

Základy klinických laboratorních oborů, které se uplatňují v diagnostice humánních chorob

prof. MUDr. Dalibor Valík, Ph.D.,
KLM LF MU, FÚ LF MU

...o které obory jde?

- klinická chemie/biochemie/toxikologie
- hematologie, hemostáza/hemokoagulační poruchy a transfusní medicína
- imunologie a imunopatologie
- lékařská mikrobiologie
- patologie, molekulární patologie a molekulární diagnostika

- *...tradičně se uvádí, že cca 60-70% diagnostických rozhodnutí se odvíjí od laboratorních výsledků při cca 5% nákladem na laboratoře (Forsman, Clin.Chem. 1996)*

souhrnně – laboratorní medicína

- historie: kde se objevil koncept klinické laboratoře
 - 1861, Dr. F.H.Brown, Boston MA: “...každá nemocnice by měla mít na konci oddělení malou místnost, která bude sloužit jako obecná laboratoř”
- jednou z prvních v Evropě: 1886 v Mnichově, Hugo Wilhelm von Ziemssen
- 1895 v USA, Filadelfie, The William Pepper Laboratory of Clinical Medicine
- hematologie: Anthony van Leeuwenhoek (1632-1723)
- mikrobiologie: Louis Pasteur (1822-1895)



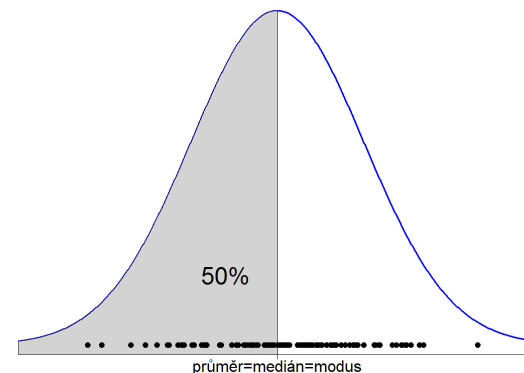
- molekulární diagnostika, 1986, 1987
 - ...zásadní byl objev PCR, popsán v r. 1971, ale realizoval jej až Kary Mullis 1983 (dostal Nobelovu cenu)
- v současnosti jsou zejména patrné tendence k agregaci laboratoří, automatizaci, vč preanalytických procesů, postanalytické fáze

profil absolventa, alias - co bychom rádi, aby z vás bylo?

- stručný, indikativní profil absolventa:
- *vzdělaný, komunikativní, zvědavý se zájmem o práci v klinické laboratoři v relevantních odbornostech s vědomím zásadní důležitosti laboratoře v diagnostickém procesu*
- *kompatibilní se způsobem práce v klinické laboratoři (bezpečnostní standardy apod.,) adherence ke správné laboratorní praxi, s profesionálním respektem ke zkušenějším kolegům, respektování etických aspektů chování*
- *součástí je ochota se vzdělávat v průběhu své profesionální kariéry (semináře, seznamování se s novinkami, kvalifikační rozvoj dle možností)*

základní pojmy pro metriku/metrologii laboratorních vyšetření

- jednotky, resp. rozměr veličiny, která je výsledkem laboratorního testu
- referenční meze, koncept normální Gaussovy distribuce, parametrické a neparametrické rozložení



jednotky a veličiny

- **rozlišujeme** kvalitativní, semikvantitativní a kvantitativní vyšetření
- kvalitativní = binární výsledek: pozitivní, negativní, teplo/zima, v medicíně také ale...bolí/nebolí
- semikvantitativní = výsledek na hrubé škále, kupř. čtyřelementové: 0_+_++_+++, apod.,
- kvantitativní výsledek: vždy vztažen k veličině, resp. kvantitě kalibrantu užíteho k ustanovení vztahu signál/koncentrace (tj. kalibraci)

...malý historický exkurs: *výborně zpracováno v: BLAHOVÁ, Kristýna. Vývoj měř a vah v českých zemích: bakalářská práce. Brno: Masarykova univerzita, Fakulta pedagogická, Katedra fyziky, chemie a odborného vzdělávání, 2020. Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Lukáš Pawera.*

- Blahová K: *“...císař Ferdinand III. vydal reskript ke sjednocení jednotek v Brně a Olomouci, zavedl předchůdce katastru”*
-metrické jednotky: Francie v období po Velké francouzské revoluci
-imperiální jednotky Britského impéria a USA
- ,...i dnes kombinace (např. krevní tlak, kde se kPa neujaly ani v Evropě), britská/standardní míle, námořní míle, “uzly” pro vyjádření rychlosti v námořnictví, v lab. kupř: “psi” jako jednotka tlaku - HPLC

o jaké jednotky jde – SI , a ty ostatní...

u nás v ČR: vyhláška 264/2000 o základních měřicích jednotkách, atd...

- ...snaha u SI jednotek versus jednotky “ostatní”, angloamerické,...
- ...jednotky odvozené od “definitivní” metody, třeba gravimetrie (kg), jednotky záření,
- metody jsou: definitivní, referenční, terénní (field)
- jednotky “relativní”, konvenční, konsensuální (kupř. proteinové standardy WHO)

biologická variabilita - zdroje

- věková škála,
- pohlaví jedince,
 - pracujeme s binárním pohlavím mimo skutečnost diagnostikovaných chromozomálních odchylek (XX, XY, varianty)
- genetický fundament jedince
- interakce genetika<>vývoj<>prostředí/environment
- chronobiologie (biologické rytmy i) časové, ii kontextuální, např. fyziologický menstruační cyklus)

zvláštnosti a specifika věkových období člověka

- škála života člověka je cca 1- 100 let
- růstovým a vývojovým obdobím je zejména dětský věk (pediatrická medicína), dospělý věk, následné presenium/senium, tj stáří
- příklady: bilirubin neonatální vs dospělý, naproti tomu monoklonální gamapatie

pohlaví jedince,

- ...pracujeme s binárním pohlavím mimo skutečnost diagnostikovaných chromozomálních odchylek (XX, XY, varianty)
- diverzifikace a diference začínají být patrné v době puberty
- kromě zjevných změn většinou endokrinologických se tyto změny také promítají do některých laboratorních vyšetření (svalová hmota - kreatinin, menstruační cyklus – RBC, železo)

genetický základ jedince

- studiem se zabývá lékařská genetika s řadou subspecializací
 - je popsána celá řada genetických poruch a abnormalit (McKusick catalogue: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2686440/>)
- u některých je možnost tzv. screeningu, tj. procesu, kdy vzorek pacienta/novorozence je předmětem laboratorního vyšetření za účelem zjištění přítomnosti jedné ze screenovaných chorob
 - u nás v ČR zejména ÚDMP VFN Praha (<https://udmp.lf1.cuni.cz/file/6111/metabolicka-prirucka-2020.pdf>)
 - FN Brno – screening CF a endokrinopatie, dnes i pilotní program pro SMA, SCID a CF

interakce genetika<>vývoj<>prostředí/environment

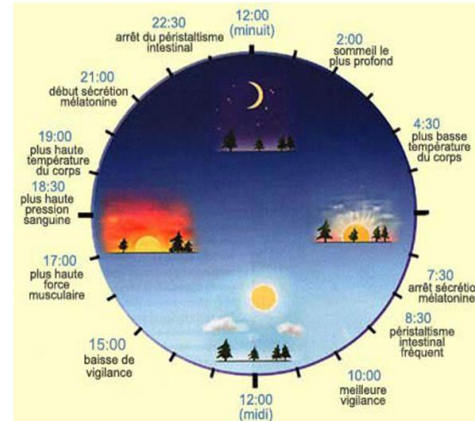
- řada stavů spojených s tzv. náchylností na/k nějakému stavu....snížené tolerance některých potravin, léčiv
- vědním obory jsou
 - farmako/genetika/genomika
 - ekotoxikologie, ekogenetika

chronobiologie (biologické rytmy:

i) časové, ii) kontextuální, např. fyziologický menstruační cyklus)

