

Je odhad glomerulární filtrace ze sérového kreatininu u dětí s onemocněním ledvin opravdu spolehlivý?

M. Fořtová, B. Sopko, M. Kohutiar, R. Průša

Abstrakt

Cíl studie: Porovnání metod stanovení sérového kreatininu (S-Kr) a zhodnocení vlivu použité metody na odhad glomerulární filtrace (eGFR) u dětí s onemocněním ledvin.

Metody: S-Kr jsme vyšetřovali u 168 dětí (102 chlapců, medián věku 12,8 let, rozmezí 1,7-15,9 let). V každém vzorku byl S-Kr stanoven Jaffého metodou a enzymově (biochemický automatický analyzátor Advia 1800, Siemens, USA). GFR byla odhadnuta podle Schwartzova vzorce.

Výsledky: Jaffého metoda poskytovala statisticky významně vyšší výsledky S-Kr (v průměru o 17 $\mu\text{mol/l}$) v nižším koncentračním rozmezí (do 200 $\mu\text{mol/l}$) a naopak, ve vyšších koncentracích (nad 250 $\mu\text{mol/l}$) poskytovala výsledky statisticky významně nižší (v průměru o 35 $\mu\text{mol/l}$). Do hodnoty S-Kr 60 $\mu\text{mol/l}$ Jaffého metodou byly hodnoty eGFR podle očekávání nižší s vyšším S-Kr ve srovnání s enzymovou metodou. Hodnoty eGFR však byly paradoxně vyšší u všech pacientů se S-Kr nad 100 $\mu\text{mol/l}$ při použití Jaffého metody. Tento paradox byl patrný zejména u dospívajících chlapců, a to především kvůli odlišnému koeficientu F použitému pro výpočet eGFR.

Závěr: Odhad GFR závisí na přesnosti měření S-Kr a koeficientu F ve Schwartzově vzorci. Tyto vlivy mohou mít závažné klinické důsledky především u dětí s pokročilým chronickým onemocněním ledvin stadia 4 a 5 (nejvíce u adolescentních chlapců), kdy enzymová metoda poskytuje významně nižší hodnoty eGFR, což může vyústit v časnější zahájení dialyzační léčby.

Klíčová slova: kreatinin, Jaffého metoda, enzymová metoda, Schwartzův vzorec

Úvod

Glomerulární filtrace (GFR) je nejdůležitější ukazatel funkce ledvin [1]. Její znalost je klíčová např. pro dávkování léků, které jsou vylučovány ledvinami, pro načasování zahájení dialyzační léčby. V rutinní praxi se GFR nejčastěji odhaduje ze sérového kreatininu, u dětí se používá aktualizovaný Schwartzův vzorec (bedside creatinine-based

Chronic Kidney Disease in Children, CKiD 2009) [1-3].

Spolehlivost hodnoty odhadované GFR (eGFR) závisí kriticky na stanovení sérového kreatininu (S-Kr) s minimální hodnotou bias (systematické chyby měření) [4]. K tomu je zapotřebí dostupné rutinní metody s dostatečnou analytickou specifičností. Stanovení kreatininu se provádí dvěma základními metodami: 1. Jaffého a 2. enzymovou metodou. Jaffého metoda byla publikována již v roce 1886 [5]. Dosud se s různými modifikacemi na některých pracovištích používá (hlavně kvůli nižší ceně), výsledky jsou však ovlivněny interferencemi celé řady především tzv. Jaffé pozitivních chromogenů [4]. V roce 1970 byly vyvinuty enzymové metody stanovení kreatininu, které jsou specifitější než Jaffého metoda a vedou k přesnějšímu odhadu GFR [6, 7]. V současné době by měly být všechny metody stanovení S-Kr návazné na referenční metodu – hmotnostní spektrometrii s izotopovou dilucí (ID-GC(LC)/MS) [1].

