

RAZVOJ BIOMARKERA NA PRINCIPIMA MEDICINE ZASNOVANE NA DOKAZIMA

Nada Majkić-Singh

Institut za medicinsku biohemiju, Farmaceutski fakultet i Klinički centar Srbije, Beograd

Kratak sadržaj: Dva su osnovna razloga za izbor i dobijanje dobrog biomarkera. Prvo biomarker se koristi za otkrivanje veličine fiziološkog poremećaja, a zatim za postavljanje dijagnoze. Veličina odstupanja rezultata od normalnih vrednosti obezbeđuje informaciju o težini poremećaja fiziološkog stanja pacijenta. Upravo zato *laboratorijska medicina zasnovana na dokazima* (eng. evidence-based laboratory medicine, EBLM) koristi najbolje dokaze koji se dobijaju u vidu rezultata laboratorijskih testova da bi se donele odluke o zbrinjavanju svakog pojedinačnog pacijenta. Ovaj pristup je moguć jedino na osnovu objedinjavanja laboratorijskih i kliničkih iskustava o načinu lečenja koja proizilaze iz sistematskih istraživanja u ovim oblastima. To znači da se definicija EBLM zasniva na dva elementa: iskustvu i dokazima koji potiču iz sistematskih istraživanja. Shodno ovome, brojni su faktori koji su poslednjih 30 godina uticali na formiranje mišljenja i pokreta poznatog pod imenom *Evidence-Based Medicine* i skraćenicom EBM. Jedan od faktora je da se svaki lekar susreće sa brojnim medicinskim informacijama koje potiču iz različitih izvora, drugi faktor je globalni fenomen povećavanja troškova lečenja, a treći je da su pacijenti danas i sami dovoljno edukovani da zahtevaju najbolju dijagnostiku i lečenje. To znači da se medicina koja se zasniva na dokazima mora oslanjati na sve tri napred navedene pretpostavke. Protokoli koji se pripremaju za lečenje obolelih moraju uzeti u obzir efikasnost i efektivnost zdravstvene službe. Da bi se ovo ostvarilo laboratorijski stručnjaci moraju pažljivo odabirati laboratorijske testove, pomoću kojih će se dobiti najviše kliničkih informacija. Prema tome, *laboratorijska medicina zasnovana na dokazima* ima za cilj da podržava kliničku dijagnozu i zbrinjavanje oboljenja primenom novih znanja koja dovode do standardne procedure koja će omogućiti laboratorijsko ispitivanje. U laboratorijskoj medicini broj testova se stalno povećava; uvode se novi testovi, međutim stari testovi se retko skidaju sa programa. S obzirom na to da su troškovi zdravstvenih fondova ograničeni, to nameće potrebu izbora onih testova koji će pružiti najviše dijagnostičkih informacija. Oni moraju biti izvedeni u laboratoriji koja je osigurala dobru laboratorijsku praksu u preanalitičkoj, post-analitičkoj i analitičkoj fazi laboratorijskog dijagnostičkog procesa. Shodno navedenom ovde se opisuje izbor, metodologija i faze *laboratorijske medicine zasnovane na dokazima* radi primene iste pri odabiru biomarkera.

Ključne reči: biomarkeri, medicina zasnovana na dokazima, laboratorijska medicina zasnovana na dokazima, izbor

Uvod

Današnja generalno prihvaćena definicija medicine zasnovane na dokazima (eng. Evidence-Based Medicine, EBM) koju su postavili Sackett i sar. (1) govori o »savesnoj, tačnoj i razumnoj primeni trenutno najboljih dokaza za donošenje odluke pri zbrinjavanju

nju pacijenata« (eng. »*the conscientious, explicit and judicious use of current best evidence in making decisions about the care of individual patients*«).

Navedena definicija *medicine zasnovane na dokazima (EBM)* profesora Davida Sackett-a i njegovih saradnika specifično uključuje patološka i dijagnostička ispitivanja, s obzirom na to da značajno doprinose dijagnostičkom pristupu u celini. To znači da primena EBM zahteva integraciju individualne kliničke ekspertize sa najboljim raspoloživim spoljnim kliničkim dokazima iz sistematskog istraživanja.

Navedena definicija može se direktno primeniti i na laboratorijsku medicinu uzimajući u obzir da je

Adresa autora:

Prof. Dr. Nada Majkić-Singh
Institut za medicinsku biohemiju
Klinički centar Srbije
Višegradska 26, 11000 Beograd
e-mail: singh@eunet.yu

zahtev za dijagnostičkim ispitivanjem deo procesa pri donošenju odluke, kao i da ova vrsta dijagnostike stalno podleže preispitivanju nivoa kvaliteta, naročito ako su u pitanju novi testovi. Treba naglasiti da je primena dijagnostičkih testova uvek interventna (2). Naime, dijagnostički test treba zahtevati onda kada je pitanje postavljeno i kada je očigledno da bi dobijeni rezultat pružio odgovor na postavljeno pitanje. Postoji više razloga zbog kojih lekar zahteva dijagnostičko laboratorijsko ispitivanje (3); u svakom slučaju priroda postavljenog pitanja i donošenje zaključka najčešće zavisi od kliničke slike pacijenta.

Susret između pacijenta i lekara je direktan, dok su laboratorijski stručnjaci u dijagnostički proces uključeni indirektno. Međutim i jedni i drugi imaju zadatak da primenom najboljih medicinskih dokaza pomognu pacijentu do izlečenja (4). Da bi se ovo ostvarilo laboratorijski stručnjaci moraju pažljivo odabrati laboratorijske testove, pomoću kojih će se dobiti najviše kliničkih informacija. Prema tome i *laboratorijska medicina zasnovana na dokazima* (eng. *evidence-based laboratory medicine, EBLM*) ima za cilj da podržava kliničku dijagnozu i zbrinjavanje oboljenja primenom novih znanja koja dovode do standardne procedure koja će omogućiti najbolje laboratorijsko ispitivanje. Dobijanje najboljih mogućih rezultata laboratorijskih ispitivanja omogućiće lekarima da uspešno donose dijagnostičke, prognostičke i terapijske odluke.

