dvou koncentračních hladinách. Pro hodnocení preciznosti za podmínek reprodukovatelnosti byly použity kontrolní materiály validované v procesu EHK, a to Liquid Assayed Multiqual 1 šarže 45651, druhou kontrolou byla Liquid Assayed Multiqual 2 šarže 45662 od výrobce BIO-RAD. Tyto referenční materiály byly proměřovány každý den v singletu po dobu dvaceti dnů. Ze změřených hodnot byly dopočítány základní statistické parametry a analytický variační koeficient. Pro vyhodnocení pravdivosti byly měřeny kontrolní materiály od firmy SEKK, s.r.o.

Na základě těchto měření byly vypočteny opět základní charakteristiky, bias a celková analytická chyba laboratoře. Srovnání této chyby s celkovou maximální chybou doporučenou firmou SEKK, s.r.o. vedlo k vyhodnocení použitelnosti metody pro dané účely.

Klíčová slova: triglyceridy, lipidy, biochemický analyzátor Advia[®] 1800, spektrofotometrie, validace, verifikace

Abstract

Triglycerides belong to a large group of lipids. They are biologically very important substances for the human body. Chemically they are glycerols which are bound by ester bonds to fatty acids. Triglycerides are feeding, and that our organism has spend triglycerides must be broken down into glycerol and fatty acids, and then they are absorbed and transported to tissues. Determination of triglycerides in serum, respectively plasma, is particularly important for the prevention of atherosclerosis which is the leading cause of cardiovascular diseases, but also to diagnose and prevent such diseases as obesity or diabetes mellitus.

To introduce method for the determination of the second-generation triglycerides via the biochemical analyzers Advia[®] 1800 to be used in the ward of clinical biochemistry of Central Laboratories of Hospital Strakonice, a. s. there was need to carry out a verification of the method. This verification is subject of the requirements of ČSN EN ISO 15189 Medical laboratories – Special requirements for quality and eligibility, according to which the Central Laboratory of Strakonice Hospital, a. s. is accredited. It is further governed by the procedures for the validation/verification methods, SOPO-C-06, drawn up by our laboratory. The results of the verification/validation are used for the evaluation of measurement uncertainties and to establish continuity and comparability of measurement results. On the basis of document mentioned above, the measurement of triglycerides in serum was conducted in two biochemical analyzers Advia[®] 1800. These measurement led to the evaluation of the precision under repeatability conditions, precisions under conditions of reproducibility and accuracy. Precision under repeatability condition was measured at twenty patients' samples in two concentration ranges. For evaluation of precisions under reproducibility conditions we used control materials validated in the EHK processes, exactly Liquid Assayed Multiquel 1 Lot 45651, the second check was with the help of Liquid Assayed Multiquel 2 Lot 45662 from the manufacturer BIO-RAD. These reference materials were measured every day in a singlet for twenty days. From the

measured values the basic statistical parameters and analytical coefficient of variation were calculated. To evaluate the truthfulness they were also measured with the help of control materials from the manufacturer SEKK, s. r. o. Based on these measurements the basic characteristics were again calculated together with bias and total laboratory analytical error. Comparison of this error with a maximum mistake recommended by the company SEKK, s. r. o. led to the evaluation of the method for the present purposes.

Keywords: triglycerides, lipids, biochemic analyzer Advia[®] 1800, spectrophotometry, validation, verification.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem 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 – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3.5.2016

.....

Helena Jandová

Poděkování

Tato bakalářská práce byla vypracována na oddělení klinické biochemie Centrálních laboratořích Nemocnice Strakonice, a. s.

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí práce Mgr. Elišce Rezkové za cenné rady, připomínky a pomoc při zpracování práce. Dále bych chtěla poděkovat za podporu a příjemné pracovní prostředí kolegům z laboratoře. V neposlední řadě děkuji svým blízkým a rodině, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

Obsah

Úvod	11
1. Teoretická část	13
1.1 Triglyceridy	13
1.1.1 Metabolismus triglyceridů	14
1.1.2 Syntéza triglyceridů	14
1.1.3 Význam TAG v organismu	15
1.1.4 Triglyceridy v séru	15
1.1.5 Preanalytická fáze a patofyziologické mechanismy ovlivňující koncentraci TAG v séru	16
1.1.6 Přímé následky zvýšené koncentrace TAG	16
1.2 Principy stanovení TAG	17
1.2.1 Spektrofotometrie	18
1.3 Biochemický analyzátor - Advia® 1800	19
1.4 Interní kontrola kvality	22
1.5 Statistické charakteristiky a analytické vlastnosti metody	23
1.5.1 Pravdivost	23
1.5.2 Bias	23
1.5.3 Přesnost	24
1.5.4 Preciznost	24
1.6 Validace a verifikace metod	24
1.6.1 Validace	25
1.6.2 Verifikace	26
2. Experimentální část	28
2.1 Chemikálie a diagnostika	28

2.2 Instrumentace	28
2.3. Použitý software	29
2.4 Interní kontrola kvality	29
2.5 Laboratorní preanalytická fáze	29
2.6 Proces analyzátoru	30
3. Výsledky	32
3.1 Advia 1.....	32
3.1.1 Preciznost za podmínek opakovatelnosti (Advia 1)	32
3.1.2 Preciznost za podmínek reprodukovatelnosti (Advia 1)	34
3.1.3 Pravdivost (Advia 1).....	35
3.2 Advia 2.....	37
3.2.1 Preciznost za podmínek opakovatelnosti (Advia 2)	37
3.2.2. Preciznost za podmínek reprodukovatelnosti (Advia 2)	38
3.2.3 Pravdivost (Advia 2).....	39
4. Diskuze.....	41
4.1 Vyhodnocení metody na rutinním analyzátoru Advia[®] 1800 (1).....	41
4.2 Vyhodnocení metody na statimovém analyzátoru Advia[®] 1800 (2)	41
5. Závěr	43
6. Literatura	44

Seznam použitých zkratk

VLDL – very low density lipoproteins (lipoproteiny o velmi nízké hustotě)

TAG – triacylglyceroly (triglyceridy)

HDL cholesterol – high density lipoprotein (vysokodenzní chol.)

LDL cholesterol – low density lipoprotein (nízkodenzní chol.)

EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid (kyselina etylendiaminotetraoctová)

VIS záření – viditelné záření

UV záření – ultrafialové záření

IR záření – infračervené záření

CCD kamera – charge-coupled device (charge-coupled zařízení)

ELISA – enzyme-linked immuno sorbent assay (enzymová imunoadsorpční analýza)

MS – mass spectroscopy (hmotnostní spektroskopie)

FDA – Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv)

IVD – in vitro diagnostic (in vitro diagnostika)

EHK – externí hodnocení kvality

VKK (IKK) – vnitřní (interní) kontrola kvality

ISE – iontově selektivní elektroda

SVP – správná výrobní praxe

CV – variační koeficient

TE – celková chyba

Úvod

V posledních letech je ve zdravotnictví kladen veliký důraz na kontrolu kvality a s tím související rozvoj nejen laboratorní techniky, ale i diagnostiky. Požadovaná akreditace zavedla nutnost standardizace práce do většiny laboratoří, tedy i do Centrálních laboratoří – klinické biochemie Nemocnice Strakonice a.s., za jejíž podpory tato bakalářská práce vznikla. Tato laboratoř je akreditovaná podle normy ISO 15189 od roku 2010.

Na základě požadavku od výrobce diagnostiky, byla potřeba zavést 2. generaci stanovení triglyceridů. Nové soupravy pro stanovení mají totiž oproti původním určité výhody, a to stabilitu kalibrace až 60 dní a tyto reagentie jsou kapalné, tedy připravené k okamžitému použití. Aby mohla být tato akreditovaná analytická metoda zavedena do provozu laboratoře, musela být nejprve na tamním biochemickém analyzátoru Advia® 1800 verifikována.

