

**VÝZNAM POROVNATEĽNOSTI PODMIENOK LABORATÓRNEHO STANOVENIA
ÚDAJOV V OBLASTI EXPERIMENTÁLNEJ BIOMEDICÍNY:
SLABÉ STRÁNKY A RIZIKÁ SYSTÉMU LABORATÓRNYCH VYŠETROVACÍCH METÓD
SIGNIFICANCE OF COMPARABILITY OF LABORATORY DATA DETERMINATION
IN THE FIELD OF EXPERIMENTAL BIOMEDICINE:
WEAKNESSES AND RISKS OF THE SYSTEM OF LABORATORY EXAMINATION METHODS**

MELUŠ Vladimír, KRAJČOVIČOVÁ Zdenka, KAŠLÍKOVÁ Katarína, GRABCZAK Pavel

Fakulta zdravotníctva, Trenčianska univerzita Alexandra Dubčeka v Trenčíne, Trenčín

ABSTRAKT:

Úvod: Súčasná biomedicína využíva širokú paletu laboratórnych vyšetrovacích metód, ktoré sú rôzne nielen z aspektu metodológie, ale aj prístrojového dizajnu. Táto variabilita môže negatívnym spôsobom ovplyvniť výsledky laboratórneho stanovenia a následne aj interpretáciu výsledkov.

Cieľ: Cieľom našej štúdie bolo overiť mieru zhody výsledkov dvoch prístrojov pri stanovení optickej denzity vzoriek pri definovanej vlnovej dĺžke.

Materiál a metódy: Pre hodnotenie sme využili Bland-Altmanove grafy pre výsledky meraní 96 vzoriek na mikrotitračnej platničke pre tri vlnové dĺžky (405 nm, 450 nm a 492 nm) a mikroorganizmy *S. aureus* a *E. coli*.

Výsledky: Výsledky overili neprítomnosť zhody medzi oboma porovnanými prístrojmi v stanovení jednotlivých vzoriek. Na základe uvedených skutočností sme akceptovali výsledky analyzátora s nižším rozptylom.

Záver: Uvedené prípady môžu byť bežnou komplikáciou experimentov a štúdií, preto je nutné vziať ich do úvahy už pri dizajne štúdie.

Kľúčové slová: Zhoda vyšetrenia laboratórneho parametra. Zameniteľnosť prístrojov. Biofilm. Validácia výsledkov.

ABSTRACT:

Background: Contemporary biomedicine uses a wide range of laboratory investigation methods, which are different not only in terms of methodology, but also in terms of device design. This variability can negatively affect the results of the laboratory determination and, consequently, the interpretation of the results.

Aim: The goal of our study was to verify the degree of agreement between the results of two devices in optical density examination of samples at a defined wavelength.

Material and methods: For evaluation, we used Bland-Altman graphs for the results of measurements of 96 samples on a microtiter plate for three wavelengths (405 nm, 450 nm and 492 nm) and microorganisms *S. aureus* and *E. coli*.

Results: The results verified the absence of agreement between the two compared devices in the determination of individual samples. Based on the mentioned facts, we accepted the results of the analyzer with lower variance.

Conclusion: The mentioned cases can be a common complication of experiments and studies; therefore, it is necessary to take them into account when designing the study.

Key words: Conformity of laboratory parameter examination. Interchangeability of devices. Biofilm. Validation of the results.