S obzirom na to da je cilj postizanje najbolje kliničke odluke za svakog pacijenta, primenom sistema kvaliteta uvek će se preispitivati da li je sprovođenje zdravstvene nege odgovarajuće, efikasno i efektivno. Ova tri zahteva se mogu ostvariti primenom kliničkih protokola i uputstava, kao i merenjem samog ishoda (5).

Klinički protokoli su sistematski razvijena uputstva pomoću kojih lekar ostvaruje brigu o pacijentu pod specifičnim kliničkim okolnostima (6). Protokol ima za cilj da ukaže kako pacijenta treba tretirati, kao i da omogući ostvarivanje veće konzistentnosti u zdravstvenoj službi. Zato je proces razvoja protokola veoma značajan i isti mora biti primenljiv na kliničku praksu (7). Klinička uputstva izrađuju eksperti, sa ciljem opšte primene. Uputstva će biti primenljivija ukoliko sadrže potvrđene činjenice. Međutim, protokoli nisu »kuvari u medicini«, već dozvoljavaju odgovarajuću kliničku slobodu (8, 9).

Protokoli za lečenje većine oboljenja moraju biti ugrađeni u strukturu procesa lečenja. Ako se pri tom postupak lečenja ne sprovede optimalno (npr. suviše rano ili suviše kasno), čak i najbolji protokoli biće neefikasni i neefektivni. Iz ovog razloga svaki stupanj u zbrinjavanju bolesnika treba da bude standardizovan kako bi se postigao najbolji rezultat. Značajna komponenta u šemi lečenja je tzv. *obrotno vreme izvođenja laboratorijskog testa* (eng. *turaround time, TAT*), koje se računa od momenta kada lekar odluči

da zatraži određenu laboratorijsku analizu do dobijanja rezultata iz laboratorije. Iz ovog razloga laboratorija mora da osigura dobru laboratorijsku praksu u *preanalitičkoj, analitičkoj i postanalitičkoj fazi* laboratorijskog dijagnostičkog procesa.

Da bi se postizalo stalno poboljšanje procesa lečenja, neophodno je praćenje primene i obnavljanje kliničkih protokola, odnosno merenje rezultata ishoda njihove primene. Sprovedene su brojne velike i skupe kliničke studije u kojima je procenjivan ishod lečenja infarkta miokarda, mortaliteta, i nivoa komplikacija. Brojne studije koje su preporučivale potrebu snižavanja koncentracije holesterola u krvi, među njima i Skandinavska Simvastatin studija (10), pokazale su da je usled ovog efekta značajno smanjenja smrtnosti od srčanog infarkta, potreba za revaskularizacijom, smrtnost od ishemijskih srčanih oboljenja i celokupna smrtnost.

Neophodno je i sistematsko ispitivanje primene medicinske tehnologije kao potpore za donošenje ispravnih zaključaka u svrhu lečenja. Pod medicinskom tehnologijom podrazumevaju se i dijagnostička sredstva kao što su testovi, a pri proceni iste treba ostvariti sledeće ključne principe: partnerstvo (diferenciranje odnosa proizvođača, distributera i korisnika), naučnu zasnovanost prema najvišim standardima, efektivnost, raspoloživost svima zainteresovanim itd. Usled navedenog, stalno se vrši pritisak na zdravstveni sistem da uvodi nove tehnologije, što utiče na povećanje troškova, koje s druge strane treba ograničavati. Napred navedeni pritisci na zdravstveni sistem utiču na stalnu proveru kompetentnosti zdravstvene službe, ali i na političke odluke o smanjenju troškova zdravstvene službe a samim tim i laboratorijske službe (11). Ovo potstiče laboratorijske stručnjake da stalno preispituju nove tehnologije radi uvođenja u svakodnevnu praksu.

Primena laboratorijske medicine zasnovane na dokazima

Primena laboratorijske medicine zasnovane na dokazima ima četiri dimenzije:

1. identifikaciju pitanja,
2. kritičku procenu najboljeg raspoloživog dokaza, shodno principima primene laboratorijske opreme,
3. implementaciju najbolje prakse,
4. održavanje najbolje prakse shodno kliničkoj potrebi (12).

Napred navedeni principi ostvaruju se kao kontinuirani proces, a brojne su publikacije koje ukazuju na načine evaluacije medicinskog postupka (13, 14) pa i specifično dijagnostičkog testa. Naime, sistematskim prispitivanjem dijagnostičkih testova dolazi se do kritičkog mišljenja o tome da li je neki test verodostojan dokaz u postupku lečenja pacijenta (15–18).

Polazna tačka je *identifikacija kliničkog pitanja* koje se postavlja laboratoriji. Sposobnost da se pomoću rezultata ispitivanja donese odluka je prema tome ishod, odnosno rezultat. Brojni su primeri koji mogu da ilustruju ovaj stav, međutim test ne može uvek da posluži za *potvrdu* («rule in»), odnosno za *isključenje* («rule out») odluke. Na primer, smatra se da se mioglobin može koristiti za «isključenje» infarkta miokarda, ali ne i za «potvrdu» (19), zbog njegove loše tkivne specifičnosti. Takođe je činjenica da je određivanje serumskog cistatina C u korelaciji sa referentnim kreatinin klirensom, ali nema dokaza da njegovo određivanje ima više kliničkih prednosti (20).

Dokaz o izvodljivosti dijagnostičkog testa može da se posmatra preko hijerarhije niza elemenata koji su značajni za donošenje odluke. Naime, tehnička i dijagnostička izvodljivost omogućavaju odgovarajući klinički pristup (dijagnostika, terapija i zdravstveni ishod) koji zavisi od organizacionog pristupa i odgovarajuće cene za postizanje efektivnosti, a što sve skupa omogućava donošenje odgovarajućih odluka pri lečenju.

Prema tome, osnova bilo kog dokaza je *tehnička izvodljivost*, koja značajno utiče na dijagnostičku izvodljivost. Na primenu testa takođe utiču: preciznost, tačnost, analitički opseg, i interferencije kao i drugi pre-analitički faktori kao što su biološke varijacije i stabilnost uzorka.

Treba naglasiti da laboratorijski stručnjaci krajnje dobro mogu da procene tehničke karakteristike, međutim problemi oko pre-analitičkih faktora su lošije dokumentovani (30). Tako pre-analitički faktori mogu da ograniče primenu testa u rutinskoj praksi (npr. biološka varijacija markera resorpcije kosti).

