



Karbohydrát-deficientní transferin: od BIO-RADu k RECIPE

 SPADIA

Mgr. Peter LOUČKA

Oddělení chromatografie a spektrometrie

Biomarkery alkoholu

Nepřímé

- AST
- ALT
- GGT
- MCV
- **CDT**

- Total serum sialic acid (TSA)
- 5-hydroxytryptophol (5-HTOL)
- N-acetyl-beta-hexosaminidáza (Beta-Hex)
- Plasma sialic acid index of apolipoprotein J (SIJ)
- Salsolinol

Přímé

- Ethanol
- Ethylglukuronid (EtG)
- Ethylsulfát (EtS)

- Acetaldehyd
- Fatty acid ethyl esters (FAEE)
- Phosphatidylethanol (PEth)

Karbohydrát-deficientní transferin

- V současné době nejvíce specifický biochemický marker pro detekci nadměrné a dlouhodobé konzumace alkoholu
- CDT roste po nadměrné konzumaci alkoholu ($\geq 50 - 80$ g ethanolu/den) v období dvou nebo více týdnů
- Při následné abstinenci dochází k navození fyziologické hodnoty během 2-3 týdnů (v závislosti na délce a intenzitě předchozí konzumace alkoholu)
- Diagnostická účinnost stanovení CDT může být ještě zvýšena kombinací stanovení CDT společně s vyšetřením GGT a MCV

Karbohydrát-deficientní transferin ve SPADIA LAB

Od 02/2010 stanovení na HPLC systému VARIANT (Bio-Rad)

Reagenční sada Bio-Rad :

- Reagencie 1, 2, 3, 4, 5
- Mobilní fáze 1, 2, 3
- Předkolona (100 nástřiků)
- Vialky pro přípravu vzorků
- CD-ROM
- Analytická kolona (600 nástřiků)



Aktuálně vyšetřujeme cca 130 vzorků / měsíc

Karbohydrát-deficientní transferin BIO-RAD

%CDT by HPLC - 2009



Zjednodušení přípravy vzorku - dodávané vialky předplněné reagenčním mixem

ReadyPrep %CDT by HPLC - 2011



Nový typ analytické kolony

Změna chromatografických podmínek: průtok 1,4 ml/min → 1,8 ml/min, lehce modifikovaný gradient

Doba jedné analýzy přibližně stejná (cca 8 min)

ReadyPrep %CDT by HPLC - 2017

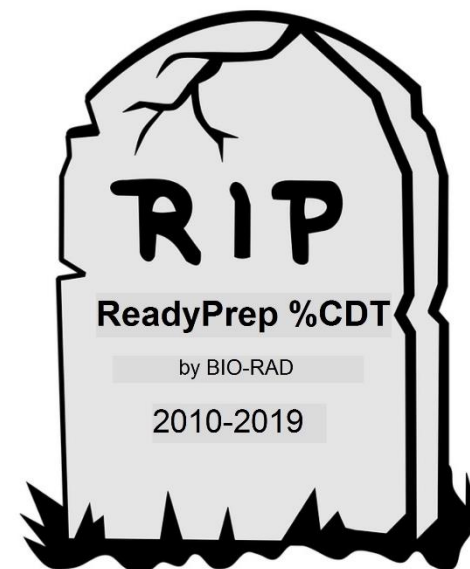
BIO-RAD končí s %CDT

Červen 2019 - informace o ukončení produkce kitu firmou BIO-RAD pravděpodobně z důvodu stáří přístrojů HPLC Variant a ukončení jejich podpory

Poslední dostupná šarže kitu měla expiraci 6. 11. 2019.

Nakoupení několika kitů na sklad.

Jak dál?



Dostupné metody pro stanovení CDT

HPLC (RECIPE, CHROMSYSTEMS)

- Měření při vlnové délce 460 nm je vysoce specifické a detekuje selektivně železem saturované transferiny
- Umožňuje separaci jednotlivých izoform transferinu
- Kvantifikace - poměr plochy píku DST k celkové ploše píků všech izoform

IMUNONEFELOMETRIE (N Latex CDT Siemens)

- Měří součet AST + MonoST + DST \Rightarrow nelze rozlišit jednotlivé izoformy
- Zvýšená koncentrace %CDT u některých vzorků s koncentrací celkového transferinu $< 1,2$ g/l

CE (Capillarys CDT, MINICAP CDT Sebia)

- Nespecifické měření absorbance peptidové vazby při vlnové délce 200 nm
- Nižší analytická citlivost než HPLC \Rightarrow AST v nízkých koncentracích

Jak dál?

