



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

METODY STANOVENÍ NÁDOROVÝCH MARKERŮ V KREVNÍ PLAZMĚ A JEJICH KLINICKÝ VÝZNAM PŘI DIAGNOSTICE

METHODS FOR DETERMINATION OF TUMOR MARKERS IN THE BLOOD PLASMA AND THEIR
CLINICAL SIGNIFICANCE IN DIAGNOSING

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. KAREL TOMAN

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. JOSEF ČÁSLAVSKÝ, CSc.

BRNO 2014



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0796/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	Bc. Karel Toman	
Studijní program:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)	
Studijní obor:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.	
Konzultanti:	MUDr. Dagmar Povalačová Ing. Milan Kremláček	

Název diplomové práce:

Metody stanovení nádorových markerů v krevní plazmě a jejich klinický význam při diagnostice

Zadání diplomové práce:

1. Provedení literární rešerše zaměřené na využití imunoanalytických metod ve spojení s chemiluminiscencí využívaných v klinické biochemii a na další analytické metody pro studium nádorových markerů.
2. Realizace klinické studie u vybrané skupiny pacientů, zaměřené na diagnostiku a sledování průběhu nemoci a účinku (rozdílné) léčby onkologických onemocnění pomocí hodnot nádorových markerů CA 19-9, CA 125, CA 15-3, CEA, AFP, TPA, PSA. V rámci této studie budou stanoveny základní biochemické parametry, které se používají k monitorování zejména léčby onkologických onemocnění.
3. Zavedení nové metody pro stanovení nádorových markerů do rutinního využívání, její validace včetně stanovení základních metrologických charakteristik
4. Porovnání nově zavedené metody s ostatními metodami v rámci Systému externí kontroly kvality (SEKK)

Termín odevzdání diplomové práce: 16.5.2014

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Karel Toman
Student(ka)

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Diplomová práce pojednává o metodách stanovení tumorových markerů a jejich klinickém významu při lékařské diagnostice nádorových onemocnění. V teoretické části práce jsou uvedeny klinicky nejdůležitější nádorové markery a rovněž jsou podrobně popsány používané chemiluminiscenční imunoanalytické metody pro jejich stanovení. Praktická část práce se týká zavedení nové chemiluminiscenční metody pro stanovení tumorového markeru do rutinního provozu, určení základních analytických parametrů této metody a porovnání se stávající imunoturbidimetrickou metodou. Součástí praktické části práce je monitorování onkologických pacientů s různými nádorovými onemocněními, které probíhá pomocí sledování hodnot nádorových markerů. V praktické části jsou také uvedeny výsledky porovnání naší metody s dalšími metodami v rámci Systému externí kontroly kvality.

ABSTRACT

The thesis discusses the methods of determination of tumor markers and their clinical importance in medical diagnostics. The theoretical part describes clinically important tumor markers and also the chemiluminescent immunoassay methods used for their determination. The practical part of the thesis describes the introduction of new chemiluminescent methods for the determination of tumor markers in routine operation, evaluates its basic analytical parameters and compares it with the existing immunoturbidimetric method. The practical part also presents results of monitoring of cancer patients with various tumors, which is performed by evaluation of the values of tumor markers. Comparison of our method with other methods within the context of System of external quality control is also documented.

KLÍČOVÁ SLOVA

Nádorové markery, chemiluminiscence, SEKK, imunoanalytické metody, Siemens Advia 1800, Siemens Immulite 2000 XPi, sledování onkologických pacientů, ROC křivky, nádorové onemocnění, CEA.

KEY WORDS

Tumor markers, chemiluminescence, SEKK, immunoassays, Siemens Advia 1800, cancer, CEA, Siemens Immulite 2000 XPi, monitoring of cancer patients, ROC curve.

TOMAN, K. *Metody stanovení nádorových markerů v krevní plazmě a jejich klinický význam při diagnostice*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 126 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v BRNĚ a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT:

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych rád poděkoval svému vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Josefu Čáslavskému CSc. za ochotu, laskavost a cenné rady. Velké poděkování patří Ing. Miloslavu Kremláčkovi za pomoc při vypracování praktické části práce a poskytnutí různých studijních materiálů k vypracování práce. Dále bych chtěl poděkovat MUDr. Janu Šebkovi za ochotu a poskytnutí informací o pacientech z onkologického oddělení a RNDr. Daně Sichertové Ph. D. za ochotu a cenné rady při zpracování práce. Mé poděkování také patří všem pracovníkům naší laboratoře za trpělivost při vypracování praktické části. V neposlední řadě děkuji rodině za podporu po celou dobu studia.

Obsah

1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Kancerogeneze	9
2.1.1 Maligní transformace buňky	9
2.2 Nádorové markery	9
2.2.1 Význam nádorových markerů	10
2.2.2 Monitorování průběhu onemocnění	11
2.2.3 Sledování efektu protinádorové léčby	11
2.2.4 Hodnota diskriminační hranice (Cut – off)	11
2.2.5 Preanalytická fáze	11
2.2.6 Analytické fáze a interference	12
2.2.7 Interpretace	12
2.2.8 Kinetika nádorových markerů	13
2.3 ROC křivky	16
2.4 Rozdělení nádorových markerů	18
2.5 Charakteristika klinicky významných nádorových markerů	19
2.5.1 CEA (karcinoembryonální antigen)	19
2.5.2 AFP (alfa-1-fetoprotein)	20
2.5.3 CA 125	21
2.5.4 CA 15-3	22
2.5.5 CA 19-9	23
2.5.6 CA 72-4	24
2.5.7 TPA a TPS	25
2.5.8 HCG (choriogonadotropin)	26
2.5.9 Cyfra 21-1	27
2.5.10 PSA (prostatický specifický antigen)	28
2.5.11 NSE (neuron specifická enoláza)	29
2.5.12 Feritin	29
2.6 Monitorování průběhu onemocnění a efektu terapie u vybraných nádorových onemocnění	30
2.6.1 Karcinom prsu	30
2.6.2 Karcinom vaječníků	31
2.6.3 Karcinom plic	31

2.7	Základní pojmy imunoanalýzy	31
2.7.1	Antigen	31
2.7.2	Protilátky	32
2.7.3	Reakce antigen-protilátka.....	34
2.8	Imunoanalytické metody	35
2.8.1	Kompetitivní metody.....	35
2.8.2	Nekompetitivní metody	36
2.9	Rozdělení imunoanalytických metod	37
2.9.1	Radioimunoanalytické metody	38
2.9.2	Enzymové imunoanalytické metody	39
2.9.3	Luminiscenční imunoanalytické metody	41
2.9.4	Fluorescenční imunoanalytické metody	51
2.10	Přístrojová technika	60
2.10.1	Biochemický analyzátor Siemens Advia 1800.....	60
2.10.2	Imunochemický analyzátor Siemens Immulite 2000 XPI	63
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	67
3.1	Použité přístroje a vybavení	67
3.2	Použité reagenční soupravy, chemikálie, kalibrační standardy, kontrolní vzorky, software	67
3.2.1	Reagenční souprava IMMULITE 2000 Feritin	67
3.2.2	Adjustory soupravy IMMULITE 2000 Feritin.....	68
3.2.3	Reagenční souprava Advia Chemistry Systems Feritin (FRT)	68
3.2.4	Kalibrační standardy Advia Chemistry Systems Feritin (FRT)	68
3.2.5	Kontrolní materiál	69
3.2.6	Vzorky SEKK (cyklus TM4/13)	70
3.2.7	Chemikálie.....	70
3.2.8	Použitý software	70
3.3	Pracovní postupy	71
3.3.1	Kalibrace soupravy Advia Chemistry Systems Feritin (FRT).....	71
3.3.2	Kalibrace soupravy IMMULITE 2000 Feritin	72
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE	75
4.1	Zavedení nové metody tumorového markeru	75
4.1.1	Verifikace a validace metody	75
4.1.1.1	Opakovatelnost.....	76
4.1.1.2	Mezilehlá preciznost.....	78
4.1.1.3	Pracovní rozsah měření	78

4.1.1.4	Pravdivost (vychýlení - Bias).....	80
4.1.1.5	Porovnatelnost metod.....	83
4.1.1.5.1	Lineární regrese.....	83
4.1.1.5.2	Passing - Bablokova neparametrická regrese.....	85
4.1.1.5.3	Rozdílové grafy dle Bland - Altmana.....	87
4.1.2	Porovnání obou metod.....	89
4.2	Porovnání metod v Systému externí kontroly kvality (SEKK).....	91
4.2.1	Analytické parametry pro metody účastníci se v SEKK.....	91
4.2.2	Výsledky ze Systému externí kontroly kvality (SEKK).....	92
4.2.3	Diskuze výsledků ze Systému externí kontroly kvality.....	95
4.3	Sledování onkologických pacientů.....	96
4.3.1	Sledování pacienti.....	97
4.3.2	Vyhodnocení sledování onkologických pacientů.....	111
5.	ZÁVĚR.....	112
6.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	113
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	121
8.	SEZNAM PŘÍLOH.....	122

1. ÚVOD

Znečištění všech složek životního prostředí má stále výraznější negativní dopady na živé organismy, člověka nevyjímaje. Jedním z nich je narůstající incidence nádorových onemocnění, která ve vyspělých zemích patří hned po kardiovaskulárních nemocech k nejčastějším příčinám úmrtí. Nádorová onemocnění zaujímají mezi ostatními chorobami významné postavení nejen pro jejich stále rostoucí incidenci, ale zejména pro náročnou zdravotnickou péči. Dle nejnovějších údajů se každý třetí občan České republiky stane onkologickým pacientem a polovina těchto pacientů na tuto nemoc umírá. Za posledních 30 let došlo v České republice k výraznému zvýšení počtu nádorových onemocnění tlustého střeva, ledvin, žlučníku, žlučových cest, konečníku, štítné žlázy a močového měchýře. U mužů došlo k incidenci rakoviny prostaty, jater, varlat a u žen se zvyšovala incidence karcinomů plic, prsu a vaječníku. Hlavním cílem dnešního lékařství je zachycení nádorového onemocnění v jeho počátečním stádiu. K tomu mohou významnou mírou přispět metody založené na sledování výskytu specifických sloučenin – tzv. nádorových markerů – v krevním séru.

Sérové nádorové markery představují důležitý indikátor, který může ulehčit predikci vývoje onemocnění u onkologických pacientů. Ve srovnání se zobrazovacími technikami jsou schopny prokázat tisíckrát menší nádor. Jejich využití však předpokládá správnou znalost indikace vyšetření. Nádorové markery se mohou použít pro primární diagnostiku, screening, predikci návratu choroby, prognózu a sledování léčebné terapie. K nejčastějšímu klinickému využití vyšetření nádorových markerů však patří sledování efektu léčebné terapie, monitorování průběhu onemocnění a včasný záchyt recidivy nádorového onemocnění. Toto vyšetření se tedy stalo nedílnou součástí onkologické péče. Vývoj metod sloužících k rychlému a spolehlivému stanovení nádorových markerů v krevním séru tedy patří mezi důležité úkoly napomáhající k minimalizaci negativních dopadů kontaminace životního prostředí na populaci.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kancerogeneze

Několikastupňový proces přeměny normálních buněk v buňky nádorové se nazývá kancerogeneze. Tento děj probíhá na úrovni chromosomů, kde dochází k nahromadění mutací genů, které kontrolují dělení a zánik buněk. Kancerogeneze je charakterizována především změnami genetickými, epigenetickými a biochemickými, které poskytují nádorovým buňkám růstovou výhodu a výsledkem těchto změn je invazivní růst nebo metastazování nádorové tkáně [1].

2.1.1 Maligní transformace buňky

Množení buněk v organismu je velmi pečlivě řízeno, v závislosti na stádiu života jedince. V časných stádiích jedince množení buněk převažuje nad zanikáním, v dospělém stádiu nastává rovnováha a v pokročilém věku života převažuje involuce. Problém nastává tehdy, pokud se buňky vymknou kontrole replikace a změní se v buňky nádorové. Přeměna normální buňky v nádorovou je způsobena nahromaděním genetických změn ve formě mutací genu, které se týkají regulace buněčného dělení, realizace oprav DNA a buněčné smrti (apoptózy). Pokud si vznikající nádorové buňky zachovají svoji funkci a zůstávají na místě, kde vznikly, nazýváme je buňkami benigními (benigní nádory). Opačným příkladem jsou buňky maligní, které ztratily většinu svých původních vlastností a invazivně pronikají do svého okolí nebo dokonce do vzdálených míst (metastáze). Maligní transformaci také často způsobují účinky vnějších podmínek např. radiace, karcinogeny, virogeny a další [1,83].

Průběh kancerogeneze je následující:

1. **Iniciační stádium:** Představuje mutaci určitého kritického genu (prvotní genetická událost). Toto stádium je velmi krátké, ale nevratné. Touto mutací buňka získává potenciál pro maligní transformaci, avšak proces v tomto stádiu lze ještě zastavit [1].
2. **Promoční stádium:** V tomto stádiu jsou zmutované buňky stimulovány k intenzivnějšímu množení. Toto stádium trvá roky až desetiletí. Nádorovou transformaci podporují promoční faktory. Proces kancerogeneze lze zpomalit nebo i zastavit odstraněním promočních faktorů [1].
3. **Stádium progresu:** U progresu dochází k dalšímu postupnému nahromadění genetických mutací. Vzniklý nádor může zůstat v místě vzniku nebo se šířit do nejbližšího okolí (invaze) a do vzdálených míst cestou krevního oběhu (metastáze) [1,83].

2.2 Nádorové markery

Nádorové markery (nazývající se též tumorové markery nebo onkomarkery) jsou látky produkované maligními buňkami nebo organismem, jako odpověď na nádorové bujení. Lze je definovat jako molekuly převážně proteinového charakteru, které se dají laboratorně prokázat v biologických tekutinách, buňkách nebo tkáních [4,6,78]. Nádorové markery mohou být antigeny lokalizované na povrchu buněčných membrán, enzymy metabolických drah, imunoglobuliny a jejich fragmenty,

hormony, fragmenty komplexních glykoproteinů a cytokeratinů, molekuly receptorové povahy a další [5,82]. Existence nádorových markerů v tělních tekutinách je podmíněna přechodem těchto látek z místa syntézy do krevního oběhu. Stanovená koncentrace v séru má obvykle přímý vztah k typu a rozsahu onemocnění [4,97].

2.2.1 Význam nádorových markerů

Stanovení nádorových markerů (ukazatelů) by mělo být využitelné zejména:

- k rozlišení onemocnění mezi benigním a maligním,
- k určení primární diagnostiky,
- k určení stadia onemocnění,
- k odhadu prognózy (předpověď chování choroby) - prognostické markery,
- ke sledování průběhu (monitorování) choroby – prediktivní markery,
- ke sledování účinnosti terapie (léčby),
- k včasnému zachytu progresu a recidivy nádoru [4,6,86].

Diagnostickou hodnotu nádorového markeru charakterizuje určitá senzitivita a specificita. Vztah mezi senzitivitou a specificitou udává rozhodovací operační křivka (ROC) [4]. Ideální nádorový marker by měl mít co největší senzitivitu při vysoké specificitě. Obě tyto hodnoty by se měly blížit k 100%.

Ideální tumorový marker by splňovat následující kritéria:

- orgánová specificita,
- produkce markeru pouze u maligních chorob,
- jeho hodnota by měla odpovídat velikosti a stádiu nádoru,
- výskyt ve vysokých koncentracích v tělních tekutinách,
- korelace s prognózou a účinností terapie,
- diagnostika časných stádií nádorových onemocnění [5,7,95].

V současné době bohužel neexistuje žádný nádorový marker, který by tato kritéria splňoval.

