Myeloperoxidáza (MPO) – preanalytická fáze

A. Jabor, J. Franeková, M. Komínková

Krátké sdělení z praxe

ÚVOD

Myeloperoxidáza (MPO) je enzym leukocytů, zasahující do syntézy kyslíkových radikálů a přispívající k lipoperoxidaci, degradaci oxidu dusnatého (NO) a inhibici syntázy oxidu dusnatého (NOS) a dalším efektům. Původní „smysl" zvýšení kyslíkových radikálů je v generování obranného systému proti infekčním agens v rámci odpovědi leukocytové řady. V rámci chronického zánětu cévní stěny se ale tyto původně obranné mechanismy obracejí proti vlastním tkáním a mají řadu negativních důsledků. Zvýšené koncentrace MPO indikují probíhající zánět cévní stěny před klinickými projevy koronární nemoci a upozorňují na riziko nestabilních aterosklerotických plátů a zhoršené prognózy. Situace se zvýšením MPO zahrnují například chronické (systolické) srdeční selhání, indikují zvýšenou pravděpodobnost další progrese srdečního selhávání a mohou upozornit na zhoršení prognózy u osob se srdečním selháním. Myeloperoxidáza může mít aditivní efekt k prognostické efektivitě natriuretických peptidů a může přispívat k odhalení budoucího rizika koronární léze u jinak zdravých osob. Proto je vynikající zprávou, že ve velmi blízké budoucnosti bude možné stanovovat koncentraci tohoto enzymu rutinním postupem - je k dispozici souprava na stanovení MPO na systému Architect Abbott. V rámci testování této nové soupravy chceme v tomto sdělení upozornit na některé aspekty stanovení koncentrace MPO především z hlediska preanalytické fáze. Vzhledem k tomu, že část prací v literatuře pracuje se sérem, snažili jsme se o kvantitativní zhodnocení případného rozdílu mezi plazmou a sérem.

PREANALYTICKÁ FÁZE

Údaje v literárních pramenech se liší nebo je autoři klinických prací neuvádějí vůbec, podobně jako jsou vzácné údaje o analytické spolehlivosti použitých diagnostických postupů. Jako příklad uvádíme dva zcela odlišné přístupy.

Tang, 2007 (CardioMPO II test, ELISA): EDTA, zmrazení na –80 st. C, limit detekce 30 pmol/l, CV v sérii 4,8 %, norma 204 (SD 139) pmol/l, recovery 97,8 (SD 2,7) %.

Meuwese, 2007 (CardioMPO test, ELISA): sérum, limit detekce 13 pmol/l, CV v sérii 2 %, mezi sériemi 6 % (udávají ovšem opačné pořadí).

Pro soupravu MPO Abbott firemní materiály striktně doporučují použití EDTA plazmy a výslovně upozorňují na nevhodnost séra nebo plazmy získané s heparinátem lithným (nepochybně v souladu s firemním sdělením Shihové (Shih et al., Clin. Chem, 2008).

METODIKA

Porovnávali jsme koncentrace MPO u EDTA plazmy přijaté na stanovení BNP a současně dodaného séra pro stanovení troponinu I (a dalších ukazatelů, výsledky zde neuvádíme). Jednalo se tedy o rutinní vzorky v podmínkách běžné spolupráce mezi laboratoří a klinikou. V pokusu na dvou dobrovolnících jsme porovnávali jednak časové změny koncentrace v různých režimech a jednak rozdíl mezi koncentrací MPO v EDTA plazmě a séru. Jako výchozí hodnota sloužila koncentrace MPO získaná bezprostředně po odběru krve, dále jsme měli k dispozici materiály, kde proběhla separace s odstupem 30 (plazma i sérum), 60 a 90 minut (pouze plazma) od odběru krve. Následovalo stání separované plazmy (séra) po dobu 6 hodin při pokojové teplotě a konečně jsme sledovali vliv zmrazení a rozmrazení plazmy (séra) pro příslušné vzorky. Použit byl odběrový systém Vacutainer.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Obrázek 1 ukazuje rozdíl mezi koncentrací MPO v plazmě (EDTA) a séru při použití běžných vzorků dostupných v laboratoři. Jednoznačně vyšší hodnoty v séru a značná heterogenita výsledků ukazuje, že proces koagulace může mít na koncentraci MPO ve vzorku významný vliv. Abychom tyto vlivy poznali přesněji a kvantifikovali je, měřili jsme časové charakteristiky ve vzorcích získaných u dvou dobrovolníků. Výsledky ukazuje obrázek 2.

