

Návaznost výsledků měření katalytických koncentrací aktivit diagnosticky významných enzymů – srovnání specializované mezilaboratorní studie s výsledky rutinního cyklu EHK

Friedecký B.

SEKK, spol. s r. o., Pardubice

SOUHRN

Vysoce sofistikovaně organizovaná studie EC4 přinesla v podstatě stejné výsledky o návaznosti a pravdivosti měření šesti enzymů standardizovaných podle IFCC jako běžný cyklus rutinní EHK. A to navzdory tomu, že studie EC4 použila šest přísně definovaných homogenních měřících systémů, zatímco účastníci EHK naopak používali velmi heterogenní uspořádání trojice přístroj-reagencie-kalibrátor. Přesto rozdíl v hodnotách bias a z nich plynoucí návaznosti výsledků měření není výrazný. Ve studii EC4 byla nejlepší úroveň návaznosti zaznamenána u ALT, přijatelná u AST, diskutabilní u gamma-GT a CK, přičemž u dvou posledních byly indikovány signifikantní hodnoty bias u některých výrobců IVD a zcela neuspokojivé výsledky u α -amylázy a LD. Program EHK SEKK vykázal podobné výsledky navzdory již zmíněnému nízkému stupni homogenity měřících systémů. Dokonce výsledky u α -amylázy byly na vyšší úrovni a u LD lze vypořádat jednoznačný trend ke zlepšování situace. Rozhodujícím faktorem, ovlivňujícím bias a návaznost výsledků měření, je kompatibilita měřících postupů, použitých výrobci IVD s referenčními postupy IFCC a striktní hodnocení výsledků EHK podle cílových hodnot, odvozených od metod IFCC.

Klíčová slova: enzymy, IFCC postupy, bias, návaznost, porovnávání.

SUMMARY

Friedecký B.: The succession of results measuring catalytic concentrations of diagnostically important enzymes: A comparison of specialized interlaboratory study with the results of a routine cycle of EQA

Two studies on the trueness of enzyme measurement were shortly compared and explained. First, highly organized EC4 study obtained practically the same results as routinely performed EQA program despite total different approach to problem. EC4 study worked with six fully homogenous measurement systems from leading world manufacturers, while participants of EQA used very heterogenic systems which consisted of equipment, reagents and calibrators from different producers. The best trueness showed in both studies measurement of ALT and AST, significant bias was determined in gamma-GT and CK measurement. Bias and traceability of α -amylase and LD seems to be better in Czech labs than in participants of EC4 study. Use of target values as criterion in EQA and strictly requirement to use only measurement methods based on the same principles as reference IFCC procedures can be way to trueness and traceability of enzyme measurement results.

Key words: enzymes, IFCC procedures, bias, traceability, comparison.

Producenti a uživatelé IVD

V zásadě je možné vyjádřit roli obou při zajišťování návaznosti výsledků měření jednoduše. Producenti jsou zavázáni zajistit návaznost výsledků měření přímo na podkladě platné evropské legislativy [1] kalibrací svých produktů IVD za použití referenčních systémů – postupů a materiálů [2]. Uživatelé musí verifikovat tuto kalibraci, obvykle úspěšnou účastí v programech mezilaboratorních porovnávání a/nebo externích hodnocení kvality. Při splnění těchto jednoduchých požadavků by neměly být závažné problémy se srovnatelností výsledků a úspěšná účast rutinní laboratoře v systému EHK by měla být verifikací návaznosti jejich výsledků měření enzymových aktivit u ALT, AST, CK, gamma-GT a-amylázy a LD.

Cílem sdělení je odpovědět na otázky:

- zda skutečně problémy se srovnatelností existují,
- pokud existují, co je jejich příčinou.

Metodika

Datové podklady publikace

- Studie EC4 [3]
- Výsledky EHK, cyklu AKS 2/06, květen 2006 (dostupné na).

Referenční postupy IFCC

Jsou vypracovány a uveřejněny pro tyto enzymy:

- α -amyláza,
- ALT,
- AST,
- CK,
- gamma-GT,
- LD.