ÚVOD

Súčasný svet postmodernej spoločnosti je charakterizovaný extrémnou rýchlosťou vývoja nových technológií. Prienik informačných technológií, nanotechnológií, robotizácie a efektívizácie sa prejavuje v biomedicínskych odboroch, v ktorých pozorovaný pokrok veľmi citlivo vníma aj laická verejnosť z pochopiteľného dôvodu, ktorým je zdravie jedinca a celej spoločnosti. Veľmi častým je pojem EBM (Evidence Based Medicine – medicína založená na dôkazoch), ktorým označujeme využívanie najlepších dostupných dôkazov, objektívnych klinických skúseností a klinických dôkazov v diagnostike a liečbe jedincov [1]. Tento prístup je zároveň dôsledným dodržiavaním vedeckej publikačnej paradigmy, kedy autori vo svojich vedeckých príspevkoch exaktne popisujú všetky okolnosti získavania dát, počínajúc dizajnom experimentu, selektívnymi kritériami zaraďovania jedincov do súborov, resp. výberu vzoriek a pokračujúc dôslednou charakteristikou materiálu, metód a prístrojového vybavenia, ktoré boli k získaniu a spracovaniu výsledkov využité a to vrátane určenia štatistického spracovania dát a softvéru, ktorým bolo vykonané. Všetky uvedené faktory majú jediný cieľ: overiteľnosť a reprodukovateľnosť výsledkov stanovení parametrov v prostredí širokej medzinárodnej vedeckej komunity a tým aj spätná kontrola, ktorou nie je iba posúdenie daného príspevku nezávislými recenzentmi v zmysle, či je alebo nie je validný, ale aj následného opakovania postupov a reprodukovania laboratórnych analýz v podmienkach iných pracovísk, iných spádových populácií a iných modifikácií výberu vzoriek alebo pacientov (napr. podľa špeciálnych ochorení, farmakoterapie a pod.).

Laboratórne vyšetrovacie metódy sú v tomto smere unikátne svojou variabilitou. Jeden a ten istý parameter možno stanoviť rôznymi metodologickými princípmi (elektrochemiluminiscencia, rádioimunoanalýza, ELISA, mikročipy, ...). Z toho však

vyplýva základný problém, ktorým sú rôzne pracovné charakteristiky týchto metód (limit detekcie, limit kvantifikácie, oblasť linearity, rôzne referenčné medze). Dokonca aj v prípade toho istého laboratórneho princípu stanovenia sa jednotlivé produkty (reakčné súpravy, prístroje) od rôznych výrobcov môžu navzájom pri stanovovaní toho istého parametra vzájomne odlišovať.

Preto sa dostávame k pomerne dôležitej otázke, akou je reálna porovnateľnosť stanovenia toho istého parametra na dvoch odlišných prístrojoch. Rutinná laboratórna diagnostika v rámci laboratórnych vyšetrovacích metód v zdravotníctve to jednoznačne kontroluje s pomocou verifikácie vzájomnej porovnateľnosti a zastupiteľnosti analyzátorov, najčastejšie s pomocou regresných modelov (Passing-Bablok) a veľmi efektívnych rozhodovacích grafov (Bland-Altman) [2-4]. V prípade rutínnej laboratórnej diagnostiky ide jednoznačne o úsilie zachovať a udržať kontinuitu a zhodu dát, ktorými sú výsledky vyšetrení pacientov, na základe ktorých sa prijímajú ďalšie rozhodnutie ohľadom liečebno-preventívnej starostlivosti. V prípade základného a aplikovaného výskumu však uvedený prístup absentuje.

CIEĽ

Overenie zhody výsledkov laboratórneho stanovenia miery tvorby biofilmu Christensenovou metódou stanovenej na dvoch rôznych laboratórnych fotometrických prístrojoch z aspektu ich interpretácie.

MATERIÁL A METÓDY

Miera tvorby biofilmu nepatrí medzi rutinne laboratórne vyšetrované parametre s následným ex-

portom výsledkov dát lekárom alebo objednávateľom vyšetrenia. Pre účely tejto štúdie boli využité zbierkové kmene mikroorganizmov *E. coli* a *S. aureus* s presne definovanými vlastnosťami. Miera tvorby biofilmu bola stanovená Christensenovou metódou s využitím 96-jamkových mikrotitračných platničiek [5, 6]. Vzorky boli opticky merané dvomi prístrojmi: Mios Junior (Merck, Darmstadt, SRN) a Apollo (Berthold Technologies GmbH & Co KG, SRN) pri zvolených identických vlnových dĺžkach 405 nm, 450 nm a 492 nm.