Dijagnostička izvodljivost znači procenu *osetljivosti testa*, koja odgovara broju osoba za koje je tačno moguće utvrditi pomoću testa da su obbolele, odnosno *specifičnost testa* koja odgovara broju osoba za koje je pomoću testa moguće tačno utvrditi da nemaju oboljenje.

Klinička korisnost testa i njegov doprinos postavljanju dijagnoze je najveći izazov; pretraživanjem literature može se videti da se najveći broj radova o primeni dijagnostičkih testova bavi tehničkim i dijagnostičkim karakteristikama; mnogo je manje onih koji govore o kliničkoj primeni (21).

Klinička korisnost testa ili procedure mora obuhvatiti efekte primene testa na: a) dijagnostičku strategiju, tj. uporedivost sa drugim testovima radi poboljšanja dijagnostičke izvodljivosti; b) terapeutsku strategiju, tj. primenu terapije, optimizacije terapije, izbegavanje štetnosti; i c) zdravstveni ishod. Tako npr. otkrivanje mikroalbuminurije shodno napred navedenom znači:

- a) rano otkrivanje dijabetične nefropatije,
- b) bolje praćenje dijabetesa i pratećih promena npr. hipertenzije i
- c) smanjenje brzine razvoja oštećenja bubrega.

Organizaciona efikasnost uključuje više faktora, ali svakako niz postupaka u ovoj oblasti može da dovede do skraćenja lečenja i smanjenja neopходnih troškova.

Shodno izloženom može se zaključiti da ishod pri evaluaciji nekog testa mora da da jasnu sliku o njegovoj prednosti, kao i da početnom tačkom mora da bude jasno definisano pitanje na koje test treba da da odgovor. Mada validacija svakog novog testa zahteva primarno istraživanje, dodatne podatke svakako će obezbediti prikupljanje istih iz više studija sistematskim pregledanjem literature. Prednosti sistematskog pregleda literaturnih podataka sastoje se u razmatranju velikog broja podataka, što umanjuje efekte *odstupanja (bias)* koje je izraženo kod pojedinačnih studija, a čime se povećava uverljivost rezultata. Sistematskim preglednim pristupom raspoloživim podacima primenom meta-analize identifikuju se metodološki nedostaci (22), a primenom ROC krive utvrđuje se potencijalni nivo značajnosti testa (23). Prema tome sistematski pregled raspoloživih podataka pruža sledeće pogodnosti:

- integriše informacije,
- dovodi podatke na nivo značajnosti,
- identifikuje ograničenosti metodologije,
- umanjuje efekte nagiba (odstupanja),
- ograničava mnogobrojna proučavanja,
- povećava poverljivost u celokupni rezultat,
- smanjuje vreme između otkrivanja i primene,
- uspostavlja generalizovane podatke,
- identifikuje uzroke nekonzistentnosti,
- identifikuje nova istraživačka pitanja.

Ključni kriterijumi kojima se postiže dobar kvalitet laboratorijskih dokaza su sledeći:

- eksplicitna identifikacija pitanja,
- odgovarajući odabir pacijenata i ispitivanja,
- primena referentnog standarda na pacijente i kontrole,
- primena pogodnog postupka merenja,
- slepo poređenje metode prema referentnoj metodi
- isključenje nejasnih odstupanja,
- opis metodologije koja se može reprodukovati.

Brojne su publikacije koje opisuju način identifikovanja laboratorijskih postupaka koji će pružiti prihvatljiv medicinski dokaz i bez velikog odstupanja (24–27). U ovim ispitivanjima veoma je značaj način izbora populacije za ispitivanje, koja mora da bude relevantna za postavljeno pitanje. Zatim je značajan dizajn eksperimentalnog ispitivanja, odnosno način na koji će rezultati biti intepretirani. Treba znati da će dijagnostička tačnost testa biti precenjena ako se oboleli porede prema potpuno zdravim osobama (28). Odstupanje (*bias*) takođe može da se unese ako paci-

jenti pri kliničkom ispitivanju (trial) nisu birani nasu-mice ili ako su neki pacijenti isključivani iz ispitivanja.

Pri proceni dijagnostičke izvodljivosti testa treba koristiti pouzdanu referentnu metodu i to za ispitivanu i kontrolnu populaciju. Tako na pr, pri ispitivanju novog biohemijskog markera za diganostikovanje infarkta miokarda, osim drugih korišćena je autopsija kao ultimativna referentna procedura (29).

Prema tome, može se zaključiti da će samo stalno preispitivanje (30) dovesti do takvog postupka koji će poslužiti kao dijagnostičko sredstvo u oblasti laboratorijske medicine zasnovane na dokazima. Osiguranje kruga kvaliteta omogućiće istraživanje i razvoj, stalna edukacija, osigiranje kvaliteta i stalno preispitivanje (31). Sprovođenje ovog cilja, odnosno održavanje visokog kvaliteta laboratorijskih usluga omogućiće povezivanje sa drugim krugom koji će obezbediti odgovarajuća materijalna sredstva, odnosno vrednost uloženog rada. Iz ovog razloga u laboratorijskoj medicini se sprovode principi menadžmenta kvalitetom i laboratorijske akreditacije (32–35).

Standardi za opisivanje dijagnostičkog testa

Shodno napred izloženom može se utvrditi da postoji sedam metodoloških standarda koji se moraju primeniti na neki dijagnostički test (36). Njihovo najkraće značenje opisano je u *Tabeli 1*.

Prema literaturnim podacima o zastupljenosti standarda u evaluaciji dijagnostičkih testova (37) uočava se da se u odnosu na karakteristike populacije najučestalije navodi starosna raspodela (zastupljenost u proučavanju (55%), vrsta pola (48%), a mnogo manje

simptomi i/ili stupanj oboljenja (29%), tačnost u podgrupama zastupljena je sa 9%, izbegavanje završnog odstupanja sa 51%, izbegavanje odstupanja iz preglednog članka sa 43%, preciznost tačnosti testa sa 12%, neodređeni rezultati testa sa 26% i reproducibilnost sa 26%.

