The Journal Of The International Federation Of Clinical Chemistry And Laboratory Medicine
eJIFCC

Systemy referencyjne w enzymologii klinicznej

Lothar Siekmann, Wydział Biochemii Klinicznej Uniwersytetu w Bonn, Niemcy

Reference Systems in Clinical Enzymology, Siekmann L, eJIFCC vol 13 no 3:
http://www.ifcc.org/ejifcc/vol13no3/130301002.htm

Na Konferencji Plenarnej IFCC w Sevilli, Hiszpania (marzec 1998) podjęto decyzję o stworzeniu globalnego systemu referencyjnego dla pomiarów stężenia katalitycznego enzymów, obejmującą następujące elementy:

- **Referencyjne procedury pomiarowe**. Istniejące metody referencyjne IFCC dla 30 °C zostaną użyte jako podstawa stworzenia zespołu standardowych procedur wykonania (standard operating procedures - SOPs) dla temperatury reakcji w 37 °C.
- **Sieć laboratoriów referencyjnych**. Zostanie wyselekcjonowana grupa laboratoriów referencyjnych (łącznie z laboratoriami producentów) w celu dostarczenia niezbędnej wiedzy i sprzętu do przeprowadzenia pomiarów według referencyjnych procedur pomiarowych (SOPs) na wysokim poziomie metrologicznym.
- **Materiały referencyjne**. Istniejące materiały referencyjne BCR zostaną ponownie certyfikowane przez sieć laboratoriów referencyjnych, zgodnie z umową o współpracy pomiędzy IFCC a IRMM. Dla niektórych enzymów (AST, amylaza, lipaza) konieczne będzie ustalenie i certyfikowanie nowych materiałów referencyjnych.

Wprowadzając takie systemy referencyjne kierujemy się pojęciem źródłowej zgodności pomiarowej (measurement traceability), która została ustanowiona w metrologii ogólnej, a obecnie wprowadzana jest również do analiz w chemii klinicznej. Zgodność źródłowa (Traceability) stanowi prawdopodobnie najważniejszą strategię zmierzającą do osiągnięcia standaryzacji w medycynie laboratoryjnej, której celem są porównywalne wyniki pomiarów bez względu na metodę, procedurę pomiarową (zestaw testowy) oraz laboratorium, w którym wykonywane są analizy.

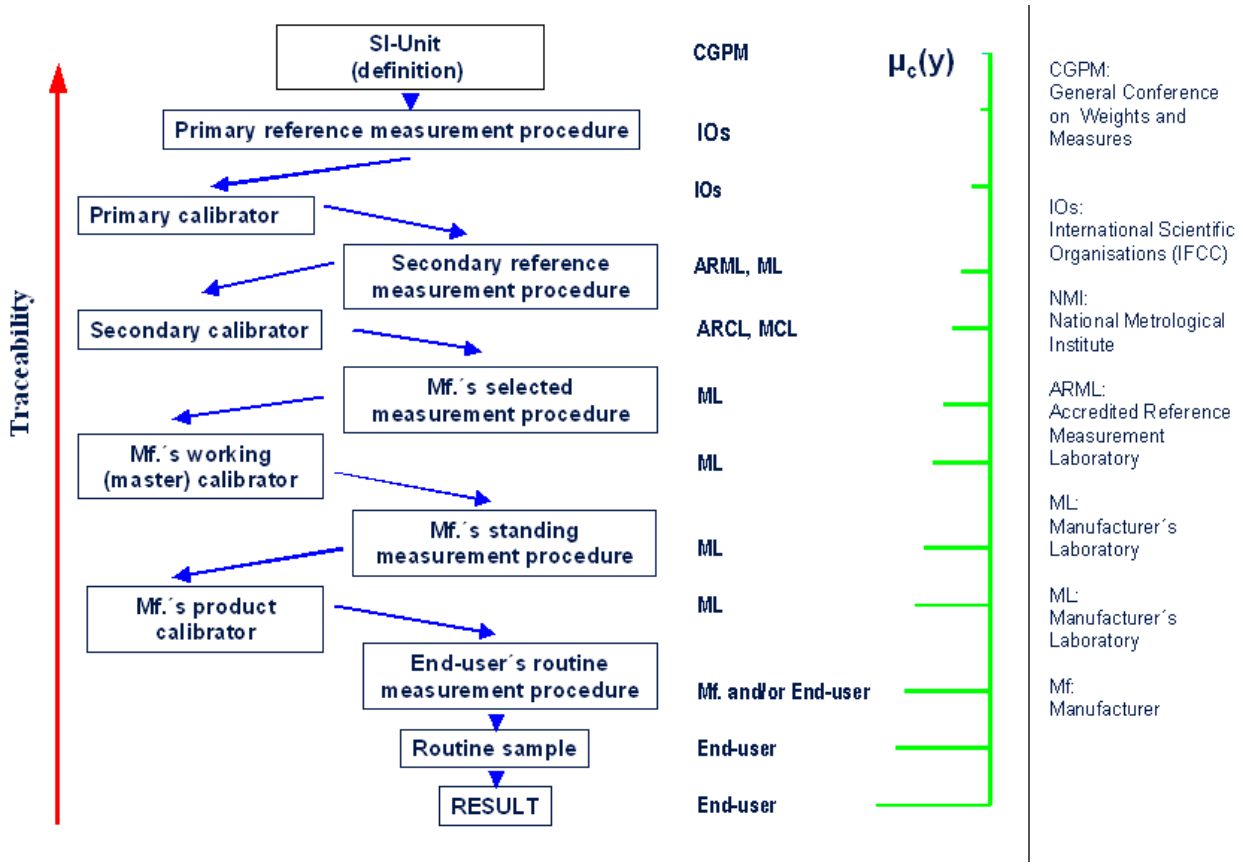
W konsekwencji, Dyrektywa Unii Europejskiej o diagnostyce in vitro [1] zastrzega, że wartości przypisywane kalibratorom i materiałom kontrolnym muszą być zgodne źródłowo (traceable) z materiałami referencyjnymi i/lub metodami referencyjnymi wyższego poziomu metrologicznego.

