

# Stanovení chloridů v séru metodami ionově selektivních elektrod (ISE). Standardizace bez harmonizace.

Friedecký B.<sup>1</sup>, Kratochvíla J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ÚKBD LF a FN Hradec Králové

<sup>2</sup> SEKK Pardubice

## SOUHRN

Nedostatečná úroveň analytické kvality měření chloridů v séru, plasmě a krvi rutinními laboratorními metodami ISE je prokázána výsledky externího hodnocení kvality – EHK (čtyř programů), vyhodnocením interferencí bikarbonátů a dlouhodobým sledováním výsledků pacientů v asi 130 laboratořích v různých zemích. Základním problémem jsou vysoké rozdíly mezi testovacími soupravami nebo mezi přístroji různých výrobců. Příčinou je nedostatečná selektivita a stabilita signálu řady rutinně používaných chloridových elektrod, důsledkem je nízká diagnostická efektivita výsledků měření, kterou lze demonstrovat pomocí extrémně vysokých hodnot kritických referenčních změn (RCV). Přitom již řadu let existuje funkční referenční systém měření chloridů i metrologická návaznost kalibrace rutinních metod na něj.

*Klíčová slova:* chloridy, ISE, bias, EHK, bikarbonáty.

## SUMMARY

**Friedecký B., Kratochvíla J.: Determination of chlorides in serum by methods with ion-selective electrodes (ISE). Standardization without harmonization.**

Insufficient level of analytical quality of chloride determination in blood serum and plasma using routine ISE methods has been demonstrated by the external quality assessment (EQA), by assessment of bicarbonate interference, and long-term follow-up of patient results in approx. One hundred thirty laboratories in several countries. The principal issues are considerable differences between test kits and instruments of various producers. The cause is insufficient selectivity and signal stability of many commonly used chloride electrodes, leading to low diagnostic effectivity of measurement results. This can be demonstrated by extremely high reference change values (RCV). Paradoxically, for many years there was a functional reference system of chloride measurement and metrological traceability of routine methods calibration.

*Keywords:* chlorides, ISE, bias, external quality assurance, bicarbonates.

## Úvod

Potřeba prověření stavu harmonizace laboratorních vyšetření souvisí s kvalitou dat při digitalizaci, s problémem věrohodnosti „big dat“ a efektivitou metod strojového učení. Této potřebě vychází vstříc nově vytvářený program vycházející ze směrnice IVDR 746 (navzdory její kontroverzní podobě). Několik základních informací o charakteru a kontroverzích IVDR je spolu s citacemi k dispozici ve stručném článku, publikovaném v bulletinu FONS [1]. Nejpřímější cestou k harmonizovaným výsledkům je standardizace měření založená na příslušném referenčním systému (referenční metoda a referenční materiál) a metrologické návaznosti kalibrace měření na něm. V některých případech však problémy rutinních laboratorních metod, ať už prováděných na automatických analyzátořech nebo na POCT systémech, nezaručí harmonizované výsledky ani při existenci standardizace, metrologické návaznosti a referenčního systému. Do této kategorie patří stanovení koncentrace chloridů v séru, plasmě a krvi. Myslíme, že zkušení pracovníci klinických rutinních laboratoří nebudou tímto tvrzením příliš překvapeni.

## Úroveň harmonizace výsledků chloridů

Je popsána vybranými soubory dat, uvedených v Tabulkách 1 až 6. Komentáře k těmto tabulkám následují. V Tabulce 1 jsou uvedeny hodnoty relativních bias, vypočtené jako rozdíly mezi průměry stejnorodých metodických skupin (peer groups) a referenční metodou ICP-IDMS (v provedení nizozemské organizace Dutch external quality assurance) (SKML Nizozemí) nebo referenční coulometrickou metodou (v provedení Referenční laboratoře MH Hannover pro Referenzinstitut für Bioanalytik Bonn (RfB)) (SEKK ČR). Kontrolní materiály jsou lyofilizáty, španělské materiály „Spain 1 gen“ mají validovanou komutabilitu. Hodnoty bias se pohybovaly v rozmezí -7 % až 1 % [2, 3]. Hodnoty jsou bez významných rozdílů mezi třemi různými programy externího hodnocení kvality (SKLM-Nizozemí, SEKK-Česká republika, EQA SEQCML1 gen-Španělsko). Od roku 2021 lze u analytických platform Roche korigovat bias pomocí poměru b/a (tedy směrnice a úseku) kalibrační funkce zatím s omezeným efektem pro zlepšení výsledků uvnitř referenčního intervalu, ale bez zlepšení zejména v oblasti nízkých koncentrací chloridů.

