

Reference a klinické laboratoře. Stav v roce 2015.

J. Kratochvíla, B. Friedecký

Normy se vztahem k referenci a metrologické návaznosti

Reference je zejména souhrn poznatků o referenčních materiálech, referenčních postupech měření a o metrologické návaznosti. Normy reference pro měření v laboratorní medicíně pocházejí z let 2002 až 2009 jako výsledek spolupráce mezi ISO (Mezinárodní organizace pro normalizaci; <http://www.iso.ch>), JCTLM (Joint Committee on Traceability in Laboratory Medicine - Mezinárodní společná komise zajišťující návaznost v laboratorní medicíně; <http://www.bipm.org/en/committees/jc/jctlm/>) a BIPM (Mezinárodní úřad pro váhy a míry v Sévres; <http://www.bipm.org>).

- ISO 17511:2003. In vitro diagnostic medical devices - Measurement of quantities in biological samples – Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials. ISO 2009.
- ISO 15193:2009. In vitro diagnostic medical devices -- Measurement of quantities in samples of biological origin -- Requirements for content and presentation of reference measurement procedures.
- ISO 15194:2009. In Vitro Diagnostic Medical Devices – Measurement of quantities in samples of biological origin -- Requirements for certified reference materials and the content of supporting documentation.
- ISO 15195:2003. Laboratory Medicine – Requirement for Reference Measurement Laboratories.
- ISO 18153:2002. Measurement of quantities in samples of biological origin – Metrological traceability of assigned value for catalytic concentration of enzymes in calibrators and control materials.

Obsahem těchto norem je ustanovení metrologické návaznosti měření, definované ve VIM 3 – (Mezinárodním slovníku základních a všeobecných termínů v metrologii, vydaném organizací BIPM (1)) jako vlastnost výsledku měření, pomocí níž může být výsledek měření odvozen pomocí určeného referenčního materiálu a/nebo referenčního postupu měření nepřerušovaným řetězcem kalibrací, z nichž každá se podílí svým příspěvkem na celkové nejistotě měření.

Metrologická návaznost je nástrojem srovnatelnosti a harmonizace výsledků měření dosažených v různých laboratořích s použitím různých metod. Jen tam, kde vykazují různé metody různých výrobců metrologickou návaznost, lze předpokládat srovnatelnost výsledků za zajištěnou a za záruku toho, že difference mezi výsledky získanými různými postupy měření nepřekročí požadované meze. VIM 3 definuje vedle dalších metrologických pojmů a termínů i **základní pojmy, potřebné k dosažení harmonizace výsledků měření**. Část problémů se srovnatelností výsledků měření je možné připsat i tomu, že výrobci a laboratoře si tyto pojmy vysvětlují nepřesně a často i ve svůj prospěch.

Referenční materiály a referenční laboratoře - stav k roku 2015

Spojená komise JCTLM má dvě základní pracovní skupiny (Working Group) a to WG 1 pro referenční materiály a referenční měření a WG 2 pro referenční laboratoře a jejich sítě. WG 1 se zabývá nominací a schvalováním referenčních materiálů a WG 2 vlastními referenčními měřicími postupy a sítí referenčních laboratořích. Referenční laboratoře JCTLM provádějí měření pomocí schválených referenčních měřících postupů kalibrovaných schválenými referenčními materiály. Průběžně jsou ustanovovány ad-hoc komise pro jednotlivé analyty, referenční materiály a referenční měření (například PTH, cystatin C, vitamin D a další). JCTLM má svou databázi (<http://www.ifcc.org> ikona JCTLM – IFCC Media) a data z ní, uvádí tabulka 1.

Tabulka 1. Výběr z dat JCTLM pro klinické laboratoře

Položka	Počet
Certifikované referenční materiály (CRM, ERM, SRM)	295
Referenční metody měření	170
Schválené referenční laboratoře (RL)	130

Tato databáze by měla být při důsledném využívání dostatečná pro dosažení metrologické návaznosti ve velké oblasti laboratorní medicíny. Data by měla být k potřebě výrobcům IVD, národním metrologickým institucím (v ČR je to Český metrologický institut (ČMI) a Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví (UNMZ)), poskytovatelům externího hodnocení kvality,

pracovníkům klinických laboratoří (základní znalosti by měly být součástí jejich pracovních náplní). Dobré informace z této oblasti by měli vykazovat i auditoři při procesech akreditací. Uživatelé této databáze JCTLM podle citace [2] jsou uvedeni v tabulce 2.

Tabulka 2. Uživatelé databáze JCTLM

Uživatel	Podíl (%)
Referenční laboratoře	20
IVD výrobci	20
Klinické laboratoře	33
Výrobci referenčních materiálů	5
Národní metrologické orgány	7
Akreditační orgány	2
Ostatní průmysl a ne-IVD výrobci	3
Ostatní, včetně poskytovatelů EHK	10

V oblasti referenčních materiálů (CRM, ERM a SRM) jsou k červnu 2015 v databázi JCTLM k dispozici následující referenční materiály pro účely laboratorní medicíny [2].