Postupy lze nalézt na: <http://www.sekk.cz> (Infoservis) a dále na stránkách Spojené komise pro návaznost v laboratorní medicíně – JCTLM umístěných na adresách:

- <http://ifcc.org>,
- <http://www.bipm.org>.

Stránky JCTLM jsou také přístupné přímo z www.cskb.cz.
Certifikované referenční materiály

V současnosti existují a na stránkách JCTLM jsou uvedeny:

- IRMM 452 (gamma-GT)
- IRMM 453 (LD)
- IRMM 454 (ALT)
- IRMM 455 (CK)
- IRMM 456 (α -amyláza)
- JC ERM (japonský referenční materiál pro ALT, AST, gamma-GT, LD, CK, α -amylázu, ALP)

Jak verifikovat návaznost?

Nejistota měření nesmí převyšovat požadovanou hodnotu, ta zase musí vyhovovat zamýšlenému použití zkoušky-vyšetření. Velikost nejistoty tedy nesmí zpochybnit použitelnost laboratorního vyšetření pacientů.

V současné době je často používaným kritériem požadované nejistoty požadovaná hodnota přesnosti měření, požadované hodnoty bias měření (diference průměru od referenční hodnoty) a povolená celková chyba měření (diference výsledku od referenční hodnoty), všechny odvozené z hodnot biologických rozptylů. Souhrn hodnot, podle nichž lze verifikovat návaznost výsledků měření enzymových aktivit, uvádí tabulka 1.

Table 1. Required values of precision, bias and total analytical error for enzymes derived from biological variation

Enzyme	Precision (CV %)	Bias (%)	Total analytical error (%)
ALT	12.2	12.0	32.1
AST	6.0	5.4	9.0
α -amylase	4.4	7.4	14.6
CK	11.5	11.4	30.3
gamma-GT	6.9	10.8	22.2
LD	4.3	4.3	11.4

Studie EC4 [3]

Referenční hodnoty byly stanoveny ve třech referenčních laboratorních sítích IFCC [4] za použití referenčních postupů IFCC. Materiál byl poté rozeslán do 70 rutinních evropských laboratoří v Itálii, Německu a Nizozemí. Účastníci používali přísně homogenní měřicí systémy (řazeno podle abecedy) – Abbott, Beckman, Dade, Olympus, Ortho, Roche. Žádné další dělení na podskupiny uvnitř těchto skupin nebylo hodnoceno!

V tomto experimentu byl použit sérový kontrolní materiál s přísadkou lidských rekombinantních enzymů a s ověřenou komutabilitou [5].

Návaznost výsledků měření byla stanovena pro každou laboratoř, enzym a měřicí systém zvlášť, jako míra shody s požadavky odvozenými z biologických rozptylů. Hodnoty bias byly kalkulovány pro skupiny jednotlivých testovaných IVD jako diference jejich průměrů od referenčních hodnot.

Externí hodnocení kvality měření enzymových aktivit v České republice (SEKK, spol. s r. o.)

Používá kontrolního materiálu společného s DGKL-Německo. Cílové hodnoty jsou ustanoveny Referenčním institutem Německé společnosti klinických laboratoří (DGKL) pro bioanalitiku v Bonnu a striktně používány

jako jediné kritérium hodnocení. Jde v zásadě o stejný typ referenčních hodnot, použitých v experimentu EC4 až na to, že namísto tří referenčních laboratoří je producentem referenčních hodnot jediná.

Specifikou českého programu EHK je nízká četnost používání homogenních měřicích systémů. Používané systémy jsou směsí přístrojů, reagenčních kitů a kalibrátorů různých výrobců. Typické je používání lacinějších reagenčních kitů menších výrobců v kombinaci s vysoce sofistikovanou přístrojovou technikou velkých světových výrobců.

