

## 9. A vizsgálatok kontrollja, ellenőrzése, pontossága, helyessége

LAKATOS ÁGNES

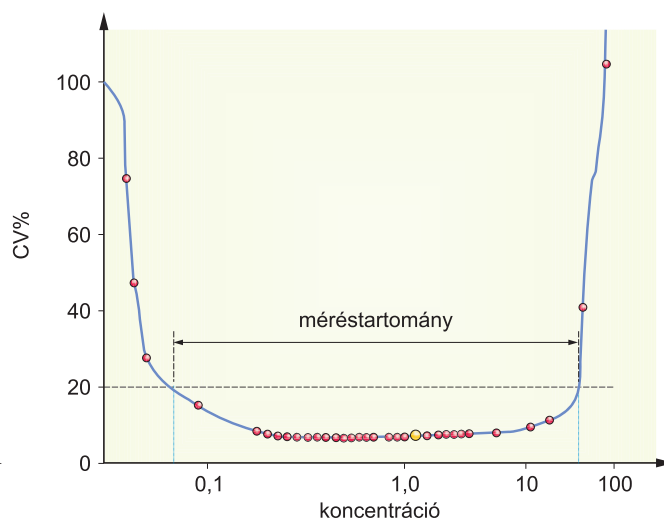
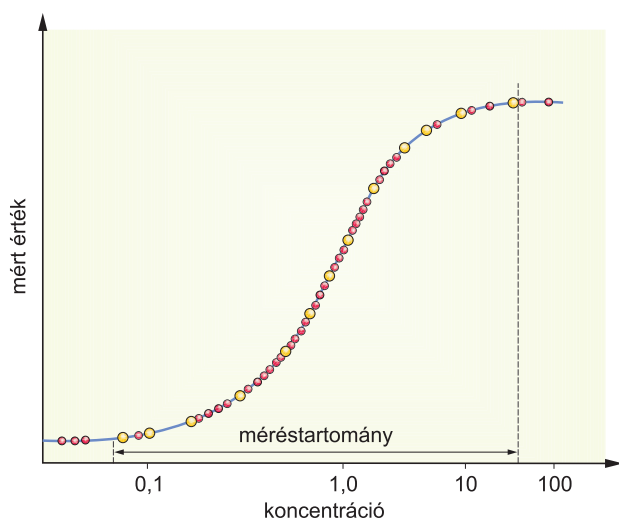
A klinikai kutatások fontos eszköze a mérés, amelynek során sokféle előkészítő eljárás után egy fizikai paramétert mérünk, amely összefüggésben van a mérendő anyag koncentrációjával. Az összefüggés lehet lineáris (pl. a Lambert–Beer-törvény szerint [1]), de nem feltétlenül az, akár fordított függvénykapcsolatot is tapasztalhatunk. Egy új paraméter mérésekor, kísérleteink legelső szakaszában az is elég információ számunkra, hogy tudjuk, melyik mintában nagyobb, melyikben kisebb a vizsgálandó anyag koncentrációja. Már ekkor is szükséges tudnunk, hogy a módszer, amelyet kidolgoztunk, megfelel-e a következőknek:

1. Elég specifikus-e, vagyis az az anyag okozza-e a mért fizikai változást, amelyekre kíváncsiak vagyunk.
2. Megfelelő-e a mérés precíziója, pontossága, azaz többszörös mérés esetén a kapott szórás, ill. a variációs koefficiens elég kicsi-e elvárásainkhoz képest. A precízió függ a mérendő anyag koncentrációjától, ezt az összefüggést ábrázolja a *precíziós profil görbe* (9-1. ábra). Az elvárásaink – biológiai minta mérése esetén – többek között attól függenek, hogy a meghatározandó anyag biológiai szó-

rása, változatossága, változékonysága mekkora. A kémikusok szempontjából, ha mátrixhatás nélküli tiszta oldatot vizsgálnak, az analitikai módszerek pontossága az esetek többségében 0,1% vagy ennél kisebb nagyságrendben van. Ezzel szemben a biológiai méréseknél gyakran megelégszünk 10% körüli pontossággal. Fehérjénél nem ritka, hogy kóros állapotokban koncentrációja a referenciaértékhez képes sok ezerszeresre is emelkedhet. Így a mért változás nagyobb pontatlanság, kisebb precízió mellett is egyértelműen értékelhető.

