

Harmonizace laboratorních vyšetření chronické ledvinové nemoci (CKD) v roce 2016

B. Friedecký, J. Kratochvíla

Restandardizace měření kreatininu v séru – nezbytná podmínka validního výpočtu eGFR

Doporučení KDIGO 2012 je mezinárodní, široce respektované doporučení ke klasifikaci pěti stupňů chronické renální choroby (CRD) pacientů na bázi hodnot eGFR (výpočtu odhadu glomerulární filtrace) a hodnoty ACR (poměr albuminu a kreatininu v moči). KDIGO 2012 je i podkladem k doporučení ČSKB a České nefrologické společnosti. Výpočet hodnot eGFR je podložen respektováním požadavků na standardizaci laboratorních měření (1).

Za počátek procesu harmonizace výpočtu hodnot eGFR lze považovat publikaci rovnice MDRD (Modification of Diet in Renal Disease), která byla navržena jako kvalitnější náhrada za kontroverzní výpočet podle Gaulta-Cockrofta, tehdy ještě ve složitější verzi, která požadovala kromě koncentrace kreatininu v séru také koncentrace močoviny a albuminu.

Rovnice MDRD byla publikována v roce 1999 (2). V roce 2002 byla v rámci harmonizace formulována nutnost restandardizace měření kreatininu k dosažení spolehlivosti výpočtu eGFR právě podle rovnice MDRD. Srovnáním hodnot kreatininu a eGFR dle MDRD u dvou studií s použitím mate-

riálů stejných pacientů byly zjištěny rozdíly mezi hodnotami kreatininu až 20 % a mezi hodnotami eGFR až 21 % (pro 90 % interval spolehlivosti). Bylo tedy nutné recalibrovat metody stanovení sérového kreatininu (3). Hlavní část práce zde vykonala pracovní skupina NKDEP (National Kidney Disease Education Program). Určila referenční systém měření sérového kreatininu a ostatní s ním související aspekty. Jejich data jsou shrnuta do tabulky 1 a pocházejí z klíčové publikace Myerse a spol (4).

Z pozdějších publikací již o recalibrování a restandardizovaných metodách stanovení kreatininu stojí za zmínku práce Greenberga a spol. (5), pojednávající o potenciálních analytických interferencích zvýšené koncentrace ketolátů a kyseliny askorbové u řady rutinních metod stanovení kreatininu. Četnost interferencí u Jaffého metod byla významně častější (46 % vzorků), než u enzymatických metod stanovení kreatininu (18 %).

Výsledky měření vzorků CAP LN 24 (USA) v letech 2006 až 2011 potvrdily vysoce pozitivní efekt recalibrace (6). Hodnoty bias po restandardizaci výrazně klesly z -7 % až 34 % (pro jednotlivé skupiny metod) v roce 2003 na hodnoty -5 % až 10 % v roce 2011. U vzorku LN 24 B (odpovídajícímu typu CKD 3) byly požadovány po účastnících programu z roku 2011 výpočty hodnot eGFR dle rovnice MDRD a byly nalezeny jen nevýznamné rozdíly (průměr 0,67 ml/s/1,73 m³ s intervalem pro jednotlivé metody 0,63-0,68 ml/s/1,73 m³).

NKDEP (National Kidney Disease Education Program)

Podrobné materiály o systému, organizaci a vlastní práci skupiny nalezneme na webových stránkách NKDEP (7). Jsou pravidelně aktualizovány a soustředěny na portálu „Laboratory evaluation“.

Tabulka 1. Souhrn harmonizačních dat standardizovaného měření kreatininu v séru a výpočtu eGFR rovnicí MDRD

Parametry	Data
Referenční materiál ke kalibraci	SRM-NIST 967(2 koncentrační hladiny)
Referenční materiál programu EHK	CAP LN 24 (USA)
Referenční metoda JCTLM	LC-ID-MS
Preciznost rutinního měření	CV ≤ 2,2 %
Bias rutinního měření	b ≤ 3,4 %
Celková chyba rutinního měření	TE ≤ 7,6 %
MDRD mez kvantifikace	≤ 1,0 ml / s / 1,73 m ³
Korekce Jaffého metod stanovení na nespecifičnost	Odečet 21μmol/l od výsledku měření

V současnosti jsou tam k nalezení i odstavce (v závorce rok aktualizace):

- Standardizace měření kreatininu (2012)
- Cystatin C metody stanovení (2014)
- GFR kalkulatory (2015)
- Komutabilita (2012)
- Soubor doporučení o kalibraci kreatininu (2015)
- Albumin v moči (2012).