Vzhledem k poměrně nízké diagnostické senzitivitě a také nízké specificitě není většina nádorových markerů vhodná ke screeningu, protože podmínkou pro screening je senzitivita 97 % při 95 % specificitě. Screening se dá charakterizovat jako vyhledávání onemocnění v jejich časných stádiích u předem definované skupiny lidí v čase, kdy člověk nemá žádné příznaky nebo jiné potíže. Cílem screeningu je včasný zásah, pomocí kterého lze snížit následky nemoci a úmrtnosti pacientů [4,5].

Stejně jako v případě screeningu, nádorové markery nejsou vhodné pro časnou detekci nádorového onemocnění a ani pro primární diagnostiku vzhledem k malé orgánové specificitě. Hlavní role nádorových markerů spočívá tedy ve sledování průběhu choroby (recidiva, progresu) a sledování účinnosti léčby nádorových onemocnění. Výběr nádorového markeru vychází z předpokládané lokalizace nádoru, stadia onemocnění, histologické struktury a buněčné diferenciaci nádorových buněk. Pokud je nádorové bujení v pokročilejším stádiu, roste také pravděpodobnost zvýšení koncentrace nádorových markerů [12,78].

2.2.2 Monitorování průběhu onemocnění

Největší uplatnění nádorových markerů se nachází ve sledování průběhu choroby a také souvisí s diagnózou recidivy a progresu onemocnění. Stanovení markerů se také využívá pro sledování efektu terapie např. chemoterapie. Pro sledování choroby se používají hlavní (základní) a doplňkové (náhradní) nádorové markery. Frekvence stanovení markerů se provádí dle doporučení vydaného Českou společností klinické biochemie (ČSKB). První vyšetření nádorových markerů je doporučeno před terapií (operací). Přibližně 14 dní po operaci následuje další stanovení markerů a poté 1x v následujících třech měsících. Frekvence vyšetření se poté provádí 1x za 3 - 4 měsíce do konce třetího roku od začátku monitorování. V dalších letech doporučení uvádí provádět vyšetření nádorových markerů 1x za 6 měsíců. Pokud je hodnota nádorového markeru zvýšená například před operací, je 88 - 95 % pravděpodobnost, že při progresi bude hodnota markeru také zvýšená. V opačném případě u progresu dochází k zvýšení v 30 % případů. Při monitorování nádorového onemocnění je doporučeno vyšetřovat 1 - 2 tumorové markery [4,7,78].

2.2.3 Sledování efektu protinádorové léčby

Sledování efektu terapie je další velkou doménou indikace nádorových markerů. Stanovená hladina nádorových markerů by měla odrážet odpověď na systémovou léčbu (úspěšnost terapie), a má tedy velký význam pro optimalizaci léčby. Po aplikaci protinádorové terapie se nádorové markery vyšetřují v 3. až 4. týdnu od zahájení terapie. Volba intervalů stanovení markerů je velice důležitá. Frekvence souvisí s různými biologickými poločasy jednotlivých markerů (tabulka č. 1).

Vzhledem k různým biologickým poločasům jednotlivých nádorových markerů je třeba správně volit intervaly odběrů krve k vyšetření tak, aby se skutečně postihl efekt léčebné terapie a ne "lysis fenomen", což je krátkodobý prudký nárůst hladiny markeru jako odpověď na terapii. Také biologická variabilita je rozdílná pro jednotlivé tumorové markery a pohybuje se v intervalu 5 - 70 %. Při sledování efektu léčby je důležité provádět stanovení markerů stejnou metodou v jedné laboratoři. Například zvýšení hodnoty markerů po chemoterapii odpovídá progresi nádoru při neúčinné léčbě pacienta [4,82,95].

2.2.4 Hodnota diskriminační hranice (Cut - off)

Pro hodnocení nádorových markerů se využívá označení hraniční hladiny Cut - off, kterou si každá laboratoř určuje sama. Pod hladinou cut - off by se mělo nacházet 95 % zdravých jedinců i s benigními onemocněními v případě primární diagnostiky. Pokud se jedná o sledování efektu léčby, tak by se pod hladinou cut - off mělo nacházet 95 % hodnot pacientů v remisi [4,83].

2.2.5 Preanalytická fáze

Jako u každého biochemického vyšetření se musí laboratoř, která vyšetřuje nádorové markery, řídit správnou preanalytickou fází analýzy. Při stanovení markeru je třeba vyloučit všechny preanalytické faktory, které ovlivňují samotné stanovení markeru. Rozdílná biologická povaha nádorových markerů

určuje různou preanalytickou variabilitu. Většina solubilních markerů se stanovuje ze séra i plazmy. Nádorové markery typu CA jsou jako skupina velmi stabilní a mají poměrně malou preanalytickou variabilitu. Vyšší preanalytickou variabilitu vykazují např. enzymy (neuron specifická enoláza (NSE)), hormony, AFP (alfa-1-fetoprotein) atd. Nádorové markery nevyžadují odběr nalačno, ale je doporučován ranní odběr. V některých případech stanovení ovlivňují preanalytické aspekty např. u vyšetření prostatického specifického antigenu (PSA) stanovení silně ovlivňuje rektální vyšetření prostaty a jakákoliv manipulace s prostatou, např. jízda na kole nebo sex. U markerů CA 19-9 a SCCA může znehodnotit analýzu kontaminace slinami nebo potem. Marker NSE je velice náchylný na hemolýzu ve vzorku, protože NSE je uvolňován z erytrocytů, a proto je třeba oddělit sérum od krevního koláče do jedné hodiny. Významnou roli hraje také již zmíněná stabilita analytu. Pokud není stanovení tumorového markeru provedeno do výrobcem doporučené doby, je třeba vzorek séra uložit při +4 až +8 °C nebo vzorek zamrazit při -20 °C [5,75].

2.2.6 Analytické fáze a interference

Koncentrace nádorových markerů se pohybuje na nízkých hladinách koncentrací v séru a to v µg/l až v ng/l na rozdíl od biochemických parametrů, které se pohybují v řádech g/l, mg/l nebo mmol/l. Analytický postup vyžaduje vzhledem k dlouhodobému sledování pacientů také vysoký stupeň přesnosti metody (mezilehlá preciznost, opakovatelnost, reprodukovatelnost). Analytická fáze stanovení nádorových markerů se vyznačuje stejnými problémy a interferencemi jako každá imunoanalytická metoda. Při stanovení markerů může dojít k řadě analytických interferencí, které se nevyhnou žádné imunochemické metodě.

Nejčastější typy interferencí u imunoanalytických metod:

- zkřížená reakce podobných molekul,
- vysoká koncentrace markeru („hook efekt“ - překročení vazebné schopnosti pevné fáze),
- přenos vyšetřovaného markeru mezi vzorky („carry – over“ - nedokonalé očištění pipetovací jehly od předcházejícího vzorku) [4,9].

2.2.7 Interpretace

Správná interpretace hodnot nádorových markerů vyžaduje vyloučení všech zmíněných rušivých faktorů, které by mohly jakkoliv ovlivnit stanovení ve fázi preanalytické i analytické. Falešná pozitivita je dalším faktorem, který hraje důležitou roli při hodnocení výsledků vyšetření markerů. Je způsobena zejména nemaligními chorobami uvedenými na Obr. č. 2. K falešně pozitivním výsledkům přispívají také tzv. heterofilní myší protilátky (HAMA). V těle se vyskytují jako důsledek reakce organismu na myší bílkoviny, které jsou podané za účelem diagnostiky nebo terapie. Jak již bylo uvedeno, pro jednotlivé nádorové markery je znám rozdílný biologický poločas v séru. Ten je tedy třeba také zvažovat při interpretaci změn hodnot nádorových markerů [1,94].

2.2.8 Kinetika nádorových markerů

V onkologické léčbě jsou posuzovány změny hladin tumor markerů v různých případech. Pokud se pacient nachází v remisi onemocnění bez terapie, výrazný nárůst koncentrace tumorových markerů ve 3 následných odběrech může značit recidivu nebo progresi choroby. U pacienta podstupujícího protinádorovou terapii značí nárůst koncentrace o více než 25 % progresi onemocnění při neúčinné léčbě (intoleranci). Naopak pokles koncentrace o více než 50 % značí parciální remisi, nikoliv kompletní remisi onemocnění [1,75].

Tabulka č. 1: *Biologický poločas nádorových markerů v séru [7]*

Nádorový marker	biologický poločas	
	dny	hodiny
karcinoembryonální antigen (CEA)	14	
tkáňový polypeptidový antigen (TPA)	7	
antigen (CA 15-3)	7	
alfa-1-fetoprotein (AFP)	5	
antigen (CA 19-9)	5	
antigen (CA 125)	4	
prostatický specifický antigen (PSA)	2	
thymidinkináza (TK)	2	
choriogonadotropin (hCG)	1	
volná podjednotka specifického prostatického antigenu (fPSA)		7
prostatická frakce kyselé fosfatázy (PAP)		2
volná beta podjednotka choriogonadotropinu (beta-hCG)		1
močový gonadotropinový peptid (UGP)		0,1

Tab. 1. Solubilní nádorové markery vhodné pro monitorování průběhu choroby a účinnosti terapie

Nádor – lokalizace		Markery základní	Markery doplňkové
Žaludek		CA 72-4, CEA	–
Jícen	horní třetina	SCCA	CYFRA 21-1
	dolní třetina	CA 72-4, CEA	–
Pankreas		CA 19-9, CEA	–
Játra		AFP, CEA	–
	cholangiocelulární	CA 19-9	–
	metastázy	CEA	–
Mléčná žláza		CA 15-3, CEA	TPA/S
Ovarium	nemucinózní	CA 125	TPA/S
	mucinózní	CA 19-9, CA 72-4	CEA
	germinativní	AFP, hCG	–
Cervix	epidermoidní	SCCA	CYFRA 21-1, CEA
	adenokarcinomy	CEA	–
Corpus uteri		CA 125	CEA
Vulva		SCCA	–
Ledviny		TPA/S, CEA	NSE
Močový měchýř		TPA/S	CYFRA 21-1
Prostata		PSA, fPSA	ChgA
Testes	seminomy	hCG, AFP	NSE
	neseminomy	hCG, AFP	–
Karcinoid		5-hydroxy, 3-indolyloctová kyselina, NSE	–
Štítná žláza	medulární	CT, CEA	NSE
	anaplastické	TPA/S	–
Melanom		NSE, S100beta	TK
Plíce	SCLC	CEA, NSE	TPA/S
	NSCLC	CYFRA 21-1, CEA	SCC
Hlava, krk		SCCA	CYFRA 21-1
CNS	neuroblastomy	NSE	–
	gliomy	CEA	–
	astrocytomy	TK	–
Leukémie		TK, FER, LD	–
Lymfom	hodgkinský	B2M, FER, LD	–
	non-hodgkinský	TK, B2M, LD	–
Mnohočetný myelom		B2M, paraproteiny	–

Obr. č. 1: Doporučované nádorové markery vhodné pro monitorování léčby (převzato z ČSKB) [5]

Zvýšené hladiny nádorových markerů v séru u nemaligních onemocnění		
Nádorový marker	Nemaligní onemocnění	Jiná příčina
CEA (<i>karcinoembryonální antigen</i>)	zánětlivé choroby jater jaterní cirhóza pankreatitida	kouření
AFP (<i>α-fetoprotein</i>)	zánětlivé procesy plic, GIT jaterní cirhóza akutní i chronická hepatitida	těhotenství ^{*)}
TPA (<i>tkáňový polypeptidový antigen</i>)	infekční procesy obecně jaterní cirhóza pankreatitida	
CA 15-3	jaterní cirhóza akutní hepatitida postižení ledvinových glomerulů	těhotenství ^{*)}
MCA (<i>antigen mucinózních karcinomů</i>)	viz CA 15-3, výraznější	
CA 125	ovariální cysty záněty adnex choroby jater, pankreatu, žlučníku	těhotenství (1. trimestr)
CA 19-9	cirhóza jater cholelitiáza chronická hepatitida akutní a chronická pankreatitida choroby žlučových cest diabetes cystická fibróza	
CA 72-4	benigní mammární nádory	těhotenství ^{*)}
PSA (<i>prostata specifický antigen</i>)	benigní hyperplazie prostaty	palpace
hCG (<i>lidský choriogonadotropin</i>)	mola hydatidóza	těhotenství
β₂-mikroglobulin	postižení ledvin	
TK (<i>thymidinkináza</i>)	interference herpes-viry B ₁₂ deficience	
SCCA (<i>antigen skvamózních buněk</i>)	záněty plic poruchy ledvin, jater	
Ferritin	záněty obecně poruchy metabolismu železa	
CYFRA 21-1 (<i>CYFRA = cytokreatin fragments; detekce fragmentů cytokreatinu</i>)	choroby urologického traktu myomy, ovariální cysty	

Obr. č. 2: Zvýšené hladiny nádorových markerů u nemaligních onemocnění, převzato z CEVA [6]

2.3 ROC křivky

ROC křivka se užívá v oblasti medicíny pro hodnocení kvality a síly diagnostických nebo screeningových testů a modelů.

Analýza ROC křivek tumorových markerů popisuje vztah senzitivity a specičnosti laboratorního testu při různých hodnotách cut - off (prahová hodnota), proto se nyní v krátkosti podíváme na obecný příklad [21,96].

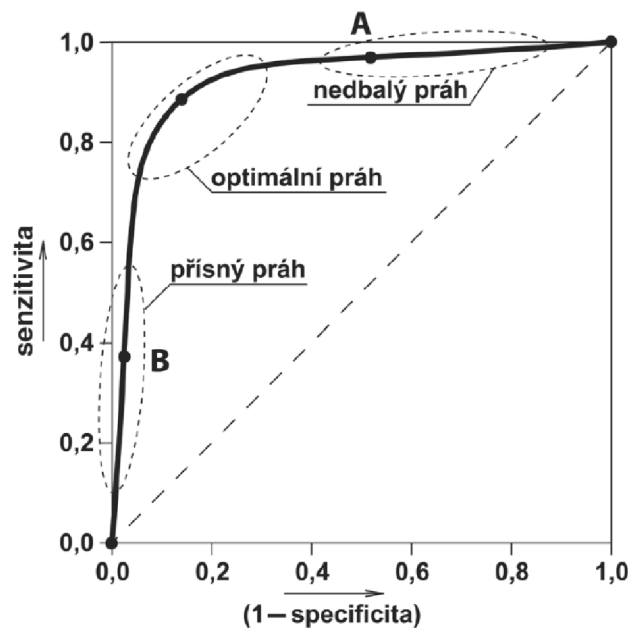
Máme skupinu osob a na základě diagnostického testu musíme rozhodnout, které osoby jsou zdravé a které nemocné. Nejdříve musíme určit vhodnou prahovou hodnotu, která nám rozdělí náš soubor pacientů na zdravé a nemocné. Jelikož všechny testy vykazují určitou nejednoznačnost, dostáváme čtyři skupiny pacientů.

- správně pozitivní (TP true positive) – správně označení nemocní pacienti,
- správně negativní (TN true negative) – správně označení zdraví pacienti,
- falešně pozitivní (FP false positive) – falešně označení zdraví pacienti,
- falešně negativní (FN false negative) – falešně označení nemocní pacienti [21].

Senzitivita (správná pozitivita) je pravděpodobnost pozitivního výsledku u jedinců s chorobou. Čím je tedy větší senzitivita, tím je menší procento falešně pozitivních výsledků. Specificita (správná negativita) je pravděpodobnost negativního výsledku u zdravých jedinců. Čím je tedy větší specificita, tím je menší procento falešně negativních výsledků [4,96].

