

Stanovení lipidových a lipoproteinových parametrů – současný stav

D. Novotný

V klinické biochemii a laboratorní medicíně je vyšetřování krevních lipidů prakticky synonymem pro stanovení parametrů spojených s metabolismem lipoproteinů a rizikem aterosklerózy. Článek shrnuje současný stav vyšetřování lipidových analytů a všimá si zejména problémů v preanalytické a analytické fázi vyšetření.

Preanalytická fáze vyšetřování lipidů a lipoproteinů (příprava pacienta, odběr biologického materiálu, biologická variabilita)

Na správný výsledek lipidových parametrů má velký vliv fáze před vlastním vyšetřením. Tím je nejčastěji žilní krev, která má být odebrána po 9 až 12 hodinovém lačnění. 2-3 dny před odběrem je zapovězena konzumace alkoholu, u diabetiků se nedoporučuje odběr ve fázi špatné kompenzace nemoci. Koncentraci krevních lipidů ovlivňuje také většina akutních a chronických onemocnění. Proto se nedoporučuje provádět jejich stanovení během hospitalizace, ale spíše ambulantně. Blíže podrobnosti lze nalézt např. v Doporučení pro diagnostiku a léčbu dyslipidemií v dospělosti (Cor Vas 2007, 49/3: Kardio, Příloha 1, www.athero.cz)

Vyšetřování z krevního séra nebo z krevní plazmy je považováno za rovnocenné. Po odběru je doporučována co nejrychlejší separace séra či plazmy od krevních elementů. Při skladování těchto materiálů je nutné počítat s faktem, že za jistých podmínek může doba a teplota uskladnění ovlivnit výsledek některých analytů. Dochází ke změnám struktury lipoproteinů vlivem redistribuce lipidů mezi třídami, zejména v souvislosti s aktivitou transportních proteinů pro estery cholesterolů a fosfolipidů (CETP, PLTP) a enzymu lecitin:cholesterol acyltransferázy (LCAT).

Tabulka 1 uvádí stabilitu analytů při skladování sekundárních materiálů (sérum, plazma) při různých teplotách tak, jak je uvedena v příručce Preanalytická fáze 2005, první vydání (ČSKB, SEKK). I když lze s některými údaji polemizovat, uvedená data jsou dobrým základem pro úspěšné zajištění preanalytické fáze vyšetření. Pokud jde o další zdroje, jako jsou např. pracovní návody výrobce, příručky preanalytických proměnných nebo soudobé studie zaměřené na tuto problematiku, údaje v nich jsou často nekonzistentní, až rozporuplné. V zásadě lze doporučit následující racionální přístup: pokud se sérum či plazma skladují za účelem analýzy lipidových parametrů, neměla by doba skladování přesáhnout při teplotě 20 -25°C řádově půl až jeden den, při teplotě 4 - 8°C 1 týden a při - 20°C 12 týdnů. Při skladování sér při - 70°C po dobu 180 dnů došlo u CHOL, TGL, Apo AI, Apo B ke změně do 4 % oproti původním hodnotám; pokles esterů cholesterolu, resp. nárůst volného cholesterolu byl

Tabulka 1: Stabilita lipidových analytů a skladování vzorků

		20 – 25 °C	4 – 8 °C	- 20 °C	Pozn.
CHOL	P	3 h	10 d	12 w	EDTA, heparin
	S	24 h	7 d	12 w	
TGL	P	3 d	10 d	2 y	Heparin Na
	S	3 d	10 d	2 y	
HDLch	P	12 h	9 d	12 w	EDTA
	S	24 h	7 d	12 w	
LDLch	P	12 h	10 d	12 w	??
	S	12 h	10 d	12 w	
Apo AI	P	10 d	21 d	12 w	K2EDTA
	S	?	?	?	
Apo B	P	3 d	10 d	4 w	Ne heparin !
	S	24 h	3 d	24 w	
Lp (a)	P	24 h	15 d	12 w	EDTA
	S	24 h	15 d	12 w	

h-hodiny, d- dny, w-týdny, y- roky

zaznamenán v LDL frakci a pokles TGL v HDL frakci (Clin Chim Acta 1997, 258: 219-229). Obecně lze konstatovat, že probíhají pouze nevýznamné změny při skladování biologického materiálu v hlubokomrazicích boxech.

Dalšími preanalytickými faktory ovlivňujícími výsledek vyšetření mohou být, mimo věkové, pohlavní a rasové diference, proměnné související s biologickou variabilitou toho kterého analytu. Značnou její část představují např. sezónní vlivy, zejména pak u CHOL, HDLchol a LDLchol (maxima jsou dosahována v zimě, minima v létě).