Několik studií ukázalo, že existují významné rozdíly v eGFR při použití různých rovnic pro různé metody měření S-Kr u dospělých [8-10]. Cílem naší retrospektivní studie bylo zjistit, zda podobné rozdíly v eGFR existují také u dětí. Porovnávali jsme sérové koncentrace kreatininu stanovené Jaffého metodou a enzymově a sledovali jsme vliv na vypočítanou eGFR u dětských pacientů s onemocněním ledvin.

Materiál a metody

Sérové koncentrace kreatininu jsme vyšetřovali u 168 dětí (102 chlapců) sledovaných pro různá akutní nebo chronická onemocnění ledvin. Medián věku těchto dětí byl 12,8 let (rozmezí 1,7-15,9). Veškeré osobní údaje o pacientech byly zašifrovány a anonymizovány (zákon 110/2019 Sb.), což znemožňuje jakoukoliv identifikaci. Výzkum byl v souladu s principy Helsinské deklarace [2013].

V každém vzorku séra byla koncentrace kreatininu stanovena Jaffého metodou a enzymově. Následně byla vypočtena eGFR pomocí Schwartzova vzorce:

$$\text{eGFR [ml/min/1,73 m}^2\text{]} = F \cdot \text{výška [cm]} / \text{S-Kr [}\mu\text{mol/l]}.$$

Pro eGFR v jednotkách „ml/min/1,73 m²“ je faktor F 36,5 v případě enzymové metody a v případě Jaffého metody 48,6 pro dívky ve věku 1 až 18 let a chlapce ve věku 1 až 12 let a 61,9 pro 12 až 18leté chlapce [3, 11].

Principem Jaffého metody je reakce kreatininu s kyselinou pikrovou v alkalickém prostředí za vzniku oranžově zbarveného komplexu. Intenzita barvy vytvořené během fixního času je přímo úměrná množství kreatininu přítomného ve vzorku. Intenzita se měří při vlnové délce 505 nm.

Enzymová kolorimetrická metoda je založena na enzymových reakcích Fossatiho, Prencipa a Bertioho [12]. Působením kreatininázy je kreatinin převeden na kreatin. Vzniklý kreatin je hydrolyzován kreatinázou za vzniku sar-

kozinu, sarkozin je oxidován sarkozinoxidázou na glycin, formaldehyd a peroxid vodíku. Vzniklý peroxid vodíku vytváří kvantitativní oxidativní kondenzací s N-(3-sulfopropyl)-3-methoxy-5-metylanilinem modré barvivo za přítomnosti peroxidázy a 4-aminoantipyrinu. Koncentrace kreatininu se stanoví měřením absorbance modrého produktu při 596/694 nm.

Kreatinin byl oběma metodami stanovován automatickým analyzátozem Advia 1800 (Siemens, USA). Stanovení (oběma metodami) bylo návazné na standardní referenč-