Ponadto, Komisja Europejska narzuca standardy zgodności źródłowej dla wartości przypisywanych kalibratorom i materiałom kontrolnym w ogólnej medycynie laboratoryjnej [2] jak i w specyficznej sferze pomiarów stężeń katalitycznych enzymów [3].

Według Słownictwa w Metrologii (Vocabulary in Metrology - VIM) [4] i Przewodnika Wyrażania Niepewności Pomiaru (Guide to the Expression of Uncertainty in Metrology - GUM) [5], źródłowa zgodność pomiarowa (measurement traceability) definiowana jest jako:

właściwość wyniku pomiaru lub wartość standardu, poprzez którą może on być odniesiony do podanych źródeł referencyjnych, zazwyczaj standardów krajowych lub międzynarodowych poprzez nieprzerwany łańcuch porównań, z których każde posiada podane niepewności. Zgodność źródłowa wartości przypisanej rutynowej próbie badanej, kalibratorowi czy materiałowi kontrolnemu jest ustanawiana poprzez serię pomiarów porównawczych przy użyciu procedur pomiarowych i materiałów referencyjnych w łańcuchu o rosnącym porządku hierarchicznym, jak pokazano na **Rys.1**. Ponieważ każde ogniwo łańcucha zgodności źródłowej (traceability chain) przyczynia się do niepewności wyniku, zaleca się omijanie tak wielu etapów jak to jest możliwe. W kategoriach metrologii idealne byłoby pominięcie wszystkich etapów pośrednich w łańcuchu

zgodności źródłowej (traceability chain) i dokonywanie pomiaru rutynowej próby badanej poprzez bezpośrednie zastosowanie pierwotnej procedury referencyjnej; to, oczywiście, nie jest wykonalne.



Rys. 1

Nieuniknionym warunkiem wstępnym ustanowienia zgodnych źródłowo (traceable) wyników dla kalibratorów i materiałów kontrolnych jest specyficzność zastosowanych procedur pomiarowych. Wyniki pomiaru nie mogą być zgodne źródłowo (traceable) jeżeli zastosowana procedura wykrywa częściowo składniki, które nie są zgodne z definicją wielkości mierzonej. Ponieważ dotyczy to pomiaru stężenia aktywności katalitycznej enzymów, konieczne jest, aby procedury rutynowe i niższego rzędu wykazywały podobną selektywność w odniesieniu do poszczególnych izoenzymów i form molekularnych.