Triglyceridy patří do velké skupiny lipidů, které jsou pro lidský, a nejen lidský, organismus nezbytnou součástí.¹ Jsou to biologicky velmi významné látky, které mohou být rostlinného, živočišného i mikrobiálního původu. Z hlediska výživy jsou nejdůležitější z této skupiny právě triglyceridy. Dále pak cholesterol, fosfolipidy a v menším množství další lipidy.²

Lipidy slouží hlavně jako zdroj a zásobárna energie, proto by měly být součástí našeho jídelníčku. Navíc obsahují esenciální mastné kyseliny, které jsou pro náš organismus nepostradatelné. Dále je organismus využívá jako tepelný izolátor a mechanickou ochranu některých orgánů a, co je také důležité, jsou součástí buněčných membrán a nervových tkání.^{3,4}

Zvýšené hladiny lipidů, resp. cholesterolu a triglyceridů jsou však pro organismus škodlivé. Důležitost jejich stanovení zakládá fakt, že jsou tyto látky rizikovými faktory rozvoje aterosklerózy, což je nejčastější příčina kardiovaskulárního onemocnění, které je v naší republice jednou z nejčastějších příčin morbidity obyvatelstva.

Cíle této práce jsou shrnuty v následujících bodech:

- Vysvětlení pojmů validace/verifikace analytických metod a jejich význam v klinické laboratoři
- Samotné provedení verifikace analytické metody stanovení triglyceridů druhé generace na statimovém a rutinním biochemickém analyzátoru Advia® 1800
- Zpracování a vyhodnocení výsledků, ověření reprodukovatelnosti, stanovení analytické chyby, pravdivosti a celkové chyby stanovení

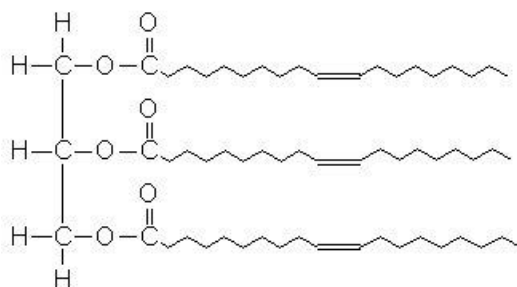
1. Teoretická část

1.1 Triglyceridy

Zcela obecně lze o lipidech říci, že jsou to deriváty mastných kyselin jednosytného nebo trojsytného alkoholu. Vyskytují se ve formě jednoduchých nebo složitých molekul, které mohou obsahovat i nelipidovou část.

Nejrozšířenější skupinou lipidů obsahujících glycerol jsou triglyceridy (TAG) patřící do skupiny neutrálních tuků. Jsou to nepolární molekuly mající hydrofobní charakter, to znamená, že se nerozpouští ve vodě, ale dobře se mísí s nepolárními rozpouštědly.^{5,6} Z chemického hlediska jsou to glyceridy, kdy jsou na glycerol navázány esterovou vazbou tři mastné kyseliny.⁷ Tyto mastné kyseliny mohou být stejné, nebo rozdílné. I délka řetězce může být různá, nejčastěji však s 16, 18, nebo 20 atomy uhlíku. Příklad triglyceridu je znázorněn na Obr. 1.

Na esterové vazby působí enzym pankreatická lipáza, vazby jsou hydrolyzovány a mastné kyseliny uvolněny. Jako monoglyceridy nebo diglyceridy jsou již pro organismus vstřebatelné.⁸



Obr. 1 Příklad triglyceridu
(převzato z ⁹)

1.1.1 Metabolismus triglyceridů

Metabolismus zahrnuje anabolické i katabolické procesy.

Trávení – Trávení je zahájeno již v ústech, i když pouze v malé míře, a to slinnou lipázou, pokračuje v žaludku žaludeční lipázou, většina triglyceridů je však trávena v duodenu. Tady působí pankreatická lipáza.¹⁰ Pankreatická lipáza štěpí triglyceridy na mastné kyseliny a monoacylglycerol.

Vstřebávání – Monoacylglyceroly, mastné kyseliny, popř. i cholesterol postupují do buněk sliznice (difúzně). Mastné kyseliny se tady „dělí“ na 2 skupiny – na mastné kyseliny, které obsahují méně než 10-12 atomů uhlíku přecházející přímo do krve a jsou přenášeny navázané na albumin k ostatním tkáním přímo, a na mastné kyseliny, které obsahují více než 10-12 atomů uhlíku, ty jsou opět esterifikovány na triglyceridy.¹¹ Tomuto nově vzniklému triglyceridu obalenému proteiny a dalšími látkami (cholesterol, fosfolipidy apod.) říkáme chylomikrony, díky nimž mají umožněn vstup do krve.¹⁰

1.1.2 Syntéza triglyceridů

Endogenní triglyceridy vznikají převážně v játrech a tukové tkáni. Tady probíhá syntéza cestou glycerol-fosfátu. V enterocytech jsou syntetizovány cestou monoacylglycerolů, které organismus získává štěpením z potravy.⁸

Pro endogenní syntézu triglyceridů jsou zdrojem mastné kyseliny v krvi nebo mastné kyseliny syntetizované z glukózy v hepatocytech. Takto vzniklé triglyceridy se zabudují do VLDL (z angl. „very low density lipoprotein“), a tak jsou transportovány opět krví ke tkáním.

Exogenní triglyceridy organismus přijímá potravou. Jsou štěpeny v tenkém střevě na mastné kyseliny a monoacylglycerol, dále jsou absorbovány a opět resyntetizovány na triacylglyceroly. Ty se poté stávají součástí chylomiker a jsou transportovány krví do tkání.¹²

Z potravy organismus takto vstřebá přes 90 % triglyceridů, což je v průměru 80-170 mmol den⁻¹.¹³

1.1.3 Význam TAG v organismu

Triglyceridy tvoří většinu tuků v potravě. Ty, které obsahují pouze nasycené mastné kyseliny, jsou především v živočišných produktech, jako je maso, žloutky, mléčné produkty apod. TAG obsahující i nenasycené mastné kyseliny s různým počtem dvojných vazeb jsou zejména v rostlinných produktech.¹¹

Jejich hlavním významem je zdroj energie. Jsou jedním ze základních energetických látek. Člověk s normální vahou má asi 15 kg TAG (u mužů cca 20 % hmotnosti těla, u žen cca 25 %).⁴ Z triglyceridů je metabolicky produkováno více energie než při metabolismu cukrů a proteinů.¹¹

Dalším úkolem této skupiny lipidů je řízení tělesné teploty. Tuková tkáň v podkoží totiž slouží jako tepelná izolace proti ztrátám tepla.

A neméně významná úloha triglyceridů je strukturální. Tuková tkáň udržuje orgány dutiny břišní a nitrohruďní ve správné poloze. Tuk je též hlavní strukturální součástí prsu.^{4,8}

1.1.4 Triglyceridy v séru

Po rozštěpení v tenkém střevě působením enzymu pankreatická lipáza na esterové vazby se glycerol a mastné kyseliny dostávají do krevního oběhu. Tady jsou opět re-syntetizovány na TAG. V krvi jsou transportovány ve formě lipoproteinů, nejvíce triglyceridů je obsaženo v chylomikrech a VLDL částicích.

Koncentrace triglyceridů v séru je daná vzájemnou interakcí mezi syntézou triglyceridů, resorpcí triglyceridů v tenkém střevě a aktivitou intravaskulárního metabolismu.⁵ Základem vydávání optimálních hodnot je společný postoj odborných společností a jejich doporučení bývají vydávána formou „guidelines“. Z doporučení vyplývá, že je optimální hodnota TAG u zdravého člověka pod 1,5 mmol l⁻¹.¹⁴

1.1.5 Preanalytická fáze a patofyziologické mechanismy ovlivňující koncentraci TAG v séru

Preanalytická fáze je souhrn činností od indikace vyšetření až po samotnou analýzu, tedy vložení vzorku do analyzátoru, popř. začátku manuální metody. Preanalytická fáze má 2 části. Mimolaboratorní, která zahrnuje přípravu pacienta k odběru, samotný odběr vzorku a jeho uchování a transport do laboratoře.¹⁵

Fyziologicky koncentrace TAG stoupá v postprandiálním stavu, proto je nutné provádět stanovení za standardních podmínek. Před odběrem krve je tedy důležité 12ti hodinové lačnění, kdy se nesmí večer před odběrem jíst maso, pít mléko, kouřit a pít alkohol.^{5,12}

V případě stanovení ze séra se patientský vzorek odebírá do zkumavky bez antikoagulační přísady. Odběrový systém s přidavkem EDTA nebo heparinu lithného bývá použit v případě stanovení z plazmy.