- základní dělení je: cirkadiánní, infradiánní, ultradiánní ve vztahu ke dni

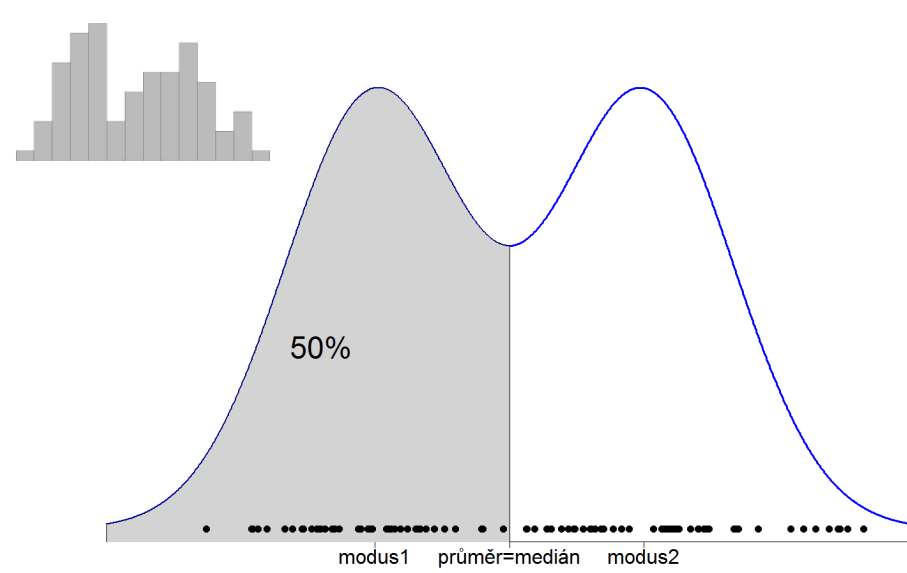
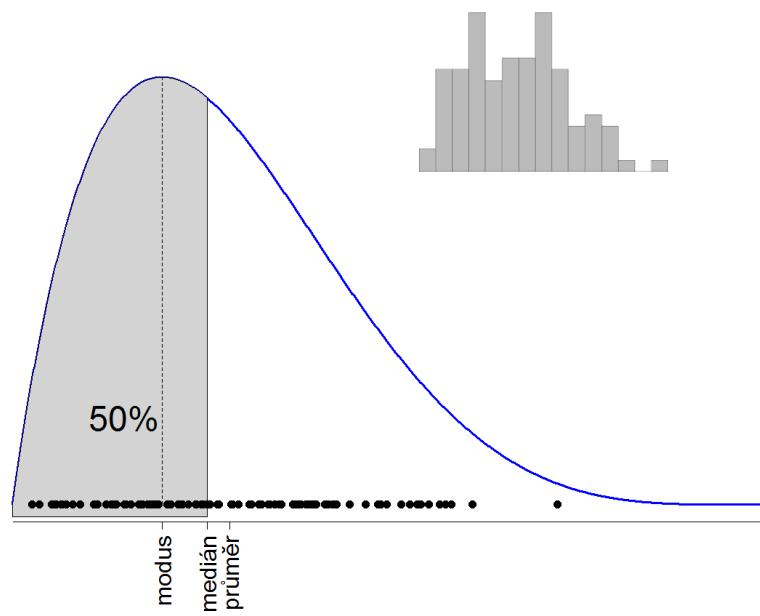
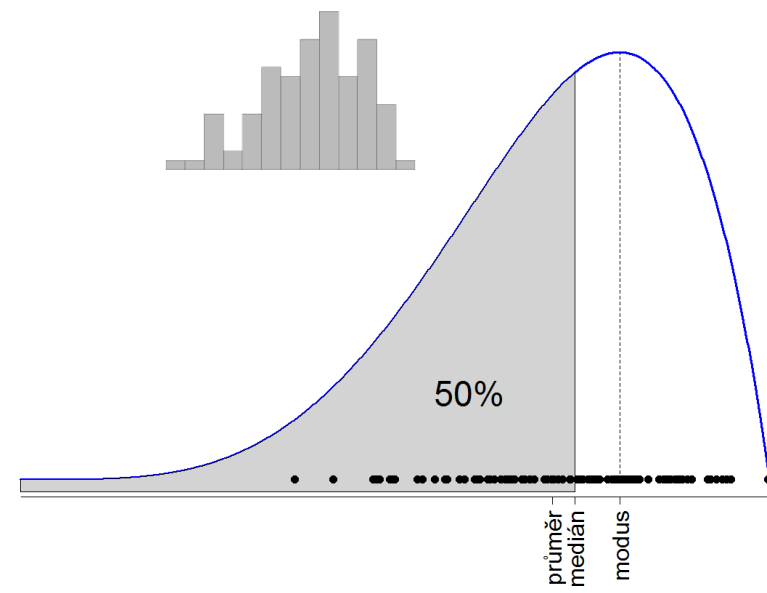
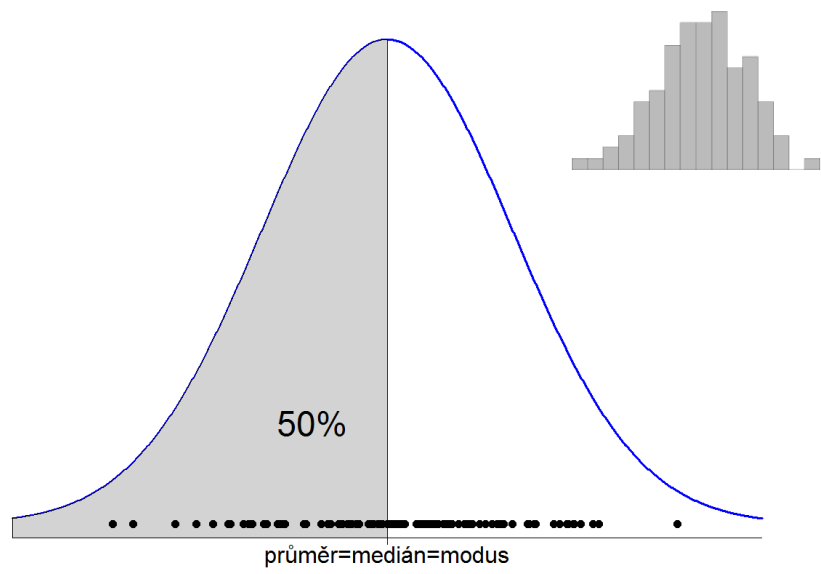
Cycle circadien



- existují delší cykly ve vztahu k fázi měsíce, roku, resp. ročnímu období, rytmus cirkannuální(<https://www.google.com/search?source=univ&tbm=isch&q=cronobiologie>)

...a zpět k jednotkám a referenčním intervalům

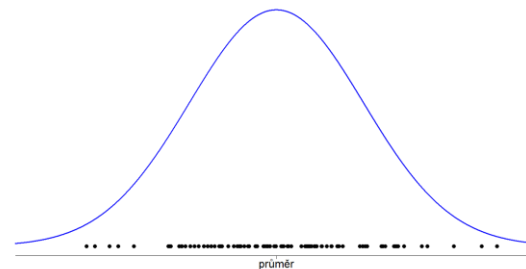
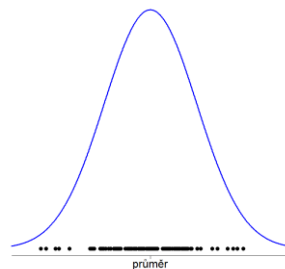
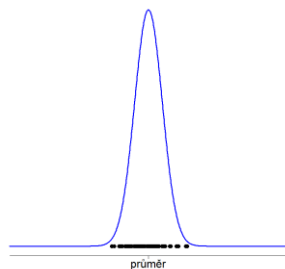
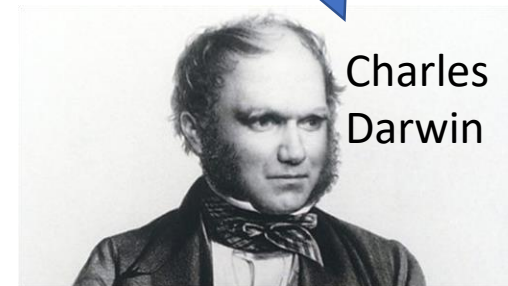
- pojem “normalita” je vztažen ke statistické distribuci (Gaussovo normální rozložení)
- od něj je odvozen tradiční koncept “normálních” hodnot ($\pm 1,96$ SD,)
- v praxi spíše neparametrická rozložení, vyjadřuje se percentily (centil, decil, kvartil, medián je střední hodnota 50. percentilu, modus je hodnotou nejčetnější