Z 25 přístrojů firmy Abbott, účastnících se měření ALT v cyklu AKS2/06, jen 9 použilo firemní reagentia; z 32 pracovišť, používajících přístroje Bayer, pracovalo s firemními kity pouze 9. Ani firmy Roche a Olympus, které jsou na tom podstatně lépe, nepřesáhly v použití svých reagentií na firemních přístrojích 50 %. Naopak, jednoznačně nejčastěji používané kity Pliva Lachema nedisponují žádným měřicím přístrojem. Téměř polovina účastníků používá kalibrátor Roche bez ohledu na přístroj a kit. Bílou vránou mezi účastníky jsou uživatelé Dade-Behring, kteří používají pro svá měření prakticky plně homogenní systémy přístroj-reagencie-kalibrátor.

Tato situace je dána příčinami, které nejsou předmětem sdělení, nicméně bylo by vhodné neodpustit si poznámku, že právě v této oblasti může být obrovský prostor pro aktivitu našich výrobců (spíše dodavatelů) IVD.

Jaký mělo takové rozříštění homogenity měřicích systémů vliv na bias výsledků měření, tedy na návaznost? Teoreticky by vliv mít nemělo, protože za podmínek Směrnice 98/79 IVD mají být principy měření, založené na stejných principech jako referenční postupy a kalibrátory, hodnoty odvozené ze stejných referenčních postupů. Není tedy žádný racionální důvod pro negativní vliv na bias, pokud pracují laboratoře s dostatečnou výkonností a pokud se reagenční kity měřicími principy neodlišují od principů referenčních postupů při dostatečné kvalitě reagentií samotných. Navíc situaci nahrává i dosti značná unifikace kalibrátorů, jako kontrast k diverzifikaci reagentií.

Výsledky a diskuse

Výsledky studie EC4

Lze konstatovat nedostatečnost úrovně návaznosti, častý výskyt signifikantních hodnot bias a rozdíly mezi výsledky dosaženými s použitím měřicích systémů různých výrobců. Tyto rozdíly jasně ukazují, že mezi literou a realizací normativního přístupu může být opravdu velký rozdíl a že ke srovnatelnosti výsledků vyšetření v enzymologii zbývá ještě dost úsilí. Kupříkladu podle výsledků studie IFCC nejsou měření LD a amylázy vůbec ještě k hodnocení návaznosti zralá. Návaznost více než 95 % výsledků byla potvrzena pouze v menšině případů:

- ALT u systémů Ortho, Roche, Olympus, Dade;
- AST, gamma-GT u systémů Dade, Olympus;
- CK u systémů Abbott, Beckman, Roche.

Zato hodnoty bias jsou v řadě případů velmi vysoké a enormně závislé na typech IVD. Tato skutečnost

ukazuje pravou příčinu nízké četnosti návazných výsledků – nedůsledné odvození hodnot pracovních kalibrátorů od referenčních postupů anebo nedodržování principů referenčních postupů při produkci IVD. Signifikanční hodnoty bias lze zaznamenat i u enzymů, kde bylo možné prokázat významný stupeň návaznosti (gamma-GT, CK), o amyláze a LD ani nemluvě (tab. 2).

Table 2. Range of bias determined for six IVD products

Enzyme	Bias (%) range
ALT	-2.5 to 4.2
AST	3.5 to 5.2
CK	-9.4 to 6.1
gamma-GT	-9.8 to 6.3
α -amylase	-24.1 to -2.7
LD	-10.5 to 8.1

Hodnoty bias měření enzymů v České republice v květnu 2006

Hodnoty bias byly určeny z výsledků měření vzorku A kontrolního cyklu AKS2/06 SEKK z května 2006. V tomto vzorku byly cílové hodnoty blízké hodnotám experimentu EC4. Amyláza však byla hodnocena z téhož důvodu z výsledků vzorku B stejného cyklu. Hodnoty bias pro jednotlivé výrobce reagenčních kitů jsou uvedeny v tabulce 3. Nelze přesvědčivě tvrdit, že výsledky dosažené v rutinním programu EHK se něčím zásadně odlišují od výsledků získaných v mnohem sofistikovanější studii EC4. Zatímco studie EC4 odhaluje, že výrobci nedodržují všechny pokyny Směrnice 98/79 ES, a je schopna tyto závady identifikovat konkrétně pro jednotlivé IVD, výsledky rutinního EHK ukázaly totéž v globální sestavě účastníků, kteří z řady důvodů (dobrých i špatných) necítí nutnost používat homogenní měřicí systémy různých výrobců. Výsledky obou studií jsou téměř totožné, navzdory odlišnému přístupu od studie EC4, i s typickými významnými hodnotami bias u GGT a CK. Příznivý vliv na výsledky EHK má bezesporu vysoký stupeň unifikace použití pracovního kalibrátoru. Při stanovení amylázy a LD lze dokonce právem říci, že stupeň návaznosti a srovnatelnosti je v České republice na vyšší úrovni, než ukazuje studie EC4.