Druhou částí je fáze laboratorní.¹⁶ Tato část je zahájena příjmem vzorku a končí zahájením analýzy.

1.1.6 Přímé následky zvýšené koncentrace TAG

Koncentrace triglyceridů je stanovována především k diagnostikování kardiovaskulárních onemocnění. Vysoká koncentrace TAG je označována jako hypertriacylglycerolémie. Ta je výsledkem nadprodukce triglyceridů, nadprodukce lipoproteinů, jako jsou chylomikron nebo VLDL obsahující triglyceridy nebo slabá aktivita enzymů, které katalyzují lipoproteiny obsahující triglyceridy, tedy zmiňované chylomikrony nebo VLDL.^{8,10}

Množství triglyceridů stoupá následkem zvýšeného příjmu cukrů a bílé mouky, fyzickou nečinností, kouřením, nadměrným příjmem alkoholu a nadváhou. Rovněž fyziologicky stoupá hladina triglyceridů v těhotenství.^{5,12}

Je-li koncentrace TAG vyšší než $1,5 \text{ mmol l}^{-1}$ nalačno, předznamenává to výskyt malých denzních LDL částic, což znamená zvýšené riziko kardiovaskulárních onemocnění.¹⁷ Zvýšená hladina TAG je dále spojována s výskytem diabetu mellitu.

Tzv. aterogenní triáda, tj. vyšší koncentrace triglyceridů, nižší koncentrace HDL cholesterolu a vyšší koncentrace cholesterolu, je typická právě pro diabetiky a pacienty s metabolickým syndromem.^{18,19}

Pokud se koncentrace TAG v krvi pohybuje nalačno přes 11 mmol l⁻¹, zvyšuje se riziko vzniku akutní pankreatitidy.^{20,21} Hyperchylomikronémie způsobuje často bolesti břicha. Předpokládá se, že hyperchylomikronémie má za následek zpomalenou cirkulaci přes pankreat. Chylomikrony jsou rozkládány pankreatickou lipázou, mastné kyseliny jsou uvolněné a způsobují lokální zánět.¹⁸

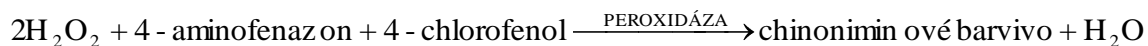
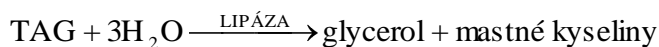
Nízká nebo snížená koncentrace triglyceridů nemá příliš velký klinický význam.

1.2 Principy stanovení TAG

Triglyceridy jsou nejčastěji stanovovány enzymaticky. Další možností je stanovení chemickými metodami, ale toho se dnes již v praxi nevyužívá.

Při enzymatickém stanovení jsou TAG štěpeny na glycerol a volné mastné kyseliny pomocí enzymu lipáza. Glycerol dále reaguje s glycerolkinázou, vzniká glycerol-3-fosfát a následuje konverze pomocí glycerol-3-fosfát-oxidázy na peroxid vodíku. Peroxid vodíku, 4-aminofenazon a 4-chlorofenol katalyzuje peroxidázou a vzniká barevný komplex.^{4,22}

Rovnice enzymového štěpení:



Při stanovení může docházet k interferencím, a to tehdy, pokud jsou kyselina askorbová a bilirubin v koncentraci nad $340 \mu\text{mol l}^{-1}$. Mohou tak falešně snížit koncentraci triacylglycerolů (reagují s H_2O_2).¹²

1.2.1 Spektrofotometrie

Absorpční spektrofotometrie je optická metoda založená na interakci světelného záření s analyzovaným vzorkem při určité vlnové délce. Tato metoda slouží ke kvantitativnímu stanovení koncentrace látek v analyzovaném vzorku.

Stanovení probíhá na tzv. spektrofotometru na základě pohlcení světla různých vlnových délek, a pokud měření probíhá jen při jedné vlnové délce, mluvíme o metodě zvané fotometrie.²³

U spektrofotometrických měření je sledována intenzita zeslabeného monochromatického záření při průchodu zkoumanou látkou ve vodném roztoku, tzv. absorpčním prostředí, kdy intenzita záření klesá exponenciálně v závislosti na koncentraci analytu a délce vrstvy absorbující látky.²⁴

Vztah mezi koncentrací analytu v roztoku a její absorpční je dán Lambert – Beerovým zákonem, jehož nejčastější matematické znázornění je uvedeno níže.

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

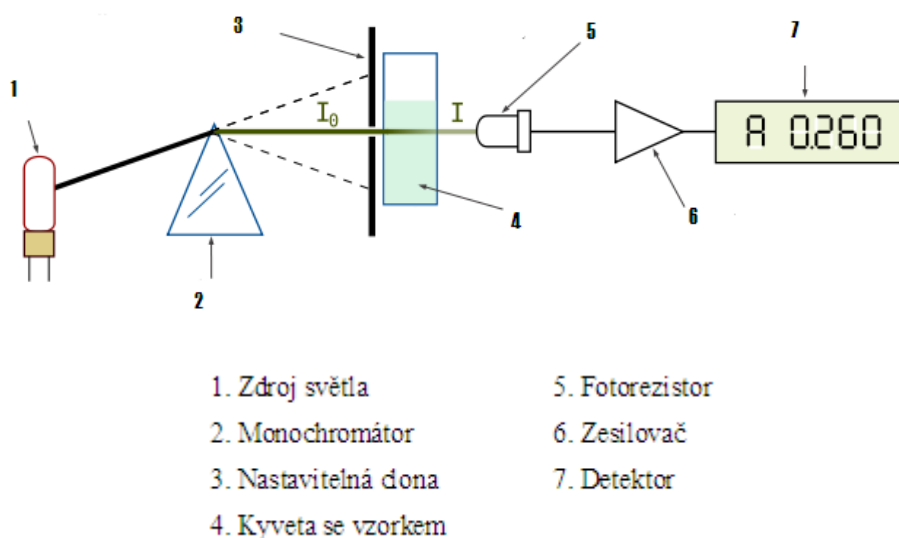
A je absorbance v nm, ε je molární dekadický extinkční koeficient v $\text{l mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, l je tloušťka kyvety v cm a c je koncentrace absorbující látky (analytu) v mol l^{-1} .

Z toho vyplývá, že je absorbance přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku a tloušťce kyvety.^{13,20,25}

Jako zdroj záření pro viditelnou oblast slouží wolframová žárovka nebo halogenová lampa, pro UV záření se používá deuteriová lampa.²⁴ K usměrnění paprsků světla slouží čočky a zrcadla, a paprsek dopadá na monochromátor. To je zařízení, které propouští jen světlo určité vlnové délky. Pro VIS se používá nejčastěji hranol ze skla, pro UV oblast hranol z křemenného skla, ale může se použít i optická mřížka.²⁶ Mřížka má stejnou rozlišovací schopnost pro všechny vlnové délky.²⁴ Monochromatické záření tak

vstupuje do prostoru, kde je uložena kyveta se vzorkem. Pro VIS oblast se používají skleněné kyvety, pro UV oblast křemenné kyvety, pro IR solné kyvety.²⁷ Vzorkem v kyvetě projde paprsek, některé fotony jsou pohlceny, ale ty které ze vzorku vychází, jsou zachyceny detektorem, který je umístěn za kyvetovým prostorem. Detektorem může být CCD kamera nebo fotodioda.²⁸ Detektor změřená data posílá dál do výstupního zařízení, dnes do počítače se speciálním softwarem na analýzu dat.

Základní schéma spektrofotometru je znázorněno na následujícím Obr. 2.