Charakteristiky variability

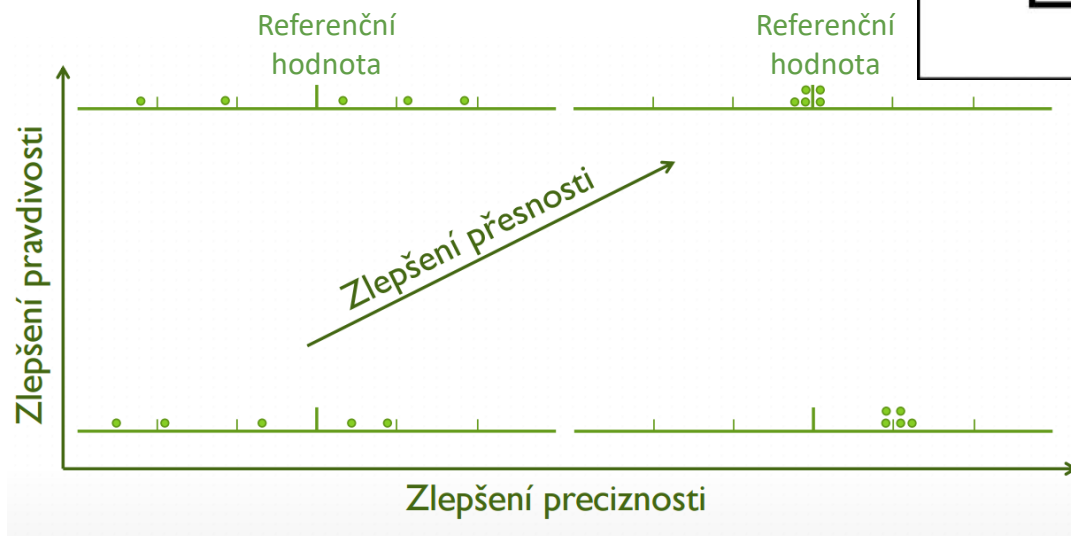
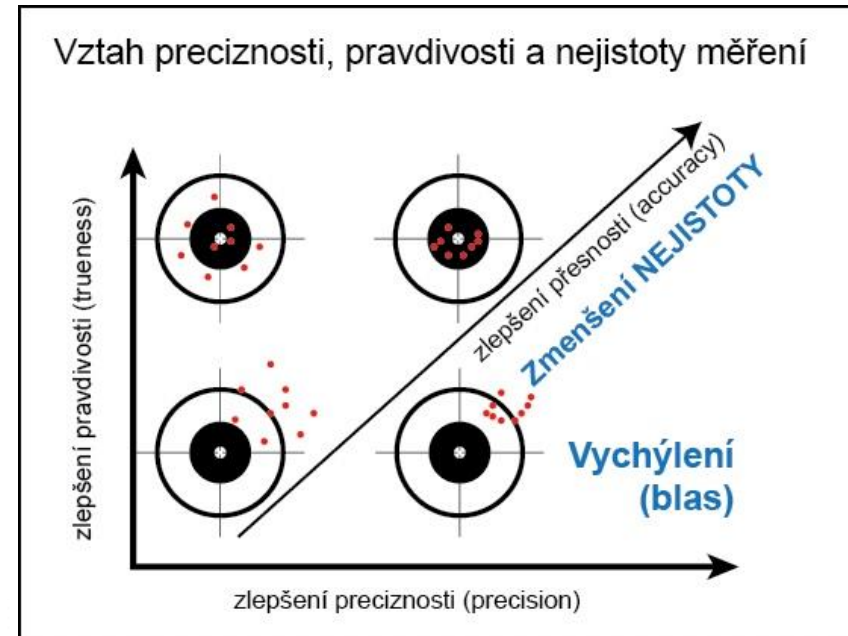
- Směrodatná odchylka (popř. rozptyl)
 - Ukazuje jak se každá jednotlivá hodnota liší od průměru
- Variační koeficient
 - Relativní míra variability vztažená k průměru
- Rozpětí
 - Vzdálenost mezi největší a nejmenší hodnotou
- Mezikvartilové rozpětí
 - Rozpětí 50 % prostředních hodnot

Když jsem v roce 1859 prohlásil, že evoluce postupuje nahromaděním nepatrných rozdílů mezi jedinci, uvedl jsem do biologického myšlení představu nepřetržité variability.



Přesnost, preciznost, pravdivost

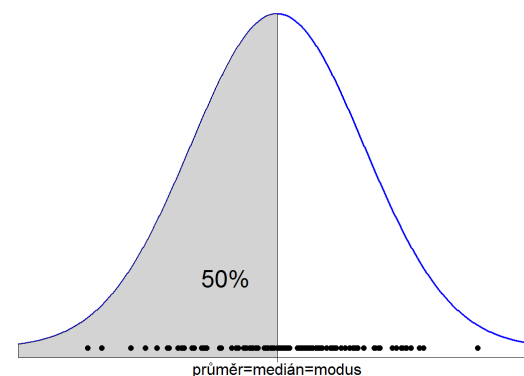
- ▶ Pravdivost = Těsnost shody mezi průměrem opakovaných naměřených hodnot a referenční hodnotou
- ▶ Preciznost = Těsnost shody mezi opakovanými naměřenými hodnotami na stejném objektu
- ▶ Přesnost = pravdivost + preciznost



Normální rozdělení

Norma může označovat něco obvyklého nebo typického, avšak normou označujeme i velmi mocná etická omezení.

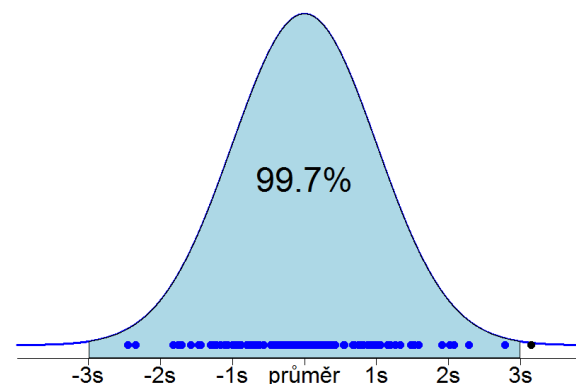
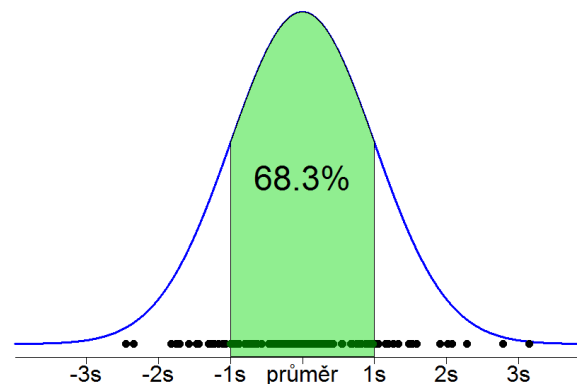
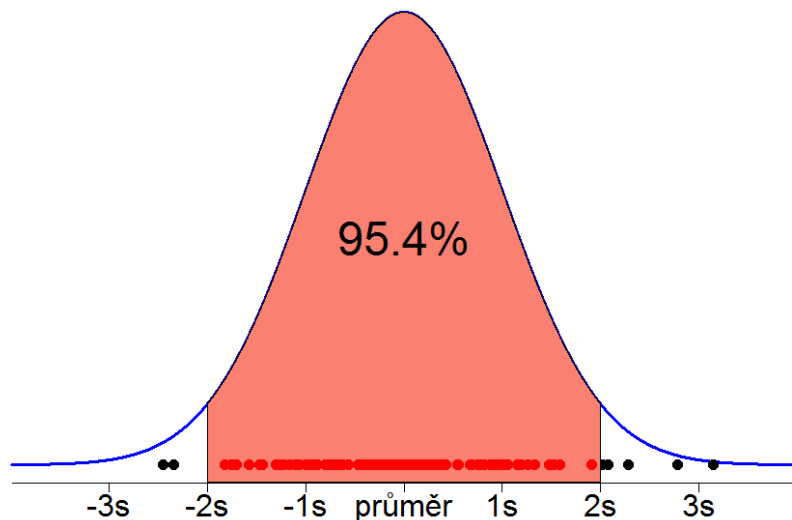
- Modeluje náhodné děje vyskytující se v přírodě či společnosti
- Přesně řídí jen málo veličin, ale jeho význam spočívá v tom, že za určitých podmínek dobře aproximuje řadu jiných pravděpodobnostních rozdělení
- Symetrické rozdělení, které je charakterizováno **střední hodnotou (průměrem)** a **směrodatnou odchylkou**



Normální rozdělení

Norma může označovat něco obvyklého nebo typického, avšak normou označujeme i velmi mocná etická omezení.

