

Doporučení KDIGO 2012. Základní analyty a jejich analytické vlastnosti a problémy

Friedecký B., Kratochvíla J.

KDIGO 2012 je mezinárodní doporučení-(Kidney Disease Improving Global Outcome). Je to materiál shrnující současně platné zásady diagnózy a léčby chronické renální choroby v různých fázích poškození ledvinové funkce. Byl publikován v *Kidney International Supplements* 2013,3,1. V následujícím sdělení shrnujeme základní analytické problémy kreatininu, cystatinu C a albuminu. Kreatinin a cystatin C jsou nástrojem výpočtu hodnot eGFR, albumin a albumin kreatininový poměr ACR pak společně s hodnotami eGFR krea a eGFR cys slouží k detekci chronické ledvinové choroby a ke klasifikaci jejího stupně.

Kreatinin

Hodnota kreatininu v séru je základem pro výpočet hodnoty odhadu glomerulární filtrace eGFR krea s použitím rovnic MDRD nebo raději CKD-EPI 2009 a pro výpočet kombinovaných hodnot eGFR krea-cys s použitím rovnice CKD-EPI 2012. U dětí se doporučuje k výpočtu eGFR krea používat nové verze Schwartzovy rovnice z hodnot koncentrace sérového kreatininu a výšky. (<http://www.nkdep.nih.gov>).

Měření kreatininu v séru je nutné provádět metodami o dostatečné specifitě, návaznými na mezinárodní referenční materiál SRM-NIST 967 (Myers GL: Standardization of serum creatinine measurement: Theory and practice *Scand J Clin Labor Invest* S241, 2008, 57-63 a Myers GL, Miller WG, Coresh J, Fleming J, Greenberg N, Greene T, Hostetter T, Levey AS, Panteghini M, Welch M, Eckfeldt JH; National Kidney Disease Education Program Laboratory Working Group Recommendations for improving serum creatinine measurement: a report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program. *Clin Chem.* 52, 2006, 5-18.)

Metody mají vykazovat co nejnižší hodnotu bias, která má být stanovena srovnáním s referenční metodou hmotnostní spektrometrie ID-GC(LC)/MS. Výsledky měření kreatininu mají být udávány společně s výsledky eGFR krea. Doporučení KDI-

GO 2012 uvádí, že se tohoto paralelního uvádění výsledků kreatininu a eGFR krea používá ve více než 75 % laboratoří USA a ve více než 90 % v laboratořích UK, Austrálie, Nového Zélandu a řady evropských laboratoří.

Autoři KDIGO 2012 doporučují vydávání výsledků kreatininu při použití jednotky umol/l zaokrouhlené na nejbližší celá čísla. Výsledky eGFR krea (ml/s/1,73 m²) pak mají být vydávány zaokrouhlené na nejbližší dvě desetinná místa. Výsledky eGFR krea nižší než 1 ml/s/1,73 m² mají být v laboratorním výsledkovém protokolu označeny slovním komentářem snížená hodnota.

Návaznost k mezinárodním referenčním materiálům a k referenčním metodám je popsána v materiálech JCTLM, uvedených na webových stránkách <http://www.bipm.org> nebo <http://www-ifcc.org>. Ideální by bylo používat enzymatické rutinní metody, které vykazují nejlepší preciznost, nejnižší bias a nejnižší zatížení interferencemi (Ceriotti F, Boyd JC, Henny J a spol. Enzymatic assays for creatinine: time for action. *Clin. Chem. Lab. Med.* 46, 2008, 567-572 a Greenberg N, Roberts VL, Boehmann LH, a spol. Specificity characteristics of 7 commercial creatinine measurement procedures by enzymatic and Jaffé method principles. *Clin. Chem.* 2012,58:391-401).

Pokud se z finančních důvodů používá Jaffého metoda, je minimálním požadavkem na ni verifikace její návaznosti na referenční materiál (SRM 967) a referenční metodu (ID-GC/MS). To znamená, že Jaffého metoda musí být navíc matematicky korigována pomocí odečtu hodnoty pseudokreatininových chromogenů.

