

## Aktuální stav standardizace měření katalytických koncentrací enzymů a srovnatelnosti výsledků. Minireview.

Friedecký B.<sup>1,2</sup>, Kratochvíla J.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ÚKBD Fakultní nemocnice Hradec Králové

<sup>2</sup>SEKK s.r.o. Pardubice

### SOUHRN

Navzdory tomu, že standardizace měření sedmi hlavních katalytických koncentrací enzymů je dokončena a referenční metody IFCC na jejím podkladě vytvořené jsou verifikované v kontrolním programu RELA IFCC, situace v rutinních laboratořích vykazuje nedostatečnou míru jejího respektování. Důsledkem je neadekvátně nízká úroveň srovnatelnosti výsledků měření dosažených v různých laboratořích. Příčinou stavu je přetrvávající výroba a používání starších, nestandardizovaných metod existujících vedle sebe na trhu, v portfoliích laboratoří a jako položky hodnocení programů externích hodnocení kvality. K oficiálnímu dosažení proklamovaných cílů harmonizace měření v laboratorní medicíně je zapotřebí existující standardizaci prosadit důsledně do rutinních laboratoří. Ústřední roli zde sehrávají programy externího hodnocení kvality.

*Klíčová slova:* Enzymy, standardizace, externí hodnocení kvality, referenční systémy, IFCC.

### SUMMARY

**Friedecký B., Kratochvíla J.: Present state in standardization of measuring catalytic concentration of enzymes and comparability of results. A minireview**

Despite of fact that standardization of seven basic enzyme measurement is completed and by program RELA IFCC verified, routine laboratories produce results of low level comparability. Producing by manufacturers and use by laboratories of non-standardized methods are main reason for this bad statement. Another reason is acceptance of non IFCC standardized by providers of external quality programs. If we really wish to reach harmonization of enzyme measurement results, we should introduce standardization more strictly into daily laboratory and manufacturers practices. Important role play here approaches of EQA programs providers.

*Keywords:* enzymes, standardization, external quality assessment, reference systems, IFCC.

## Úvod

Standardizace je nástrojem k dosažení harmonizace výsledků měření se všemi jejími pozitivními důsledky - pravdivostí výsledků, srovnatelností metod, existencí obecně platných referenčních intervalů/rozhodovacích limitů jako nástrojů racionální interpretace a omezení rizika zdravotní péče pacientů. K posouzení aktuálního stavu bylo použito výhradně recentních studií, odpovídajících co nejlépe aktuální situaci.

## Referenční systémy a stav standardizace

V průběhu let 2002 - 2011 byla provedena standardizace měření sedmi základních rutinních enzymů v séru. Výsledkem bylo vytvoření sedmi referenčních metod IFCC a osmi certifikovaných referenčních materiálů, zajišťujících metrologickou návaznost rutinních měření. Stručné shrnutí referenčních systémů IFCC je uvedeno v Tabulce 1. Zdálo by se tedy, že problém standardizace měření enzymů je vyřešen a srovnatelnost a obecná platnost referenčních intervalů zajištěna. Ale skutečný stav vykazuje ještě řadu problémů, vznikajících nedůslednou standardizací ze strany výrobců, laboratoří a organizátorů programů EHK.

**Table 1.** IFCC reference measurement systems of enzymes

Enzyme	Publication	Notice	Certified reference material
ALT	1	P5P coenzyme	ERM-AD454/IFCC
AST	2	P5P coenzyme	ERM-AD457/IFCC
GGT	3		ERM-AD452/IFCC
LD	4	lactate as substrate	ERM-AD453/IFCC
alfa-Amylase	5	ethyliden-G7-PNP substrate	IRMM/IFCC 456 JC ERM 20327
ALP	6		JC ERM 20327
CK	7		ERM-AD455/IFCC

\*P5P pyridoxal-5'-phosphate

**Table 2.** Participants of selected interlaboratory comparison programs used traceability to IFCC reference methods (%)