Da bi neki dijagnostički test ispunio kriterijume EBLM principa koriste se različiti tipovi dokaza i to:

- podaci o izvodljivosti analitičkog testa,
- podaci o unutrašnjoj i spoljašnjoj kontroli kvaliteta u laboratoriji,
- podaci o osetljivosti i specifičnosti u odnosu na posebne kliničke okolnosti.

Pojednostavljeno rečeno, ono što nam je potrebno jeste dokaz da će se primenom laboratorijskog testa na određenu grupu pacijenata naći klinički relevantne razlike u odnosu na dijagnostikovanje ili tretman. Često je teško postići ovaj cilj pošto npr. test sa istim imenom (npr. PSA, troponin I) daje različite numeričke rezultate. Iz tog razloga postavljeni su ciljevi sprovođenja evaluacije napred navedenih standarda, kao i šireg procesa standardizacije na međunarodnom nivou.

Cilj kliničkog biohemičara je da se primenom testa dođe do tačne dijagnoze oboljenja. Uopšteno se može reći da u kliničkoj biohemiji postoje jasno tri razdvojene faze rada. Ako se ovo posmatra sa stanovišta primene dijagnostičkog testa, klinički biohemičar je uglavnom uključen u analitičku fazu rada u kojoj je odgovoran za sprovođenje, produktivnost, kvalitet i troškove. Pre-analitička faza u odnosu na dijagnostički test obuhvata istraživanje u oblasti novih ili poboljšanja starih testova. Ovom fazom se bave akademske i industrijske istraživačke grupe; retko je prisustvo

Tabela I Sedam standarda koji karakterišu dijagnostičke testove (36)

Standard	Značenje
Sastav populacije	Osetljivost i specifičnost testa zavisi od karakteristika proučavane populacije
Podgrupe	Uspešna primena testa zavisi od okarakterisane tačnosti koja se odnosi na individualne podgrupe pacijenata
Izbegavanje završnog odstupanja	Javlja se pri tvrdnji da su pacijenti sa pozitivnim ili negativnim rezultatom dijagnostičkog testa potvrđeni zlatnom standardnom procedurom
Izbegavanje odstupanja (bias) iz preglednog članka	Može se izbeći ako rezultate testa interpretiraju odvojeno osobe koje međusobno ne znaju rezultate
Preciznost rezultata za tačnost testa	Stabilnost osetljivost i specifičnosti zavise od broja ispitanih pacijenata; moraju se navesti granice pouzdanosti
Prezentacija neodređenih rezultata testa	Frekvencija ovakvih rezultata i kako su korišćeni pri računanju
Reproducibilnost testa	Test ne mora uvek da daje iste rezultate; razlozi i jačina ovog efekta moraju biti ispitani

kliničkih biohemičara u ovoj oblasti razvoja dijagnostičkog testa. Međutim nema razloga da biohemičar ne sudeluje u post-analitičkoj fazi primene testa u kojoj se ispituje primena testa sa ciljem da se dostigne najveća klinička i finansijska efektivnost testa.

Shodno navedenom kako bi se dostigao cilj EBLM (ili EBCB) klinički biohemičari moraju nastojati da se uključe u niz sledećih oblasti:

1. Sistematsko pretraživanje dokaza, što nije ni malo jednostavno zbog velikog broja podataka koji se svakodnevno objavljuju (npr. oko 1000 publikacija o PSA godišnje);
2. Izvođenje i razumevanje korišćenih pravila i metoda (saradnja sa Cochrane Collaboration radnim grupama);
3. Obezbeđivanje da se moduli o EBM, sistematski pregledni članci, kritički prikazi literature stalno uključuju u programe edukacije za profesionalnu kvalifikaciju;
4. Uključivanje individualaca ili grupa u iznalaženju EB metoda za specifična ispitivanja;
5. Ispitivanje načina na koji se informacije o kliničkim ili finansijskim efektima laboratorijskog testa mogu na najbolji mogući način primenjivati;
6. Preispitivanje izrade i primene lokalnih EB uputstava; osetljivost, specifičnost i »likelihood ratio« treba primeniti na populaciona ispitivanja, u cilju dobijanja jasnog odgovora na postavljeno kliničko pitanje.

Sistematsko pretraživanje podataka je veoma značajno za iznalaženje empirijskih izvora odstupanja i niza drugih karakteristika nekog testa. Tako je npr. na osnovu 26 studija tipa meta-analize kod odraslih i dece sa oštećenom funkcijom bubrega i/ili dijabetesa utvrđeno da je kreatinin klirens bolji bubrežni funkcionalni test od kreatinina u plazmi. Na osnovu 12 studija TrT i 9 TrI utvrđeno da oba markera imaju podjednaku osetljivost i specifičnost u slučaju nestabilne angine pektoris.

Naime, danas postoje »evidence-based« časopisi koji su uspostavili set specifičnih metodoloških i kliničkih standarda koji moraju biti primenjeni u kliničkim radovima koje objavljuju. Ovo će svakako povećati validnost dobijenih rezultata i povećati kvalitet publikacija. Primeri ovih časopisa su *AC Journal Club*, *Evidence-Based Cardiovascular Medicine*, i *Evidence-Based Medicine*. Takođe postoje baze podataka objavljenih radova, kao što su MEDLINE i EMBASE, mada je njihov nedostatak to što svi medicinski članci nisu u njima indeksirani.

Klinički pregledni članci treba da budu naučni isto onoliko koliko i sami članci koji su u njima opisani i pretraživani, pa samim tim i da predstavljaju »zlatni standard« u EBM. Sistematski pregledi i meta-analiza nisu niti jedno niti isto.

Da bi nasumice izvođeni trajali (*randomized trials*) bili dobro osmišljeni, izvedeni i opisani *Conso-*

lidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) je 1996. godine objavio dokument sa 21 tačkom koju treba uključiti u ovakav tip ispitivanja (38, 39). Cilj je da se izbegne odstupanje (bias) koji se javlja kod loše postavljenih studija (40). Prema tome, dokumenta CONSORT i STARD (*Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy*) će omogućiti potpuno i tačno iskazivanje proučavanja vezanih za dijagnostičku tačnost.

Da bi se razvio i primenio STARD dokument, decembra 1999. godine ustanovljen je upravni komitet koji uključuje i editora časopisa *Clinical Chemistry*, sa zadatkom da se sprovodi redovna procena i inovacija navedenog dokumenta. Ovakav dokument omogućiće odgovarajući izbor i opisivanje neophodnih podataka pri ispitivanju dijagnostičkih testova u primarnim studijama.