Obr. 2 Schéma spektrofotometru
(převzato z²⁸)

1.3 Biochemický analyzátor - Advia[®] 1800

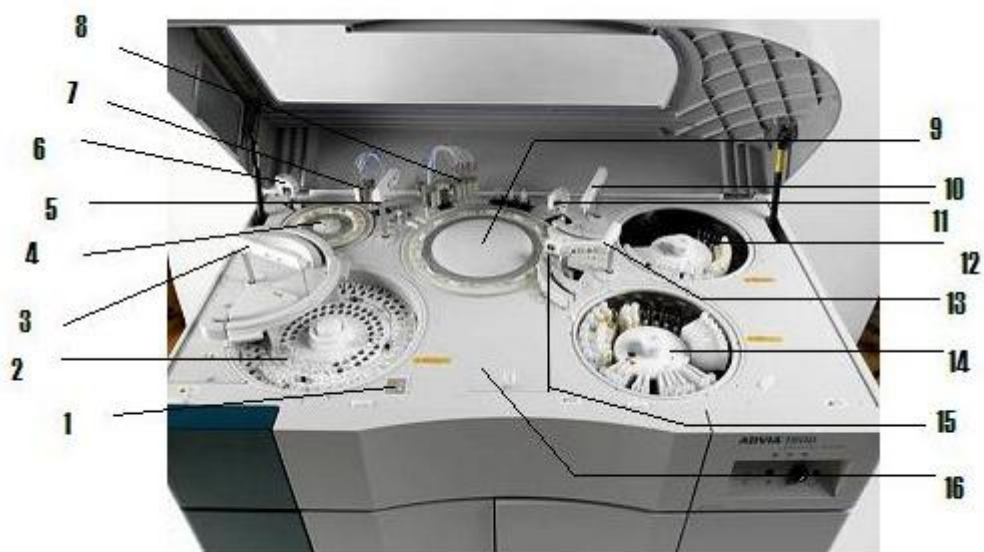
Advia[®] 1800 od společnosti Siemens je plně automatizovaný biochemický analyzátor znázorněný na Obr. 3, 4 a 5. Je určen pro diagnostické použití in vitro. Tento analyzátor měří na základě absorpční spektrofotometrie, fluorescenční polarizace, turbidimetrie nebo na principu potenciometrického měření iontově selektivními elektrodami (ISE). Je možno analyzovat vzorky z lidského séra, plazmy, moče nebo

likvoru. Kapacita analyzátoru je 1200 fotometrických testů a 600 ISE testů za hodinu. Pro stanovení různých analytů v analyzátoru lze současně analyzovat až 52 metod. Jako zdroj záření je použita halogenová lampa o výkonu 50 W, která má vodní chlazení. Analyzátor dokáže měřit až na 14 různých vlnových délkách i bichromaticky. Je zde instalována konkávní difrakční mřížka s diodovým polem.

Měření absorbance probíhá v plastových kyvetách o tloušťce 1 cm, které jsou umístěny v reakčním kole a jsou vyhřívány olejovou lázní na $37\text{ °C} \pm 0,1\text{ °C}$. Do těchto kyvet je pipetováno 2 – 30 μl vyšetřovacího objemu biologického materiálu. Pipetovací jehla je opatřena detektorem pro sraženiny a detektorem pro kontrolu hladiny kapaliny.²⁹ Objem reagensů, který se do kyvet také pipetuje, se pohybuje v rozmezí 80 – 120 μl . Každých 6 sekund je v těchto kyvetách změřena absorbance. V závislosti na typu metody bývá průměrná doba prvního výsledku 10 – 15 min.²⁹ Po dokončení analýzy jsou reakční disky s kyvetami promyty mycí stanicí. Je tak umožněno další použití bez rizika kontaminace.³⁰

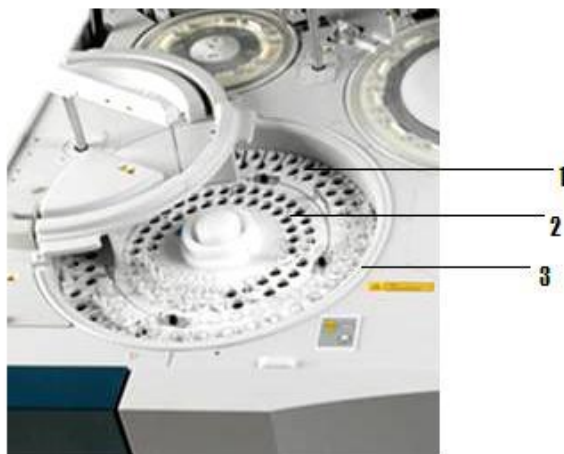


Obr. 3 Biochemický analyzátor Advia[®] 1800
(převzato z³¹)



- | | |
|--------------------------------------|--------------------------|
| 1. Tlačítko rotace a pauzy vzorku | 9. Reakční disk |
| 2. Vzorkový disk | 10. Reagenční pipetor 2 |
| 3. Pipetovací jehla na ředění vzorků | 11. Reagenční míchadlo 2 |
| 4. Disk ředících čidel | 12. Reagenční disk 2 |
| 5. Vzorkový pipetor | 13. Reagenční jehla 1 |
| 6. Ředící míchadlo | 14. Reagenční disk 1 |
| 7. Ředící promývačka | 15. Reagenční míchadlo 1 |
| 8. Promývačka reakčního disku | 16. Spektrofotometr |

Obr. 4 Pohled shora na biochemický analyzátor Advia[®] 1800 s popisem
(převzato z ³²)



1. Vnější vzorkový disk na vzorky
2. Vnitřní disk na kalibrátory a kontroly
3. Čtečka čárového kódu

Obr. 5 Advia[®] 1800 – pohled na vzorkový disk
(převzato z³²)

1.4 Interní kontrola kvality

System daný v klinické laboratoři, který zabezpečuje spolehlivost laboratorních výsledků a má detekovat a minimalizovat analytické chyby, a tak zajistit bezpečí pacientů, je tzv. interní (vnitřní) kontrola kvality. V praxi to znamená, že laboratoř provádí analýzu kontrolních vzorků s různými hodnotami, obsahem nebo koncentrací analytů před každou sérií patientských vzorků a výsledky jsou porovnávány s očekávanými hodnotami.^{33,34}

Součástí interní kontroly kvality je kalibrace, což je proces, kdy je hledán vztah mezi měřeným signálem a měřenou jednotkou (př. mezi absorbancí a koncentrací látky v roztoku). Pro každý test, kde se vyhodnocuje koncentrace nebo aktivita, je potřeba

sestaví kalibrační křivku. Jsou používány tzv. standardy se známou koncentrací analytu.^{35,36} Tyto sety se využívají pro lineární kalibraci jak jednobodovou, tak i vícebodovou.

1.5 Statistické charakteristiky a analytické vlastnosti metody

K prvotnímu zpracování analytických dat patří výpočet základních charakteristik, které lze rozdělit do tří skupin. V první jsou veličiny určující úroveň čili polohu statistického znaku, tzv. střední hodnoty. Ve druhé pak jsou míry jejich rozptýlenosti nebo-li variability, tzv. míry rozptýlenosti. Každá analytická metoda má určitou variabilitu, která je dána analytickou, neanalytickou a intraindividuální biologickou variabilitou (biologické vlivy a jejich časové působení u biologického jedince). Všechny variability mají normální Gaussovo rozdělení.³⁷ Charakteristiky patřící do třetí skupiny jsou nejméně používané, jsou to tzv. míry koncentrace.

Mezi základní statistické charakteristiky, které se nejčastěji používají, patří aritmetický průměr, směrodatná odchylka a variační koeficient.

Každá metoda má analytické vlastnosti, mezi které je zahrnuta např. pravdivost metody, vychýlení, přesnost a preciznost metody, na jejichž základě lze danou metodu označit jako validovanou příp. verifikovanou.

1.5.1 Pravdivost

Tato vlastnost je definována jako těsnost souhlasu mezi průměrnou hodnotou získanou z velkého počtu výsledků měření a danou referenční hodnotou. Mírou pravdivosti je vychýlení – bias.³⁸

1.5.2 Bias

Bias neboli vychýlení představuje rozdíl mezi průměrem získaným z velkého počtu měření a referenční hodnotou. Na základě této hodnoty lze odhadnout systematické

chyby měření. Nesprávnost měření lze vyjádřit jako chybu absolutní, bias ($X - X_0$) nebo chybu relativní, která se vztahuje ke správné hodnotě.³⁸ Vztah je znázorněn níže.

$$B = \frac{X - X_0}{X_0} \cdot 100$$

Kde X_0 je hodnota referenčního (kontrolního) materiálu a X je známá hodnota složky.