Enzyme	RIQAS	SKML	SEKK	Empower
ALT	?	97	100	43
AST	?	98	100	42
GGT	49	96	100	-
LD	42	97	100	58
$\alpha$ -Amylase	?	87	96	-
ALP	25	96	98	-
CK	72	96	100	-

To je zřejmé již z Tabulky 2, obsahující data účastníků, uváděná ve vybraných dotazních programů mezilaboratorních studií a EHK. V Tabulce 2 jsou uvedena data programů SKML Nizozemí 2012-2013 [1], SEKK Česká republika, komerčního programu (RIQAS Randox) a data projektu Empower [2]. Programy SKML a Empower používají kontrolních materiálů s otestovanou komutabilitou a nejsou ovlivněna případně možnými matricovými vlivy.

Data kontrolního programu RIQAS jsou vzata do úvahy hlavně pro vysoký, o jeden až dva řády vyšší, počet účastníků, umožňující náhled do situace ve velkém počtu anonymních, často ne zcela důsledně kontrolovaných rutinních klinických laboratoří, vyskytujících se ve velkém, geograficky silně heterogenním prostoru.

Již data Tabulky 2 poukazují na existenci řady problémů standardizace enzymů.

Program RIQAS při hodnocení výsledků měření nedává účastníkům vůbec možnost se zařadit do skupiny metod IFCC v případě ALT a AST a nebere v úvahu existenci referenční metody IFCC u  $\alpha$ -amylázy, což již samo o sobě osvětluje kontroverzní vztah firem k standardizaci (hraničící s nezájmem). V případě stanovení katalytické koncentrace LD podíl referenční metody IFCC, používající laktát jako substrát v programu RIQAS nepřesáhl ani 50 % a u programu Empower 60 % účastníků. Ostatní účastníci zůstávají u metod, používajících jako substrátu pyruvát. Při měření aminotransferáz u účastníků programů RIQAS zcela dominují metody bez P5P v reakční směsi. Také účastníci recentního programu Empower, používajícího sér individuálních dárců krve nerespektují důsledně u řady enzymů již existující standardizaci [2]. Metody ALT, AST bez P5P jsou používány běžně, metoda LD s pyruvátovým substrátem zůstává frekventovaně používaná a dokonce je stále vyráběná a používána i zcela obsoletní metoda ALP s DEA puřem (Tabulka 2).

V případě metod stanovení ALP s AMP puřem považují mnozí výrobci (viz jejich dokumentace) za IFCC metodu omylem metodu Tietze a spol. vyvinutou na počátku 80. let pro inkubační teplotu 30° C [3]. Skutečná referenční metoda IFCC pochází až z roku 2011 a řadou výrobců nebyla doposud akceptována [4]. Pozvolné akceptování této metody není dokonce ještě důsledně provedeno ani v roce 2015 a v letech 2012 - 2013 bylo teprve v počáteční fázi. Proto jsou data o vysokém stupni standardizace stanovení ALP v Tabulce 2 možná nespolehlivá.

Zásadním problémem programu RIQAS a také jiných firemních programů, je nevhodná definice skupin, do nichž jsou výsledky laboratoří zařazovány. Problém o to závažnější, že právě princip hodnocení po skupinách je prakticky výhradně ve všech programech EHK využíván. Velké akreditované programy EHK (zde SKML, SEKK) a kvalifikované mezilaboratorní studie (AACB, Empower, CAP USA) a jiné definují skupiny podle výrobců, nicméně bohužel neplatí pravidlo, že výrobce představuje jednu standardizovanou metodu, a tím i pevný, definovaný bod hodnocení. Jeden výrobce produkuje často několik principiálně odlišných metod (včetně paralelní produkce standardizovaných metod IFCC a metod nestandardizovaných). Skupiny, podle kterých se hodnotí účastníci v programu RIQAS, jsou tvořeny velmi voluntaristicky. Někdy podle výrobce reagentů, jindy podle instrumentace, nebo i podle principu metod měření.

