



UPPSALA
UNIVERSITET

Institutionen för Biokemi och Mikrobiologi
Biomedicinska analytikerprogrammet
Examensarbete 15 hp, VT 2009

Validation of Abbott Diagnostics turbidimetric cystatin C assay and enzymatic creatinine assay using the Architect c8000 analyzer

Susanne Dehmer

Handledare: Christian Löwbeer, M.D, PhD, Överläkare.
Hans Wallinder, M.Sc, Laboratoriechef.

Avdelningen för Klinisk kemi, Immunologi och Allergi.
Aleris Medilab, Täby.

ABSTRACT

Objective: Estimation of glomerular filtration rate (GFR) is an important tool in the diagnosis and management of chronic kidney disease. Today creatinine is the most frequently used marker for kidney function though several studies indicate that cystatin C is a superior marker. The purpose of this study was to validate Abbott Diagnostics turbidimetric cystatin C assay and enzymatic creatinine assay.

Methods: The validation was performed by studies of CV for the two methods and correlations between the two and other available methods for assessing GFR. The stability of cystatin C at room temperature was also evaluated.

Results: Both methods showed good precision. The Abbott cystatin C assay generally gave lower values and thereby higher estimated GFRs than the correlated Gentian method. The Abbott enzymatic creatinine assay gave higher values than the correlated Jaffe method. Those results are generally unexpected, but in this study the cause is an automatically applied negative intercept used together with the Jaffe method. Cystatin C showed high stability when stored at room temperature.

Conclusions: Estimated GFRs tend to differ depending on the choice of method for analyzing cystatin C or creatinine and this study gives an overview of the range of variation. The study also enlightens the need for an international calibrator for the cystatin C methods presented by different manufacturers.

KEYWORDS

Chronic kidney disease, kidney function, glomerular filtration rate, immunoassay, correlation studies.

INTRODUKTION

Hos en vuxen människa väger varje njure omkring 150 gram och är cirka 11 centimeter lång [1]. Njurarnas främsta uppgift är att filtrera blodet och under ett dygn koncentrerar de ungefär 180 liter primärurin till 1-2 liter sekundärurin (färdig urin). Utöver renande av blodet har njurarna också en mängd andra funktioner i människokroppen, exempelvis metaboliserar de 25-hydroxy-vitamin D till den aktiva formen 1,25-hydroxy-vitamin D vilket reglerar upptag av kalcium samt bennybildning i kroppen. Njurarna är också viktiga vid bildandet av erytropoetin (EPO), hormonet som stimulerar till produktion av erythrocyter, och vid reglering av blodvolym och blodtryck i kroppen genom utsöndring av enzymet renin. På grund av alla dessa funktioner är njurarna viktiga för att bibehålla en normal homeostas i människokroppen [1].

Kronisk njursjukdom är ett stort hälsoproblem i Sverige och resten av världen. I USA räknar man med att ungefär 20 miljoner människor lever med kronisk njursjukdom och mer än 400 000 människor behandlas med någon form av dialys [2]. Kronisk njursjukdom ger ofta inga symtom förrän i dess senare stadier. Detta medför att om man inte screenar för njursjukdom hittar man inte dessa patienter innan de har utvecklat symptom. Problemet med att hitta patienten sent är att när sjukdomen fortskridit så långt finns det få möjligheter att bromsa utvecklingen. Fortsatt minskning av njurfunktion kan då leda till kardiovaskulära problem, kortare livslängd, sämre livskvalitet samt behov av dialys [1]. För en patient med en kronisk njursjukdom är risken större att avlida i sviterna av en kardiovaskulär sjukdom än av terminal njurinsufficiens [3]. Patienter med diabetes, högt blodtryck eller ärftlighet för något av dessa tillstånd löper högre risk att utveckla kronisk njursjukdom [1].

Tidigare kategoriserades kroniska njursjukdomar efter orsak, t.ex. pyelonefrit, glomerulonefrit eller lupusnefrit [3]. År 2002 kom rekommendationer från Kidney disease improving global outcomes (KDIGO) och National kidney foundation/Kidney disease outcomes quality initiative (NKF/KDOQI) som förespråkade klassificering av patienter med kronisk njursjukdom samt njurtransplantationspatienter i 5 stadier baserade på deras glomerulära filtrationshastighet (GFR). Ett GFR på $< 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ eller njurskada i minst 3 månader oberoende av orsak är den internationella definitionen för kronisk njursjukdom [4,5] (Figur 1).

Stadium	GFR mL/min/1,73 m ²
1. Njurskada utan påverkan på njurfunktionen.	> 90
2. Njurskada med lätt nedsättning av njurfunktionen.	60 – 89
3. Måttlig njurinsufficiens.	30 – 59
4. Avancerad njurinsufficiens – symtomgivande uremi.	15 – 29
5. Terminal njurinsufficiens – njursvikt.	< 15

Figur 1. Beslutsgränser för stadiindelning av kronisk njursjukdom.

GFR används i kliniken för att tidigt diagnostisera försämring i njurfunktion hos riskpatienter, för att följa sjukdomsförlopp och prognos, för utvärdering av behandling samt för att definiera behov av dialys eller transplantation. Man skattar också GFR hos potentiella njurdonatorer och före behandling med läkemedel som utsöndras via njurarna [4].

GFR påverkar clearance av alla läkemedel som elimineras renalt, vilket medför att den dos som en patient rekommenderas av ett sådant läkemedel måste beräknas utifrån patientens absoluta GFR (mL/min). Om GFR inte skattas korrekt kan det leda till felaktig läkemedelsdosering och därmed under- eller överbehandling. Exempel på ett läkemedel som är beroende av GFR vid dosering är digoxin. Enligt en rapport av Pär Hallberg med kollegor publicerad i *Upsala Journal of Medical Sciences* år 2004 låg 33 % av alla digoxinresultat då över den högsta rekommenderade koncentrationen, vilket ansågs bero på sambandet mellan digoxinnivå och njurfunktion då försämrade njurfunktion och således sänkt GFR leder till ökad serumkoncentration av digoxin [6].

GFR kan anges i två olika enheter, antingen i mL/min eller mL/min/1,73 m². Den första enheten, kallad absolut GFR, ger ett mått på den totala filtrationsförmågan medan den senare enheten, kallad relativt GFR, ger ett GFR som är kroppsytenormerat. 1,73 m² anses vara den genomsnittliga normala kroppsytan, beräknad med du Bois och du Bois formel [7]. Absolut GFR används för att bedöma njurarnas totala filtrationskapacitet vid läkemedelsdosering medan relativt GFR används för bedömning av njurarnas filtrationsförmåga vid misstanke om eller uppföljning av njursvikt. Ett relativt GFR möjliggör jämförelse av filtrationsförmåga patienter emellan. På grund av dessa olika användningsområden är det viktigt att tydligt skilja absolut GFR från relativt GFR [8].

Inulin betraktas som ”gold standard” medan iohexol, Cr-EDTA och iothalamat betraktas som ”silver standards” vid GFR-mätning [9]. Vid mätning av inulin krävs kontinuerlig infusion medan det för ”silver standard”-metoderna endast krävs en injektion av den använda markören. Efter injektionen tas sedan ett eller flera blodprover [10]. Dessa metoder är omständliga, dyra och tar lång tid att utföra vilket har medfört att kreatinin har varit den mest använda markören för skattning av GFR de senaste decennierna. Nu har dock flera studier visat att cystatin C är en bättre markör än kreatinin för detta ändamål [9].

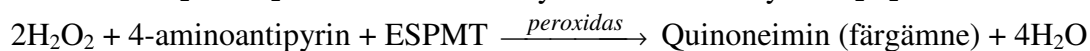
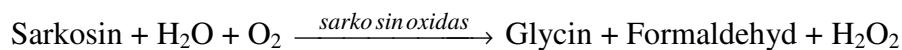
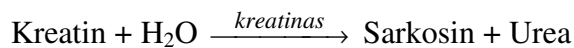
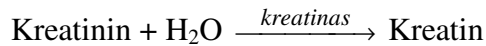
Kreatinin är anhydridformen av kreatin vilken bildas då kreatinfosfat spjälkas till kreatin och fosfat vid muskelkontraktion. Detta medför att kreatininnivåerna i serum eller plasma inte bara är relaterade till patientens njurfunktion utan också till dess muskelmassa [8], vilket har till följd att kreatinin inte är en bra markör för skattning av GFR hos personer med avvikande muskelmassa såsom äldre och barn.

Kreatinin är den enskilt mest analyserade markören på kliniskt kemiska laboratorier idag samt den absolut mest använda markören för skattning av GFR i Sverige och världen, detta trots att kreatinin som markör för njurfunktion har allvarliga begränsningar. Kreatininnivån i serum eller plasma påverkas inte bara av individens muskelmassa utan även av andra faktorer så som ålder, kön och fysisk aktivitet. Ett annat problem med kreatinin som markör för att hitta njursjukdom är att kreatinin i serum eller plasma inte blir förhöjt förrän GFR har sjunkit med minst 50 %. Detta medför att markören är okänslig för tidiga minskningar i GFR [8].

Ett sätt att skatta GFR på är genom beräkning av kreatininclearance utifrån S-Kreatinin och U-Kreatinin. För att undersöka kreatininclearance krävs att patienten samlar all sin urin under en bestämd tidsperiod, helst i 24 timmar för att undvika dygnsvariationer.

Modification of diet in renal disease (MDRD) och Cockcroft-Gault representerar två formelgrupper som ofta används vid skattning av GFR utifrån kreatinin mätt i serum eller plasma [9]. Dessa formler är baserade på kreatininmätningar med den så kallade Jaffe-metoden. Principen för denna metod är att kreatinin i ett prov reagerar med pikrinsyra och formar komplex vid basiskt pH. Mängden kreatinin-pikrinxkomplex är direkt proportionell mot koncentrationen kreatinin i det ursprungliga provet då absorbans mäts vid våglängden 500 nm. Ett problem med Jaffe-metoden för analys av kreatinin är att den har en tendens att inte bara reagera med kreatinin utan också med pseudokreatininer. Detta medför att kreatinivärdet vid mätning med denna metod i medeltal blir 10-15% högre än vad det

egentligen är [8]. För att kompensera för Jaffe-metodens reagerande med pseudokreatininer har en del tillverkare justerat sina kalibratorer för att vid analys få värden som liknar de som fås då en referensmetod används. Genom att göra detta antar man att pseudokreatinininterferensen är konstant, vilket inte stämmer. Jaffe-metoden kan alltså påverka riktigheten då kreatinin analyserat med denna metod används vid skattning av GFR. För att undvika interferens och få sannare GFR-värden kan istället enzymatiska metoder användas. Dessa är mer specifika för kreatinin då de inte reagerar med pseudokreatininer [11]. I denna studie validerades Abbott Diagnostics metod för enzymatisk bestämning av kreatinin, i den ingår följande enzymkatalyserade reaktioner:



I den sista reaktionen bildas färgämnet Quinoneimin vilket ger en förändring av absorptions vid 548 nm. Denna förändring av absorptions är proportionell mot kreatininkoncentrationen i provet som analyseras.