1.5.3 Přesnost

Přesnost je definována jako míra shody mezi výsledky získanými opakovanou analýzou téhož vzorku za předem specifikovaných podmínek³⁸ Počet těchto opakování musí být dostatečný, aby bylo možné statistické hodnocení, za dostatečné je považováno 20 a více analýz.³⁸

1.5.4 Preciznost

Těsnost shody mezi naměřenou hodnotou veličiny a správnou (vztaženou) hodnotou měřené veličiny získanými opakovanými měřeními stejného souboru nebo na podobných souborech za specifikovaných podmínek.³⁸

1.6 Validace a verifikace metod

V laboratorní medicíně má validace, respektive verifikace značný význam. Výsledky měření jsou efektivním nástrojem diagnostiky, terapie i prevence.

Validace metod je vyžadována normami řízení kvality (ISO 15025, ISO 15189).^{39,40,41,42}

V praxi mají výsledky velmi silný dopad. V klinické laboratoři mají rozhodný vliv, někdy i fatální, na zdraví a kvalitu života pacienta.

Mimo to používání validovaných resp. verifikovaných měření vyžaduje akreditace (akreditace = úřední potvrzení kompetence laboratoře).^{39,43}

1.6.1 Validace

Validace je proces nezbytný k tomu, aby bylo prokázáno, že je analytická metoda vhodná k danému účelu používání a tím budou nabízeny přesné a reprodukovatelné výsledky. Proto je validace klíčovým krokem v biochemické analýze (a nejen tam), je zásadní pro laboratoře, aby byla dodržována správná výrobní praxe (SVP), správná laboratorní praxe a mezinárodní předpisy ISO 17025 a ISO 15189. Důkaz o správnosti validace je získán kombinací laboratorních údajů pomocí experimentů a externích údajů z dokumentů od výrobce nebo odborných publikací.^{39,43}

Validace je tedy proces prokazující spolehlivost metody pro stanovení analytu ve vzorku. Pro různé metody je vyžadována různá hloubka a různý rozsah validace. O tom rozhoduje management laboratoře.^{38,44,45} Proces validace se podle obsáhlosti rozděluje na 3 typy validace, a to plnou, částečnou a cross-validaci (křížovou).⁴⁶

Je-li proces aplikován poprvé (validace probíhá poprvé) nebo je zaváděno stanovení nového analytu, je povinná plná validace. Plná validace by měla zahrnovat všechny parametry (selektivitu, kalibrační křivky, přesnost, reprodukovatelnost apod.).⁴⁷

Jsou-li provedené pouze menší změny jako např. převedení metody z laboratoře do laboratoře, změna v rozsahu, změna při zpracování vzorku apod., stačí k ověření pouze částečná validace.⁴⁸

Posledním typem je cross-validace, resp. křížová. Jde o porovnání parametrů validace dvou nebo více různých analytických postupů. Srovnávat lze buď různé analytické metody (př. ELISA vs. MS) anebo stejné metody mezi laboratořemi. Výsledky se nesmí lišit o více jak 15 %.⁴⁹

Analytická metoda je validovaná tehdy, pokud se výsledky měření nacházejí uvnitř požadovaného intervalu nejistoty.

Validaci mohou provádět výrobci diagnostik. Na trh musí být uváděny pouze validované měřicí systémy. Postup a rozsah je dán normou EN 13612:2002.^{39,50}

Další možností, kdo validaci provádí, je profesionální organizace analytiků (organizace AOAC). Cílem této organizace je přispět k celosvětové důvěryhodnosti

analytických výsledků. Spolupracuje s organizací FDA, čímž svým způsobem zasahuje i do oboru laboratorní medicíny.^{39,46}

Poslední institucí provádějící validaci je samotná laboratoř. Ta nakonec nese odpovědnost za adekvátní validaci.³⁹

1.6.2 Verifikace

Tento proces ověření poskytuje důkaz o tom, že jsou dosaženy funkční vlastnosti, ale i zákonné požadavky na měřicí systém a potvrzení objektivními důkazy, že data deklarovaná výrobcem nebo referenční institucí jsou v dané laboratoři s použitím měřicího systému dosažena. V podstatě jde o zkrácenou validaci. Proces verifikace je nutný před uvedením do provozu laboratoře.^{38,44}

Analytická metoda má být verifikována v pravidelných intervalech.⁴³ Je doporučováno 1 krát ročně. Dále musí být verifikace provedena také při zásadní inovaci téhož výrobku IVD nebo opakují-li se neshody konkrétního vyšetření (neúspěch v EHK, popř. VKK, stížnosti lékařů nebo pacientů apod.)

Obsah a rozsah verifikace je dán managementem laboratoře stejně, jako u validace. Vždy je brán ohled na důvod provádění verifikace a specifika konkrétního vyšetření.^{51,52}

Verifikace a její průběh musí být samozřejmě dokumentovány stejně jako u validace metody.

Rozdíl mezi validací a verifikací je uveden v přehledné Tab. 1

Tab. 1 *Výkonnostní parametry validace a verifikace analytického postupu*
 (převzato z ⁴³)

Validace	Verifikace
<ul style="list-style-type: none"> • opakovatelnost • mezilehlá preciznost • vychýlení (bias) • pracovní rozsah • mez detekce a mez stavitelnosti • ostatní (matricové interference, srovnání s jinou metodou, srovnání pomocí výsledků EHK, robustnost, výtěžnost...) 	<ul style="list-style-type: none"> • opakovatelnost • mezilehlá preciznost • vychýlení (bias) • pracovní rozsah

2. Experimentální část

Na úseku klinické biochemie Centrálních laboratoří Nemocnice Strakonice, a.s. akreditovaných podle ČSN EN ISO 15 189:2007, se řídí proces verifikace/validace při pořízení a před aplikací nového analytického měřicího systému do laboratoře podle SOPO-C-06 Postup při validaci/verifikaci metody. Tento postup je vypracován manažerem kvality.^{40,53,54}

2.1 Chemikálie a diagnostika

- Fyziologický roztok (Baxter Czech spol. s. r. o.)
- Promývací roztok (BIOVENDOR – Laboratorní medicína, a.s.)
- Kyvetový kondicionér (BIOVENDOR – Laboratorní medicína, a.s.)
- Lamp coolant additive (Siemens, spol. s. r. o.)
- Reagent wash probe 1 (Siemens, spol. s. r. o.)
- Reagent wash probe 2 (Siemens, spol. s. r. o.)
- Reagent wash probe 3 (Siemens, spol. s. r. o.)
- Chemistry calibrator (Siemens, spol. s. r. o.), šarže 335823B
- Liquid Assayed Multiqual 1, 2, 3 (BIO-RAD, spol. s. r. o.), šarže 45651, 45662
- ADVIA Chemistry Triglycerides_2 (Siemens, spol. s. r. o.)
- ADVIA Chemistry Triglycerides_2 concentrated (Siemens, spol. s. r. o.)

2.2 Instrumentace

- Biochemický analyzátor Advia[®] 1800 (rutinní, statimový), Siemens, Japonsko
- VersaCell (SMS) systém na zpracování vzorků, Siemens, USA
- Digitální centrifuga Eppendorf 5702, Medesa spol s. r. o., ČR
- RO stanice Resto 25 přístroj na výrobu deonizované vody, Resto spol. s.r.o., ČR

- Laboratorní vybavení běžně používané (reakční zkumavky, pipety, špičky, laboratorní sklo)

2.3. Použitý software

- Ovládací software k analyzátorům Advia[®] 1800
- Microsoft Office Excel 2010
- Statistický software MedCalc

2.4 Interní kontrola kvality

Pro naše účely byl ke kontrole kvality triglyceridů v séru využit jako kalibrační set Chemistry Calibrator společnosti Siemens, spol. s. r. o. Jako kontrolní materiál byly použity kontroly Liquid Assayed Multiqual 1, 2, 3, společnosti BIO-RAD, spol. s. r. o.

Po splnění podmínek IKK byl analyzátor připraven k analýze biologického materiálu, který mezitím procházel laboratorní preanalytickou fází.