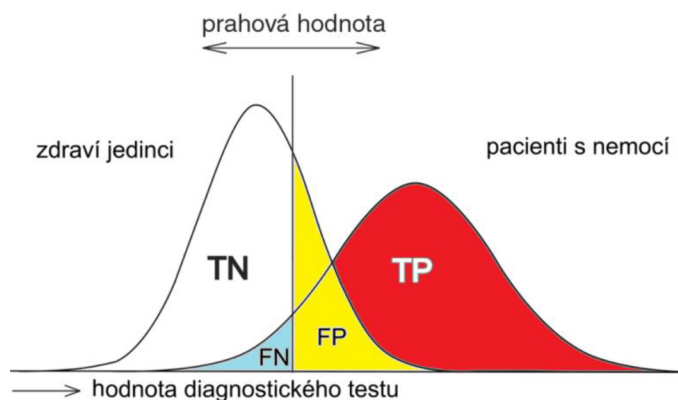
Při sestrojování ROC křivky v našem případě předpokládáme, že náš test při vysoké hodnotě cut - off signalizuje větší pravděpodobnost výskytu onemocnění než při hodnotě cut - off nízké. Dále si musíme určit, zda pacient je skutečně zdravý nebo nemocný a vypočítáme si hodnoty pro senzitivitu (osa y) a pro specificitu hodnotu $1 - \text{specificita}$ (osa x).

Příklad analýzy ROC křivky máme na Obr. č. 3. U křivky jsou označeny tři oblasti: přísný, optimální a nedbalý práh [8].

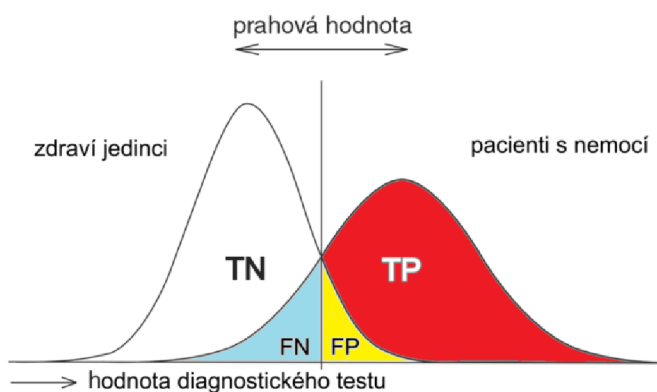


Obr. č. 3: Analýza ROC [8]

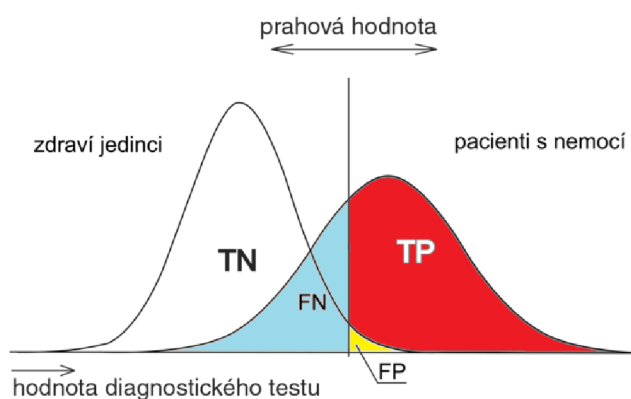
Nejdůležitějším úkonem v ROC analýze je definice prahové hodnoty (cut - off). Přísný práh, tj. vysoká hodnota cut - off nám málokterého pacienta klasifikuje jako nemocného (minimum falešně pozitivních, více falešně negativních - viz Obr. č. 6). Optimální práh, tj. ideální hodnota cut - off má nejvyšší specificku a senzitivitu (viz Obr. č. 5). Nedbalý práh, tj. nízká hodnota cut - off nám téměř všechny pacienty klasifikuje jako nemocné (více falešně pozitivních, minimum falešně negativních viz - Obr. č. 4).



Obr. č. 4: *Nedbalý práh* [8]



Obr. č. 5: *Optimální práh* [8]



Obr. č. 6: *Přísný práh* [8]

Určení prahové hodnoty se provádí podle následujících pravidel:

- prahová hodnota je vybrána náhodně,
- prahová hodnota je vybrána co nejblíže hornímu rohu, kdy senzitivita a specificku se blíží 100%,
- prahová hodnota se vybere při největším součtu senzitivity a specificku [8,96].

2.4 Rozdělení nádorových markerů

Základní rozdělení nádorových markerů podle jejich výskytu je na:

- celulární (marker se vyskytuje v tkáních zhoubného nádoru),
- humorální (marker se vyskytuje v tělní tekutině).

Tyto dvě skupiny se dále podrobně dělí dle jejich biochemické podstaty na:

1. Humorální nádorové markery (detekovatelné v tělních tekutinách) [4,6,7,78]:

❖ Onkofetální antigeny (s nádorem asociované antigeny)

- CEA (karcinoembryonální antigen)
- Antigeny CA - typu (CA 15-3, CA 125, CA 72-4, CA 19-9, CA 242, CA 549, CA 50, CAM 26, CAM 29)
- AFP (alfa-1-fetoprotein)
- MCA (antigen mucinózních karcinomů)
- HE4 (lidský epididymální protein 4)

❖ Cytokeratinové markery

- CYFRA 21-1 (fragment cytokeratinu 19)
- SCCA (antigen skvamózních buněk)
- TPA/TPS (tkáňový polypeptidový antigen)

❖ Enzymy

- PSA (prostatický specifický antigen)
- LD (laktátdehydrogenáza)
- TK (thymidinkináza)
- PAP (prostatická frakce kyselých fosfatáz)
- NSE (neuron-specifická enoláza)

❖ Hormony

- hCG (choriagonadotropin)
- TG (thyreoglobulin)
- CT (kalcitonin)
- PRL (prolaktin)
- ADH (antidiuretický hormon)
- GH (růstový hormon)
- PTH (parathormon)

❖ Sérové proteiny

- FER (ferritin)
- RAF (reaktanty akutní fáze)
- CIC (cirkulující imunokomplexy monoklonální imunoglobuliny)
- B2M (beta2-mikroglobulin)
- laminin, elastin, selectin

❖ Ostatní metabolity

- VMK (kyselina vanilmandlová)
- HIOK (kyselina hydroxyindoloctová)
- MEL (melanogeny)
- UGP (močový gonadotropinový peptid)
- NMP-22 (proteiny nukleární matrix)
- S-100 (protein S-100)

2. Celulární (tkáňové) nádorové markery

- ER, PR (receptory estradiolu a progesteronu)
- CD (katepsin D)
- HER-2/neu (onkoprotein HER-2/neu)
- p53 (protein kódovaný tumor-supresorovým genem p53) [6,7].

2.5 Charakteristika klinicky významných nádorových markerů

Vzhledem k velkému počtu nádorových markerů v teoretické části budou popsány pouze klinicky nejvýznamnější nádorové markery.

2.5.1 CEA (karcinoembryonální antigen)

Vlastnosti: CEA je jeden z nejvíce prozkoumaných antigenů spojených s lidskými nádory. CEA je imunologicky heterogenní skupina glykoproteinů o molekulové hmotnosti od 175 do 200 kDa s proměnnou složkou sacharidů 45 – 85 %. Skupina genů pro CEA je zastoupena 17 aktivními geny ve dvou skupinách. První skupina obsahuje strukturně příbuzné CEA a NCA (nespecifický reakční antigen) a v druhé skupině jsou specifické těhotenské glykoproteiny (PSG) [7,77].

Funkce: Biologická funkce zatím není přesně definována, ale pravděpodobně ovlivňuje buněčnou adhezi (funkce mezibuněčné adhezivní molekuly) a metastazování buněk [10,77].

Výskyt: CEA patří do skupiny karcinofetálních antigenů, které jsou vytvářeny během embryonálního a fetálního vývoje plodu. Tvorba CEA je tedy potlačena po narození plodu a u zdravého dospělého jedince ji nelze stanovit. S malými koncentracemi se můžeme setkat v tlustém střevě, žaludku, v plicích, slinivce a dalších tkáních [7,10,77].

Referenční rozmezí: Hodnota cut - off se pohybuje kolem 5 ng/ml (dle metody a dané laboratoře).

Klinické využití: Nelze použít pro screening ani diagnostiku [5]. Používá se pro monitorování průběhu onemocnění a odpovědi na léčbu [10,86].

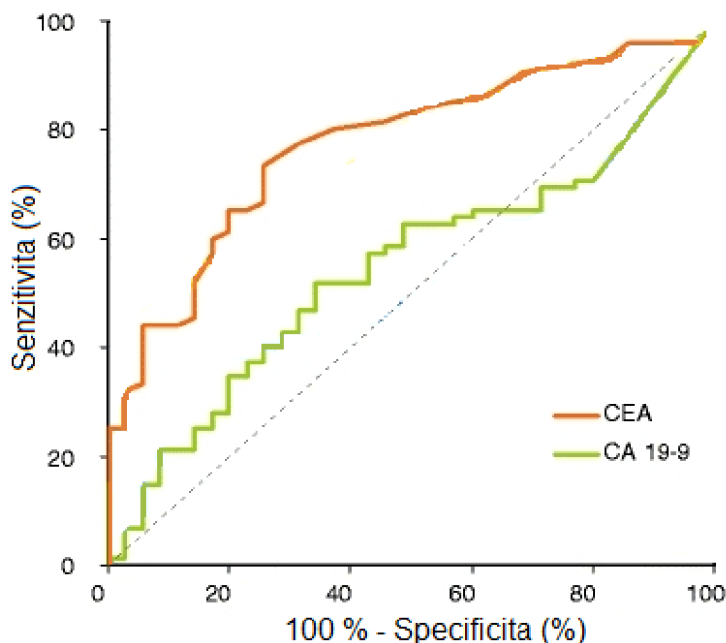
Maligní onemocnění

Zvýšené hladiny koncentrace CEA vykazují karcinomy trávicího ústrojí, plic, mléčné žlázy, pohlavních orgánů (vaječnicků), štítné žlázy, močového měchýře, ledvin, prostaty, dělohy aj.

Nejvyšší senzitivita markeru CEA kolem 60 % je pro kolorektální karcinom a 50 % pro nádory žaludku [7,86,89].

Benigní onemocnění

Zvýšené hladiny koncentrace CEA způsobující falešnou pozitivitu u 20 – 50 % benigních onemocnění jsou např. u jaterní cirhózy, onemocnění plic, ledvin, žlučníku, pankreatitidy, Crohnovy choroby. Zvýšené hodnoty CEA mají zejména kuřáci [5,7,89].



Obr. č. 7: ROC křivka CEA (kolorektální tumor) [22]

2.5.2 AFP (alfa-1-fetoprotein)

Vlastnosti: Alfa-1-fetoprotein je glykoprotein o molekulové hmotnosti 70 kDa. Na jednoduchém polypeptidovém řetězci složeného přibližně z 590 aminokyselin je navázáno 3 - 5 % sacharidů. AFP je svojí strukturou velice podobný albuminu, ale v molekule AFP jsou výrazněji obsaženy aminokyseliny glycin, serin a isoleucin [10].

Funkce: Mezi nejvýznamnější funkce AFP se řadí především jeho transportní role různých látek (steroidů, těžkých kovů, bilirubinu, mastných kyselin, retinoidů, antibiotik atd.) a funkce v imunitních a metabolických procesech. AFP je také spojený s regulací růstu a antioxidačními procesy. U plodu zprvu nahrazuje albumin a jeho transportní funkce [7,13].

Výskyt: AFP patří do skupiny onkofetálních proteinů. Plod produkuje AFP především buňkami žloutkového vaku od 10. dne od oplodnění až do 10. týdne gravidity a od 10. týdne gravidity poté ve fetálních játrech. AFP je také označován jako hlavní sérový protein plodu a jeho koncentrace prudce klesá s blížícím se porodem. U dospělého zdravého jedince je koncentrace AFP minimální. V séru matky je důležitým ukazatelem pro vývoj těhotenství. Zvýšení hladiny AFP v séru dospělých jedinců bylo pozorováno mimo těhotenství i ve spojitosti s některými zhoubnými i nezhooubnými onemocněními [7,13].

Referenční rozmezí: Hodnota cut - off se pohybuje kolem 3,6 ng/ml (dle metody a dané laboratoře).

Klinické využití: Stanovení AFP není doporučeno pro screening karcinomů. Stanovení AFP je přínosné také při odhadování rizika Downova syndromu u plodu [13].

Maligní onemocnění

Monitorování průběhu nádorových onemocnění patří k hlavním využitím AFP.

Pro hepatocelulární (jaterní) karcinom je AFP markerem první volby při senzitivitě až 80 %.

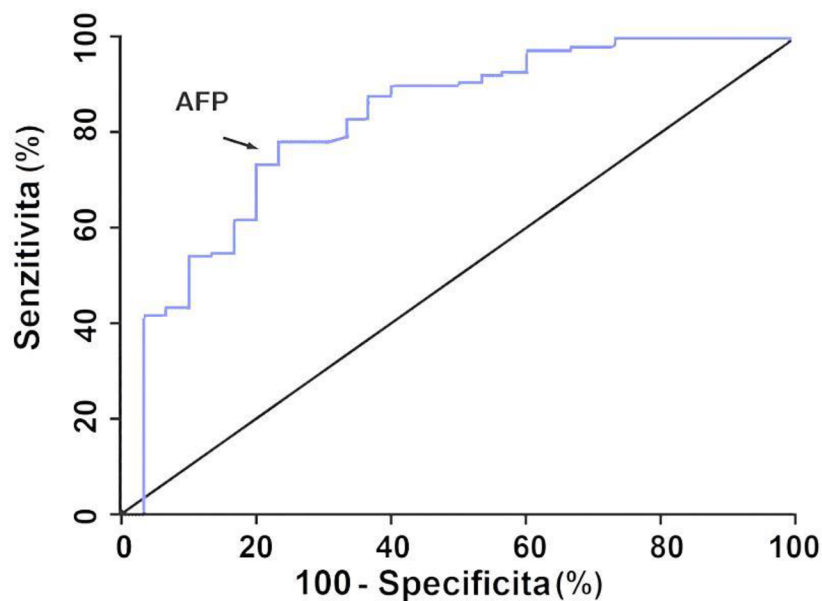
Pro embryonální karcinomy a nádory žloutkového vaku dosahuje až 80 % senzitivity.

Vysoká senzitivita byla určena také pro neseminomativní rakovinu varlete.

Zvýšené koncentrace se vyskytují u karcinomů vaječníku, trávicího traktu, střeva, žaludku a žlučových cest [7].

Benigní onemocnění

Zvýšené hladiny koncentrace AFP způsobující falešnou pozitivitu mohou způsobit tato benigní onemocnění: akutní virová i chronická hepatitida, cirhóza a nekróza jater, fyziologické a patologické těhotenství [7,84].



Obr. č. 8: ROC křivka AFP (hepatocelulární karcinom) [24]

2.5.3 CA 125

Vlastnosti: CA 125 má zřejmě strukturu glykoproteinu o molekulové hmotnosti asi 200 – 1000 kDa s vysokým obsahem sacharidů (24 %). CA 125 má proteinovou strukturu spojenou s uhlovodíkovými bočními řetězci. Molekula tohoto antigenu je značně heterogenní. V nativním stavu může vytvářet obrovské komplexy až 4 miliony Da [7,13,88].

Funkce: Není objasněna. Funkce CA 125 může být vázána s proteázovou aktivitou a s rolí při reprodukci [13,78].

Výskyt: Antigen CA 125 je produkován fetálními epitelovými tkáněmi. U dospělého člověka může být také syntetizován v epitelu tkáně vejcovodů, plic, endometria (vnitřní výstelky dělohy), cervixu (děložní hrdlo), perikardu (osrdečník) a peritonea (pobřišnice) [7,13].

Referenční rozmezí: Hodnota cut - off se pohybuje kolem 21 U/ml (dle metody a dané laboratoře).