Tabulka 3. Referenční materiály v databázi JCTLM

Skupiny analytů	Čisté referenční materiály	Matricové referenční materiály
Vitaminy	-	9
Proteiny	7	18
Nukleové kyseliny	9	1
Ne peptidické hormony	12	11
Stopové kovy a prvky	-	58
Metabolity a substráty	53	33
Enzymy	6	6
Elektrolyty	15	21
Léčiva a drogy	12	19
Koagulační faktory	-	2
Krevní skupiny	-	3

Referenčních materiálů je velké množství, ale nejsou vždy důsledně používány a stupeň jejich používání někdy nelze zjistit ani z dokumentace IVD výrobců, která bývá v oblasti metrologie (nauky o měření) často nedokonalá ačkoliv výrobky IVD jsou výslovně k měření určeny. Naopak řada potřebných referenčních materiálů není doposud vůbec k dispozici (za všechny si dovoříme uvést kardiální troponiny a TSH).

Hodnocení kvality referenčních a kalibračních laboratoří RELA

Je prováděno programem RELA (Reference Laboratories) od roku 2003. Program je prováděn pod záštitou IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine), BIPM a JCTLM. Organizačně zajišťuje program RELA německá společnost DGKL (Deutsche Vereinte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e. V.) a její součást Referenzinstitut für Bioanalytik DGKL Bonn (RfB Bonn) [3]. RELA je určeno akreditovaným referenčním laboratořím a kalibračním laboratořím výrobců IVD. Zásadní podmínkou účasti je akreditace referenční/kalibrační laboratoře podle normy ISO 17025 a/nebo ISO 15195. Výsledky referenčních měření v systému RELA jsou zveřejňovány každoročně na webu (<http://www.dgkl-rfb.de:81/index.shtml>); včetně identifikace totožnosti každého účastníka RELA, tedy i kalibračních laboratořím výrobců IVD. Kontrolní cykly RELA jsou realizované dvěma zaslanými kontrolními vzorky 1x ročně. Vedle výsledků měření uvádí každá zúčastněná laboratoř i nejistoty výsledků měření vypočtené dle určeného algoritmu. Od roku 2003 se počet stanovovaných analytů a parametrů (anorganické a organické analyty, substráty, enzymy, proteiny, hormony, léky, glykovaný hemoglobin, vitamíny) průběžně rozšiřuje. Postupně roste i počet referenčních laboratořím, které splňují požadovaná kritéria a účastní se EHK programu RELA. Vybrané údaje o programu RELA uvádí tabulka 4.

Tabulka 4. EHK program RELA

	Počet
Referenční laboratoře v rámci JCTLM	50
Kontrolované analyty	39
Nově kontrolované analyty	4 (HDL a LDL cholesterol; 25-OH vitamin D; fT4)
Referenční laboratoře v rámci task force (pracovní skupiny IFCC) pro stanovení hemoglobinu HbA _{1c}	19 (2 noví kandidáti)

I když je počet referenčních laboratoří v současnosti vysoký, na východ od Německa není v Evropě žádná. Ani u nás, a to ani třeba jen pro jeden či několik analytů. Je to škoda, protože se jedná vedle zajímavé a cenné odborné práce i o ekonomicky přínosnou činnost. Rozložení referenčních laboratoří účastnících se v programu RELA ve světě uvádí tabulka 5.

Tabulka 5. Počty referenčních laboratoří v rámci JCTLM

Stát	Počet
Čína	24
Německo	6
Itálie	3
Francie, Nizozemsko, Španělsko	po 2
USA, Kanada, Argentina, Singapur, Jižní Korea, Japonsko, Belgie, Švédsko, Velká Británie, Turecko	po 1

Velký počet referenčních laboratoří v Číně svědčí o pozornosti, jaký významu reference a vědě vůbec v současnosti Čínská lidová republika přikládá. Počty ostatních referenčních laboratoří v Evropě jsou vyhovující. Překvapuje jen jedna referenční laboratoř USA při NIST (National Institute of Standards and Technology).

Výsledky RELA jsou volně přístupné na výše uvedené webové adrese. Překvapuje, že výrobci IVD svou účast a své výsledky v programu RELA prakticky nezmiňují ve své výrobní dokumentaci, přestože kalibrační laboratoře některých z nich (Roche, Dirui, Mindray, Bio Systems) se programu RELA dlouhodobě pravidelně účastní. Zato informují často o účasti v jiných referenčních programech, ale ani ne tak o výsledcích, jako o tam přidělených certifikátech. Analogie s přístupem řady účastníků rutinních programů EHK je zřejmá.

Harmonizace a nejistota výsledků referenčních laboratoří v programu RELA

Obecně dostupné výsledky programu RELA umožňují udělat si představu o současném stavu kvality referenčních měření v referenčních a kalibračních laboratořích a tím i představu o současné dosažitelné analytické úrovni laboratorní medicíny. V tabulce 6 uvádíme data vybraných metod, dosažená v roce 2014.