Jaffého metody v pediatrii jsou pro výpočet hodnot eGFR krea nevhodné i přes jejich návaznost na referenční materiál a metodu. V tomto případě by měly být vždy preferovány enzymatické metody.

Bias stanovení je kritický pro výpočet eGFR krea. Bias stanovení kreatininu má být stanoven jako diference od IDMS metody. Výsledky bias jsou silně závislé na koncentraci. Program LN 24 CAP, používající jako kontrolních materiálů směsi nativních sér (Killeen AA, Ashwood ER, Ventura CB, Styr P. Recent Trends in Performance and Current State of Creatinine Assays. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2013,137:496-502) poskytl v roce 2011 výsledky, uvedené v následující tabulce.

RMP(μmol/l)	Bias (%)
68	-6,9 až 8,1
245	-4,9 až 0,9
355	-4,7 až 0,4

Bias je nejvyšší u hodnot, kritických pro správnost výpočtu eGFR u hraničních stavů mezi zdravím a ledvinovou chorobou (80-130 $\mu\text{mol/l}$). U vyšších hodnot není jeho problém závažný. Výsledky v tabulce uvedené jsou získány kity firm **Abbott, Beckman, Ortho, Siemens, Roche, ale není bohužel zatím přehled o ostatních metodách.**

Doporučení IFCC k zlepšení kvality (snížení nejistoty) hodnot výpočtu eGFR předpokládá dosažení preciznosti měření měření $\text{CV} \leq 2,2\%$ a hodnoty bias pro interval koncentrací 80 až 133 $\mu\text{mol/l}$ 4,4 $\mu\text{mol/l}$. To odpovídá hodnotě $b = 5,5\%$ (pro 80 $\mu\text{mol/l}$) a $b = 3,3\%$ (pro 133 $\mu\text{mol/l}$).

Za těchto podmínek nepřesáhne odhad nejistoty výpočtu eGFR krea hodnotu $u_c = 10\%$ (Delanghe JR, Cobbaert C, Harmoinen A, Jansen R, Laitinen P, Panteghini M. Focusing on the clinical impact of standardization of creatinine measurements. a report by the EFCC working group on creatinine standardization, Clin. Chem. Lab. Med. 2011, 49, 6:977-982).

Srovnávací studie se směsí nativních lidských sér, prováděné od roku 2006 v rámci programů způsobilosti CAP USA (cyklus LN 24), ukazují velmi významný pokles hodnot bias během posledních deseti let. U nízkých, pro výpočet eGFR kriticky důležitých, koncentrací kreatininu (cca 68- 80 $\mu\text{mol/l}$) se hodnota bias jednotlivých systémů měření snížila z intervalu -7 až +37% v roce 2003 (což odpovídalo hodnotě bias eGFR až 27%) na interval -5 až 10% (což odpovídá hodnotě bias eGFR pod 10%). Významné snížení hodnot bias bylo dosaženo recalibrací měření kreatininu na podkladě uplatnění řetězce metrologické návaznosti. Návaznost nové kalibrace byla verifikována pro metody firem Abbott, Beckman, Ortho Clinical, Olympus, Roche, Siemens (Advia, Dade) a pro enzymatickou i Jaffého metodu. U Jaffého metody musela být navíc uplatněna korekce na pseudokreatininové nespecifické chromogeny, pohybuující se v intervalu matematických odečtů 18 až 27 $\mu\text{mol/l}$ (National Kidney Disease Education Program. Laboratory Evaluation. <http://www.nkdep.nih.gov>).

Pokud uvažujeme použití korigované Jaffého metody a mezinárodně validovaného systému měření lze učinit v současnosti závěr, že problémy standardizace stanovení kreatininu v séru a výpočtu eGFR krea jsou vyřešeny a požadavky doporučení kliniků v nefrologii, diabetologii a pediatrii jsou splněny.

