

Referenční metoda stanovení katalytické koncentrace ALP (IFCC 2011) a vliv pH reakční směsi

P. Sedlák, J. Kratochvíla

Omlouváme se hned v úvodu laskavému čtenáři, že z tématu ALP děláme v bulletinu Fons přímo seriál na pokračování, ale aktuální stav standardizace stanovení ALP to bohužel stále vyžaduje.

Supervizoři SEKK věnovali dostatečný časový prostor do konce roku 2016 tomu, aby všichni účastníci zvládli přechod na referenční metodu stanovení kat. k. ALP z roku 2011 (1). Bohužel ani toto pětileté (2011 až 2016) přechodné období nebylo pro všechny dostatečné. Samozřejmě zde na vině nejsou samotní účastníci programu EHK. V éře dominujících uzavřených analytických systémů jsou závislí na svých dodavatelích IVD, kteří ve většině případů úkol „pětiletky“ již splnili. Proto také v komentáři supervizorů cyklu AKS4/16 bylo avizováno, že od roku 2017 se již nepočítá se systematickým rozšiřováním mezi D_{\max} z důvodu existence odlehklých skupin výsledků měření, které nevykazují metrologickou návaznost na referenční metodu. Nově budou tyto „nenávazné“ výsledky měření hodnoceny jako samostatná skupina.

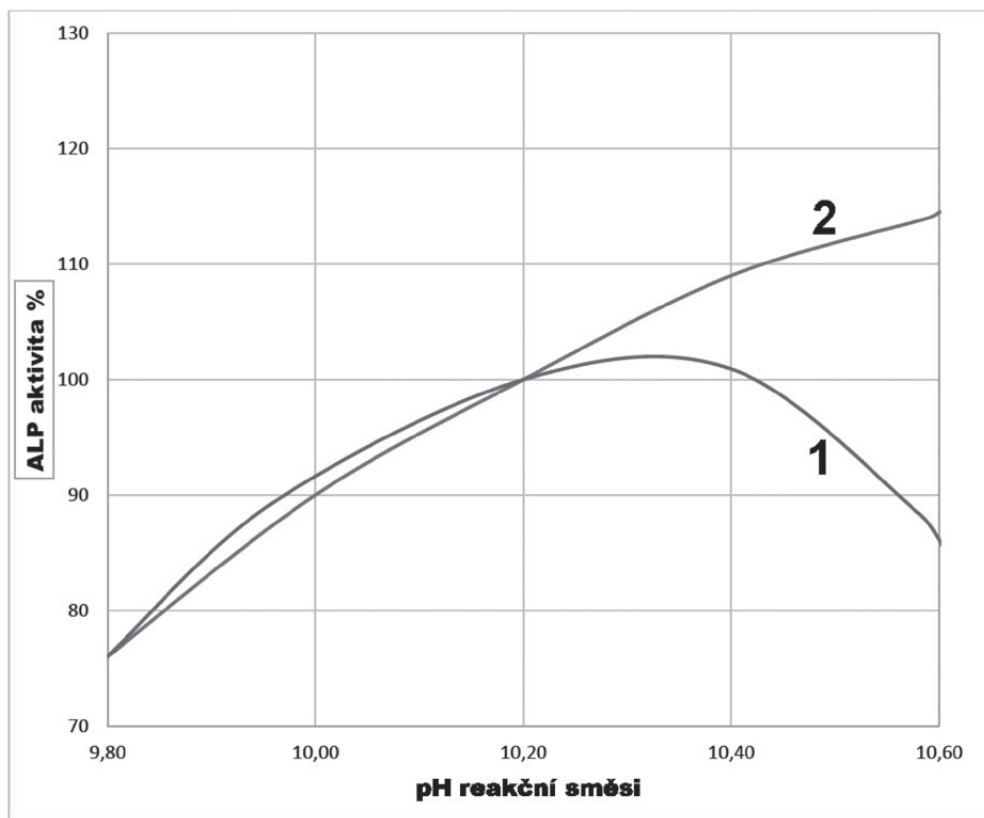
Samozřejmě nedokončená standardizace má kromě komerčních i své reálné příčiny, obojí jsme diskutovali již v předchozích textech (2, 3, 4). Tehdy ještě jen v převážně teoretické a intuitivní rovině s nedostatkem pádných argumentů. Zpochybňovaná byla už samotná volba referenční metody co do reakčního prostředí s poukazováním na obtížnou opakovatelnost přípravy reakční směsi s totožnými reakčními vlastnostmi, dokladovaná zřehadnou, dlouholetou a stálou absencí preparace CRM. Připouštíme zpětně v těch textech i trochu sentimentu nad odvvrženou metodou pro standardizaci rozhodně vhodnější, metodou s pufrem MEG (N-metyl-D-glukamin), (kterou publikovali L. Zahradníček s V. Chromým již v osmdesátých letech) a která byla v republice téměř monopolně (Lachema) a plošně prováděna ke spokojenosti analytiků i kliniků po celá desetiletí (5). Jak se dnes ukazuje, nebyla to jen intuice a nostalgie. Za pravdu dostáváme nejen zdlouhavou a stále neukončenou praktickou realizací standardizačního procesu, ale i průběžně novými odbornými sděleními, na která