Cały łańcuch zgodności źródłowej (traceability chain) ma zastosowanie jedynie dla tych ilości mierzalnych, które mogą mieć wartość wyrażoną w jednostkach SI. Jeżeli pierwotne lub wtórne kalibratory nie są dostępne, łańcuch zgodności źródłowej (traceability chain) dla wielu wartości mierzonych w medycynie laboratoryjnej kończy się na niższym poziomie, np. regulaminowej procedurze pomiarowej producenta. Powstaje pytanie czy wyniki pomiarów stężenia katalitycznego enzymów mogą być zgodne źródłowo (traceable) z jednostkami SI czy jedynie z niższym poziomem w hierarchii łańcucha zgodności źródłowej (hierarchical traceability chain).

Na pierwszy rzut oka, sytuacja wydaje się trudniejsza w przypadku enzymów niż innych wielkości takich, jak elektrolity czy metabolity, np. cholesterol, który może oczywiście zostać opisany w jednostkach SI 'mol na litr'. W przeciwieństwie do nich, wyniki stężeń katalitycznych enzymów są porównywalne jedynie wtedy, kiedy aktywność enzymów mierzona jest w takich samych warunkach.

Tym samym, wartość mierzona enzymu nie może być opisana jedynie przez swoją nazwę, rodzaj wielkości i środowisko, np. 'stężenie aktywności katalitycznej kinazy kreatynowej w surowicy ludzkiej', ale jej definicja wymaga również specyficznej procedury pomiarowej. Chociaż w enzymologii klinicznej używa się na ogół skróconej nazwy analitu enzymu, np. 'kinaza kreatynowa', wartość mierzona jest w rzeczywistości definiowana jako "aktywność katalityczna enzymu mierzona jako szybkość reakcji substancji wskazującej (indicator substance) w specyficznym środowisku zgodnie z daną procedurą pomiarową", np. "aktywność katalityczna kinazy kreatynowej mierzona jako szybkość konwersji NADH w procedurze referencyjnej IFCC".

Z zasady, ta zależność od procedury nie jest unikalna dla pomiaru stężenia katalitycznego enzymów, ale odnosi się również do znacznie prostszych wielkości. Na przykład, pomiar długości pręta z żelaza wymaga opisu warunków pomiaru, przynajmniej rzeczywistej temperatury, albo pomiar cholesterolu całkowitego w surowicy wymaga stwierdzenia stopnia hydrolizy.

W hierarchicznym systemie procedur i materiałów referencyjnych, referencyjne procedury pomiaru enzymów IFCC utworzą najwyższy poziom metrologiczny i tym samym stanowić będą definicje odpowiednich wielkości mierzonych. Zgodnie z prawodawstwem międzynarodowym (dyrektywa EU-IVD) [1] i standardami międzynarodowymi (ISO, CEN) [2, 3], wartości przypisywane kalibratorom i wynikom pomiarów niższego poziomu metrologicznego, łącznie z tymi używanymi w codziennej rutynowej praktyce powinny być zgodne źródłowo (traceable) z najwyższym poziomem referencyjnym procedur pomiarowych i jednostkami SI (Rys. 1).

Jednolita jednostka pomiaru SI "mol na sekundę na metr sześcienny", wyrażona jako: mol s-1 m-3 [lub (mol/s)/m3], zwana także 'katalem na metr sześcienny', wyrażona jako: kat m-3 (lub kat/m3), będzie stanowić poziom najwyższy każdej hierarchii kalibracyjnej dla stężenia katalitycznego enzymu [3].

Zgodnie ze standardem 'Metrologicznej Zgodności Źródłowej Wartości Stężeń Katalitycznych Enzymów Przypisywanych Kalibratorom i Materiałom Kontrolnym' [3] wartości mierzone enzymów definiowane są przez pierwotne procedury referencyjne. Procedury te muszą być przestrzegane we wszystkich szczegółach, np. rodzaj substratu i jego stężenie, składniki bufora, wartość pH, efektory i ich stężenia, kierunek katalizowanej reakcji, składniki reagentu, temperatura, czas inkubacji, czas opóźnienia, czas pomiaru, długość fali.[1]

W konsekwencji, pierwszym celem komisji enzymatycznej IFCC i grupy specjalistycznych laboratoriów przy wprowadzaniu systemu referencyjnego była decyzja co do pierwotnych procedur pomiarowych.