HPLC **RECIPE** x **CHROMSYSTEMS**

RECIPE:

Ternární gradient (20 min)

Objem nástřiku 400-500 ul

CHROMSYSTEMS - větší výběr kitů:

Binární gradient (22 min)

Ternární gradient: Normal (20 min), Fast Elution (9,5 min) nebo One Step

Fast Elution (10 min)

Objem nástřiku 100-200 ul

Jak dál?

Testování DEMO kitu od RECIPE

HPLC systém Agilent 1100 s VWD detektorem a kvartérní pumpou

Velký objem nástřiku 400-500 ul

- Pořízení smyčky 500 ul (Seat capillary)
- Dávkovací zařízení max. 100 ul, do smyčky dávkuje 4-5 x 100 ul, potom pouští vzorek na kolonu - prodlužuje analýzu na 23,5 min



CDT in serum, ClinRep® HPLC Complete Kit, RECIPE HPLC Agilent 1100

Vícekroková příprava vzorků

Ve druhém kroku přípravy výrazné ředění vzorků **x**
velký objem nástřiku???

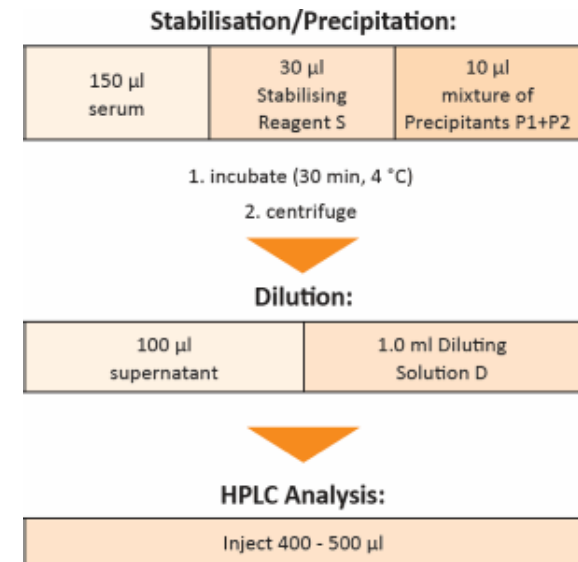
⇒ Dle výrobce koncentrovanější vzorky vykazují horší
separaci a zkracují životnost kolony

Předkolona: 50 vzorků (Bio-Rad 100 vzorků)

Analytická kolona: cca 600 vzorků (Bio-Rad 600
vzorků)

Lépe vypadající chromatogramy (software)

Je možná manuální integraci píků (nízký celkový transferin)



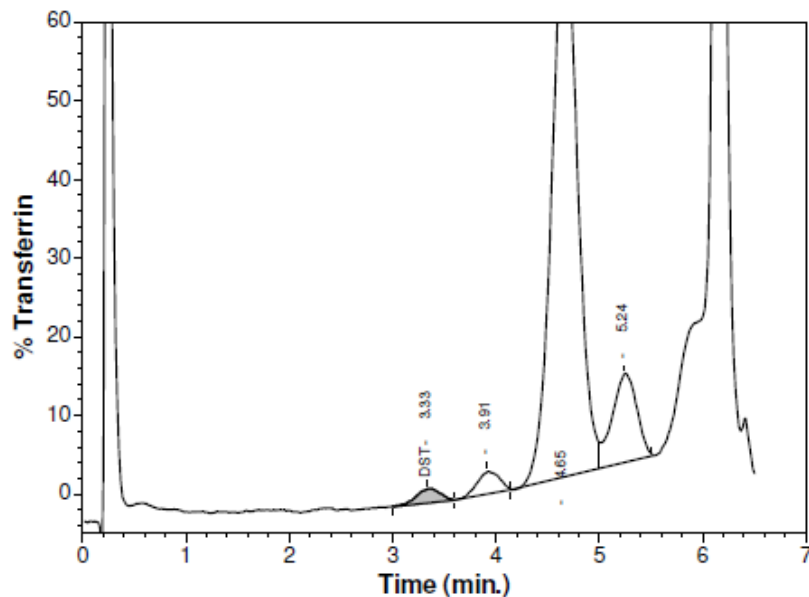
Chromatogramy VARIANT

Peak Name	Calibrated Area %	Area %	Retention Time (min.)	Area
DST	---	1.96	3.328	3601
TriST	---	2.93	3.913	5392
TeST	---	82.65	4.645	152229
PST	---	12.47	5.236	22958

Total Area: 184,180

AST concentration = %
DST concentration = 1.96 %

Analysis comments:

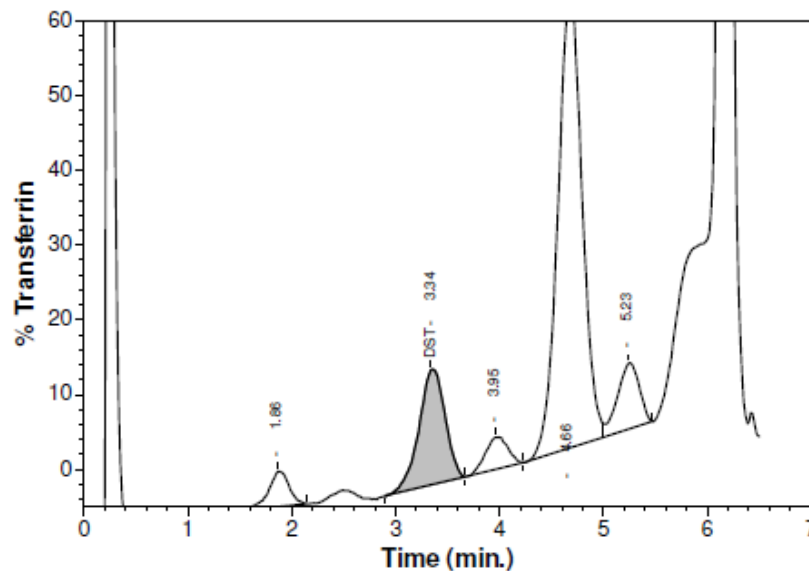


Peak Name	Calibrated Area %	Area %	Retention Time (min.)	Area
AST	---	4.48	1.862	6865
DST	---	17.74	3.336	27205
TriST	---	4.32	3.950	6627
TeST	---	64.96	4.661	99627
PST	---	8.50	5.235	13039

Total Area: 153,362

AST concentration = 4.48 %
DST concentration = 17.74 %

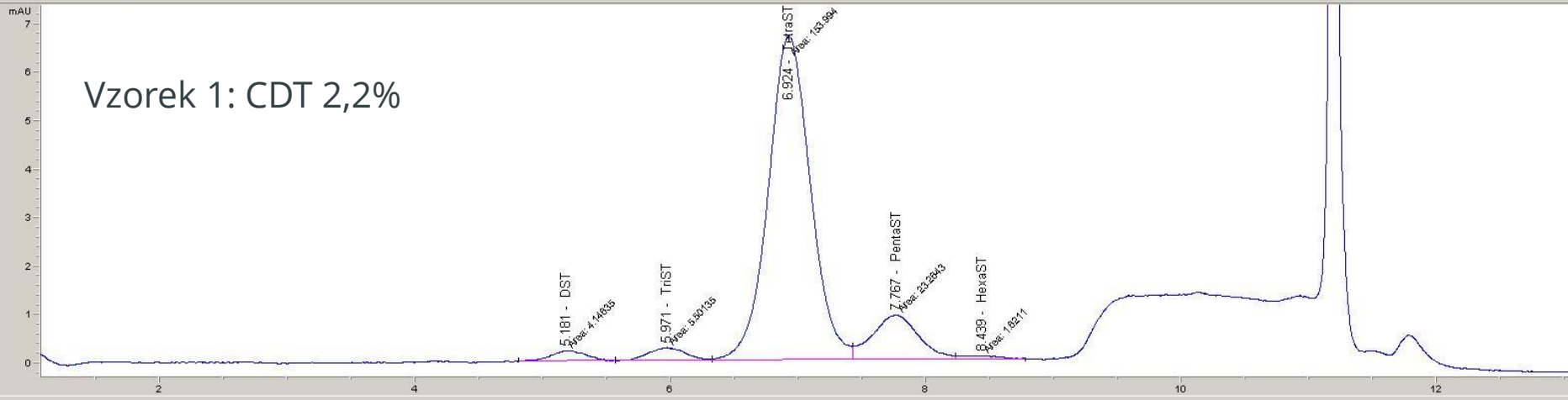
Analysis comments:



Chromatogramy AGILENT 1100

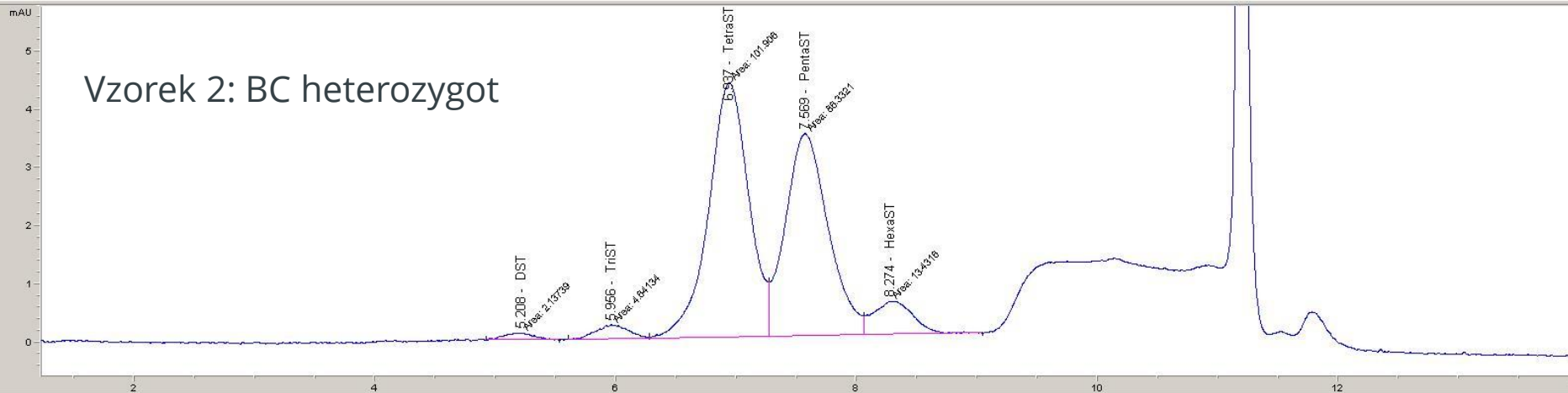
VWD1 A, Wavelength=460 nm (CDT RECIPE\CDT RECIPE 2020-01-08 12:57:33\12-1101.D)

Vzorek 1: CDT 2,2%



VWD1 A, Wavelength=460 nm (CDT RECIPE\CDT RECIPE 2020-01-08 12:57:33\11-1001.D)

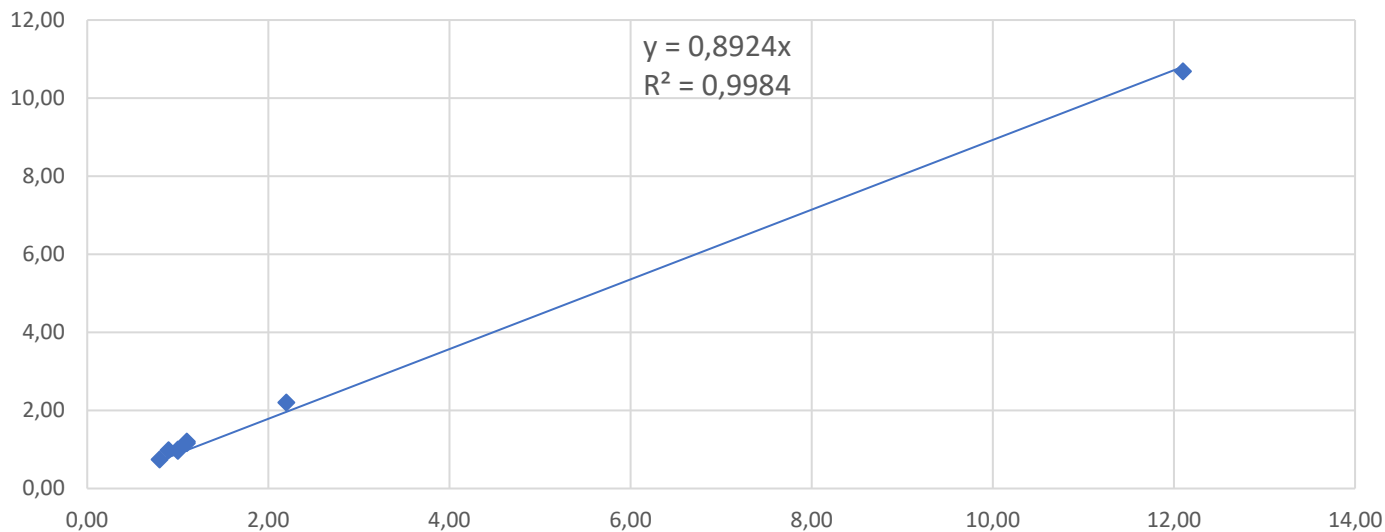
Vzorek 2: BC heterozygot



Srovnání metod RECIPE vs BIO-RAD

	HPLC Variant	HPLC Agilent 1100	rozdíl	%
1	12,10	10,69	1,41	11,65
2	1,00	0,96	0,04	4,00
3	0,90	0,98	-0,08	-8,89
4	1,10	1,20	-0,10	-9,09
5	1,00	1,00	0,00	0,00
6	1,10	1,16	-0,06	-5,45
7	2,20	2,20	0,00	0,00
8	0,80	0,74	0,06	7,50