- Je základem velkého množství statistických testů
- Referenční rozmezí
- „Zákon chyb“



Měření – odhad skutečné hodnoty

II. Měření provedeme pouze jednou

- Odhady

1. Bodový odhad

Výsledek uvedeme jako: **měření**

2. Intervalový odhad

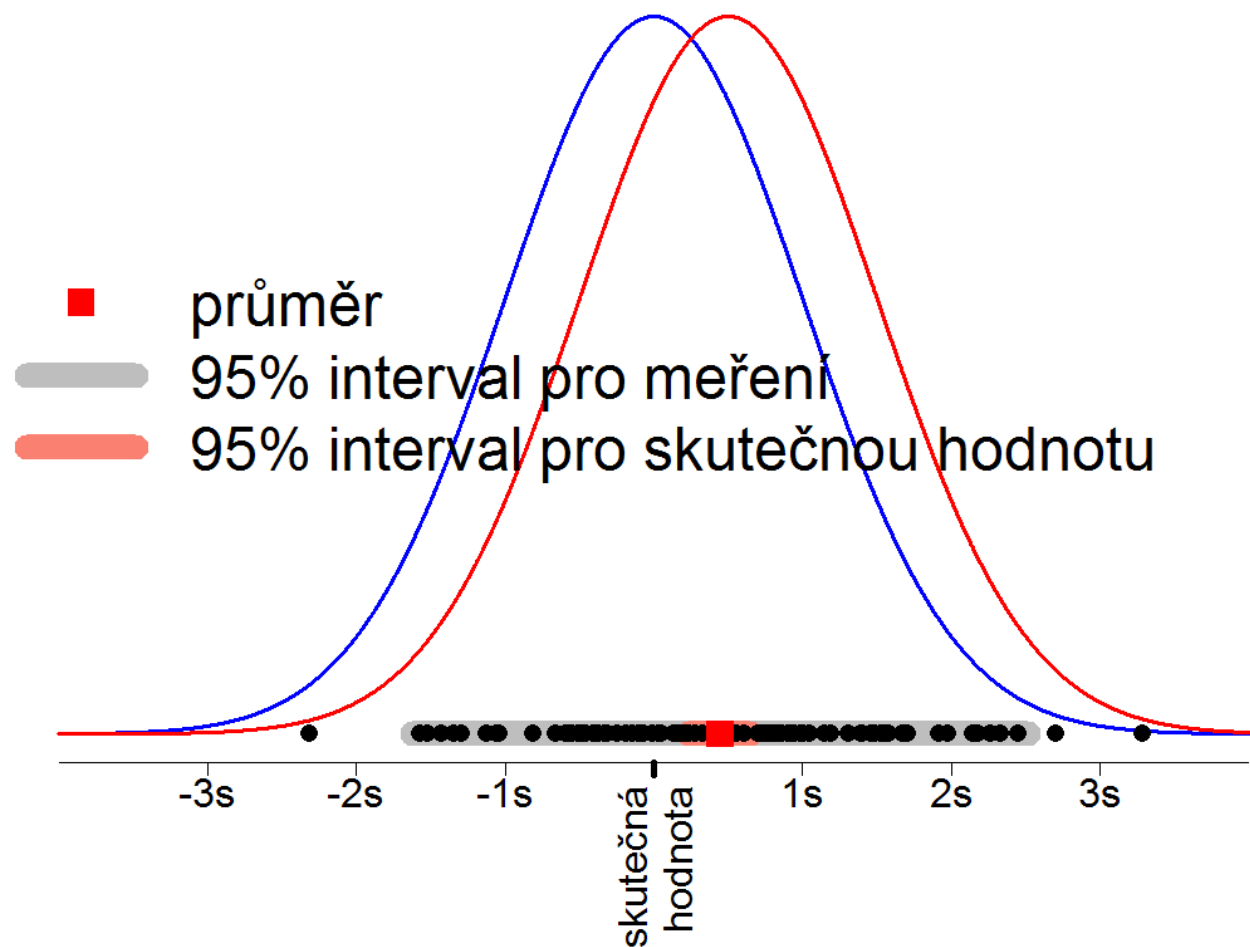
Výsledek uvedeme jako:

měření ± číslo (rozšířená

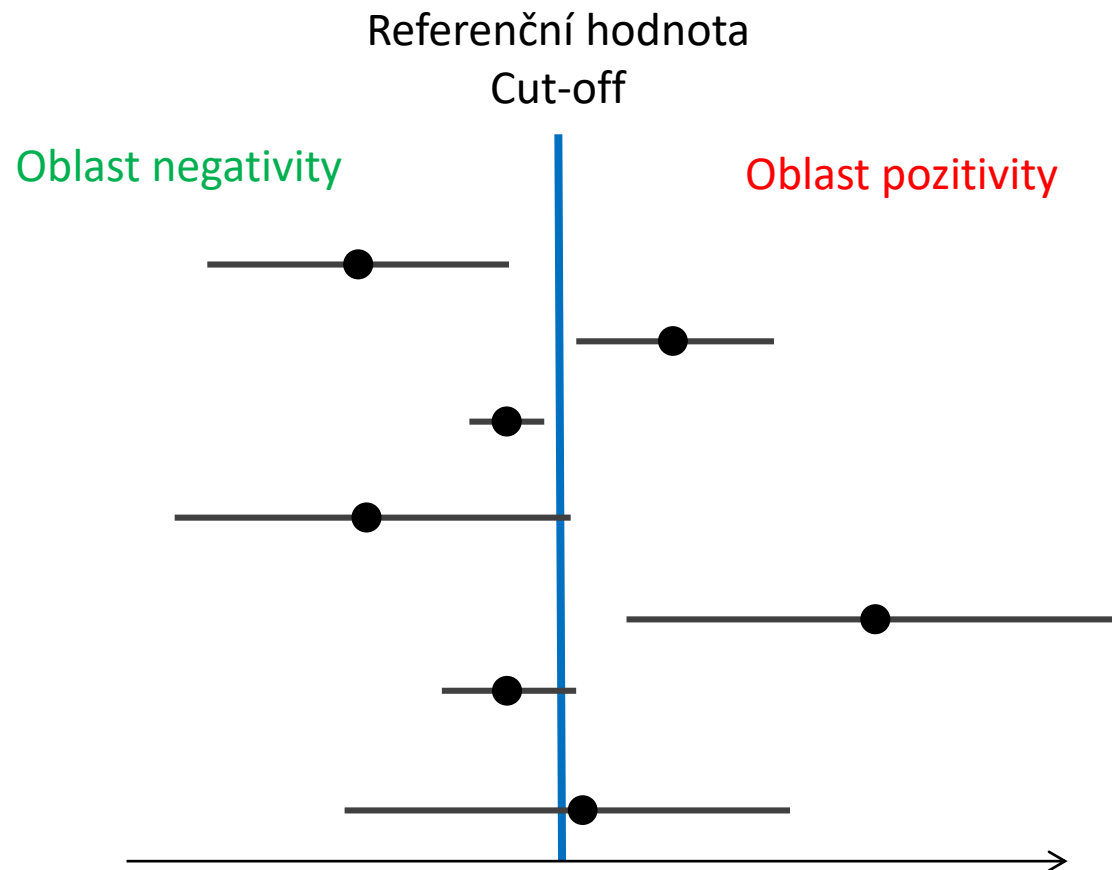
nejistota)