U amylázy je hlavním důvodem vysoký stupeň standardizace. Jen 8,7 % účastníků nepoužilo metody na principu IFCC (metody s maltoheptaosidem, blokováním ethylidenem, případně benzylidenem). Účastníci používající systém Dade jsou znevýhodněni, protože se hlásí k IFCC metodice, avšak mají k dispozici maltotriosový substrát, který není schopen zajistit návaznost výsledků měření.

Table 3. Bias value (%) in survey AKS2/06 SEKK CZ

Enzyme	Target	Bias (%)							
		All	Ro	OI	Da	La	Abb	Dia	Bay
α -amylase	1.69	2.4	-0.6	3.6	15.4	1.2	–	-1.8	0.6
AST	2.9	0	1.0	1.2	-2.8	0.9	-1.0	0	-1.0
ALT	1.27	5.5	4.3	2.3	7.9	6.5	2.4	7.1	1.6
CK	8.52	-5.3	-5.0	-2.9	-11.9	-3.4	-0.3	-6.0	-9.0
gamma-GT	1.675	-6.9	-7.7	-5.2	1.4	-6.9	-5.1	-5.7	-8.1
LD	6.1	1.8	-0.8	2.1	-3.8	0.3	-2.0	-2.2	2.3

Explanation: All – all participants, Ro – Roche, OI – Olympus, Da (La) – Pliva Lachema, Abb – Abbott, Dia – Dialab, Bay – Bayer

Situace u LD je bezproblémová tam, kde účastníci používají metodu měření na principu IFCC. Problém je v tom, že současně jsou na trhu a v užívání kity výrobců IVD, které používají jiný princip měření (od pyruvátu k laktátu). Tato situace je obzvláště nápadným porušením platné Směrnice 98/79 ES, neboť diagnostický kit s principiálně nemožnou návazností na referenční měřicí postup nemá být na trhu přítomen a rutinními laboratořemi vůbec používán. Programy EHK jsou lépe schopny zachycovat vývojové trendy než sofistikované studie. V případě LD došlo v České republice během jednoho roku k nárůstu počtu laboratoří používajících metodiku IFCC z 22 % na 59,4 %. Kompletní přechod na tuto metodiku a eliminace přítomnosti druhého kitu bez šance k návaznosti na trhu situaci nejspíš zcela vyřeší. Důsledné hodnocení výkonu laboratoří podle cílových hodnot, odvozených z metod IFCC, je velmi přínosné.

Program externího hodnocení referenčních laboratoří – RELA

V tabulce 4 je uvedeno rozpětí hodnot enzymových aktivit naměřené evropskými referenčními laboratořemi klinické chemie u vzorku A cyklu RELA 1/2004. Z dat je zřejmé, že k významnému bias může docházet už při stanovování referenčních hodnot v referenčních materiálech potenciálně sloužících k hodnocení návaznosti při verifikačních měřeních v laboratořích a/nebo programech mezilaboratorních porovnávání podle kvality práce referenční laboratoře.

