

Celkový bilirubin v séru

Lekce metrologické návaznosti v praxi

(O REKALIBRACI MĚŘENÍ CELKOVÉHO BILIRUBINU)

B. Friedecký, J. Kratochvíla

Důvod sdělení

Desítky let se provádí toto stanovení zdánlivě bez problémů. V poslední době nastala dramatická změna a číselné výsledky této zdánlivě dobře zavedené metody se mají měnit v rozsahu 10-20 %. Jaké jsou důvody takové náhlé změny?

Primární referenční materiál

NIST-SRM 916a je substance nekonjugovaného bilirubinu. Materiál byl připraven v roce 1988, expirovat má na konci 2009. Materiál nemá certifikovanou hodnotu koncentrace bilirubinu, certifikovaná je čistota substance ($98,3 \pm 0,3$ %) a hodnoty molárních absorpčních koeficientů. Ty jsou odvozené z referenční metody podle Doumase (referenční variantě Jendrassikovy-Grofovy metody).

Certifikát NIST SRM 916 a lze vyhledat na adrese www.nist.gov

Referenční postupy měření

V databázi Spojené komise pro návaznost v laboratorní medicíně (JCTLM) jsou uvedeny

- referenční metoda DGKL
- referenční metoda Doumas BT, Kwok Cheung PP, Perry BV, Jendrzejczak B, McComb RB a spol. Clin Chem 1985, 31, 1779-1789

Jde však o dvě různá označení zcela identické metody!

Analytické charakteristiky referenční metody jsou uvedeny na adresách www.ifcc.org/JCTLM nebo www.bipm.fr/JCTLM

Diference mezi metodami

Byla důkladně vyhodnocena na podkladě výsledků externího hodnocení kvality CAP (College of American Pathologists). V časovém intervalu 2003-2006 byly vyhodnoceny vzorky o „novorozenecké“ koncentraci 340-451 $\mu\text{mol/l}$. Šlo o devět kontrolních cyklů s 1718-4982 účastníky, tedy o dostatečně reprezentativní soubor dat. Bylo dosahováno reprodukovatelnosti CV % = 4,9-7,0. Pro srovnání v programu SEKK- AKS 2008 se

hodnoty reprodukovatelnosti pohybovaly v roce 2008 v intervalu 4,0-8,4 % a v programech novorozeneckého bilirubinu v témže roce v intervalu 4,1-6,5 %.

Diference mezi výsledky různých výrobců IVD se však pohybovaly v širokém intervalu -13,6 až +12,5 % od průměru (ALTM) hodnot všech účastníků (Lo SF, Jendrzejczak B, Doumas BT. Arch Pathol Lab Med 2008, 132, 1871-1875). To svědčí pro rozdílnou úroveň kalibrace, respektive pro nedostatečnou srovnatelnost různých kalibrátorů.

Podobné diference našli nizozemští autoři už v roce 2005 mezi výsledky, získanými systémem Ortho Diagnostic („suchá chemie“) a výsledky, získanými diagnostikou Roche na analyzátozech Hitachi. Diference výsledků Ortho vůči cílové hodnotě byla +20 %, zatímco diference výsledků Roche Hitachi byla -10 %. Celkově tedy byla diference mezi „suchým“ a „mokrým“ systémem 30 % (Apperlov JJ, van der Graaf F, Scharnhorst V, Vader ML. Clin Chem Lab Med 2005, 43, 5, 531-535).

V kontrolním programu SEKK používají účastníci rozdílného spektra metod, než v programu CAP (například chybí metody „suché chemie“). V roce 2003 (cyklus AKS1/03) byla diference mezi výsledky různých výrobců -4 až 8,4 %, v roce 2008 (cyklus AKS4/08) vzrostla na -3 až 13 %, patrně vlivem zavedení nových metod na principu oxidačních stanovení.

Změny kalibrace u diagnostik Roche

Byly oznámeny zákazníkům firmy ke konci roku 2008. Změnou nastavení „master“ kalibrátoru mělo být dosaženo signifikantního snížení výsledků měření o -10 až -17 %. Změny měly být různé podle typu sedmi různých typů diagnostik, používaných na čtyřech typech instrumentace. Předpokládá se sedm různých hodnot v identickém kalibrátoru!

První kvalifikované odhady snížení výsledků

V programech SEKK stanovily laboratoře, uvádějící, že provedly recalibraci, snížení výsledků o 17 % pro hodnoty ALTM 62,8-74,3 $\mu\text{mol/l}$ a o -22 % pro koncentraci 27,5 $\mu\text{mol/l}$. Údaje laboratoří nebyly verifikované a mohou být proto i poněkud zkršené, nicméně zdá se, že snížení hodnot je ještě vyšší, než avizované. Je nutno vzít do úvahy, že do hodnoty ALTM byly vzaty i recalibrované hodnoty, takže reálné snížení je ještě o něco vyšší, než zde uvedené.