Nowe procedury IFCC dla 37°C oparte są na istniejących, zalecanych dotychczas przez IFCC metodach dla 30°C [6, 7, 8, 9, 10, 11]. Warunki pomiaru zostały dalej zoptymalizowane w odniesieniu do stężenia substratu, pH, stężenia buforu, czasu opóźnienia i okresu czasu odczytu. Było to konieczne przynajmniej do pewnego stopnia z powodu zmiany temperatury. Warunki pomiaru opisane są w każdym szczególe w formie standardowych procedur wykonania.

Pierwotne referencyjne procedury pomiaru IFCC dla ALT, AST, amylazy, CK, GGT i LD są obecnie przygotowywane do publikacji. Ustalenie procedur dla AP, lipazy i CHE jest w fazie projektów.

Procedury pomiarowe ustalone zostały przez sieć laboratoriów. Aktualni członkowie tej sieci wymienieni są w Tabeli 1.

Tabela 1: Aktualni członkowie sieci referencyjnych laboratoriów enzymatycznych			
Dr. F. Ceriotti	Istituto Scientifico San Raffaele	Milano	Italy
Dr. G. Ehlers	Ortho - Clinical Diagnostics	Rochester	U.S.A.
Prof. G.Ferard/ Dr. Lessinger	Centre Traumatologie et Orthopedie	Illkirch Grafenstaden	France
Dr. F. H. Franck	Ziekenhuis Leyenburg	Den Haag	The Netherlands
Prof. J. Gella	**Biosystems S.A.**	**Barcelone**	**Spain** [2]
Prof. W. Hölzel	Roche - Boehringer Mannheim GmbH	Tutzing	Germany
Dr. P. Joergensen	Dept. of Clinical Chemistry	Odense	Denmark
Prof. T. Kanno	Hamamatsu University Hospital	Hamamatsu	Japan
Dr. A. Kessner	Beckman -Coulter, Inc.	Brea, CA	U.S.A.
Dr. M. Panteghini	1 Laboratory of Clinical Chemistry	Brescia	Italy
Dr. F. Schiele	Centre du Medecine Preventive	Nancy	France
PD Dr. G. Schumann	Med. Hochschule Hannover	Hannover	Germany
Dr. A. Vialle	Hopital Debrousse	Lyon	France
Dr. G. Weidemann	Klinikum der Stadt Nürnberg	Nürnberg	Germany
Dr. K.Yoshinari	ASAHI Chemical Industry Co.,Ltd.	Tokyo	Japan

Każde laboratorium sieci wyraziło zgodę na przestrzeganie rygorystycznych zasad metrologicznych:

Skalibrowane ilości testowe zostały użyte we wszystkich etapach grawimetrycznych; do pomiaru i dozowania objętości użyto sprzętu skalibrowanego grawimetrycznie; do ustalenia temperatury i pH zastosowano

[1] Wytłuszczenie własne.
[2] Wytłuszczenie własne.

skalibrowane przyrządy o znanych niepewnościach. Do testowania ustawień długości fali oraz absorbancji fotometrycznej sprzętu fotometrycznego, użyto filtrów i/lub roztworów testowych certyfikowanych przez narodowy instytut metrologiczny.

Wszystkie znaczące dane mające wpływ na ogólną niepewność końcowych wyników musiały być zgłoszone koordynatorowi sieci.

Ostatecznie grupa specjalistycznych laboratoriów (Tabela 1) certyfikowała, we współpracy z Instytutem Materiałów i Metod Referencyjnych Unii Europejskiej (IRMM), roztwory enzymów, które poprzednio zostały certyfikowane przez różne procedury pomiarowe, najczęściej w 30°C.

W przypadku materiału referencyjnego BCR dla ALT, procedura certyfikacji skutkowała bardzo małym, 95% przedziałem pewności pomiaru, który był rzędu +/- 1% w grupie 12 laboratoriów. Taki mały przedział okazał się szczególnie zadowalający w porównaniu z poprzednimi procedurami certyfikacji używającymi tego samego materiału, a także w porównaniu z paroma próbnymi eksperymentami przy użyciu komercyjnych materiałów kontrolnych, przeprowadzonymi przed badaniami certyfikującymi (Rys. 2).