## Zdroje dat z recentních mezilaboratorních studií

Pro účely našeho sdělení jsme použili data z programů a studií, uvedených v Tabulce 3. Použité materiály mají jednak testovanou komutabilitu, a pak jde o standardní, lyofilizaci stabilizované a celosvětově používané kontrolní materiály.

Tři programy použily materiálů s testovanou komutabilitou, u ostatních materiálů nebyl stupeň komutability zjišťován.

## Diference výsledků mezi metodami, vztažené hodnoty pro výpočet bias, problémy ustanovování hodnocených skupin

Diference mezi metodami má za následek i diference mezi výsledky měření. Rozdíly jsou pozorovány jak u referenčních materiálů bez otestované komutability, tak i u materiálů s testováním potvrzenou komutabilitou včetně sér individuálních dárců krve v programu Empower, kde vlivy matrice principiálně nepřicházejí vůbec v úvahu. Zjištěné a v recentní literatuře uvedené systematické diference jsme shrnuli do Tabulky 4 s několika pododdíly. Soustředili jsme se na enzymy ALT, AST, ALP, LD a  $\alpha$ -amylázu a použili výsledků několika recentních mezilaboratorních studií a programů externích hodnocení kvality.

**Table 3.** Materials, method groups, commutability

Program	Matrix	Commutability	Methods
RELA IFCC	lyophilized	?	IFCC 2011
SKML	native pool	Y	Be, Ro, Ab, Ad
Empower Master	single donors	Y	Be, Ro, Ab, Ad, Di, Ol, Vit, Th
AACB AUS	native pool	Y	Be, Ro, Ab, Ad, Di, Ol, Vit,
SEKK CZ	lyophilized	?	Be, Ol, Ab, Ad, Di, Ro
RIQAS	lyophilized	?	Be, Ol, Ro, Ab, Ad, Ro

Be-Beckman DxC; Ol-Beckman Olympus; Ro-Roche (Cobas, Modular, Integra); Ab-Abbott Architect; Ad-Siemens Advia; Di-Siemens Dimension; Vit-Ortho Vitros; Th-Thermo; Bias calculated as differences from means of manufacturer groups, except ALT/AST in Empower program (IFCC reference values); ? – commutability not tested; Y - commutable sample; AACB - reference materials of Australian Association of Clinical Biochemistry; RELA IFCC - control materials of RfB Germany to EQA program for IFCC reference laboratories

**Table 4.** The lack of standardization and non comparability of enzymes measurement in different interlaboratory comparison programs**4a Bias of ALP metod with AMP buffer**

Program	Bias (%)
RELA IFCC (2013)	± 2.5
SKML (2012 – 2013)	± 5
Empower (2014)	-15/10
AACB AUS (2014)	-7/10
RIQAS (2013)	-18/30
EQA China (12)	
Native samples	-27/20
Lyophilised samples	-29/20
Roche	-10/-16
Roche after IFCC recalibration	± 4
SEKK CZ (2015)	
All participants	-13/19
IFCC recalibration	-6/7

**4b Bias of α-AMS methods**

Program	Methods/Systems	Bias (%)
RELA IFCC (2013)	IFCC	-2/1.1
SEKK CZ (2015)	Roche G7-PNP	-2.6
	Advia G7-PNP	1.7
	Olympus G7	3.2
	Abbott 3-CI-G3	2.9
	Dimension 3-CI-G3	23.0
RIQAS (2013)	Roche Cobas G7	-7.0
	Roche Integra 3-CI-G3	-5.3
	Beckman G-4 (maltotetraoside)	1.1

**4c Bias of ALT/AST**

Program	Bias (%)	
	ALT	AST
RELA (2013)	± 2.5	± 3
AACB AUS (2014)	-7/14	-5,1/9,3
Empower with P5P (2014)	-40/25	-40/10
Empower non P5P (2014)	-20/-40	-25/0
SEKK CZ (2012-2014)	-5/15	-5/15
RIQAS (2013)	-6/8	-8/21
SKML (2012 – 2013)	± 10	± 5