Tabulka 6. Výsledky RELA 2014 u sedmi vybraných analytů (jen doporučené referenční metody)

Analyt	Interval výsledků	Interval laboratorních nejistot	Referenční metody
Draselný kation [mmol/l]	5,8 - 5,93	0,01 - 0,1	FAES, ICP/MS
Vápník celkový [mmol/l]	3,11 - 3,16	0,03 - 0,08	ICP/MS, FAAS
Glukóza [mmol/l]	11,8 - 12,1	0,12 - 0,54	ID-LC/MS, ID-LC/MS/MS
Cholesterol [mmol/l]	4,97 - 5,1	0,05 - 0,11	ID-GC/MS
Kreatinin [μmol/l]	156 - 164	1,8 - 11,5	ID-LC/MS, ID-LC/MS/MS
Glyk. hemoglobin HbA _{1c} [mmol/mol]	65,2 - 68,5	0,9 - 1,8	LC/MS
Vitamin D – 25-OH [nmol/l]	28,5 - 29	1,4 - 4	LC-MS/MS

Z výsledků lze konstatovat většinou dobrou shodu průměrů výsledků měření jednotlivých referenčních laboratoří u vybraných analytů a z toho logicky plynoucí i přijatelné hodnoty bias. Naopak je tak možné identifikovat už i jinde zjištěné problémy s hodnotou bias třeba při stanovení glyk. hemoglobinu HbA_{1c} (v rutinních klinických laboratořích kolem 4 až 5 mmol/mol; rozptyl jen referenčních laboratoří $\Delta = 3,3$

mmol/mol). Podobně jako rutinní laboratoře, i laboratoře referenční mají problémy s výpočtem nejistot měření, což je považováno za obecný problém hodnocení kvality analytických měření vůbec. Za povšimnutí stojí výrazný posuv referenčních postupů měření ke kvalitním přístrojovým metodám reference, k ICP (induktivně vázaná plasma) a tandemové hmotnostní spektrometrii (MS/MS).

Další možnosti využití výše uvedených dat

V programu SEKK se nám občas naskytne zajímavá možnost použít v programu AKS vzorky, které byly předtím použity v programu RELA pro referenční laboratoře. Ukázka takového srovnání je prezentována v tabulce 7, kde jsou uvedeny robustní průměry (RoM) výsledků účastníků cyklu AKS1/14 vzorek B a intervaly hodnot referenčních laboratoří cyklu RELA 2014, vzorek B, když bylo použito shodného materiálu.

Tabulka 7. Srovnání průměrů rutinních měření s intervaly referenčních měření v roce 2014

Analyt	RoM SEKK cyklus AKS1/14 B (v závorce počet účastníků)	Interval výsledků RELA 2014 B (v závorce počet referenčních laboratoří JCTLM)
Sodný kation [mmol/l]	149,5 (174)	150,4 – 152,0 (10)
Draselný kation [mmol/l]	2,95 (174)	2,88 – 3,03 (10)
Vápník celkový [mmol/l]	1,84 (169)	1,76 – 1,85 (10)
Glukóza [mmol/l]	6,39 (178)	6,00 – 6,29 (18)
Kyselina močová [μmol/l]	297 (173)	286 – 308 (8)
Urea [mmol/l]	19,0 (178)	18,6 – 19,5 (11)
Kreatinin [μmol/l]	155 (179)	149 – 164 (11)
Cholesterol [mmol/l]	3,81 (169)	3,73 – 3,82 (10)

Výsledky měření ukazují nejen dobrou úroveň standardizace základních analytů krevního séra (plazmy) účastníků cyklů SEKK, ale i dostatek zajímavých dat, použitelných k verifikaci standardizace rutinních metod měření. Je jen škoda, že nejsou tato data výrobci IVD, poskytovateli programů EHK a orgány akreditačních procesů zatím více využívána.

Pravděpodobné trendy standardizace a reference v blízké budoucnosti

V procesu standardizace jsou měření klíčových biomarkerů složitější struktury:

- PTH (Pracovní skupina IFCC)
- cTnI (NIST)
- 25-OH vitamin D (VDSP – *Vitamin D standardization program*)
- Thyroidní hormony (Pracovní skupina IFCC).

Řeší se problémy související přímo se standardizací a to mimo jiné:

- komutabilita referenčních materiálů (potřeba jejího jednoznačného určení)
- odhad nejistoty měření (potřeba obecně akceptovaného algoritmu výpočtu)
- využití sigmometrie (jako objektivního indikátoru analytické kvality).

Tyto problémy jsou intenzivně testovány a publikovány a názory na ně, či závěry o nich, jsou doposud kontroverzní a nejednotné.

Literatura:

1. VIM 3. International vocabulary of metrology - Basic and general concepts and associated terms. BIPM 2008. Dostupné na <http://www.bipm.org>
2. Wielgosz R.: JCTLM Database, reference materials, methods, measurement services for IVD industry. Euromedlab Paris 2015.
3. Kessler A. et al.: External Quality Assessment Scheme for reference laboratories – review of 8 years' experience. Clin Chem Lab Med 2013, 51/5: 997-100.