Často diskutovanou otázkou je v rutinní praxi využití vyčerovacích prostředků pro séra s vysokým lipemickým sérovým indexem. Pokud pracoviště tento postup u chylózních sér využívá, mělo by mít

na paměti, že výtěžnost po použití Lipoclearu je pro HDLch 82,4 %, pro LDLch 19,1 %, pro Apo AI 95,3 % a pro Apo B 22 % (testováno na nechylózních sérech, viz Fons 3 / 2009, s.19-21). Čerání je tedy neakceptovatelné při přímém stanovení LDLch a Apo B, což uvádí i výrobce.

Analytická fáze vyšetřování lipidů a lipoproteinů

V tabulce 2 jsou shrnuta kritéria kvality lipidových parametrů na základě konceptu celkové přípustné chyby a jsou zde prezentovány: celková nejistota měření (TMU) v současnosti používaná v rámci mezilaboratorního porovnání zkoušek v systému SEKK, teoretická TMU na bázi biologických variabilit a kritéria Národního cholesterolového vzdělávacího programu (NCEP-ATP III).

Tabulka 2: Kritéria kvality na základě konceptu TEa

	TMU (Dmax) (%) SEKK	TMU teor. (%) Ricos et. al	NCEP-ATPIII (%)
CHOL	8,5	8,5	8,9 CV < 3 Bias < 3
TGL	15	28	15
HDLch	15	11,1	13 CV < 4 Bias < 5
LDLch	15	13,6	12 CV < 4 Bias < 4
Apo AI	21	9,1	-
Apo B	21	11,6	-
Lp(a)	40	28,6	-

Další text bude mapovat současnou situaci analytiky jednotlivých parametrů.

Celkový cholesterol

Pro stanovení celkového cholesterolu je v laboratorní praxi zajištěn nepřerušovaný řetězec návaznosti měření, který je realizován mj. za pomoci níže uvedených složek:

Definitivní (referenční) metoda	ID-GC/MS, ID-LC/MS (cholesterol ¹³ C2); Abell-Kendallova (CDC)
Referenční materiály	SRM 909 b NIST, SRM 911b NIST, NIST/SRM 1952a (Cholesterol in Frozen Serum), SRM 1951b NIST, USA, JCCRM 211, Japonsko
Rutinní metody	metoda CHOD-PAP , Uc 3 až 4 %; suchá chemie
Nedoporučené metody	podle Liebermanna-Burcharda
Porovnatelnost	EHK (SEKK), síť referenčních laboratoří CRMLN (CDC): certifikace rutinních měřicích systémů (kitů) a rutinních laboratoří
Poznámky k metodě	spolehlivá, standardizovaná dříve diference mezi kalibrátory výrobců, záporný bias oproti TV v cyklech AKS

Závěr:

Jeden z nejlépe ošetřených analytů co do mezilaboratorní porovnatelnosti a návaznosti měření, tento fakt je pravidelně potvrzován vysokou úspěšností v cyklech AKS a RFA. O příčinách záporného biasu pozorovaného v cyklech AKS lze zatím jen spekulovat. Výsledky získané Abell-Kendalovou metodou dávají pozitivní bias oproti metodě definitivní (cca 1,6 %).

Triacylglyceroly

Pro stanovení triacylglycerolů je v laboratorní praxi zajištěn nepřerušovaný řetězec návaznosti měření, který je realizován mj. za pomoci níže uvedených složek:

Definitivní (referenční) metoda	ID-GC/MS, (tripalmitin ¹³ C3) extrakčně fotometrická s chromatopovou směsí (CDC metoda)
Referenční materiály	SRM 909b NIST, NIST/SRM 1951a USA, JCCRM 223, Japonsko
Rutinní metody	metoda s GPO-PAP , U _c 3 až 4 % UV metoda (minoritně), suchá chemie, (HPLC)
Nedoporučené metody	fotometrické neenzymové metody
Porovnatelnost	EHK (SEKK), síť referenčních laboratoří CRMLN (CDC): jen ve vybraných laboratořích
Poznámky k metodám	GPO-PAP: standardizovaná, robustní, vesměs malý vliv volného glycerolu (bez korekce)

Závěr:

Jeden z nejlépe ošetřených analytů co do mezilaboratorní porovnatelnosti a návaznosti měření, tento fakt je pravidelně potvrzován vysokou úspěšností v cyklech AKS a RFA. Rutinní metody vyžadují vesměs korekci na volný glycerol, která se v běžné laboratorní praxi většinou neprovádí.