**Table 1.** The bias of chloride values in control samples EQAS SKML (NL), SEKK (CZ) in 2019-2021 and in commutable samples (Spain 1 gen) 2015-2016.

Manufacturer	SKML	SEKK	Spain 1 gen
Abbott	≤1	≤-2	≤1
Beckman	-2 to -3	-4 to -5	-1 to 1
Roche	-3 to -6	-5 to -7	0 to -3.5
Siemens Advia	≤-1	-	-1 to 2
Siemens Atellica	0 to -3	-	

Ve shodě s dřívějším pozorováním (Tabulka 2) významně interferují bikarbonáty [4]. Trendy a velikosti interference jsou u sér pacientů závislé na metodě a přístroji a velmi rozdílné s bias -4 % až 7 %. Příčina je řadu let známá a spočívá ve snížené selektivitě chloridových elektrod na bázi kvarterních amoniových bází jako ionexu ve srovnání s elektrodami typu Ag/AgCl. Přesto však interference nadále přetrvávají bez efektivní korekce ze strany výrobců nebo reakce ze strany zákazníků/laboratoří [4, 5]. Aktuální publikace [5] se speciálně zaměřuje na produkty firmy Roche a konstatuje shodně s jinými údaji vysoké hodnoty negativního bias.

**Table 2.** Bias influenced by HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration (SKML) in pools of patient's sera.

HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mmol/L)	Manufacturer	Bias (%)
11	Roche	-4
	Siemens ADVIA	-1
	Radiometer	1
	Siemens Rapidpoint	1
22	Roche	-2
	Siemens ADVIA	-1
	Radiometer	2
	Siemens Rapidpoint	2
32	Roche	0
	Siemens ADVIA	3
	Radiometer	4
	Siemens Rapidpoint	5

Rozdíly mezi průměry a mediány stejnorodých skupin metod a průměry (ALTM – all laboratory trimmed mean) a mediány všech účastníků jsou u kontrolních vzorků ještě vyšší, než u metod na automatických analyzátořech a dosahují hodnot 7 až 8 mmol/L. A to navzdory faktu, že uvedené výsledky byly dosaženy s použitím kontrolních materiálů s mnohem jednodušší maticí (pufrovaný vodný roztok albuminu). Vztažné hodnoty obou programů jsou navíc určeny přístroji Radiometer bez jakéhokoliv využití referenční metody a referenčního materiálu.

**Table 3.** Interval of robust mean values (ALTM) or medians in POCT equipment EQA SEKK CZ 2019-2021 and RfB Bonn Germany 2022 by specified method groups.

EQA system	ALTM (mmol/L)	ALTM interval low values (mmol/L)	ALTM (mmol/L)	ALTM interval higher values (mmol/L)
SEKK 2019	95	93 to 100	127	122 to 130
SEKK 2021	96	93 to 100	128	122 to 131
	Median (mmol/L)	Median of low value groups (mmol/L)	Median (mmol/L)	Median of higher value groups (mmol/L)
RfB Bonn 2022	93	93 to 99.5	110	110 to 118
RfB Bonn 2022	102	101 to 108.5	93	93 to 100

Data dlouhodobé studie, sledující denní pohyb hodnot percentilů pacientů ukazují rovněž významné rozdíly mezi hodnotami různých metod, srovnatelné s diferencemi u výsledků EHK v Tabulce 1 [6]. Studie přitom nepostrádá dostatečnou robustnost. Jde o výsledky 126 laboratoří z celého světa s 250 přístroji různých typů a s daty, dlouhodobě pořízenými za 6 až 8 týdnů hodnocení.