na těchto stránkách reagujeme. Tentokrát je to nově pregnantní vysvětlení dalšího závažného úskalí v publikaci autorů z referenční laboratoře v Hannoveru (6). Aby paradoxů nebylo málo, mezi autory je sice na posledním místě, ale přece, i samotný hlavní autor referenční metody (dlouholetý vedoucí pracovní skupiny pro enzymy IFCC/C-RSE).

Vliv samotného pH reakční směsi byl samozřejmě v rámci konstrukce referenční metody zkoumán a optimalizován. Nahlédneme-li do textů vývoje referenční metody, je zde věnována pasáž volbě optimálního reakčního pH, pasáž věnována samotnému instrumentálnímu a technologickému postupu měření pH i pasáže dokonce dvoustupňové adjustace pH při přípravě reakčních činidel. Stejně tak je diskutován a zohledněn následný pokles pH pufru při skladování za přístupu vzduchu a na základě této hodnoty i stabilita a doba použitelnosti činidel. Nicméně jeho vliv ve vztahu k jednotlivým izoenzymům ALP byl zjevně podceňen. Teprve neúspěšná restandardizace IVD platforem pro stanovení ALP, realizovaná firmou Roche (7) v letech 2014-2015, obrací pozornost výrazněji tímto směrem. Firma Roche, podobně jako i jiní globální výrobci, si standardizační proces sice výrazně ulehčila, či spíše ho v podstatě obehla, když ponechala v nabídce původní typy souprav s nonIFCC složením reakční směsi, ale metrologickou návaznost na ALP IFCC (2011) se pokusila realizovat pomocí regresních studií na souborech pacientů. Nicméně i tento model by měl vést k zajištění metrologické návaznosti minimálně jako u jiných výrobců. Odpověď na otázku příčiny neúspěchu objasňuje zkratkou, zato výstižně:

- Ilustrativní Graf 1, vystihující koncentrovaně obsah publikace (6).
- Deklarace výrobce (Roche) kalibračního materiálu (8) C.f.a.s., kdy hladina ALP je modelována výhradně pomocí placentární (rekombinantní) ALP, tedy dle grafu č. 1 ta nejméně vhodná frakce ALP!

Křivka pro placentární izoenzym neposkytuje obvyklé plató, umožňující dosáhnout v praxi reálnou, textem (1) toleranci fixace optimálního reakčního $\text{pH} = 10,2 \pm 0,05$ požadovanou, a tím i dostatečně robustní analytickou metodu. Vliv i minimálních, zejména v praxi reálných odchylek pH na reakční rychlost, respektive naměřené hodnoty ALP za těchto podmínek kalibrace (8), je nepříjemně velký. Obdobně následně markantní zejména v oblasti nekontrolovaného poklesu pH činidel „on board“ za přístupu vzduchu. Autoři na základě modelací dospěli k nové maximální nejistotě hodnoty pH od optima $\text{pH} = 10,2 \pm 0,03$ při použití



Graf 1. Závislost aktivity ALP na pH reakční směsi dle (6)

Křivka 1 prezentuje závislost aktivity jaterní frakce ALP na pH a křivka 2 závislost placentární frakce ALP na pH; přitom katalytická koncentrace ALP je nastavena jako 100 % pro hodnotu pH = 10,2

kalibrátorů a QC se zastoupením placentární frakce ALP. V praxi to bude ale jen velmi těžko reálně dosažitelné.