Cystatin C är ett protein bestående av 121 aminosyror. Det har en molekylvikt på cirka 13 kDa och fungerar som en inhibitor av lysosomala cysteinproteaser i alla mammalieceller. Cystatin C har flera funktioner i den mänskliga kroppen, bland annat kontrollerar det extracellulär proteolys och modulerar immunsystemet [4]. Cystatin C produceras i alla kärnförande celler i konstant hastighet, den renala eliminationen sker endast via glomerulär filtration och proteinet reabsorberas totalt i tubuli där det också kataboliseras [4,5,12]. Med detta i åtanke anses cystatin C analyserat i serum eller plasma utgöra en bättre markör för skattning av GFR än kreatinin, speciellt hos barn och äldre [4,12]. Detta bekräftas också av metastudier där cystatin C anses vara överlägsen kreatinin vid uppskattning av njurfunktion då serumkoncentrationen av cystatin C inte påverkas av t.ex. muskelmassa, ålder eller inflammation [9]. Det finns också tillstånd då cystatin C är mindre bra som markör för skattning av GFR. Hos patienter med hypothyreos har man sett en minskning i cystatin C, och hos patienter med hyperthyreos samt vid behandling med glukokortikoider har man sett en ökning av markören. Hyperthyreos påverkar också halten kreatinin i blodet, vilken då sjunker. Hos patienter med thyreoidearubbning kan man därför skatta GFR utifrån både cystatin C- och kreatininanalys varefter medelvärde av dessa GFR beräknas.

Automatiserad mätning av cystatin C sker antingen med Particle-enhanced turbidimetric immunoassay (PETIA) eller Particle-enhanced nephelometric immunoassay (PENIA) [4]. I denna studie validerades Abbott Diagnostics PETIA-metod och jämfördes med Gentians PETIA-metod. Principen för dessa metoder är att då latexpartiklar konjugerade med polyklonala anti-humana cystatin C-antikroppar blandas med provmaterial innehållande humant cystatin C aggregerar antikropp och protein. Denna aggregation förändrar absorptionsen i lösningen, vilken är proportionell mot koncentrationen av humant cystatin C i ursprungsprovet.

Beräkning av relativt GFR utifrån cystatin C kräver inte information om patientens vikt vilket behövs i Cockcroft-Gaults formel för skattning av GFR utifrån kreatinin. Detta underlättar för laboratorierna då de kan ha svårt att få tillgång till denna information [9]. Det finns idag ingen kalibrering av cystatin C-metoder eller formel för GFR-skattning utifrån

cystatin C som utgör internationell standard. Detta har medfört att varje tillverkare har kalibrerat sin egen metod för analys av cystatin C och sedan utformat en egen formel för GFR-skattning utifrån egna analysresultat. Det är därför viktigt att använda rätt formel vid skattning av GFR utifrån cystatin C då olika formler ger olika resultat. Enligt en artikel av Martin Tidman med kollegor publicerad i *Nephrology Dialysis Transplantation* (2008) kan en cystatin C-koncentration av 1 mg/L ge skattade GFR som varierar mellan 76 till 99 mL/min/1,73m² beroende på vilken formel som använts [5].

Valideringsstudier kan användas för att bedöma metoders lämplighet vid rutinanalys. En mängd olika parametrar kan undersökas. Vad man i praktiken kontrollerar beror på hur etablerad metoden i fråga är vid andra laboratorier samt hur omfattande information som fås från tillverkaren. Valideringsunderlaget används sedan för att uppskatta metodens prestanda.

CV-studier utförs för att undersöka precision hos en analysmetod och ger ett mått på metodspridning uttryckt som normalfördelning. CV (variationskoefficient) beräknas som standarddeviation dividerat med medelvärde.

Denna studies syfte var att validera Abbott Diagnostics PETIA-metod för analys av cystatin C samt Abbott Diagnostics enzymatiska metod för analys av kreatinin med instrumentet Architect c8000. Architect c8000 är ett automatiserat analysinstrument med plats för 68 uppsatta metoder. Instrumentet har plats för 217 patientprover åt gången, dessa platser är uppdelade i prioriterade (35), rutinprover (150) och karusell (32). Karusellplatserna används främst då små provmängder eller kontroller ska analyseras.

Valideringen av de två metoderna gjordes genom CV-studier och jämförande av korrelation med en extern och två interna analysmetoder. Även korrelationen mellan de två validerade analysmetoderna undersöktes. För cystatin C gjordes också en stabilitetsstudie.

Tabell 1. Sammanfattning av i studien ingående metoder och formler, med kortnamn.

Kortnamn	Metod
Abbott Cys C	PETIA-metod för analys av P/S-Cystatin C från Abbott Diagnostics.
Gentian Cys C	PETIA-metod för analys av P/S-Cystatin C från Gentian.
Krea. Jaffe.	Den väletablerade Jaffe-metoden för analys av P/S/U-Kreatinin från Abbott Diagnostics.
Krea. Enz.	Enzymatisk metod för analys av P/S-Kreatinin från Abbott Diagnostics.
Formel	
GFR Abbott Cys C	$\frac{71}{\text{Cystatin C}^{1,28}}$ <p>För barn under 14 år multipliceras ovanstående GFR med 1,332. Svar i relativt GFR.</p>
GFR Gentian Cys C	$79,901 \times \text{Cystatin C}^{-1,4389}$ <p>Svar i relativt GFR.</p>
GFR Krea. Jaffe GFR Krea. Enz.	$175 \times \left(\frac{\text{S-Kreatinin}}{88,4} \right)^{-1,154} \times \text{ålder}^{-0,203}$ <p>För kvinnor multipliceras ovanstående GFR med faktorn 0,742. Svar i relativt GFR.</p>
GFR Krea-clear.	$\frac{\text{Urinkoncentration} \times \text{Urinvolym}}{\text{Urinsamlingstid} \times \text{Plasmakoncentration}}$ <p>Svar i absolut GFR.</p>

MATERIAL OCH METODER

PROVMATERIAL

För CV-studier med kontrollmaterial användes Cystatin C Control Set (REF 1P9320) från Abbott Diagnostics och Triad NYSSPATH (nivå 1: kod 667005 och nivå 3: kod 667007) från Beckman Coulter. För CV-studier med patientprover användes avhållt serum från 10

slumpmässigt utvalda prover ur de två serierna med konsekutivt insamlade prover samt prover från dialyspatienter.

Fyra olika provserier användes till korrelationsstudier, alla ingående prover var tagna i gelrör från BD Vacutainer och centrifugerade innan ankomst till laboratoriet. Före analys hälldes serum över till 5mL-provrör.

Beskrivning av de fyra provserierna:

- Prover som analyserats med extern metod: För att undersöka korrelation till en extern analysmetod användes serum från 120 patientprover som samlats in vid Avdelningen för klinisk kemi och farmakologi, Akademiska sjukhuset, Uppsala. I denna patientgrupp återfanns 73 män och 47 kvinnor. Medelåldern var 63 år (9-91 år), tre av dessa prover var från barn under 14 år. Alla prover förvarades frysta i väntan på analys.
- Prover som samlats in konsekutivt: För att undersöka korrelation vid analytkoncentrationer inom normalområde användes serum från 116 patientprover som samlats in konsekutivt vid Avdelningen för klinisk kemi, Aleris Medilab, Täby. 57 av dessa prover var tagna från män och 59 var tagna från kvinnor. Medelåldern hos denna patientgrupp var 57 år (22-98 år). Dessa prover förvarades en dag i kylrum (4°C) före analys.
- Prover från patienter som genomgår dialysbehandling: För att undersöka korrelation vid höga analytkoncentrationer användes serum från 147 prover tagna från dialyspatienter, av dessa prover var 84 tagna från män och 63 från kvinnor. Medelåldern hos denna patientgrupp var 70 år (27-88 år). Dessa prover förvarades i kylrum (4°C) i fyra dagar före analys.
- Prover som analyserats för kreatininclearance: För korrelationsstudie med prover analyserade för Pt-Kreatininclearance användes serum från 10 konsekutivt insamlade patientprover som tidigare analyserats i rutindiagnostik vid Avdelningen för klinisk kemi, Aleris Medilab, Täby. Tre av dessa var från män och sju var från kvinnor. Medelåldern i denna grupp var 56 år (20-83 år). Dessa prover förvarades frysta i väntan på analys.

För att undersöka stabiliteten hos cystatin C användes 10 centrifugerade patientprover tagna i gelrör vilka samlades in konsekutivt.

ANALYSMETODER

Vid alla analyser som utfördes på Avdelningen för klinisk kemi, Aleris Medilab, Täby användes instrumentet Architect c8000 (Abbott Diagnostics). De 120 prover som erhöles från Avdelningen för klinisk kemi och farmakologi, Akademiska sjukhuset, Uppsala hade innan ankomst analyserats med Gentians PETIA-metod för analys av cystatin C med instrumentet Architect ci8200 (Abbott Diagnostics). Efter ankomst analyserades även dessa prover med instrumentet Architect c8000.

För analys av cystatin C användes reagens (REF 1P9301, reagens 1 och 2), kalibrator (REF 1P9310) och kvalitetskontroller (REF 1P9320, två nivåer) från Abbott Diagnostics. Reagens 1 innehåller TRIS-buffert och immunologiska blockerare och reagens 2 innehåller latexpartiklar som täckts med polyklonala anti-cystatin C-antikroppar (kanin). Kalibrator och kontrollmaterial består av en vätska som preparerats genom spikning av humant serum poolat med rekombinant cystatin C. Analys av S-Cystatin C utfördes med följande instrumentinställningar: reaction mode: rate-up, wavelength: 548 nm, read times, main: 19-27

och calibration method: spline. 153 μL av reagens 1 blandades med 2 μL provmaterial och 33 μL av reagens 2.

För analys av kreatinin med enzymatisk metod användes reagens (REF 8L24-01, reagens 1 och 2) och kalibrator (REF 6K3010) från Abbott Diagnostics. Kontrollmaterial (nivå 1: kod 667005 och nivå 3: kod 667007) erhöles från Beckman Coulter. Reaktiva beståndsdelar i reagens 1 är kreatinas, sarkosinoxidas, askorbatoxidas, katalas och N-etyl-N-sulfopropyl-m-toluidin (ESPMT). I reagens 2 är de reaktiva beståndsdelarna kreatinas, peroxidas och 4-aminoantipyrin. Kalibrator och kontrollmaterial härstammar från färsk frusen human-plasma. Analys av S-Kreatinin med enzymatisk metod utfördes med följande instrumentinställningar: reaction mode: end-up, wavelength: 548 nm, read times, main: 31-33, read times, blank: 13-15 och calibration method: linear. 180 μL av reagens 1 blandades med 4 μL provmaterial och 60 μL av reagens 2.

För analys av kreatinin med Jaffe-metod användes reagens (REF 7D64, reagens 1 och 2) och kalibrator (REF 1E65-04) från Abbott Diagnostics. Kontrollmaterial (nivå 1: kod 667005 och nivå 3: kod 667007) erhöles från Beckman Coulter. Reagens 1 innehåller natriumhydroxid, reagens 2 innehåller pikrinsyra, kalibrator och kontrollmaterial härstammar från defibriniserad färskt frusen human-plasma. Analys av S-Kreatinin med Jaffe-metod utfördes med följande instrumentinställningar: reaction mode: rate-up, wavelength: 500 nm, read times, main: 18-22 och calibration method: linear. För analys av S-Kreatinin blandades 200 μL av reagens 1 med 9,6 μL provmaterial och 48 μL av reagens 2.