Table 4. Ranges of enzyme values obtained in european reference laboratories in survey RELA 1/2004

Enzyme	Range of values (kat/l)	Maximal bias value (%)
ALT	2.045–2.167	5.8
AST	1.56–1.68	7.4
CK	4.84–5.35	10.0
gamma-GT	1.31–1.46	10.8
LD	3.29–3.48	5.6
α -amylase	1.25–1.29	3.2

Závěry

Návaznost a požadované hodnoty pravdivosti–bias jsou dosažitelné při měření enzymových aktivit pouze důsledným dodržováním zásad Směrnice 98/79 ES (IVD). To vyžaduje také důslednou regulaci trhu tak, aby na něj měly přístup pouze IVD s kalibrací odvozenou z referenčních měřicích postupů IFCC. Dozor nad

kvalitou IVD prostřednictvím programů EHK je nutný, a to oboustranně. To znamená nejen sledováním stability šarží IVD, ale také hodnocením výkonu laboratoří, který znamená správné používání IVD v denní laboratorní praxi. Výsledky sofistikované studie (EC4) jsou v souladu s výsledky rutinní EHK, dokonce lze pozorovat u účastníků běžné EHK lepší dispoziční k návaznosti výsledků měření, přestože používají málo homogenní měřicí systémy. Důležitou rolí EHK je edukace až „nátlak“ na uživatele k používání relevantních měřících postupů. To má nesporně pozitivní vliv na kvalitu měření, jakkoliv to zní poněkud provokativně.

Literatura

1. *Lex EU. Directive 98/79 EC on in vitro medical devices.* Off J L, 1998, 331, p. 1–37.
2. *ISO 18153.* In vitro diagnostic medical devices-measurement of quantities in samples of biological origin-metrological traceability of values for catalytic concentrations of enzymes assigned to calibrators and control materials. Geneva, Switzerland : ISO 2003.

3. **Jansen, R., Schumann, G., Baadenhuijsen, H., Franck, P., Franzini, C. et al.** Trueness verification and traceability assessment of results from commercial systems for measurement of six enzyme activities in serum. An international study in the EC4 framework of the Calibration 2000 project. *Clin. Chim. Acta*, 2006, 386, p. 16–167.
4. **Panteghini, M., Cerriotti, F., Schumann, G., Siekman, L.** Establishing a reference system in clinical enzymology. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2001, 39, p. 795–800.
5. **Cobbaert, C., Weykamp, C., Baadenhuijsen, H., Kuypers, A., Lindemans, J., Jansen, R.** Selection, preparation and characterization of commutable frozen human serum pools as potential secondary reference materials for lipid and apolipoprotein measurements. *Clin. Chem.*, 2002, 48, p. 1526–1538.

Do redakce došlo: 21. 6. 2006.

*Adresa pro korespondenci:
RNDr. Bedřich Friedecký, Ph.D.
SEKK, spol. s r. o.
Bartolomějská 90
530 02 Pardubice
e-mail: friedecky@sekk.cz*

Otevřený dopis dr. Friedeckému

Milý Bedřichu,

pětašedesátka není věk, kterého by sis měl všímat. Zatímco mladší Ti ho mohou při Tvé kondici závidět, starším naopak nezbyvá opět nic jiného než závist. Jsi institucí, bez které by klinická biochemie měla velkou šanci poněkud myšlenkově živořit, jsi člověk s názory, jejichž nevyslovení by bylo prázdnou cestou do pustin. A tak posloucháme, když mluvíš a čteme, když píšeš. Ale vždy s očekáváním, co nového se dozvíme.

Jen několika lidem jsi dal nahlédnout pod povrch Tvé laskavě sarkastické bariéry, ale nás pár také ví, jak trpí svět, který Tě obklopuje, a jak rád bys humanismus, který máš jako svůj světónázor, viděl kolem sebe mnohem častěji.

Tak jako jsi jen několika lidem dal poznat své nitro, tak jsi naopak mnoha lidem dal poznání, směr, pochopení a možná i náplň života. Naučil jsi nás často víc, než bychom si byli ochotni připustit, ukázal jsi nám věci v úplně jiném světle a v souvislostech, které byly buď naprosto absurdní, nebo úplně jednoduché, ale my jsme si jich prostě nevšimli.

Život může člověka stále příjemně překvapovat a přeji Ti, abys s klukovským údivem bral všechna ta překvapení jako odměnu, kterou si zasloužíš.

Tvůj

Tonda Jabor