Enzymatická metoda měření kreatininu v séru - nezbytný nástroj standardizace

Standardizace měření kreatininu vede sice k harmonizaci výsledků eGFR, ale řada laboratorů používá stále nespecifické metody, založené na Jaffého reakci. K harmonizování s mnohem specifičtější enzymovou metodou se používá u Jaffého metod korekce softwarovým odečtem „pseudokreatininu“. Hodnota odečtu je žel u různých výrobců různá a pohybuje se od asi 18 po až 30 $\mu\text{mol/l}$ kreatininu a někteří výrobci poskytují i uživateli volbu: korekci používat, nebo nepoužívat a to navzdory neblahým důsledkům pro harmonizaci stanovení kreatininu.

Již v roce 2008 byl publikován názor, že vyšší analytická specifická enzymatického stanovení kreatininu je nutnou podmínkou vyšší pravdivosti výpočtu eGFR, a že kompenzace“ Jaffého reakce odečtem hodnoty „pseudokreatininu“ není dostačující (8). Nizozemští autoři v zhruba stejné době odmítli použití Jaffého metody s kompenzací i bez ní u dětí a novorozenců, protože zjistili, že hodnoty eGFR z nich vypočtené jsou klinicky významně ovlivněny albuminem, IgG a HbF. Enzymatické metody těmto interferencím nepodléhají a měly by být u této skupiny pacientů voleny zcela automaticky (9).

Zcela recentní mezinárodní studie ze čtyř zemí (Itálie, Španělsko, Nizozemí, Velká Británie) s použitím šesti komutabilních materiálů zjistila hodnotu bias u enzymové metody stanovení kreatininu $b < \pm 5 \%$, a u Jaffého metody s kompenzací $b = -5 \%$ až $7,5 \%$, a u Jaffého metody bez kompenzace je pak $b = \pm 10 \%$. Účastníci studie používali testovací soupravy od globálních výrobců Roche, Olympus, Advia, Dimension, Abbott a všichni výrobci dodávali bez ohledu na potřeby harmonizace všechny tři výše uvedené

druhy metod (10). Je možné usuzovat, že velkou překážkou standardizace / harmonizace jsou právě globální výrobci sami a jejich tržní zájmy.

V tabulce 2 jsou uvedeny procentuální četnosti používání Jaffého a enzymatické metody u tří programů EHK. Je zde jasně vidět jednak nedostatečná úroveň harmonizace, dále pak poměrně výjimečný stav její úrovně v České republice.

Standardizace měření cystatinu C

Základní podmínkou standardizace stanovení cystatinu C je odvození hodnot pracovních kalibrátorů standardizovaných metod od certifikovaného referenčního materiálu ERM DA 471/IFCC. Materiál byl připraven rekombinantní technikou, koncentrace byla zjištěna gravimetricky a ověřena metodami RID, imunonefelometricky a imunoturbidimetricky (11). Po čtyřech letech od publikování přípravy tohoto referenčního materiálu ERM DA 471 byla dosažená úroveň standardizace otestována na dvou vzorcích směsi lidských sér v americkém programu CAP US CYS. Jeden modeloval pacienty bez CKD (vztažná hodnota 0,96 mg/l cystatinu C), druhý pacienty s přibližně třetím stupněm CKD (vztažná hodnota 2,31 mg/l cystatinu C). Programu CAP CYS se účastnilo 139 laboratorů.