CV-STUDIER MED KONTROLLMATERIAL

För att studera precision hos Abbott Diagnostics PETIA-metod för analys av cystatin C användes kontrollmaterialet 'Cystatin C Control Set' från samma företag. Låg och hög kontroll analyserades jämsides, båda kontrollerna analyserades sex gånger vid varje analystillfälle. Detta utfördes två gånger per dag i fem dagar (n=60).

För att studera precision hos Abbott Diagnostics enzymatiska metod för analys av kreatinin användes kontrollmaterialet Triad® NYSSPATH från Beckman Coulter. Även här analyserades låg och hög kontroll jämsides, det analytiska utförandet följde samma schema som föregående precisionsstudie (n=60).

CV-STUDIER MED PATIENTPROVER

De 10 slumpmässigt utvalda prover som ingick i denna studie analyserades två gånger i direkt följd för både cystatin C med Abbott Diagnostics PETIA-metod (n=20) och kreatinin med samma företags enzymatiska metod (n=20).

KORRELATION TILL EXTERN ANALYSMETOD

De 120 prover som ingick i denna studie samlades in på Avdelningen för klinisk kemi och farmakologi, Akademiska sjukhuset, Uppsala varefter de transporterades i frigolitlåda till Avdelningen för klinisk kemi, Aleris Medilab, Täby. Dessa prover hade tidigare analyserats med Gentians PETIA-metod för analys av cystatin C, med proverna följde ett dokument med uppgifter om kön, ålder samt analysresultat för vart och ett av de 120 proverna. I 10 dagar

analyserades sedan 12 prover om dagen. Dessa prover tinades i rumstemperatur i en timme innan de blandades och centrifugerades i 10 minuter (1328 g) och analyserades med Abbott Diagnostics PETIA-metod för analys av cystatin C samt enzymatiska metod för analys av kreatinin. GFR skattades sedan utifrån samtliga analysresultat.

KORRELATIONSSTUDIE MED KONSEKUTIVA PROVER

För de 116 konsekutivt insamlade prover som ingick i denna studie antecknades innan analys ålder, kön samt erhållna värden då proverna analyserats med Jaffe-metoden för kreatinin i rutinverksamheten på laboratoriet. Varje prov analyserades sedan med Abbott Diagnostics PETIA-metod för analys av cystatin C och enzymatiska metod för analys av kreatinin med tidigare angivna instrumentinställningar. GFR skattades sedan utifrån samtliga analysresultat.

KORRELATIONSSTUDIE MED PROVER FRÅN DIALYSPATIENTER

De 147 prover från patienter under dialysbehandling som ingick i denna studie analyserades först i rutinverksamheten på laboratoriet varefter de stod i kylrum (4°C) i 4 dagar. Därefter antecknades ålder och kön för vart och ett av proverna. De analyserades sedan med Abbott Diagnostics Jaffe-metod samt enzymatiska metod för analys av kreatinin och PETIA-metod för analys av cystatin C med tidigare angivna instrumentinställningar. GFR skattades sedan utifrån samtliga analysresultat.

KORRELATIONSSTUDIE MED PROVER ANALYSERADE FÖR KREATININCLEARANCE

De 10 konsekutivt insamlade patientprover som användes i denna studie hade vid tidigare tillfällen analyserats i rutinverksamheten vid laboratoriet med avseende på U-Kreatinin samt S-Kreatinin med

Abbott Diagnostics Jaffe-metod varefter kreatininclearance hade beräknats. Ålder, kön samt erhållit kreatininclearance för varje prov antecknades. Därefter tinades de frysta proverna i rumstemperatur i en timme och centrifugerades i 10 minuter (1328 g). Dessa prover analyserades i en serie med Abbotts Diagnostics PETIA-metod för analys av cystatin C samt enzymatiska metod för analys av kreatinin med tidigare angivna instrumentinställningar. GFR skattades sedan utifrån samtliga analysresultat.

STABILITETSSTUDIE

En stabilitetsstudie utfördes för cystatin C med hjälp av 10 prover som samlades in konsekutivt, dessa prover förvarades i rumstemperatur med kork på. Första analysen skedde kort tid efter att proverna anlät till laboratoriet, därefter analyserades alla prover även dag två, tre, fyra och åtta efter ankomst (n=50). Parallellt med proverna analyserades kontroller. Alla analyser utfördes med Abbott Diagnostics PETIA-metod för analys av cystatin C med tidigare angivna instrumentinställningar.

ETISKA ASPEKTER

Utvärdering av analysmetoder för kliniskt bruk, såsom i det aktuella projektet, är en rutinemässig del av hälso- och sjukvårdsarbetet vid ett kliniskt kemiskt laboratorium. Metodvalidering är också en del av det kvalitetsarbete som sker innan införandet av all ny metodik i rutindrift och finns beskrivet i laboratoriets kvalitetsmanual, som utgör grunden för verksamhetens ackreditering. Det aktuella projektet var således per definition inte ett forskningsprojekt och behövde därför inte granskas av den regionala etikprövningsnämnden. Mätning av cystatin C och kreatinin i serum utfördes på prover som togs inom ramen för rutinsjukvården och där någon av dessa analyser var beställd. Något informerat samtycke från patienterna bedömdes därför inte behövas. Alla prover som användes i valideringen var avidentifierade. Proverna sparades inte längre tid än två månader efter analysernas utförande och omfattades därför inte av biobankslagen.

STATISTISKA BERÄKNINGAR

För att åsynliggöra precisionen hos analysmetoderna fördes de erhållna analysvärdena in i färdiga formler för CV-beräkning i Microsoft Excel Office 2007, dessa formler är utformade enligt Aronsson, T och Groth, T [12]. Med hjälp av resultaten från kontrollanalyserna beräknades medelvärde, inomdags-, mellandags- samt total CV och med hjälp av resultaten från patientprovsanalyserna beräknades medelvärde samt CV inomserie.

För att skatta GFR utifrån kreatinin användes MDRD-formeln och för att skatta GFR utifrån cystatin C användes Akademiska sjukhusets samt Abbott Diagnostics egna formler. Detta möjliggjorde fler metodjämförelser då följande skattade GFR kunde korreleras: GFR skattade med resultat från Abbott Diagnostics samt Gentians PETIA-metoder för analys av cystatin C, GFR skattade från Abbott Diagnostics Jaffe-metod samt enzymatiska metod för analys av kreatinin och GFR skattat genom bestämning av kreatininclearance.

För att åsynliggöra graden av överensstämmelse mellan de olika metoderna användes programmet Method Validator, version 1.1.10.0. Analysresultaten från de fyra korrelationsstudierna fördes in i olika tabeller varvid nivåskillnader kunde beräknas med biasplot enligt Bland-Altman och korrelationer med regressionsanalys enligt Passing-Bablok.

För utvärdering av stabilitet hos cystatin C i rumstemperatur användes ickeparametrisk Friedman ANOVA (Variansanalys) beräknad med programmet Statistica, version 8.0 (Statsoft Inc.).

RESULTAT

CV-STUDIER MED KONTROLLMATERIAL

Tabell 2 visar medelvärde samt CV % inomdag, mellandag och totalt för studien med kontrollmaterialet 'Cystatin C Control Set' analyserat med Abbott Diagnostics PETIA-metod för analys av cystatin C.

Tabell 2. Cystatin C Control Set, Abbott Diagnostics, 2 nivåer (n=60).

	Nivå 1	Nivå 2
Medelvärde (mg/L)	0,72	3,5
Inomdags CV (%)	0,8	0,7
Mellandags CV (%)	0,6	0,3
Total CV (%)	1,0	0,8

Tabell 3 visar medelvärde samt CV % inomdag, mellandag och totalt för studien med kontrollmaterialet 'Triad® NYSSPATH' analyserat med Abbott Diagnostics enzymatiska metod för analys av kreatinin.

Tabell 3. Triad® NYSSPATH, Beckman Coulter, 2 nivåer (n=60).

	Nivå 1	Nivå 2
Medelvärde (µmol/L)	51,2	625
Inomdags CV (%)	0,9	0,3
Mellandags CV (%)	0,9	0,2
Total CV (%)	1,2	0,4

CV-STUDIER MED PATIENTPROVER

De 10 patientprover som slumpmässigt valdes ut till denna CV-studie hade cystatin C-koncentrationer i intervallet 0,37 – 3,1 mg/L (medelvärde: 1,18 mg/L) vid analys med Abbott Diagnostics PETIA-metod för analys av cystatin C. Total CV beräknades till 1,0 %.

Samma 10 patientprover hade kreatininkoncentrationer i intervallet 38 – 507 µmol/L (medelvärde: 111 µmol/L) vid analys med Abbott Diagnostics enzymatiska metod för analys av kreatinin. Total CV beräknades till 1,4 %.

KORRELATION TILL EXTERN ANALYSMETOD

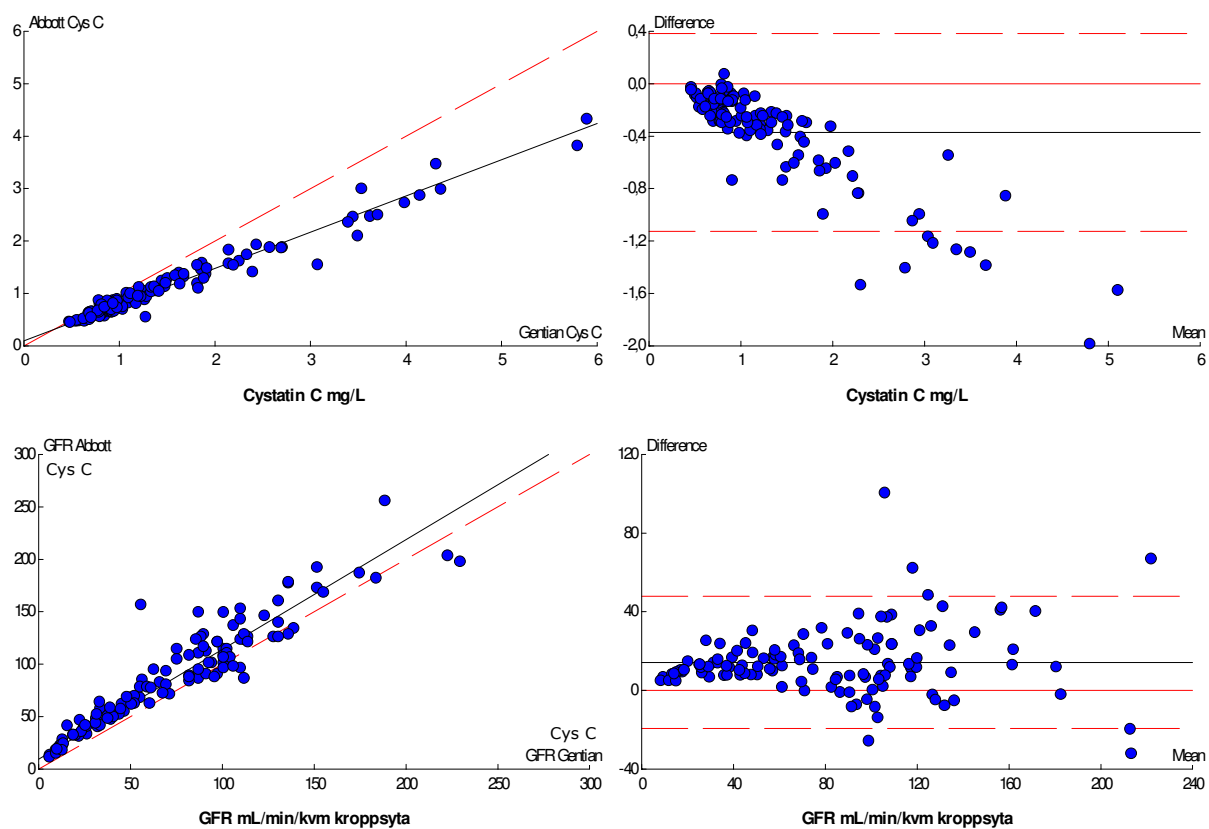
Korrelation mellan Gentian Cys C och Abbott Cys C

