

Současný stav rutinní analytiky některých biochemických markerů

J. Vávrová, B. Friedecký, M. Tichý
Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF UK
Fakultní nemocnice, Hradec Králové

22.9.2009



Laboratorní testy

- Vliv na 70 - 80 % diagnostických a terapeutických rozhodnutí v nemocnici

 - Tvoří 3 - 5 % nákladů ve zdravotnictví
-

Analytické otázky

- Řešeny otázky přístupu k technologiím
 - separační *versus* imunochemické postupy
- Očekává se přínos navrhovaných referenčních metod pracujících na principu LC-MS/MS

Na zvolených příkladech demonstrujeme přednosti a úskalí technologických možností

- Příklad 1: FLC
 - Příklad 2: albumin v moči
 - Příklad 3: vitamin D
-


Příklad 1: FLC

- Technologicky rutinně dostupný parametr aplikací imunochemické metody
 - metoda kvantifikace se potýká s problémy mezilaboratorního srovnání a interpretace výsledků
 - *Criteria for diagnosis of multiple myeloma from IMWG, 2003*
 - *USA NACB guidelines for the use of tumor markers in monoclonal gammopathies <http://www.nacb.org> 2006 (Draft guidelines)*
-

Otevřené „laboratorní“ otázky

- metodické problémy implikují problémy s interpretací

- standardizace
 - protilátky
 - kalibrátory, kontrolní materiály
 - ...
- ředění vzorků



závislost na metodě
závislost na použité technologii
závislost na optimalizaci ředění

FLC - validace vyšetření souvisejících s diagnostikou mnohočetného myelomu



- 6 center ČR
 - ÚKBLD VFN LF1 UK Praha
 - ÚKBH LF UK a FN Plzeň
 - OKB FN Olomouc
 - Lab. klin. imunologie FNKV Praha
 - OKBH FN Brno-Bohunice
 - ÚKBD LF UK a FN Hradec Králové

Vávrová, J., Tichý, M., Friedecký, B., Maisnar, V., Hájek, R., Čermáková, Z., Dastych, M., Gottwaldová, J., Kučera, P., Krotká, J., Racek, J., Ženková, J., Schneiderka, P., Lochman, P., Zima, T., Benáková, H., Spáčilová, J., Palička, V.

Opakovatelnost

Laboratoř	CV %			
	kappa	lambda	k/l	Metoda
1	14,3	4,5	8,9	IMT
2	15,6	4,9	35,0	IMT
3	5,8	13,2	14,5	IMT
4	14,6	2,8	44,0	IMN
5	n.a	n.a	n.a	
6	6,3	18,6	29,9	IMN
Celkem	11,3	8,8	26,5	
Údaj výrobce	$\leq 8,0$	$\leq 4,0$		

Reprodukovatelnost - kappa

Vzorek	průměr	CV%
1	7,0	12,3
2	7,4	11,4
3	7,8	13,8
4	10,9	20,6
5	11,3	28,6
6	32,2	25,3
7	52,2	50,0
8	56,1	43,8
9	67,1	40,9
10	293,1	41,1
11	299,5	43,4
12	344,6	54,0
Průměr		32,1

Reprodukovatelnost - lambda

Vzorek	průměr	CV%
1	3,3	102,4
2	5,7	46,0
3	6,6	32,5
4	10,3	19,6
5	10,6	11,7
6	10,9	22,5
7	52,9	9,3
8	232,1	23,7
9	334,1	19,2
10	2610	27,5
11	11283	9,9
12	13912	20,4
Průměr		28,7

Reprodukovatelnost - Kappa/Lambda

Vzorek	průměr	CV%
1	0,0028	29,6
2	0,0041	62,3
3	0,0067	153,4
4	0,0224	28,1
5	0,049	18,1
6	1,1	23,5
7	1,25	34,7
8	1,7	59,0
9	9,44	73,2
10	27,7	40,0
11	29,6	53,6
12	353,1	100,7
Průměr		56,4

Počet výsledků uvnitř referenčního intervalu (%)

Počet výsledků uvnitř referenčního intervalu	%
Kappa	39,0
Lambda	50,0
Kappa/Lambda	21,5

- analytická charakteristika měření sFLC může mít i nezanedbatelné klinické důsledky
 - problematický přístup a definice kalibračního materiálu
-

Příklad 2: Albumin v moči

- systematické diference mezi imunochemickými a HPLC metodami
 - původ
 - snížená imunoreaktivita albuminu po vyloučení ledvinami
 - nespecifičnost použitých separačních metod (možná společná eluce dalších proteinů ze separační kolony zároveň s albuminem)
-