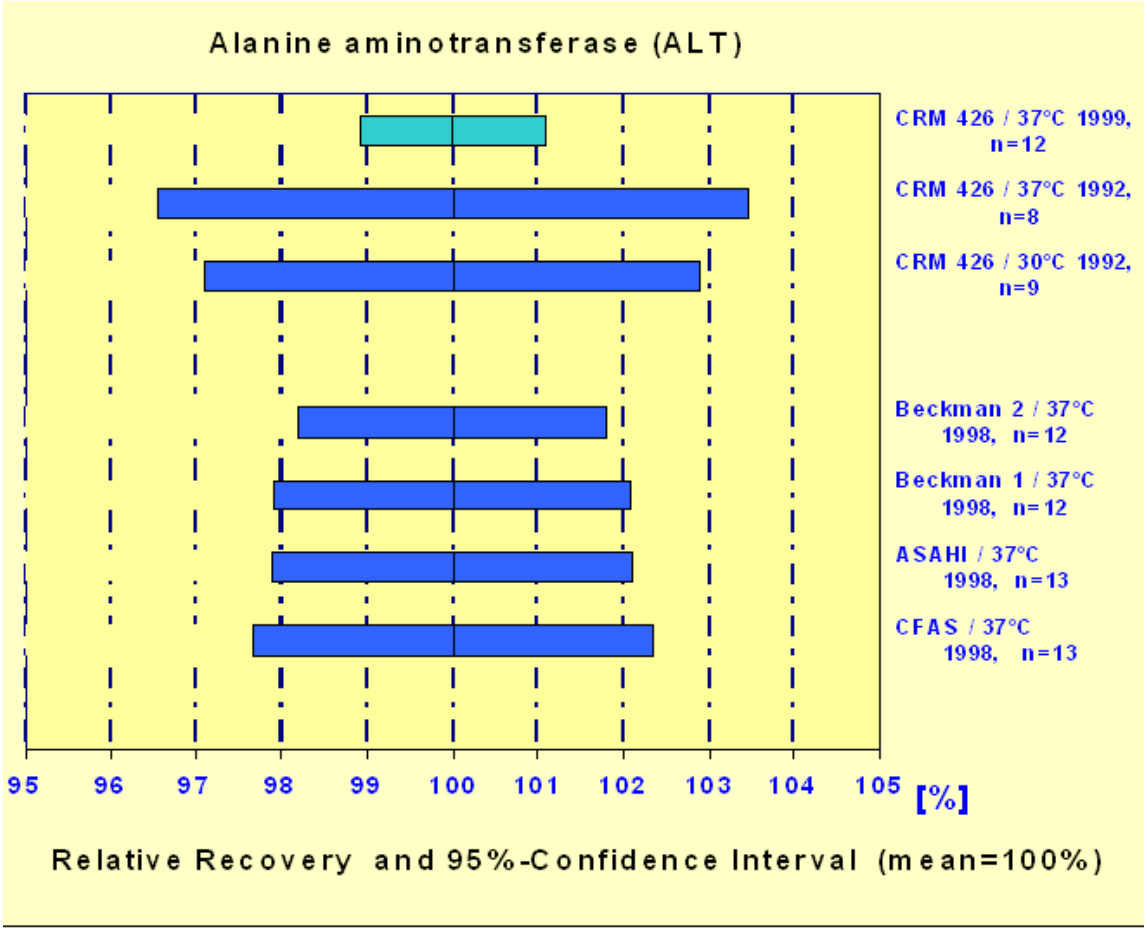


Fig. 2

Certyfikacja materiału referencyjnego IRMM-BCR CRM 426 i różnych materiałów kontrolnych dla ALT.
95% przedziały pewności uzyskane przez różne laboratoria w procesie certyfikacji.
Górny pasek: Certyfikacja CRM 426 przez nową procedurę referencyjną IFCC dla 37°C (12 lab.).
Drugi pasek: Certyfikacja CRM 426 przez poprzednią procedurę referencyjną IFCC dla 37°C (8 lab.).
Trzeci pasek: Certyfikacja CRM 426 przez poprzednią procedurę referencyjną dla 30°C (9 lab.).
Paski od czwartego do siódmego: Pomiary różnych materiałów kontrolnych przez nową procedurę referencyjną dla 37°C w próbnym eksperymencie podczas certyfikacji materiału referencyjnego BCR (12 lab.).

