

KBM 2/2024

Detekce monoklonálních volných lehkých řetězců imunoglobulinů metodou izoelektrické fokusace s následným afinitním imunoblottingem

Vilímová K., Kušnierová P.

Cíle práce: Cílem práce bylo posouzení základních analytických charakteristik metody (IEF/AIB) k detekci monoklonálních volných lehkých řetězců (FLC), vzájemné porovnání s rutinně dostupnými metodami a její využití při rozlišení monoklonálního, resp. oligoklonálního charakteru volných lehkých řetězců.

Metodika: Do studie bylo zařazeno celkem 94 vzorků séra a moči pacientů z různých odborných ambulancí Moravskoslezského kraje s podezřením na monoklonální gamapatie. K průkazu monoklonální komponenty byla využita elektroforéza sérových proteinů, imunofixační elektroforéza a IEF/AIF. Ke statistickému zpracování dat byl použit program MS Excel a MedCalc.

Výsledky: IEF/AIB je vysoce citlivá metoda, jejíž mez kvantifikace se pohybuje okolo 0,025 mg/L pro FLC kappa a 0,25 mg/L pro FLC lambda, na rozdíl od elektroforézy sérových proteinů a imunofixační elektroforézy. Při posuzování metod na základě shody klinické interpretace bylo 100 % shody ($\kappa = 1,0$) dosaženo mezi metodami IMF a IEF/AIB pro průkaz monoklonálních volných lehkých řetězců v séru a 92,6 %, resp. 94,4 % shody pro průkaz monoklonálních volných lehkých řetězců kappa, resp. lambda v moči ($\kappa = 0,844$, resp. 0,886). Srovnáním výsledků pacientů s prokázaným oligoklonálním profilem volných lehkých řetězců kappa, resp. lambda metodou IMF s IEF/AIB bylo získáno 75%, resp. 68,8% shody ($\kappa = 0,215$, resp. 0,076), z čehož plyne, že metodou IEF/AIB se podařilo u 25 %, resp. 30,2 % vzorků prokázat monoklonální volné lehké řetězce v séru, které metodou IMF byly chybně interpretovány jako oligoklonální profil.

Závěr: Metoda izoelektrické fokusace s následným afinitním imunoblottingem je vysoce senzitivní metoda umožňující odhalit přítomný monoklonální imunoglobulin při negativitě elektroforézy sérových proteinů a imunofixační elektroforézy či rozlišit mezi monoklonálním a oligoklonálním profilem volných lehkých řetězců imunoglobulinů.

Klíčová slova: monoklonální imunoglobulin, oligoklonální profil, elektroforéza sérových proteinů, imunofixační elektroforéza, izoelektrická fokusace s následným afinitním imunoblottingem.

Uremický toxin indoxyl sulfát a možnost jeho ovlivnění dietou

Tomášová A., Tichá A., Zadák Z., Hyšpler R.

Tato studie byla podpořena výzkumnými projekty TAČR TJ04000280 a MZ ČR-RVO (FNHK, 00179906)

Indoxyl sulfát (IS) vzniká v organismu degradací z aminokyseliny tryptofanu obsaženého ve stravě. Ten se dostává jako součást reziduálního proteinu do tlustého střeva, kde je účinkem gastrointestinálních bakterií přeměněn na indol a následně vstřebán do krevního oběhu. V játrech poté dochází k enzymatické hydroxylaci a konverzi indolu na IS. Fyziologicky je IS vylučován močí – tubulární sekrecí a jeho sérová koncentrace je $<5,4 \mu\text{mol/L}$. Jako uremický toxin, který je z 90 % vázaný na proteiny, je velmi těžko odstranitelný dialyzačními technikami. U pacientů s poškozenou funkcí ledvin dochází k akumulaci IS, což negativně ovlivňuje celý organismus, např. způsobuje progresi kardiovaskulárních onemocnění a stimuluje oxidační stres.

Cílem studie bylo potvrdit spojitost mezi koncentrací IS a rychlostí katabolismu proteinů za využití predialyzační a postdialyzační koncentrace močovininy, a tudíž možnost ovlivnit koncentraci IS vhodnou dietou. Typ studie: Monocentrická prospektivní otevřená kohortní studie byla provedena na 108 pacientech podstupujících dialyzační léčbu na Nefrologické klinice Fakultní nemocnice Hradec Králové.

Výsledky: Byl potvrzen pozitivní vliv reziduální diurézy na snížení hladin IS ($p=0,005$), u anurických pacientů je koncentrace IS $160,4 \mu\text{mol/L}$ (122,6; 200,5), zatímco u oligourických pacientů $124,6 \mu\text{mol/L}$ (98,7; 168,1). Dále byla nalezena korelace mezi rostoucím příjmem bílkovin ve stravě a vzrůstající koncentrací IS ($p=0,040$).

Závěr: Vhodná personalizovaná úprava složení diety při zachování potřebného příjmu proteinů by mohla vést ke snížení sérové koncentrace IS u těchto pacientů.

