

Biologická a analytická variabilita

Richard Průša

Ústav lékařské chemie a klinické biochemie
2.LF UK a FN Motol

Předmět klinická biochemie

- Správná indikace laboratorních vyšetření (správné soubory, kombinace testů)
- Správná interpretace laboratorních výsledků (nálezového listu)
- Znalost principů analytických metod k posouzení senzitivity, specificity a možných interferencí (např. lékových)

Základní posouzení výsledku pomocí:

- Referenčních mezí
dle věku, pohlaví, etnika, indexu individuality
- Klinické významnosti rozdílů výsledků v čase
podle:
delta check, CD (kritické difference), RCV
(reference change value)
- Rozhodovacího limitu (hodnoty cut-off)
- Biologického poločasu analytu

„Normální“ hodnoty

- Referenční meze – **ráno, na lačno**
- Subject-based – intraindividuální biol.var.
- Population-based – interindivid. biol. var.
- „zdravá“ populace, n=? (120 vs. 20)
- Závislost ref. mezí na věku, pohlaví, etniku
- Pediatrické a geriatrické refer. meze
- Závislost na metodě (biochemické OK, imunochemické zatím jen některé – TSH, PSA, PCT)

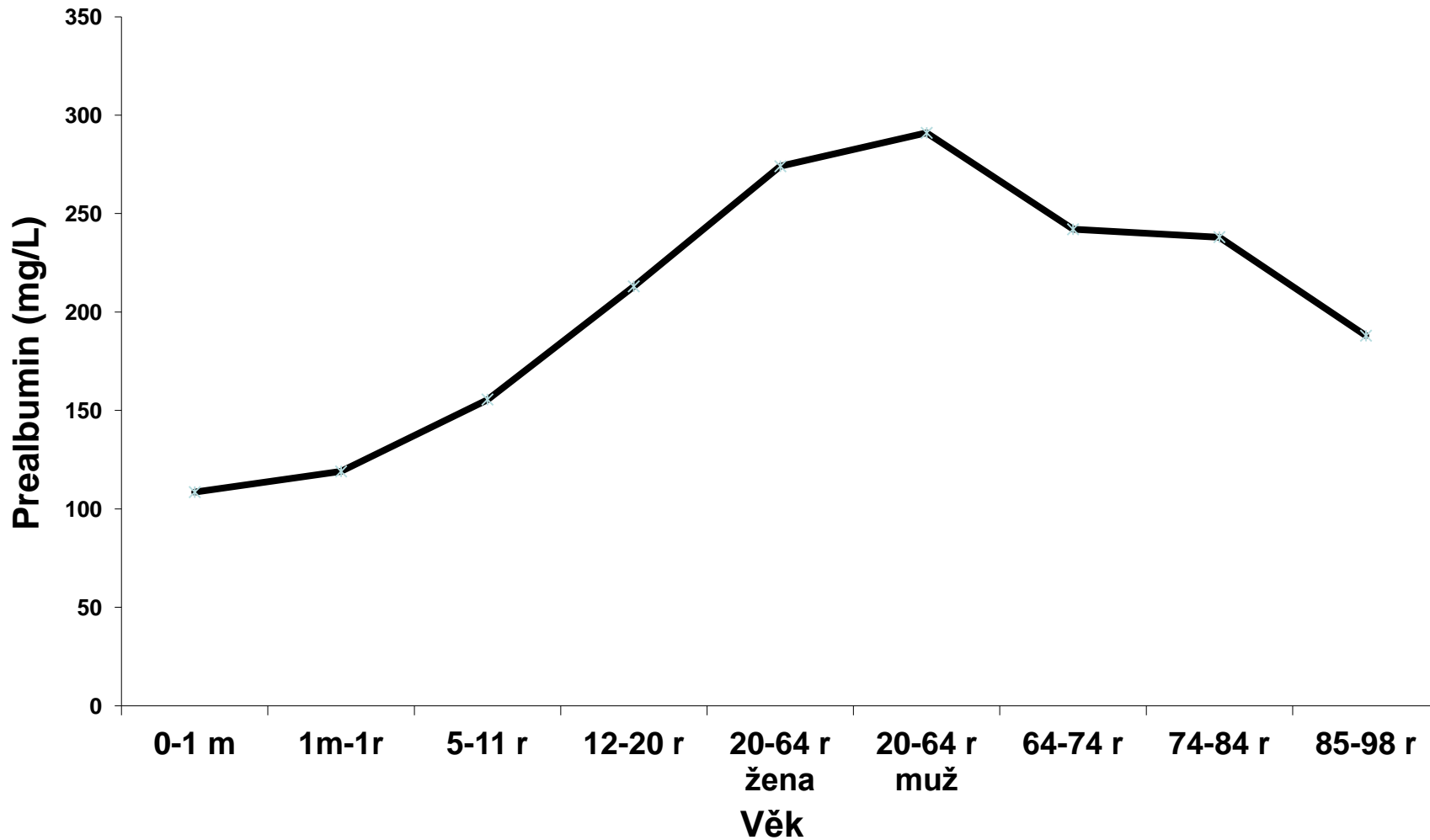
Referenční meze

- Aritmetický průměr \pm 2SD
- 2,5 – 97,5 %, event. 99. percentil (př. hs-cTnI)
- 5 % zdravých je mimo referenční meze
- Rozložení dat – normalita, semilog. (př. TSH, HDL-
chol, kalciurie), bifázické
- Přesah zdravé a nemocné populace
- Nemocniční populace – Hoffmanova metoda
- Chauventova nebo Dixonova kriteria

Zdroje biologické variability

- Biorytmy (denní, sezonní) – př. Fe, TSH – 50% rozdíl mezi 8.00 a 14.00
- Věk (gestační, postnatální)
- Homeostáza (př. prepubertální, postmenopauzální, menstruační cyklus)
- Pohlaví a gender, transG (př. kreatinin)
- Etnikum (př. amyláza, CK)
- Patologie (př. IgM – akutní bronchopneumonie)
- Stimuly: jídlo, fyzická aktivita, čaj, káva, nikotin, alkohol apod.

Prealbumin – závislost na věku



Ontogeneze biochemických hodnot

- cTnI (v 1.m až do 4,8 ug/l, do 3.m až 0,7)
- BNP, NT-proBNP
(v 1.m. až 30x vyšší, v 1.r. až 10x vyšší)