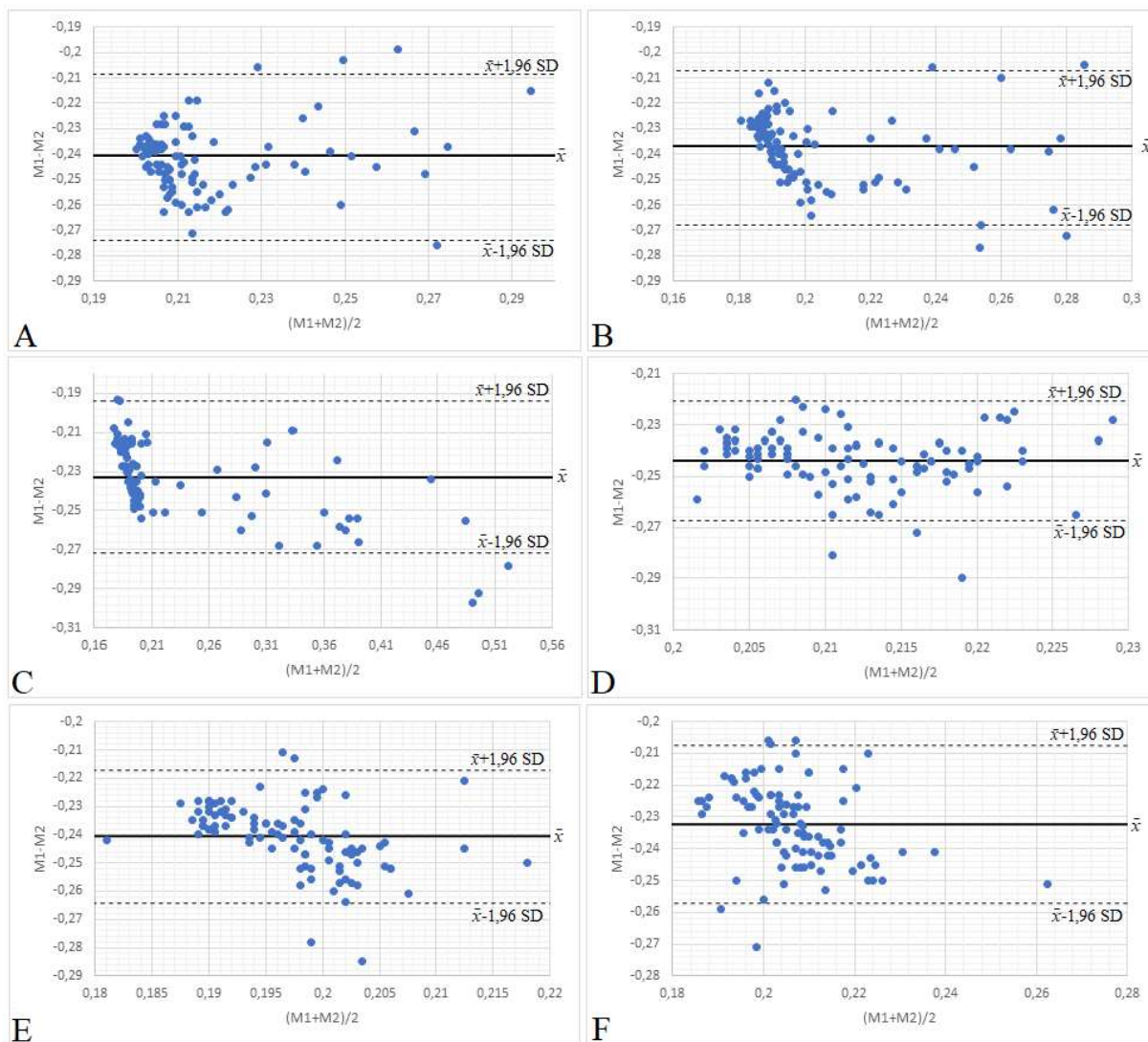
VÝSLEDKY

Základné matematicko-štatistické charakteristiky získaných dát sú uvedené v prehľadovej tabuľke 1. Podstatné je však vyhodnotenie grafického spracovania s pomocou Bland-Altmanových grafov (graf 1). Na os y sa nanáša rozdiel medzi výsledkami merania tej istej vzorky na oboch prístrojoch (M1 – Apollo, M2 – Mios), na os x sa vyznačuje priemerná hodnota oboch meraní $(M1 + M2/2)$. Ak by oba prístroje mali spĺňať predpoklad identickosti výsledkov (t.j. vzájomnú zameniteľnosť), tak všetky body dvojrozmerného Bland-Altmanovho grafu by sa mali nachádzať okolo priemernej hodnoty (plná čiara) ktorá by sa mala nachádzať veľmi blízko nule a zároveň vo vnútri intervalu daného 1,95-násobkom smerodajnej odchýlky (prerušovaná čiara).

