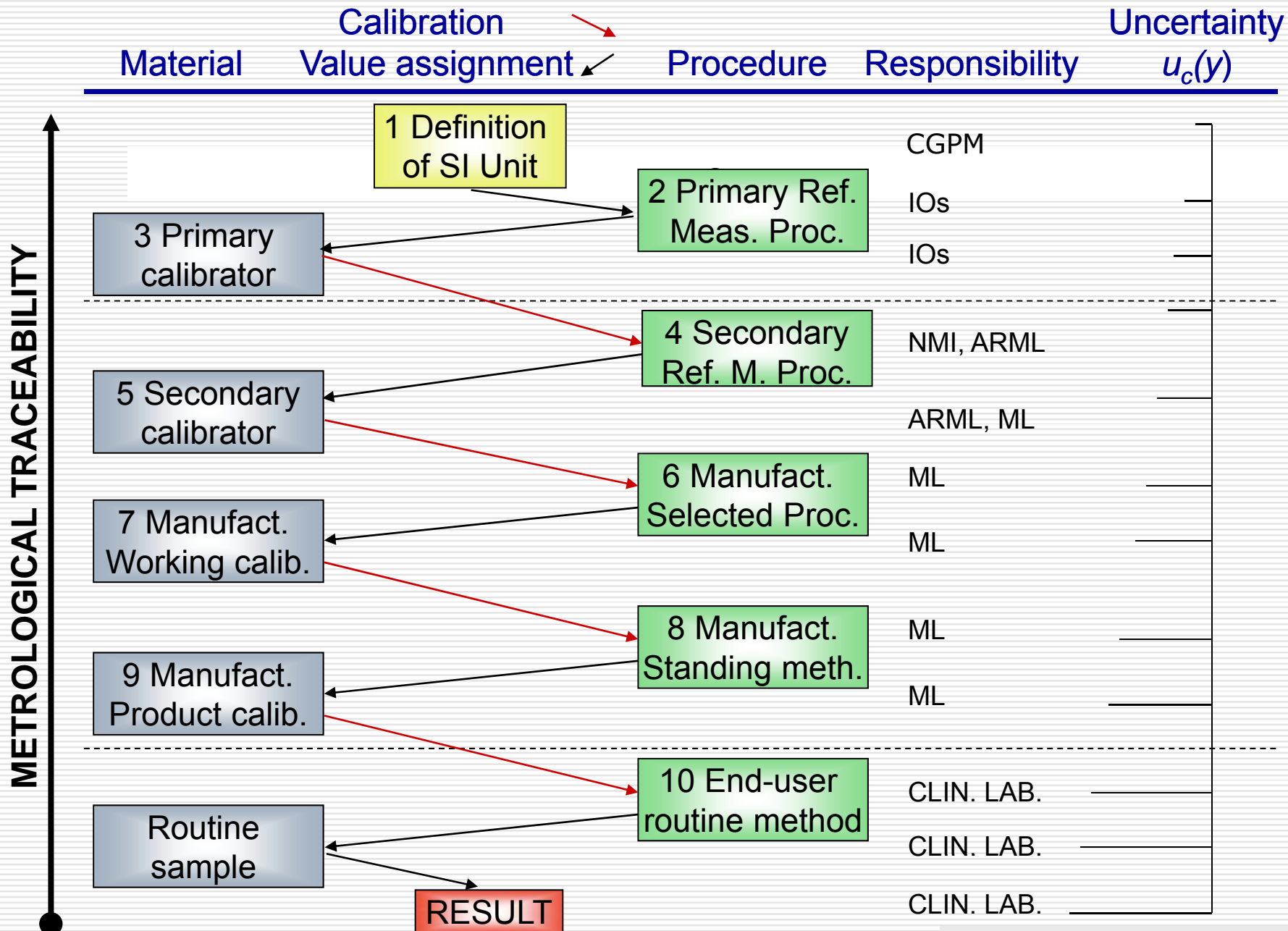


# Referenční materiály v počínající éře proteomiky

---

Bedřich Friedecký  
ÚKBD FN,LF Hradec Králové  
SEKK s.r.o Pardubice



# Kompletní reference- záruka pravdivosti

	<b>Reference Method</b>	<b>Ref. Material</b>
<b>AST</b>	<b>Clin Chem Lab Med 2002;40:725-33</b>	<b>IRMM/IFCC 457</b>
<b>ALT</b>	<b>Clin Chem Lab Med 2002;40:718-24</b>	<b>IRMM/IFCC 454</b>
<b>γGT</b>	<b>Clin Chem Lab Med 2002;40:734-38</b>	<b>IRMM/IFCC 452</b>
<b>LDH</b>	<b>Clin Chem Lab Med 2002;40:643-48</b>	<b>IRMM/IFCC 453</b>
<b>CK</b>	<b>Clin Chem Lab Med 2002;40:635-42</b>	<b>IRMM/IFCC 455</b>
<b>AMY</b>	<b>Clin Chem Lab Med 2006;44:1146-55</b>	<b>IRMM/IFCC 456</b>

# Bias měření katalytických koncentrací enzymů

---

## □ Studie referenčních intervalů

ALT 0,6-4,8%