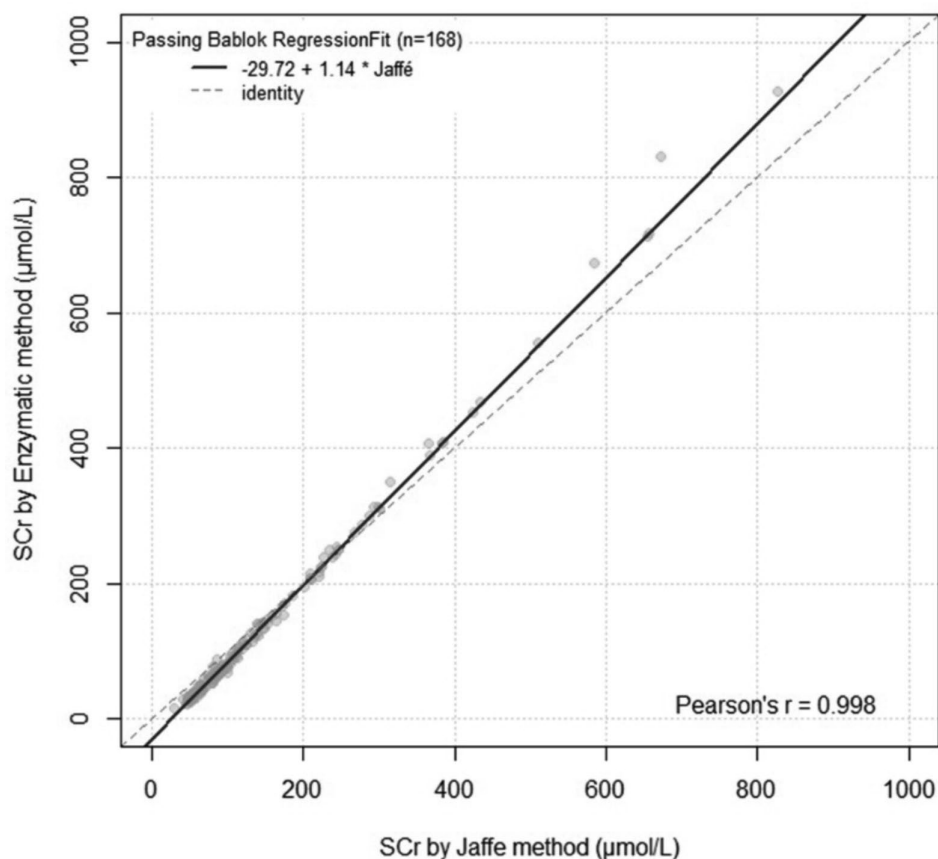
ní materiál NIST SRM 967 a ID-LC/MS. Kontrolní materiály použité v této studii (67 a 579 $\mu\text{mol/l}$) byly od firmy Bio-Rad (Německo).

Porovnávali jsme sérové koncentrace kreatininu stanovené Jaffého metodou a enzymově a hodnoty eGFR z těchto koncentrací odvozené. Vztah mezi těmito dvěma metodami byl hodnocen regresní analýzou Passing Bablok ($n(\text{boot}) = 30000$) [13]. Pro statistické analýzy byl použit „R-Statistical Package“ [14].

Výsledky

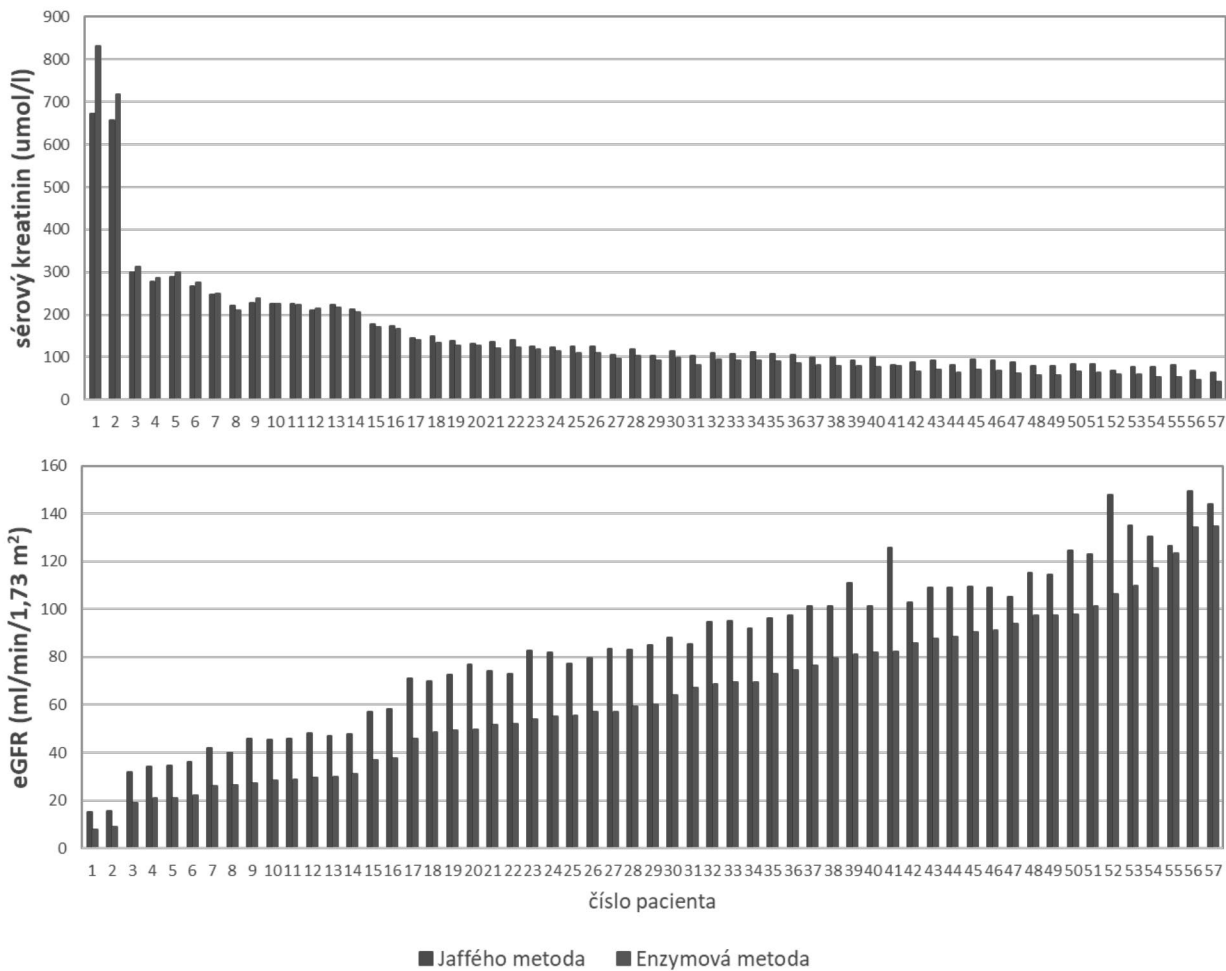
Tabulka 1. Aritmetické průměry, mediány a rozpětí sérového kreatininu (S-Kr) a odhadnuté glomerulární filtrace (eGFR) Jaffého a enzymovou metodou v souboru všech pacientů (N=168)