Hodnoty reprodukovatelnosti byly u prvního vzorku (0,96 mg/l) $CV = 14,3 \%$, interval průměrů skupin metod pak 0,78 - 0,97 mg/l. U druhého vzorku (2,31 mg/l) byla stanovena hodnota $CV = 12,8 \%$ a interval průměrů skupin metod 2,05 - 2,31 mg/l. Nejnižší interval variabilit byl dosažen při kalibraci Gentian, nejvyšší ve skupině nedostatečně specifikovaných metod (26 % účastníků). Účastníci použili pestrých kombinací kalibrátorů a reagensií. Vcelku je nutné konstatovat neočekávaně nízkou úroveň standardizace a to čtyři roky po jejím zavedení (12). Velmi podobných výsledků, jako studie CAP dosáhla francouzská studie (13) z roku 2016. Nejlepší variabilitu vykazoval opět Gentian, nejhůře testovací soupravy Siemens Prospec (BN-II). Zlepšení oproti roku 2014 však vykazala metoda stanovení cystatinu C firmy Roche vlivem mezitím provedené recalibrace na ERM DA 471 u 2. generace testovacích souprav. Abbott používá dvou nesouhlasných kalibrací (Dako a Gentian) s významnými rozdíly ve výsledcích měření u různých typů přístrojů Architect. Efekt standardizace je

Tabulka 2. Procentuální zastoupení rutinních metod stanovení sérového kreatininu v třech programech EHK

Metoda stanovení	Program 4 zemí (10)	RfB Německo	SEKK ČR
Jaffé [%]	77	76	56
Enzymaticky [%]	23	24	44

zatím nedostatečný vlivem nedůsledné standardizace rutinních metod a závěry klinických studií mohou být z toho důvodu silně limitované (14).

Další studie z roku 2016 (15) ukázala, nakolik může standardizace ovlivnit výsledky výpočtu eGFR. Nedostatečná korelace mezi Roche 1. generace (bez metrologické návaznosti na ERM DA 471/IFCC) a Siemens (s návazností na ERM DA 471) byla vystředána velmi úzkou shodou při použití Roche 2. generace, překalibrované na ERM DA 471. Rozdíl mezi hodnotami eGFR CKD-EPI, vypočtenými metodami Siemens a Roche pak výrazně poklesly.

Doporučení KDIGO 2012 a experti NKDEP preferují k výpočtu eGFR před rovnicí MDRD nověji vypočtený a publikovaný vztah CKD-EPI (15).

Rovnice CKD-EPI vykazuje vyšší shodnost s hodnotou mGFR - změřenou metodou s iothalamátem a vysokou hodnotu P 30 (procenta eGFR s diferencí od referenční mGFR < 30), která dosahuje podle autorů až 84 %. Rovnice CKD-EPI jsou k nalezení na webových stránkách NKDEP a lze vyhledat řadu příslušných webových kalkulačtorů.

Výpočet eGFR pomocí rovnice MDRD byl omezený nespolehlivostí hodnot nad 1,0 ml/s/1,73 m². Nad tuto hodnotu se už nedoporučovalo kvantifikovat výsledek a měla se používat hodnota >1,0. Postup CKD-EPI umožňuje kvantifikaci výsledků až do 2 ml/s a posouvá hodnotu cut-off u skupiny pacientů bez CKD z původního eGFR > 1 ml/s/1,73 m² na ≥ 1,5 ml/s/1,73 m² (16).

Skandinávští autoři používají často k výpočtu eGFR z hodnot měření kreatininu rovnice Lund-Malmö, revidované od roku 2014. Podle Nymana a spol. je tento výpočet zatížený nižší hodnotou bias vůči iohexolové referenční metodě a má hodnotu P 30 rovnou 84 %, oproti metodě CKD-EPI s hodnotou P 30 rovnou 76 % (17). Avšak jiná publikovaná práce v jiném časopisu od v podstatě stejných autorů o rok později konstatuje, že výpočty pomocí CKD-EPI a Lund-Malmö neposkytují signifikantně odlišné výsledky eGFR z kreatininu (18).