AST 0,7-2,5%

GGT 0,5-4,8%

## □ Výsledky EHK referenčních laboratoří RELA IFCC

Interval bias pro všechny standardizované enzymy  $\pm 5,25\%$

---

# RELA-IFCC

---

- Externí hodnocení kvality referenčních laboratoří
  - Poskytuje přehled o aktuálním stavu pravdivosti(bias) měření u řady analytů
-

# Návaznost, srovnatelnost a kompatibilita (VIM-3)

---

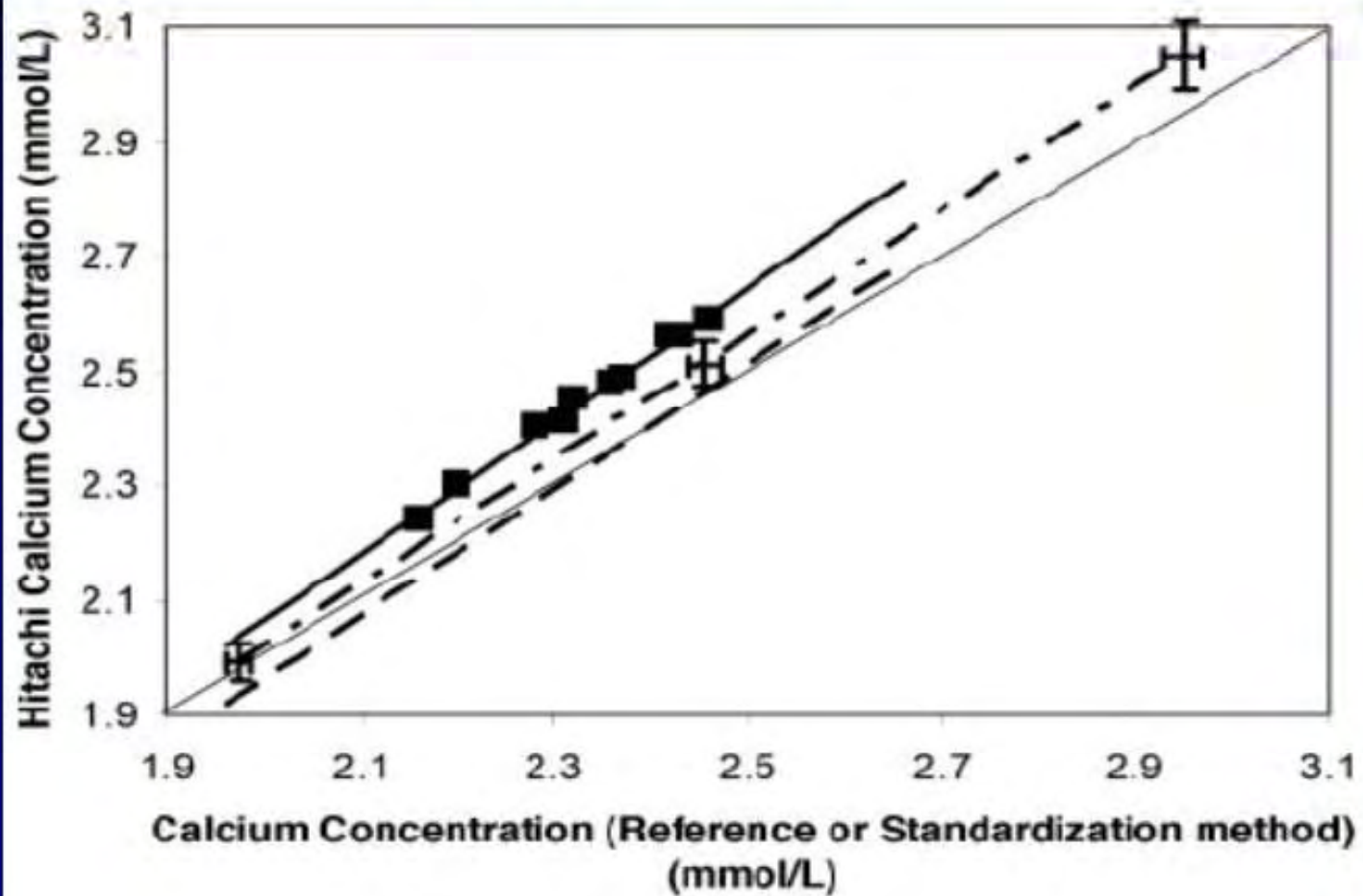
- **Návaznost** znamená, výsledek je odvozen od reference nepřerušným řetězcem kalibrací odvozené od stejné reference
  - **Srovnatelnost** je dána návazností k stejné referenci. Výsledky se mohou číselně lišit, ale jen do přepočtu na stejnou jednotku (HbA1c NGSP vs IFCC)
  - **Kompatibilita** značí, že difference výsledků různých metod jsou v rámci nejistot těchto diferencí
-