**Table 4.** Patients median in international long term „percentile“ experiment 2014.

Manufacturer	Median (mmol/L)
Roche Cobas	101.0
Roche Modular	102.0
Siemens ADVIA	105.0
Vitros	102.5
Siemens Dimension	104.0
Abbott Architect	104.5
Beckman-AU	104.5

Další data ukazují suboptimální hodnoty koncentrací chloridů v některých kontrolních vzorcích z hlediska klinických potřeb, a to nejen v programech EHK SEKK a RfB Bonn. Klinická významnost kontroly kvality stanovení chloridů je maximální u pacientů na intenzivní péči pro hodnocení jejich akutního stavu zejména u metabolických alkalóz a pro odhad hodnot AG (anion gap). Ale k tomu účelu bylo alespoň v posledních letech použito v EHK velmi málo optimálních vzorků kontrolních materiálů (s koncentrací pod 90 až 95 mmol/L). Z Tabulky 5 je to zjevné. Naopak počet vzorků se zvýšenými koncentracemi chloridů je extrémní. U cyklu POCT (SEKK-ABR) není situace o moc lepší.

**Table 5.** Chloride concentration (mmol/L) in control samples SEKK (CZ) in 2019-2022

EQA target values (mmol/L) in AKS surveys	<96 mmol/L	>110 mmol/L
Number of samples	2 (6 %)	20 (63)
EQA target values in ABR surveys	<91 mmol/L	>110 mmol/L
Number of samples	4 (12 %)	4 (12 %)

**Table 6.** Reference change values (RCV) of chloride derived from the biological variation database [7]

Reference change value (%)	EuBIVAS 2018	Westgard 2014
RCV interval (publication)	4.4 to 4.5	1.9 to 2.2
CV = 1 %	3.3 to 3.4	
CV = 2 %	5.1 to 5.4	
CV = 3 %	7.1 to 7.7	

Hodnoty kritické referenční změny (RCV), vykazují významný potenciál k hodnocení klinické ekvivalence výsledků, a ukazují významný rozdíl v obou existujících databázích. Novější databáze EuBIVAS EFLM je v současnosti považována za reálnější [8]. Extrémní závislost hodnot RCV na laboratorní preciznosti je zřejmá. Hodnoty RCV u chloridů jsou vypočteny za předpokladu, že hodnota bias je kompenzována kalibrací, tedy blízká nule. Reálné hodnoty bias, uvedené v Tabulkách 1 až 4 však ukazují, že problémy s klinickou interpretací výsledků měření chloridů jsou extrémně veliké právě v důsledku jejich enormních velikostí. Tedy zde by bylo v praxi nutné při výpočtech brát v úvahu reálné hodnoty bias.

## Diskuse

Standardizace na bázi příslušného referenčního systému (referenční metoda a referenční materiál) stejně jako metrologická návaznost u stanovení chloridů sice již mnoho let existuje, harmonizace výsledků rutinních měření a jejich klinická ekvivalence však nejsou zdaleka na potřebné úrovni.

Rozdíly mezi metodami jsou vysoké, referenční systémy málo využívané nebo vůbec nevyužívané nebo nevyužitelné (ve většině programů EHK a u metod POCT). Situace je z hlediska srovnatelnosti, ekvivalence a harmonizace neutěšená, efektivita a užitečnost takových výsledků pak nejistá.

Kontrolní materiály EHK nemají vždy všechny potřebné koncentrace (málo hodnot koncentrací chloridů pod 90 až 95 mmol/L) pro zajištění kvality nejčastěji se vyskytujících stavů snížených chloridů v séru u metabolických alkalóz a s tím souvisejících odhadů hodnot AG (anion gap).

Nejpravděpodobnější příčinou nízké ekvivalence výsledků měření mezi různými systémy a analytickými platformami (ovlivnění interferencemi bikarbonátů a závislostí na koncentraci chloridů ve vzorku), je kvalita elektrod a jejich konstrukcí. Problémy měření metodami ISE byly detekovány už ke konci minulého století, nicméně přes kvalitně provedenou kompletní standardizaci měření nejsou vyřešeny dodnes. A to i navzdory existující, ale zdá se, že poněkud ignorované studii IFCC [9]. Korekce výsledků, zavedená od roku 2021 u Roche ISE metod má patrně zatím pozitivní dosah u koncentrací chloridů uvnitř referenčního intervalu, zatímco u snížených hodnot (nejpodstatnějších v diagnostice) je její vliv nedostatečný. Jiný tým holandských autorů [5] uvádí, že referenční materiály Roche samy o sobě obsahují vysoké koncentrace bikarbonátů a že při snížení

koncentrací bikarbonátů v připraveném nekomerčním kalibrátoru z 30 mmol/L bikarbonátů na 20 mmol/L poklesl počet výsledků s bias pod -3 % ze 77 % na 13 %! To dobře ukazuje nízkou robustnost měření chloridů metodami ISE.