A mérés pontosságát egyrészt az „intraassay” (egy mérési napon belül meghatározott) szórás fejezi ki, de nagyon fontos, hogy a különböző mérési napok között mennyire tudjuk egyformán beállítani a körülményeket. Ezt az „interassay” (minden mért értéket különböző mérési napon meghatározva) szórás mutatja.

3. Elég szenzitív-e a módszer, vagyis a mintában lévő mérendő analit mennyisége elég-e ahhoz, hogy mérhető fizikai választ kapjunk. Itt is változnak az elvárásaink, ill. a mérés érzékenysége javulásával a teszt funkciója is változhat. Ilyen volt



9-1. ábra. Precíziós profil görbe

pl. a TSH [2] esete. Az első generációs teszteknel a funkcionális érzékenység nem volt elég kicsi ahhoz, hogy a referenciatartomány alatti *alacsony* TSH-szinteket elkülönítse a referenciatartományon belüli értékektől, csak a nagyobb értékek esetében lehetett következtetéseket levonni. Amikor a tesztek fejlesztésével lehetségessé vált az alacsony értékek megítélése, megnőtt a TSH-mérés jelentősége, és elsődlegessé vált a pajzsmirigy-diagnosztikában.

Hasonló változást figyelhattunk meg a CRP-tesztnél, eleinte a 10 mg/l alatti koncentrációkat nem tudta a teszt megbízhatóan mérni. Az akut gyulladások kimutatására azonban így is alkalmas volt. Amikor a tesztek érzékenyebbé váltak, ill. a megbízható alsó mérési tartomány csökkent, az 5–10 mg/l közötti értékekről megtudtuk, hogy jelezheti az atherosclerosis érfalban lévő mikroglyuladásait is [3].

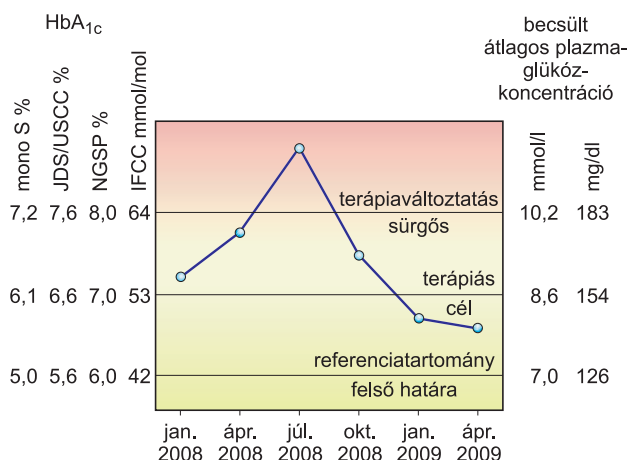
4. Fontos szempont, hogy az adott minta mátrixa mennyire befolyásolja a mérésünket. Tudnunk kell, hogy milyen biológiai minta milyen előkészítési módszerrel tehető alkalmassá a mérésre. A mátrix kérdése mindenképpen felvetődik akkor is, amikor a viszonyítási standard problémájával foglalkozunk.
5. A mérési eljárás kidolgozásának fontos eleme, hogy ismerjük a mérési tartományt, azt a koncentrációtartományt, amelyen belül a koncentrációváltozás egyértelmű kapcsolatban áll a fizikai jel változásával. Immunológiai módszereknél mindig gondolnunk kell a High Dose Hook jelenségre [4], vagyis arra, hogy a reagens antitestkoncentrációjához képest nagy mérendő antigénkoncentráció esetén hamisan alacsony eredményt kaphatunk.
6. Egy módszer beállítása során fontos annak a vizsgálata, hogy a mérendő minta a mérendő komponensre nézve mennyire, és milyen körülmények között stabil.