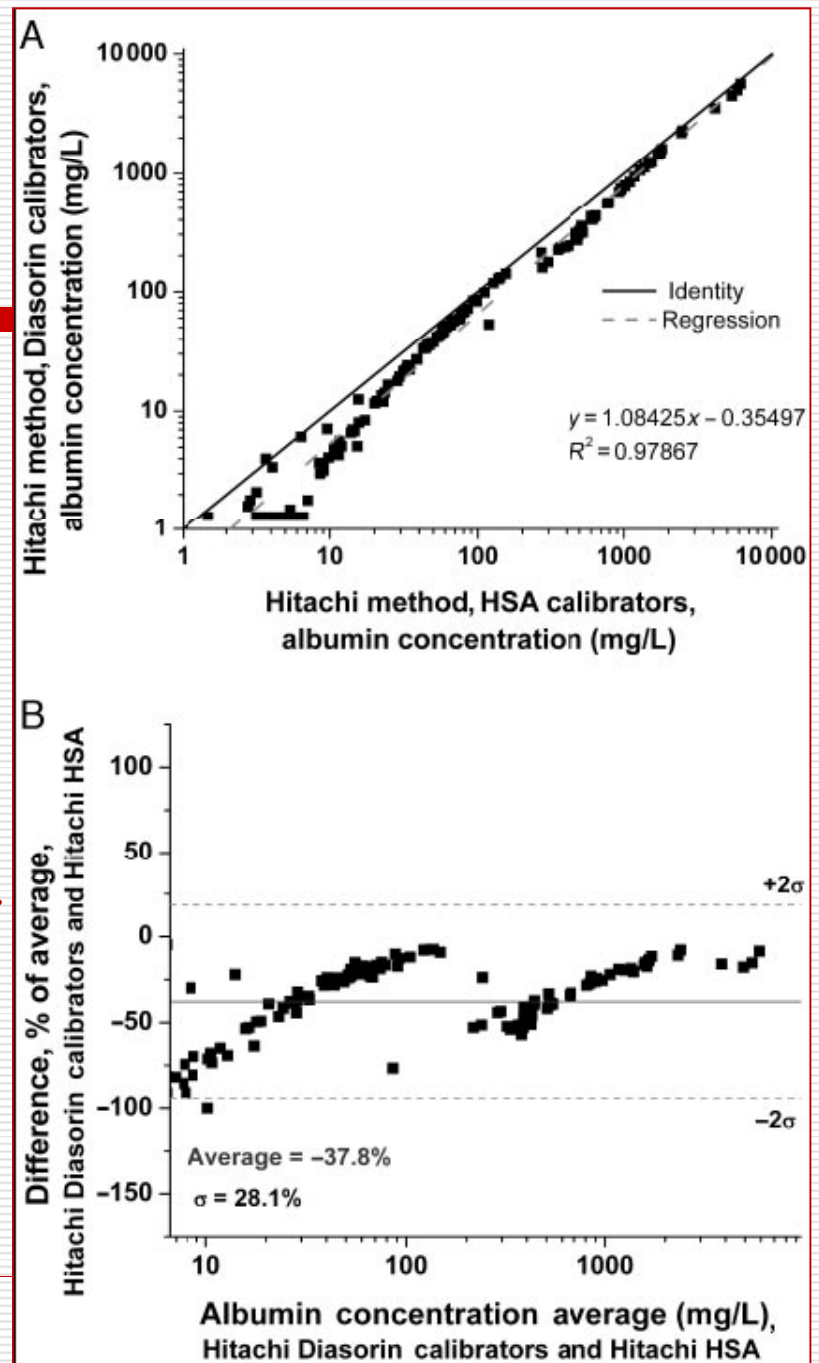
IFCC doporučení

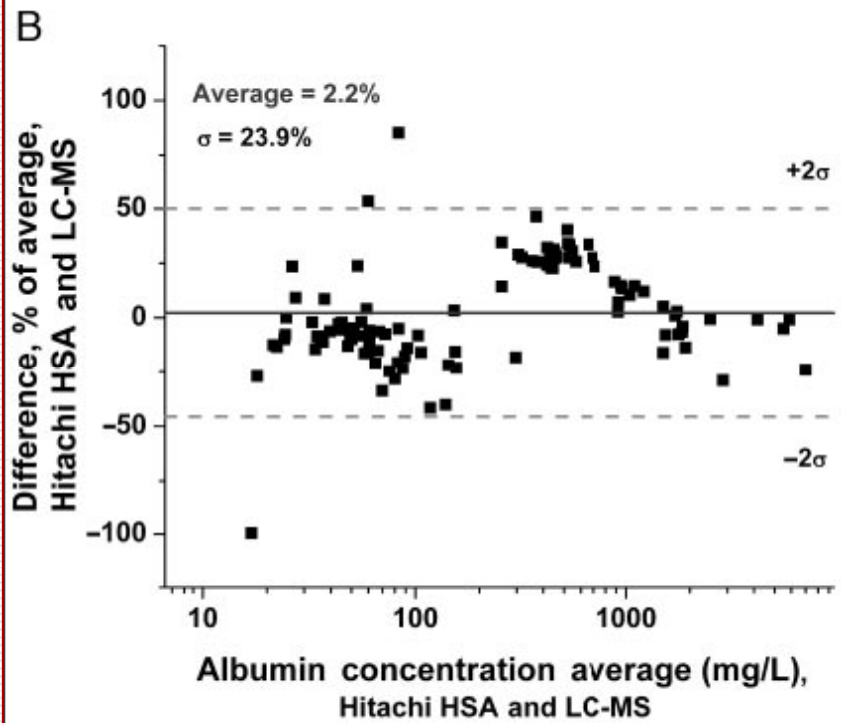
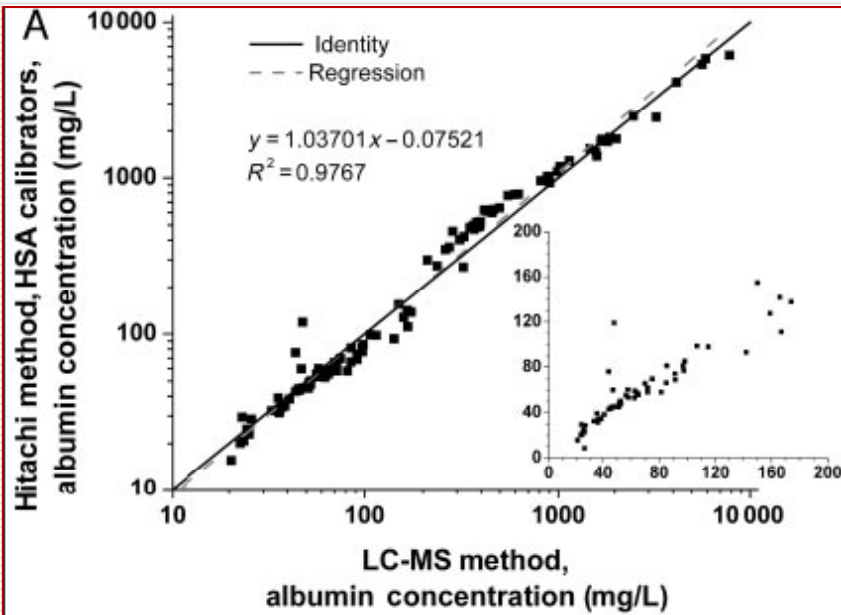
- Kvocient ACR – metoda volby
 - Preanalytika
 - Ranní moč, stabilita 7 dní, **NEMRAZIT!!!**
 - SI jednotky: mg/mmol
 - Rozdíl HPLC a imunoanalýzy
 - o pravdivosti vypoví LC/MS
 - Potřeba urychleně dokončit návaznost RM

 - W. G. Miller et al.: **Current Issues in Measurement and Reporting of Urinary Albumin Excretion**
Clinical Chemistry 55:1, 24–38 (2009)
-