- Beta2-mikroglobulin
(v 1.m až 5 mg/l, ev. až do půl roku)
- Měď (poloviční až do 6 m, třetinové u novorozenců – do 7 umol/l)
- Mangan (2x vyšší hodnoty až do 2 let: 70 nmol/l)
- Aldosteron (gest.věk, velké změny a široký RI)
- Kyselina hyaluronová (první 3 m až 5x vyšší)

Kreatinin (umol/l)

Postnatální věk	Gest.věk 28 t	Gest.věk 36 t
2 d	40 – 220	23 – 143
7 d	23 – 145	16 – 98
14 d	18 – 118	12 – 80
21 d	16 – 104	11 – 71
28 d	15 – 95	10 – 64

Konzultace č. 9

- Žena, 47 let, výška 182 cm, m = 79 kg
- S-kreatinin = **97** umol/L (opakovaně)
(enzymová metoda, Siemens, Advia 1800)
- Horní referenční mez **85** umol/L

- Příčina?
- 0,4 %, tj. 40.000 obyvatel v ČR je transG
- (USA 1.400.000, cca 5.000 v aktivní službě v armádě)

Intraindividualní biologická variabilita

- Referenční meze – populační – **interindiv.**
- **Intraindividualní variabilita**
- Homeostatický bod (hodnota)
- Variační koeficient
- S-Na 1 % (vs. 135 – 145 mmol/l)
- S-kreatinin 10 % (vs. např. 40 – 80 μ mol/l)
- S- osteokalcin 50 %
- Index individuality: 0,6 – 1,4

Analytická variabilita

- Pokud možno variační koeficient menší nebo stejný jako VK intraindividuální BV
- Např. VK S-Na = 1 %
- Závislý na metodě:
- S-kreatinin Jaffé, VK = 10 %
- S-kreatinin enzymová metoda, VK = 4,5 %
- Analytický VK podobný v různě vysokých hodnotách: S-kreatinin 100 vs. 500 $\mu\text{mol/l}$

Delta check a kritická diference

- Odpověď na otázku, zda je rozdíl dvou po sobě následujících výsledků u pacienta už klinicky významný (vzhledem k přítomné biologické a analytické variabilitě)
- Příklad: vzestup S-kreatininu ze 100 na 118 $\mu\text{mol/l}$
klinicky významný ano či ne?
- Např. cholesterol (léčba), PSA (relaps), cTnI (dg. AIM)
- Delta check – prostý absolutní rozdíl nebo relativní rozdíl v % (př. hs-cTnI, kreatinin)
- Kritická diference – výpočet pomocí znalosti variačních koeficientů analytické a intraindividální biologické variability obvykle na hladině pravděpodobnosti 95 %
- RCV – do výpočtu zahrnuje také populační variabilitu