# Bezpečnost pacienta a referenční materiály

---

- ❑ Návaznost zajišťuje kompatibilitu výsledků
  - ❑ Zaručuje, že různé metody poskytnou srovnatelnou informaci o diagnostice a terapii (nevýznamně rozdílné referenční intervaly a /nebo rozhodovací limity, prediktivní hodnoty)
-

# Změna hodnoty kalibrátoru *Clin Chem 2006*





# Náhlá změna hodnoty kalibrátoru(Ca)

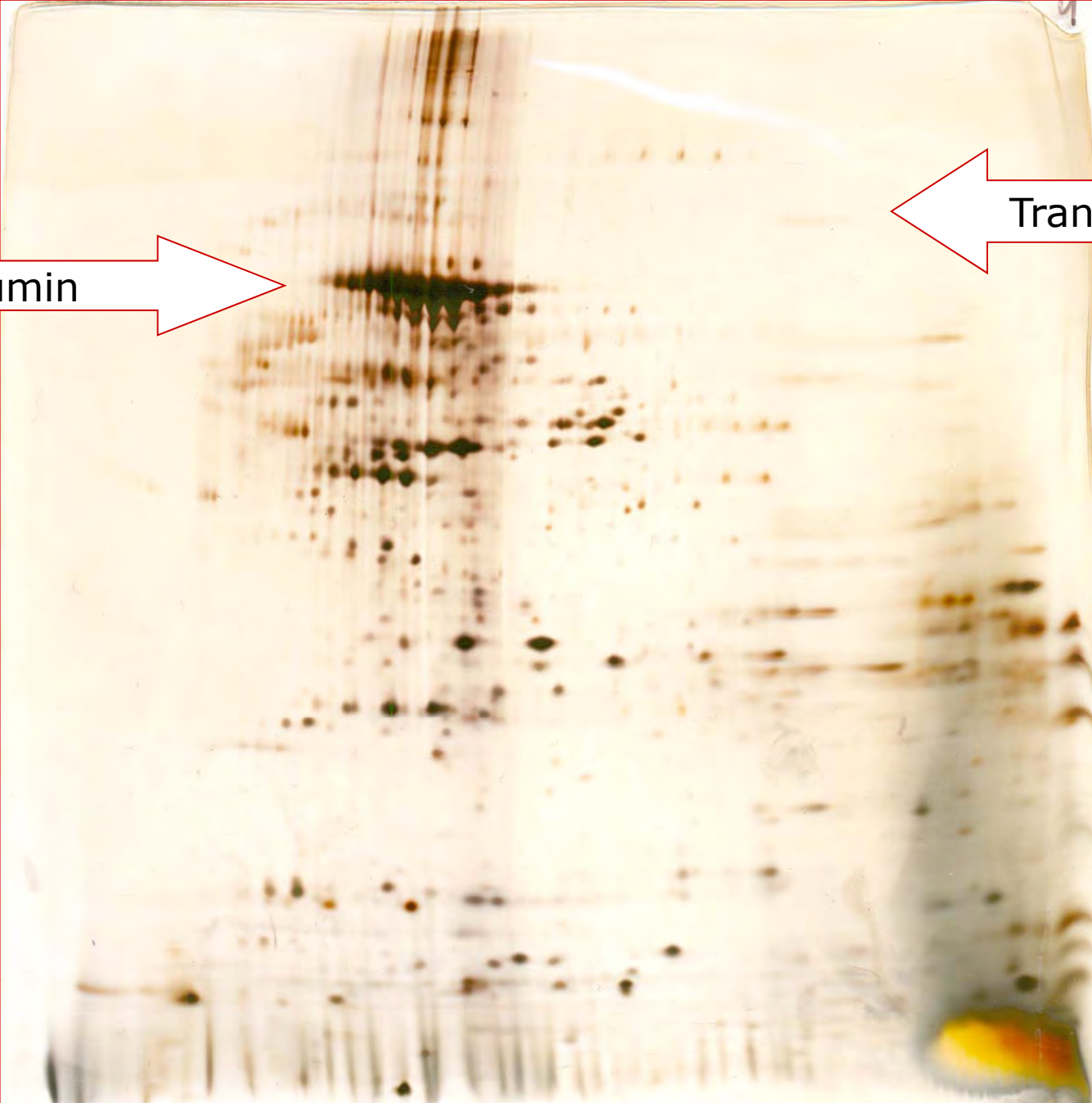
---

- 0,11 mmol/l
  - Podle studie NIST (Report-04 Mayo clinic ,2004) má bias **0,1 mmol/l** u Ca za následek diagnostické pochybnosti u 3,5 milionů pacientů
  - To představovalo před 5 lety 150 mil. USD dodatečných nákladů
-

# Celkový bilirubin 2009-pozdní návaznost a nekomutabilita

---

- V roce 2009 změna hodnot pracovních kalibrátorů s následkem cca 20% změny dosavadních hodnot
  - Odůvodněno rekalibrací pracovního kalibrátoru na referenci. Publikováno v září 2009
  - Reference (Doumasova metoda a SRM 916) existuje již 25-30 let
-



Albumin

Transferrin

# Cholesterol v EHK RELA. Diference mezi dvěma referenčními metodami

---

- Od roku 2004 do 2008 narostla diference mezi dvěma referenčními metodami (LC-MS a Abell) z 2 na 5,7%
  - Požadovaná hodnota bias je 3(4)%
-

# Albumin v séru. Změna primárního kalibrátoru

---

- ❑ Změna primární kalibrace výrobce z HSA na ERM DA 470 má údajně způsobit posun výsledků BCG metody o 8-9%(pacienti) a 12-14%(EHK!?)