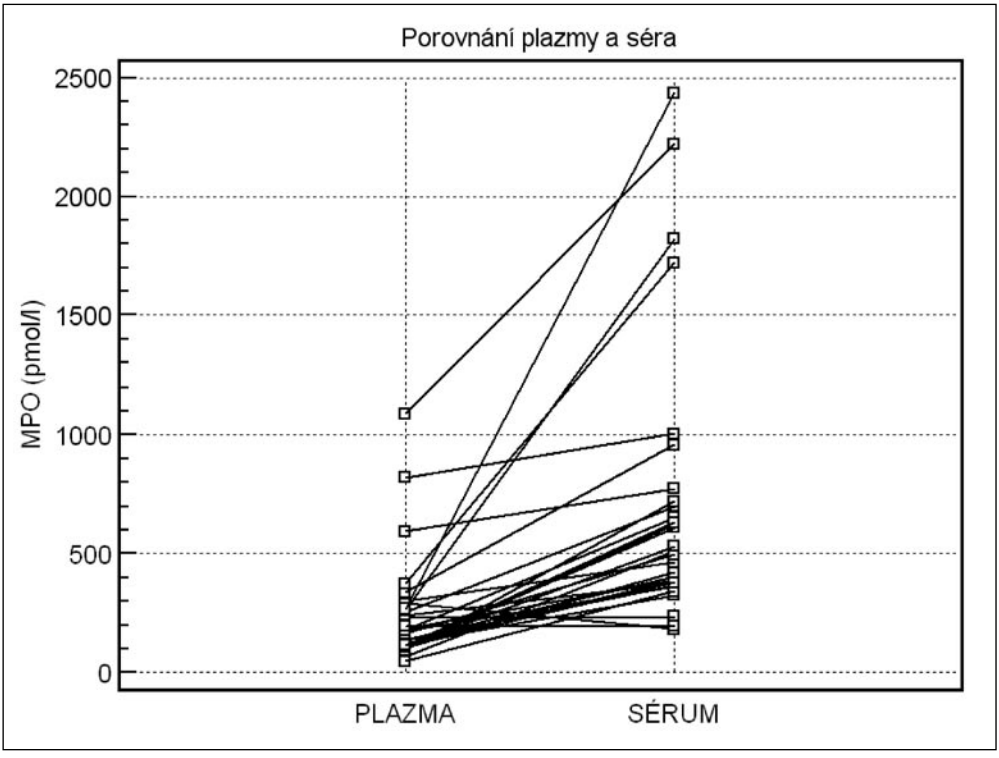
Je vidět, že koncentrace MPO v plazmě jsou stabilní během různých podmínek experimentu, zatímco odložení separace již o 30 minut jasně zvyšuje koncentraci MPO v séru. Další vliv stání nebo cyklu zmrazení a rozmrazení na koncentrace v séru již není patrný. Pokud jsme sledovali vliv odložené separace o 60, resp. 90 minut (sledovali jsme pouze plazmu), žádné významné změny se neprokázaly (zde jsme pracovali pouze s plazmou), nízkou variabilitu všech výsledků v plazmě u dobrovolníka A a B charakterizuje obrázek 3. Všechna měření jsme pro zajištění robustnosti informace prováděli v dubletech, rozdíly v duplikátech ukazuje tabulka 1.