Cut-off, rozhodovací limit

- Nahrazuje dolní nebo častěji horní mez referenčního intervalu pro dosažení větší senzitivity nebo specifity vyšetření
- Vždy spojen s konkrétní diagnózou (př. CA 19-9: karcinom pankreatu vs. mucinosní ovariální karcinom)
- Např. TSH v novorozeneckém screeningu (senzitivita – téměř 100 %), PCT pro diagnostiku sepse (specifita téměř 100 % pro hodnoty 20x vyšší než horní RM), PSA, NSE, cTnI
- Mění se podle guidelines odborných společností (podle pokroku v diagnostice a léčbě)
- Arbitrární cut-off: glykemie, cholesterol, LDL-cholesterol

Biologický poločas - příklady

- AST, ALT, CK (hepato- a myo- toxická noxa)
- Glykovaný Hb (diabetes mellitus), 60 dnů
(pozor! variabilní Hb a hemoglobinopatie – heterozygoti = odlišný T1/2)
- PTH (peroperační, úspěšnost operace), 8 min
- Nádorové markery, pooperačně úspěšnost operace (AFP 5 dnů)
- CDT (bez sacharidový transferin) (abusus etanolu), 8 dnů

Speciální pojmy - příklady

- Reflexní testování
(TSH – fT4, paraprotein – imunofixace)
- High (ultra) senzitivní metody:
hs-Tg, hs-CRP, hs-PSA, hs-cTnI apod.
- Lipemický, hemolytický a ikterický index
(možné analytické interference)

Quantifying Biological Variation

How are you going to quantify biological variation?

You have to dissect out the components of variance: -

$$\sigma^2_{\text{total}} = \sigma^2_{\text{Analytical}} + \sigma^2_{\text{Individual}} + \sigma^2_{\text{Group}}$$

Evaluating the significance of change in serial results.

- **Critical Difference or Reference Change value indicates the value by which 2 serial results must differ to be considered statistically significant: -**

$$CD = 2^{1/2} * Z * (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}$$

Probability = 95% Z = 1.96

Probability = 99% Z = 2.58

- **Only valid if the variance of $\sigma^2_{\text{Individual}}$ is homogenous.**

(Costongs J Clin Chem Clin Biochem 1985;23:7-16)

Multipliers for $(CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}$ to Obtain Critical Difference at Different Levels of Probability

Multiplier ($2^{1/2} * Z$)	3.64	2.77	2.33	1.81	1.47	1.19	0.95
Probability of false alarm	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50
Probability	99%	95%	90%	80%	70%	60%	50%

Significance of Change?

63 year old patient: Cholesterol 1 = 6.60 mmol/L
Cholesterol 2 = 5.82 mmol/L

Significant change ?

$$CV_a = 1.6\% \quad CV_I = 6.0\%$$

$$RCV = 2^{1/2} * Z * (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}$$

$$95\%RCV = 1.414 * 1.96 * (1.6^{1/2} + 6.60^{1/2})^{1/2} = 17.2\%$$

$$99\%RCV = 1.414 * 2.58 * (1.6^{1/2} + 6.60^{1/2})^{1/2} = 22.6\%$$

$$\text{Actual Change} = ((6.60 - 5.82)/6.60)*100 = \mathbf{11.8\%}$$

Dispersion = $Z^* (SD^2_A + SD^2_I)$

Dispersion of first result = result \pm 1.96 SD : -

95% level 6.60 = 5.80 – 7.40

99% level 6.60 = 5.54 – 7.66

Dispersion of 2 result

95% level = 5.82 = 5.11 – 6.53

99% level = 5.82 = 4.89 – 6.75

Overlap: therefore neither significantly or highly significantly different

Can use the formula to ascertain the probability that change is significant. Calculate Z using the $\left(\frac{6.6 - 5.82}{6.6}\right) * 100\%$ as RCV and look up in tables. **82% in this case.**

Assessing the utility of reference intervals.