2.5 Laboratorní preanalytická fáze

Pro verifikaci nové metody byl mimo jiné použit soubor patientských vzorků.

Před vlastní analýzou biologického materiálu byly vzorky nejprve zcentrifugovány (odstředěny), jelikož bylo vyžadováno sérum. Pro naše účely se vzorky centrifugovaly 10 min při 2500 g. Až poté byly jednotlivé zkumavky s odděleným sérem vloženy do analyzátoru a byla zahájena analýza.


2.6 Proces analyzátoru

Samotná měření preciznosti za podmínek opakovatelnosti, preciznosti za podmínek reprodukovatelnosti a pravdivosti pro účel verifikace byla provedena fotometricky na statimovém a rutinním biochemickém analyzátoru Advia[®] 1800 společnosti Siemens, spol. s r. o.

Vzorky byly umístovány do vzorkového disku na příslušnou pozici vnějšího kruhu. Do vzorkového disku, ale vnitřního kruhu, se vkládali i kontroly a kalibrátory. Toto platí pro statimový analyzátor. Při měření na rutinním analyzátoru je využíváno tzv. Versacell (SMS).

Ve chvíli, kdy se vzorek napipetoval do kyvety a smíchal s reagensy, začal probíhat sled reakcí, které jsou již popsány v kapitole 1.2. Absorbance vzniklého komplexu byla následně měřena fotometrem při vlnové délce 505/694 nm.

Všechna měření byla zaznamenána a zanesena do formuláře F-C-32 vypracovaného naší akreditovanou laboratoří. Jeho náležitosti jsou zobrazeny na Obr. 6.

	Centrální laboratoře Nemocnice Strakonice, a.s.	
	Název: F-C-32 Verifikace metody	

Cíl validace	
Metoda a vymezení aplikace validované metody	
Název diag. soupravy	
Výrobce	
Kat.č.	
Princip stanovení	
Specifikace vzorků	
Analytický systém použitý k validaci:	
Název, typ	
Výrobce	
Rok výroby	
Kalibrační materiál použitý pro kalibraci:	
Název	
Výrobce	
Kat.číslo, šarže	
Kontrolní materiály, používané při měření výkonnostních parametrů	
Název	
Výrobce	
Kat.č., šarže	
Název	
Výrobce	
Kat.č., šarže	
Název	
Výrobce	
Kat.č., šarže	
Jiné důležité údaje	

Obr. 6 Úvodní list formuláře F-C-32 Verifikace metody
(převzato z ⁵⁵)

3. Výsledky

Změřené hodnoty byly zpracovány pomocí programu Microsoft Office Excel 2010. Zde se vytvořili uvedené tabulky a vypočítali potřebné statistické charakteristiky (aritmetický průměr, směrodatná odchylka, variační koeficienty, bias).

Jelikož se metoda stanovení triglyceridů druhé generace zaváděla na dvou biochemických analyzátoch Advia[®] 1800, byly pro tento účel označeny jako Advia 1 (rutinní) a Advia 2 (statimový analyzátor). Výsledky se hodnotily pro každý analyzátor zvlášť.

3.1 Advia 1

Variační koeficienty opakovatelnosti CV_O a reprodukovatelnosti CV_R jsou kombinované koeficienty variace různých hladin opakovatelnosti a reprodukovatelnosti. Kombinovaný koeficient opakovatelnosti byl vypočten z obou měřených hladin vzorků opakovatelnosti. Použitý vzorec je uvedený níže.

$$CV_{O(R)} = \sqrt{\frac{CV_1^2 + CV_2^2}{2}}$$

3.1.1 Preciznost za podmínek opakovatelnosti (Advia 1)

K měření opakovatelnosti byly použity patientské vzorky nesrážlivé krve směrodatné pro rozhodování lékaře pohybující se v normálních a vysokých fyziologických hodnotách (Tab. 2). Tyto vzorky byly proměřeny 20 krát za sebou v jedné sérii.

Tab. 2 Opakovatelnost pro Advii 1

Opakovatelnost		
Číslo měření	Vzorek 1	Vzorek 2
1.	1,40	5,13
2.	1,39	5,11
3.	1,39	5,06
4.	1,39	5,10
5.	1,40	5,14
6.	1,39	5,15
7.	1,40	5,09
8.	1,39	5,09
9.	1,41	5,11
10.	1,41	5,18
11.	1,39	5,10
12.	1,40	5,12
13.	1,41	5,15
14.	1,39	5,17
15.	1,40	5,17
16.	1,38	5,14
17.	1,40	5,12
18.	1,43	5,10
19.	1,41	5,12
20.	1,43	5,12
Průměr	1,40	5,12
SD	0,01	0,03
CV %	0,94	0,60
CV ₀ %	0,79	

3.1.2 Preciznost za podmínek reprodukovatelnosti (Advia 1)

Pro měření reprodukovatelnosti se použily kontrolní materiály z IKK o dvou různých hladinách v oblasti směrodatných pro rozhodování lékařů (Tab. 3). Jako první kontrola se používala Liquid Assayed Multiqua 1 šarže 45651, druhou kontrolou byla Liquid Assayed Multiqua 2 šarže 45662, obojí od firmy BIO-RAD. V průběhu 20 dnů se vždy změřily oba referenční materiály.

Tab. 3 Mezilehlá preciznost pro Advia 1

Mezilehlá preciznost		
Den	Kontrolní materiál 1	Kontrolní materiál 2
1.	1,05	1,47
2.	1,03	1,48
3.	1,05	1,46
4.	1,06	1,50
5.	1,02	1,48
6.	1,05	1,46
7.	1,05	1,45
8.	1,04	1,47
9.	1,06	1,45
10.	1,05	1,45
11.	1,05	1,47
12.	1,04	1,49
13.	1,04	1,49
14.	1,06	1,47
15.	1,03	1,46
16.	1,05	1,48
17.	1,04	1,48
18.	1,04	1,45
19.	1,05	1,45
20.	1,05	1,46
Průměr	1,05	1,47
SD	0,01	0,02
CV %	1,00	1,04
CV_{MP} %	1,02	

Analytický variační koeficient CV_A se vypočetl z kombinovaného koeficientu variace opakovatelnosti a kombinovaného koeficientu variace reprodukovatelnosti.

$$CV_A = \sqrt{CV_O^2 + CV_{MP}^2}$$

$$CV_A = 1,29 \%$$

3.1.3 Pravdivost (Advia 1)

K měření pravdivosti byl použit referenční materiál měřený za podmínek opakovatelnosti (Tab. 4). Pro potřebu tohoto měření nám posloužil kontrolní materiál používaný při měření výkonnostních parametrů SEKK Analyty krevního séra, AKS 3752 a AKS 3754.

Pro oba referenční materiály byl vypočten aritmetický průměr, směrodatná odchylka, variační koeficient a z toho byl následně vypočten bias.

Tab. 4 *Pravdivost pro Advii 1*

Pravdivost		
Č. měření	Hodnota signálu ref. mat. č. 1	Hodnota signálu ref. mat. č. 2
1.	1,06	2,27
2.	1,06	2,46
3.	1,05	2,27
4.	1,17	2,28
5.	1,07	2,27
6.	1,08	2,28
7.	1,07	2,29
8.	1,07	2,28
9.	1,07	2,28
10.	1,06	2,28
Průměr	1,08	2,30
Cíl.hodnota	0,97	2,22
SD	0,03	0,06
CV %	3,17	2,52
BIAS	11,16	3,66

Bias analytický b_A byl vypočten následujícím vztahem.

$$b_A = \frac{\sqrt{b_1^2 + b_2^2}}{2}$$

$$b_A = \mathbf{8,30 \%}$$

Pro stanovení celkové chyby TE_{lab} byl použit níže uvedený výpočet.

$$TE_{lab} = b_A + 2CV_A$$

$$TE_{lab} = \mathbf{10,88 \%}$$

Přehled získaných dat pro hodnocení metody stanovení TAG na Advii 1 uvádí Tab. 5.