Klíčová slova: uremické toxiny; indoxyl sulfát; selhání ledvin; dialýza.

Úvaha o harmonizaci postanalytické fáze evropských klinických laboratoří

Friedecký B.

První část stručného sdělení referuje o shrnutí výsledků dotazníkového sčítání o stavu harmonizace postanalytické fáze v Evropě, provedeného Pracovní skupinou EFLM pro harmonizaci. Další část na několika případech demonstruje nedostatečnost harmonizace jednotek měření na příkladech programů externího hodnocení kvality a textu mezinárodního guidelines diabetu ADA 2023. Třetí část se snaží o stručnou konfrontaci málo pokročilého stavu harmonizace post analytické fáze v současnosti s možnostmi pokroku v blízké budoucnosti, založeného na akceptování nejistot měření, hodnot biologických variací a zpracování big dat.

Klíčová slova: postanalytická fáze, jednotky měření, referenční intervaly, nejistoty měření, biologické variace.

AKTUALITY

- Remake guidelines laboratorní diagnostiky ADA 2023, jmenovitě preanalytika a analytické specifikace kvality (APS) u glukózy v krvi. Problémy preanalytiky plasmatické glukózy.
Friedecký B.

STANOVISKA VÝBORU ČSKB

- Stanovisko ČSKB ke stanovení beta-hydroxybutyrátu v plné krvi v režimu POCT
- Stanovisko České společnosti klinické biochemie ČLS JEP ke stanovení kardiálního troponinu při podezření na akutní koronární syndrom v režimu POCT.

NEKROLOG

Ing. Josef Ondřej

KBM 3/2024

Editorial

Omické metody reálně v laboratořích

Friedecký D.

V posledních letech se klinická laboratorní diagnostika stále častěji potkává s pojmy „omických metod“ vztahujících se ke genomice, proteomice či k metabolomice. Není tedy překvapivé, že právě v tomto čísle časopisu jsou zařazeny dva související příspěvky. První, věnovaný lipidomice přináší základní informace o oboru lipidomiky, který rozšiřuje naše porozumění metabolickým procesům v lidském těle. Tento rychle se rozvíjející vědecký

směr nabízí nové možnosti pro diagnostiku a léčbu řady závažných onemocnění, od kardiovaskulárních poruch po autoimunitní a neurodegenerativní stavy. Lipidomika je věda zabývající se studiem mnoha tříd lipidů v biologických systémech. Ve své klinické formě se zaměřuje na aplikaci lipidomických dat pro zlepšení diagnostických a terapeutických postupů. Díky pokročilým analytickým technikám s využitím hmotnostní spektrometrie, můžeme dnes z biologických vzorků podrobně analyzovat komplexní lipidové profily zahrnující stovky různých analytů, což přináší nové možnosti pro personalizovanou medicínu.

V centru tohoto vědeckého pokroku stojí Spinoff Lipidica, založený Michalem Holčápkem, předním expertem v oblasti lipidomiky. Lipidica si klade za cíl využít pokročilé lipidomické technologie k identifikaci specifických lipidových biomarkerů, které by mohly být indikátory raných stádií karcinomu slinivky. Karcinom slinivky břišní patří mezi nejagresivnější typy rakoviny s nízkou mírou přežití, což je částečně způsobeno pozdním odhalením nemoci. Včasná diagnostika může zásadně zlepšit prognózu pacientů, a zde se otevírá významný prostor pro aplikaci lipidomiky. Lipidica plánuje rozvíjet a komercializovat testy, které by na základě analýzy lipidů v krvi umožnily identifikaci osob s vysokým rizikem vzniku karcinomu slinivky břišní. Tento přístup by mohl zahrnovat sledování změn v koncentracích určitých lipidů, které jsou přítomny u pacientů s karcinomem slinivky v raném stadiu, ale chybí u zdravých jedinců.

Přestože klinická lipidomika přináší nadějně výsledky, čelí také výzvám, jako je potřeba standardizace metod a interpretace komplexních datových sad. I zde, jak je zřejmé také z druhého příspěvku tohoto čísla časopisu věnovanému informacím o metrologické návaznosti, nastal čas zabývat se omickými metodami pro potřeby precizní medicíny, zejména v onkologii a věnovat se zvláštnostem preanalytické fáze, často rozhodujícím faktoru pro kvalitu získaných dat.

Další integrace omických technik do klinické praxe vyžaduje výraznou multidisciplinární spolupráci a inovace v oblasti informačních technologií. Podpora výzkumů v klinických oblastech (i klinické lipidomiky, a projektů jako je např. Lipidica), je důležitá pro rozvoj a zavádění těchto pokročilých přístupů do zdravotní péče s cílem predikce a léčby mnoha závažných onemocnění a zlepšení kvality života pacientů po celém světě.

Možnosti včasného zachytu nádorových onemocnění slinivky břišní

Dosoudilová M., Kašparová K., Dolečková Z., Grodová, K.