Fehérjék mérésekor gyakran igazi kihívás a mért eredmény kifejezése koncentrációértékekben. Míg kis molekulájú anyagnál, ahol a kristályos anyag a rendelkezésünkre áll, vagy egyszerű gravimetriás beméréssel, vagy a mátrix zavaró hatásának kiküszöbölése érdekében alkalmazott standard addíciós módszerrel, vagy bonyolultabb esetben referenciamódszerrel mért másodlagos standard alkalmazásával egyértel-

műen összefüggésbe hozhatjuk a mért fizikai jelet a koncentrációval, fehérjék esetében ez sohase ilyen egyszerű. Így mindig érdemes fenntartással fogadni, még a gyári mérési tesztek esetében is az alkalmazott standardok valódi értékét és a mérési tesztek eredményeinek valóságát. Sok esetben nem kapunk összehasonlítható eredményeket különböző, önmagukban nagyon megbízható gyári tesztek használva sem. A fehérjék mérésekor alkalmazott kontrollok eredményei is módszerfüggők, a független kontrollokra minden módszerhez más-más érték van megadva, a reagensgyártó saját kontrolljai pedig nem alkalmasak más módszerek kontrollálására.

A standardizáció nehézségeinek következményeit jól példázza a fruktózamin mérés esete. A fruktózamin mérést mint a diabetes monitorozására használható redoxireakción alapuló fotometriás módszert 1983-ban használták először és írták le JOHNSON és munkatársai [5]. Standardnak ők a glikált fehérje Amadori-termékének szerkezetét utánzó dezoxi-morfolin-fruktózt használták. Mivel egyértelmű volt, hogy a szérum fehérjéje szükséges a reakcióhoz, standard addíciót alkalmaztak. Módszerükkel a fruktózamin referenciatartománya 2,0–2,4 mmol/l volt. Az alkalmazás során kiderült, hogy a módszer legérzékenyebb része, amelyet legjobban befolyásolnak a reagens összetételének és egyéb körülményeknek a kisebb eltérései is, maga a kalibrálás (noha a kalibrálás célja a kisebb szisztemás hibák kiküszöbölése lenne) [6, 7], ezért másodlagos, természetes „fruktózamin”-tartalmú standard alkalmazását javasolták a mindennapokban. A fruktózaminmérés elterjedését végül az segítette, hogy egy gyári teszt megjelenésével párhuzamosan bevezették a  $^{14}\text{C}$ -izotóppal jelzett glükózzal glikált polilizinre visszavezetett másodlagos standard használatát [8]. Így a referenciatartomány 205–285  $\mu\text{mol/l}$  lett. Az így kapott értékek valószínűleg jobban tükrözik a valódi koncentrációt, mint a dezoxi-morfolin-fruktózra standardizált mérés eredményei, bár abszolút helyességében nem lehetünk biztosak, hiszen a polilizin nem ugyanaz, mint a szérumfehérjék [9].

Másik standardizálási probléma ugyancsak a diabetes monitorozás területén a  $\text{HbA}_{1c}$  mérése [10, 11]. A mérés története 1958-ig nyúlik vissza. Itt néhány évtizednyi standardizálási káosz után az ioncserés kromatográfiát választották referenciamódszernek, az eredményt pedig az összes hemoglobin százaléka-



9-2. ábra. Beteg HbA<sub>1c</sub>-értékeinek longitudinális követése

ban adták meg. A HbA<sub>1c</sub> standardizálásának összehangolása a különböző laboratóriumok, különböző mérési módszerek között nagyon fontos, mert a betegek monitorozását sok éven át kell folytatni, és az eredmények összehasonlítása csak standardizált mérési módszerek alkalmazásával lehetséges. A standard a nemzetközi megállapodáson alapuló, ioncserés kromatográfiás módszerre visszavezethető módon megállapított koncentrációjú preparátum volt az immunológiai módszerek esetében is, 1993-tól a Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) javaslatára. A standardizálást az NGSP (National Glycohemoglobin Standardization Program) referencialaboratóriumai felügyelték. Nem csatlakoztak az amerikai (DCCT-NGSP) rendszerhez, de ugyancsak ioncserés HPLC-t használtak referenciamódszerként Japánban (JDS) és Svédországban (MonoS) is, ezek egymástól eltérő eredményeket adtak.

