

Experimenty s referenční metodou ALP IFCC 2011

Sedlák P., Friedecký B.,
Kratochvíla J.

Text je experimentálním doplňkem k práci o stanovení ALP, poslané k publikaci v časopisu Klin. Biochem. Metab. v roce 2015. Cílem práce je přispět k harmonizaci výsledků ALP v situaci, kdy není doposud řadou výrobců diagnostik respektována referenční metoda IFCC 2011.

Kalibrace stanovení ALP pomocí 4-nitrofenolu (4 NP)

Byly použity 3 testovací soupravy složením reagentů přesně odpovídajícím referenční metodě IFCC 2011(1). Jednalo se o komerční soupravu Siemens (2), dále pak o soupravy získané u výrobce „in home“ připravené na zakázku. Firma Erba Lachema (<https://www.erbalachema.com/>) poskytla modifikovanou komerční soupravu (3), u které byla upravena koncentrace AMP v R1, firma Skalab (<http://www.skalab.cz/>) pak poskytla experimentální šarži soupravy dle receptury (1).

Kalibrační faktory, získané použitím standardního roztoku 4 nitrofenolu (4 NP) jsou uvedené v tabulce 1.

Tabulka 1. Kalibrační faktory 3 testovaných souprav pro stanovení ALP (IFCC 2011) získané použitím 4-nitrofenolu

Metoda	Kalibrační faktor*
Siemens IFCC 2011	5189,3
Erba Lachema IFCC 2011	5240,2
Skalab IFCC 2011	5177,5

*Faktor je získán na analytickém systému Hitachi Roche

Výsledky kalibračních měření pomocí primárního kalibračního materiálu tedy poskytují velmi dobrou shodu hodnot kalibračních faktorů použitých souprav.

Kalibrace pomocí 4 NP, aplikovaná na pool lidských sér (n = 35) však už poskytuje u různých metod/souprav významně rozdílné výsledky měření. V případě již výše uvedených tří souprav je tento rozdíl asi 10 %. Reakční rychlosti, determinované vlastnostmi reakční směsi, se mezi 3 soupravami výrazně liší.

Tabulka 2. Lidský sérový pool měřený 3 metodami stanovení ALP (IFCC 2011) kalibrovaný pomocí 4-nitrofenolu

Metoda	ALP (μkat/l)
Siemens IFCC 2011	7,893
Erba Lachema IFCC 2011	7,140
Skalab IFCC 2011	7,613

Zatímco ještě první krok, kalibrace pomocí p-nitrofenolu, tj. získání kalibračních faktorů v režimu END-POINT vykazoval dobrou shodu mezi jednotlivými soupravami (zanedbatelné rozdíly v hodnotách faktoru), už následný krok - tj. použití identických podmínek kinetického měření vykázal značné rozdíly!

Prakticky shodné hodnoty kalibračního faktoru získané pomocí 4-NP nám dovolí vyvodit, že parametry složení inkubační směsi z různých výchozích složení činidel v kombinaci s různými pipetovacími a dávkovacími schémata testovacích souprav jsou objemově i složením deklarovaných komponent identické a odpovídají ALP IFCC 2011. Protože všechny aplikace a měření byly realizovány na jediném automatickém analyzátoru Hitachi 911 (H-911), lze předpokládat, že jsou eliminovány i vlivy parametrů fotometrie a různého časování. Časování bylo díky flexibilitě analytického systému H-911 téměř identické s publikovaným referenčním postupem IFCC 2011.

Jediným logickým vysvětlením rozdílů kinetických měření je proměnlivé množství složek reakční směsi s inhibičním efektem. Je totiž velmi obtížné připravit AMP (2-amino-2-metyl-1-propanol), hustou viskózní látku v dostatečně čistém stavu bez příměsí. Známý a v praxi nejčastější vliv inhibice uhlíčitany a jejich současný vliv na hodnotu pH reakční směsi byl při experimentu eliminován (práce s čerstvě otevřenými činidly, použití sifonových uzávěrů pro minimalizaci vlivu vzdušného CO₂).

Kalibrace pomocí sérového kalibrátoru

Byl použit materiál EHK SEKK 3756 s hodnotami stanovenými Referenční laboratoří RfB v Hannoveru referenční metodou IFCC 2011. (Výrobce SERO; hodnota ALP = 5,93 μkat/l; U_c = 0,140 μkat/l).

Kalibrace tímto sérovým kalibrátorem poskytla následující kalibrační faktory:

Tabulka 3. Kalibrační faktory získané metodou IFCC 2011 pomocí sérového kalibrátoru Siemens ALPI CAL

Metoda	Kalibrační faktor*
Siemens IFCC 2011	6000
Erba Lachema IFCC 2011	6143
Skalab IFCC 2011	5663

*Faktor je získán na analytickém systému Hitachi Roche

Zatímco faktory souprav Siemens a Erba Lachema jsou podobné, faktor soupravy Skalab se liší.

Analýza sérového kalibrátoru Siemens (ALPI CAL, DC 150; metoda „IFCC 2011“; level 2 = 8,5 μ kat/l ALP a level 3 = 17,94 μ kat/l ALP) vykazuje v porovnání s výše uvedenými hodnotami kalibračního faktoru u tří výše uvedených souprav dle metody „IFCC 2011“ následující hodnoty bias uvedené v tabulce 4:

Tabulka 4. Bias při měření sérového kalibrátoru Siemens, když je měření kalibrováno materiálem IFCC RELA deklarujícím hodnotu získanou metodou IFCC 2011.