#### 4d Number of participants with P5P in ALT, AST

Program	Number of participants (%)	
	ALT	AST
RIQAS (2013)	10%	6%
SEKK CZ (2012-2014)*	80%	80%
Empower (2014)	57%	58%

\*P5P added in control materials

#### 4e Bias in LD measurement

Program	Bias (%)	Notice
RELA (2013)	± 4.5	
AACB AUS (2014)	-4/4	
SKML (2012 – 2013)	-5/5	
SEKK CZ (2012-2014)	-5/8	
Empower IFCC method (2014)	-15/20	
Empower non IFCC method (2014)	-20/5	
RIQAS (2013)	-14/44	difference lactate vs pyruvate

#### 4f LD IFCC (lactate) vs non IFCC (pyruvate) - number labs and manufacturers

Program	Manufacturers	
	Lactate (IFCC)	Pyruvate (non IFCC)
Empower (2014)	Ab, Be, Ol, Ro(Cob), Ro(M), Ad, Di	Be, Ol, Ro(Cob), Ro(M), Ad, Vit
RIQAS (2013)	Participants (%)	
	65	25 (9*)

\* Unclear

U studií SKML, AACB, Empower a RIQAS byly jejich autory použity jako vztažné hodnoty pro kalkulaci bias průměrů měření všech účastníků v případě SEKK, RELA IFCC a Empower ALT/AST pak hodnoty, získané IFCC referenčními metodami. **Omezené používání referenčních hodnot IFCC rovněž svědčí pro malou důslednost standardizace měření enzymů.**

Výsledky programu RELA IFCC (EHK referenčních laboratoří) ukazují velmi dobrou srovnatelnost referenčních metod IFCC s reprodukovatelností mezi 2,5 až 4,5%. V programech EHK a v mezilaboratorních studiích, jejichž data pocházejí z rutinních metod měření, pozorujeme žel zcela jinou, podstatně horší situaci.

Paralelní výroba souprav na bázi nestandardizovaných a standardizovaných metod měření rutinních enzymů a jejich vytrvalé používání v klinických laboratořích přetrvává navzdory faktu, že výsledky při stanovení AST a ALT se liší, zejména pak u hodnot uvnitř referenčních intervalů, jak je zřetelné u výsledků (Empower) za těchto podmínek u metod o desítky procent. Při stanovení LD více než dvojnásobně a u metody ALP (DEA pufr) se dosahuje výsledků až o 90% vyšších, než u metod s pufrům AMP. Rozdíly mezi výsledky ALT a AST při použití nebo absenci P5P u vzorků pacientů byly popsány již před mnoha lety a jsou zejména u těžce nemocných pacientů nezanedbatelné [5]. V některých systémech EHK (RfB Germany, SEKK ČR a možná i dalších) se používá kontrolních sér s přídatkem P5P, takže případné difference mezi metodami stanovení ALT/AST IFCC s P5P a bez P5P se zamaskují.

Například v programu SEKK nepoužilo podle údajů účastníků v cyklu AKS4/14 20% laboratoří P5P, avšak díky přidavku P5P do kontrolního materiálu při jeho výrobě nebyly rozdíly pozorovány.

Při stanovení ALP je zavedení standardizované metody IFCC o několik let opožděné a ze strany výrobců v čase nekoordinované, takže srovnatelnost výsledků měření mezi laboratořemi není v současné době zajištěna (s překvapující výjimkou výsledků SKML?), jak je zjevné z výsledků Tabulky 4a. Jak potvrzuje nejnověji i recentní čínská studie [6] a jak souhlasí s našimi zkušenostmi ani globální výrobce Roche neakceptoval dosud referenční IFCC metodu. Přitom výsledky téhož programu jasně ukazují, že recalibrace na IFCC metodu je možná.

