

# Validace stanovení AFP v plodové vodě soupravou AFP Access

F. Šturm, V. Bartoš

Předmětem práce bylo provedení validace stanovení AFP v plodové vodě soupravou AFP Access, kat. č. 33210, na analyzátorech UniCel DxI 800, výrobce soupravy i analyzátorů Beckman Coulter Inc., USA. Důvodem byla skutečnost, že výrobce specifikované soupravy neuváděl v r. 2010 v dokumentaci možnost jejího použití pro stanovení AFP v plodové vodě.

Stanovení AFP v plodové vodě je jedním z prvků screeningu vrozených vývojových vad ve 2. trimestru těhotenství. Vodítkem pro interpretaci výsledků tohoto stanovení je vyhodnocení násobků mediánů AFP v závislosti na délce těhotenství vhodným expertním programem – např. ALPHA.

Stanovení se provádí na výše uvedených analyzátorech dle návodu stanoveného výrobcem soupravy.

Validace byla provedena na základě „Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích“, autoři Friedecký B., Šprongl L., Kratochvíla J., Plzák Z., vydala ČSKB ve druhém vydání 11/2010.

Príslušné testy jsme se rozhodli provést paralelně na dvou pracovištích:

- Laboratoře MeDiLa spol. s r. o., Štrossova 239, 530 03 Pardubice, dále pracoviště Pardubice
- Referenční laboratoř pro RSA, Centrum laboratorní diagnostiky, Fakultní nemocnice Ostrava, 17. listopadu 1790, 708 52 Ostrava – Poruba, dále pracoviště Ostrava

## Plán kvantitativních testů

1. Nejprve připravit 2 série alikvotů reálných vzorků v dostatečném počtu k provedení níže uvedených testů vzhledem k paralelnímu provedení testů na obou pracovištích.
2. Test preciznosti – mezilehlá preciznost, opakovatelnost.
  - 2.1. Ke zjištění mezilehlé preciznosti získat 20 výsledků měření 3 vzorků o různých koncentracích. Vyhodnotit průměr, směrodatnou odchylku (dále SD) a variační koeficient (dále CV). Požadovaná hodnota CV <12%.
  - 2.2. Ke zjištění opakovatelnosti získat 5 - 10 výsledků měření 3 vzorků o různých koncentracích. Vyhodnotit průměr, SD, CV. Požadovaná hodnota CV <10%.

3. Vychýlení metody – bias. Nebude se provádět, není k dispozici standardizovaný referenční materiál (plodová voda).
4. Recovery. Použit vhodný přírůstek WHO standardu AFP k reálným vzorkům. Dále použít mísení vhodných reálných vzorků. Požadovaná hodnota recovery 85 až 115 %.
5. Test ředění. Provést test ředění vzorků s vysokým obsahem AFP v kaskádě 2x, 4x, 8x, 16x. Požadovaná hodnota odezvy při ředění 85 až 115 %.
6. Porovnání s jinou metodou. Provést porovnání se stanovením AFP v plodové vodě soupravou AFP screening IRMA KIT, kat. č. A37404, výrobce Immunotech a. s. Praha. Tento způsob stanovení byl původně používán na obou pracovištích. Porovnání provést nejméně se 30 vzorky. Požadovaná hodnota směrnice regresní přímky je v intervalu 0,80 až 1,20. Požadovaná hodnota korelačního koeficientu >0,75.

## Vlastní provedení validace

### 1. Příprava sérií vzorků pro testy

Na pracovišti Pardubice byly připraveny 2 série reálných vzorků plodových vod k provedení paralelních testů na obou uvedených pracovištích. Byly použity plastové zkumavky objemu 5 ml s těsnou zátkou. Každá série obsahovala:

- 14 x 0,5 ml vzorku A, B a C pro test mezilehlé preciznosti
- 1 x 1,0 ml vzorku A, B a C pro test opakovatelnosti
- 1 x 3,0 ml patologického vzorku pro test ředění.

Po alikvotaci byly obě série zamrazeny při -20°C. Jedna série byla ve zmraženém stavu dopravena na pracoviště Ostrava. K provedení příslušného testu byl vždy rozmrazen potřebný alikvot.

### 2. Test preciznosti

#### 2.1. Test mezilehlé preciznosti

K tomuto testu byl vždy v určený den rozmrazen příslušný alikvot. Stanovení byla provedena na začátku a na konci směny. Použitý alikvot byl po prvním stanovení uchovávan při +2°C až +8°C, po druhém stanovení byl vyhozen.