Regressionsanalysen visade en lutning av 0,69 (95 % konfidensintervall: 0,66 till 0,73) och ett intercept av 0,10 mg/L (95 % konfidensintervall: 0,06 till 0,13). För att skillnaden i lutning mellan två metoder inte ska vara signifikant måste värdet 1 innefattas i det 95 % -iga konfidensintervallet. För att skillnaden i intercept mellan två metoder inte ska vara signifikant gäller istället att värdet 0 inkluderas. Då värdena 1 respektive 0 inte innefattades i dessa konfidensintervall var skillnaderna i lutning och intercept mellan analysmetoderna signifikanta. I biasplotten sågs en genomsnittlig differens av -0,37 mg/L ($\pm 2 S_{Diff}$: -0,44 till -0,30). För att den genomsnittliga differensen mellan två metoder inte ska vara signifikant krävs att värdet 0 innefattas i intervallet $\pm 2 S_{Diff}$. S_{Diff} ger ett mått på differensens standardavvikelse, alltså sannolikheten att de jämförda metoderna ger överensstämmande

resultat för en individ. $\pm 2 S_{\text{Diff}}$ är således det intervall där 95 % av differenserna hamnar, detta område kallas limits of agreement. I detta fall betyder det att den genomsnittliga differensen var signifikant. Tillsammans åskådliggör dessa resultat att Abbott Cys C konsekvent gav lägre analysresultat än Gentian Cys C (Figur 2, övre).

Korrelation mellan GFR Gentian Cys C och GFR Abbott Cys C

Regressionsanalysen visade en lutning av 1,05 (95 % konfidensintervall: 0,99 till 1,12) och ett intercept av 9,38 mL/min/1,73 m² (95 % konfidensintervall: 6,86 till 12,4). Dessa resultat visar att ingen signifikant skillnad i lutning fanns, däremot var skillnaden i intercept signifikant. I biasplotten sågs en genomsnittlig differens av 14,2 mL/min/1,73 m² ($\pm 2 S_{\text{Diff}}$: 11,2 till 17,3) vilket visade en signifikant differens. Tillsammans åskådliggör dessa resultat att GFR Abbott Cys C gav högre skattade GFR än GFR Gentian Cys C (Figur 2, nedre).

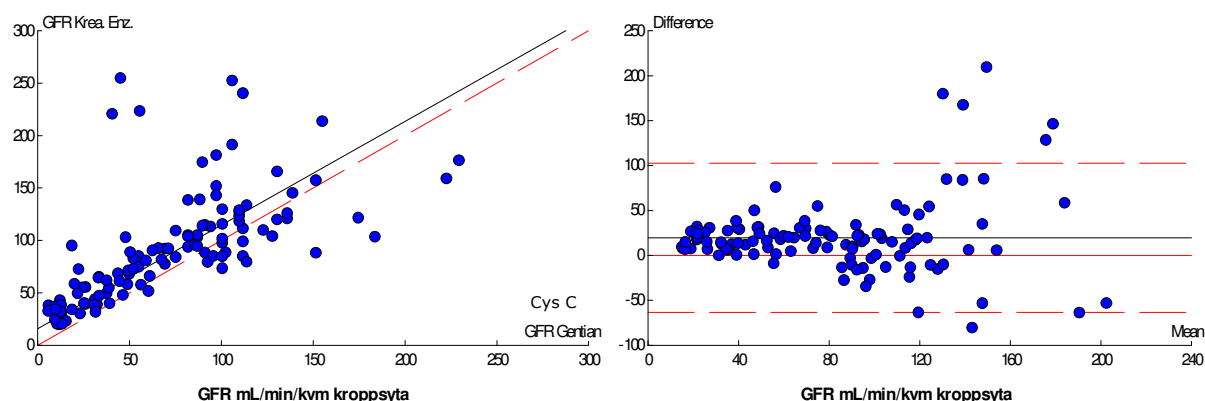


Figur 2. Prover från annat laboratoriums rutinproduktion (n=120).

Passing-Bablok-diagram (vänster) och Bland-Altman biasplot (höger) visande graden av överensstämmelse mellan Gentian Cys C och Abbott Cys C (övre) samt GFR skattade från dessa analysvärden (nedre). Gentian Cys C samt GFR Gentian Cys C är referensmetoder. Passing-Bablok diagram: heldragen linje = metodernas linjaritet, streckad linje = linjaritet vid lutningen 1. Bland-Altman biasplot: x-axeln = medelvärde, y-axeln = differens mellan metoderna, heldragen linje = medeldifferens, streckade linjer = $\pm 2 SD$.

Korrelation mellan GFR Gentian Cys C och GFR Krea. Enz.

Regressionsanalysen visade en lutning av 0,99 (95 % konfidensintervall: 0,88 till 1,12) och ett intercept av 15,9 mL/min/1,73 m² (95 % konfidensintervall: 8,75 till 23,6). Tillsammans visar dessa resultat att ingen signifikant skillnad i lutning fanns, däremot var skillnaden i intercept signifikant. I biasplotten sågs en genomsnittlig differens av 19,5 mL/min/1,73 m² ($\pm 2 S_{\text{Diff}}$: 11,8 till 27,3) vilket visade en signifikant differens (Figur 3).



Figur 3. Prover från annat laboratoriums rutinproduktion (n=120).

Passing-Bablok-diagram visande graden av överensstämmelse mellan GFR Gentian Cys C och GFR Krea. Enz. (vänster) samt biasplot med samma värden (höger). GFR Gentian Cys C är referensmetod. Passing-Bablok diagram: heldragen linje = metodernas linjaritet, streckad linje = linjaritet vid lutningen 1. Bland-Altman biasplot: x-axeln = medelvärde, y-axeln = differens mellan metoderna, heldragen linje = medeldifferens, streckade linjer = ± 2 SD.

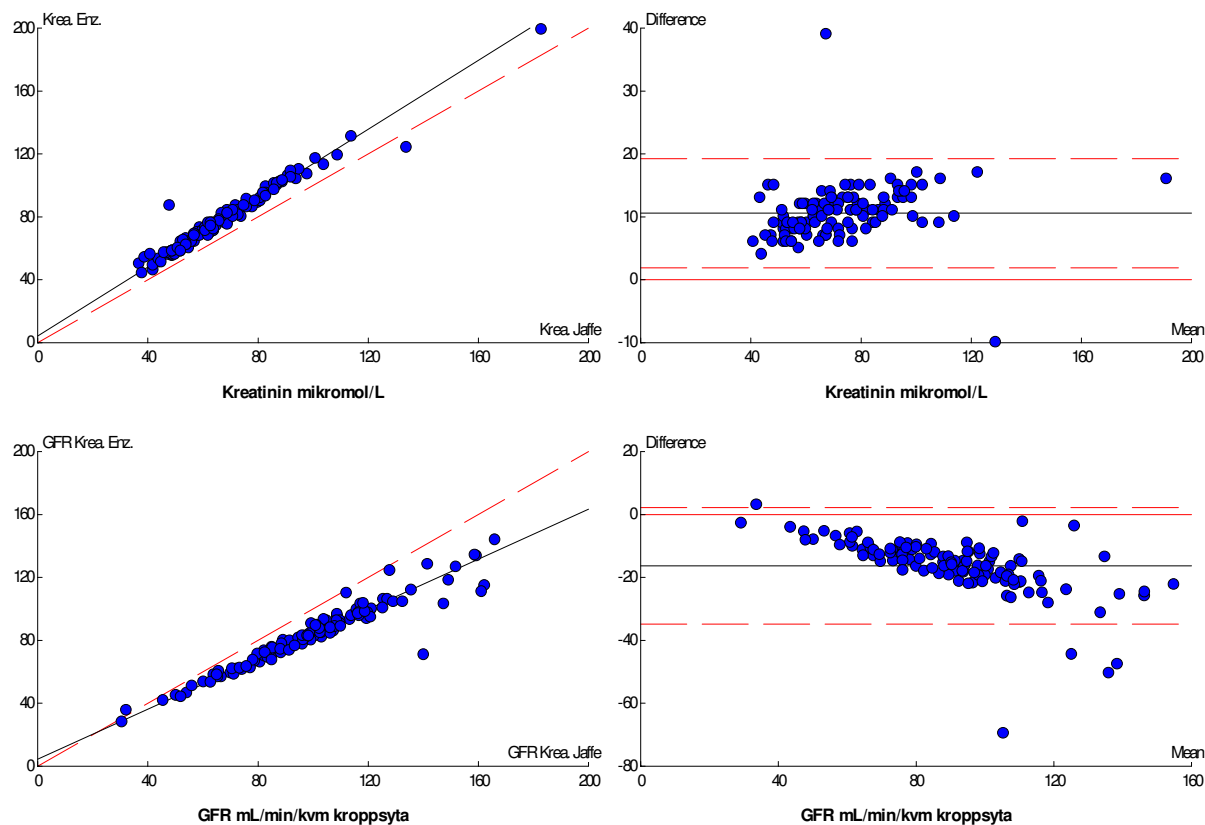
KORRELATIONSSTUDIE MED KONSEKUTIVA PROVER

Korrelation mellan Krea. Jaffe och Krea. Enz.

Regressionsanalysen visade en lutning av 1,10 (95 % konfidensintervall: 1,06 till 1,13) och ett intercept av 4,2 $\mu\text{mol/L}$ (95 % konfidensintervall: 1,9 till 6,2), vilket visade signifikanta skillnader mellan metoderna. I biasplotten sågs en genomsnittlig differens av 10,6 $\mu\text{mol/L}$ (± 2 S_{Diff} : 9,77 till 11,4), vilken också var signifikant. Tillsammans åskådliggör dessa resultat att Krea. Enz. konsekvent gav högre analysresultat än Krea. Jaffe (Figur 4, övre).

Korrelation mellan GFR Krea. Jaffe och GFR Krea. Enz.