Na základe zhodnotenia výsledkov vo všetkých šiestich grafoch v súlade s publikovanými kritériami konštatujeme, že výsledky meraní uskutočnených na oboch analyzátoroch nie sú zhodné a preto ani uvedené prístroje nie sú pri stanovení toho istého parametra zhodné v zmysle napríklad vzájomnej zastupiteľnosti.

Tabuľka 1 Popisné štatistické parametre výsledkov stanovenia miery tvorby rezistencie

| Mikroorganizmus | <i>E. coli</i> | | | | | | <i>S. aureus</i> | | | | | | | |
|-------------------|----------------|--------|-------------|----------------|--------|---------|------------------|----------|--------|-------------|----------------|--------|---------|---------|
| | 405 | | 450 | | 492 | | 405 | | 450 | | 492 | | | |
| vlnová dĺžka (nm) | prístroj | počet | ar. priemer | smer. odchýlka | medián | minimum | maximum | prístroj | počet | ar. priemer | smer. odchýlka | medián | minimum | maximum |
| | Apollo | Mios | Apollo | Mios | Apollo | Mios | Apollo | Mios | Apollo | Mios | Apollo | Mios | Apollo | Mios |
| | 96 | 96 | 96 | 96 | 96 | 96 | 96 | 96 | 96 | 96 | 96 | 96 | 96 | 96 |
| | 0,0982 | 0,3390 | 0,0875 | 0,3244 | 0,1256 | 0,3585 | 0,0900 | 0,3339 | 0,0768 | 0,3174 | 0,0901 | 0,3225 | | |
| | 0,0270 | 0,0206 | 0,0291 | 0,0291 | 0,0975 | 0,1068 | 0,0082 | 0,0092 | 0,0064 | 0,0104 | 0,0115 | 0,0154 | | |
| | 0,0880 | 0,3330 | 0,0740 | 0,3135 | 0,0780 | 0,3125 | 0,0885 | 0,3340 | 0,0760 | 0,3150 | 0,0900 | 0,3215 | | |
| | 0,075 | 0,318 | 0,067 | 0,294 | 0,069 | 0,276 | 0,070 | 0,318 | 0,060 | 0,302 | 0,061 | 0,292 | | |
| | 0,257 | 0,410 | 0,231 | 0,416 | 0,631 | 0,871 | 0,115 | 0,364 | 0,102 | 0,346 | 0,137 | 0,388 | | |



Graf 1. Overenie zhody medzi prístrojmi (stanovenie miery tvorby biofilmu mikroorganizmov). *Legenda:* A – *E. coli*, pri vlnovej dĺžke 405 nm; B – *E. coli*, pri vlnovej dĺžke 450 nm; C – *E. coli*, pri vlnovej dĺžke 492 nm; D – *S. aureus*, pri vlnovej dĺžke 405 nm; E – *S. aureus*, pri vlnovej dĺžke 450 nm; F – *S. aureus*, pri vlnovej dĺžke 492 nm

DISKUSIA

Výber prístrojového vybavenia v prezentovanej štúdií na paralelné párové porovnanie výsledkov stanovenia tých istých vzoriek bol vykonaný na základe obdobia ich vzniku a výroby, preto sa jedná o zariadenia, časovo a dizajnom vzdialené dve generácie. Vývojovo starší prístroj (Mios), resp. generácia, ku ktorej konštrukčne patrí, sa dlhodobo využíval v bežnej rutinej biochemickej analýze ako aj experimentálnych prácach až do nástupu plnoautomatických analyzátorov [7]. Z toho vyplýva, že v prípade, ak boli publikované výsledky spracovania dát napríklad v období pred dvadsiatimi rokmi, v súčasnej dobe nemusia súhlasiť s aktuálne stanovenými hodnotami. Je síce všeobecný úzus, overo-

vať a odvolávať sa na literárne zdroje s čo možno najrecentnejším dátumom publikovania, v niektorých prípadoch (a v mikrobiológii obzvlášť) to nemusí platiť a je nutné za času na čas revalidovať aj staršie údaje.

To, čo je kľúčové na uvedených dátach, je zrejme z údajov uvedených v tabuľke 1. Výsledky štúdií sa častokrát udávajú v podobe základnej opisnej štatistiky (počet, aritmetický priemer, smerodajná odchýlka, medián, minimum, maximum), za ktorou však takmer vždy nasleduje spracovanie dát v podobe štatistického testu a následne interpretovanej *p*-hodnoty testovacieho kritéria štatistického testu. To môže byť akceptovateľné a zmysluplné vtedy, ak sa dáta získali na jednom type prístroja.