Nejistota = parametr přidružený k výsledku měření, který charakterizuje míru rozptýlení hodnot, které by mohly být důvodně přiřazeny výsledku

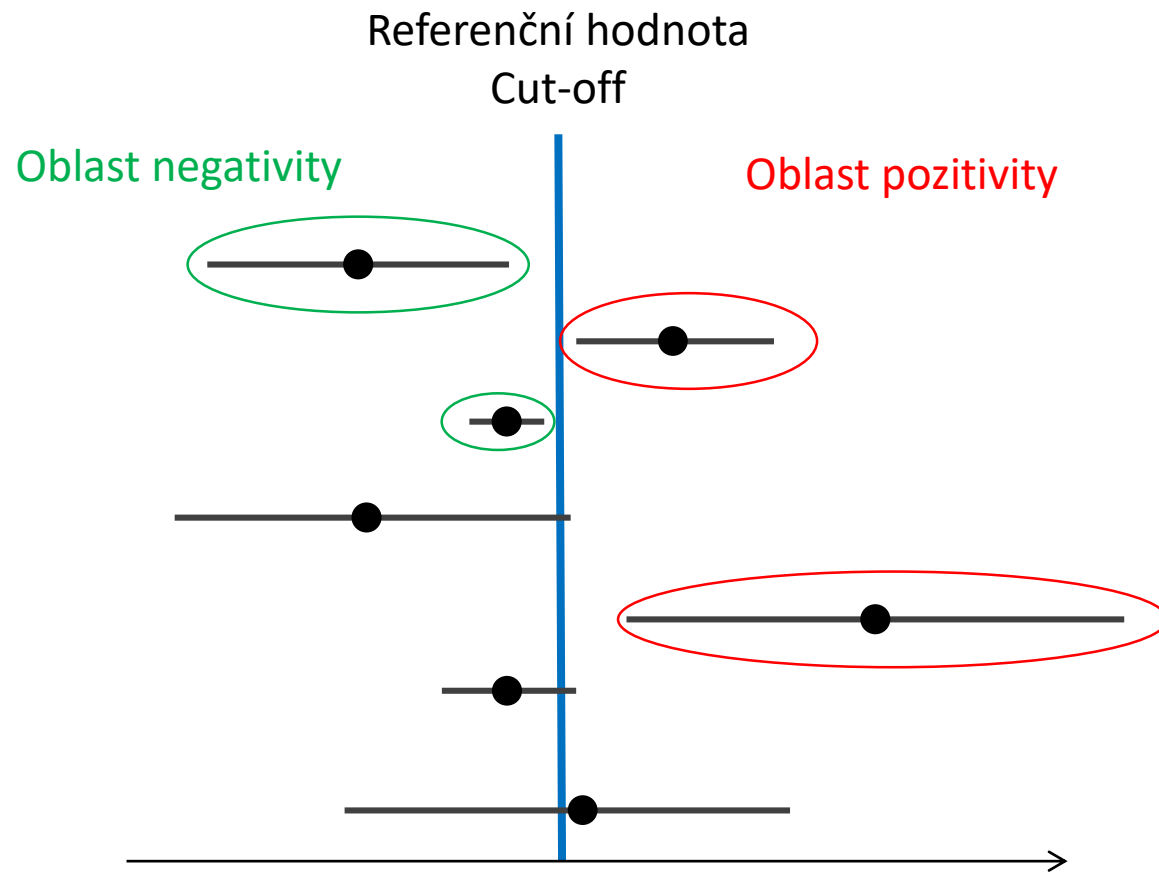
Vychýlení měření



Proč uvádět výsledek měření včetně nejistoty?



Proč uvádět výsledek měření včetně nejistoty?



Referenční rozmezí

=hodnoty laboratorního testu, které ohraničují většinu hodnot referenční populace

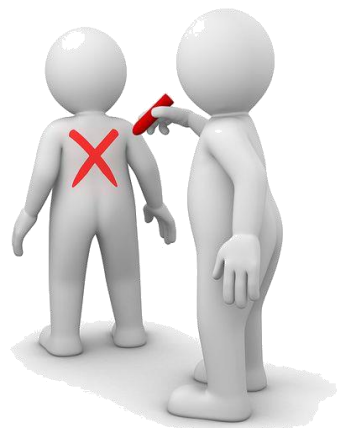
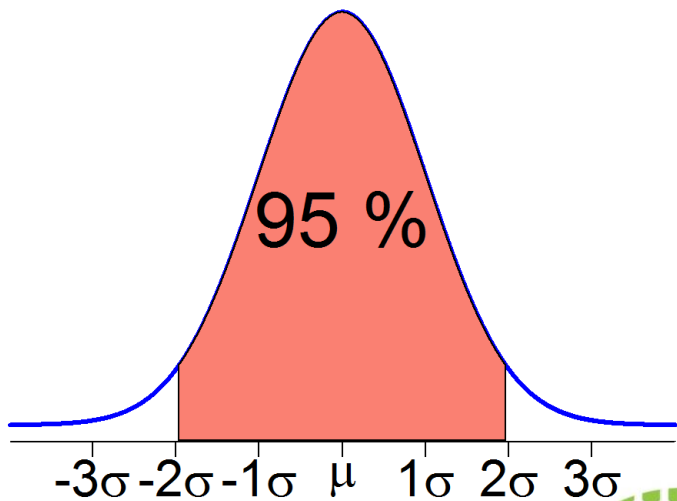
- Co je většina? **95 % (99 %)**
- Hranice (Meze)
 - Oboustranné **DRM-HRM**
 - Jednostranné **pod HRM**
nad DRM
- Co je referenční populace?



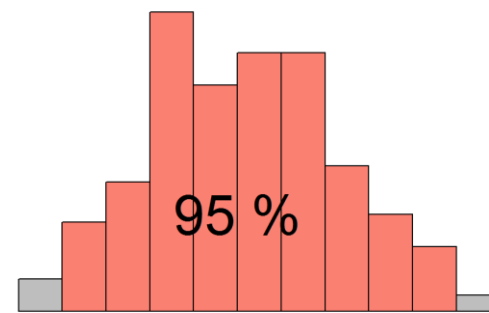
Referenční populace

=množina všech jedinců splňujících určité předpoklady, týkající se jejich zdravotního stavu, případně další definované požadavky (věk, pohlaví, rasa)

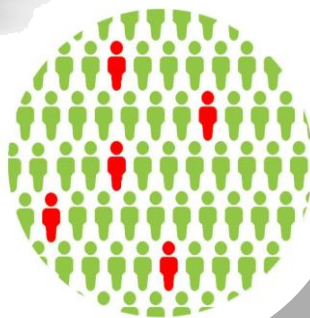
- Zdraví jedinci či jedinci, kteří nemají chorobu ovlivňující příslušný laboratorní ukazatel
- Volba požadavků na referenční jedince, je poměrně problematická záležitost a může zásadně ovlivnit výsledné hodnoty referenčních mezí a jejich interpretaci
- Jedinci s chorobou nejsou uvažování!



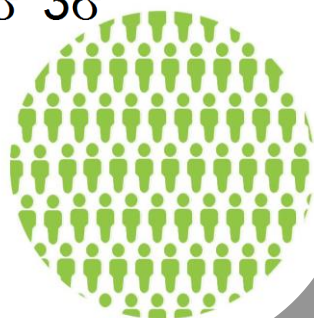
A thought bubble containing the word "Statistics" in a stylized font, surrounded by various mathematical formulas such as $S_x^2 = \frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{x})^2$, $\hat{y} = a + bx$, $\mu = np$, $\sigma = \sqrt{np(1-p)}$, $\mu = \frac{1}{n} \sum x_i$, $r = \frac{S_{xy}}{S_x S_y}$, $a = \bar{y} - b\bar{x}$, $\hat{p} = \frac{\sum x_i y_i}{n_1 n_2}$, $\bar{X} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$, $\binom{n}{k} = \frac{n!}{k!(n-k)!}$, $H_0: p = p_0$, $S_B = \sqrt{\frac{\hat{p}(1-\hat{p})}{n}}$, $z = \frac{\hat{p} - p_0}{S_B}$, $n = \frac{z^2}{\hat{p}(1-\hat{p})}$, $SE = \sqrt{\frac{s^2}{n}}$, and $P(A, B)$. A small bar chart is also visible.