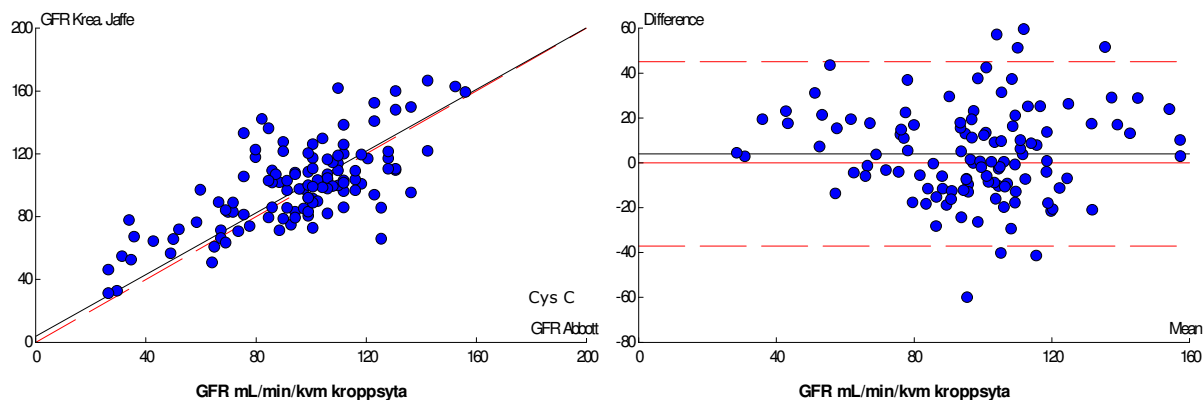
Regressionsanalysen visade en lutning av 0,80 (95 % konfidensintervall: 0,77 till 0,82) och ett intercept av 4,33 mL/min/1,73 m² (95 % konfidensintervall: 1,70 till 6,83). Dessa resultat visade signifikanta skillnader i lutning och intercept mellan de två metoderna. I biasplotten sågs en genomsnittlig differens av -16,3 mL/min/1,73 m² (95 % konfidensintervall: -18 till -14,6) vilket visade att även den genomsnittliga differensen var signifikant. Tillsammans åskådliggör dessa resultat att GFR Krea. Enz. konsekvent gav lägre skattade GFR än GFR Krea. Jaffe (Figur 4, nedre).



Figur 4. Konsekutivt insamlade prover från Aleris Medilabs rutinproduktion (n=116). Passing-Bablok-diagram (vänster) och Bland-Altman biasplot (höger) visande graden av överensstämmelse mellan Krea. Jaffe och Krea. Erz. (övre) samt GFR skattade från dessa analysvärden (nedre). Krea. Jaffe samt GFR Krea. Jaffe är referensmetoder. Passing-Bablok diagram: heldragen linje = metodernas linjaritet, streckad linje = linjaritet vid lutningen 1. Bland-Altman biasplot: x-axeln = medelvärde, y-axeln = differens mellan metoderna, heldragen linje = medeldifferens, streckade linjer = ± 2 SD.

Korrelation mellan GFR Abbott Cys C och GFR Krea. Jaffe

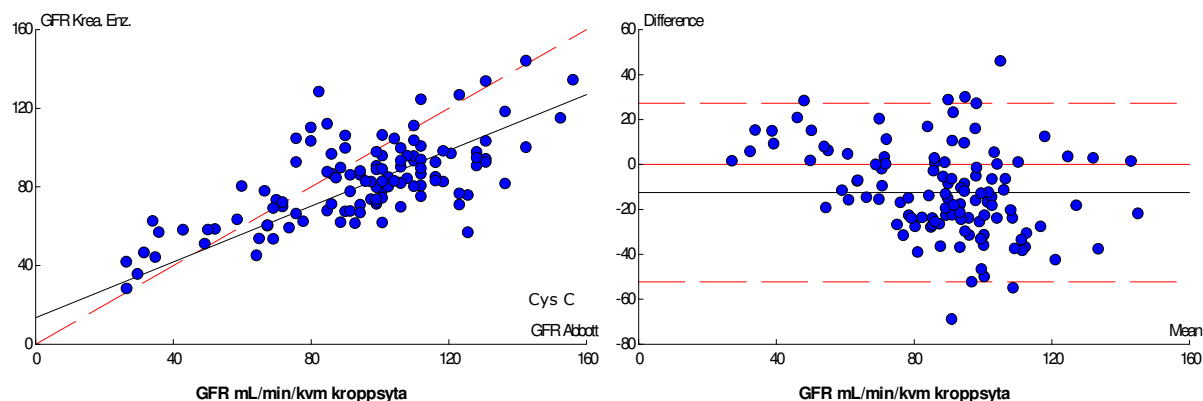
Regressionsanalysen visade en lutning av 0,98 (95 % konfidensintervall: 0,85 till 1,17) och ett intercept av 3,78 mL/min/1,73 m² (95 % konfidensintervall: -15,2 till 16,0). I biasplotten sågs en genomsnittlig differens av 3,98 mL/min/1,73 m² (± 2 S_{Diff}: 0,17 till 7,8). Dessa resultat visade att ingen signifikant skillnad i lutning och intercept fanns, däremot var den genomsnittliga differensen signifikant. Tillsammans åskådliggör dessa resultat att GFR Krea. Jaffe gav något högre GFR än GFR Abbott Cys C (Figur 5).



Figur 5. Konsekutivt insamlade prover från Aleris Medilabs rutinproduktion (n=116). Passing-Bablok-diagram visande graden av överensstämmelse mellan GFR Abbott Cys C och GFR Krea. Jaffe (vänster) samt biasplot med samma värden (höger). GFR Abbott Cys C är referensmetod. Passing-Bablok diagram: heldragen linje = metodernas linjaritet, streckad linje = linjaritet vid lutningen 1. Bland-Altman biasplot: x-axeln = medelvärde, y-axeln = differens mellan metoderna, heldragen linje = medeldifferens, streckade linjer = ± 2 SD.

Korrelation mellan GFR Abbott Cys C och GFR Krea. Enz.

Regressionsanalysen visade en lutning av 0,71 (95 % konfidensintervall: 0,61 till 0,84) och ett intercept av 13,4 mL/min/1,73 m² (95 % konfidensintervall: 0,85 till 13,0). Dessa resultat visade signifikanta skillnader i lutning och intercept mellan metoderna. I biasplotten sågs en genomsnittlig differens av -12,5 mL/min/1,73 m² (± 2 S_{Diff}: -16,2 till -8,79), denna differens var alltså signifikant. Tillsammans åskådliggör dessa resultat att GFR Abbott Cys C generellt gav högre skattade GFR än GFR Krea. Enz. (Figur 6).



Figur 6. Konsekutivt insamlade prover från Aleris Medilabs rutinproduktion (n=116). Passing-Bablok-diagram visande graden av överensstämmelse mellan GFR Abbott Cys C och GFR Krea. Enz. (vänster) samt biasplot med samma värden (höger). GFR Abbott Cys C är referensmetod. Passing-Bablok diagram: heldragen linje = metodernas linjaritet, streckad linje = linjaritet vid lutningen 1. Bland-Altman biasplot: x-axeln = medelvärde, y-axeln = differens mellan metoderna, heldragen linje = medeldifferens, streckade linjer = ± 2 SD.

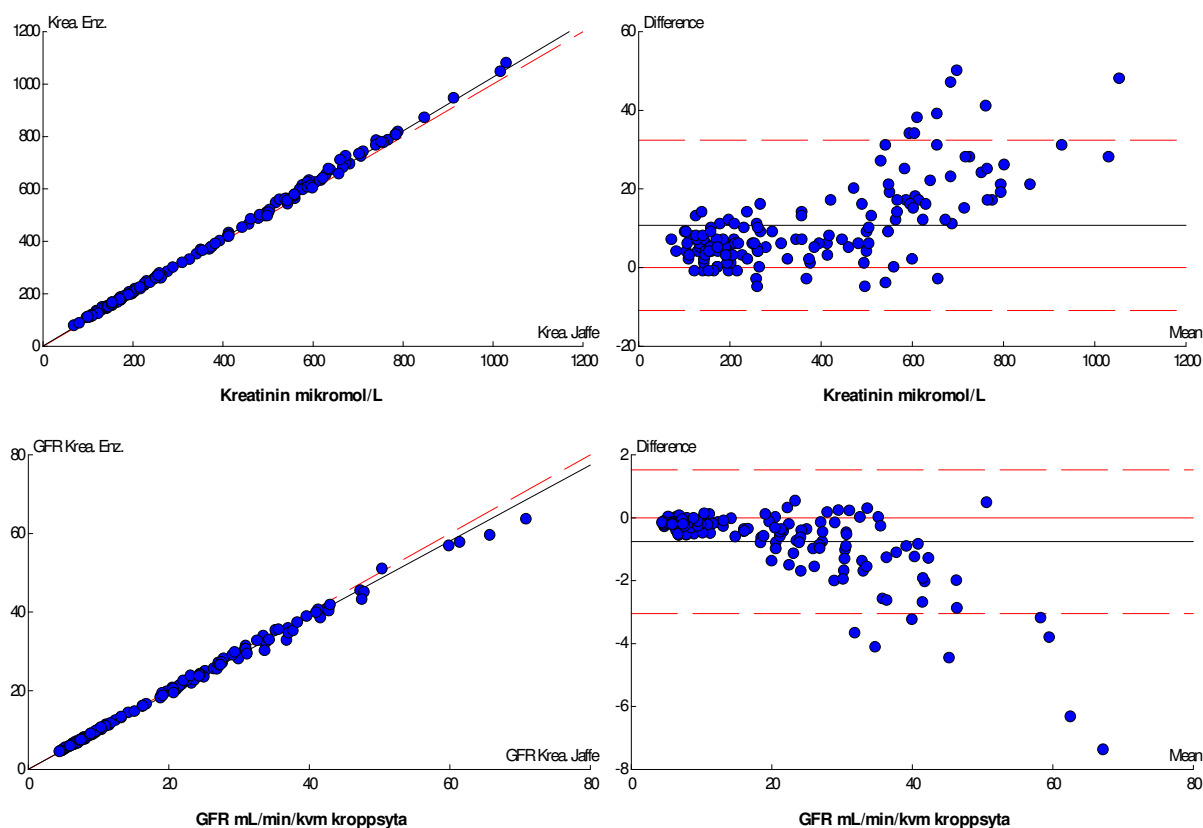
KORRELATIONSSTUDIE MED PROVER FRÅN DIALYSPATIENTER

Korrelation mellan Krea. Jaffe och Krea. Enz.

Regressionsanalysen visade en lutning av 1,03 (95 % konfidensintervall: 1,02 till 1,03) och ett intercept av 0,3 $\mu\text{mol/L}$ (95 % konfidensintervall: -1,0 till 1,9). Skillnaden i lutning var signifikant medan ingen signifikant skillnad kunde ses i intercept. I biasplotten sågs en genomsnittlig differens av 10,8 $\mu\text{mol/L}$ ($\pm 2 S_{\text{Diff}}$: 8,98 till 12,6), vilket visade att differensen var signifikant. Tillsammans åskådliggör dessa resultat att Krea. Enz. generellt gav något högre analysresultat än Krea. Jaffe, dock gällde detta främst vid kreatininkoncentrationer $>400 \mu\text{mol/L}$ (Figur 7, övre).

Korrelation mellan GFR Krea. Jaffe och GFR Krea. Enz.

Regressionsanalysen visade en lutning av 0,97 (95 % konfidensintervall: 0,96 till 0,97) och ett intercept av 0,03 $\text{mL/min}/1,73 \text{ m}^2$ (95 % konfidensintervall: -0,05 till 0,12). Även här var alltså skillnaden i lutning signifikant medan den i intercept ej var signifikant. I biasplotten sågs en genomsnittlig differens av -0,76 $\text{mL/min}/1,73 \text{ m}^2$ ($\pm 2 S_{\text{Diff}}$: -0,95 till -0,57), vilket visade att differensen var signifikant. Tillsammans åskådliggör dessa resultat att GFR Krea. Enz. generellt gav något lägre skattade GFR än GFR Krea. Jaffe, dock gällde detta främst GFR i intervallet 30-60 $\text{mL/min}/1,73 \text{ m}^2$ (Figur 7, nedre).