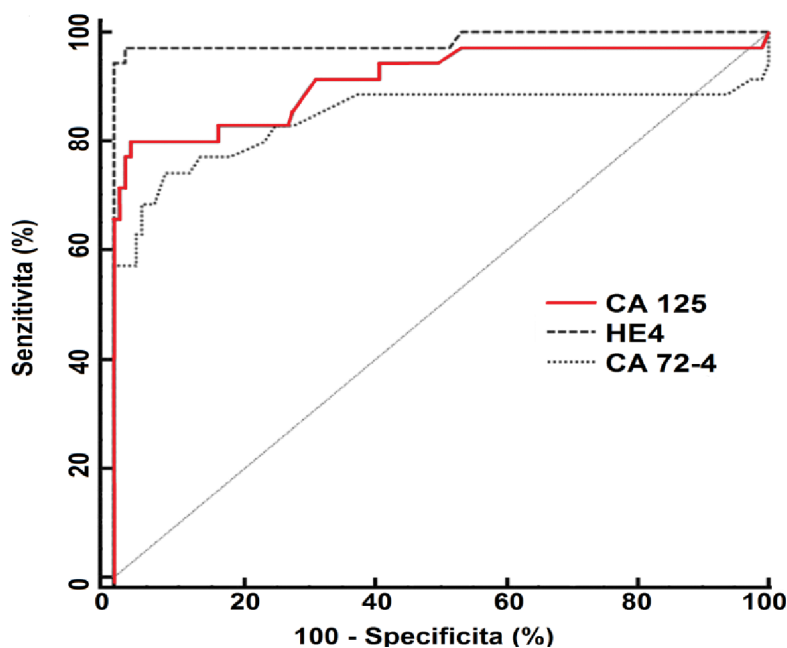
Klinické využití: Používá se pro screening a monitorování karcinomu ovarii u symptomatických pacientů v případě genetické zátěže [88].

Maligní onemocnění

Vysoká koncentrace CA 125 se nalézá u 80 % karcinomů ovarii (vaječnicků) serózního nemucinózního typu. Serózní typ karcinomu ovarii, kde je CA 125 markerem první volby, vykazuje senzitivitu až 90 % (cut - off 65 kU/l). Nárůst koncentrace markeru může předcházet klinickou diagnózu až o 1 - 8 měsíců. Při dokonalém odstranění primárního tumoru klesá koncentrace CA 125 o 75 – 90 % během prvního týdne. Senzitivita u dalších gynekologických nádorů je nižší. Zvýšená koncentrace je u karcinomů mléčné žlázy, pankreatu (slinivka břišní), plic, žlučových cest a také u hepatocelulárního karcinomu [10,13,82].

Benigní onemocnění

U benigních onemocnění se mohou koncentrace antigenu CA 125 pohybovat do hodnoty 65 kU/l. Jsou to zejména chronické onemocnění jater, benigní onemocnění ovarii, pankreatu a endometria nebo selhání ledvin. Chirurgický zásah v břišní dutině může také vyvolat zvýšenou koncentraci antigenu CA 125 [10,13,88].



Obr. č. 9: ROC křivka CEA 125 (tumor ovarii) [26]

2.5.4 CA 15-3

Vlastnosti: CA 15-3 je polymorfní epiteliální mucin (PEM) s vysokou molekulovou hmotností 300 až 450 kDa, nazývaný rovněž MUC1 (mucin 1). Tento glykosylovaný protein je tvořen O-glykosylovanými opakovanými sekvencemi 20 aminokyselin. Za normální situace se polymorfní epiteliální muciny (PEM) neodstávají do krevního oběhu. Pokud se však buňka přemění na maligní, dojde ke zvětšení propustnosti membrány a PEM se dostanou do krevního séra [7].

Funkce: Funkce antigenu CA 15-3 není přesně známá. Jedna z jeho rolí by mohla být účast na vazbě adhezivní molekuly typu ICAM-1. Vazba je zodpovědná za usnadnění metastazování nádoru nebo za

potlačení protinádorové odpovědi aktivovaných lymfocytů. Za fyziologických podmínek souvisí s ochranou epiteliálních struktur [7, 13].

Výskyt: Antigen CA 15-3 (MUC 1) se nachází na apikálním povrchu epiteliálních buněk různých orgánů plodu, především plic a jater. U dospělého jedince je syntetizován v epiteliálních buňkách vývodů mléčné žlázy, slinných žláz a bronchů plic [7,13].

Referenční rozmezí: Hodnota cut - off se pohybuje kolem 38 U/ml (dle metody a dané laboratoře).

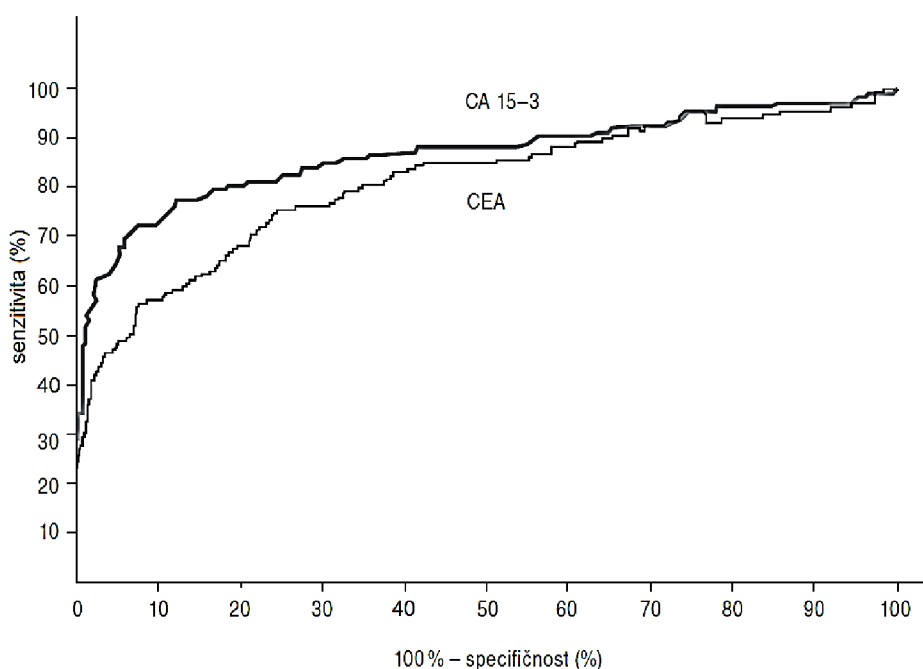
Klinické využití: Antigen nelze použít pro screening karcinomu prsu ani stanovení této diagnózy. Zjištěné koncentrace se však shodují se stádiem nemoci [7].

Maligní onemocnění

Hlavní využití antigenu je pro monitorování průběhu onemocnění u karcinomu prsu. Senzitivita u karcinomu prsu je až 90 % avšak s nízkou specificitou 20 – 40 %, u metastazujících nádorů až 80 %. Zvýšené hodnoty se také objevily u pacientů s karcinomy plic (senzitivita 63 %) a vaječníků (senzitivita 80 %) [7,13].

Benigní onemocnění

Senzitivitu toho tumorového markeru snižují benigní onemocnění prsu, trávicího ústrojí, dále pak jaterní cirhóza, akutní a chronická hepatitida, chronická renální insuficience, chronická bronchitida a pneumonie [7,13].



Obr. č. 10: ROC křivka CEA 15-3 (tumor prsu) [18]

2.5.5 CA 19-9

Vlastnosti: Molekula toho antigenu je sialylovaný pentasacharid lakto-N-fukopentaózy, obsažený sacharid se skládá z fukózy a sialové kyseliny. Tato molekula odpovídá haptenu determinanty lidské Lewis-a krevní skupiny. CA 19-9 je antigen, který se vyskytuje jako mucin v séru nebo jako glykolipid ve tkáních s molekulovou hmotností 36 kDa (glykolipid) [10,13].

Funkce: Role antigenu CA 19-9 není dosud objasněna.

Výskyt: CA 19-9 je syntetizován plodem v epitelových strukturách pankreatu, žaludku a žlučových cest, proto patří k onkofetálním antigenům. Syntéza u dospělých jedinců je omezena na stopové množství, a to zejména v epiteliálních buňkách pankreatu, žlučníku, plicních bronchů, žaludku a u některých nádorů. Odhaduje se, že 5 až 10 % populace tento antigen netvoří [10,13].

Referenční rozmezí: Hodnota cut - off se pohybuje kolem 37 U/ml (dle metody a dané laboratoře).

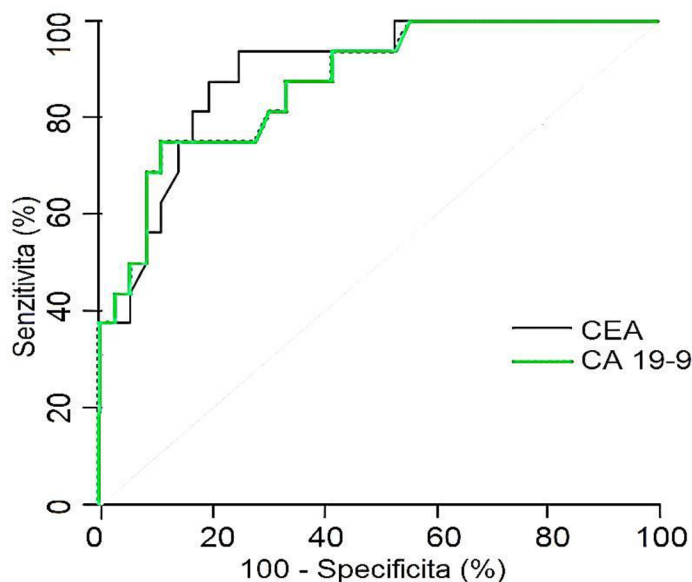
Klinické využití: CA 19-9 není vhodný pro screening a stanovení primární diagnózy. Používá se při sledování léčby a monitorování pacienta při onemocnění [10,13].

Maligní onemocnění

Stanovení antigenu se využívá zejména pro karcinomy slinivky při monitorování pacienta, kdy jeho senzitivita odpovídá vysokým hodnotám 68 – 94 % při specifitě 76 – 100 %. Vysoké hodnoty sice nekorelují s velikostí nádorové tkáně, ale dávají dobrý průkaz vzdálených metastáz. Stanovení antigenu nachází také použití pro mucinózní karcinomy ovarií, karcinom tlustého střeva (se senzitivitou 18 – 58 %), karcinom žaludku (senzitivita 25 – 60 %), karcinom hepatobiliární (55 -79 %), karcinom cholangiocelulární (22 – 49 %). Stanovené koncentrace tohoto antigenu dobře souvisejí s monitorováním pacienta při hodnocení efektu terapie [10,13].

Benigní onemocnění

Falešnou pozitivitu tohoto tumorového markeru snižují benigní onemocnění žaludku, střeva, jater, slinivky atd. Výrazné zvýšení antigenu v séru způsobuje i mírná cholestáza. Antigen 19-9 se rovněž nachází v séru pacientů s cystickou fibrózou [10,13,97].



Obr. č. 11: ROC křivka CA 19-9 (tumor pankreatu) [20]

2.5.6 CA 72-4

Vlastnosti: Antigen 72-4 je glykoprotein (mucinový komplex) o velké molekulové hmotnosti 1000 kDa. Antigen je určený na základě reakce s dvěma monoklonálními protilátkami B 72.3 a CG 49 [7,13].

Funkce: Role antigenu 72-4 není dosud objasněna.

Výskyt: CA 72-4 patří do skupiny onkofetálních antigenů, které produkuje plod v epitelech pankreatu, žaludku a jícnu. Stopové koncentrace se nacházejí u dospělých jedinců v tkáních pohlavních orgánů, gastrointestinálních orgánech atd. Naopak vysoké koncentrace produkují maligní karcinomy žaludku, pankreatu, ovaria a další [7,13].

Referenční rozmezí: Hodnota cut - off se pohybuje kolem 7 U/ml (dle metody a dané laboratoře).

Klinické využití: CA 72-4 není vhodný pro screening ani pro primární diagnostiku. Své uplatnění nachází při monitorování především maligních karcinomů žaludku a pankreatu a dále také při nádorech střeva, mléčné žlázy a určitých typů nádorů vaječnicků [7,13,84].

Maligní onemocnění

Stanovení antigenu se využívá především při monitorování choroby u karcinomu žaludku a v kombinaci s CEA k odlišení benigního a maligního onemocnění slinivky. Hodnota koncentrace antigenu většinou koreluje s přítomností vzdálených metastáz. CA 72-4 má vysokou specifitu u maligních onemocnění, ale poměrně nízkou senzitivitu, proto se často při sledování choroby používá v kombinaci s dalšími markery. Sledování průběhu choroby se používá u karcinomu žaludku při senzitivě 48 % s 95 % specifícností, senzitivita se zvyšuje v kombinaci s CEA nebo CA 19-9, dále pro mucinózní karcinom vaječnicků se senzitivitou 47 – 80 % (větší než u CA 125) při zvýšení senzitivity v kombinaci s CA 125, pro karcinom tlustého střeva je senzitivita 20 – 41 %, ale velká falešná pozitivita, proto se používá kombinace s CEA a zvýšení senzitivity až na 87 %. Antigen může být dále použit pro sledování nemocných s metastázemi zmíněných nádorů do jater [7,13,84].

Benigní onemocnění

Antigen CA 72-4 má vysokou diagnostickou specifícnost pro benigní onemocnění, což patří k jeho velkým nevýhodám. Zvýšenou koncentraci můžeme nalézt například u těchto benigních onemocnění: zánětlivé onemocnění zažívacího traktu, jaterní cirhóza, chronická bronchitida, choroby žaludku, akutní pankreatitida, plicní a revmatické choroby, benigní onemocnění vaječnicků, onemocnění prsu, gynekologické poruchy [7,13,84].

2.5.7 TPA a TPS

Vlastnosti: Tkáňový polypeptidový antigen (TPA) odpovídá fragmentům solubilních cytokeratinových podjednotek. Fragmenty mají molekulovou hmotnost kolem 40 kDa. Do této doby bylo objeveno asi 20 typů cytokeratinů, které spolu tvoří polymery. Epiteliální buňky mají určité kombinace cytokeratinů pro ně charakteristické, a to zejména v závislosti na histologickém typu tkáně. Při proliferaci nádorové tkáně se uvolňují tyto fragmenty cytokeratinů do séra. TPA reaguje proti cytokeratinům 8, 18 a 19. Tkáňový polypeptidový specifický antigen (TPS) epitop reaguje s cytokeratinem 18. Z dalších testovaných protilátek proti cytokeratinům drtivá většina reagovala s epitopy 8, 18 a 19. Při stanovení velmi záleží na různé specifitě protilátek v různých soupravách a lze tedy očekávat různé výsledky [10,13,84].

Funkce: Cytokeratiny patří k proteinům cytoskeletární struktury buňky. TPA a TPS přecházejí z těchto struktur do séra jako fragmenty cytoskeletárních proteinů. Cytokeratiny se dělí na kyselé cytokeratiny třídy I (9-20) a bazické cytokeratiny třídy II (1-8). Cytokeratiny se vyskytují ve formě

heteropolymerů a obsahují jeden cytokeratinin třídy I a druhý cytokeratinin třídy II. Epitelie běžně syntetizují cytokeratiny 8 a 18 a někdy také 19 a 7 [10,13].

Výskyt: TPA a TPS jsou fyziologicky produkovány především v trofoblastu placenty. Prokazatelné jsou také v různých dalších orgánech u vyvíjejícího se plodu. Stopové koncentrace jsou nalézány u dospělých jedinců v tkáni mléčné žlázy, močového měchýře, plic a trávicího traktu. Ve vysokých koncentracích se také nacházejí ve tkáních primárních maligních nádorů [10,13].