Napjainkban megy végbe az átállás az új standardizálásra. Ennek alapja, hogy sikerült tiszta HbA<sub>1c</sub>-t előállítani, és ebből definitív összetételű preparátu-

mokat, valamint egy új referencia mérési rendszert kidolgozni. Lényege, hogy az enzimátikus (endoproteináz Glu-C) hasítással előállított N-terminális hexapeptidet izolálják, és tömegspektrometrián mérrik glikált és nem glikált formáját. Az IFCC ajánlása szerint az eredményt továbbra is az összes hemoglobinhoz viszonyítva, de nem százalékban adjuk meg, hanem mmol/mol mértékegységben. Az új módszer alapján kiderült, hogy a DCCT-NGSP standardizálással kapott eredmények nagyobbak a valódi értéknél (9-2. ábra).

A különféle standardizálásra kapott eredmények egymásba lineáris összefüggés szerint átszámíthatók (9-1. táblázat) [12].

Méréseink minőségét különböző referenciaanyagokkal biztosíthatjuk, ill. ellenőrizhetjük:

- **Kalibrátorok.** A fehérjék esetében szorosan egy adott készülék típushoz készült, egy vagy több koncentrációjú (egy-, ill. többpontos kalibráció). referencia anyagra/módszerre visszavezethetősége kötelező.
- **Valódiság kontrolllok.** Nem készülékhez kötött, nemzetközi szervezetek által felügyelt, referencia anyagra/módszerre kötelező visszavezethetőség.
- **Gyártói precízió kontrolllok.** Adott készüléktípusra optimalizált, gyakran a kalibrátorral azonos alapanyagból készül, visszavezethetősége nem kötelező.
- **Független precízió kontrolllok.** Nem készülékre optimalizált, elfogulatlan megítélést tesz lehetővé, visszavezethetősége nem kötelező.
- **Saját precízió kontrolllok.** Új, általunk kidolgozott mérés esetében gyakran az egyetlen lehetőség. Gyűjtött mintából mérünk minden alkalommal. A többi precízió kontrollhoz hasonló-

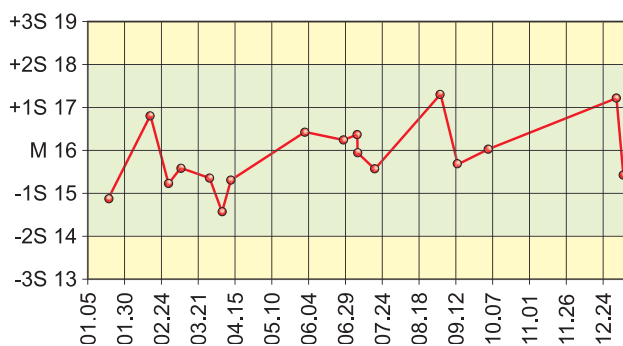
9-1. táblázat. A HbA<sub>1c</sub> átszámítási összefüggései

Számítás	
IFCC egységből indulva $X = \text{HbA}_{1c}$ IFCC egységben (mmol/mol)	NGSP egységből indulva $X = \text{HbA}_{1c}$ NGSP egységben (%)
IFCC (mmol/mol) = $X$	IFCC (mmol/mol) = $10,93 X - 23,5$
NGSP (%) = $0,0915X + 2,15$	NGSP (%) = $X$
JDS (%) = $0,0927X + 1,73$	JDS (%) = $1,013X - 0,45$
MonoS (%) = $0,0989X + 0,88$	MonoS (%) = $1,081 X - 1,44$

an, bár a módszer valódiságát (bias) nem mutatja a mérés relatív szisztémás hibáját, eltérését (az előző mérésekhez viszonyítva) követni lehet vele. Nagyon fontos, hogy biztosak legyünk benne, hogy a kontrollminta tárolása nem befolyásolja a mérés eredményét.