Ze stejných důvodů tak i zřejmě jinak precizně provedené regresní studie (7) mezi výsledky získanými firemními stávajícími testovacími soupravami IVD Roche a výsledky získanými referenční metodou ALP 2011, evidentně ztratily nepostradatelný pevný společný bod, za který byl pro praxi zřejmě nešťastně zvolen právě kalibrátor C.f.a.s.

Nutně podobný osud pak měly i rozsáhlé studie postavené na shodných IVD, které měly vést k získání nových referenčních intervalů zejména pro pediatrickou populaci (9, 10, 11).

K jakému dalšímu kroku se uchýlí firma Roche, nelze zatím odhadovat. Zda to bude jednodušší cesta formou specifického kalibrátoru výhradně jen pro

kalibrace ALP s vhodnější skladbou izoenzymů, či velmi náročný proces změny matrice celosvětově používaného kalibrátoru C.f.a.s., a nebo bude postupovat jinak? Rozhodně nelze setrvat na stávajícím řetězci „metrologické návaznosti“ realizovaném pomocí současného kalibrátoru C.f.a.s (8) s placentární frakcí ALP.

Pro účastníky cyklů AKS SEKK je naopak dobrou zprávou, že současně se zavržením vhodnosti materiálu C.f.a.s. pro analytiku ALP byly autory (6) i kladně prověřeny QC materiály Seronorm a Seronorm High (SERO, Norway), aktuálně často užívané právě poskytovatelem EHK SEKK.

Pro ucelenou představu o aktuálním stavu standardizace stanovení ALP se podívejme, jak je tomu u dalších globálních výrobců (12).

Tabulka 1 Některé analytické systémy výrobců IVD pro měření katal. konc. ALP (12)

Výrobce	Platforma	Princip metody	Kalibrátor	Deklarovaná nejistota [%]	Metrologická návaznost
Abbott **	Architect	p-NPP	kalibr. faktor	NA	IFCC 2011
		p-NPP		NA	p-NPP (abs.koef.)
Beckman	AU	IFCC metoda	systémový kalibrátor	6 %	Beckman Coulter master calibrator
		DEA		NA	
	Synchron	AMP	enzyme validátor 1 a 2	6,22 % 1,86 %	IFCC 2011
Roche	Cobas c.	IFCC Gen 2	C.f.a.s.	0,59 %	stará metoda 1983
	Integra	IFCC Gen 2	C.f.a.s.	1,22 %	stará metoda 1983
	Modular	IFCC „kapalná“	C.f.a.s.	0,65 %	stará metoda 1983
		DGKL stará	C.f.a.s.	0,91 %	stará metoda 1983
Siemens	Dimension	AMP	ALPI calibrator	4,51 %	IFCC 2011
	Advia*	AMP	chemistry calibrator 1 a 2	3,7 %	IFCC 2011
				1,0 %	IFCC 2011

Pozn.: *Dle bulletinu firmy Siemens CZ se nově (v roce 2016) používá kalibrátor ADVIA Chemistry Alkaline Phosphatase 2 Calibrator (Kalibrátory Siemens jsou na bázi ALP z vepřových ledvin v matrici lidského albuminu)

**Složení reakční směsi nonIFCC, firma poskytuje kalibrační faktor

Použité zkratky: p-NPP = p-nitrofenyl fosfát; DEA = dietanolamin; AMP = 2-amino-2-metyl-1-propanol; IFCC 2011 - referenční metoda IFCC dle citace (1); QC = Quality Control

Tabulka 2. Nastavení odhadu cílové nejistoty k zamýšleným účelům (13)

Úroveň kvality $U_c \sim [\%]$		
minimální	použitelná / vhodná	optimální
4,5	3,0	1,5

Tabulka 3. Předběžné referenční hodnoty kat. k. ALP pro dospělou populaci (14)

Evropská populace ~ [μ kat/l]	
Muži	Ženy
0,71 – 1,92	0,55 – 1,64

Pozn. Studii provedlo CIRME Milano (Centre for metrological traceability in laboratory medicine – webová adresa: <http://users.unimi.it/cirme/home/index.php?selCategoria=210>) sídlící na milánské univerzitě (Università degli Studi di Milano)) ve spolupráci s italskou společností klinické biochemie a laboratorní medicíny SIBioC.