Referenční rozmezí: TPA do 70 U/l, lepší specificita do 130 U/l, TPS do 80 U/l (dle metody)

Klinické využití:

Při maligním procesu v souvislosti s růstem nádoru a dalšími ději (apoptózou, nekrózou) se TPA (TPS) dostává do séra. Jeho hladina je však zvýšena i u benigních onemocnění. Jako nádorový marker není vhodný pro screening ani pro primární diagnózu. Hlavní využití těchto univerzální markerů spočívá v monitorování průběhu onemocnění a sledování úspěšnosti terapie. TPA a TPS totiž reagují s vyšší dynamikou než ostatní markery a jejich hladiny dobře korelují s procesem proliferace nádorové buňky dříve, než je možné vznikající nádory rozpoznat [10,13,84].

Maligní onemocnění

TPA (TPS) má nejvyšší senzitivitu pro sledování karcinomu močového měchýře. Zvýšená hladina TPA rychle poklesne v případě účinné terapie a tento efekt je výraznější než u markerů diferenciačního typu. Senzitivita a specificita se mění dle typu a stádia nádoru. Jako doplňkový marker je doporučován při sledování onemocnění mléčné žlázy s CA 15-3, nádory plic, ledvin, trávicího traktu atd. [10,13].

Benigní onemocnění

Falešnou pozitivitu způsobují onemocnění jako je jaterní cirhóza a hepatitida a další infekční onemocnění. Při onkologické léčbě ozářením dochází také ke zvýšení koncentrace TPA (TPS) v séru [10,13].

2.5.8 HCG (choriogonadotropin)

Vlastnosti: Choriogonadotropin je glykoprotein o molekulové hmotnosti 36,7 kDa. HCG je tvořen alfa podjednotkou o 14,5 kDa z 92 aminokyselin a beta podjednotkou o 22,2 kDa z 145 AK. Alfa i beta podjednotku spojují intercysteinové vazby, které vytvářejí můstky, které se podílejí na vazbě k receptorům. Obě podjednotky tvoří HCG hormon. HCG molekula je podobná s dalšími hormony LH, FSH a TSH, které mají v podstatě alfa-podjednotku stejnou, beta-podjednotka má výrazně rozdílnou strukturu a určuje biologickou specificitu hormonu [10,13].

Funkce: HCG udržuje v prvních týdnech těhotenství žluté tělísko, dále se podílí na produkci estrogenu a progesteronu. HCG se také účastní procesu imunotolerance plod – matka [10,13].

Výskyt: HCG je fyziologicky syntetizován placentou po početí. Hodnoty HCG se v krvi matky zvyšují do 14. týdne, poté je hodnota stálá až do porodu. Po porodu hodnota HCG klesá na normu. HCG může u zdravých osob vznikat v hypofýze. Pro nádorové onemocnění je důležitá beta podjednotka HCG. Tato podjednotka je přítomna na membránách většiny maligních tumorů [10,13].

Referenční rozmezí: Hodnota cut - off se pohybuje kolem 10 IU/l (dle metody a dané laboratoře).

Klinické využití: HCG se nejčastěji stanovuje pro diagnózu těhotenství. V onkologii se často využívá specifitější stanovení volné beta podjednotky HCG. Zvýšené hodnoty mohou naznačovat přítomnost nádorů varlat, ovárií choriokarcinomu atd. [10,13].

Maligní onemocnění

HCG se může využívat ke screeningu pouze u osob podezřelých (nesestouplé varle, nádor testes) na germinativní nádory varlat. Není vhodný pro primární diagnostiku, ale pomocí hodnoty HCG lze potvrdit histologický typ. Pomocí stanovení lze určit stadium onemocnění. Má velký význam při monitorování průběhu onemocnění s nádory testes a ověření efektu léčebné terapie. Senzitivita se pohybuje kolem 50 – 90 % pro neseminomy, pro seminomy pouze 10 – 20 %. Senzitivita je 100 % u choriokarcinomů. U dalších karcinomů, např. pankreas, plíce, ledviny, močový měchýř, je senzitivita velmi nízká, 10 - 20 % [10,13].

Benigní onemocnění

Falešnou pozitivitu zvyšuje fyziologické i patologické těhotenství, ovariální cysty a myomy [10,13].

2.5.9 Cyfra 21-1

Vlastnosti: Cyfra 21-1 je polypeptid o molekulové hmotnosti 40 kDa. Cyfra 21-1 je solubilní fragment cytokeratinu 19. Stanovení je více specifické, než tomu bylo u TPA, protože Cyfra 21-1 se vyskytuje v epitelových buňkách skvamózního typu, a proto má vyšší orgánovou specifitost [7,13].

Funkce: Podobně jako TPA, také Cyfra 21-1 patří do skupiny cytoskeletálních proteinů, které se podílejí na struktuře buněčného skeletu. Při maligním onemocnění je tento marker pravděpodobně produkován při buněčné nekróze [7,13].

Výskyt: Cyfra 21-1 se prokazatelně vyskytuje v omezeném množství ve fyziologickém stavu v tkáních plic, dělohy, močového měchýře a trávicího ústrojí [7,13,78].

Referenční rozmezí: Hodnota cut - off se pohybuje kolem 3,3 µg/l (dle metody a dané laboratoře).

Klinické využití: Zvýšené hodnoty byly nalezeny u maligních i benigních onemocnění.

Maligní onemocnění

Jako většina nádorových markerů se nehodí pro screening ani pro stanovení primární diagnózy. Hodnota markeru většinou odpovídá stádiu onemocnění. Hlavní oblastí stanovení Cyfra 21-1 je sledování průběhu onemocnění a monitorování úspěšnosti léčebné terapie. Při úspěšnosti léčby následuje rychlý pokles hodnoty Cyfra 21-1 v séru až na normální hodnoty. Pokud je hodnota markeru na stejné úrovni nebo se tato hodnota pomalu snižuje, pak tento průběh značí neúplné odstranění nádorového onemocnění. U nemalobuněčného karcinomu plic se senzitivita pohybuje kolem 55 % a je markerem první volby pro toto onemocnění. Pro velkobuněčné karcinomy a adenokarcinomy je nižší senzitivita 35 - 40 %. Pro karcinom močového měchýře je senzitivita asi 30 %. Může být stanoven jako doplňkový marker při nádorech cervixu a u nádorů v oblasti hlavy a krku [7,13].

Benigní onemocnění

Falešně pozitivní hodnotu markeru zvyšují onemocnění jako je jaterní cirhóza a hepatitida. Dobrou specifitost má Cyfra 21-1 pro benigní onemocnění plic, např. pneumonie, tuberkulóza, bronchitida, astma atd. Nižší hodnoty Cyfra 21-1 vykazují onemocnění ledvin, jater a infekční onemocnění [7,13].

2.5.10 PSA (prostatický specifický antigen)

Vlastnosti: PSA je glykoprotein složený z 237 aminokyselin v jednoduchém polypeptidovém řetězci o molekulové hmotnosti 34 kDa obsahujícím 10 % sacharidů. PSA má enzymovou aktivitu serinových proteináz podobnou chymotrypsinu. PSA je v séru vázán (inaktivován) z 95 % na alfa-antichymotrypsin a v menší míře na alfa-makroglobulin. Volná podoba PSA se v séru vyskytuje obvykle v 10 - 25 % [7,13].

Funkce: Role PSA v organismu je umožnění zkapalnění seminální plasmy, čímž usnadňuje pohyb spermatozool. PSA interaguje s plazminogenem za tvorby fragmentů, které inhibují angiogenezi. Inhibice angiogeneze a nižší rychlost růstu nádoru prostaty vypovídá o možné biologické funkci PSA. Jelikož je velká část PSA inaktivována vazbou na alfa-antichymotrypsin, nelze předpokládat důležitou funkci v organismu [7,13].

Výskyt: PSA fyziologicky produkují epiteliální buňky žlázových vývodů. PSA je však produktem zejména prostatické tkáně, ale může být produkován i v epitelu močového měchýře. PSA je také tvořen z 10 % proteinů v seminální plazmě. Produkce PSA provází maligní i benigní onemocnění prostaty [7,13].

Referenční rozmezí: Hodnota cut - off se pohybuje kolem 4 mg/l (dle metody a dané laboratoře).

Klinické využití: Hodnota PSA popř. volné PSA se stanovuje u maligních i nemaligních onemocnění [7,13].

Maligní onemocnění

Stanovení PSA se pro screening karcinomu prostaty u asymptomatických jedinců zatím nepoužívá. U symptomatických pacientů zatím není jasně určeno, zda PSA lze použít pro screening. Vyšetření se ordinuje pro pacienty s rodinnou zátěží a s poruchami močového ústrojí. Pomocí hodnoty PSA lze jen těžko odlišit maligní karcinom od benigní formy. Význam má také stanovení poměru vázané a volné frakce PSA pro odlišení zmíněné benigní hyperplazie od karcinomu prostaty. U hyperplazie má poměr volného k celkovému PSA vyšší hodnotu o 15 %. U karcinomu prostaty je poměr výrazně nižší. PSA je markerem první volby pro sledování průběhu a účinku terapie maligního karcinomu prostaty. Po radikální prostatektomii zvýšené hodnoty PSA značí možnost zbytkové choroby v 70 % nebo návrat choroby v 30 %. Hodnota PSA koreluje s účinností léčebné terapie např. radioterapie. Pokles PSA dobře koreluje s délkou přežití pacienta. Hodnotu PSA lze také využít pro potvrzení stádia onemocnění u 95 % metastatických nádorů [7,13].

Benigní onemocnění

Falešnou pozitivitu způsobuje již zmíněná benigní hyperplazie prostaty nebo prostatitida. Koncentrace PSA stoupá také po rektálním vyšetření prostaty, kolonoskopii, biopsii nebo po jakémkoliv mechanickém podráždění do prostaty, jako je např. jízda na kole (koni) nebo sexuální aktivita [7,13].

2.5.11 NSE (neuron specifická enoláza)

Vlastnosti: NSE je solubilní protein, který je obsažen v cytoplazmě buněk. Tento glykolytický izoenzym enolázy má molekulovou hmotnost přibližně 80 kDa a vyskytuje se v různých dimerických izoformách tvořených z podjednotek alfa, beta, gama. NSE je dimer složený z podjednotek alfa-gama a gama-gama. Izoenzym enolázy katalyzuje přeměnu 2-fosfoglycerátu na fosfoenolpyruvát. NSE se primárně vyskytuje v neuronech a je též produkována maligními nádory [7,13].

Funkce: NSE je glykolytický enzym, který se podílí na metabolismu sacharidů [7,13].

Výskyt: NSE produkuje nervová a plicní tkáň plodu. Za fyziologických podmínek se vyskytuje u dospělých jedinců v neuronech. Zvýšené koncentrace NSE jsou produkovány v neuroblastomech, malobuněčných karcinomech plic, karcinomu ledvin a seminomech [7,13].

Referenční rozmezí: Hodnota cut - off se pohybuje kolem 15 mg/l (dle metody a dané laboratoře).

Klinické využití: Hodnotu NSE ovlivňuje několik faktorů při stanovení. Při stanovení výrazně interferuje hemolýza. NSE je obsažena v erytrocytech a trombocytech a je nutné odstranit krevní elementy do jedné hodiny po odběru krve. Hodnota NSE je lépe stanovitelná v likvoru než v séru [7,13].

Maligní onemocnění

NSE není vhodná pro screening ani pro stanovení diagnózy. Prognostický význam má NSE pro malobuněčné karcinomy plic a neuroblastomy. Senzitivita pro malobuněčné karcinomy plic je uváděna kolem 93 % při 92 % specifitě. Hodnota NSE poskytuje dobrou korelaci s rozsahem onemocnění. Hlavní použití NSE spočívá v monitorování průběhu onemocnění a sledování léčebné terapie, např. malobuněčného karcinomu plic, neuroblastomů, meduloblastomů, retinoblastomů, karcinomů ledvin a prostaty, ostatních nádorů mozku jako gliom, meningiom. Odpovědí na chemoterapii bývá zvýšení hodnoty NSE po prvním cyklu. Po týdnu při úspěšné terapii obvykle rychle klesá k normálním hodnotám [7,13].

Benigní onemocnění

Falešnou pozitivitu způsobují zejména plicní a jaterní onemocnění. Ke zvýšení NSE může docházet také při encefalitidě, ischemii, infarktu, úrazu hlavy, epilepsii, schizofrenii a dalších zánětlivých onemocněních mozku [7,13].

2.5.12 Feritin

Vlastnosti: Feritin je makromolekula, která se skládá z proteinového obalu (označovaného též jako apoprotein) a jádra tvořeného kationtem železa. Apoprotein je složen z 24 podjednotek o molekulové hmotnosti 480 kDa. Podjednotky se dělí na těžké (kyselé) s molekulovou hmotností 21 kDa a lehké (bazické) s molekulovou hmotností 19 kDa. Jádro obsahuje přibližně 2500 až 4500 Fe^{3+} iontů. Existuje přes 20 izoferitinů, které se liší zastoupením kyselých a bazických podjednotek v proteinovém obalu [10,13].

Funkce: Hlavní funkcí bazických izoferitinů, které se nacházejí v játrech, slezině a kostní dřeni, je dlouhodobé skladování železa. Při nedostatku železa v organismu je toto uvolňováno z feritinu. Feritin také chrání buňky před toxickými účinky z nadbytku železa [10,13].

Výskyt: Bazické izoferitiny jsou nejvíce syntetizovány v játrech, slezině a kostní dřeni. Kyselé izoferitiny se nacházejí v kosterním a srdečním svalstvu a nádorových tkáních. V těhotenství se feritin vyskytuje též v placentě. Dále se může také vyskytovat na povrchu B-lymfocytů a monocytů a v tkáni plic [10,13,82].

Referenční rozmezí: muži 20 – 300 ng/ml, ženy 10 – 150 ng/ml

Klinické využití: Klinické použití feritinu spočívá v diagnóze přebytku a nedostatku železa a při zjišťování stavu metabolismu železa. Představuje cennou pomůcku při rozlišení anémie z nedostatku železa od jiných typů anémie a pomáhá odhalovat úbytek železa ještě před nástupem anémie. Pravidelně se stanovuje u pacientů podstupujících dialýzu [10,13,82].

Maligní onemocnění:

Zvýšené hodnoty feritinu jsou pozorovány u akutní myeloblastické leukémie, hodgkinského lymfomu, mnohočetného myelomu. Nespecifické zvýšení provází karcinomy plic, tlustého střeva, jater a prostaty. U hematologických maligních onemocnění hodnota feritinu koreluje se závažností choroby. Hlavní oblastí využití tohoto markeru je monitorování průběhu onemocnění a především sledování léčebné terapie. Stanovení feritinu má význam při metastázách do jater, kde senzitivita se pohybuje okolo 76 % [10,13,82].

Benigní onemocnění:

Falešnou pozitivitu způsobuje mnoho benigních onemocnění, jako jsou zánětlivé choroby, poškození jater, hemochromatóza a hemosideróza. Na zvýšení feritinu má také vliv fyzická zátěž a alkoholismus [10,13].