CDT



EHK

RfB cyklus DT1/20

Survey: **DT1/20**
 month: **March 2020**
 Participant-No: **9907484**



Listing and Evaluation of all your results

Explanations

Certificate

A certificate is issued (given) for an analyte only if the basis for an evaluation of the accuracy is given by the guidelines of the German Medical Association and/or if an evaluation is possible in analogy to these guidelines (see comments on the evaluation) and, if both results for an analyte are within the given acceptance limits, (marked as '+' below C).

Certificate of participation

In the participation certificate all analytes which are included in the list on this page are listed.
 If all analytes are listed on the certificate no participation certificate is printed.

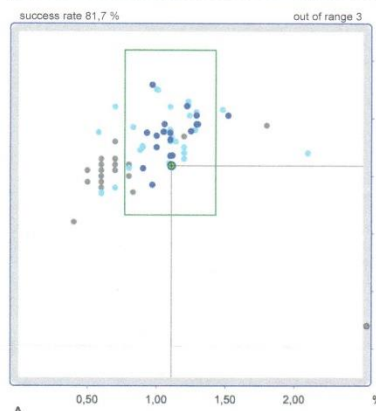
Legend:	C=Certification, M=No of method, R=your result, D=Difference (R-T) Dmax= maximum allowable amount of difference in measurement, partly given by §max 1 of the guideline of the BfK (Dt. Ärzteblatt 111, Heft 36, 16.9.2014). T = target value, either reference method value or assigned value, LL, UL = lower resp. upper limit	Certification: + = fulfilled (quotient D/Dmax <= 1.0) - = not fulfilled (quotient D/Dmax > 1.0) ± = certification cancelled because of technical and/or analytical reasons
---------	--	--

	C	M	R	D/Dmax	T	LL	UL								
Disialo-transferin [%]	+	3	A	1.11	0.03	1.10	0.770	1.43							
			B	4.18	-0.40	4.75	3.32	6.18							
Judgement [ohne]	+	3	A	nor.		nor.	nor.	nor.							
			B	path.		path.	path.	path.							

0000_p044/EPPN/0208250917_43_111_AD//281512_25_138_7/11

Youden plots DT1/20, Participant No 9907484, page 1 of 1

Analyte: **Disialo-transferin**
 Method: **all methods**



No. of participants	82	
sample/unit	A	B
mean	0.934	4.47
standard deviation	0.314	0.493
coefficient of variation	33.6	11.0

Analyte: **Judgement**
 Method: **all methods**

sample	5	3	3	3	2	others	all	method kit
A	101	75	47	2	28			
	39	19*	18	11	35	10	132	normal
	-	1	1	-	-	2	4	suspicious
	-	-	-	-	-	1	1	pathological

sample	5	3	3	3	2	others	all	method kit
B	101	75	47	2	28			
	-	-	-	-	-	1	1	normal
	-	-	-	-	-	1	1	suspicious
	40	20*	19	11	35	11	136	pathological

Sample A [%]	M	Kit	N	Min	16.P	50.P	84.P	Max
Alle	82	0.400	0.600	0.930	1.23	1.37	1.48	9.80
3	2	9	0.600	0.900	1.23	1.37	1.48	
3	47	18	0.580	0.700	0.915	1.14	2.10	
3	75	19	0.903	0.970	1.10	1.29	1.52	
3	99	3	1.00		1.10		1.20	
5	101	30	0.400	0.564	0.900	0.736	9.80	

Sample B [%]	M	Kit	N	Min	16.P	50.P	84.P	Max
Alle	82	1.40	3.93	4.38	5.01	5.58		
3	2	9	3.70	4.06	4.80	5.38	5.22	
3	47	18	3.72	4.14	4.84	5.20	5.49	
3	75	19	3.85	4.21	4.75	5.05	5.58	
3	99	3	4.50		4.60		5.50	
5	101	30	1.40	3.90	4.10	4.20	4.60	

The deviation of your results from the median of the corresponding sub-collective (kit) is: A: 0.9% B: -12.04%

Other kits (number): 2-02(1), 2-28(1), 5-48(1).

number of participants: **138**

2020080817_43_111_AD//281512_25_137_5/11

Děkuji Vám za pozornost

J sme  SPADIA