Lze si pomoci vyjasnit situaci obecně přístupnou databází biologických variabilit a postupů výpočtu hodnot kritických referenčních změn následných měření (RCV)? Data RCV jsou vypočtena za předpokladu validované komutability materiálu a hodnoty bias, blízké nule [7]. Taková situace však platí jen v několika málo případech měření (Tabulky 1 až 4). Ve většině případů je hodnota bias a následně i RCV natolik vysoká, že lze na jejich podkladě pochybovat o možnosti dostatečné úrovně klinické interpretace. Standardizace a metrologická návaznost kalibrace mají za úkol eliminovat (minimalizovat) hodnoty bias, ale v praxi toho není dosahováno.

K dosažení požadované úrovně klinické ekvivalence a taky k potřebám využití souborů „big dat“ při aplikaci strojového učení (machine learning) by bylo zapotřebí značného úsilí k dosažení harmonizace mezi testovacími soupravami a analytickými platformami výrobců navzdory dlouho existující, formální standardizaci měření. Zejména to pak platí u POCT měření. Naproti tomu při hodnocení dat, získaných v EHK nejsou registrovány podstatné rozdíly mezi metodami ISE s ředěním a bez ředění vzorků.

Měření chloridů v séru (plasmě, krvi) je sice obecně považováno již mnoho let za zcela standardizované, data však ukazují potřebu jeho důkladné revize ve shodě s prací nizozemských autorů ze strany výrobců a ve smyslu zásad IVDR 746 [1].

## Literatura

1. **Friedecký, B., Kratochvíla, J.** IVDR In Vitro Diagnostic Device Requirement. Implementace nové evropské směrnice IVDR a její dopady. *FONS*, 2022, 2, s. 13-15.
2. **Koostra-Ros, J. E., van der Hagen, E. A. E., van Schroyen Lantman, M., Thelen, M., van Berkel, M. et al.** (In)direct chloride ISE measurements, room for improvement. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2022, 60(7), e168-e171. Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/cclm-2022-0220>.
3. **Ricós, C., Perich, C., Boned, B., Gonzáles-Lao, E., Diaz-Garzón, J. et al.** Standardization in laboratory medicine: Two years experience from category 1 EQA programs in Spain. *Biochemia Medica (Zagreb)*, 2019, 29(1), 010701. Dostupné: <https://doi.org/10.11613/BM.2019.010701>
4. **Dimeski, G., Clague, A. E.** Bicarbonate interference with chloride-ion-selective electrodes. *Clin. Chem.*, 2004, 50(6), s. 1106-1107.
5. **Monteyne, T., Oyaert, M., Van Dalem, A., Godefroid, M., Cuyks, M. et al.** Impact of bicarbonate interference on routine ion-selective electrode chloride measurements. *Ann. Lab. Med.*, 2022, 42(5), s. 566-574.
6. **Goossens, K., Van Uytanghe, K., Twomey, P. J., Thiempont, L. M. et al.** Monitoring laboratory data across manufacturers and laboratories-A prerequisite to make big data work. *Clin. Chim. Acta*, 2015, 445, s. 12-18.
7. **Aarsland, K. A., Fernandez-Calle, P., Webster, C., Coskun, A., Gonzales-Lao, P. et al.** The EFLM Biological Variation Database. Dostupné z: <https://biologicalvariation.eu>

8. **Aarsland, K. A., Díaz-Garzón, J., Fernandez-Calle, P., Guerra, E., Locatelli, M. et al.** The Eubivas: Within-and between-subject biologic variation data for electrolytes, lipids, urea, uric acid, total protein, total bilirubin, direct bilirubin and glucose. *Clin. Chem.*, 2018, 64(9), s. 1380-1393.
9. **Ben Rayana, M., Burnett, R. W., Covington, A. K., D'Órazio, P., Fogh-Andersen, N. et al.** Recommendation for measuring and reporting chloride by ISEs in undiluted serum, plasma and blood. IFCC Scientific Division committee on POCT and working group on selective electrodes. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2006, 44(3), s. 346-352.

Autoři prohlašují, že nejsou ve střetu zájmů.

Do redakce došlo 10. 8. 2022

*Adresa pro korespondenci*  
*RNDr. Bedřich Friedecký, Ph.D.*  
*Střelnická 1680*  
*182 00 Praha 9*  
*e-mail: friedecky@sekk.cz*