

Poznámky autora ke zveřejněným textům

Ing. Pavel Sedlák, prosinec 2019

V závěru roku jsem byl požádán kolegy ze SEKK, abych jako autor provedl aktualizaci dvou textů publikovaných již před lety v oddíle **Infoservis** a posoudil, zda informace jsou stále platné, aktuální a informačně přínosné vzhledem nemalému posunu oboru za dobu mezi vznikem článků (rok 2002) a současností. Zadání se ukázalo jako velice inspirativní impuls k ohlédnutí za stavem harmonizace stanovení enzymů na mezinárodní úrovni. Co se povedlo a co se bohužel dodnes nepovedlo. Už zaměření obou textů, jeden k problematice kalibrace a stanovení ALP, druhý identicky k α -AMS, přímo srovnáním vybízelo ke komentáři. Shodný záměr, stejný cíl, obdobná konstrukce reference i hierarchie návaznosti, ale dosažené výsledky i po několika letech rozdílné. O osobní komentář se tímto pokusím.

Kalibrace katalytických koncentrací enzymových aktivit (ALP)

Prezentovaný text *Kalibrace katalytických koncentrací enzymových aktivit rutinních enzymů v klinické biochemii pomocí primárních standardních roztoků na autoanalyzátoch (s příkladem pro ALP)* má ve své obecné a teoretické části stálou platnost a nic se s časem nemění. V praktické a instruktážní části realizace kalibrace byl použit příklad metodického postupu stanovení katalytické koncentrace ALP s (MEG) N-metyl-D-glukamin pufrem (DGKC "new 94"), jako původní kandidát na připravovanou standardizaci IFCC. Dnes je již standardizace prezentována jiným metodickým postupem s pufrem (AMP) 2-amino-2-metyl-1-propanolem (IFCC 2011), což se ovšem ve zpětném pohledu ukazuje jako chybná volba. Standardizace fakticky důsledně existuje jen na papíře, dodnes k ní absentuje preparace příslušného CRM, což ji činí reálně nedokončenou. Problematičnost zvoleného metodického postupu (zejména pufru a modifikátorů rychlosti reakce) dokumentují již opakované revize, zpřesňující a upravované nároky na čistotu použitých substancí, hodnoty tolerance pH reakční směsi atp. vyvolané obtížemi s opakovatelností přípravy činidel v místě a čase se shodnými reakčními vlastnostmi.

K tomu navíc přistupuje odhalení nečekaných, dramatických problémů metody se zastoupením izoenzymů ALP v analyzovaných vzorcích. Důsledkem obého je právě již 8 roků postrádaný CRM jako jediný pevný, harmonizační bod analytiky stanovení kat.k. ALP. V tomto smyslu je pak nutno konstatovat, že původní text na stránkách SEKK neztratil aktuálnost nejen v té teoretické části, ale platil a platí i v části praktické. Metodický postup (DGKC "new 94"), jako robustní metodu s minimálními problémy s přípravou identických činidel lze opravdu pomocí primárního standardu 4-nitrofenolu úspěšně kalibrovat a mezilaboratorně unifikovat, zatímco u současné verze metody (IFCC 2011) to vzhledem ke zmíněné problematické přípravě reagentů, nejen mezi výrobci, ale i mezi šaržemi téhož výrobce, vede naopak k velké disharmonizaci. To je důvod, proč ukázka praktického postupu kalibrace ALP nebyla v publikovaném textu aktualizována na sice platnou, ale pro tento účel zcela nevhodnou metodu IFCC 2011.

Kalibrace katalytických koncentrací enzymových aktivit (α -AMS)

Text s identickým názvem jako v předešlém případě, jen navíc s podtitulkem *Stanovení α -amylázy (1,4- α -D-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1.)* je s obdobným členěním a v mnohém se odkazujícím na pasáže teoretických východisek prezentovaných pro ALP, navíc už i v kapitole praktického příkladu stále aktuální. Kalibrace je prezentována na metodickém postupu stanovení α -amylázy (α -AMS) za užití substrátu EPS-G7 (37 °C) (1,2) následně převzatou a standardizovanou jako IFCC v roce 2005. Zde je tedy situace vzhledem k aktualizaci textu mnohem jednodušší. Standardizace je v tomto případě nejen proklamována, je navíc uvedena reálně do praxe. Přestože v případě α -AMS oproti ALP činí monitorovaný produkt reakce (4-nitrofenol) vzhledem k pH reakčního prostředí mnohem větší problémy (diskutováno v původní práci), optimální volba pufru a složení reakční směsi vedla na rozdíl od ALP k úspěšnému řešení. K dispozici je příslušný referenční materiál CRM, od něhož je odvíjen nepřetržitý řetězec metrologické návaznosti přes výrobce IVD až do rutinních laboratoří. Krásný případ celosvětově úspěšně zvládnuté standardizace, pomineme-li malou píhu na kráse, tj. nejednotné používání SI jednotek pro vyjadřování katalytické koncentrace. I tak markantní kontrast ve srovnání se stavem u ALP.

Pokrok v oboru

V obou textech nelze přehlédnout poplatnost době vzniku z pohledu dosažené úrovně našich možností, kompetencí, přístrojového vybavení atd. Zde je bohužel nutno konstatovat dramatický úbytek kompetencí analytika v současném rutinním provozu laboratoře, jejich nevratným přesunem do působnosti firemních analytických systémů. Nástup „uzavřených“ analytických systémů z nás činí

pouhé uživatele a konzumenty firemních „know how“ s velice omezenými možnostmi a pravomocemi, i když bychom mnohdy případně měli k dispozici vlastní a lepší „know how“. Naše daň pokroku. Naštěstí právě oblast kalibrace je ještě stále u většiny biochemických automatů znalé obsluze dostupná jistým zásahům. Praktické příklady kalibrací pro HITACHI 911 už dnes nikdo praktikovat nemá na čem, ale vypovídající a ilustrační hodnotu mají stále. Didaktická cena spočívá v ozřejmění, jak se vlastně rodí deklarace v referenčních kalibračních materiálech pro analytiku enzymů.

Schůdnou cestu popsané kalibrace dnes ještě stále poskytne využití:

Zpravidla výrobcem poskytovaných několika volně programovatelných metod

K výpočtu kalibračního faktoru použít výpis naměřených absorbancí z režimu kalibrace, kdy ponecháme firemní SW aplikaci (včetně režimu RATE) a provedeme pouze potřebnou výměnu činidel (R2, standard pNP), výpočet F manuálně, korekci na BLANK již na rutinní aplikaci.

Ve firemních (uzavřených) aplikacích vyhledáme vhodnou aplikaci END POINT pro jiný analyt, kde zajistíme shodu pipetovaných a dávkovaných objemů, vlnových délek atd., kterou využijeme pro pomocnou kalibraci.

Závěr

Společně se správci webu jsme se dohodli, že oba zmíněné texty s minimálními korekcemi a odkazem na tento komentář ponecháme stránkách SEKK. Činíme tak zčásti z nostalgie ke starým časům, jako k relikvii poplatné době, ale také jako k materiálům dokumentujících dva zcela rozdílné příběhy standardizace. Současně v nich spatřujeme stálou didaktickou hodnotou zejména pro nastupující generaci analytiků.