Parametr	S-Kr [$\mu\text{mol/l}$]		p	eGFR [ml/min/1,73 m^2]		p
	Jaffé	Enzymová		Jaffé	Enzymová	
Průměr \pm SD	143,4 \pm 128,8	134,7 \pm 150,7	0,0012	80,8 \pm 36,6	75,3 \pm 45,1	0,0013
Medián	96,5	78,0		87,9	70,5	
Rozpětí	30,2 – 826,4	15,0 – 927,0		177,0 – 7,1	267,5 – 4,9	

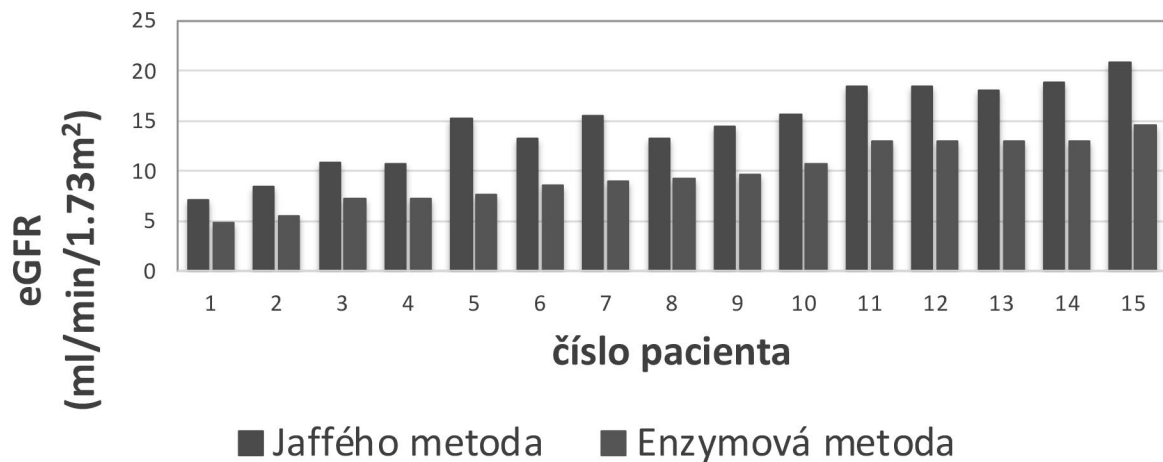


Obrázek 1. Lineární závislost enzymově a Jaffého metodou stanoveného kreatininu

Rovnice lineární regresní analýzy (Passing Bablok) $y = 1,14 x - 29,72$, kde „x“ představuje Jaffého metodu a „y“ enzymovou metodu, korelační koeficient $r = 0,998$