ZÁVĚRY

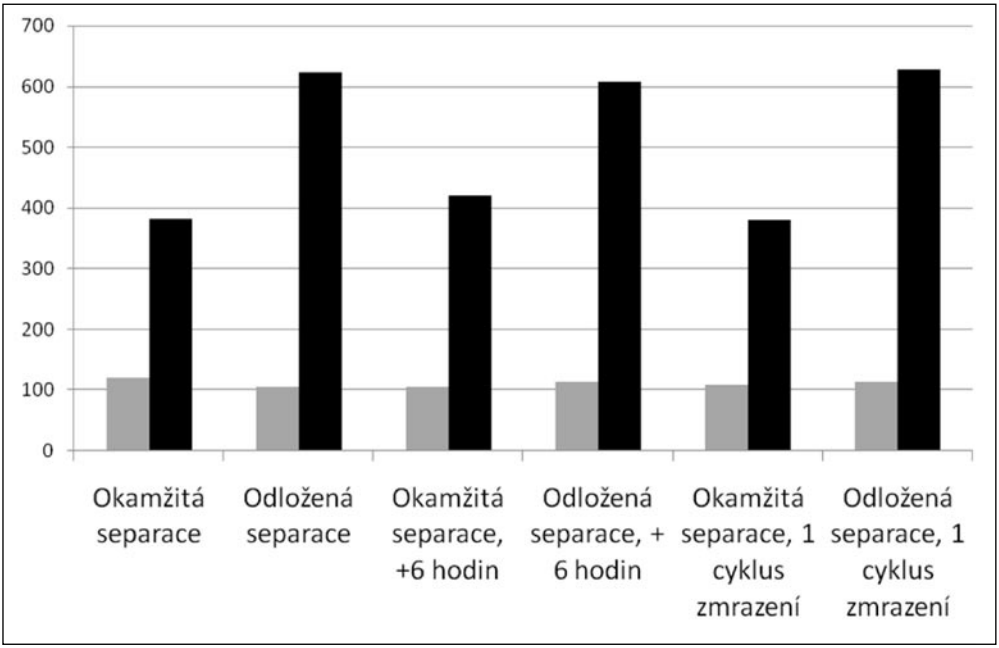
Volba vzorku pro stanovení koncentrace myeloperoxidázy má zásadní význam. Stanovení koncentrace MPO v séru, a podle literárních údajů i v lithium heparinové plazmě, vede k úniku MPO z leukocytů během fáze koagulace a k podstatnému zvýšení koncentrace ve vzorku. Vhodným antikoagulačním materiálem je EDTA, která s největší pravděpodobností blokuje uvolnění MPO z leukocytů. EDTA plazma je vhodným materiálem i z hlediska časově dostatečné stability vzorku do doby separace plazmy od korpuskulární fáze krve a podobně při použití EDTA plazmy nedochází k odchylkám při zmrazení a rozmrazení separované plazmy. Literární údaje, které jako biologický materiál zmiňují sérum, je nutné hodnotit s velkou dávkou skepse. Souprava pro stanovení MPO z EDTA plazmy vyvinutá pro analyzátor Architect je dalším pozitivním krokem k identifikování jedinců s rizikem cévního poškození.