Statistické uvažování



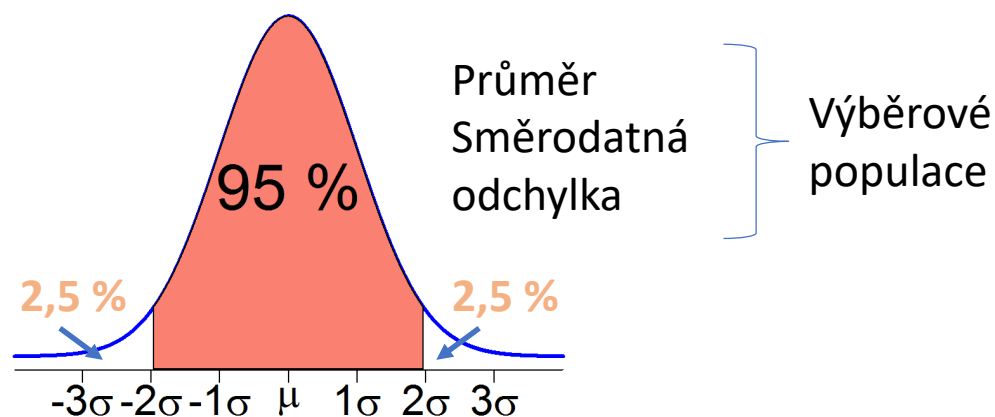
Výběr z referenční populace



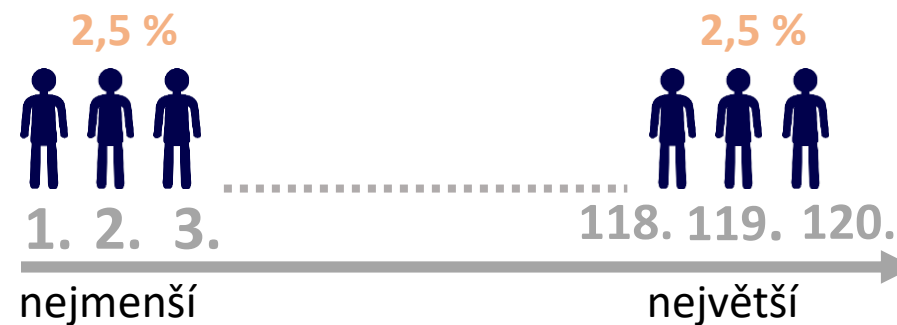
Referenční populace

Metody určení referenčního rozmezí

- Přímý × nepřímý způsob
- Parametrický přístup × neparametrický přístup



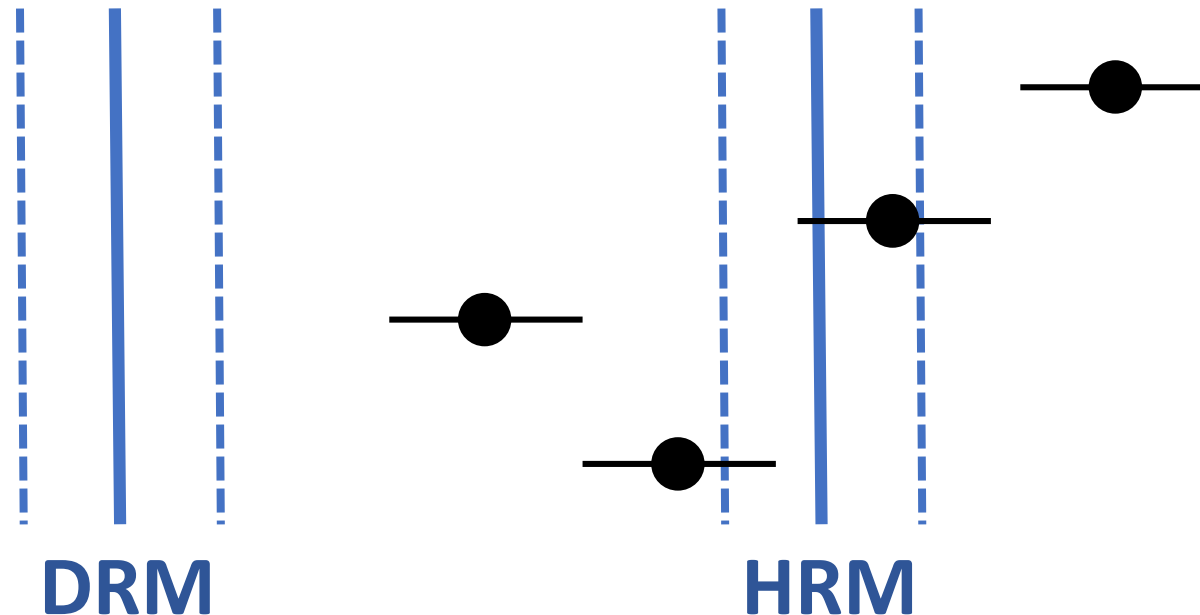
Normální rozdělení



5 % zdravých jedinců bude mít hodnotu parametru mimo referenční rozmezí

Co je třeba uvážit při použití Referenčního rozmezí

- Odhad referenčních mezí je konstruován bodově, ale pro každou mez je možné konstruovat interval spolehlivosti
- Každé měření má svou nejistotu

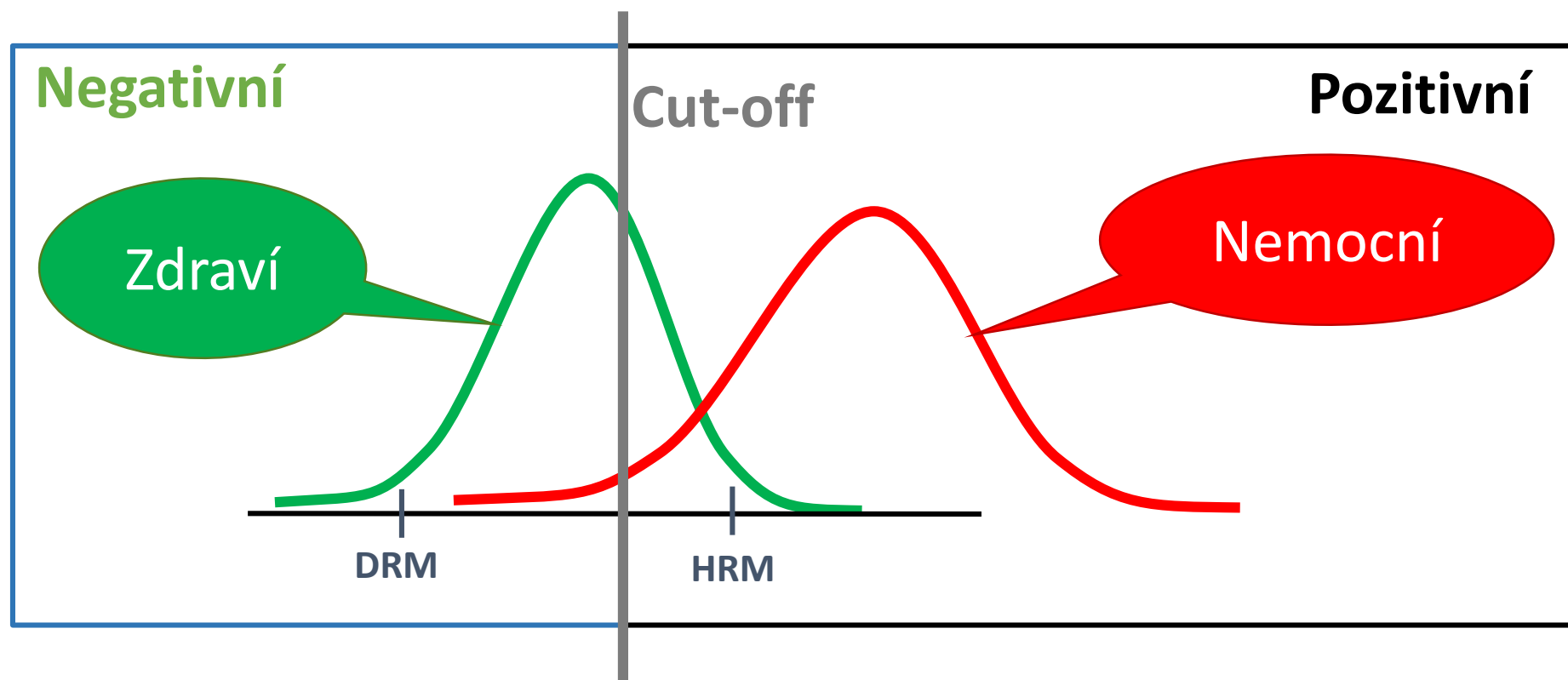


Co je třeba uvážit při použití Referenčního rozmezí

- Požadavky na referenční populaci (rasa, pohlaví,...)
- Výsledek mimo referenční meze(abnormalita) může upozornit na patologický stav
- je třeba kombinace s jinými statistickými nástroji