2.6 Monitorování průběhu onemocnění a efektu terapie u vybraných nádorových onemocnění

2.6.1 Karcinom prsu

Pomocí markerů lze zjistit metabolické šíření o 4 - 6 měsíců dříve než s využitím zobrazovacích metod [85]. Marker první volby pro sledování pacientů je CA 15-3 se senzitivitou kolem 60 % při specificitě 50 - 85 %. Pro prokázání recidivy nebo vzdálených metastáz je senzitivita velmi dobrá (60 – 89 %). Pomocným markerem je CEA, avšak jeho senzitivita je nižší. Doporučovaná kombinace je CA 15-3 a TPA. TPA je doporučován zejména pro invazivní nádory. Senzitivita TPA je stanovena na 60 % a pro pokročilejší stádium nemoci dosahuje až 80 %. Pro prokázání recidivy je senzitivita kolem 60 %. Kombinace CA 15-3 a TPA je nejvhodnější pro včasný záchyt recidivy. Stanovení CA 125 se doporučuje pro podezření metastáz do plic. MCA (antigen mucinózních karcinomů) má podobnou senzitivitu jako CA 15-3, ale má vyšší falešnou pozitivitu. Pro efekt léčby je možné onemocnění sledovat pomocí TPS, který má vyšší specificitu než TPA. Mohou být také vyšetřovány markery CYFRA 21-1, HER-2/neu, TK a další [7,78].

2.6.2 Karcinom vaječníků

Marker první volby pro karcinomy ovárií je CA 125, který může být použit i pro screening rizikových skupin pacientů s genetickým předpokladem. Při monitorování léčby je senzitivita CA 125 pro serózní ovariální karcinomy až 90 %. Obecně pro karcinomy vaječníků je senzitivita 87 %. Jako doplňkový marker se používá TPA nebo TPS, v závislosti na histologickém typu jsou doporučeny další markery pro sledování průběhu choroby při léčbě. Pro mucinózní karcinom je jako marker první volby určen CA 19-9 a CA 72-4 (senzitivita 47 – 80 %) a doplňkovým markerem je CEA. Pro germinativní karcinom jsou určeny základní markery AFP a volná podjednotka HCG. Novým markerem pro sledování karcinomů ovárií je HE4 (Lidský epididymální protein 4). HE4 se vyznačuje vyšší senzitivitou v raném stádiu onemocnění než marker CA 125. Kombinace CA 125 a HE4 poskytuje vůbec nejvyšší senzitivitu 77 % při specifčnosti 95 % pro ovariální karcinom [7,78].

2.6.3 Karcinom plic

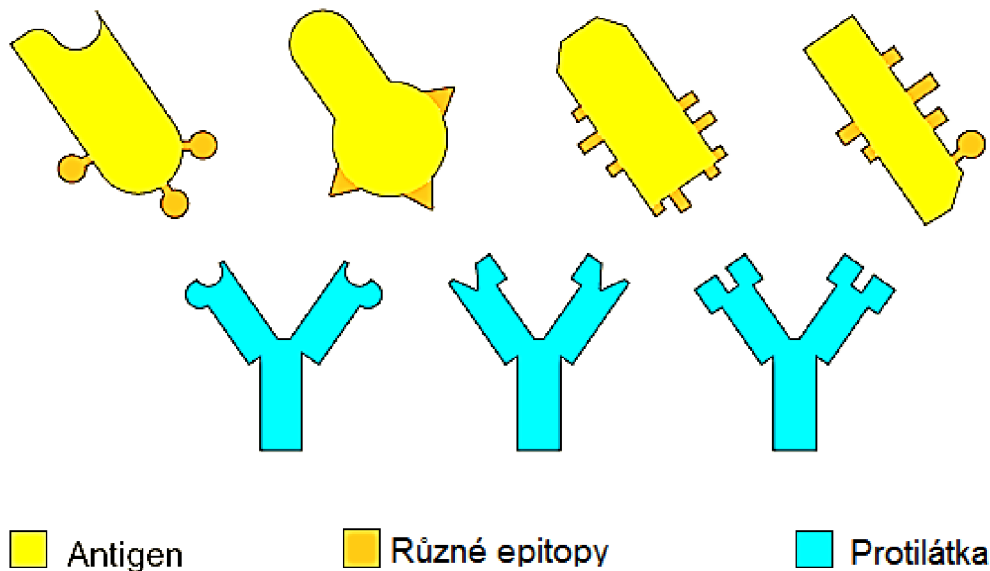
Správná volba nádorového markeru se u karcinomů plic řídí výhradně histologickým typem nádoru. Pro nemalobuněčné karcinomy (NSCLC) je markerem první volby CYFRA 21-1 se senzitivitou pro epidermoidní karcinomy až 60 % a pro adenokarcinomy přes 40 %. Pro adenokarcinomy je vyšetřován také jako základní marker CEA. Jako doplňkový marker pro sledování se používá TPA a TPS nebo SCCA. U malobuněčných plicních karcinomů se používá jako základní marker první volby NSE se senzitivitou 93 %. Senzitivita NSE u SCLC se pohybuje kolem 60 až 70 %. Jako doplňkové markery jsou doporučovány CEA, CYFRA 21-1, TPA, TPS a SCCA [7,78].

2.7 Základní pojmy imunoanalýzy

2.7.1 Antigen

Antigeny jsou vysokomolekulární látky přirozeného nebo syntetického původu, které imunitní systém rozeznává jako cizí. Z hlediska biochemické struktury jsou to různé biopolymery složené z proteinů, polysacharidů, glykoproteinů, lipoproteinů, nukleoproteinů a hormonů. Jejich přítomnost v organismu stimuluje tvorbu protilátek a navozuje tedy imunitní odpověď. Antigeny se dělí na kompletní a nekompletní. Kompletní antigen se nazývá imunogen. Imunogen má schopnost navodit specifickou imunitní odpověď (imunogenicita), která zahrnuje tvorbu protilátek a schopnost s protilátkami a lymfocyty reagovat (specifita). Imunogen tedy reaguje pouze s těmi lymfocyty a protilátkami, které specificky vyvolal. Nekompletní antigen se nazývá haptén. Haptén má schopnost specifické vazby na protilátku, ale nevyvolává imunitní odpověď jako imunogen. Téměř každá nízkomolekulární látka může být hapténem a po navázání na vhodný nosič se může stát imunogenem. Molekula imunogenu se skládá z makromolekulárního nosiče a nízkomolekulárních determinantů (determinantních skupin), které se nazývají epitopy. Epitop je specifický povrchový rys antigenu, který může být vázán protilátkou; představuje určitou skupinu atomů na povrchu antigenu a charakterizuje jeho specifitu a schopnost reagovat s vazebným místem protilátky. Antigeny vzhledem ke svému původu můžeme

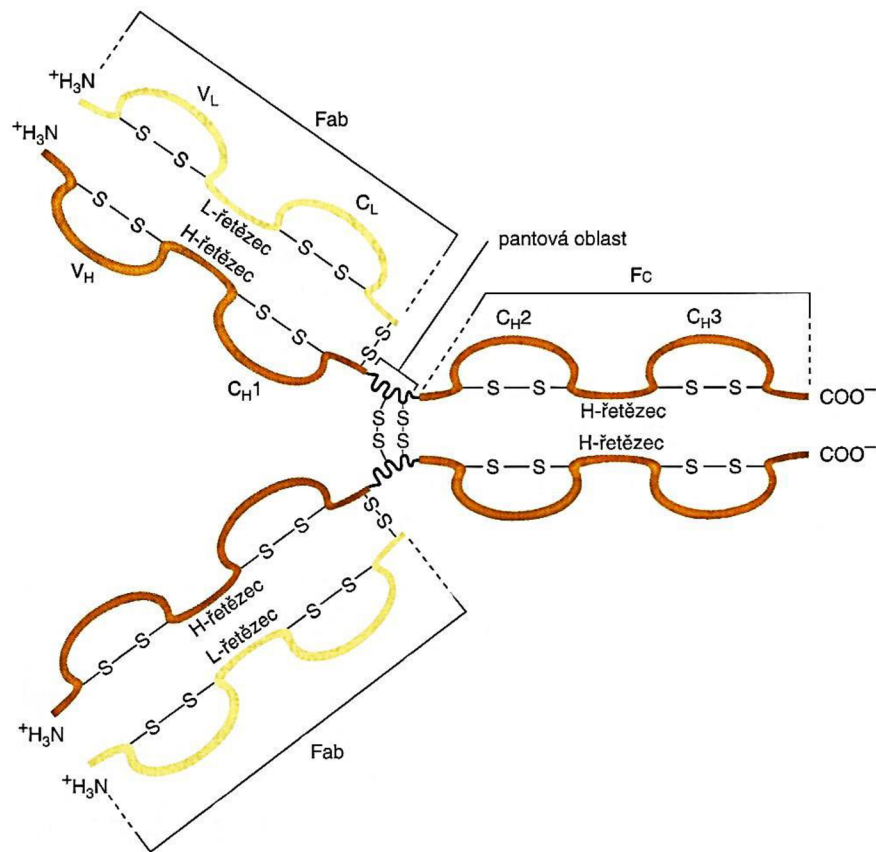
rozdělit na přirozené a syntetické. Přirozené antigeny jsou cizorodé látky z vnějšího prostředí, které vytvářejí především mikroorganismy. Tyto makromolekulární sloučeniny jsou obsaženy zejména v bakteriální stěně. Syntetické antigeny jsou připravené uměle a jsou většinou tvořeny z přirozeného nebo syntetického nosiče s přesně definovanými determinantními skupinami [7,9].



Obr. č. 12: *Antigeny a protilátky* [42]

2.7.2 Protilátky

Protilátky jsou glykoproteiny krevního séra, které nazýváme imunoglobuliny. Ty jsou produkovány imunitním systémem, který se skládá ze dvou hlavních součástí: specifické imunity (B-lymfocyty, T-lymfocyty) a přirozené (nespecifické) imunity. Imunoglobuliny jsou syntetizovány především buňkami B-linie, plazmatickými buňkami, které vytvářejí a uvolňují imunoglobuliny do plazmy jako reakci na kontakt s nejrůznějšími antigeny. Tyto produkováné imunoglobuliny vykazují specifickou vazebnou aktivitu k určitému antigenu. Imunoglobuliny jsou složeny ze dvou lehkých řetězců (L) a dvou těžkých řetězců (H), které jsou spojené disulfidovými vazbami. Lehký řetězec má relativní molekulovou hmotnost kolem 23 kDa a je složen přibližně z 212 až 220 aminokyselin, naproti tomu těžký řetězec má relativní molekulovou hmotnost 35 – 75 kDa je tvořen přibližně ze 450 aminokyselin. Lehké i těžké řetězce mají variabilní (V) a konstantní (C) část. Sekvence aminokyselin ve variabilních částech lehkých řetězců určují specifitu protilátky a vytvářejí vazebné místo pro určitou antigenní determinantu (epitop) – pantová oblast. L a H řetězce se dělí podle struktury konstantní oblasti. Existují dva typy lehkých řetězců kappa (κ) a lambda (λ). U lidí je mnohem častější řetězec kappa. Těžké řetězce dělíme podle struktury konstantní oblasti do pěti tříd: α , λ , γ , ϵ a μ . Máme tedy pět tříd imunoglobulinů: IgG, IgM, IgA, IgD a IgE. V krevním séru jsou nejvíce zastoupeny imunoglobuliny třídy IgG a IgM. Na Obr. č. 13 je zobrazena struktura IgG [11,16].



Obr. č. 13: *Struktura IgG* [16]

Protilátky dělíme na polyklonální a monoklonální dle způsobu přípravy.

Polyklonální protilátky se dají charakterizovat jako produkty mnoha klonů B-lymfocytů. Tyto protilátky se připravují cílenou imunizací zvířat, kdy se zvířeti aplikuje příslušný antigen intravenózně. Kompletní antigeny obsahují více epitopů a tedy v organismu aktivují několik klonů B-lymfocytů. Během imunizace tedy v krevním séru tohoto zvířete vzniká směs protilátek (antisérum) proti různým epitopům použitého antigenu, které se nazývají polyspecifické protilátky. Pokud by byl použit k imunizaci jeden antigen, vytvářené protilátky se nazývají monospecifické. Hlavní předností polyklonálních protilátek je jejich vysoká citlivost a vyšší vazebná energie mezi celou molekulou antigenu a protilátkou. Značnou nevýhodou jsou velké rozdíly v kvalitě protilátek vlivem individuální imunologické odpovědi [11,14].

Monoklonální protilátky jsou produktem jednoho klonu B-lymfocytů a jsou tedy specifické proti jedinému epitopu. Tyto protilátky nejsou produkovány přímo organismem, ale buněčnou kulturou. V prvním kroku imunizace se získají lymfocyty produkující protilátky po imunizaci myši příslušným antigenem. V druhém kroku se tyto lymfocyty hybridizují s nádorovými buňkami a následně dojde ke splynutí jader a vytvoření hybridomů. Další syntéza protilátek se tedy odehrává v hybridomu. Zatímco B-lymfocyt je nositelem specifity produkované protilátky, nádorová buňka je nositelem nesmrtelnosti. Hybridom tedy zdědí po nádorové buňce možnost nepřetržitého růstu a po aktivovaném B-lymfocytu

schopnost syntetizovat monoklonální protilátku namířenou proti jedné antigenní determinantě. Hlavní výhodou je reprodukovatelnost procesu, dlouhodobá produkce, která nekončí smrtí zvířete, vyšší čistota a specifita. K nevýhodám těchto protilátek patří nižší vazebná energie mezi molekulou antigenu a protilátky a vyšší počáteční investice do výroby [11,14].

2.7.3 Reakce antigen-protilátka

Podstatou všech imunochemických metod je interakce mezi antigenem a protilátkou. Při reakci antigen-protilátka vzniká imunokomplex [11,19].



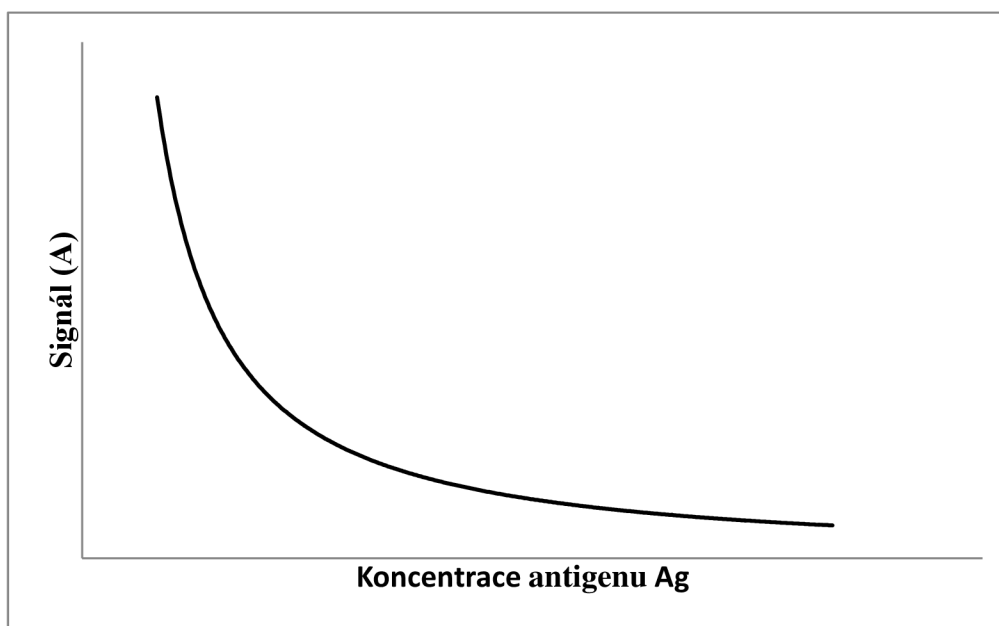
Mezi protilátkou a antigenem vznikají nekovalentní vazby. Tyto vazby lze rozdělit dle jejich charakteru na hydrofobní interakce, iontové a vodíkové vazby, van der Waalsovy slabé nevazebné interakce [11,19]. Intenzitu interakce mezi vazebným místem protilátky a jednou determinantní skupinou antigenu vyjadřuje afinita. Afinita tedy popisuje vazebnou energii pro jeden epitop antigenu. Sumu všech interakcí mezi protilátkou a antigenem vyjadřuje avidita. Avidita zahrnuje afinitu, která je dána příspěvky všech vzniklých vazeb mezi epitopy antigenu a protilátkou a další nespecifické faktory, které ovlivňují vazbu mezi antigenem a protilátkou. Výsledná avidita je mnohem vyšší než pouhý součet afinit jednotlivých protilátek [11]. Při tvorbě imunokomplexů reakcí antigenu a protilátky se při této reakci mohou vyskytovat sekundární jevy, jako jsou zkřížené reakce, což jsou reakce protilátky, jejíž tvorbu vyvolal určitý antigen, s jiným antigenem, který má stejné nebo podobné antigenové determinanty jako antigen původní. Zkřížené reakce se vyskytují mezi sacharidovými antigeny, které mají podobnou chemickou strukturu [9,19]. Precipitační a aglutinační reakce patří do základních imunochemických reakcí. Precipitace je interakce rozpustného antigenu s rozpustnou protilátkou za vzniku precipitátu (sraženiny). Aglutinace (obecně shlukování částic) je reakce protilátky s nerozpustným antigenem, která vede ke vzniku viditelných shluků antigenu [9].