V našom prípade však ukazujeme príklad stanovenia, keď jeden a ten istý parameter je stanovený tým istým laboratórnym princípom na dvoch rôznych analyzátoroch. V takomto prípade „klasické“ štatistické testy nemajú výpovednú hodnotu a nastupujú špeciálne modely (napr. Passing-Bablokova regresia) [8]. Bland-Altmanove grafy danú situáciu s prehľadom znázorňujú okamžite. V tomto prípade aj napriek numerickým (kardinálnym) dátam bola vykonávaná interpretácia výsledkov podľa ordinálneho kritéria (miera tvorby biofilmu žiadna – slabá – mierna – silná), teda nevyužívali sa primárne číselné údaje. V našom prípade sme si zvolili ako referenčný prístroj, ktorého výsledky budú smerodajné pre interpretáciu a hodnotenie dát, novší a s nižšou variabilitou výsledkov (Apollo).

Skúsme si predstaviť hypotetickú situáciu, že uvedené výsledky by boli získané na základe laboratórneho stanovenia nejakého biochemického parametra (napr. koncentrácia alebo napr. enzýmová aktivita). V prípade natoľko odlišných výsledkov a systematickej odchýlke (druhý prístroj „nahodnocuje“ údaje v dôsledku čoho je rozdiel uvedený na osi y pod nulovou hranicou, kde by sme ho očakávali v ideálnom prípade zhody prístrojov, graf 1) môžu mať laboratórne stanovenia rôznych pacientov, zahrnutých v klinických štúdiách, veľký vplyv na štatistické vlastnosti výsledného súboru dát ako aj na výsledky, získané štatistickým spracovaním.

ZÁVER

Snaha o objektívne a exaktné dáta je typická pre biomedicínske disciplíny a základnú filozofiu prístupu medicíny založenej na dôkazoch. Na druhej strane je však v tejto oblasti prítomná veľmi široká variabilita, ktorá je daná nielen rôznymi metodologickými princípmi, ale aj technickými odlišnosťami analyzátorov, ktoré pracujú na tom istom analytickom princípe. Negatívne vplyvy tejto variability

možno potlačiť vhodným dizajnom štúdií/experimentov a dôsledným overovaním zameniteľnosti / zastupiteľnosti použitých laboratórných prístrojov.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

- [1] AKOBENG A.K. Principles of evidence based medicine. *Arch Dis Child*. 2005; 90 (8): 837-840.
- [2] PASSING H., BABLOK W. A New Biomedical Procedure for Testing the Equality of Measurements from Two Different Analytical Methods. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1983; 21: 709-720.
- [3] BLAND J.M., ALTMAN D.G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986; 327: 307-310.
- [4] MELUŠ V., KRAJČOVIČOVÁ Z., NETRISOVÁ J., KAŠLÍKOVÁ K., SLOBODNÍKOVÁ J. Význam a využitie Bland-Altmanových grafov pri overovaní zhody laboratórných vyšetrovacích metód v biomedicíne. *Zdravotnícke listy*. 2016; 4 (3-4): 83-91.
- [5] KAŠLÍKOVÁ K., SLOBODNÍKOVÁ J., MELUŠ V., KRAJČOVIČOVÁ Z. Mikrobiálne filmy: vznik, štruktúra a selekčná výhodnosť. *Zdravotnícke listy*. 2018; 6 (3): 23-28
- [6] KAŠLÍKOVÁ K., MELUŠ V., KRAJČOVIČOVÁ Z., GRABCZAK P. Sledovanie tvorby biofilmu u bakteriálnych kmeňov izolovaných z prostredia nemocníc. *Zdravotnícke Listy*. 2022; 10 (2): 93-99.
- [7] AVTI P.K., KUMAR S., PATHAK CH.M. et al. Smokeless Tobacco Impairs the Antioxidant Defense in Liver, Lung, and Kidney of Rats. *Toxicological sciences*. 2006; 89 (2): 547-553
- [8] PUM J. A practical guide to validation and verification of analytical methods in the clinical laboratory. *Adv Clin Chem*. 2019; 90: 215-281.