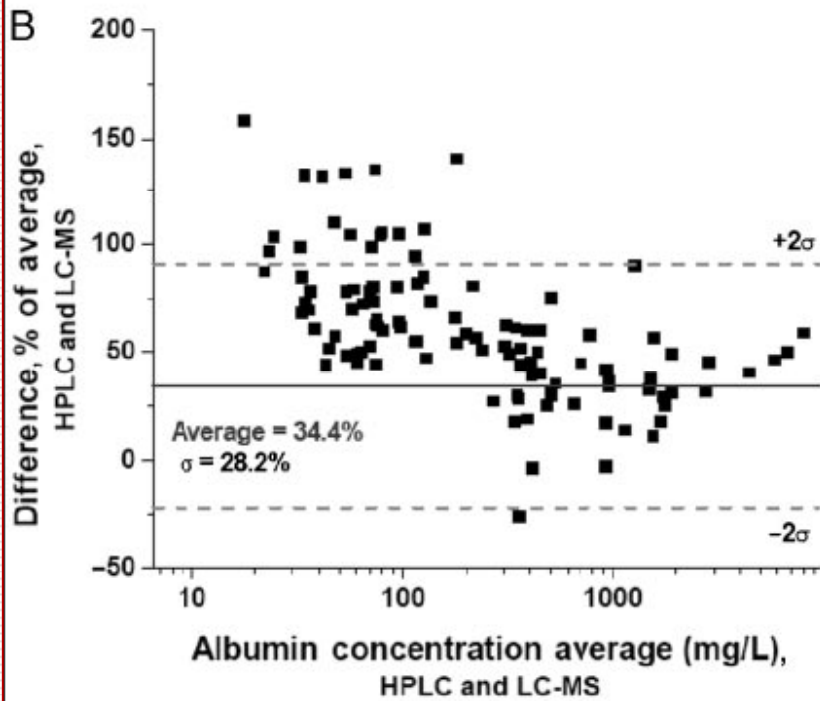
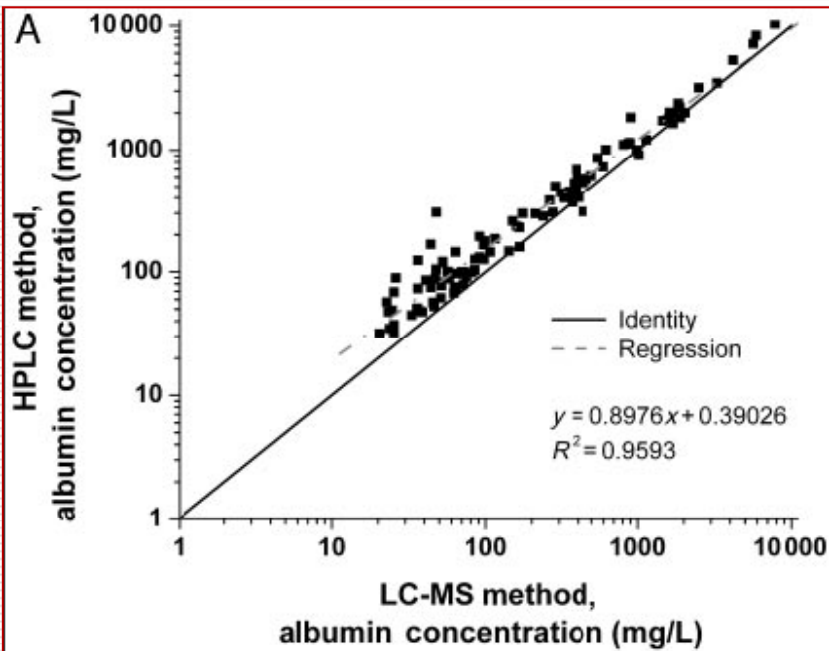
- A. Shaikh et al.: Comparison between Immunoturbidimetry, Size-Exclusion Chromatography, and LC-MS to Quantify Urinary Albumin
Clinical Chemistry 54:9, 1504–1510 (2008)

Albumin v moči
immunoturbidimetricky,
HSA vs sérové kalibrátory





□ Albumin immunochemicky s HSA standardy vs LC-MS



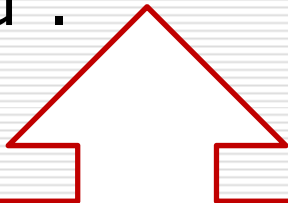
HPLC vs LC-MS

Příklad 3: vitamin D

- nespecifičnost immunoanalýz
 - Clin Chem 2008,54,2059-2062
 - Analytem vitamin D3, zatímco v řadě případů se používá k suplementaci vitamínu D2
 - Clin Chem 2008,54,630-632
 - vysoké diference mezi výsledky různými EHK
 - není k dispozici kalibrátor pro D3 i D2, takže potenciálně specifická metoda LC-MS/MS má problémy s kalibrací
-

Clin Chem 2009m,1300-1302

- Problémy s pravdivostí stanovení vitamínu D jsou natolik závažné, že se objevil v New York Times článek o tomto problému, který „obviňoval“ laboratoře z „častého nedodržování řádných postupů“.



Je třeba ustanovit návaznost měření.
Materiál sRM-NIST 972, certifikovaný metodou LC/MS/MS.
Netrpělivě se čeká na referenční postup měření, který bude založen rovněž na metodě hmotnostní spektrometrie.

Závěr

- Současná situace nedosahuje potřebné srovnatelnosti výsledků
 - Proteomika je cestou k definování referenčních materiálů
-