U časopisu *Clinical Chemistry* pojavljuju se članci sa naznakom *Evidence-based Laboratory Medicine and Test Utilization*. Primer ovakvog članka je rad autora Sacks DB i sar. *Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus* (41). Kao što je poznato za dijagnostikovanje i praćenje šećerne bolesti koriste se brojni laboratorijski testovi, čiji je kvalitet i primenljivost različitog stepena značajnosti. Iz ovog razloga ekspertski komitet Američkog društva za kliničku hemiju (*American Association for Clinical Chemistry*) je izradio preporuke i uputstvo koje se odnose na merenje glukoze, primenu glukometara i praćenje glikohemoglobina, kao i na potencijalni značaj neinvazivnog praćenja glukoze, genetskih ispitivanja, mikroalbumina, proinsulina, C-peptida i drugih sastojaka. Značajnost navedenih parametara testirana je prema preporukama Američkog dijabetološkog društva (ADA) i to prema nivoima A, B, V i E shodno kliničkoj primenljivosti (41).

Holesterol je raniji primer laboratorijskog testa, čija je jasna klinička primena uspostavljena na osnovu brojnih kliničkih ispitivanja (42). Drugi primer je C-reaktivni protein koji ima veoma nisku dijagnostičku specifičnost mada je dugi niz godina korišćen kao akutno-fazni marker oštećenja, infekcija i inflamacije, a može da ukaže i na buduće kardiovaskularno oboljenje (43). Sistematski pregledni članci ukazali su na primenu plazmatskog homocisteina kao rizik faktora za koronarna i druga kardiovaskularna oboljenja (44). Na isti način određivanje pankreasne α -amilaze utvrđeno je kao veoma značajno za dijagnostikovanje akutnog pankreatitisa (45, 46). Ovo su samo neki primeri koji ukazuju na koji način se dolazi do nekog parametra koji se može iskoristiti kao laboratorijski dokaz u otkrivanju i praćenju oboljenja. Kritička evaluacija ovakvog parametra može se samo ostvariti na osnovu kritičke procene podataka koji nastaju u vezi između laboratorije i kliničke medicine (47, 48).

Izbor biohemijskih markera za praćenje srčanog oštećenja

Primena sračanih markera doživela je ogromnu transformaciju počevši od aspartat aminotransferaze (AST) i laktat dehidrogenaze (LDH) pa sve do mioglobina, kreatin kinaze (CK) i izoenzima MB (CK-MB i troponina I i T (cTnI i cTnT), kao tri dobro poznate familije markera koji se primenjuju u urgentnoj medicini za procenu tegoba i bola u grudima. Za svaki od navedenih markera dobro je poznata kinetika izlaska iz oštećenih srčanih ćelija i primena prema tačno utvrđenom vremenskom intervalu i nastalim simptomima kod pacijenta (49). Mioglobin je rani marker sa visokom negativnom prediktivnom vrednošću ali niskom specifičnošću. CK i CK-MB su prema kriterijumima SZO »zlatni standard« za dijagnostikovanje infarkta miokarda. Troponini su kardio-specifični proteini sa visokim stepenom osetljivosti i specifičnosti za nekrozu miokarda. Ovi serumski markeri nekroze su sveobuhvatno izučavani na visko-rizičnim grupama koje su imale visoku prevalenciju AIM. Veoma obećavajući podaci su dobijeni i u slučaju niže rizičnih pacijenata (50). Inflamatorni markeri kao što su C-reaktivni protein (CRP) i trombocitni marker, kao što je P-selektin uvedeni su od nedavno, ali još uvek nisu doživeli širu kliničku primenu.

Biohemijski markeri oštećenja miokarda danas su prihvaćeni kao univerzalno značajni za dijagnostikovanje pacijenata sa akutnim koronarnim sindromima. Osim do sada definitivno prihvaćenih biomarkera akutnog koronarnog sindroma, svakodnevno se uvode novi biomarkeri, kao što su natriuretski peptidi, kardioprotektivni steroidi, citokini, albumin modifikovan ishemijom, slobodne masne kiseline itd.

Dokazano je da su srčani markeri krajnje vredni za postavljanje dijagnoze, procenu rizika i primenu terapije. Međutim, idealni protokol za evaluaciju srčanog markera još uvek se razlikuje između institucija, laboratorija, vrste pacijenata i raspoloživih resursa (51). Uslovi specifičnog srčanog markera moraju da budu postavljeni tako da ispunjavaju potrebe dijagnostikovanja infarkta miokarda i procenu mogućeg rizika. Svakodnevno se uvode novi testovi, a tehnologija postojećih se stalno poboljšava. Zato procena dijagnostičkog testa treba da doprinese ne samo njegovom uvođenju u kliničku praksu, već i smanjenju neželjenih kliničkih posledica vezano za tačnost samog testa, a samim tim i umanjenje troškova nepotrebnog ponavljanja laboratorijskog praćenja. Procena dijagnostičkih testova je složen proces, mada su analitička tačnost i dijagnostička tačnost dva najznačajnija faktora u ovoj proceni. Ova činjenica je od ranije prepoznata, naročito u postupku nasumice izvođenih kliničkih ispitivanja, što je dovelo do *Izjave o objedinjenim standardima za pripremu izveštaja ispitivanja* (eng. *Consolidated Standards of Reporting Trials, CONSORT*), koja sadrži listu pitanja na koja treba odgovoriti prilikom ispitivanja dijagnostičke tač-

nosti (38). Standardima za iskazivanje dijagnostičke tačnosti (eng. *Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy, STARD*) opisani su svi neophodni dokazi potrebni za obezbeđivanje pojedinih zahteva navedene CONSORT izjave (52). Na ovoj osnovi krajnje ozbiljno se mora primeniti koncept laboratorijske medicine zasnovane na dokazima (eng. *Evidence-Based Laboratory Medicine, EBLM*), i to iz više razloga. Prvo, potrebno je obezbediti najbolje moguće rezultate, kako bi lekari donosili dijagnostičke, prognostičke i terapijske odluke. S druge strane, neophodno je procenjivati veći broj dijagnostičkih testova. Kao treće, postavlja se pitanje koliko su dijagnostički testovi dobri i kolika im je cena koštanja (53–55).