Obrazek 2. Sérový kreatinin a odhadnutá glomerulární filtrace (eGFR) u chlapců nad 12 let



Obrazek 3. Odhadnutá glomerulární filtrace (eGFR) odvozená z Jaffého vs. enzymového kreatininu u dětí se selháním ledvin (eGFR (enz) < 15 ml/min/1,73 m², N = 15; 7 chlapců; věk: medián 10,3 let; 1,7 – 15,9 let)

Diskuse

V tabulce 1 jsou uvedeny průměrné hodnoty, mediány a rozpětí hodnot sérového kreatininu a eGFR v souboru všech pacientů. V případě Jaffého metody vidíme významně vyšší průměrnou hodnotu i medián S-Kr, metoda ale poskytovala užší rozpětí hodnot. Oproti očekávání Jaffého metoda poskytovala vyšší průměrnou hodnotu i medián eGFR [rozpětí hodnot je opět užší ve srovnání s enzymovou metodou]. Tento paradox je dán odlišným faktorem F ve Schwartzově vzorci, viz dále [3,11].

Z grafu lineární regrese (obr. 1) je patrné, že regresní linie (znázorněna modře) protíná linii identity (znázorněna červeně čerchovaně) v hodnotě 212 $\mu\text{mol/l}$ (s 95% CI 185; 260). V této oblasti poskytovaly metody prakticky shodné výsledky S-Kr. V nižších koncentracích poskytovala Jaffého metoda hodnoty statisticky významně vyšší, ve vyšších hodnotách statisticky významně nižší.

Dostupná literatura se zabývá zejména pozitivní systematickou chybou v oblasti nižších koncentrací, která je dána přítomností Jaffé pozitivních interferujících chromogenů (např. glukóza, kyselina močová, askorbát, acetacetát, pyruvát, bílkovina, hemoglobin, lipémie, některé léky [cefalosporiny, streptomycin, trimetoprim, cimetidin, kyselina acetylsalicylová a další, [15-17]]). Hodnoty eGFR, vypočtené z výsledků Jaffého metody, mohou být v důsledku této pozitivní systematické chyby falešně nižší [2, 18]. Toto jsme však nepotvrdili v naší studii. V oblasti koncentrací do přibližně 200 $\mu\text{mol/l}$ poskytovala Jaffého metoda u všech pacientů vyšší hodnoty než metoda enzymová, ale předpokládané nižší hodnoty eGFR [při užití Schwartzova vzorce pro Jaffého metodu] jsme našli jen u 35 % případů. Tento paradox se začal objevovat již u některých pacientů s kreatininem nad 60 $\mu\text{mol/l}$, v oblasti kreatininu nad 100 $\mu\text{mol/l}$ to bylo u všech pacientů. Je způsoben vyšším faktorem F ve Schwartzově vzorci [3,11] v případě Jaffého metody, nejvyšší hodnotu faktor F dosahuje u chlapců nad 12 let. U skupiny těchto adolescentních chlapců vidíme, že hodnoty kreatininu byly při užití Jaffého metody významně vyšší přibližně do zmíněné hodnoty 200 $\mu\text{mol/l}$. Nad hodnotou zhruba 250 $\mu\text{mol/l}$ byly hodnoty kreatininu vyšší enzymovou metodou. Co se týče ale eGFR, tak díky vysokému faktoru F v čitateli Schwartzova vzorce při užití Jaffého metody, byly výsledky eGFR ve všech případech významně vyšší (obr. 2). Na nevhodnost užití Schwartzova vzorce s enzymově stanoveným sérovým kreatininem a jednotným faktorem F k odhadu GFR u dětí ve věku od 1 do 16 let upozornili také japonská autoři, kteří vyvinuli vlastní rovnice k odhadu GFR [19, 20].