- **Külső kontroll.** Rutin laboratórium munkájához elengedhetetlen külső kontrollok használata, hogy tudjuk, eredményeink mennyire összehasonlíthatók más laboratóriumokéval. Több szervezet foglalkozik külső kontrollrendszerek szervezésével, minták küldésével, eredmények feldolgozásával. A külső kontrollként, „körkontrollként” használt minták minősége a valódiság-kontrollok minőségének felelnek meg. Elterjedt rutin módszerek esetében ezek elérhetők. Ennek hiányában, újabb módszereknél arra kell törekednünk, hogy évente néhány mintát több, egymástól függetlenül működő laboratóriumban meghatározzunk.

Kontrolljainkra mért eredményeket az ötvenes évek óta a jól ismert *Levey–Jennings-grafikonon* (9-3. ábra) ábrázoljuk [13]. A középértékeket és a szórás értékeit a gyári kontrolloknál a gyártó adja meg, saját kontrollnál magunknak kell számolnunk. A megadott szórás értékei logikusan a mérési eljárás precízióját fejezik ki, de elképzelhető olyan megoldás is, hogy a határértékeket a paraméter biológiai varianciájából képezik megfelelő statisztikai módszerrel („six sigma”). Jó az, ha a kettő között nincsen nagy eltérés vagy ha a mérési eljárás precíziójából számolt határértékek a kisebbek. Ilyenkor szigorúbbak vagyunk a szükségesnél. A cél mindenképpen az kell hogy legyen, hogy a mérés hibája ne befolyásolja a klinikai megítélést vagy kutatásainkban a vizsgált és a kontrollcsoport eredményei közti



9-3. ábra. Levey–Jennings-grafikon

különbségek értékelését. A kontrollok értékelésére a *Westgard-szabályok* szerinti számítás alkalmas [14]. A kontrollméréseket hagyományosan „batch”, azaz sorozatmérés esetén a mérendő minták közé tesszük, és a mintával egyezően kezeljük. Ilyenkor, ha a kontrollokban hiba mutatkozik, a Westgard-szabályoknak megfelelően az egész sorozatot meg kell ismételni. Manapság tendencia, hogy egyrészt a rutin laboratóriumok és ezzel a mérési sorozatok egyre nagyobbak, másrészt az automaták többsége nem batch, hanem betegorientált módon mér. Ezért egyre inkább az az általános szokás, hogy a minták mérését akkor kezdjük, ha a kontrollmintákat már lemértük, eredményeit értékeltük, az esetleges hibákat kijavítottuk.

A kontroll szónak van másik jelentése is. Klinikai kutatásainkban, ha kíváncsiak vagyunk, hogy a mérendő paramétert hogyan befolyásolja valamilyen állapot (betegség, gyógyszer, környezeti hatás stb.), nem elég, ha a vizsgált személyek vagy kísérleti állatok mintájából mérjük az adott paramétert jól beállított analitikai módszerrel, hanem a vizsgált csoporthoz majdnem mindenben hasonló *kontrollcsoportot* is vizsgálnunk kell. Leginkább a kor és a nem eloszlására kell figyelni, a csoport létszámának pedig a vizsgált csoport létszámával összevethetőnek kell lennie. Következtetések levonására, statisztikai értékelésre csak ezek figyelembevételével alkalmas a mérési sorozat. Ettől a szabálytól legfölbjebb akkor lehet eltekinteni, ha széles körben elterjedt, jól leírt paramétert standardizált gyári teszttel mérünk, amelynek a referenciatartományát, annak változásait jól ismerjük.