Při používání heterogenních měřících systémů se často v méně rozvinutých zemích používá laciných diagnostik malých výrobců, která nemají verifikovaný pracovní kalibrátory a o kterých není známo, zda u nich existuje metrologická návaznost. Může jít

zejména o finančně nedostatečně zajištěné země, které nemohou nebo nechtějí vynakládat na stanovení vyšší finanční částky, nutné k zajištění kvality. V programu externího hodnoty kvality v jedné z nich (v Argentině) byla v roce 2012 zjištěna hodnota bias u kriticky nízké koncentrace kreatininu (kolem 70 $\mu\text{mol/l}$) stále ještě +54 %. Ve sdělení z roku 2013 bylo identifikováno cca 30 výrobců-dodavatelů takových diagnostik, u nichž nebyla verifikována jejich návaznost na referenci, a tím i nelze ani předpokládat spolehlivost hodnot eGRF krea, pomocí nich vypočtených. Jde prakticky vesměs o Jaffého metody. V českém programu externího hodnocení kvality kreatininu může být podle našeho odhadu 25-33 % výsledků, u kterých rovněž lze mít odůvodněné podezření na to, že jejich kalibrace nevykazují potřebnou a klinicky požadovanou metrologickou návaznost (Myers GL. Standardization of creatinine. Finally achieved? 7th CIRME International Scientific Meeting on Metrological Traceability and Assay Standardization, May 2013, Stresa, Italy).

Při stanovení kreatininu v moči lze enzymatické a Jaffého metody považovat za rovnocenné.

Enzymatické metody v ČR vykazují momentálně četnost použití 29 % (AKS 2/13).

Ve srovnání s programem RfB (Německo jde o vyšší hodnotu) – četnost použití enzymatických metod byla zde v roce 2012 pouze 21 % (KS4/13).

Hodnota četnosti enzymatických metod v Německu má setrvalý trend (21 %) už nejméně od roku 2009. Trend četnosti enzymatických metod v českých laboratořích měl stoupající charakter (od 10 % v roce 2009 do 29 % v roce 2013).

SEKK 2009-2013 10-29 RfB 2009-2013 21-21

Pro koncové uživatele v rutinních laboratořích jsou tedy prvořadě dvě informace k tomu, aby bylo vyhověno požadavkům doporučení KDIGO 2012. Informace o návaznosti použitého analytického systému a informace, zda a jak je tato návaznost průběžně verifikována.

V programu SEKK 2013 (v AKS2/13) bylo možné identifikovat jen 68 % systémů s bezpečně verifikovanou návazností (ostatní systémy byly výrobky malých firem, od kterých nebyly jasné informace o návaznosti přístupné).

V programu RfB 2013 (v KS4/13) bylo možné identifikovat minimálně 90 % systémů s verifikovanou a dokumentovanou návazností.

Cystatin C

Cystatin C v séru je nezbytné měřit metodou, jejíž pracovní kalibrátor je návazný na mezinárodní referenční materiál ERM DA 471. (Grubb A, Blirup-

Jensen S, Lindsroem V, Schmitt C, Atthaus H, Zegers I. First certified reference material for cystatin C in human serum ERM-DA 471/IFCC. Clin. Chem. Lab. Med. 2010, 48:11:1619-1621.

Použití nestandardizovaného stanovení cystatinu S bez návaznosti pracovního kalibrátoru na ERM-DA 471/IFCC je zcela obsoletní.

Přesto není standardizace cystatinu C u některých metod některých výrobců doposud provedena. U některých výrobců nelze stav standardizace ani z dokumentů výrobců, ani z výsledků EHK určit.

Hodnota eGFR cys má vyšší výpovědní hodnotu než samotná hodnota cystatinu C.

Výsledky cystatinu C v séru a hodnoty eGRR cys by se měly vydávat společně.

K výpočtu eGFR cys se má používat rovnice CKD-EPI 2012.

Výsledky cystatinu C a eGFR cys se mají vydávat na nejbližší dvě desetinná místa.

V pediatrii lze aplikovat výpočet GFR cys z cystatinu C, pouze hodnota koeficientu, kterým se hodnota cystatinu C násobí, je rozdílná od hodnoty u dospělých. Preciznost měření lze pro koncentrace kolem 1 mg/l charakterizovat hodnotou CV(%) 3 - 5,6 % a při měření koncentrací v intervalu 2 až 4 mg/l je hodnota CV = 1,1 - 3,5 %.