LITERATURA

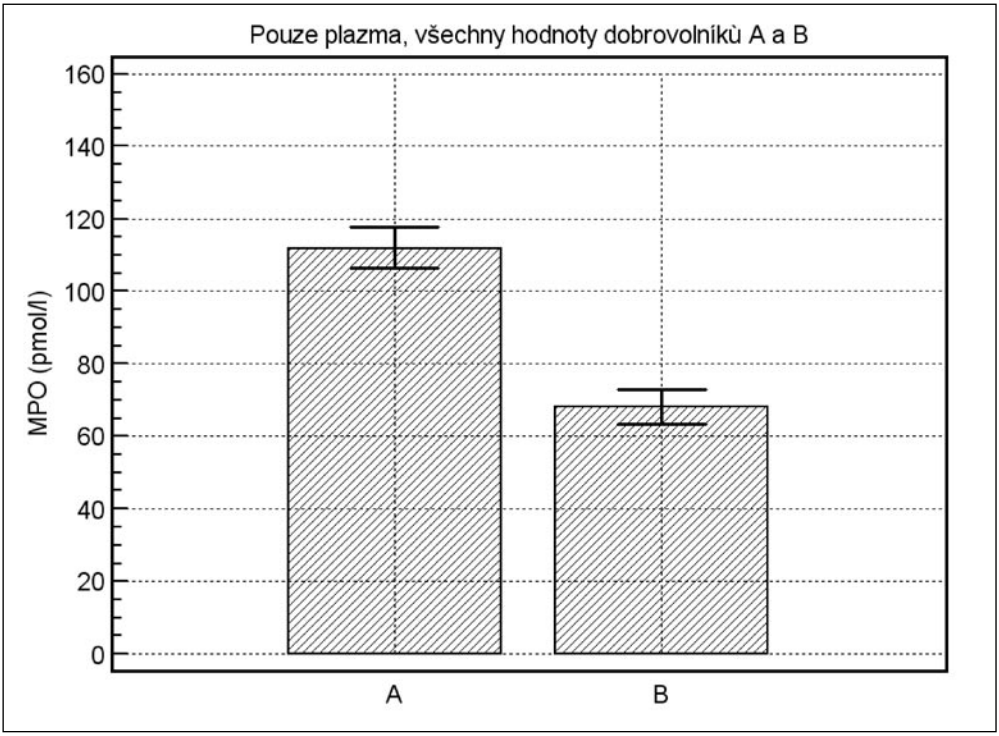
- Meuwese, M.C., Stroes, E.S.G., Hazen, S.L. et al.: Serum myeloperoxidase levels are associated with the future risk of coronary artery disease in apparently healthy individuals. J. Am. Col. Cardiol., 50, 2007, č. 2, s. 159 – 165.
- Tang, W.H.W., Tong, W., Troughton, R.W. et al.: Prognostic value and echocardiographic determinants of plasma myeloperoxidase levels in chronic heart failure. J. Am. Col. Cardiol., 49, 2007, č. 24, s. 2364 – 2370.
- Shih, J., Datwyler, S.A., Hsu, S.C. et al.: Effect of collection tube type and preanalytical handling on myeloperoxidase concentrations. Clin. Chem., 54, 2008, s. 1076 – 1079.



Obrázek 1: Koncentrace v plazmě a současně odebraném séru u rutinních vzorků (pacienti, N = 30). Rozdíl je významný v t-testu (t = -5,17, p < 0,0001), rozdílné jsou i variance v F-testu (p < 0,001).



Obrázek 2: Koncentrace MPO za různých podmínek. Šedé sloupce – EDTA plazma dobrovolníka, černé sloupce – sérum téhož dobrovolníka. Každý sloupec reprezentuje průměr stanovení v duplikátu. Odloženou separací se míní odložení separace o 30 minut.



Obrázek 3: Koncentrace MPO (pmol/l) v plazmě dobrovolníků A a B za všech režimů, tj. okamžitá separace, separace odložená o 30, 60 a 90 minut, totéž po 6 hodinách stání při pokojové teplotě a totéž po 1 cyklu zmrazení a rozmrazení. Udána je průměrná koncentrace z 3 * 4 = 12 měření v duplikátech u každého dobrovolníka a 1 směrodatná odchylka.

Tabulka 1: Rozdíly v duplikátech (rozdíl vypočten jako procento hodnoty rozdílu na průměrné hodnotě dubletu)

	Medián	10. percentil	90. percentil
Plazma (221 pmol/l, N = 48)	1,54 %	-6,1 %	+14,4 %
Sérum (483 pmol/l, N = 30)	-2,1 %	-8,6 %	+6,4 %