  - ❑ U metody BCP je tento posuv -12 až +4% u dvou různých výrobních šarží
  - ❑ Požadovaná hodnota bias je 1,3 %
-

# Analytická nespecifičnost - limit kompatibility.Kreatinin/eGFR

---

□ Hodnota rozhodovacího limitu eGFR 1,0  
ml/s/1,73m<sup>2</sup>

□ Při použití Jaffého metody(n=81laboratoří) se získá interval eGFR

**0,76-0,88(průměr± SD)**

□ Při použití specifičtější enzymové metody(n=17 laboratoří) pro  
stejného pacienta

**0,85-1,11(průměr± SD)**

---

# Definice analytu-základní podmínka reference

---

- ❑ Obtížná definice složitých proteinů
  - ❑ Špatně definovaný referenční materiál není dostatečným ztělesněním jednotky měření a
  - ❑ Výsledek není pravdivý
  - ❑ Pokrok proteomiky však dovoluje definovat rychle a spolehlivě i složité proteiny
-

# Neúplná definice troponinů- různá klasifikace ACS(2008)

---

- ❑ 8 nejfrekventovanějších metod měření cTnI a cTnT
  - ❑ **54-78%** výsledků nad rozhodovací limit(tedy podporujících diagnosu ACS)
  - ❑ *Není zde ještě bráno v úvahu "ultrasensitivní" stanovení cTnT*
-



# hCG – analyt nedostatečně definovaný

---

- Šest isoforem a jeden referenční materiál
- Z 16 metod, používaných v EHK NEQAS rozpoznává prakticky každá jiné izoformy a jinak
- Výsledkem je interval výtěžnosti pro komerční kity