Externí hodnocení kvality světových referenčních laboratoří-program RELA

Je organizováno od roku 2003 Jde o oficiální program EHK, určený pro referenční laboratoře a organizovaný IFCC. Jednou ročně analyzují referenční laboratoře dva kontrolní vzorky. Ještě v letech 2005-2006 byla diference u celkového bilirubinu mezi dvěma referenčními laboratořemi (více účastníků nebylo) -10 až -14%. To je diference u referenčních měření zcela neúnosná. Po úpravách referenčních metod a po vyladění kalibrace klesla diference mezi referenčními laboratořemi v letech 2007-2008 na 0,7 až 1,0%. Počet referenčních laboratoří vzrostl v té době na pět, včetně kalibrační laboratoře Roche. Postup a výsledky vyladění referenčních laboratoří IFCC v programu externího hodnocení kvality RELA je popsán v práci, uveřejněné bohužel až v září 2009 a v časopise, který není u nás příliš rozšířen (Lo SF, Kytzia H-J, Schuman G, Swartzentruber M, Vader HJ a spol. Interlaboratory comparison of the Doumas bilirubin reference method. Clin Biochemistry 2009, 42, 1328-1330). Fakt pozdního zveřejnění a nižší přístupnosti těchto informací vnesl zmatek do vědomí veřejnosti, hodnocení výsledků EHK a do hodnocení případných změn referenčních intervalů.

Východisko recalibrace Roche

Situace v programu RELA se stala východiskem pro recalibraci diagnostik Roche. Cílem recalibrace je konečně po 24 letech existence referenční metody a 21 letech existence primárního referenčního materiálu NIST SRM 916a realizovat návaznost a jí podmíněnou srovnatelnost rutinních metod stanovení bilirubinu.. Zcela nedávno přistoupila k recalibraci i firma Abbott.

Úspěch „recalibrace“ bude v první řadě závislý na tom, nakolik se podaří přenést hodnoty referenční metody na pracovní kalibrátory různých výrobců. Úspěch takového přenosu bude záviset zejména na maticí a komutabilitě takových kalibrátorů, které obvykle kromě nekonjugovaného bilirubinu obsahují například taurobilirubin a často i značný podíl albuminů zvířecího původu. Zatím je situace

taková, že úroveň hodnot v pracovním kalibrátoru Roche se v závislosti na použité měřící platformě pohybuje v rozsahu 7%.

Na bázi referenčních hodnot, získaných Doumasovou referenční metodou mají být nyní v programu CAP novorozenecký bilirubin hodnoceny laboratoře účastníků. Doposud byly hodnoceny v rámci svých metodických skupin. Je vhodné poznamenat, že tato „převratná“ novinka funguje už v některých evropských programech EHK slušný počet let.

Požadavek na bias

Maximální hodnota bias, odvozená z biologických variací je 11,4% (www.westgard.com)

Změna, způsobená recalibrací je vyšší, než tato hodnota. Interval předpokládaných diferencí mezi různými typy diagnostik Roche (7%) je nevhodně vysoký (61% maximální akceptovatelné hodnoty bias).

Shrnutí

Přestože referenční metoda měření celkového bilirubinu existuje řadu let (od roku 1985) a primární referenční materiál je k dispozici ještě déle (současná jeho šarže byla certifikována v roce 1988), nebyla návaznost rutinních měření k těmto referencím před rokem 2006 realizována ani v referenčních laboratořích IFCC. V důsledku toho jsou až doposud výsledky měření celkového bilirubinu v séru, dosažené různými metodami, reagenčními kity a přístroji nedostatečně srovnatelné. Nesrovnatelné byly dokonce i výsledky referenčních laboratoří, používajících referenční (Doumasovy) metody. Až v letech 2007-2008 bylo dosaženo vysoké úrovně srovnatelnosti referenčních měření. Od roku 2009 se datuje snaha dosáhnout srovnatelnosti i na výsledky rutinních metod recalibrací stanovení s využitím návaznosti hodnot pracovních kalibrátorů na primární referenční materiál NIST SRM 916a. Tento proces má velké zpoždění a je zatížen neúměrně dlouhým časem trvání. Proces není výrobcí IVD koordinovaný a není provázán s postanalytickými procesy, zejména pak korekcí referenčních intervalů a u novorozenců s prověřením a případnou korekcí rozhodovacích limitů.