Tab. 5 *Přehled hodnot důležitých k hodnocení metody na Advii 1*

Výsledné hodnoty v %	
CV_A	1,29
b_A	8,30
TE_{lab}	10,88

3.2 Advia 2

3.2.1 Preciznost za podmínek opakovatelnosti (Advia 2)

Tab. 6 *Opakovatelnost pro Advii 2*

Opakovatelnost		
Číslo měření	Vzorek 1	Vzorek 2
1.	0,98	2,70
2.	0,95	2,71
3.	0,98	2,72
4.	0,97	2,73
5.	0,98	2,70
6.	0,95	2,70
7.	0,97	2,73
8.	0,96	2,73
9.	0,97	2,72
10.	0,99	2,72
11.	0,97	2,73
12.	0,97	2,75
13.	0,99	2,73
14.	0,97	2,74
15.	0,99	2,72
16.	0,99	2,75
17.	0,98	2,72
18.	0,98	2,71
19.	0,97	2,71
20.	0,96	2,74
Průměr	0,97	2,72
SD	0,01	0,02
CV %	1,26	0,56
CV ₀ %	0,97	

3.2.2. Preciznost za podmínek reprodukovatelnosti (Advia 2)

Tab. 7 Mezilehlá preciznost pro Advii 2

Mezilehlá preciznost		
Den	Kontrolní materiál 1	Kontrolní materiál 2
1.	1,03	1,43
2.	1,04	1,42
3.	1,02	1,41
4.	1,05	1,44
5.	1,03	1,43
6.	1,04	1,46
7.	1,03	1,44
8.	1,05	1,46
9.	1,04	1,47
10.	1,04	1,47
11.	1,03	1,45
12.	1,05	1,42
13.	1,05	1,46
14.	1,04	1,45
15.	1,02	1,45
16.	1,05	1,44
17.	1,04	1,44
18.	1,03	1,47
19.	1,03	1,45
20.	1,02	1,43
Průměr	1,04	1,45
SD	0,01	0,03
CV %	1,00	1,9
CV _{MP} %	1,12	

Analytický variační koeficient CV_A se vypočetl z kombinovaného koeficientu variace opakovatelnosti a kombinovaného koeficientu variace reprodukovatelnosti.

$$CV_A = \sqrt{CV_O^2 + CV_{MP}^2}$$

$$CV_A = 1,48 \%$$

3.2.3 Pravdivost (Advia 2)

Pro oba referenční materiály byl vypočten aritmetický průměr, směrodatná odchylka, variační koeficient a vychýlení.

Tab. 8 *Pravdivost pro Advii 2*

Pravdivost		
Č. měření	Hodnota signálu ref. mat. č. 1	Hodnota signálu ref. mat. č. 2
1.	1,41	2,37
2.	1,37	2,27
3.	1,37	2,29
4.	1,38	2,27
5.	1,38	2,29
6.	1,42	2,37
7.	1,38	2,29
8.	1,38	2,35
9.	1,38	2,32
10.	1,43	2,35
Průměr	1,39	2,32
Cíl. hodnota	1,31	2,20
SD	0,02	0,04
CV %	1,55	1,73
BIAS	6,11	5,32

Bias analytický b_A byl vypočten následujícím vztahem.

$$b_A = \frac{\sqrt{b_1^2 + b_2^2}}{2}$$

$$b_A = 5,73 \%$$

Pro stanovení celkové chyby TE_{lab} byl použit níže uvedený výpočet.

$$TE_{lab} = b_A + 2CV_A$$

$$TE_{lab} = 8,69 \%$$

Přehled získaných dat pro hodnocení metody stanovení TAG na Advii 2 uvádí Tab. 9.

Tab. 9 *Přehled hodnot důležitých k hodnocení metody na Advii 2*

Výsledné hodnoty v %	
CV_A	1,48
b_A	5,73
TE_{lab}	8,69

4. Diskuze

K hodnocení dané metody a její vhodnosti pro daný analytický účel se používá vztah $TE_{lab} < TE_{max}$, kde TE_{max} představují doporučené hodnoty odbornou společností, v našem případě firmy SEKK s.r.o., jejichž doporučené hodnoty bývají využívány při externím hodnocení kvality (EHK).

V době zavádění nové generace triglyceridů pro jejich stanovení na biochemickém analyzátoru Advia[®] 1800 se řídila naše laboratoř aktuálním odborným doporučením české společnosti pro klinickou biochemii.⁵⁶

Součástí verifikace v naší laboratoři klinické biochemie je kromě opakovatelnosti a reprodukovatelnosti i výpočet celkové chyby metody TE_{lab} .

Pro naše účely čerpáme z EHK, kdy jsou naše výsledky porovnávány s chybami uvedenými při mezilaboratorním porovnávání. K tomuto využíváme firmu SEKK, s.r.o., ale je možné využívat i doporučené hodnoty uváděné na www.westgard.com.⁵⁷

4.1 Vyhodnocení metody na rutinním analyzátoru Advia[®] 1800 (1)

Námi zjištěné CV_A 1,29 % je nižší než CV_A dané výrobcem 1,60 %. Celková chyba laboratoře na Advii 1 vyšla TE_{lab} 10,88 %. Společností SEKK, s.r.o. je povolená maximální chyba 15 %. Ze vztahu $TE_{lab} < TE_{max}$ tedy vyplývá, že TE_{lab} nepřesáhla požadovaný limit.

Metoda stanovení TAG druhé generace na rutinním biochemickém analyzátoru Advia[®] 1800 je v naší laboratoři použitelná pro daný účel.

4.2 Vyhodnocení metody na statimovém analyzátoru Advia[®] 1800 (2)

I v tomto případě nám CV_A 1,48 % vyšlo nižší než CV_A doporučené výrobcem 1,6 %. Pro srovnání byl opět využit údaj pro maximální celkovou chybu udanou odbornou společností, TE_{max} 15 %. Ze vztahu $TE_{lab} < TE_{max}$ tedy vyplývá, že TE_{lab} 8,69 % nepřesáhla maximální hodnotu celkové chyby.

Hodnocení je tedy stejné jako pro rutinní analyzátor a metoda stanovení TAG druhé generace je na statimovém biochemickém analyzátoru Advia[®] 1800 použitelná pro daný účel.

5. Závěr

Po vysvětlení pojmů validace/verifikace a jejich významu v klinické laboratoři byla provedena samotná verifikace akreditované analytické metody stanovení triglyceridů druhé generace enzymatickou fotometrií na biochemických analyzátořech Advia® 1800, společnosti Siemens.

Pro účel verifikace byla provedena měření preciznosti za podmínek opakovatelnosti, preciznosti za podmínek reprodukovatelnosti a pravdivosti. Z těchto změřených hodnot a potřebných výpočtů vyplývá, že je daná metoda pro účely Centrálních laboratoří Nemocnice Strakonice, a.s. oddělení klinické biochemie validní, jelikož na obou analyzátořech platí $TE_{lab} < TE_{max}$. Bylo tak ověřeno, že verifikace proběhla úspěšně a metoda stanovení je vhodná ke klinickému využití. Na základě této verifikace bylo možné metodu stanovení triglyceridů druhé generace zavést do provozu laboratoře. Byly tak splněny všechny definované cíle této bakalářské práce.