Rozhodovací mez

=Hodnota výsledku laboratorního testu, podle které se rozliší jedinci s přítomností choroby od jedinců bez její přítomnosti

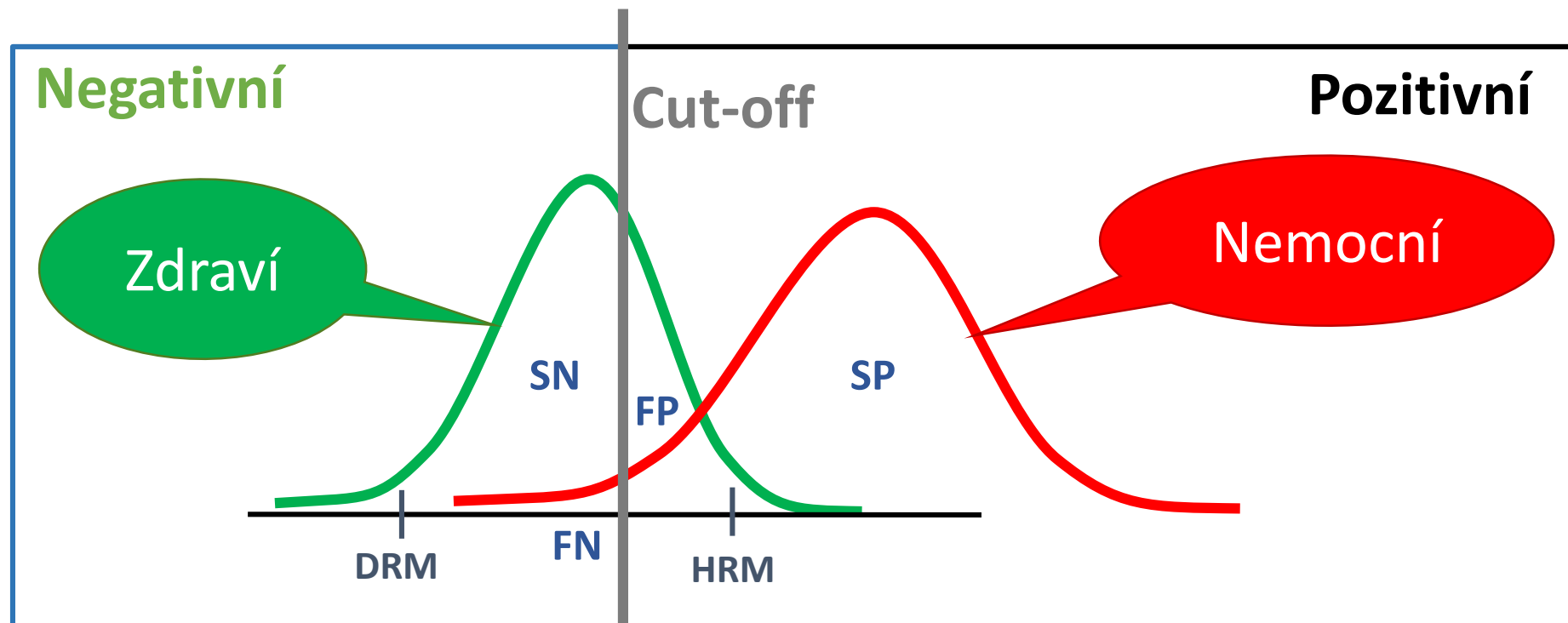


Rozhodovací mez

=Hodnota výsledku laboratorního testu, podle které se rozliší jedinci s přítomností choroby od jedinců bez její přítomnosti

$$\text{Specificita} = \frac{SN}{\text{Zdraví}}$$

$$\text{Senzitivita} = \frac{SP}{\text{Nemocní}}$$

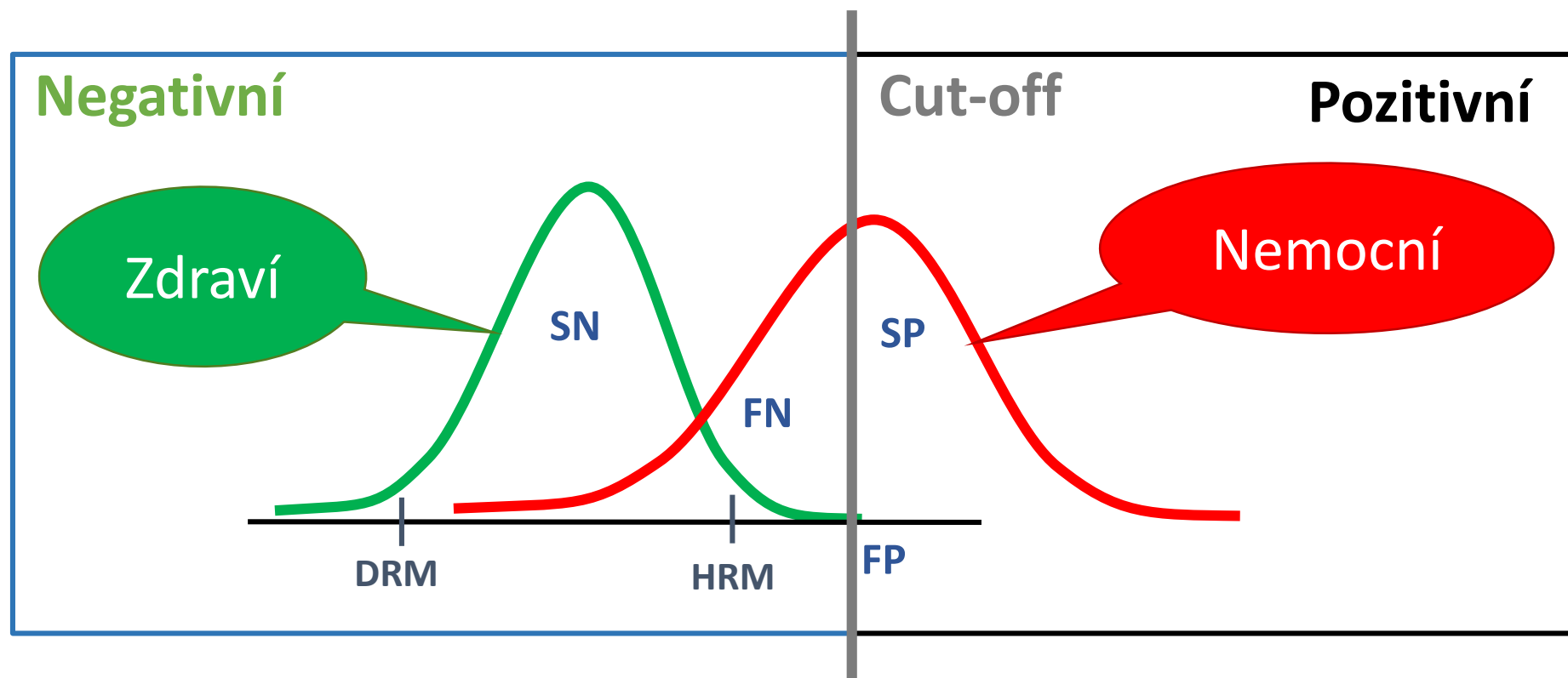


Rozhodovací mez

=Hodnota výsledku laboratorního testu, podle které se rozliší jedinci s přítomností choroby od jedinců bez její přítomnosti