109-164%

---

# Řešení ?

---

- ❑ Nalézt kalibrátor, reprezentující v ekvimolárním poměru všechny isoformy
  - ❑ Použít specifitější metody
  - ❑ Druhé řešení přináší stále naléhavěji na scénu hmotnostní spektrometrii
-

# 25-OH vitamin D-analytický a klinický hit bez reference

---

- ❑ Odkrytí klíčového významu vitaminu D odkrylo i analytické nedostatky jeho měření
  - ❑ Požadavky na vyšetření narostly raketově( v 50% USA laboratoři za rok o více, než 50%)
  - ❑ Velká očekávání, kontroversní výsledky
-

# Analyt-mediální hvězda

---

- ❑ V programech CAP a DEQAS neúměrné difference mezi metodami
  - ❑ V článku v New York Times (6.1.2009) podezření, že laboratoře nedodržují správné pracovní postupy
  - ❑ V předchozích 20 letech výsledky EHK v „pohodě“ (hodnocení po skupinách)
  - ❑ Rychlé a masivní nasazení metody LC-MS/MS bez očekávaného úspěchu
  - ❑ Co se měří a požaduje? D2, D3, D2+D3????
-

# Řešení??? Reference!!!

---

- ❑ Efekt jednotné kalibrace byl nedávno bezpečně prokázán
  - ❑ Rychlý vývoj NIST SRM 972
  - ❑ Velmi očekávaná referenční metoda na principu LC-MS/MS
-