6. Literatura

1. JABOR A., *Laboratorní příručka, IKEM*, Praha, 2016, dostupné z:
http://www.ikem.cz/plm_lp/_LP_12374_LOOOOOO6.htm [cit. 12. 2. 2016]
2. HOLEČEK M., *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*, Praha, Grada, 2006, ISBN 978–80–247–1562–9
3. ODSTRČIL J., *Biochemie*, Brno, Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotních oborů, 2005, ISBN 80-7013-425-9
4. MURRAY R. K., et al., *Harperova biochemie*, překlad Kraml J. et al, 2. vydání, Praha, H&H, 1998, ISBN 80-85787-38-5
5. DUCHOŇ J. et al., *Lékařská biochemie a biochemie*, Praha, Avicenum, 1984
6. GOTTO M., *Manual of lipid disorders*, Williams & Wilkins, 1999
7. „*Nomenclature of lipids*“, IUPAC – IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN), *Biochem. J.*, 1978, dostupné z:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1184130/pdf/biochemj00489-0030.pdf> [cit. 12. 2. 2016]
8. Kol. autorů, *Lékařská chemie a biochemie*, Avicenum, 1990
9. <http://www.chemienunterricht.de/dc2/haus/fette.htm> [cit. 12. 2. 2016]
10. GANONG, W. F. *Přehled lékařské fyziologie*. 1.vyd., H+H Jinočany, 1995, ISBN 80-85787-36-9

11. VOET D., VOETOVÁ J. G., *Biochemie*, Victoria Publishing, Praha, 1990
12. ČERMÁKOVÁ H. et al., *Klinická biochemie – 2.díl*, Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, Brno, 2005, ISBN 80-7013-424-0
13. ŠTERN, P. et al., *Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia*, Praha, Karolinum, 2011, ISBN 978-80-246-1979-8
14. *Detection evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult treatment panel III)*, květen 2006, dostupné z: <http://www.nhlbi.nih.gov/guidlines/cholesterol/atp3xsum.pdf> [cit. 20. 2. 2016]
15. ROMERO A., COBOS A., GOMEZ J., MUÑOZ M., *Role of training activities for the reduction of pre-analytical errors in laboratory samples from primare care*, *Clinical Chimica Acta*. Sv. 1-2, 2012
16. ELSTON D. M., *Opportunities to improve quality in laboratory medicine, Clinics in laboratory*, *Medicine*. Sv. 2., 2008
17. FIALOVÁ L., *Novější poznatky o patogenezi aterosklerózy*, *ČS. Fyziol.*, 1995, roč. 44, ISSN 1210-6313
18. ČEŠKA R. et al., *Cholesterol a ateroskleróza, léčba dyslipidemií*, 1. vydání, Praha, Triton, 2005, ISBN 80-7254-738-0
19. POULIOT Mc., DESPRES Jp., NADORU A. et al., *Visceral obesity in men: Associations with glucose tolerance, plasma insulin and lipoprotein levels*, *Diabetes* 1992

20. ZIMA T. et al, *Laboratorní diagnostika*, Praha, Galén, Karolinum, 2002, ISBN 80-7262-201-3
21. KRAML P., *Hyperlipoproteinémie v klinické praxi*, 1. vydání, Tigris, 2008, ISBN-13: 978-80-903750-5-5
22. HRAZDÍRA I., MORNSTEIN V., LECHNER J., *Biofyzikální principy lékařské přístrojové techniky*, 1. vydání, Brno, Masarykova univerzita, 1999, ISBN 80-210-2213-2
23. KÁŠ J., KODÍČEK M., VALENTOVÁ O., *Laboratorní techniky biochemie*, 1. vydání, VŠCHT v Praze, Praha, 2006, ISBN 80-7080-586-2
24. ČERŇÁK J., ČERŇÁKOVÁ M., *Laboratorní technika II.*, Avicenum, Praha, 1982,
25. NAVRÁTIL L., ROSINA J. a kol, *Medicínská biofyzika*, 1 vydání, Praha, Grada, 2005, ISBN 80-247-1152-4
26. KLOUDA P., *Moderní analytické metody*, 2. vydání, Ostrava, 2003, ISBN 80-86369-07-2
27. BERČÍK J., BUSTIN D. et al., *Fyzikálne a fyzikálno-chemické analytické metódy*, Bratislava, Alfa vydavateľstvo technickej a ekonomickej literatúry, 1977
28. <http://www.commons.wikimedia.org/wiki/File:Spektrophotometewr-en.svg>
[cit. 5. 3. 2016]
29. <http://www.healthcare.siemens.com/laboratory-automation/systems/advia-automation-solutions> [cit. 20. 3. 2016]

30. <http://www.healthcare.siemens.com/clinical-chemistry/systems/advia-1800>
[cit. 20. 3. 2016]
31. <http://www.healthcare.siemens.com/clinical-chemistry/systems/advia-1800-chemistry-system> [cit. 20. 3. 2016]
32. <http://www.m-sone.com/yxzx/lcjyzx/pictureShow11.html> [cit. 25. 3. 2016]
33. BURTIS A. C., ASHWOOD E. R., BRUNS D. E., *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*, Elsevier saunders, 2006
34. LEWANDROSKI K., *Clinical chemistry: Laboratory management and clinical correlations*, Lippincott/Williams and Wilkins, 2002
35. TNI 01 0115:2009, *Mezinárodní metrologický slovník – Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny (VIM)*, UNMZ, Praha 2009, čl. 2.39 a 4.31
36. POHANKA M., *Základy statisticky laboratorních experimentů*, Vojenské zdravotnické listy, Hradec Králové 2010, č. 2
37. MOUČKOVÁ L., *Verifikace základních parametrů krevního obrazu na analyzátoru Sysmex XT 4000i a porovnání výsledků patientských vzorků s analyzátozem Sysmex XT 2000i v akreditované laboratoři*, Č. Budějovice, 2014, bakalářská práce (Bc.), JČU v ČB, Zdravotně sociální fakulta
38. RACEK J. et al, *Klinická biochemie*, Galén, Praha, 2006, ISBN 80-7262-324-9
39. FRIEDECKÝ B., ŠPRONGL L., KRATOCHVÍLA J., *Validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích*, doporučení ČSKB. 16. 11. 2004,

dostupné z: <http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporučení--validace-a-verifikace-metod>

[cit. 12. 3. 2016]

40. ČSN EN ISO 15189. *Zdravotnické laboratoře – zvláštní požadavky na kvalitu a způsobilost*, UNMZ PRAHA, 2007
41. International organisation for standardisation, *ISO/EC 17025, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*, 2005
42. International organisation for standardisation, *ISO/EC 15189, Medical laboratories – Particular requirements for quality and competence*, 2012
43. FRIEDECKÝ B., ŠPRONGL L., KRATOCHVÍLA J., PLZÁK Z., *Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích*, doporučení ČSKB, leden 2011, dostupné z: [http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf\(2011/2011-1/dop-validace.pdf](http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf(2011/2011-1/dop-validace.pdf) [cit. 3. 3. 2016]
44. FRIEDECKÝ B., *Soubor článků o kontrole kvality*. Bulletin Společnosti klinické biochemie FONS, září 1994, prosinec 1994, leden 1997
45. PLZÁK Z, KORUNA I, FRIEDECKÝ B., KRATOCHVÍLA J., *Metrologická terminologie v analytické laboratoři*, CD ROM publikace SEKK Pardubice, 2003
46. *U. S. Department of healthy and human services, food and drug administration, Guidance for industry: Bioanalytical method validation*, 2001, dostupné z: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf> [cit. 15. 3. 2016]

47. GONZÁLES O., BLANCO M. E., IRIARTE G., BARTOLOMÉ L., MAGUREGUI M. I., ALONSO M. R., *Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of qualification, robustness and matrix effect*, Journal of Chromatography A, 2014
48. BLUME H., BRENDEL E., BRUDNY – KLOEPEL M., GREBE S., LAUSECKER B., ROHDE G., SIETHOFF C., *Workshop/Conference Report on EMA Draft Guideline on Validation of Bioanalytical Methods*, Eur. J. Pharm. SCI. 42, 2011
49. MUIRHEAD D. C., SMART T. S., *Chromatographia* 52, 2000
50. EN ISO 13612, *Performance evaluation in vitro diagnostics medical devices*, 2002
51. FUNK W., DAMMANN V., DONNEWERT G., *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie*, Willey-Interscience, 2005
52. CHUNG CHOW CHAN, LAM H., LEE Y. C., XUE – MING ZHANG, *Analytical method validation and instrument performance verification*, Willey – Interscience, 2004
53. ŠIMEČKOVÁ E., *Laboratorní příručka*, Strakonice, Nemocnice Strakonice a.s. – Centrální laboratoře, 2015
54. TOKÁR Z., *Příručka kvality*, Strakonice, Nemocnice Strakonice a.s. – Centrální laboratoře, 2015

55. TOKÁR Z., *Postup při validaci/verifikaci metody – standardní operační postup*, Strakonice, Nemocnice Strakonice, a. s. – Centrální laboratoře, 2015, SOPO-C-06
56. ŠPRONGL L., KRATOCHVÍLA J., FRIEDECKÝ B., PLZÁK Z., *Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích*, ČSKB ČLS JEP, listopad 2010
57. <http://www.westgard.com> [cit. 1. 4. 2016]