Pozdní diagnostika nádorů slinivky břišní vede k nepříznivé prognóze, a tedy vysoké mortalitě. Pro diagnostiku se využívají zobrazovací metody, které pro pacienta představují značnou zátěž. Aktuálně jsou v České republice realizovány studie, v rámci kterých probíhá screening nádorů

slinivky u osob v riziku s využitím zobrazovacích metod. V rámci snah o zavedení biomarkeru pro včasný záchyt onemocnění se výzkumné aktivity zaměřují především na genetické a imunochemické přístupy. Další možností je lipidomický test na základě patentované metody vyvinuté skupinou prof. Holčapka, který je založen na koncentračních rozdílech lipidů v krevní plazmě zdravých jedinců a pacientů s nádory slinivky. Pro jeho ověření bude v příštích letech probíhat studie klinické funkce, kterou realizuje společnost Lipidica, a.s. ve spolupráci s 14 zdravotnickými zařízeními napříč Českou republikou.

Klíčová slova: lipidomika, včasná diagnostika, slinivka břišní, nádorové onemocnění.

Informace o metrologické návaznosti a preanalytické fázi omických metod

Friedecký B.

Nutnost zabývat se omickými metodami pro potřeby precizní medicíny, zejména v onkologii, je zřejmá. Některé okolnosti, jmenovitě nízká úroveň standardizace, metrologické návaznosti a nedostatečné znalosti preanalytických podmínek, způsobují, že rutinní používání omických metod je významně opožděné za úrovní výzkumu. To platí zejména v oblasti kapalných biopsií, velmi slibnému nástroji časné diagnostiky řady maligních chorob. Toto krátké sdělení má cíl poskytnout základní a recentní informace o standardizaci a preanalytických faktorech omických metod. Pokouší se o to formou, směřující k hybridní prezentaci. Informace pojednávají o metrologické návaznosti kalibrace omických metod, označované jako biometrologie. Dále pak o zvláštěnostech preanalytické fáze, často rozhodujícím faktoru kvality. Nakonec je poskytnuto několik informací o mezinárodních programech zlepšování preanalytické fáze (SPIDIA, SPIDIA4P).

Klíčová slova: omické metody, preanalytika, biometrologie, SPIDIA.

Využití biomarkerů microRNA metodou TT-PCR pro diagnostiku COVID-19

Štěpán D., Kušnierová P.

Cíl studie: Identifikace a kvantifikace prediktivních miRNA markerů umožňujících včasnou diagnostiku COVID-19.

Typ studie: prospektivní

Název a sídlo pracoviště: Ústav laboratorní medicíny, Fakultní nemocnice Ostrava, 17. listopadu 1790/5, 708 52 Ostrava Poruba

Materiál a metody: Do studie bylo zařazeno osm pacientů, kteří se nakazili virem SARS-CoV-2, a byli sledováni v čase. Odběr vzorků (krevní sérum a výtěr z nosohltanu) byl proveden na Klinice infekčního lékařství a Klinice anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny Fakultní nemocnice Ostrava. Stanovení microRNA bylo provedeno metodou TT-qPCR, izolace microRNA probíhala na izolá-

toru iCatcher 12 (CatchGene Co.) a pro reverzní transkripci s následnou detekcí byl použit detekční systém CFX96™ Real-Time (Bio-Rad). Ke statistickému zpracování dat byl použit software MS Excel a MedCalc®.

Výsledek: Do studie bylo zařazeno sedm mužů (87,5 %) a jedna žena (12,5 %). Bland-Altmanova analýza neprokázala statisticky významný rozdíl mezi vzorky krevního séra a výtěry z nosohltanu u všech studovaných miRNA. Nejvýznamnější změny v expresi microRNA během onemocnění COVID-19 byly zjištěny u hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-136a-5p a hsa-miR-222-3p. Tyto microRNA byly označeny za potenciální prognostické diagnostické markery na základě shody výsledků dvou statistických testů.

Závěr: Využití TT-qPCR pro kvantifikaci exprese miRNA představuje inovativní a perspektivní strategii v diagnostice COVID-19. Identifikace miRNA biomarkerů s dynamickými změnami exprese v průběhu infekce může významně přispět k rozvoji moderních diagnostických nástrojů. Pro potvrzení těchto nálezů a jejich integraci do klinické praxe je však nezbytné provést další validace prostřednictvím rozsáhlých klinických studií.

Klíčová slova: microRNA, SARS-CoV-2, COVID-19, TT-qPCR, biomarker.

Současné problémy externího hodnocení kvality

Friedecký B., Kratochvíla J.

Práce ukazuje přehled vývoje programů externího hodnocení kvality (EHK) v několika (cca 10) posledních letech. Hlavními tématy jsou význam komutability kontrolních vzorků, důsledky jejich omezeného používání v programech EHK, souvislost EHK s nejistotami měření, stav harmonizace a kategorizace hodnot APS (analytical performance specification).

Klíčová slova: EHK, APS, komutabilita, harmonizace, nejistoty měření.

prof. MUDr. Antonín Kazda, DrSc. devadesátiletý

RNDr. Hana Benáková, MBA – životní jubileum

Za prim MUDr. Josefem Mračkem