HDL cholesterol

Referenční metoda	CDC metoda (ultracentrifugace, polyanionová precipitace: heparin-sulfát, Mn ²⁺ , Abell-Kendalova metoda)
Referenční materiály	SRM 911a NIST, SRM 1951a NIST (Lipids in Fresh-Frozen Human Serum) USA, JCCRM 211, JCCRM 223, Japonsko
Rutinní metody	1. přímé“ metody - preferované, U _c 3 až 5 % 2. s precipitací lipoproteinů obsahujících apo B (fosfowolframová k./ Mg ²⁺ , dextran/ Mg ²⁺ , heparin/Mn ²⁺ , PEG 6000)- téměř se nepoužívají
Porovnatelnost	EHK (SEKK), síť referenčních laboratoří CRMLN (CDC): certifikace výrobců i laboratoří

Poznámky k „přímým“ (lépe homogenním) metodám

Ve skutečnosti jde o sérii reakcí založených na rozličných kombinacích eliminace apo B obsahujících částic a následně selektivní reakci s CHOL na částicích HDL. Ten je stanoven enzymově. Klíčovým problémem se jeví u téměř všech postupů matrice vzorků a s tím související robustnost metod (rozdílné chování u normolipemických a dyslipemických vzorků, více např. v publikaci Clin Chem 2010, 56(6): 977-986).

Možné problémy:

Nespecifita některých metod pozorována již od TGL > 1,6 mmol/l (!)- nesplnění přípustné TE, odchylky výsledků od referenční metody (nahodnocování i podhodnocování výsledků podle typu použitého reakčního principu), patrně zejména u vzorků s nízkým HDLch, přítomnost abnormálních lipoproteinů, vliv podávaných léků, komorbidit u pacientů s dyslipidemií, postprandiální lipémie, přítomnost dysfunkčních HDL.

Reakční mechanismy uvedeny např. v literatuře Clin Chem 2001, 47(9): 1579-1596.

Závěry:

I přes výše uvedené je jednoznačně preferováno použití tzv. přímých metod stanovení. Certifikace výrobce kitu v síti CRMLN je žádoucí. Kromě řádné verifikace a úspěšnosti v cyklech EHK je téměř nutností mít na paměti citlivost metody k lipoproteinovému profilu vzorků, zejména u dyslipidemických pacientů.

LDL cholesterol

Referenční metoda	Beta- kvantifikace (CDC metoda), (flotace VLDL, precipitace apo B LP -heparin-Mn ²⁺ , stanovení HDLch Abell-Kendallovou metodou, výpočet LDLch)
Referenční materiály	SRM 1951a, SRM 1951b
Rutinní metody	1. „přímé“ metody- Uc 3 až 5 % 2. výpočet podle Friedewaldovy rovnice: LDLch = CHOL - HDLch - TGL / 2,20 (mmol/l)
Porovnatelnost	EHK (SEKK), síť referenčních laboratoří CRMLN (CDC): certifikace výrobců i laboratoří

Poznámky k „přímým“ (lépe homogenním) metodám

Ve skutečnosti jde o sérii reakcí využívajících detergenty a další látky v rozličných kombinacích k solubilizaci nebo blokování lipoproteinů jiných tříd k dosažení specifity pro LDLch. Ten je měřen enzymově. Klíčovým problémem se jeví u téměř všech postupů matrice vzorků a s tím související robustnost metod (rozdílné chování u normolipemických a dyslipemických vzorků, více např. v publikaci Clin Chem 2010, 56(6): 977-986).

Možné problémy:

Recovery LDL- podhodnocování téměř všech metodických postupů vůči referenční metodě a Friedewaldově rovnici, v důsledku čehož může nastat misklasifikace pacientů, dále interference VLDL, Lp-X, vesměs neznámá reaktivita se small dense LDL a Lp(a), deklarovanou použitelnost při vysokých TGL nelze vždy potvrdit. Problémy u vzorků s nízkým HDLch, neproběhla žádná velká multicentrická studie s použitím přímého měření.

Poznámky k výpočtové metodě

V praxi je používáno několik verzí Friedewaldovy rovnice (viz např. Klin Biochem Metab 2005, 13(3): 151-154), z nich řada nesprávných. Výsledky dotazníkové akce z roku 2005 v rámci cyklu RFA ukázaly na 11 různých modifikací rovnice, na rozdíly v omezeních jejího použití a na různé následné postupy vyšetřování LDLch při její neplatnosti.