	Bias Level 2 (%)	Bias Level 3 (%)
Siemens IFCC 2011	6,59	-2,69
Erba Lachema IFCC 2011	-0,38	-5,0
Skalab IFCC 2011	-3,08	3,84

Robustnost metody IFCC (2011)

Data dokládají známé rčení, že když dva/tři dělají/vyrábějí totéž, nemusí to být totéž. To není v našem případě výtka na stranu výrobců, to je výtka směřující k robustnosti metodického postupu originální metody IFCC 2011. Nelze na tomto místě nostalgicky nevzpomenout na metodický postup s pufrům MEG (Zahradníček, Chromý a spol.), který v tomto ohledu rozhodně disponoval lepšími parametry, patrně díky možnosti přípravy vysoce krystalicky čistého pufru MEG.

Problém certifikovaného referenčního materiálu ALP

Do jaké míry se promítnou těžkosti s výše doloženou robustností metody IFCC 2011 při přípravě certifikovaného referenčního materiálu, je otázkou. Je ale možné, že právě tyto těžkosti jsou důvodem, že ani po třech letech existence refe-

renční metody IFCC 2011 není dosud k dispozici příslušný certifikovaný referenční materiál (CRM) pro stanovení ALP.

U řady referenčních metod měření rutinních enzymů jsou naopak již řadu let takové CRM k dispozici a mohou sloužit jako prostředník v řetězci metrologické návaznosti rutinních metod výrobců k referenční metodě IFCC (ALT, AST, CK, GGT, LD, α -AMS).

Chování tří testovaných souprav se podařilo na přijatelné úrovni sjednotit kalibrací pomocí sérového standardu (kalibrátoru) s hodnotou ALP určenou referenční metodou IFCC 2011. Takový vhodný sérový kalibrátor musí vždy vykazovat vysoký stupeň komutability a metrologické návaznosti na referenční metodu.

Kontrolní materiály EHK SEKK s hodnotami, získanými v programu IFCC RELA ALP vykazují dobrou komutabilitu a shodu dokladovanou velmi blízkými výsledky měření všech testovaných souprav, kalibrovaných kalibrátorem (SIEMENS, ALPI Cal, REF DC 150).

Tento výsledek byl i potvrzen experimentem, kdy EHK SEKK a pooly lidských sér, byly podrobeny analýze na pracovišti klinické biochemie nemocnice Jičín (V. Mikan, M. Zlámalová), validovanou metodou ALP SIEMENS Advia 1800 s kalibrací pomocí firemního faktoru F pro danou soupravu a analyzátor. Zde dosahovala metoda stanovení ALP Bayer zanedbatelný bias oproti referenčním hodnotám. Viz. Tabulka 5.

Výsledky uvedené v tabulce 5 demonstrují, že kvalitní, na dostatečném souboru vzorků ověřený firemní kalibrační faktor může dobře nahradit sérový kalibrátor. A to zejména v situaci, kdy neexistuje odpovídající referenční materiál CRM. Výhoda kalibračního faktoru spočívá v eliminaci problémů spojených s komutabilitou, s vývojem a určením hodnot sérového kalibrátoru s odpovídající metrologickou návazností. K ověření se vhodně použijí i materiály EHK SEKK s hodnotami získanými referenční metodou IFCC 2011, které jsou k dispozici.

Je nutno upozornit, že deklarované hodnoty ALP, kalibračních a QC materiálů (byť označené IFCC 2011) mnoha firem, realizujících nikoliv přísně metrologickou návaznost, zahrnují korekce vztažené ke konkrétní soupravě i analytické instrumentaci, jsou proto nepoužitelné pro soupravy a analytické systémy jiného výrobce. Proto je třeba obecně volit materiály s výhradně metrologickou návazností k referenční analytice ALP IFCC 2011.

Tabulka 5. Bias stanovení kat. k. ALP při měření na anal. systému Bayer Advia testovací soupravou Advia s kalibrací pomocí firemního faktoru F (testované kontrolní materiály s referenčními hodnotami stanovenými v referenční laboratoři RfB Hannover)

Kontrolní materiál SEKK/ RfB Hannover	Referenční hodnota μkat/l (U _c)	Měřená hodnota μkat/l	Bias (%)
1	9,088 (0,218)	9,12	0,35
2	12,629 (0,302)	12,475	-1,22
3	3,140 (0,074)	3,15	0,32
4	5,930 (0,140)	6,06	2,19

Závěr

Uvedený text ukazuje možnost, jak v přechodném období do završení IFCC standardizace stanovení ALP možno v praxi zajistit maximální možnou harmonizaci výsledků v zájmu našich pacientů. Je to použití sérového referenčního materiálu s hodnotou, určenou referenční metodou ALP 2011. Doporučujeme pomocí něho nastavit/verifikovat hodnotu kalibračního faktoru.

Literatura

1. Schumann G, Klauke R, Canalias F, Bossert-Reuter S, Franck PFH, Gella FJ et al. IFCC primary reference procedures for the measu-

rement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37° C. Part 9: Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alkaline phosphatase. Clin Chem Lab Med 2011, 49/9:1439 - 1446.

2. Příbalový návod kitu ALPI, Flex reagent cartridge, REF DF150, SIEMENS, 2012-09-04.
3. Příbalový návod kitu ALP-AMP L 500, Kat. č. 10010216, ERBA-Lachema, 2012-11-01.
4. Firemní dokumentace Roche. ALP podle IFCC Gen 2. Nová referenční standardizace, reasignace cílových hodnot. Srpen 2014. Roche Diagnostics CZ.