Było to równie zgodne przy certyfikacji substancji referencyjnej dla LD i materiału referencyjnego BCR dla CK.

Również przy certyfikacji materiału referencyjnego BCR dla GGT rozrzut wyników uzyskanych przez 12 laboratoriów w kategoriach 95% przedziału pewności był poniżej +/- 1.5%.

Należy nadmienić, że także materiał referencyjny BCR dla amylazy został niedawno certyfikowany z równie dobrymi rezultatami.

Ta bardzo zadowalająca zgodność wyników uzyskana w różnych laboratoriach referencyjnych wskazuje na:

- po pierwsze, dobre funkcjonowanie sieci laboratoriów od Dalekiego Wschodu (Japonia) po daleki Zachód (Kalifornia), łącznie z laboratoriami uniwersyteckimi, klinicznymi i laboratoriami producentów,
- a po drugie, wysoki poziom postępu i dokładny opis procedur pomiarowych, co zostało uzyskane dzięki wkładowi pracy członków sieci laboratoriów referencyjnych.

Jak tylko pierwotne procedury pomiarowe IFCC zostaną opublikowane po tajnym głosowaniu wśród członków IFCC (mając nadzieję, że nastąpi to w przeciągu paru następnych miesięcy), pełny system referencyjny obejmujący procedury referencyjne, laboratoria i materiały referencyjne zostanie udostępniony. Następnie, **wymóg zgodności źródłowej (traceability) w rozumieniu dyrektywy IVD Unii Europejskiej i standardów CEN/ISO, będzie musiał być wprowadzony nie tylko przez producentów opracowujących komercyjne zestawy testowe i kalibratory do pomiarów stężenia katalitycznego enzymów, ale również przez organizatorów zewnętrznych programów badania jakości przy przypisywaniu wartości docelowych dla ich materiałów kontrolnych rozsyłanych do uczestniczących w programie laboratoriów**[3].

Podsumowując, można stwierdzić, że ustalony został system referencyjny dla pomiaru stężenia katalitycznego enzymów, który może również służyć jako wzór dla innych grup wielkości, które mają być standaryzowane w kategoriach zgodności źródłowej.

Bibliografia

1. Directive 98/79/EC of the European Parliament and the Council of 27 October 1998 on In Vitro Diagnostic Medical Devices.
2. prEN ISO 17511, In vitro diagnostic medical devices - Measurement of quantities in samples of biological origin - Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials.
3. prEN ISO 18153, In vitro diagnostic medical devices - Measurement of quantities in samples of biological origin - Metrological traceability of values for catalytic concentration of enzymes assigned to calibrators and control materials.
4. International vocabulary of basic and general terms in metrology, 2nd edition, ISO, Geneva, 1993.
5. Guide to the expression of uncertainty in measurement, 1st edition, ISO, Geneva, 1995.
6. Bergmeyer HU, Hørder M, Rej R. Approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase (L-aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.1). J Clin Chem Clin Biochem 1986;24: 497-510.
7. Bergmeyer HU, Hørder M, Rej R. Approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3. IFCC method for alanine aminotransferase (L-alanine:2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.2). J Clin Chem Clin Biochem 1986;24:481-95.
8. Shaw LM, Strømme JH, London JL, Theodorsen L. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 4. IFCC method for ?-glutamyltransferase [(?-glutamyl)-peptide:amino acid ?-glutamyltransferase, EC 2.3.2.2). J Clin Chem Clin Biochem 1983;21:633-46.
9. Hørder M, Elser RC, Gerhardt W, Mathieu M, Sampson EJ. Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 7. IFCC method for creatine kinase (ATP:creatine N-phosphotransferase, EC 2.7.3.2). J Clin Chem Clin Biochem 1991; 29:435-56. JIFCC 1989;1(3):130-9; JIFCC 1990;2(1):26-35; JIFCC 1990;2(2):80-3.
10. Bais R, Philcox M. Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 8. IFCC method for lactate dehydrogenase (L-lactate:NAD+ oxidoreductase, EC 1.1.1.27). Eur J Clin Chem Clin Biochem 1994,32:639-55.
11. Lorentz K. Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 9. IFCC method for a-amylase (1,4-a-D-glucan 4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1). Clin Chem Lab Med 1998,36:185-203.

[3] Wytłuszczenie własne.