V některých programech externího hodnocení kvality jsou tyto rozdíly jednoduše vyřešeny hodnocením výsledků po skupinách metod (peer groups), do nichž jsou účastníci zařazováni. K zabezpečení certifikátu kvality pro auditora a pojišťovny jde o postup sice výhodný, ale k detekci a případnému odstranění systematických chyb se naprosto nehodící. Z dat Tabulek 3 a 4 je navíc zřejmé, že není dostatečně definován způsob ustanovování takových „peer groups“ skupin. Výsledky získané soupravami některých výrobců jsou dále dost libovolně děleny do dalších podskupin. Například Roche do podskupin Cobas, Modular, Integra, Siemens na podskupiny Advia, Dimension, Beckman na DxC a Olympus AU, mezi kterými jsou pozorovány také difference. Hodnocení podle skupin rozhodně nevede k principiálnímu zvýšení kvality, pouze k zlep-

šení úspěšnosti účastníků v programech externích hodnocení kvality. Výsledky programů Empower z roku 2014 a RIQAS 2013 explicitně dokládají, že velká většina globálních výrobců diagnostik produkuje a na trhu prodává paralelně soupravy, založené jak na IFCC metodách, tak i na metodách nestandardizovaných bez ohledu na to, že poskytují zcela rozdílné výsledky.

I v případech, kdy bylo standardizace dosaženo intenzivní prací příslušných pracovních skupin IFCC, se náhle objeví výrobce, který uvede na trh novou, nestandardizovanou metodu stanovení enzymu. V případě  $\alpha$ -amyláz, kde standardizace pomocí referenční metody IFCC (substrát ethylden-G7 PNP) zvýšila úroveň harmonizace výsledků o řád (z desítek procent hodnot CV na jednotky CV), se objevují v tržní nabídce metody nestandardizované, vykazující v programech EHK více než 20% rozdíl od průměru metod standardizovaných (Siemens Dimension se substrátem CI-G3-PNP). Je však zajímavé, že výsledky metod Roche Integra (CI-G3-PNP) a Abbott Architect (substrát 3 CI-G3-PNP) nevykazují žádné signifikantní difference od metody IFCC, takže napovídají, že vyladění metody 3-CI-G3-PNP na referenční metodu IFCC(G7-PNP) je zřejmě možné.

**Zdroji diferencí mezi metodami je primárně existence a používání nestandardizovaných metod, vyráběných i globálními výrobci navzdory existenci referenčních systémů měření a referenčních materiálů. Problém komutability materiálů se v tomto kontextu jeví jako druhotný.**

## Role EHK, laboratoří a výrobců v dosažení důsledné standardizace měření. Současnost a budoucí cíle.

Standardizace měření enzymů je teoreticky dobře zabezpečená a data o referenčních postupech IFCC, referenčních materiálech IRMM/IFCC a výsledcích referenčních laboratoří IFCC jsou volně dostupná na webových stránkách [7, 8]. Například od roku 2011 funguje pro metodu ALP kontrolní program EHK pro referenční laboratoře RELA [8], takže kontrolní/referenční materiály by mohly být bez problémů rekalibrovány na hodnoty, odpovídající referenční IFCC (2011) metodě. V takovém případě by nemuselo k nesrovnatelnostem metod ALP, používajících pufru AMP vůbec dojít. Stejně tak, by mohla být zřejmě pomocí výsledků RELA (viz Roche Integra; Abbott Architect) rekalibrována metoda měření  $\alpha$ -AMS s CI-G3-PNP substrátem na referenční metodu IFCC (G7 – PNP).

Programy EHK by měly sehrávat podle svého určení edukační roli, zaměřenou zejména na důslednost standardizace a její vyžadování ze stran uživatelů.