Opšteno govoreći, biomarker se definiše kao merljivi događaj u biološkom sistemu (npr. humanom organizmu) ili alterantivno kao molekul koji ukazuje na promene različite od fiziološkog ponašanja (56). Biomarkeri su krajnje korisni u poboljšanju dijagnoze kao i za identifikaciju osoba sa visokim rizikom za razvoj koronarnih sindroma kao što su angina i akutni infarkt miokarda. U stvari dijagnoza akutnog koronarnog sindroma se u potpunosti oslanja na primenu biomarkera.

Karakteristike idealnog srčanog markera su prikazane u *Tabeli II*. Imajući u vidu sve navedeno ne postoji jedan marker koji može da zadovolji sve navedene karakteristike. Za procenu nekroze miokarda i akutne srčane ishemije koriste se prelomne tačke, koje obezbeđuju kvalitativnu razliku u primeni srčanih markera.

Biohemijski markeri koji ukazuju na nekrozu miokarda moraju da se prate u uzorcima uzetim uzastopno u seriji kako bi se postigla zadovoljavajuća dijagnostička primenljivost (57, 58). Serijsko praćenje markera ishemije i nekroze neophodno je zato što se njihove koncentracije brzo menjaju u odgovoru na kliničku promenu i imaju relativno kratko poluvreme života u krvi. Prema tome od posebnog je značaja da se srčani markeri dovedu u vremensku zavisnost sa kliničkim znacima i simptomima. Ovo je naročito važno u slučaju primene takozvanog POC (point-of-care) ispitivanja. U odnosu na akutni koronarni sindrom treba odvojeno razmatrati markere miokardijalne ishemije i markere nekroze srčanog mišića. Merenje srčanih markera, pojedinačno ili u kombinaciji je standardna procedura za porocenu, dijagnostikovanje, praćenje, stratifikaciji rizika, prognozu i primenu terapije za pacijente koji pripadaju grupi akutnog koronarnog sindroma. Današnji biohemijski markeri ukazuju na nekrozu, a cTnT i CTnI su postali zamena za ćelijsku smrt. Međutim, markeri drugih procesa koji su fundamentalni za akutni koronarni sindrom takođe mogu biti od velike koristi. Nestabilnost plaka/disrupcija i aktivacija trombocita su zajedničke fiziološke karakteristike u akutnom koronarnom sindromu. Prema tome markeri koji pokazuju stabilnost plaka i aktiviraju ili »ljute« (razdražuju) trombocite su

Tabela II Karakteristike idealnog srčanog markera

- *Veličina*: manji markeri izlaze brže iz oštećenog tkiva
- *Ćelijska lokalizacija*: rastvorljivi citoplazmatski marker je bolji od strukturnog markera
- *Apsolutna srčana tkivna specifičnost*: marker ne treba da postoji u drugim tkivima pod fiziološkim i patološkim uslovima
- *Visoka tkivna specifičnost*: zastupljenost u srčanom tkivu i odsustvo u plazmi
- *Specifičnost za ireverzibilno oštećenje*: mora da ima sposobnost razlikovanja reverzibilnog (ishemija) od ireverzibilnog (nekroza) oštećenja
- *Izlazak*: izlazak iz miokarda mora da bude potpun nakon oštećenja i u direktnoj proporciji sa veličinom oštećenja (veličina infarkta)
- *Stabilnost*: marker mora da dostigne maksimalni nivo ubrzo nakon oštećenja i da se zadrži u cirkulaciji nekoliko sati kako bi omogućio pogodan dijagnostički okvir
- *Klirens*: marker mora da se uklanja brzo kako bi omogućio dijagnostikovanje ponovnog oštećenja
- *Primene*: mora da omogući praćenje reperfuzije, reokluzije ili oba procesa i to pri ranom i kasnom dijagnostikovanju srčanog oštećenja
- *Pogodnost određivanja*: treba da postoji mogućnost brzog određivanja markera u punoj krvi, a koje je kvantitativno i pristupačno

Tabela III Neke od karakteristika dobrog biomarkera

- Nepreciznost
- Odstupanje (bias)
- Učestalost ispitivanja
- Turnaround time
- Detekcioni limit
- Korišćenje testa
- Granice odlučivanja
- Standardizaciju određivanja
- Uzimanje uzorka
- Dijagnostičku tačnost
- Priprema pacijenta
- Uzimanje uzorka
- Kvalifikovanost operatera
- Interferencije sa metodom
- Kontrola kvaliteta
- Vreme ponavljanja testa
- Dijagnostički algoritam

potencijalno klinički važni. Inflamacioni markeri kao što je C-reaktivni protein ukazuje na primenu procene dugotrajnog rizika, mada može imati značaj i za praćenje pacijenta sa sumnjom na akutni koronarni sindrom. Ishemija je centralni fiziološki proces, te je uloga biohemijskih markera za njenu procenu od velike važnosti.

EBLM i dijagnostički proces

Osnovna svrha izbora i postavljanja testa je prvo otkrivanje fiziološkog poremećaja, a zatim postavljanje dijagnoze. Veličina odstupanja rezultata od normalne vrednosti ukazuje na težinu nastalog poremećaja. Da bi se dijagnostički proces sprovodio na odgovarajući način neopodna je izrada praktičnih kliničkih vodiča, koji predstavljaju sistematski razvijena uputstva koja koristi praktičar za donošenje odluke o

zdravstvenom stanju pacijenta. Uputstva koja se primenjuju u laboratoriji moraju da sadrže niz karakteristika o biomarkeru prikazanih u *Tabeli III*.

Shodno navedenom neophodno je više elemenata da bi se uspostavila uputstva, odnosno vodiči za primenu biomarkera u laboratorijskoj praksi. Na izradi vodiča rade imenovane grupe, koje koriste sve dostupne podatke iz sistematskih pretraživanja literature, prevodeći dostupne dokaze u preporuke. Definitivni vodiči i preporuke se mogu naći na web stranama više organizacije (npr. Association of Clinical Biochemists, UK; Finnish Medical Society; The National Academy of Clinical Biochemistry) (59).