Diference mezi metodami ve vyšších koncentracích ve prospěch naopak enzymové metody je v literatuře zmiňována ojediněle a příčina tohoto jevu není zcela objasněna. V doporučeních ČNS a ČSKB k vyšetřování GFR z roku 2009 je uvedeno, že výsledky měření Jaffého metodou

jsou zatíženy systematickou chybou závislou na koncentraci kreatininu, v oblasti koncentrací menších než zhruba 130 $\mu\text{mol/l}$ pozitivní, ve vyšších koncentracích negativní [21]. Lamb et al. [10] sledovali rozdíly v metodách stanovení kreatininu u starších lidí s převážně mírným nebo středně pokročilým chronickým onemocněním ledvin, se sérovým kreatininem stanoveným ID-MS metodou mezi 47 a 230 $\mu\text{mol/l}$. Enzymové metody vedly k přesnějším odhadu koncentrace kreatininu v celém rozsahu koncentrací, zatímco Jaffého metoda měla tendenci sérový kreatinin nadhodnocovat v oblasti nízkých koncentrací (přibližně pod 130 $\mu\text{mol/l}$) a podhodnocovat při vyšších koncentracích.

Naše studie sledující dětské pacienty došla k obdobným závěrům. V oblasti vyšších koncentrací byly hodnoty enzymově stanoveného kreatininu ve srovnání s Jaffého metodou vyšší. V naší studii byla tato hranice přibližně 250 $\mu\text{mol/l}$ a diference mezi metodami ve prospěch enzymové metody průměrně 35 $\mu\text{mol/l}$, v koncentrační oblasti nad 600 $\mu\text{mol/l}$ až 150 $\mu\text{mol/l}$. Diference ve prospěch enzymové metody se nedala vysvětlit pozitivními interferencemi při užití enzymové metody (některé léky, např. lidocain, flucytosin), ani negativními interferencemi typickými pro Jaffého metodu (především furosemid, [15-17]), protože žádný z našich dětských pacientů zmíněné léky neužíval.

U všech pacientů se sérovým kreatininem nad 200 $\mu\text{mol/l}$ jsme zaznamenali významně vyšší hodnoty eGFR při užití Jaffého metody. Z těchto zjištění plyne jednoznačný závěr pro klinickou praxi: díky rozdílu v hodnotách sérového kreatininu mezi metodami Jaffé a enzymovou mohou být pacienti s progredujícím chronickým onemocněním ledvin (CKD) 4. stadia a enzymově stanoveným kreatininem dříve klasifikováni jako CKD 5. stadia a dříve zařazeni do chronického dialyzačního programu nebo preemptivně transplantováni. Významný rozdíl mezi eGFR při měření kreatininu různými metodami je navíc umocněn odlišnou hodnotou faktorů F ve Schwartzově vzorci. Porovnání metod v této podskupině 15 pacientů s CKD 5. stadia v případě naší studie je znázorněno na obrázku 3.

Závěr

Odhad GFR závisí na přesnosti měření sérového kreatininu a koeficientu F ve Schwartzově vzorci. Do hodnoty S-Kr 60 $\mu\text{mol/l}$ Jaffého metodou byly hodnoty eGFR podle očekávání nižší s vyšším S-Kr ve srovnání s enzymovou metodou. Hodnoty eGFR byly paradoxně vyšší u všech pacientů se S-Kr nad 100 $\mu\text{mol/l}$ při použití Jaffého metody. Tento paradox byl patrný zejména u dospívajících chlapců, a to především kvůli odlišnému koeficientu F použitému pro výpočet eGFR. Tyto vlivy mohou mít závažné klinické důsledky především u dětí s pokročilým CKD stadia 4 a 5, kdy enzymová metoda poskytuje významně nižší hodnoty eGFR.

Poděkování Prof. MUDr. Tomáši Seemanovi, CSc. MBA za pomoc při interpretaci dat a při vypracování publikace.