- **Utility of population based reference data?**
- **Ratio of Within to Between subject variances.**

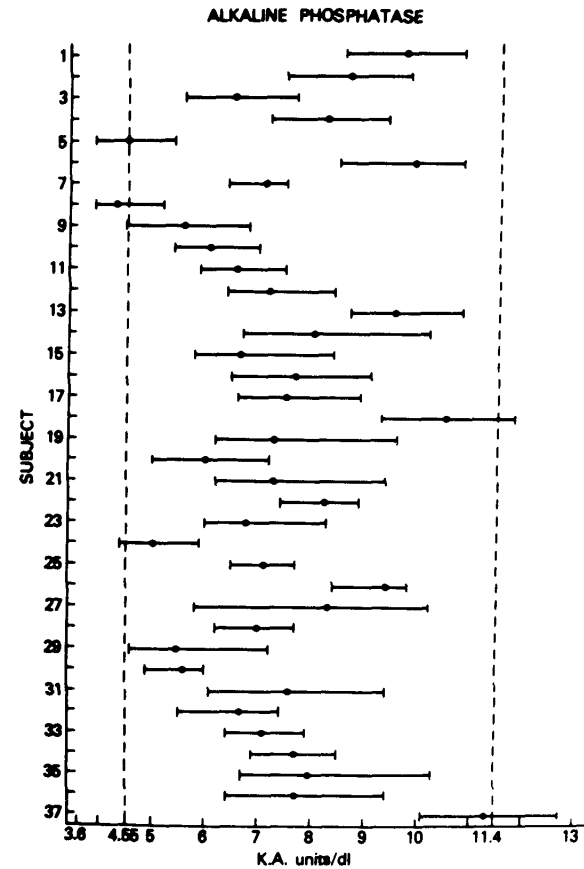
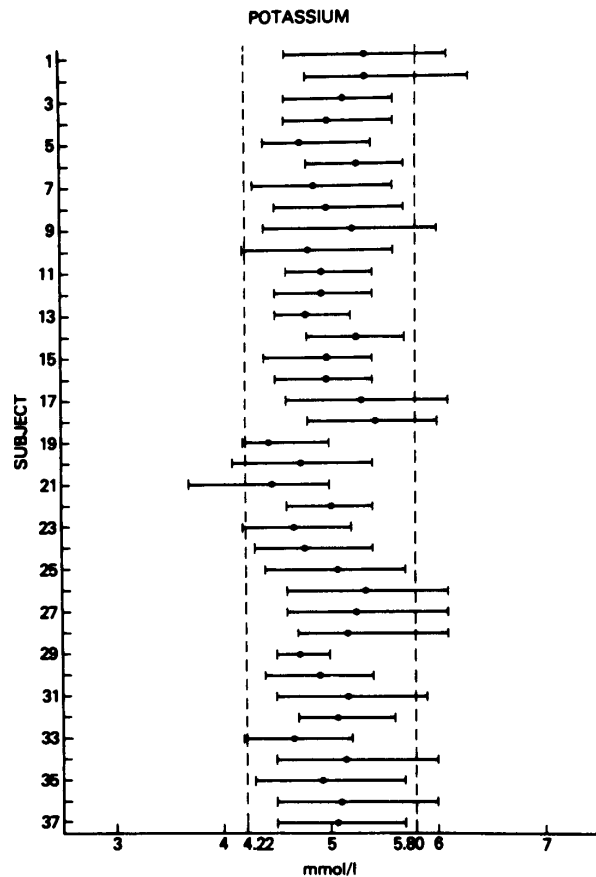
$$\text{Index of Individuality} = CV_I / CV_G$$

Population Ref Intervals: -

Index ≤ 0.6 = Limited in Value

Index ≥ 1.4 = Applicable

Biological Variation & Utility of Reference Intervals



Number of specimens required to estimate homeostatic set points: -

Cholesterol testing

How many samples (n) required to estimate set point within $\pm 5\%$ given: -

$CV_I = 4.9\%$ $CV_A = 3\%$
(Recommended)

Substitute equation: -

$$n = (Z \cdot CV_{A+I} / D)^2$$

$$n = [1.96 \cdot (3^2 + 4.9^2)^{1/2} / 5]^2 = 5.07$$

RCV at 95% and Number. of Specimens Required to Assess the Homeostatic Set Point at Different Levels of Imprecision

<u>CV_A</u> <u>(%)</u>	<u>CV_I</u> <u>(%)</u>	<u>RCV^a</u> <u>(%)</u>	<u>Number of</u> <u>specimens^b</u>
2.0	4.7	14.1	4
3.0	4.7	15.4	5
4.0	4.7	17.1	6
5.0	4.7	19.0	7
6.0	4.7	21.1	9
7.0	4.7	23.4	11
8.0	4.7	25.7	13
9.0	4.7	28.1	16
10.0	4.7	30.6	19
15.0	4.7	43.5	38
20.0	4.7	56.9	65

^aRCV ($p_{\leq 0.05}$) = $2.77 (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}$, assuming no statistical evidence of heterogeneity

^bNumber = mean result is within $\pm 5\%$ of homeostatic set point $1.96^2 \times (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2} / 25$.