Australští autoři uvádějí společný referenční interval pro muže i ženy (australská a novozélandská populace ve věku nad 22 let) v rozmezí 0,5 až 1,84 μ kat/l (15).

Závěr

Patová situace v absenci CRM rovněž vychází z problémů se zvolenou referenční metodou citovaných již v publikaci (5). Volba zastoupení izoenzymů v CRM je vzhledem k těmto faktům a vzhledem k proměnlivému zastoupení frakcí ALP v patientských vzorcích obtížně řešitelný problém. Diskutovaná práce

(6), autory považovaná za revizi původní verze (1) co do nároků na adjustaci pH, bude sice řešením pro referenční laboratoře, avšak pro praxi představuje spíše jen dodatečné zdůvodnění pozorovaných diferencí. Vkrádá se až kacířská otázka: Nenastal čas revidovat referenční metodu co do reakčního prostředí? Precedens by tu už byl... (16, 17).

Literatura

1. Schumann G, Klauke R, Canalias F, Bossert-Reuter S, Franck PFH, Gella FJ et al.: IFCC primary reference procedures for the measurement 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. Sedlák P, Friedecký B, Kratochvíla J, Budina M.: Stav standardizace stanovení katalytické koncentrace alkalické fosfatázy (ALP) a další vývoj. *Klin Biochem Metab* 2015, 23/44:21-26.
3. Sedlák P, Kratochvíla J.: Standardizace stanovení ALP na etapy...FONS 2016 2 19-22.
4. Kratochvíla J., Sedlák P.: Referenční metoda pro stanovení katalytické koncentrace ALP, byť s přídomkem IFCC, je podmínka nutná, avšak nikoliv postačující. FONS 2016 4 21-22.
5. Kolektiv autorů: Doporučené metody v klinické biochemii (Kap. 4 Enzymy – L. Zahradníček). *Zdravotnické aktuality, Avicennum* 224 1992.
6. Grote-Koska D, Klauke R, Brand K, Schumann G.: Alkaline phosphatase activity – pH impact on the measurement result. *Clin Chem Lab Med* 2016, DOI 10.1515/cclm-2016-0771.
7. Firemní dokumentace Roche. ALP podle IFCC Gen 2. Nová referenční standardizace, re-signace cílových hodnot. Srpen 2014. Roche Diagnostics CZ.
8. Systémová informace Roche: Calibrator for automated systems Cobas č. 401. Roche Diagnostics, 2016-02.
9. Han L, Wang J, Zhang Q, Ke P, Wu X et al.: Development of reference intervals for serum alkaline phosphatase among adults in southern China traced to the new IFCC reference measurement procedure. *Clin Chem Lab Med* 2016, 54/4:659-666.
10. Gungoren MS.: An example of estimating reference range from hospital database. Reference range of ALP for pediatric population. *Clin Chem Lab Med* 2015, 53/11:eA225.
11. Christoph J.: Änderung der pädiatrischen Referenzwerte der Alkalischen Phosphatase bei Messung gemäss IFCC 2011. Deutsche Kongress für Laboratoriumsmedizin DGKL, Mannheim 24 – 27. 9. 2014.
12. Infusino I.: Progress and impact of enzyme measurement standardization. 10th CIRME Meeting. 17 – 18. 11. 2016 Milano, Italy.
13. Panteghini M, Bais R.: Tietz Textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 6th Edition. Elsevier books 2016.
14. Infusino I. at all.: *Clin Chem Lab Med* 2017, in press.
15. Koerbin G, Tate JR et AACB committee: Harmonising adult reference interval in Australia and New Zealand, the continuing story. 2016 37/3 121-129.
16. Friedecký B, Kratochvíla J, Malý M, Lapin A.: Diagnostic Kits Derived from Standard Method „DGKC 94“ as a Potential Tool for Improvement of Analytical Standardization of Alkaline Phosphatase. *Clin Chem Lab Med* 1998 36/6 405- 406.
17. Schmidt E, Gerhardt W, Henkel E, Klauke R, Liese W at al.: Proposal of standard methods for the determination of enzyme catalytic concentrations in serum and plasma at 37 degrees C. I. Alkaline phosphatase. Working group on enzymes. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992, 30/4:247-256.