# Proteomika

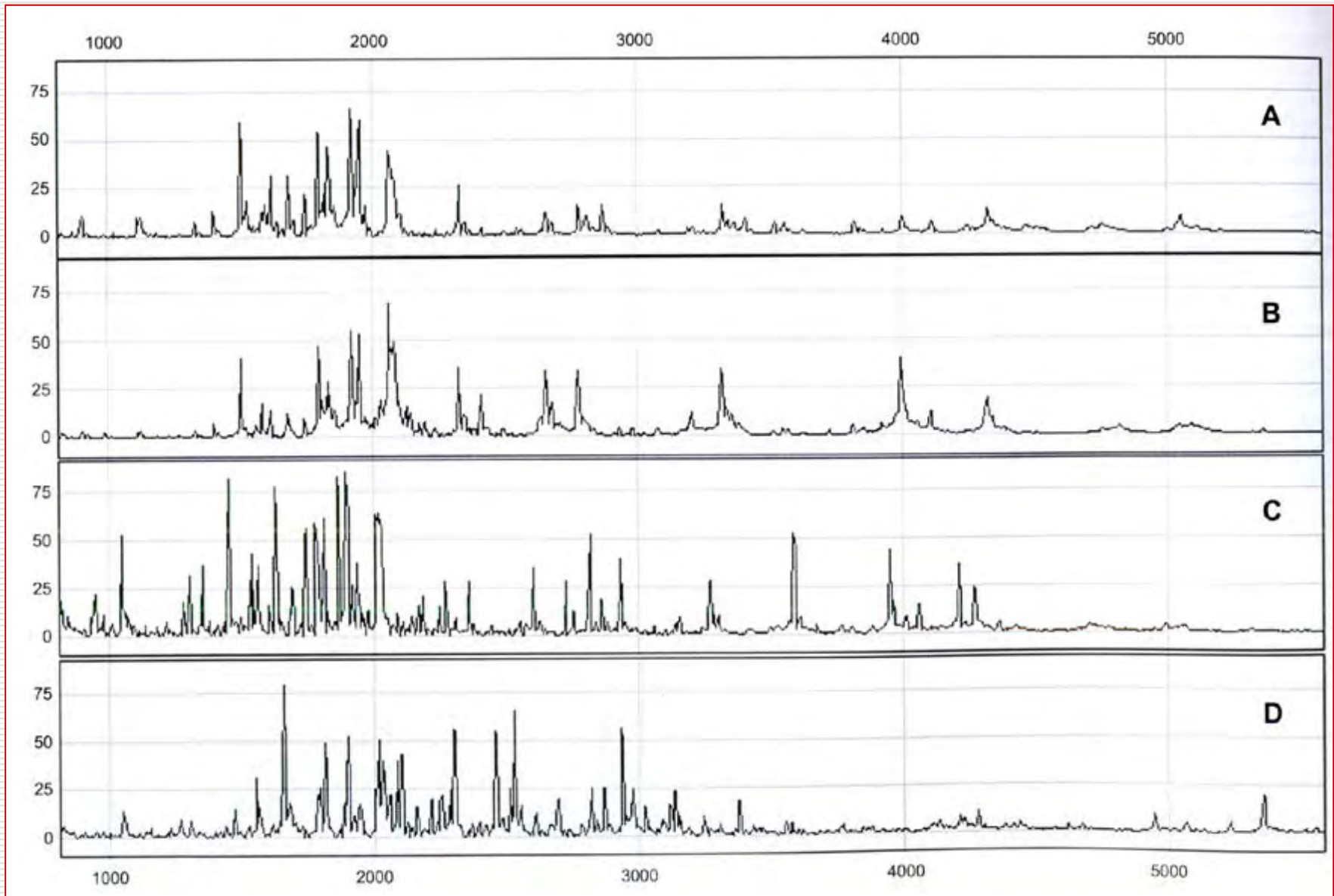
---

- Proteom-soubor geneticky exprimovaných a posttranslačně modifikovaných proteinů
  - Možnost stanovení fmolových koncentrací(25-50 buněk)
  - Možnost účinné úpravy vzorku před vlastní analýzou na mikročipech( afinitní chromatografie s použitím protilátek, solí kovů a pod.)
  - Použití tryptické digesce
-