Rossz példa volt erre SCHOENFELD és munkatársainak [15] kutatása, amely szerint az antihiszton antitest mennyisége monoklonális gammopathiák, myeloma multiplex betegségben is hasonló arányban emelkedett, mint autoimmun SLE vagy rheumatoid arthritis esetében. (Hiszton fehérjék ellen termelt autoantitest, autoimmun betegségekben várható a megjelenése.) Amikor követni akartuk ezeket a kísérleteket megfelelő korú kontrollcsoportot is bevonva, kiderült, hogy az antihiszton antitestek megjelenése (gyári, szemikvantitatív ELISA tesztet használva) idős korban (70 év felett) gyakori, emiatt a myeloma multiplexben talált előfordulási valószínűség nem volt nagyobb, mint a korban megfelelő kontrollcsoportban [16, 17] Ebből is látszik, hogy a megfelelő kontrollcsoport kiválasztása van olyan lényeges, mint a vizsgálati csoporté.

Az eddigiekből levonható az a következtetés, hogy a kontrollok alkalmazása (a szó mindkét értelmében) létfontosságú mind a klinikai laboratóriumi rutinmunkában, mind kutatásainkban.

## IRODALOM

- [1] [http://en.wikipedia.org/wiki/Beer%E2%80%93Lambert\\_law](http://en.wikipedia.org/wiki/Beer%E2%80%93Lambert_law)
- [2] [http://hu.wikipedia.org/wiki/Pajzsmirigyserkent%C5%91\\_hormon](http://hu.wikipedia.org/wiki/Pajzsmirigyserkent%C5%91_hormon)
- [3] <http://en.wikipedia.org/wiki/Atherosclerosis>
- [4] <http://www.merckodia.se/learning-center/merckodia-elisa-technology/high-dose-hook-effect.html>
- [5] JOHNSON, R. N. et al.: Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. *Clin. Chem. Acta* 127: 87–95, 1983.
- [6] BAKER, J. R. et al.: Use of protein-based standards in automated colorimetric determinations of fructosamine in serum. *Clin. Chem.* 31:1550–1554, 1985.
- [7] LAKATOS Á., JOBST K.: A p-Nitro-Tetrazóliumkék koncentráció szerepe a fruktózamin Standardizálásában. *Laboratóriumi Diagnosztika* 16:241–243, 1989.
- [8] SCHLEICHER, E. D., VOGT, B. W.: Standardization of serum fructosamine assays. *Clin. Chem.* 36:136–139, 1990.
- [9] Fructosamine Cobas Teszt leírás, Roche.
- [10] [http://en.wikipedia.org/wiki/Glycated\\_hemoglobin](http://en.wikipedia.org/wiki/Glycated_hemoglobin)
- [11] WEYKAMP, C., JOHN, W. G., MOSCA, A.: A Review of the Challenge in Measuring Hemoglobin A<sub>1c</sub>. *J. Diabetes Sci. Technol.* 3:(3), 439–445, 2009.
- [12] LITTLE, R. R., ROHLFING, C. L., WIEDMEYER, H. M. et al. – NGSP Steering Committee.: The national glycohemoglobin standardization program: a five-year progress report. *Clin. Chem.* 47(11):1985–1992, 2001.
- [13] LEVEY, S., JENNINGS, E. R.: The use of control charts in the clinical laboratory. *Am. J. Clin. Pathol.* 66:268–275, 1976.
- [14] WESTGARD, J. O., BARRY, P. L., HUNT, M. R. et al.: A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. *Clin. Chem.* 27:493–501, 1981.
- [15] SCHOENFELD, Y., EL-ROEY, A., BEN-YEHODA, O. et al.: Detection of antihistone activity in sera of patients with monoclonal gammopathies. *Clin. Immunol. Immunopath.* 42:250–258, 1987.
- [16] LAKATOS, Á., SÉTÁLÓ, J., JOBST, K. et al.: Relationship of serum antihistone antibody level to the patient's age. *Acta Med. Hung.* 49:91–100, 1992.
- [17] JOBST, K., LAKATOS, Á., SÉTÁLÓ, J.: Diagnostic value of the antihistone antibody (AHA) test in autoimmune diseases. *Klin. Lab.* 5:109–110, 1992.