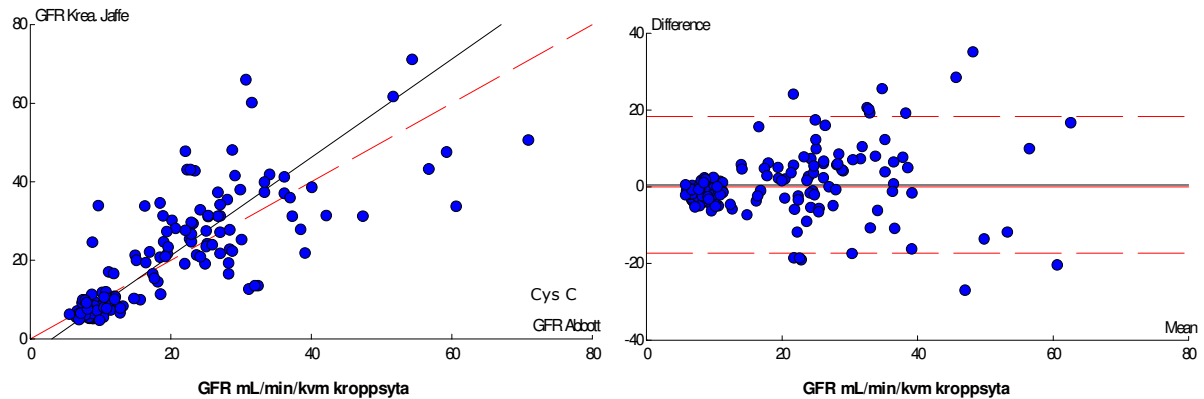


Figur 7. Prover från dialyspatienter ingående i Aleris Medilabs rutinproduktion (n=147).

Passing-Bablok-diagram (vänster) och Bland-Altman biasplot (höger) visande graden av överensstämmelse mellan Krea. Jaffe och Krea. Enz. (övre) samt GFR skattade från dessa analysvärden (nedre). Krea. Jaffe samt GFR Krea. Jaffe är referensmetoder. Passing-Bablok diagram: heldragen linje = metodernas linjaritet, streckad linje = linjaritet vid lutningen 1. Bland-Altman biasplot: x-axeln = medelvärde, y-axeln = differens mellan metoderna, heldragen linje = medeldifferens, streckade linjer = $\pm 2 \text{ SD}$.

Korrelation mellan GFR Abbott Cys C och GFR Krea. Jaffe

Regressionsanalysen visade en lutning av 1,25 (95 % konfidensintervall: 1,12 till 1,38) och ett intercept av -3,83 mL/min/1,73 m² (95 % konfidensintervall: -5,89 till -1,85). I biasplotten sågs en genomsnittlig differens av 0,49 mL/min/1,73 m² ($\pm 2 S_{\text{Diff}}$: -0,98 till 1,96). I lutning och intercept sågs här signifikanta skillnader mellan metoderna medan den genomsnittliga differensen ej var signifikant (Figur 8).

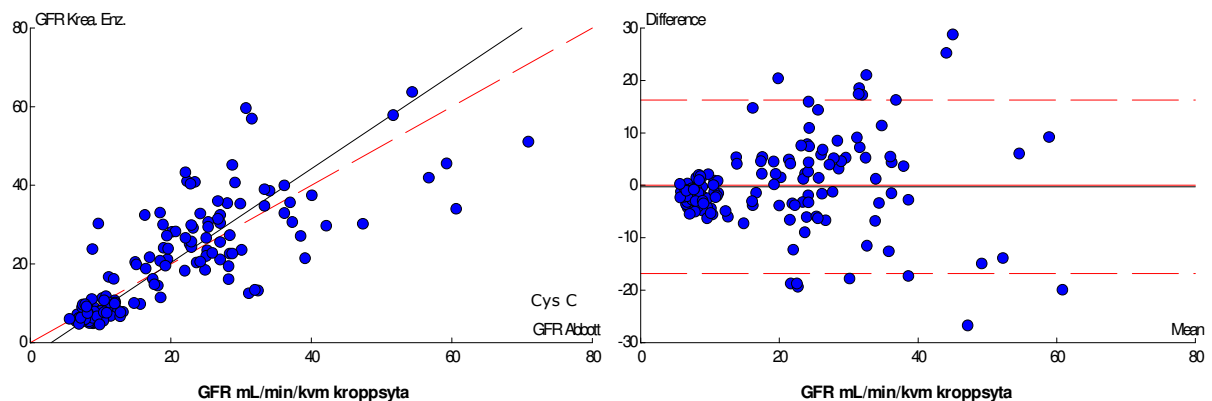


Figur 8. Prover från dialyspatienter ingående i Aleris Medilabs rutinproduktion (n=147).

Passing-Bablok-diagram visande graden av överensstämmelse mellan GFR Abbott Cys C och GFR Krea. Jaffe (vänster) samt biasplot med samma värden (höger). GFR Abbott Cys C är referensmetod. Passing-Bablok diagram: heldragen linje = metodernas linjaritet, streckad linje = linjaritet vid lutningen 1. Bland-Altman biasplot: x-axeln = medelvärde, y-axeln = differens mellan metoderna, heldragen linje = medeldifferens, streckade linjer = ± 2 SD.

Korrelation mellan GFR Abbott Cys C och GFR Krea. Enz.

Regressionsanalysen visade en lutning av 1,19 (95 % konfidensintervall: 1,06 till 1,32) och ett intercept av -3,55 mL/min/1,73 m² (95 % konfidensintervall: -5,41 till -1,55). I biasplotten sågs en genomsnittlig differens av -0,27 mL/min/1,73 m² ($\pm 2 S_{\text{Diff}}$: -1,64 till 1,1). Dessa resultat visar att signifikanta skillnader fanns i lutning och intercept mellan metoderna, medan den genomsnittliga differensen ej var signifikant (Figur 9).



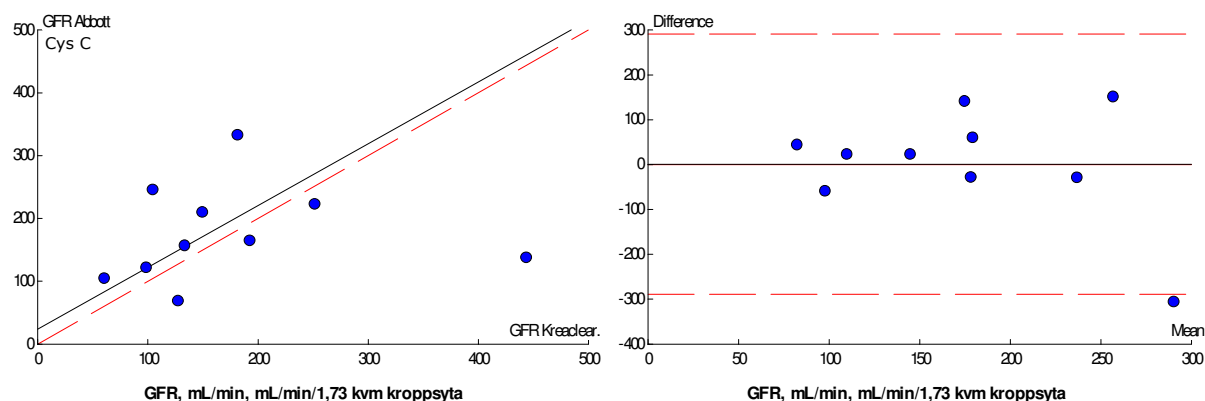
Figur 9. Prover från dialyspatienter ingående i Aleris Medilabs rutinproduktion (n=147).

Passing-Bablok-diagram visande graden av överensstämmelse mellan GFR Abbott Cys C och GFR Krea. Enz. (vänster) samt biasplot med samma värden (höger). GFR Abbott Cys C är referensmetod. Passing-Bablok diagram: heldragen linje = metodernas linjaritet, streckad linje = linjaritet vid lutningen 1. Bland-Altman biasplot: x-axeln = medelvärde, y-axeln = differens mellan metoderna, heldragen linje = medeldifferens, streckade linjer = ± 2 SD.

KORRELATIONSSTUDIE MED PROVER ANALYSERADE FÖR KREATININCLEARANCE

Korrelation mellan GFR Kreactlear. och GFR Abbott Cys C

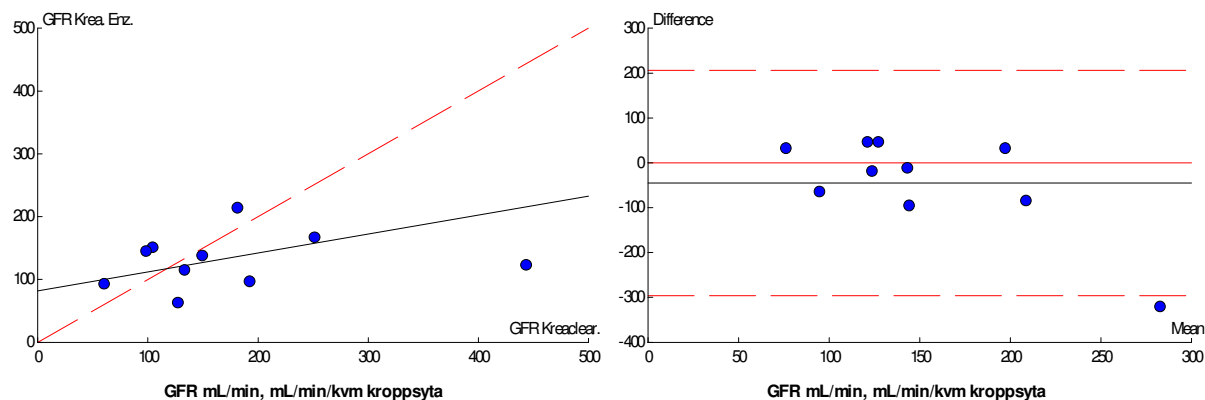
Regressionsanalysen visade en lutning av 0,98 (95 % konfidensintervall: 0,09 till 3,67) och ett intercept av 24,0 mL/min/1,73 m² (95 % konfidensintervall: -338,2 till 145,9). I biasplotten sågs en genomsnittlig differens av 1 mL/min/1,73 m² ($\pm 2 S_{\text{Diff}}$: -90,7 till 92,7). Dessa resultat visade inte på några signifikanta skillnader mellan metoderna, dock var konfidensintervallen så stora att det var svårt att dra någon slutsats av detta (Figur 10).



Figur 10. Prover analyserade för kreatininclearance i Aleris Medilabs rutinproduktion (n=10). Passing-Bablok-diagram visande graden av överensstämmelse mellan GFR Kreactlear. och GFR Abbott Cys C (vänster) samt biasplot med samma värden (höger). GFR Kreactlear. är referensmetod. Passing-Bablok diagram: heldragen linje = metodernas linjaritet, streckad linje = linjaritet vid lutningen 1. Bland-Altman biasplot: x-axeln = medelvärde, y-axeln = differens mellan metoderna, heldragen linje = medeldifferens, streckade linjer = ± 2 SD.

Korrelation mellan GFR Kreactlear. och GFR Krea. Enz.