Minimálním krokem při organizaci programů EHK by měla být činnost, vedoucí k eliminaci produkce nestandardizovaných metod ze strany výrobců, což by vedlo k redukci (až eliminaci) jejich používání v rutinních klinických laboratořích. V rámci akreditace klinických laboratoří by bylo zapotřebí omezovat hodnocení výsledků měření v programech EHK jen na ty skupiny metod,

kteří jsou založené na standardizovaných postupech. Pak by nebylo nutné využívat pochybeného a systematické difference maskujícího hodnocení podle metodických skupin a nahradit je hodnocením podle referenčních postupů nebo aspoň robustních průměrů. Pak by bylo možné i získání dosud pochybených a v podstatě málo známých, výrobci a laboratořemi obvykle falešně optimistických dat o hodnotách bias [9] a nejistot měření u enzymů.

## Literatura

1. **Weykamp C, Franck PF, Gunnewick JK, de Jonge R, Kuypers A, van Loon D et al.:** Harmonisation of seven common use enzyme results through EQA. *Clin Chem Lab Med* 2014,52:1149-1155.
2. **Empower Master Comparisons 2014.** Preliminary Report. STT/UGent. <http://www.stt-consulting.com>
3. **Tietz NW, Burtis CA, Duncan P, Ervin K, PetitClerc CJ, Rinker AS et al.:** A reference method for measurement of alkaline phosphatase activity in human serum. *Clin Chem* 1983,29:751-761.
4. **Schumann G, Klauke R, Canallias F, Bossert-Reuther S, Franck PFH, Gella FJ et al.:** IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C. Part 9: Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alkaline phosphatase. *Clin Chem Lab Med* 2011,49:1439-1446.
5. **Mastroiani A, Longoni PP, Franzini G, Facchetti G.:** Importance of pyridoxal-5'-phosphate addition to the assay medium for the measurement of catalytic concentrations of plasma aspartate and alanine aminotransferases in patients undergoing antineoplastic chemotherapy. *Eur Clin Chem Clin Biochem* 1996,34: 507-510.
6. **Han L, Wang J, Li Y, Zhang Q, Zheng S et al.:** Application of New Reference Procedure for ALP Measurement in the Clinical Laboratory. *Clin Lab* 2015, 61/5-6.
7. Dostupné na: <http://www.bipm.org/jctml> k 10. 7. 2015
8. Dostupné na: <http://www.dgkl-rfb.de:81/index.shtml> k 10. 7. 2015
9. **Krouwer JS.:** Biases in clinical trials performed for regulatory approval. *Accred Qual Assur* 2015: doi 10.1007/s00769-015-1145-0.
10. **Schumann G, Bonora R, Cerriotti F, Ferard G, Ferrero CA, Franck PF et al.:** Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alanine aminotransferase. *Clin Chem Lab Med* 2002,40:718-724.
11. **Schumann G, Bonora R, Cerriotti F, Ferard G, Ferrero CA, Franck PF et al.:** Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of aspartate aminotransferase. *Clin Chem Lab Med* 2002,40:725-733.
12. **Schumann G, Bonora R, Cerriotti, Ferard G, Ferrero CA, Franck PF et al.:** Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of gamma-glutamyltransferase. *Clin Chem Lab Med* 2002,40:734-738.
13. **Schumann G, Bonora R, Cerriotti F, Clerc-Renaud P, Ferrero CA, Ferard G et al.:** Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of lactate dehydrogenase. *Clin Chem Lab Med* 2002,40:643-648.
14. **Schumann G, Aoki R, Ferrero CA, Ehlers G, Féraud G, Gella FJ et al.:** IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic concentrations of enzymes at 37 degrees C. Part 8. Reference procedure for

the measurement of catalytic concentration of  $\alpha$ - amylase. *Clin Chem Lab Med* 2006,44:1146-1155.

15. **Schumann G, Bonora R, Cerriotti F, Clerc-Renaud P, Ferrero CA, Ferard G.:** Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of creatine kinase. *Clin Chem Lab Med* 2002,40:635-642.

*Podpořeno MZ ČR - RVO (FNHK, 00179906)*

Do redakce došlo 17. 7. 2015

*Adresa pro korespondenci  
RNDr. Bedřich Friedecký Ph.D.  
SEKK spol.s r.o.  
Za Pasáží 1609  
530 02 Pardubice  
e-mail: friedecky@sekk.cz*