Výpočty eGFR z hodnot cystatinu C

Základní práci je publikace Grubba a spol. z roku 2014 (19). V ní je k výpočtu použito šesti testovacích souprav pro měření cystatinu C, standardizovaných a s metrologickou návazností jejich kalibrátorů (5 druhů) na ERM DA 471. Autoři použili k výpočtu eGFR z cystatinu C dvou rovnic. Třísložkové CKD-EPI, uvedené na webu NKDEP (7) a nové rovnice CAPA (Caucasian, Asian, Pediatric and Adult cohorts). Jde o dvousložkovou rovnici o dvou proměnných (cystatin C a věk) bez potřeby údaje o pohlaví, která byla použita současně pro švéd-

skou, japonskou, pediatrickou a adolescentní populaci. Jako reference bylo použito iohexolové mGFR. Bias CAPA a CKD-EPI od reference byl fakticky totožný jak pro švédskou, tak i pro japonskou populaci, hodnota P 30 byla 84 % u CAPA a 80 % u CKD-EPI. Hodnoty u dětí a adolescentů vykázaly nízký negativní bias (-0,15 až -0,17 ml/s/1,73 m²). Podle autorů jsou rovnice CKD-EPI a CAPA pro výpočet eGFR z cystatinu C dobře srovnatelné. CAPA je validována zatím pro tyto dvě populační skupiny.

Výpočty eGFR kombinací hodnot z kreatininu a cystatinu C

Použití kombinovaného výpočtu eGFR z kreatininu i cystatinu C bylo testováno ve švédské populaci na souboru 1112 dospělých jedinců. Podle autorů zlepšilo hodnotu P 30 na 94 (96) % oproti hodnotám 87 (85) %, dosaženým u výpočtu buď z kreatininu nebo z cystatinu C. Nejlepších výsledků je dosahováno tam, kde se při kombinovaném přístupu dílí hodnoty eGFR kreatininu a cystatinu C neliší o více, než 10 %. Autoři nezaznamenali významné rozdíly při použití kombinací vztahů Lund-Malmö, CKD-EPI a CAPA (20).

Shlipak a spol. zjistili na podkladě metaanalytických studií vyšší schopnost odhadu rizika mortality při použití výpočtů eGFR kombinací hodnot získaných ze stanovení kreatininu a cystatinu C oproti hodnotám eGFR, získaným buď z kreatininu anebo jen z cystatinu C. Riziko ESRD (risks of death and end-stage of renal disease - konečné stadium) se schopností odhadu rizika nelišily. Autoři považují za rizikové všechny hodnoty eGFR < 1,42 ml/s/1,73 m² (21).

Pět výpočtů eGFR bylo srovnáno na souboru 1500 dospělých Korejců (z toho 49 % žen). Srovnány byly rovnice MDRD, Lund-Malmö tři rovnice CKD-EPI (pro kreatinin, cystatin C a společné stanovení kreatininu + cystatinu C). Diference výsledků byly až 30 %. Největší rozdíly byly nalezeny u osob s normálními a mírně sníženými hodnotami eGFR (22).

Závěr

K diagnostice CKD a k diskriminaci stupně poškození pacientů je k dispozici doporučení KDIGO 2012 (a jeho česká obdoba) a materiály NKDEP. Rovněž existuje několik matematických vztahů k vlastnímu výpočtu eGFR, validovaných na změřené referenční hodnoty mGFR. Zatímco výpočty eGFR se mohou vcelku spolehlivě opřít o provedenou restandardizaci měření kreatininu, není zatím měření cystatinu C standardizováno v rutinních laboratořích dostatečně (v důsledku nedostatečné harmonizace globálních výrobců). I stav měření kreatininu by bylo vhodné zlepšit častějším používáním analyticky specifickéjší enzymové metody stanovení.