Dobijene informacije zavise od kvaliteta dijagnostičkog testa, odnosno od njegove dijagnostičke tačnosti. Da bi se ovo osiguralo sa primenom principa EBLM, moraju se povezati edukacija i usavršavanje, istraživanje, preispitivanje i upravljanje kvalitetom.

Zahvalnost. Revijski rad je napisan na osnovu iskustava koja proističu iz Projekta 1260, koji finansira Ministarstvo za nauku, i zaštitu životne sredine Republike Srbije.

DEVELOPMENT OF THE BIOMARKERS ON EVIDENCE-BASED MEDICINE PRINCIPLES

Nada Majkić-Singh

*Institute of Medical Biochemistry,
Pharmaceutical Faculty and Clinical Centre of Serbia, Belgrade*

Summary: There are two fundamentally different purposes for obtaining a test: the first is to detect and establish the magnitude of a physiological derangement, and the second is to make diagnoses. The extent to which a test result falls outside the normal range provides information on the severity of the physiological derangement. Evidence-based laboratory medicine (EBLM) is the use of the current best evidence of the utility of laboratory tests in making decisions about the care of individual patients. This practice means integrating laboratory and clinical experience with the last available external evidence from systematic research. It means that the definition of EBLM focuses on two key elements: experience and evidence from systematic research. One factor is those individual physicians, faced with numerous medical informations; the second factor is the global phenomenon of increasing health care costs and third is that patients who have generally more education, want the best in diagnostics and therapies. It means that evidence-based medicine has been driven by the need to cope with information overload, by cost-control, and by public impatient for the best in diagnostics and treatment. Clinical guidelines care maps, and outcome measures are quality improvement tools for the appropriateness, efficiency, and effectiveness of health services. Laboratory professionals must direct more effort to demonstrating the impact of laboratory tests on a greater variety of clinical outcomes. Evidence-based laboratory medicine aims to advise clinical diagnosis and management of disease through systematic researching and disseminating generalisable new knowledge that meets the standard of critical review on clinically effective practice of laboratory investigations. In laboratory medicine, the use of tests increases; new tests are constantly introduced, but »old« tests are seldom removed from the repertoire. This, together with limited public funds for the health care, should underline the challenge for laboratory professionals to provide evidence for the utility of different tests. This practice means integrating laboratory and clinical experience with the best available external evidence from systematic research therefore, it is important that advice given by laboratory medicine professionals are sound and based on evidence in the pre-analytical, analytical, and post-analytical phases of the diagnostic process. This paper provides an insight into the rationale, methodology and the phases of the EBLM applied for selecting biomarkers used in laboratory medicine.

Key words: biomarkers, Evidence-based medicine, EBM, Evidence-based laboratory medicine, EBLM

Literatura

1. Sackett DL, Rosenberg WMC, Gray JAM, Haynes RB, Richardson WS. Evidence-based medicine: what it is and what it isn't. *Br Med J* 1996; 312: 71–2.
2. Lundberg GD. The need for an outcomes research agenda for clinical laboratory testing. *JAMA* 1998; 280: 565–6.
3. Lundberg GD. How clinicians should use the diagnostic laboratory in a changing medical world. *Clin Chim Acta* 1999; 280: 3–14.
4. Sackett DL, Richardson WS, Rosenberg W, Haynes RB. Evidence-based medicine: how to practice and teach EBM. Edinburgh, Scotland: Churchill Livingstone, 2000; 261pp.
5. Canadian Medical Association Quality of Care Committee. Care maps and continuous quality improvement. Ottawa: Canadian Medical Association, 1995: 1–20.
6. Agency for Health Care and Policy Research. Clinical guideline development Program note. Washington: US Dept of Health and Human Services, 1990.
7. Shekele PG, Woolf SH, Eccles M, Grimshaw J. Clinical guidelines. Developing guidelines. *BMJ* 1999; 318: 593–6.
8. Hurwtz B. Clinical guidelines. Legal and political considerations of clinical practice guidelines. *BMJ* 1999; 318: 661–4.
9. Hyams AL, Brandenburg JA, Lipsitz SR, Shapiro DW, Brennan TA. Practice guidelines and malpractice litigation: a two way street. *Ann Intern Med* 1999; 122: 450–5.
10. Hoffman PA. Critical path method: an important tool for coordinating clinical care. *Jt Comm J Qual Improv* 1993; 19: 235–46.
11. Moore RA. Evidence-based clinical biochemistry. *Ann Clin Biochem* 1997; 34: 3–7.
12. Williams O. What is clinical audit? *Ann R Coll Surg Engl* 1996; 78: 406–11.
13. Warren KS, Mosteller F, eds. Doing more harm than good: the evaluation of health care interventions. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 703: 1–341.