2.8 Imunoanalytické metody

Imunoanalytické metody můžeme třídit podle různých kritérií a hledisek. Nejčastěji se tyto metody rozdělují podle uspořádání reakce na kompetitivní a nekompetitivní a podle potřeby separace volné a vázané frakce na heterogenní a homogenní [19].

2.8.1 Kompetitivní metody

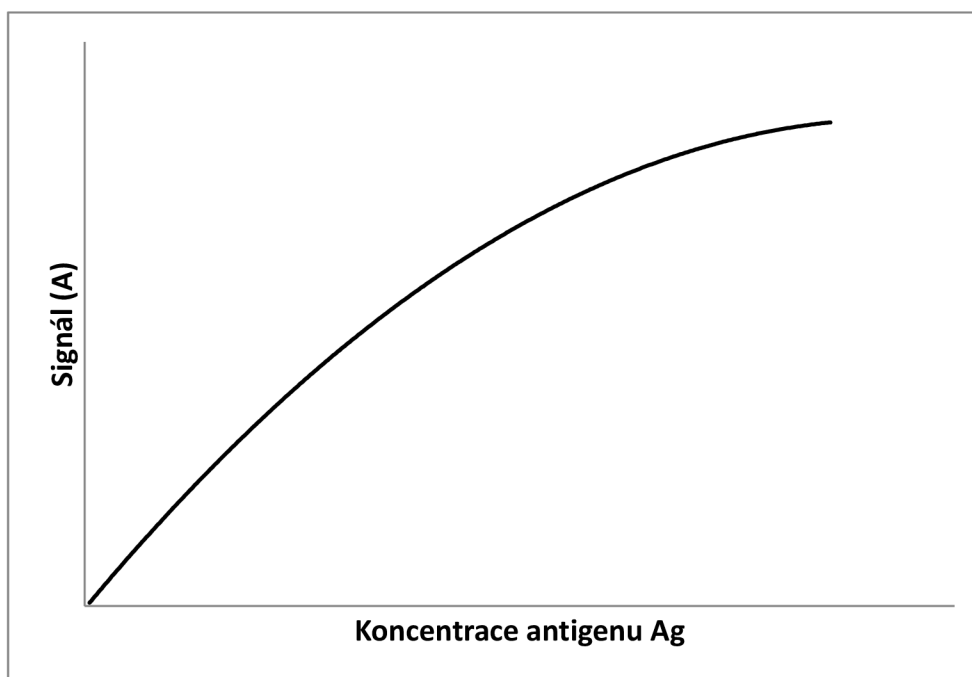
U kompetitivních metod je specifická protilátka (Ab) proti stanovovanému antigenu v reakci v omezeném množství. O vazebná místa této protilátky kompetují (soutěží) značený (Ag^*) a neznačený antigen (Ag). Oba antigeny mají stejnou schopnost vázat se na protilátku. Obě formy antigenů se na protilátku navážou v poměru svých koncentrací. Výsledkem této reakce je vznik neznačeného a značeného komplexu. V reakční směsi zůstane podíl volných antigenů značených i neznačených. Množství vzniklého značeného komplexu je nepřímo úměrné množství přítomného neznačeného antigenu (Ag) což znamená, že čím vyšší je koncentrace neznačeného antigenu, tím nižší bude měřený signál v značeném imunokomplexu (Obr. č. 14). Heterogenní imunoanalýza vyžaduje separaci značeného volného antigenu od jeho značené vázané frakce v imunokomplexu. U homogenní imunoanalýzy není potřeba oddělovat značený volný antigen od vzniklého značeného imunokomplexu, v důsledku vazby na protilátku, kdy navázaný antigen je inaktivní (při vazbě protilátky na enzym konjugátu se aktivní centrum může zablokovat nebo nastává konformační změna enzymové molekuly spojená se ztrátou aktivity). V tomto případě se měří volný značený antigen a měřená veličina je přímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu. Kompetitivní metody se používají zejména pro stanovení malých molekul s jednou antigenní determinantou, jako jsou hormony (thyreotropin, steroidy) a léky [9,11,79].



Obr. č. 14: Graf závislosti měřeného signálu na koncentraci u kompetitivních metod

2.8.2 Nekompetitivní metody

U nekompetitivních metod je specifická protilátka (Ab1) v reakci přítomna v nadbytku ke stanovovanému antigenu (Ag). Reakce se účastní pouze stanovovaný antigen. Dojde k první imunochemické reakci navázáním všech molekul antigenu na protilátku (Ab1), která je v přebytku. V nadbytku je přidána druhá protilátka (Ab2), která je značená indikátorem a je namířena proti jiné antigenní determinantě stanovovaného antigenu (Ag). Vzniká sendvičový komplex složený z protilátky navázané na pevné fázi (Ab1), antigenu (Ag) a protilátky značená indikátorem (Ab2). Pro heterogenní analýzu se po navázání indikační protilátky její zbytek odstraní separací. Obvykle se poté měří množství vzniklého značeného imunokomplexu, které je přímo úměrné množství stanovovaného antigenu (viz Obr. č. 15). U sendvičové metody se používají dvě monoklonální protilátky nebo jedna monoklonální a druhá polyklonální. Nekompetitivní metody jsou vhodné pro analýzu velkých antigenů s několika antigenními determinantami (epitopy) pro protilátku, např. pro hormony (HCG, AFP) nebo bílkoviny (IgE) [9,11].



Obr. č. 15: Graf závislosti měřeného signálu na koncentraci u nekompetitivních metod

2.9 Rozdělení imunoanalytických metod

Imunoanalytické metody lze dělit podle použitého značení (indikátoru). Indikátor je obecně antigen nebo protilátka, která je vhodným způsobem značená, a tak umožňuje sledovat průběh imunoanalytické reakce. Tyto značené látky jsou schopny buď samy produkovat přímo signál, nebo po dané inicializaci jeho produkci vyvolat. Jako první byly používány látky značené radionuklidem ¹²⁵I. V dnešní době jsou místo radionuklidů používány enzymy, luminofory nebo enzymy, které pomáhají vzniku látek způsobující luminiscenci. Tyto odlišné zdroje, které generují signál, využívají různý způsob jeho detekce, který bude probrán v dalších kapitolách [9,11,79].

Tabulka č. 2: Rozdělení imunoanalytických metod pro stanovení nádorových markerů [9]

Luminiscenční imunoanalytické metody	
LIA	Luminiscenční imunoanalýza
ILMA	Imunoluminometrická analýza (nekompetitivní)
CMIA, CLIA	Chemiluminiscenční imunoanalýza na částicích
LOCI	Chemiluminiscenční imunoanalýza (homogenní)
ECLIA	Elektrochemiluminiscenční imunoanalýza
Fluorescenční imunoanalytické metody	
FIA	Fluorescenční imunoanalýza
FPIA	Fluorescenční polarizační imunoanalýza (homogenní)
DELFA (TR-FIA)	Zesílená prodloužená fluorescenční imunoanalýza (heterogenní)
TRACE	Časově rozlišená zesílená fluorescenční imunoanalýza (homogenní)
Enzymově – fotometrické imunoanalytické metody	
EIA	Enzymová imunoanalýza (kompetitivní)
ELISA	Heterogenní enzymová imunoanalýza (nekompetitivní)
MEIA	Enzymová imunoanalýza na mikročásticích (heterogenní)
EMIT, IEMA	Homogenní enzymová imunoanalýza
Radiometrické imunoanalytické metody	
RIA	Radiometrická imunoanalýza (kompetitivní heterogenní)
IRMA	Imunoradiometrická analýza (nekompetitivní heterogenní)
REA	Radioenzymatická analýza
RRA	Radioreceptorová analýza

Tabulka č. 3: *Meze detekce některých imunoanalytických metod [9]*

imunoanalytická metoda	citlivost [g/ml]
EMIT	10^{-6}
FIA, FPIA, EIA	10^{-9}
RIA, REA, IRMA	10^{-12}
LIA, ILMA	10^{-15}

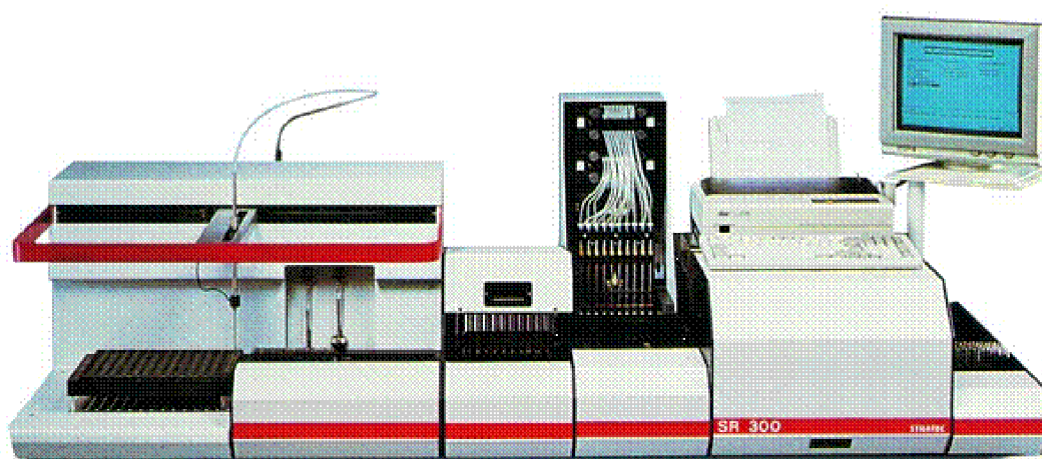
2.9.1 Radioimunoanalytické metody

U těchto metod se používají jako indikátory imunochemické reakce vhodné radionuklidy. Kompetitivní heterogenní metody se označují RIA (radioimunoanalýza) a nekompetitivní heterogenní metody se označují jako IRMA (imunoradiometrická analýza). Pomocí těchto metod je možné stanovit teoreticky všechny tumorové markery, proti kterým lze připravit odpovídající protilátku [9,98].

Metoda RIA byla jedna z prvních imunoanalytických metod, která používala značení imunoreaktantů. Ke značení byl použit původně ^{131}I , ale vzhledem ke krátkému poločasu rozpadu byl nahrazen stálejším radionuklidem ^{125}I . Takto se označovaly bílkoviny nebo thyroïdní hormony. Z dalších radioizotopů byly používány ^{14}C , ^{75}Se , ^{57}Co , ^3H . I přes delší poločas rozpadu řádově 60 dnů u ^{125}I se jedná o látky s krátkou dobou použití. Při detekci se měří radioaktivita detektorem záření podle typu značkovacího radionuklidu. RIA je z definice kompetitivní heterogenní metoda. Principem metody RIA je imunochemická specifická reakce, která je založená na soutěžení antigenu ve vzorku se značeným antigenem (radioizotopem) o vazebná místa specifické protilátky. Množství značeného komplexu je nepřímo úměrné původnímu množství stanovovaného antigenu. Metody RIA v naprosté většině používají imunoreaktanty kotvené na pevnou fázi. Předností RIA je vysoká citlivost a specifita a malá spotřeba protilátky. Postupem času byla RIA nahrazována jinými principy generování a detekce signálů, které nevyužívají radioizotopy a měření radioaktivity. Důvodů k nahrazování radioimunoanalytických metod je několik, z nich nejvýznamnější je snaha vyhnout se radiační zátěži z hlediska ekologie a ohrožení pracovníků laboratoře. Hlavním důvodem používání neizotopových metod je skutečnost, že dosahují lepší citlivosti analýzy, než je měření radioaktivity, a také je snazší jejich automatizace [9,11,15].

Imunoradiometrická analýza IRMA je nekompetitivní heterogenní imunoanalytická metoda. Stanovení tumorových markerů probíhá pomocí dvou protilátek, z nichž jedna je značená radioizotopem. Častým uspořádáním je sendvičová technika. Imunochemická reakce probíhá mezi stanovovaným antigenem a dvěma protilátkami v nadbytku. První protilátka je obvykle ukotvena na pevné fázi a druhá protilátka je označena radioizotopem. Každá z protilátek je namířena proti jiné antigenní determinantě stanovovaného antigenu. Pro vyhodnocení je třeba separovat vázaný komplex od volné značené protilátky v reakci. Množství vzniklého značeného komplexu je přímo úměrné množství stanovovaného antigenu [13,98].

Imunoradiometrickou metodu (IRMA) pro stanovení některých tumorových markerů (např. CA 72-4, CYFRA 21-1, AFP, HCG, CEA, TPS, PSA atd.) v současné době dle SEKK používá asi 10 laboratoří v celé ČR. Toto stanovení je realizováno na analyzátoru STRATEC SR 300 (SL 300) od firmy Stratec. Ve většině stanovení se využívá jednokrokový sendvičový postup. Zkumavka je potažená myší monoklonální protilátkou vůči stanovovanému analytu (TM) a druhá protilátka (polyklonální kozi atd.) vůči dalšímu epitopu je značená ^{125}I . Inkubace trvá 2 hodiny. Aktivita ^{125}I se měří gama detektorem. Na Obr. č. 16 je zobrazen analyzátor Stratec firmy Beckman Coulter (dříve Immunotech) [70].



Obr. č. 16: Analyzátor Stratec firmy Beckman Coulter (dříve Immunotech)

2.9.2 Enzymové imunoanalytické metody

Enzymové imunoanalytické metody (EIA) jsou velkou skupinou technik, které připouští řadu možných variant uspořádání imunoanalýzy použitím enzymu jako indikátoru. V indikační reakci, pomocí níž se prokazuje enzymová aktivita vázaného konjugátu, se přidá chromogenní substrát reagující s enzymově značenou protilátkou nebo antigenem [19,80]. Heterogenní enzymová imunoanalýza (ELISA) je metoda, kde je antigen nebo protilátka adsorbována na povrch pevné fáze (zkumavky, jamky). Uspořádání je možné jak kompetitivní, tak nekompetitivní. Kompetitivní provedení je co nejjednodušší a usnadňuje separaci volné od vázané fáze. Specifická protilátka je kotvená na povrch pevné fáze v titračních jamkách destičky. Poté se přidá stanovovaný antigen (Ag) a enzymem značené známé množství antigenu (Ag*), který je k protilátce v přebytku. Vzorek a značený antigen soutěží o limitovaná vazebná místa protilátky. Po inkubaci se zakotvený imunokomplex promyje, přidá se substrát a po proběhlé enzymové reakci se změří obsah produktu, jehož koncentrace je nepřímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu. Nekompetitivní provedení se nazývá sendvičová technika, protože antigen (Ag) je v imunokomplexu obklopen dvěma protilátkami (Ab1, Ab2) jako v sendviči. Měří se koncentrace značeného imunokomplexu, která je přímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu. Homogenní enzymová imunoanalýza je metoda, která

nepožaduje oddělení vázané a volné značené protilátky nebo antigenu. Vzniklý imunokomplex ztrácí svoji enzymovou aktivitu a měří se aktivita volného značeného antigenu, která je přímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu. Homogenní metody jsou velice jednoduché, ale mají menší citlivost než metody heterogenní [5,9,80].