Regressionsanalysen visade en lutning av 0,30 (95 % konfidensintervall: -0,08 till 1,32) och ett intercept av 81,8 mL/min/1,73 m² (95 % konfidensintervall: -61,7 till 150,8). I biasplotten sågs en genomsnittlig differens av -45,2 mL/min/1,73 m² ($\pm 2 S_{\text{Diff}}$: -125 till 34,2). Dessa resultat visade inte på några signifikanta skillnader mellan metoderna, dock var konfidensintervallen även här väldigt stora varefter antaganden om slutsats utifrån dessa resultat var svåra att göra (Figur 11).



Figur 11. Prover analyserade för kreatininclearance i Aleris Medilabs rutinproduktion (n=10). Passing-Bablok-diagram visande graden av överensstämmelse mellan GFR Kreadclear. och GFR Krea. Enz. (vänster) samt biasplot med samma värden (höger). GFR Kreadclear. är referensmetod. Passing-Bablok diagram: heldragen linje = metodernas linjaritet, streckad linje = linjaritet vid lutningen 1. Bland-Altman biasplot: x-axeln = medelvärde, y-axeln = differens mellan metoderna, heldragen linje = medeldifferens, streckade linjer = ± 2 SD.

STABILITETSSTUDIE

Den ickeparametriska ANOVA-analysen som gjordes visade $p=0,25$. Medelvärdet av analysresultaten från alla 10 prover var dag ett 0,8 mg/L med en standarddeviation av 0,18. Dag åtta var medelvärdet av analysresultaten från alla 10 prover också 0,8 mg/L med en standarddeviation av 0,18. Dessa resultat visade att cystatin C-koncentrationerna i de analyserade proverna inte förändrades nämnvärt under de åtta dagar de analyserades, därmed bedömdes cystatin C vara stabilt i rumstemperatur under denna tidsrymd.

DISKUSSION

De viktigaste resultaten som erhöles i denna studie:

- Abbotts Diagnostics PETIA-metod för analys av cystatin C gav i medeltal 22 % lägre analysresultat än Gentians PETIA-metod för analys av cystatin C. Denna skillnad i analysresultat innebär att det är av stor betydelse att formeln som används för skattning av GFR är framtagen för den använda analysmetoden.
- Med de methodspecifika formler för skattning av GFR som användes i denna studie gav GFR Abbott Cys C i medeltal ca 14 mL/min/1,73 m² högre värden än GFR Gentian Cys C.
- Även GFR skattade efter analys med Abbott Diagnostics enzymatiska metod för analys av kreatinin gav högre skattade GFR än GFR Gentian Cys C, medeldifferensen dessa metoder emellan var 20 mL/min/1,73 m².
- Abbott Diagnostics enzymatiska metod för analys av kreatinin gav i medeltal 17 % högre analysresultat än Abbott Diagnostics Jaffe-metod för analys av kreatinin vid normala koncentrationer, vid höga analytkoncentrationer var skillnaden endast 3 %. Att den enzymatiska metoden gav högre analysvärden beror med stor säkerhet på det negativa intercept som automatiskt appliceras på resultat då Abbott Diagnostics Jaffe-metod används vid Aleris Medilab.

- GFR skattade med MDRD-formeln var beroende av vilken kreatininmetod som användes vid analys.

Kronisk njursjukdom är ett av våra stora hälsoproblem idag. I USA lever ungefär 20 miljoner människor med sjukdomen, av dessa behandlas 400 000 människor med dialys [2]. Antal människor som drabbas av kronisk njursjukdom förutspås öka i framtiden, år 2030 räknar man med att två miljoner amerikaner kommer att vara i behov av dialys eller njurtransplantation [14]. Bedömning av GFR är en viktig del i diagnostisering och uppföljning av patienter med kronisk njursjukdom. GFR kan skattas antingen genom clearance av exogena substanser (exempelvis inulin), clearance av endogena substanser (kreatininclearance) eller genom mätning av endogena substanser i blod (kreatinin eller cystatin C) [15]. Kreatinin mätt i serum eller plasma är den absolut vanligast använda markören då GFR skattas i klinisk verksamhet, detta trots att kreatinin har flera begränsningar som markör för njurfunktion. Kreatinin är till exempel inte känsligt nog för att upptäcka mindre minskningar i GFR samtidigt som koncentrationen av markören påverkas av ålder, kön, muskelmassa, fysisk aktivitet och diet [16]. På grund av detta finns behovet av en bättre markör för njurfunktion som kan användas separat eller fungera som ett komplement till kreatinin. På senare tid har cystatin C mätt i serum eller plasma föreslagits som en bra markör för njurfunktion. Cystatin C påverkas inte i samma utsträckning som kreatinin av ålder och muskelmassa, däremot kan koncentrationen av cystatin C i blodet påverkas av tyreoidaefunktion och behandling med kortikosteroider [16]. I kliniken svaras endast GFR som skattats efter kreatininanalys ut då det understiger 60 mL/min/1,73 m², överstiger resultaten denna gräns svaras de ut som >60 mL/min/1,73 m². Då analys av cystatin C används för skattning av GFR svaras resultat ut då de understiger 90 mL/min/1,73 m², resultat över denna gräns svaras ut som >90 mL/min/1,73 m² [17]. Detta är på grund av den undermåliga precision som uppnås vid GFR över dessa gränsvärden, vilket illustreras väl i de grafer och plottar som framställts i denna studie.

CV-studierna som gjordes med avseende på cystatin C visade på god precision både då kontrollmaterial och patientprover analyserades. Dessa resultat stämmer väl överens med en tidigare studie där precision hos Abbott Diagnostics cystatin C-reagens undersökts [16]. CV-studierna med avseende på kreatinin analyserat med enzymatisk metod visade även dessa på god precision både då kontrollmaterial och patientprover analyserades. Lägst CV erhöles vid analys av hög kontroll; att precisionen är god vid höga kreatininnivåer är viktigt då detta är av stor klinisk signifikans.

Då Abbott Diagnostics PETIA-metod för analys av cystatin C validerades var det av stort intresse att se hur väl denna metod korrelerade till en välvaliderad extern analysmetod för cystatin C som redan används i rutinverksamhet, i detta fall Gentians PETIA-metod. Detta är ett viktigt steg i valideringsprocessen av en metod då olika laboratorier skall kunna lämna samstämmiga analysresultat trots olika metodleverantörer. Även korrelationen till de två analysmetoder som i dagsläget används för skattning av GFR vid Aleris Medilab, Jaffe-metoden för analys av kreatinin samt kreatininclearance, var betydelsefull. Dessutom undersöktes korrelationen till den andra i denna studie validerade metoden, Abbott Diagnostics enzymatiska metod för analys av kreatinin.

Utifrån erhållna resultat kunde slutsatsen dras att Abbott Cys C gav lägre analysresultat och därmed högre skattade GFR än Gentician Cys C. Dock var överensstämmelsen mellan metoderna bättre vid lägre analytkoncentrationer. Liknande korrelation mellan Gentician Cys C och Abbott Cys C har tidigare påvisats varvid konklusionen att denna skillnad i resultat troligtvis beror på val av kalibratorer antagits. Då en internationell kalibrator för cystatin C-metoder beräknas bli tillgänglig under år 2009 förväntas bättre överensstämmelse mellan

olika tillverkares metoder kunna uppnås [16]. Skillnader i analysnivåer mellan tillgängliga cystatin C-metoder har också konstaterats i EQUALIS (Extern kvalitetssäkring inom laboriemedicin i Sverige) kvalitetssäkringsprogram för proteinanalyser. Enligt EQUALIS (analysomgång 2008-51) underskattade tre av de fyra i klinisk verksamhet använda cystatin C-metoderna GFR. Den metod som gav GFR som stämde bäst överens med det som uppmätts med referensmetod var Dade Behrings PENIA-metod, vilken i en tidigare studie visats ha stark korrelation till Abbott Diagnostics PETIA-metod för analys av cystatin C [16]. Detta tyder på att Abbott Diagnostics PETIA-metod möjligtvis ger mer riktiga GFR än den korrelerade metoden i denna studie, Gentians PETIA-metod för analys av cystatin C.

I EQUALIS kvalitetssäkringsprogram (analysomgång 2008-51 och 2009-14) framträdde också bilden av att de metoder som i dagsläget finns tillgängliga för cystatin C-analys ger värden och skattade GFR som varierar stort. Då Gentians och Abbott Diagnostics PETIA-metoder jämfördes i denna studie var skillnaden i analysvärde i medeltal 22 % medan skillnaden i skattade GFR i medeltal var 32 %. Dessa resultat placerar sig inom ramen för den mellanlaboratoriespridning som EQUALIS presenterat, därmed torde inte skillnaden i analysresultat mellan dessa två metoder vara större än mellan de metoder som idag används i klinisk rutinverksamhet. Det bör dock påpekas att det ur medicinsk synvinkel inte är optimalt med så stora skillnader mellan metoder som mäter samma analyt.

GFR skattade utifrån Abbott Cys C jämförda med GFR Krea. Jaffe visade störst överensstämmelse då konsekutivt insamlade öppenvårdsprover analyserades vilket tyder på att metoderna ger bäst överensstämmelse vid relativt normala GFR. Vid lägre GFR var samstämmigheten metoderna emellan sämre. Detta visades genom korrelation med prover från dialyspatienter. Då prover från dialyspatienter används för korrelationsstudier i detta arbete är det viktigt att ha i åtanke att de GFR som skattas utifrån dessa analysresultat är artificiella och speglar således inte patienternas njurfunktion. GFR används inte i praktiken som mått på njurfunktion hos patienter som behandlas med dialys.

När GFR beräknade utifrån Abbott Cys C jämfördes med GFR Krea. Enz. gav GFR Krea. Enz. konsekvent lägre skattade GFR. Flera signifikanta skillnader kunde belysas mellan dessa två metoder, störst var skillnaderna vid lägre analytkoncentrationer och därmed högre skattade GFR. Dessa skillnader metoderna emellan var så stora att de kan tänkas ha klinisk betydelse.

GFR Abbott Cys C korrelerades också till GFR Kreaclear. Gällande denna korrelationsstudie med prover analyserade för kreatininclearance är det viktigt att ha i åtanke att detta beräknande av GFR med utgångspunkt i patienternas S-Kreatinin samt U-Kreatinin ger svar i absoluta GFR (mL/min). I denna studie jämfördes således absoluta GFR med de relativa GFR (mL/min/1,73 m²) som beräknats utifrån analys av S-Cystatin C. Då alla prover i denna studie var tagna från vuxna individer kunde antagandet göras att de ej avvek nämnvärt från den genomsnittliga normala kroppsytan 1,73 m² [7]. För att korrekt kunna korrelera dessa GFR till varandra skall egentligen absolut GFR räknas om till relativt GFR eller vice versa. För att denna omvandling skall vara möjlig måste information om längd och vikt för varje individ erhållas. Denna information fanns ej tillgänglig vid denna studie. De resultat som erhöles då GFR Abbott Cys C korrelerades mot GFR Kreaclear. visade inte på några signifikanta skillnader mellan metoderna. Dock så var de 95 % -iga konfidensintervallen stora varför det är svårt att dra slutsatsen att dessa metoder är jämförbara för skattning av GFR. Att endast 10 patientprover användes i studien gör det också svårt att dra några slutsatser.