Tab. 1.: Výsledky testu mezilehlé preciznosti

pracoviště Pardubice			
n=20	vzorek A	vzorek B	vzorek C
	[µg/L]		
průměr	7510,8	11747,3	18370,4
SD	538,7	1273,8	1717,2
CV %	7,2	10,8	9,3

pracoviště Ostrava			
n=24	vzorek A	vzorek B	vzorek C
	[µg/L]		
průměr	7324,7	10866,6	16840,2
SD	701,3	922,2	1796,8
CV %	9,6	8,5	10,7

## 2.2. Test opakovatelnosti

**Tab. 2.:** Výsledky testu opakovatelnosti

pracoviště Pardubice			
n=10	vzorek A	vzorek B	vzorek C
	[µg/L]		
průměr	7314,0	11033,3	17381,6
SD	341,7	1013,2	915,0
CV %	4,67	9,18	5,26
pracoviště Ostrava			
n=6	vzorek A	vzorek B	vzorek C
	[µg/L]		
průměr	7450,8	10967,6	17303,2
SD	529,0	387,9	1225,3
CV %	7,10	3,54	7,08

## 3. Test vychýlení metody – bias

Nebyl podle plánu proveden.

## 4. Test recovery

K testu recovery byl použit reálný vzorek A a alikvot 50 µL standardu AFP WHO 72/225, rozpuštěného v nulovém séru, lot 090406511, který včetně nulového séra poskytla společnost Immunotech a. s.

K ověření výtěžnosti bylo dále provedeno stanovení AFP ve vzorcích, připravených smísením reálných vzorků A a B v různých poměrech. Poměry mísení a výsledky jsou uvedeny v tabulce. Všechna stanovení provedena v duplikátech.

Koncentrace AFP v reálných vzorcích plodové vody byla stanovena

vzorek A	7314 µg/L
vzorek B	17382 µg/L

Koncentrace AFP v alikvotu standardu uvedeného WHO činila 60500 µg/L.

Tento test byl proveden pouze na pracovišti Pardubice.

**Tab. 3.:** Výsledky testu recovery

ředění		naměřeno	teorie	recovery
		[µg/L]		[%]
450 µL vz A	50 µL WHO	11234	12633	88,9
450 µL vz A	50 µL 0 st	6142	6583	93,3
100 µL vz A	300 µL vz B	13069	14865	87,9
200 µL vz A	200 µL vz B	10963	12348	88,8
300 µL vz A	100 µL vz B	9855	9831	100,2

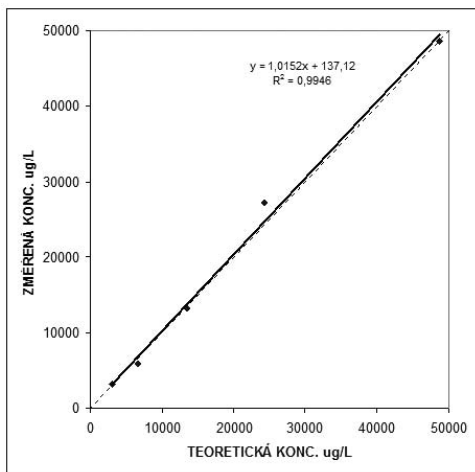
## 5. Test ředění

K testu byl použit reálný vzorek s původní koncentrací AFP 131759 µg/L. Tento vzorek byl smísen s jinou plodovou vodou s nízkou koncentrací AFP tak, aby výsledná koncentrace směsi byla těsně pod hodnotu 51000 µg/L (horní hranici kalibrace).

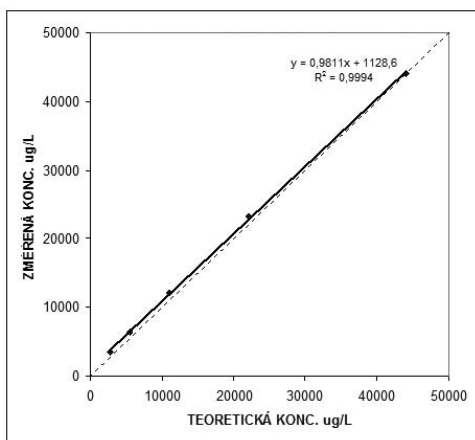
Postupným ředěním této směsi byly připraveny vzorky s různým obsahem AFP. K ředění byl použit Access Wash Buffer II, kat. č. A16792. Všechna stanovení byla provedena v duplikátech.

**Tab. 4.:** Výsledky testu ředění

pracoviště Pardubice			
ředění	naměřeno	teorie	výtěžek
	[µg/L]		[%]
0	48632	48632	
2	27168	24316	111,7
4	13296	13584	97,9
8	6001	6648	90,3
16	3234	3001	107,8
pracoviště Ostrava			
ředění	naměřeno	teorie	výtěžek
	[µg/L]		[%]
0	44106	44106	
2	23297	22053	105,6
4	12227	11026	110,9
8	6428	5513	116,6
16	3428	2757	124,4



Obr. 1.: Test ředění - pracoviště Pardubice



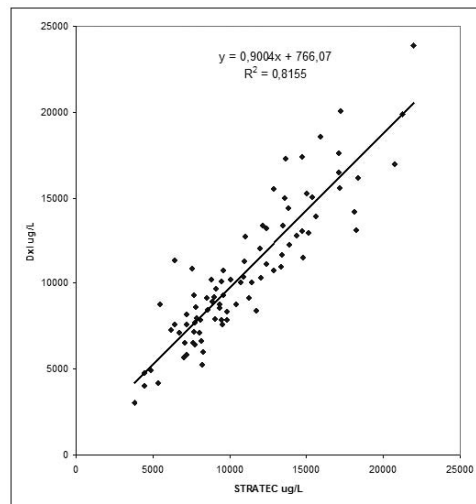
Obr. 2.: Test ředění - pracoviště Ostrava