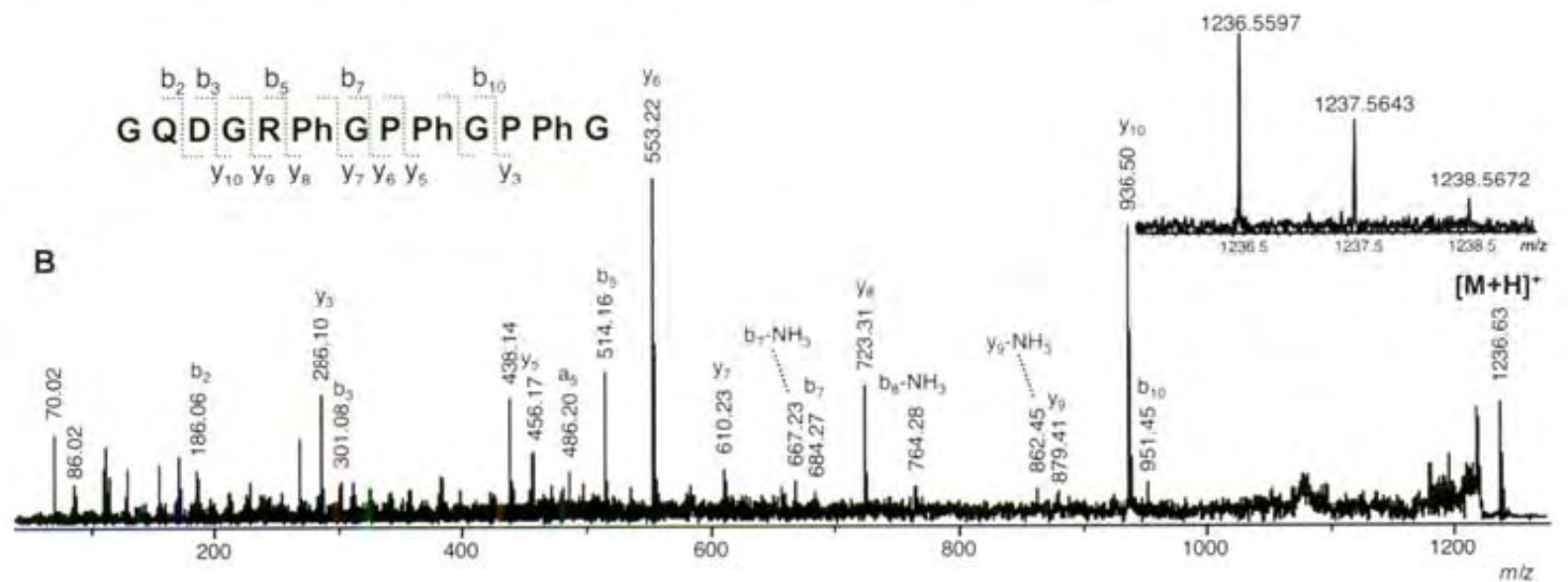
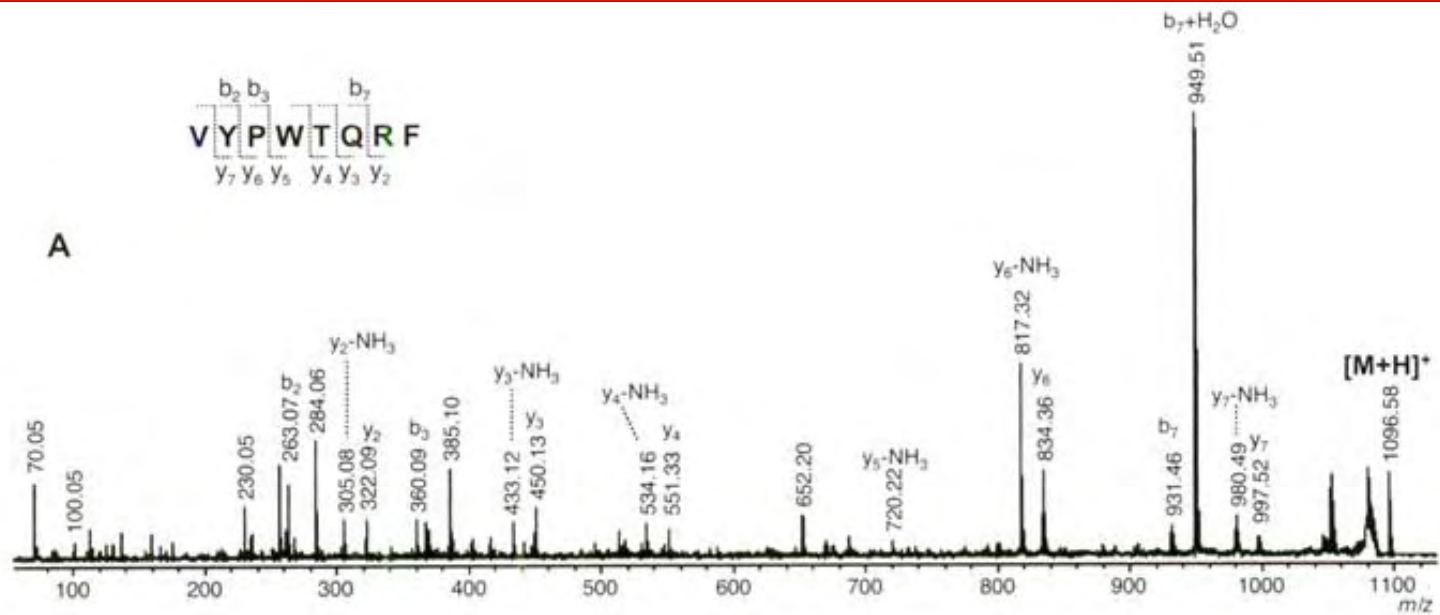
# Metody

---

- Analýzy jednotlivých komponent
  - Multiplexní analýzy
  - Analýzy proteinových profilů(fingerprintů)
  - Možnost kvantifikace SID(diluce stabilními isotopy)
- 
- LC-MS/MS
  - MALDI(SELDI)-TOF-MS
-







# Reference

---

- Srovnání profilů u jedinců bez specifické choroby a s ní
  - Srovnání experimentálních spekter s teoretickými (počítačově)
  - Hodnoty  $m/z$  lze určit s přesností 0,1-0,3%
  - Tyto hodnoty mohou velmi přesně definovat stanovenou proteinovou/peptidovou složku
-

# Perspektivy

---

- Velmi efektivní získávání biomarkerů (dosavadní metody potřebují k získání jednoho biomarkeru několik let času a několik set milionů USD)
  - **Vytvoření referenční báze pro měření proteinů na podkladě produkce dobře definovaných hodnotami m/z a rychle i efektivně validovaných peptidů**
-

# Závěr

---

- ❑ Realizace návaznosti na referenci(rekalibrace) měření jednoduchých analytů s dobře známou strukturou probíhá pomalu, nekoordinovaně a často bez potřebných informací v protokolech výrobců
  - ❑ Realizace referenčních systémů měření proteinů není dosažitelná imunochemickými metodami a závisí na rozvoji metod proteomiky
-