Metoden att skatta GFR genom kreatininclearance har flera felkällor: en stor felkälla är urinsamlandet. För att få ett så pålitligt resultat som möjligt är det av stor vikt att patienten samlar all sin urin i 24 timmar, över- eller undersamlade leder till felaktigt skattade GFR. En annan felkälla är den tubulära sekretionen av kreatinin vilken leder till att GFR skattade genom kreatininclearanceberäkning överskattas [18].

Då Abbott Diagnostics enzymatiska metod för analys av kreatinin validerades var det av största intresse att se hur väl denna metod korrelerade till den vid laboratoriet redan etablerade Jaffe-metoden för analys av kreatinin. Det är sedan tidigare känt att Jaffe-metoden är känslig för interferens från pseudokreatininer, vilket leder till högre analysvärden. Därmed torde enzymatiska metoder för analys av kreatinin, som generellt inte påverkas av sådan interferens, ge lägre och mer riktiga analysvärden [19]. Att ersätta den etablerade Jaffe-metoden med en enzymatisk metod vid analys i rutinverksamhet vinner allt mer stöd då bevis finns för att enzymatiska metoder ger mer specifika analysresultat [11]. Då funderingar om att byta ut den gamla Jaffe-metoden för analys av kreatinin mot Abbott Diagnostics enzymatiska metod fanns på laboratoriet var denna korrelationsjämförelse viktig. Korrelation mellan GFR Krea. Enz. och GFR beräknade utifrån analys med Gentians PETIA-metod för analys av cystatin C undersöktes också för att få ett mått på hur bra Abbott Diagnostics enzymatiska metod för analys av kreatinin korrelerade till en extern analysmetod. Även korrelation till den andra i denna studie validerade metoden, Abbott Diagnostics PETIA-metod för analys av cystatin C, undersöktes. Dessutom korrelerades GFR Krea. Enz. mot resultat för kreatininclearance. Då metoden att skatta GFR genom beräkning av kreatininclearance inte rekommenderas längre förväntades GFR skattade genom analys av kreatinin med Abbott Diagnostics enzymatiska metod vara riktigare.

Utifrån erhållna resultat kunde slutsatsen dras att Krea. Enz. konsekvent gav högre analysresultat och därmed lägre skattade GFR än Krea. Jaffe. Denna differens var dock störst vid normala kreatininnivåer där skillnaden metoderna emellan i medeltal var 17 %. I studien med dialyspatienter, vilka nästan uteslutande hade kreatininnivåer långt över referensintervallet, sågs en avsevärt bättre korrelation med en skillnad som i medeltal bara var 3 %. Detta kan anses bero på effekter av dialysen då okända interferenser kanske undviks på grund av denna behandling. En annan möjlig orsak kan vara det faktum att den kända pseudokreatinininterferensen inte har lika stor påverkan på differensen metoderna emellan vid så pass höga analysvärden. Att Abbott Diagnostics enzymatiska metod för analys av kreatinin gav högre analysresultat än Jaffe-metoden kan tyckas överraskande då det är känt att interferens av pseudokreatininer kan utgöra upp till 20 % av det uppmätta kreatininvärdet då normalt serum analyseras med Jaffe-metoden [19]. Eftersom enzymatiska metoder för analys av kreatinin inte påverkas av sådan interferens torde de alltså ge lägre analysvärden. Abbott Diagnostics Jaffe-metod som använts i denna studie är dock modifierad och har ett negativt intercept av -18,2 vilket automatiskt subtraheras från varje analysresultat, detta för att bortse från den kända interferensen av pseudokreatininer. Denna faktor har tagits fram genom en kalibrering med kreatininfritt serum från EQUALIS. Om vi då bortser från detta negativa intercept gav Jaffe-metoden även i denna studie högre kreatininvärden än Abbott Diagnostics enzymatiska metod. Antagandet kan också göras att den genomsnittliga sanna interferensen i de analyserade proverna är lägre än 18,2 %, vilket kan förklara att den enzymatiska metoden gav högre analysvärden i denna studie.

När GFR skattade utifrån Krea. Enz. jämfördes med GFR Gentian Cys C visades att GFR Gentian Cys C gav >10 % lägre skattade GFR.

Ur jämförelsen av GFR skattade från Krea. Enz. mot GFR Abbott Cys C kunde det fastställas att GFR Abbott Cys C gav högre skattade GFR inom normalområdet. Då prover från dialyspatienter, som företrädesvis hade låga GFR, analyserades gav GFR Abbott Cys C något lägre skattade GFR. Denna skillnad kan möjligtvis bero på det faktum att dialyspatienternas blod inte är likvärdigt med blod från personer som inte behandlas med dialys, då dialysbehandlingen renar blodet från en mängd komponenter. Således är användandet av blod från dialyspatienter inte helt optimalt vid dessa korrelationsstudier, dock ger det ändå en viss bild av korrelation vid höga analytkoncentrationer.

GFR Krea. Enz. jämfördes också mot GFR Kreaclear. Resultaten som erhöles vid denna studie tyder på att GFR Krea. Enz. ger lägre skattade GFR än GFR Kreaclear., dock är de 95 % -iga konfidensintervallen väldigt stora. Detta, tillsammans med det faktum att endast 10 patientprover användes till studien, gör det svårt att dra slutsatser av dessa resultat.

Enligt information från Abbott Diagnostics är kreatinin i serum eller plasma hållbart i sju dagar både vid förvaring i 2-8°C och 20-25°C. Cystatin C har tidigare visats vara stabilt i upp till 21 dagar vid förvaring i 4°C [9]. I denna studie undersöktes stabiliteten hos cystatin C vid förvaring i rumstemperatur. Då den ickeparametriska ANOVA-analysen visade $p=0,25$ samt minimala förändringar i medelvärde och standarddeviation mellan dagarna under den undersökta tidsrymden kan slutsatsen dras att cystatin C är stabilt i rumstemperatur i åtta dagar. Denna kunskap om stabiliteten hos cystatin C är av vikt då prover vid transport mellan provtagningsenhet och laboratorium ofta förvaras i rumstemperatur.

Sammanfattningsvis visar de olika resultat av skattade GFR som erhöles i denna studie beroende på val av metod för mätning av cystatin C respektive kreatinin, hur relativt osäkra skattade GFR är som mått på njurfunktion. De validerade metoderna från Abbott Diagnostics visade dock god precision och bedöms utgöra intressanta alternativ för mätning av cystatin C och kreatinin. Då det gäller cystatin C är behovet av en internationell kalibrator stort för att uppnå bättre överensstämmelse mellan metoderna.

För att ytterligare bygga på denna studie skulle en jämförelse av dessa metoder mot en referensmetod, förslagsvis inulin- eller iohexolclearance, vara av stort intresse. Detta skulle kunna ge en bättre bild av vilka i denna studie ingående metoder som ger bäst korrelation till referensmetoden och därmed kan antas ge riktiga resultat. Då antalet patienter med försämrad njurfunktion inom hälso- och sjukvården förväntas öka markant i framtiden torde det vara av största intresse att GFR skattas på bästa sätt i kliniken.

ACKNOWLEDGEMENT

Först och främst vill jag tacka mina förträffliga handledare Christian Löwbeer och Hans Wallinder för att ni gav mig möjligheten att genomföra detta projekt. Tack för ert engagemang samt all den hjälp och alla intressanta synvinklar som ni har försett mig med under arbetets gång. Tack till Avdelningen för klinisk kemi och farmakologi, Akademiska sjukhuset, Uppsala för de prover ni försåg mig med. Jag vill också tacka Solveig Eckerbom från Abbott Diagnostics för hjälp med att sätta upp metoderna och Zübeyde Yesilekin för upplärning på instrumentet Architect c8000. Avslutningsvis vill jag också passa på att tacka all personal på Avdelningen för klinisk kemi vid Aleris Medilab, jag har känt mig mycket välkommen hos er!

REFERENSER

- [1] St. Peter, WL: Introduction: Chronic Kidney Disease: A Burgeoning Health Epidemic, *Journal of Managed Care Pharmacy* (2007); **13**: 2-5.
- [2] Jaar, BG et al: Principles of Screening for Chronic Kidney Disease, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* (2008); **3**: 601-609.
- [3] Eknoyan, G: Progress and Promise in the Management of Chronic Kidney Disease, *Canadian Medical Association Journal* (2008); **179 (11)**: 1107-1108.
- [4] Prigent, A: Monitoring Renal Function and Limitations of Renal Function Tests, *Seminars in Nuclear Medicine* (2008); **38**: 32-46.
- [5] Tidman, M. Sjöström, P och Jones, I: A Comparison of GFR Estimating Formulae Based upon S-Cystatin C and S-Creatinine and a Combination of The Two, *Nephrology Dialysis Transplantation* (2008); **23**: 154-160.
- [6] Hallberg, P. et al: Cystatin C vs Creatinine as Markers of Renal Function in Patients on Digoxin Treatment, *Uppsala Journal of Medical Sciences* (2004); **109**: 247-253.
- [7] Du Bois, D och Du Bois, DF: A Formula to Estimate the Approximate Surface Area if Height and Weight Be Known, *Nutrition* (1989); **5 (5)**: 303-311.
- [8] Hansson, L-O. et al: Dagens Svenska Metoder För Att Mäta Njurfunktion Måste Bli Bättre, *Läkartidningen* (2008); **105**: 731-734.
- [9] Flodin, M. et al: Evaluation of Gentian Cystatin C Reagent on Abbott Ci8200 and Calculation of Glomerular Filtration Rate Expressed in mL/min/1,73 m² From the Cystatin C Values in mg/L, *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* (2007); **67**: 560-567.
- [10] Sterner, G. et al: Determining 'True' Glomerular Filtration Rate in Healthy Adults Using Infusion of Inulin and Comparing it with Values Obtained Using Other Clearance Techniques or Prediction Equations, *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* (2008); **42**: 278-285.
- [11] Panteghini, M: Enzymatic Assays for Creatinine: Time for Action, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (2008); **46 (4)**: 567-572.
- [12] Delanaye, P. et al: Analytical Study of Three Cystatin C Assays and Their Impact on Cystatin C-Based GFR-Prediction Equations, *Clinica Chimica Acta* (2008); **398**: 118-124.
- [13] Aronsson, T och Groth, T: Nested Control Procedures for Internal Quality Control: Theoretical Design and Practical Evaluation, *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* (1984); **172**: 51-64.
- [14] Stevens, L. A. et al: Assessing Kidney Function – Measured and Estimated Glomerular Filtration Rate, *The New England Journal of Medicine* (2006); **354**: 2473-2483.
- [15] Bandaranayake, N. et al: Intra-Individual Variation in Creatinine and Cystatin C, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (2007); **45**: 1237-1239.
- [16] Flodin, M och Larsson, A: Performance Evaluation of a Particle-Enhanced Turbidimetric Cystatin C Assay on the Abbott ci8200 Analyzer, *Clinical Biochemistry* (2009); **Epub Ahead of Print**: March 10.
- [17] Simonsson, P: Lär Känna Din Patients GFR! *Läkartidningen* (2009); **106**: 425-427.
- [18] Le Riche, M. et al: An Audit of 24-Hour Creatinine Clearance Measurements at Tygerberg Hospital and Comparison With Prediction Equations, *South African Medical Journal* (2007); **97 (10)**: 968-970.
- [19] Vickery, S. et al: Does the ID-MS Traceable MDRD Equation Work and is it Suitable for Use with Compensated Jaffé and Enzymatic Creatinine Assays? *Nephrology Dialysis Transplantation* (2006); **21**: 2439-2445.