## 6. Porovnání s jinou metodou

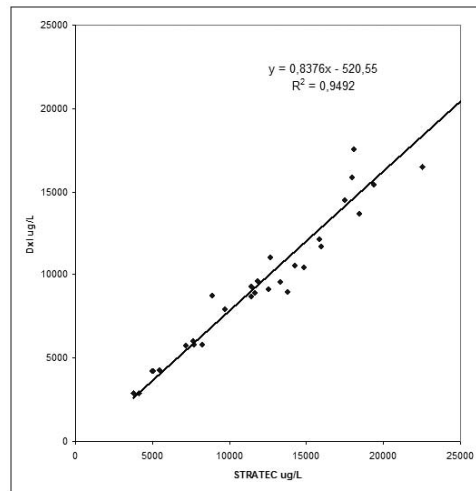
Porovnání bylo provedeno na vlastních reálných vzorcích každého pracoviště. Srovnávací metodou bylo původní stanovení soupravou AFP screening IRMA KIT, výrobce Immunotech a. s. Praha, kat. č. A37404. Stanovení provedeno analyzátelem STRATEC SR300, výrobce Stratec Electronics A.G., Německo. Ředění vzorků plodové vody 100x na pracovišti Pardubice bylo vždy prováděno uvedeným analyzátelem STRATEC v jednom kroku. Stejně ředění bylo na pracovišti Ostrava vždy prováděno ručně mikropipetou v jednom kroku.

Tab. 5.: Výsledky porovnání s původní metodou

	pracoviště	
	Pardubice	Ostrava
počet porovnání n	86	30
hodnota směrnice	0,9004	0,8376
koeficient determinace	0,8153	0,9492
korelační koeficient	0,9031	0,9743



Obr. 3.: Porovnání s původní metodou - pracoviště Pardubice



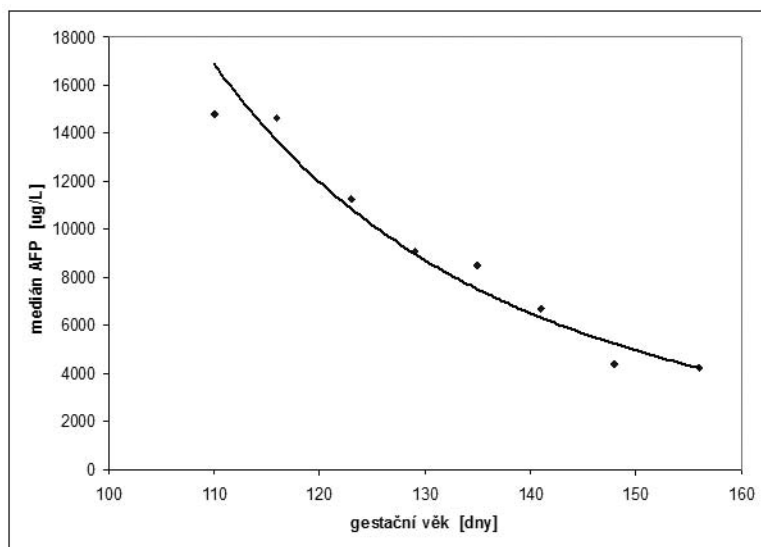
Obr. 4.: Porovnání s původní metodou - pracoviště Ostrava

## 7. Vyhodnocení závislosti mediánů AFP na gestačním věku.

Validační zpráva byla posléze doplněna o vyhodnocení závislosti mediánů koncentrace AFP v plodové vodě na gestačním věku. Vyhodnocení bylo provedeno na pracovišti Pardubice programem ALPHA za období leden – červen 2011.

**Tab. 6.:** Reálná závislost mediánu AFP na gestačním věku

gestační věk [dny]	medián AFP [ $\mu\text{g/L}$ ]
110	14772
116	14639
123	11275
129	9091
135	8503
141	6709
148	4398
156	4254



**Obr. 5.:** Průběh reálné závislosti mediánu AFP na gestačním věku

## Závěr

Výsledky testů mezilehlé preciznosti, opakovatelnosti, recovery a porovnání s původní metodou splnily požadovaná kritéria.

Výsledky testů ředění přesáhly v 1 případě z 8 provedených měření požadovanou hodnotu. Vzhledem k tomu, že se jednalo o nejvyšší stupeň ředění (16x), považujeme výsledky za akceptovatelné.

Na základě výsledků výše uvedených testů používáme soupravu AFP Access, kat. č. 33210 ke stanovení AFP v plodové vodě na analyzátoch Beckman Coulter DxC 880i a Dxi 800 od ledna 2011.