$$\text{Specificita} = \frac{SN}{\text{Zdraví}}$$

$$\text{Senzitivita} = \frac{SP}{\text{Nemocní}}$$

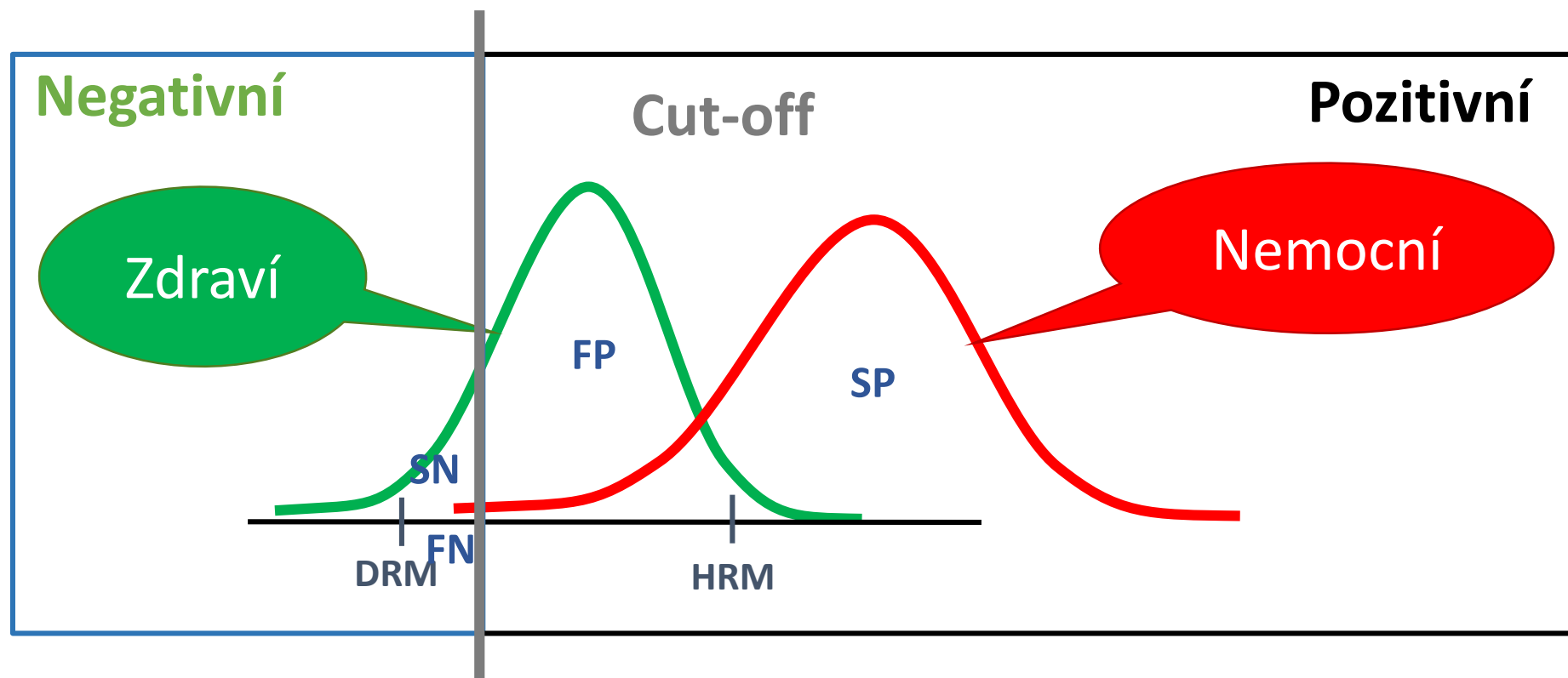


Rozhodovací mez

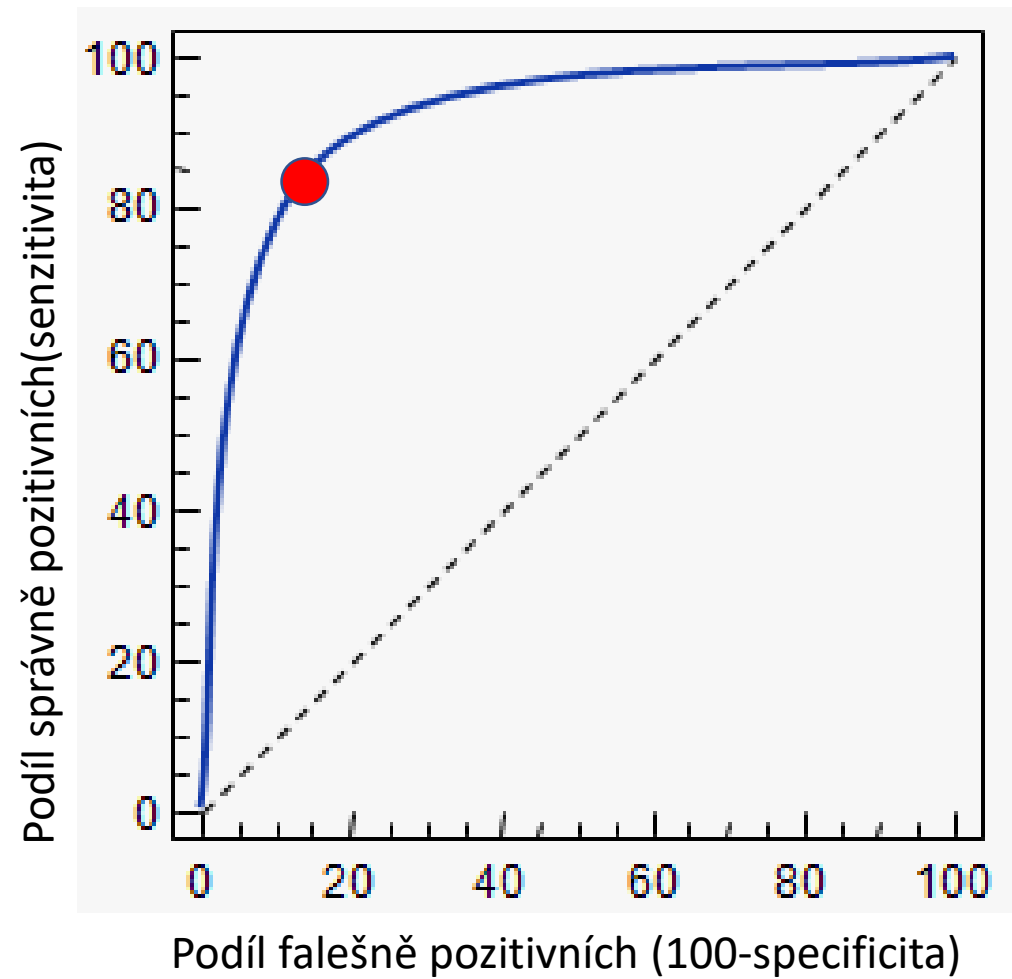
=Hodnota výsledku laboratorního testu, podle které se rozliší jedinci s přítomností choroby od jedinců bez její přítomnosti

$$\text{Specificita} = \frac{SN}{\text{Zdraví}}$$

$$\text{Senzitivita} = \frac{SP}{\text{Nemocní}}$$



ROC křivka



Shrnutí

Referenční rozmezí

- Pouze zdravá populace
- Překročení signalizuje abnormalitu
- Mají svou nejistotu
- Zdravý jedinec bude mít výsledek mimo referenční meze s pravděpodobností 5 %

Cut-off

- Populace s chorobou i bez
- Překročení je spojeno s lékařskou akcí
- Bodový pojem
- Zdravý jedinec přesáhne cut-off s pravděpodobností (100-specificita) %

,...děkuji za pozornost

- statistická část:
- RNDr. Bc. Iveta Selingerová,
Ph.D., MOÚ, FÚ LF MU