Literatura

1. KDIGO 2012. Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *J Int Soc Nephrol* 2013,1:1-163.
2. Levey AS, Bosch JD, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D.: A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine. A new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Inter Med* 1999,130/6:461-470.
3. Coresh J, Astor BC, McQuillan G, Kusek J, Greene T, Van Lente F, Levey AS.: Calibration and random variation of the serum creatinine assay as critical elements if using equations to estimate glomerular filtration rate. *Am J Kidney Dis* 2002,39/5:920-929.
4. Myers GL, Miller GW, Coresh J, Fleming J, Greenberg N, Green T. a spol.: Recommendations for improving serum creatinine measurement. A report from the laboratory working group of the National Kidney Disease Education Program. *Clin Chem* 2006,52/1:5-18.
5. Greenberg N, Roberts WL, Bachmann LM, Whigt EC, Neil-Dalton R, Zakowski JJ, Greg Miller W.: Specificity characteristics of 7 commercial creatinine measurement procedures by enzymatic and Jaffe method principles. *Clin Chem* 2012,58/2:391-4016.
6. Killen AA, Ashwood AR, Ventura CB, Styer P.: Recent trends in performance and current state of creatinine assays. *Arch Pathol Lab Med* 2013,137/4:496-502.
7. National Kidney Disease Education Program (NKDEP). Laboratory evaluation. Dostupné na: <https://www.niddk.nih.gov>, nebo <http://nkdep.nih.gov/labprofessionals>.
8. Panteghini M, Scientific Division IFCC.: Enzymatic assays for creatinine: time for action. *Clin Chem Lab Med*. 2008,46/3:567-572.
9. Cobbaert C, Baadenhuijsen H, Weykamp CW.: Prime time for enzymatic creatinine method in pediatry. *Clin Chem* 2009,55/3:549-558.
10. Jassam N, Weykamp C, Thomas A, Secchiero S, Sciacovelli L. a spol.: Post-standardization of routine creatinine assays: are they suitable for clinical applications? *Ann Clin Biochem* 2017. doi:10.1177/0004563216664541.
11. Grubb A, Blirup-Jensen S, Lindström V, Schmidt C, Althaus H, Zegers I.: First certified reference material for cystatin C in human serum ERM-DA 471/IFCC. *Clin Chem Lab Med* 2010,48:1619-1621.
12. Eckfeld JH, Karger AB, Miller GW, Rynders GP, Inker LA.: Performance in measurement of serum cystatin C by laboratories participating in the CAP 2014 CYS Survey. *Arch Pathol Lab Med* 2015,139/7:888-893.
13. Bargnoux AS, Kuster N, Delatour V, Delanaye P, Gonzáles-Antuna A. a spol.: Reference method and reference material are necessary tools to reveal the variability of cystatin C assays. *Arch Pathol Lab Med* 2016,140:117-118.
14. Ebert N, Delanaye P, Shlipak M, Jacob O, Martus P, Bartel J. a spol.: Cystatin C standardization decreases assay variation and improves assessment of glomerular filtration rate. *Clin Chim Acta* 2016,456:115-121.
15. Levey AS, Stevens LA, Schmid Y, Zhang AF, Castro III, Feldmann HI. a spol.: A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Inter Med* 2009,150:604-612.
16. Delanaye P, Cavalier E, Cristol JP, Delanghe JR.: Calibration and precision of serum creatinine measurement: impact on the estimation of glomerular filtration rate. *J Nephrol* 2014,27/5:467-475.
17. Nyman U, Grubb A, Larsson A, Hansson L-O, Flodin M, Nordin G. a spol.: The revised Lund-Malmö GFR estimating equation outperforms MDRD and CKD-EPI across GFR, age and BMI intervals in a large Swedish population. *Clin Chem Lab Med* 2014,52/6:815-824.
18. Björk J, Grubb A, Sterner G, Back SF, Nyman U.: Performance of GFR estimating equations stratified by measured or estimated GFR. Implication for interpretation. *Am J Kidney Dis* 2015,66:1107-1108.
19. Grubb A, Horio M, Hansson LO, Björk J, Nyman U, Flodin M a spol.: Generation of a new cystatin C-based estimating equation for glomerular filtration rate by use of 7 assays standardized to the international calibrator. *Clin Chem* 2014,60:974-986.
20. Björk J, Grubb A, Larsson A, Hansson LO, Flodin M, Sterner G a spol.: Accuracy of GFR estimating equations combining standardized cystatin C and creatinine assays : a cross-sectional study in Sweden. *Clin Chem Lab Med* 2015,53/3:403-414.
21. Shlipak MG, Matsushita K, Ärnlöv J, Inker LA, Katz R, Polkinghorne KR a spol.: Cystatin C versus creatinine in determining risk based on kidney function. *N Engl J Med* 2013,369:932-943.
22. Ji M, Lee Y-H, Hur M, Kim H, Cho H-I, Yang H-S. a spol.: Comparing results of five glomerular filtration rate-estimating equations in the Korean general population. MDRD study, revised Lund-Malmö and three CKD-EPI equations. *Ann Lab Med* 2016,36:521-528.