Platnost Friedewaldova vztahu se datuje již od roku 1972, v dalších 2.dekádách bylo v odborné literatuře zaznamenáno více než 3.000 citací (!), stále jde o klinicky uznávanou metodu, na níž jsou postaveny všechny velké epidemiologické studie vztahující se k tématu.

Další modifikace rovnice se v praxi neuplatnily (např. korekce na apo B100, Lp(a) apod.)

Hlavní omezení: citlivost k TGL > 4,5 mmol/l, k typu III dyslipidémie, k chylomikronům a remnantům (nutné lačnění), nespolehlivý u pacientů s ESRD, u žen na HST, zahrnuje chybu měření 3 metod.

Závěry:

V laboratorní rutinní praxi se doporučuje používat metody přímého stanovení LDLch, zejména pro dosažení nižší nejistoty měření a lepší mezilaboratorní porovnatelnosti Preference však není tak silná jako u HDLch. Před event. změnou je vhodné konzultovat s kliniky a ověřit i diskriminační sílu metody oproti výpočtovému vztahu (LDLch je „terapeutický cíl“, pozor na podhodnocování výsledků). Certifikace výrobce kitu v síti CRLMN je žádoucí. Kromě řádné verifikace a úspěšnosti v cyklech EHK je téměř nutností mít na paměti citlivost metody k lipoproteinovému profilu vzorků, zejména u dyslipidemických pacientů. Při použití Friedewaldovy rovnice je nutné používat správnou verzi výpočtu a plně respektovat její omezení. Diskutabilní zůstává otázka vzájemné zaměnitelnosti přímé a výpočtové metody, resp. jejich souběžného používání.

Apolipoproteiny AI a B

Definitivní (referenční) metoda	NEEXISTUJÍ, jako kandidátní navržena HPLC/MS pro Apo AI
Referenční materiály (sekundární)	WHO SP1-01, WHO SP3-07
Rutinní metody	imunoturbidimetrie, imunonefelometrie, Uc okolo 9 %
Nedoporučené metody	RID, EID
Porovnatelnost	EHK (SEKK)
Poznámky k metodě	poměrně dobrá úroveň standardizace- porovnatelnosti mezi laboratořemi vývoj referenční metody- expertní skupina při IFCC

Závěry:

V poslední dekádě vlivem standardizací rutinních metod a zajištění návaznosti na sekundární referenční materiály je patrné významné zlepšení mezilaboratorní porovnatelnosti.

Lipoprotein (a)

Definitivní (referenční) metoda	NEEXISTUJE
Referenční materiály (sekundární)	WHO IFCC SRM 2B
Rutinní metody	imunoturbidimetrie, imunonefelometrie ELISA, RIA, ELFO lipoproteinů (%)
Porovnatelnost	EHK (SEKK): hodnocení po skupinách výrobců
Poznámky k metodě	Zatím nízká úroveň standardizace- porovnatelnosti mezi laboratořemi

Poznámky ke stanovení

Na stanovení Lp(a) mají významný vliv následující faktory: délkový polymorfismus apo (a) (3-42 kopií domény kringle 4, molekulová hmotnost proteinu velmi heterogenní podle izoform: 300-800 kDa), denzitní polymorfismus- poměr apo (a) : apo B100 v molekule lipoproteinu, sekvenční polymorfismus a stupeň glykosylace, homologičnost s proenzymem fibrinolytického systému plasminogenem, různá reaktivita protilátek (kritérium výběru: necitlivost k délkovému polymorfismu apo (a) !), neexistence primární standardy a referenční metody.

Sekundární referenční materiál IFCC SRM2B obsahuje 3 majoritní izoformy Lp(a) o počtu 16, 17 a 18 kopií domény kringle 4, a 3 minoritní izoformy o počtu 14, 20 a 32 kopií domény kringle 4.

Mezilaboratorní CV ve skupinách dle výrobců se např. v cyklu RFA1/11 pohybovaly od 2,2 do 14 %, za použití imunoturbidimetrických nebo imunonefelometrických metod. Naprosto odlišné výsledky a CV byly zjištěny ve skupině Roche, kde kalibrace metod na platformě Modular není navázána na referenční materiál. Tento jev je setrvalý a dlouhodobý.

Závěry:

Návaznost metody na SRM 2B při použití jakéhokoli metodologického kvantitativního postupu je nepodkročitelnou podmínkou. Specifita protilátek je její klíčovou charakteristikou a neměla by vykazovat citlivost k polymorfismu apo (a).

Literatura: u autora