Literatura

- Kidney Disease:** Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2013; 3: 1-163.
- Pottel H, Dubourg L, Goffin K, et al.** Alternatives for the Bedside Schwartz Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate in Children. *Adv Chronic Kidney Dis* 2018; 25: 57-66.
- Schwartz GJ, Muñoz A, Schneider MF, et al.** New equations to estimate GFR in children with CKD. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 629-637.
- Srisawasdi P, Chaichanajareerkul U, Teerakanjana N, et al.** Exogenous interferences with Jaffe creatinine assays: addition of sodium dodecyl sulfate to reagent eliminates bilirubin and total protein interference with Jaffe methods. *J Clin Lab Anal* 2010; 24: 123-133.
- Jaffe M.** Über den niederschlag, welchen pikrinsäure in normalen hrn erzeugt und über eine neue reaction des kreatinins. *Z Physiol Chem* 1886; 10: 391-400.
- Hoste L, Deiteren K, Pottel H, et al.** Routine serum creatinine measurements: how well do we perform? *BMC Nephrol* 2015; 16: 1-9.
- Lindbäck B and Bergman A.** A new commercial method for the enzymatic determination of creatinine in serum and urine evaluated: comparison with a kinetic Jaffé method and isotope dilution-mass spectrometry. *Clin Chem* 1989; 35: 835-837.
- Schmidt RL, Straseski JA, Raphael KL, et al.** A risk assessment of the Jaffe vs enzymatic method for creatinine measurement in an outpatient population. *PLoS One* 2015; 10: e0143205.
- Lee SC, Lim LM, Chang EE, et al.** Effect of differences in serum creatinine estimation methodologies on estimated glomerular filtration rate. *Singapore Med J* 2019; 60: 468-473.
- Lamb EJ, Wood J, Stowe HJ, et al.** Susceptibility of glomerular filtration rate estimations to variations in creatinine methodology: a study in older patients. *Ann Clin Biochem* 2005; 42: 11-18.
- Schwartz GJ, Brion LP and Spitzer A.** The use of plasma creatinine concentration for estimating glomerular filtration rate in infants, children, and adolescents. *Pediatr Clin North Am* 1987; 34: 571-590.
- Fossati P, Prencipe L and Berti G.** Enzymic creatinine assay: a new colorimetric method based on hydrogen peroxide measurement. *Clin Chem* 1983; 29: 1494-1496.
- Manuilova E and Schuetzenmeister A.** mcr: Method Comparison Regression. R package version 1.2.1. 2014; Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=mcr>.
- R Core Team. R:** A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria 2020; Available from: <https://www.R-project.org/>.
- Nigam PK and Chandra A.** Positive and negative false estimates of serum creatinine. *Interv Cardiol* 2017; 9: 163-167.
- Ducharme MP, Smythe M and Strohs G.** Drug-induced alterations in serum creatinine concentrations. *Ann Pharmacother* 1993; 27: 622-633
- Mitchell RT, Marshall LH, Lefkowitz LB Jr, et al.** Falsely elevated serum creatinine levels secondary to the presence of 5-fluorocytosine. *Am J Clin Pathol* 1985; 84: 251-253.
- Klee GG, Schryver PG, Saenger AK, et al.** Effects of analytic variations in creatinine measurements on the classification of renal disease using estimated glomerular filtration rate [eGFR]. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 737-741.
- Uemura O, Nagai T, Ishikura K, et al.** Reference glomerular filtration rate levels in Japanese children: using the creatinine and cystatin C based estimated glomerular filtration rate. *Clin Exp Nephrol* 2015; 19: 683-687.
- Uemura O, Nagai T, Ishikura K, et al.** Creatinine-based equation to estimate the glomerular filtration rate in Japanese children and adolescents with chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol* 2014; 18: 626-633.
- Zima T, Teplan V, Tesař V et al.** Doporučení České nefrologické společnosti a České společnosti klinické biochemie ČLS JEP k vyšetřování glomerulární filtrace. *Aktual Nefrol* 2009; 15: 129-139.