V roce 2013 v cyklu CC1/13 38 % laboratoří, účastníků programu SEKK, považovalo svá měření cystatinu C za návazná na ERM DA 471, 61 % účastníků za nenávazná.

V programu RfB (Německo) byl v cyklu IG3/13 interval naměřených mediánů hodnot 1,20-1,54 mg/l u vzorku A a 0,84-1,09 mg/l u vzorku B. Minimum odpovídala hodnotě skupiny Siemens Dade(Vista), maximum hodnotě Roche. Podle dokumentů výrobců by měly hodnoty minimálně odpovídat stavu bez návaznosti na ERM DA 471. Je třeba vzít do úvahy, že standardizace cystatinu C pomocí návazností na ERM DA471 průběžně probíhá, a proto by měly rutinní laboratoře situaci pozorně sledovat. Například z firemního cirkuláře firmy Siemens Healthcare ze dne 29. 4. 2013 je zřejmé, že provedla recalibraci své metody na ERM DA 471. To by mohlo celou situaci s cystatinem C posunout k situaci, požadované doporučením KDIGO 2012.

Stanovení proteinů v moči

Základní pravidla

Podle doporučení KDIGO 2012 přichází do úvahy k diagnóze chronické renální choroby, k její klasifikaci a léčbě stanovení.

- kvantitativní stanovení albuminu a albumin-kreatininového kvocientu (ACR) v moči
- kvantitativní stanovení celkového proteinu a protein-kreatininového kvocientu (PCR) v moči
- orientační semikvantitativní stanovení proteinu diagnostickými proužky v moči

Tyto tři uvedené testy jsou seřazeny podle klesající klinické důležitosti.

Několik základních pravidel používání těchto vyšetření:

- Výsledky albuminu je vhodné uvádět jako ACR (mg/mmol) i jako koncentrace (mg/l)
- Výsledky celkového proteinu je vhodné uvádět jako PCR (g/mmol) i jako koncentrace (g/l)
- Preferují se jednorázové vzorky močí před vzorky časovanými
- Nemá se nadále používat nesprávného a matoucího pojmu "mikroalbuminurie"
- Pozitivní výsledky semikvantitativních stanovení albuminu a celkového proteinu je nezbytné potvrdit opakovanou kvantitativní analýzou v laboratoři
- Pokud se u náhodného vzorku stanoví hodnota ACR ≥ 3 mg/mmol, je zapotřebí vyšetření opakovat s použitím vzorku první ranní moče (EMU)
- Časované vzorky jsou zatížené prakticky neodstranitelnou chybou sběru
- Doporučuje se je používat pouze v přísně indikovaných případech
- Nejvyšší výpovědní hodnotu a současně nejnižší biologickou variabilitu vykazují vrorky první ranní moči (EMU)

Albumin a ACR

Dominantní roli v analýze proteinů u chronické renální choroby zaujímá stanovení albuminu v moči. Albumin je senzitivnějším a specifitějším ukazatelem změn glomerulární permeability, než celkový protein. Albumin navíc hraje významnou roli i v diagnostice srdečních chorob a při posouzení stavu diabetu. Hodnoty ACR diskriminují populaci do tří kategorií podle stupně renální choroby (viz výše). U zdravé populace nepřesahuje koncentrace albuminu v moči hodnotu 30 mg/24 hod., a proto také může být patologické zvýšení albuminu v moči (ACR) detekováno i při nezvýšeném množství celkového proteinu v moči, jehož stanovení je mnohem méně analyticky citlivé. Albumin vykazuje ve srovnání s celkovým proteinem významně vyšší analytickou citlivost a větší analytickou specifičnost. Hodnota ACR vykazuje nižší biologickou variabilitu, než hod-

noty albuminu v časovaných vzorcích a má rovněž nejvyšší výpovědní hodnotu. Doporučuje se zakrouhlovat výsledek ACR na nejbližší jedno desetinné místo (Miller, G., Bruns, D. E., Hortin, G. L., et al.: Current issues in measurement and reporting of urinary albumin excretion. Clin. Chem., 2009, 55: 24 – 38.). Imunochemické metody stanovení albuminu (imunturbidimetrie/imunonefelometrie) vykazují mez detekce 2 až 10 mg/l (pro srovnání: mez detekce celkového proteinu v moči pomocí stanovení testovacími proužky je asi 150 mg/l). Mezilaboratorní reprodukovatelnost v systémech externí hodnoty kvality se pohybovala v intervalu 5 % až 16,5 % pro koncentrace nižší než 30 mg/l a v intervalu 3,1 % až 12,1 % pro koncentrace vyšší, než 30 mg/l albuminu. Požadovaná mezilaboratorní reprodukovatelnost měření je $CV < 15\%$