14. Bowling A, ed. Research methods in health. Investigating health and health service. Buckingham, UK: Open University Press, 1997; 1–431.
15. Nierenberg AA, Feinstein AR. How to evaluate a diagnostic marker test: lessons from the rise and fall of dexamethasone suppression test. *JAMA* 1988; 259: 1699–702.
16. Irwig L, Tosteson ANA, Gatsonis C, Lau J, Colditz G, Chalmers TC, et al. Guidelines for meta-analyses evaluating diagnostic tests. *Ann Intern Med* 1994; 120: 667–76.
17. Ohlsson A. Systematic reviews: theory and practice. *Scand J Clin Lab Investig* 1994; 54: 25–32.
18. Greenhalgh T. How to read a paper: papers that report diagnostic of screening tests. *Br Med J* 1997; 315: 540–3.
19. Storrow AB, Gibler WB. The role of cardiac markers in the emergency department. *Clin Chim Acta* 1999; 307: 775–8.
20. Price CP, Finney H. Developments in the assessment of glomerular filtration rate. *Clin Chim Acta* 2000; 297: 55–66.
21. Hobbs FDR, Delaney BC, Fitzmaurice DA, Wilson S, Hyde CJ, Thorpe GH, et al. A review of near patient testing in primary care. *Health Technol Assess* 1997; 1(5): i-iv, 1–229.
22. Vamvakas EC. Meta-analyses of studies of the diagnostic accuracy of laboratory tests. *Arch pathol lab Med* 1998; 122: 575–86.
23. Moses LE, Shapiro D. Combining independent studies of a diagnostic test into a summary ROC curve: data-analytic approaches and some additions considerations. *Stat Med* 1993; 12: 1293–316.
24. Mulrow CD, Linn WD, Gaul MK, Pugh JA. Assessing quality of a diagnostic test evaluation. *J Gen Intern Med* 1989; 4: 288–95.
25. Kraemer HC, ed. Evaluating medical tests: objective and quantitative guidelines. Newbury Park, CA: SAGE Publications, 1992: 103–13.
26. Jaeschke R, Guyatt G, Sackett DL. Users, guides to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic tests. A. Are the results of the study valid? Evidence-Based Medicine Working Group. *JAMA* 1994; 271: 389–91.
27. van der Schouw YT, Verbeek AL, Ruijs SH. Guidelines for the assessment of new diagnostic tests. *Investig Radiol* 1995; 30: 334–40.
28. Lijmer JG, Mol BW, Heisterkamp S, Bossel GJ, Prins MH, van der Meulen JHP, et al. Empirical evidence of design-related bias in studies of diagnostic tests. *JAMA* 1999; 282: 1061–6.
29. Rowley JM, Hampton JR. Diagnostic criteria for myocardial infarction. *Br J Hosp Med* 1981; 26: 253–8.
30. Lord J, Littlejohns P. Evaluating healthcare policies; the case of clinical audit. *Br Med J* 1997; 315: 668–7.
31. Sackett DL, Richardson WS, Rosenberg W, Haynes RB, eds. Evidence-based medicine. How to practice and teach EBM. London: Churchill Livingstone, 1997: 1–250.
32. Burnett D, ed. Understanding accreditation in laboratory medicine. London: ACB Venture Publication, 1996: 1–311.
33. Klein R. Competence, professional self regulation, and the public interest. *Br Med J* 1998; 316: 1740–2.
34. Poštić-Grujin A, Majkić-Singh N, Ilić M, Nešić T, Bošković R. The first certification and accreditation of medical laboratory in Yugoslavia. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39: 284.
35. Majkić-Singh N, Ilić M, Poštić-Grujin A. Certification and accreditation activities in laboratory medicine in Yugoslavia. *Balkan Journal Clin Lab* 2001; 8: 41.
36. Read MC, Lachs MS, Feinstein AR. Use of methodological standards in diagnostic test research: getting better but still not good. *JAMA* 1995; 274: 645–51.
37. Epstein AM. Use of diagnostic tests and therapeutic procedures in a changing health care environment. *JAMA* 1996; 275: 1197–8.
38. Begg C, Cho M, Eastwood S, Horton R, Moher D, Olkin I, et al. Proving the quality of reports of randomized controlled trials in the CONSORT statement. *JAMA* 1996; 276: 637–9.
39. Altman DG. Better reporting of randomized controlled trials: the CONSORT statement. Authors must provide enough information for readers to know how the trial was performed Editorial. *BMJ* 1996; 313: 570–1.
40. Schulz KF, Chalmers I, Hayes R, Altman DG. Empirical evidence of bias. Dimensions of methodological quality associated with estimates of treatment effects in controlled trials. *JAMA* 1995; 273: 408–12.
41. Sacks SB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parrott M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2002; 48: 436–472.
42. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomized trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study. *Lancet* 1994; 344: 1389–9.
43. Pepys MB, Berger A. The renaissance of C reactive protein Editorial. *BMJ* 2001; 322:4–5.
44. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS. Quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1999; 274:1049–57.
45. Ignjatović S, Majkić-Singh N, Mitrović M, Gvozdenović M. Biochemical evaluation of patients with acute pancreatitis. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38: 1141–44.

46. Panteghini M, Ceriotti F, Pagani F, Secchiero S, Zanotto M, Franzini C. Recommendations for the routine use of pancreatic amylase measurement instead of total amylase for the diagnosis and monitoring of pancreatic pathology. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 97–100.
47. Watine J. Are laboratory investigations recommended in current medical practice guidelines supported by available evidence. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 252–255.
48. Morre RA, Fingerova H. Evidence-based laboratory medicine: using current evidence to treat individual patients. in *Point-of-Care Testing*, edited by CP Price, JM Hicks, AACC Press, 1999; 265–87.
49. Tucker JF, Collins RA, Anderson AJ, Hauser J, Kalas J, Apple FS. Early diagnostic efficiency of cardiac troponin I and troponin T for acute myocardial infarction. *Acad Emerg Med* 1997; 4: 13–21.
50. O'Neil BJ, Ross MA. Cardiac markers protocols in a chest pain observation unit. *Emerg Med Clin North Am* 2001; 19: 67–86.
51. Blomkalns AL, Gibler WB. Early Detection of Myocardial necrosis in the Emergency Setting and Utility of Serum Biomarkers in Chest Pain Unit Protocols. In *Cardiac Markers, Second Edition*, Ed by Alan H.B Wu, Humana Press, 2003; 3–13.
52. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, Moher D, et al. The STARD Statement for Reporting Studied of Diagnostic Accuracy: Explanation and Elaboration. *Clin Chem* 2003; 49: 7–18.
53. MCQueen M. Evidence-based laboratory medicine: addressing bias, generalisability and applicability in studies on diagnostic accuracy: The STARD initiative. *Clin Biochem (Editorial)* 2003; 36: 1–7.
54. Majkić-Singh N. Uloga laboratorijske medicine zasnovane na dokazima u zdravstvenoj službi. *Jug Med Biohem* 2002; 21: 99–104.
55. Majkić-Singh N. Izbor biohemijskih pokazatelja za dijagnostikovanje akutnog koronarnog sindroma. *Jug Med Biohem* 2005; 24: 1–13.
56. Slate EH, Turnbull BW. Statistical models for longitudinal biomarkers of disease. *Stat Med* 2000; 19: 617–37.
57. Joint ESC&ACC Committee. Myocardial infarction redefined-a consensus document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 959–69.
58. Balk EM, Ioannidis JP, Salem D, Chew PW, Lau J. Accuracy of biomarkers to diagnose acute cardiac ischemia in the emergency department: a meta-analysis. *Ann Emerg Med* 2001; 37: 471–7.
59. Price CP, Christenson RH. Evidence-based laboratory medicine. From Principles to outcomes, AACC Press, 2003.

Rad primljen: 04. 05. 2005

Prihvaćen za štampu: 22. 05. 2005