V současné době není k dispozici ani na seznamu JCTLM certifikovaný referenční materiál. Rutinní pracovní kalibrátory mají hodnoty odvozené srovnáním s ředěným sérovým referenčním materiálem ERM DA470. Pracovní kalibrátory obsahují různá množství interferujících polymerovaných albuminů. Japonská společnost klinické chemie a Japonská společnost pro standardy v klinické chemii vyvinula prototyp certifikovaného referenčního materiálu s maticí, tvořenou chloridem sodným, fosfátovým pufrům a sacharózou a bez obsahu albuminových polymerů. Tento referenční materiál je postoupen k schválení a uvedení na seznam JCTLM. Referenční metoda používaná k odvození návazných hodnot albuminu v pracovních kalibrátorech bude pravděpodobně založena na principu tandemové hmotnostní spektrometrie LC/MS-MS (Shaikh, A., Segmiller, J. C., Borland, T. M., et al.: Comparison between immunoturbidimetry, size-exclusion chromatography and LC-MS to quantify urinary albumin. Clin. Chem. 2008, 54: 1504 – 1510).

Pro rutinní měření albuminurie je nevhodnější skladování vzorků před analýzou v lednici při 2 – 8 °C a temperování vzorků před měřením na pokojovou teplotu k odstranění případných precipitací. Stabilita při této teplotě je minimálně 7 dní. Zamra-

zování se nedoporučuje, protože není dostatečně prostudovaná případná sorpce na stěny odběrových zkumavek ani jiné ovlivňující faktory.

Celkový protein a PCR

Metody stanovení celkového proteinu nejsou standardizované. Není k dispozici mezinárodní referenční materiál. Výsledky měření jsou silně závislé na složení vzorku. Turbidimetrická a fotometrická metody, obecně k stanovení používané, vykazují mnohem vyšší analytickou senzitivitu k albuminu, než ke globulínům. Metody také postrádají dostatečnou preciznost v oblastech nižších koncentrací a vykazují nižší úroveň mezilaboratorní preciznosti v důsledku diferencí výsledků mezi výrobci diagnostických kitů, kterých je velké množství. V indikovaných případech je však zapotřebí preferovat stanovení PCR před ACR (například u monoklonálních gamapathií). Dostatečně podrobný přehled analytických metod je obsažen v práci Lamb, E. J., MacKenzie, F., Stevens, P. E.: How should proteinuria be detected and measured?

Semikvantitativní stanovení albuminu a celkových proteinů diagnostickými proužky

Semikvantitativní stanovení celkového proteinu diagnostickými proužky má jen orientační význam. Je málo senzitivní, s nestandardizovanými barevnými škálami, rozdílnými u různých výrobců. Hodnota 1 j odpovídá u různých výrobců koncentraci 0,1–0,3 g/l. Albumin vykazuje mnohem vyšší citlivost při reakcích dg. proužků, než globuliny, což způsobuje velkou závislost výsledků na složení analyzovaných vzorků. Dalším zdrojem chybných výsledků je alkalické pH vzorku moči. Při vizuálním odečtu proteinurie diagnostickými proužky může navíc silně interferovat intenzivní zbarvení vzorku moči.

Nově se objevují reagenční proužky, jimiž lze stanovit v režimu POCT albumin s dostatečnou citlivostí a dokonce ACR. Dosud je však s nimi málo zkušeností a omezený počet studií.

U pacientů s pozitivním nálezem při vyšetření diagnostickým proužkem má být přítomnost proteinurie nebo albuminurie vždy ověřena kvantitativním stanovením poměru ACR nebo PCR.