Metodu ELISA pro stanovení některých tumorových markerů (např. AFP, HCG, CEA, TPS, SCCA) dle SEKK využívá přibližně 20 pracovišť v ČR. Metoda ELISA je prováděna na analyzátořech různých výrobců. Stanovení nádorových markerů pomocí ELISA probíhá na mikrotitrační destičce. V mikrotitračních jamkách je zakotvena protilátka proti stanovovanému analytu. Následuje inkubace vzorku v mikrotitrační jamce. Po inkubaci se přidává protilátka s navázaným biotinem proti dalšímu epitopu analytu. Poté se přidá streptavidin s navázanou peroxidázou. Po inkubaci a promytí se přidá tetramethylbenzidin (chromogen). Probíhající reakce je zastavena stop činidlem. Detekce měření poté probíhá do 15 minut fotometricky při 450 nm. Dnes je upřednostňovaný jednokrokový sendvičový postup, kdy druhá protilátka je již konjugována s peroxidázou a celý postup trvá přibližně 1 hodinu [54].

Enzymy jsou kovalentně vázány (konjugovány) na antigeny (Ag) nebo protilátky (Ab). Konjugované antigeny a popřípadě protilátky si zachovávají své původní imunospécifické vlastnosti. Enzymové značení musí splňovat tyto požadavky:

- katalytická aktivita enzymu musí být snadno měřitelná a ve vhodné kvalitě,
- měřený enzym se nesmí sám vyskytovat ve stanovovaném vzorku,
- u heterogenních metod musí enzym zachovat katalytickou aktivitu po vazbě na antigen nebo protilátku,
- u homogenních metod musí enzym výrazně omezit katalytickou aktivitu po vazbě na antigen nebo protilátku,
- enzym musí být snadno dostupný [80].

Nejčastěji jsou používány enzymy POD (peroxidáza) a ALP (alkalická fosfatáza), méně často se používají GOD (glukozaoxidáza), beta-D-galaktosidáza a malátdehydrogenáza a další. Peroxidáza katalyzuje reakci peroxidu vodíku s vhodným substrátem, který oxiduje na barevné sloučeniny, nebo také může katalyzovat oxidační kopulaci fenolu a jeho derivátů za vzniku chinoniminových barviv. Alkalická fosfatáza štěpí esterovou vazbu kyseliny fosforečné, např. 4-nitrofenylfosfát na žlutý 4-nitrofenol. Jako chromogenní substráty pro fotometrii se používají např.

3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB); 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonát) (ABTS);

o-fenylendiamin; o-dianisidin; o-toluidin. Detekce enzymatických imunoanalýz nejčastěji probíhá fotometricky. Dále se používá luminometrická detekce, která dosahuje lepších mezí detekcí [9,11].

Enzymová imunoanalýza na mikročásticích (MEIA) patří do skupiny heterogenní enzymové imunoanalýzy. Heterogenní fluorescenční enzymovou imunoanalýzu na mikročásticích (MEIA) využívá pro stanovení tumorových markerů kolem 30 laboratoří v ČR. Metoda je prováděna na analyzátořech AxSYM od firmy Abbott. Stanovení je založeno na sendvičovém heterogenním principu. Metoda využívá latexové mikročástice (Abbott) pokryté monoklonální myší protilátkou proti

stanovovanému analytu. U firmy ABBOTT je komplex mikročástice - analyt oddělen z reakční směsi ireverzibilní vazbou na vrstvu skleněných vláken v matrici. Do reakce se přidává druhá myší protilátka proti druhému epitopu antigenu konjugovaná s ALP a vytváří se sendvičový komplex. Fluorescenční substrát je 4-methylumbelliferylfosfát (MUP). ALP katalyzuje jeho hydrolýzu na 4-methylumbelliferon. Vzniklý produkt absorbuje excitační záření ze zdroje, např. ze rtuťové výbojky (350 - 370 nm), a emituje fluorescenční záření vlnové délky 448 nm, které je detekováno fotonásobičem [55,56].



Obr. č. 17: Analyzátor AxSYM od firmy Abbott [73]

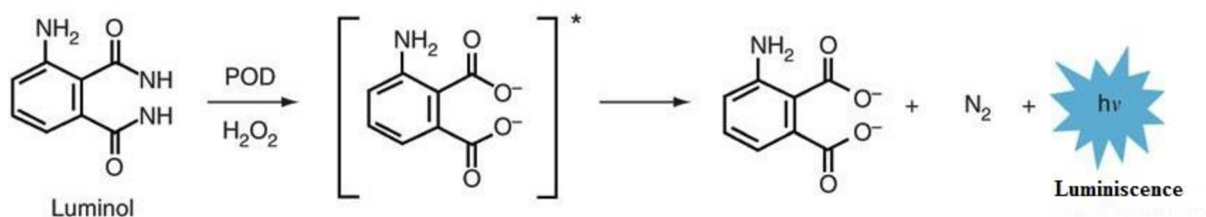
2.9.3 Luminiscenční imunoanalytické metody

Luminiscenční imunoanalytické metody používají jako indikátory imunochemické reakce vhodné luminiskující látky obsahující luminofory. Kompetitivní metody se označují LIA (luminoimunoanalýza) a nekompetitivní se označují jako ILMA (imunoluminometrická analýza). Pomocí těchto metod je možné stanovit teoreticky každý nádorový marker, proti kterému lze připravit odpovídající protilátku. Do těchto metod se také řadí metody označované CLIA, LOCI a ECLIA. Chemiluminiscenční imunoanalýza (CLIA) má mnoho možností uspořádání od různých výrobců.

Luminiscence je děj, který nastává po absorpci záření, absorpci energie z chemické (elektrochemické) reakce nebo absorpci jiného druhu energie molekulou obsahující luminofor za následné emise této energie ve formě fotonů. Při luminiscenci molekuly po absorpci záření excitují do vyššího energetického stavu, což se projeví přechodem valenčních elektronů do vyšších energetických hladin a vibrační excitací vazeb v molekule. Deexcitace probíhá složitějším mechanismem. Struktury v molekulách, které absorbují elektromagnetické záření (energii) za následného vyzáření světla

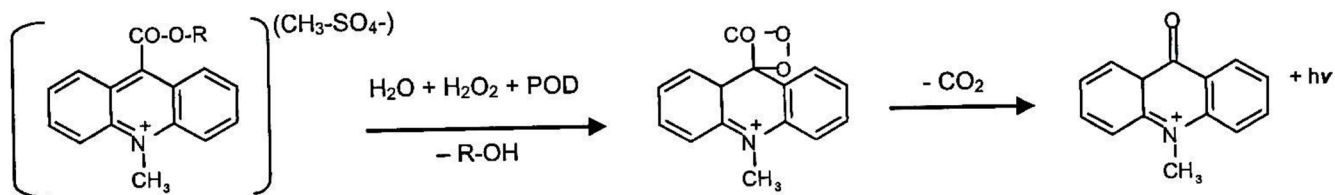
(luminiscence) nazýváme luminofory [17]. Luminiscence je také charakterizována jako přebytek záření nad tepelným vyzařováním tělesa, přičemž toto záření má konečnou dobu trvání. Za luminoimunoanalytické metody (LIA) označujeme ty metody, u kterých je použit jako indikátor imunochemické reakce luminiskující látka obsahující luminofor. Imunoanalytické metody s detekcí luminiscenčního záření lze rozdělit na dvě skupiny. První skupina metod využívá jako indikátor (značky) na antigenu nebo protilátce přímo luminofor. Druhá skupina využívá luminofor jako substrát, který reaguje za katalýzy enzymu (navázaný na antigen nebo protilátku) produkující luminiscenční záření. Luminiscenční záření lze dělit podle zdroje excitace na chemiluminiscenci, fotoluminiscenci (fluorescence, fosforescence), bioluminiscenci, elektroluminiscenci a další [17,98].

Luminofory jsou struktury v molekule, které jsou schopny absorbovat záření v ultrafialové nebo viditelné oblasti spektra. Tyto vlastnosti mají zejména organické látky aromatického charakteru. Vlastnosti látek jsou spojeny s elektronovými přechody, které mohou v molekule probíhat. Aromatické látky obsahují π -elektrony. Aromatické sloučeniny s přechody π - π^* mají obecně vysoké kvantové výtěžky luminiscence, a proto se používají v analytické praxi. Mezi nejznámější a nejpoužívanější luminogen patří luminol (3-aminofthalhydrazid). Luminol se využívá pro stanovení peroxidu vodíku za katalýzy peroxidázy (POD), viz Obr. č. 18, nebo iontů kovů (Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} atd). Peroxidáza a jiné katalyzátory zrychlují oxidaci luminolu peroxidem vodíku. Intenzita luminiscenčního záření, které má maximum při 425 nm (modré světlo), je poté úměrná stanovené koncentraci peroxidu vodíku [35]. Luminol není příliš vhodný pro značení v imunoanalýze, proto se v praxi více používají deriváty luminolu, např. N-alkylderiváty isoluminolu, jako 4-(3-amino-2-hydroxypropylamino)ftalalhydrazid nebo 4-amino-ftalhydrazid, z důvodů jejich lepšího kvantového výtěžku [9].



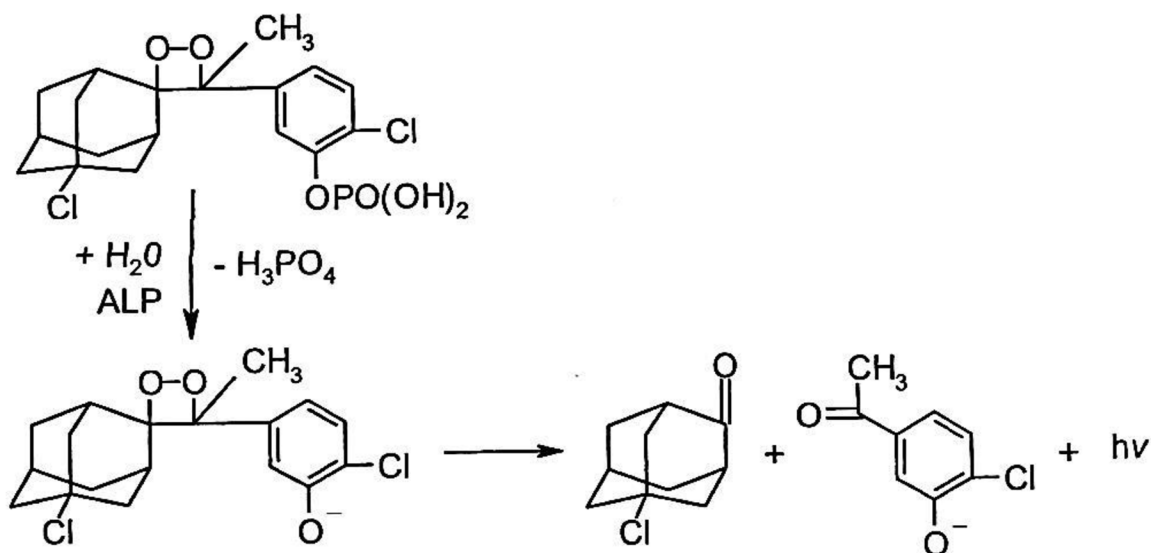
Obr. č. 18: *Reakce luminolu s peroxidem vodíku za katalýzy POD [33]*

Další významnou skupinou luminogenů jsou akridinové estery. Používají se často jako značky, které se hydrolyzují a katalyticky oxidují na nestálý meziprodukt. Stabilizace molekuly probíhá za vyzáření světla a produkce oxidu uhličitého. Tato skupina luminogenů má vysoké kvantové výtěžky a poměrně nízký šum, proto se jedná o velice citlivou detekci používanou v imunoanalýze. Ve spojení s jednoduchým navázáním na proteiny se používají ke stanovení např. tumorových markerů nebo thyreotropinu (TSH) atd. [9]. Tyto estery se také mohou použít pro stanovení peroxidu vodíku dle reakce, která je uvedena na Obr. č. 19.



Obr. č. 19: *Reakce akridinových esterů s peroxidem vodíku*

Dioxethany jsou hojně využívanou skupinou luminiskujících látek, které obsahují strukturu 1,2-dioxethanu. Dioxethany jsou využívány jako substráty pro různé enzymy, například pro alkalickou fosfatázu (ALP), β -D-galaktosidázu nebo glukozaoxidázu (GOD). Pro chemiluminiscenci s ALP jsou využívány luminiscenční substráty na bázi fosfátového esteru adamantyl dioxethanu a jeho deriváty. Enzym ALP nejdříve katalyzuje rozštěpení fosfátového esteru (defosforylace substrátu) za následného vzniku nestabilního meziproductu dioxethanu v excitovaném stavu, který deexcituje vyzářením světla (luminiscence) o vlnové délce 466 nm. Intenzita záření je tedy úměrná poločas rozpadu dioxethanového derivátu a aktivitě daného enzymu, což se dá využít k jeho stanovení [9,79]. Reakce je zobrazena na Obr. č. 20



Obr. č. 20: *Reakce esteru adamantyl dioxethanu s ALP*

Chemiluminiscence (CLIA)

U chemiluminiscence je zdrojem excitační energie chemická reakce. Luminiscence zde vzniká nepřímou přeměnou chemické energie přes excitovaný stav molekuly na světelnou. Energie uvolněná z chemické reakce nejdříve převádí molekuly do excitovaného stavu. Druhým krokem přechází excitované molekuly do základního stavu za vyzáření fotonu, jehož vlnová délka je úměrná rozdílu energií excitovaného a základního stavu molekuly. Podobně jako u fotoluminiscence excitovaná molekula neztrácí svoji energii pouze vyzářením fotonu, ale také nežádivými procesy, jako je kolizní deaktivace, vnitřní konverze, mezisystémové přechody nebo může docházet k dalším chemickým reakcím. Tyto nežádoucí děje chemiluminiscenci zeslabují. Při těchto reakcích nevzniká téměř žádné

teplo, proto se světlu vznikajícímu při chemických reakcích říká studené světlo. Při chemiluminiscenci se struktura molekuly obsahující luminofor změní na rozdíl od fotoluminiscence. Chemické reakce při chemiluminiscenci jsou hlavně redoxního charakteru [9,11].

Chemiluminiscenční imunoanalýza je využívána dle SEKK pro stanovení nádorových markerů přibližně na 450 klinických pracovištích v ČR. Metoda CLIA je vyvinuta několika firmami s různou technikou stanovení. Chemiluminiscenční imunoanalýzu na paramagnetických mikročasticích (CMIA) používá ke stanovení tumorových markerů analyzátor Architect i2000SR (i1000 SR) od firmy Abbott. Chemiluminiscenční imunoanalýzu na paramagnetických částicích (CLIA) používají pro stanovení tumorových markerů analyzátory Advia Centaur od firmy Siemens a UniCel® DxI 600 (DxI 800) a Access 2 od firmy Beckman Coulter. Stanovení tumorových markerů pomocí CLIA může probíhat také na analyzátoru Immulite 2000 XPi od firmy Siemens, kde se používá jako pevná fáze polystyrenová kulička. Analyzátory Vitros 5600 (4600) od firmy Johnson & Johnson využívají jako pevnou fázi jamku mikrodestičky. Princip stanovení se u vyjmenovaných analyzátorů liší technikou provedení analýzy.



Obr. č. 21: Analyzátor Advia Centaur od firmy Siemens [58]



Obr. č. 22: Analyzátor Architect i2000SR od firmy Abbott [74]

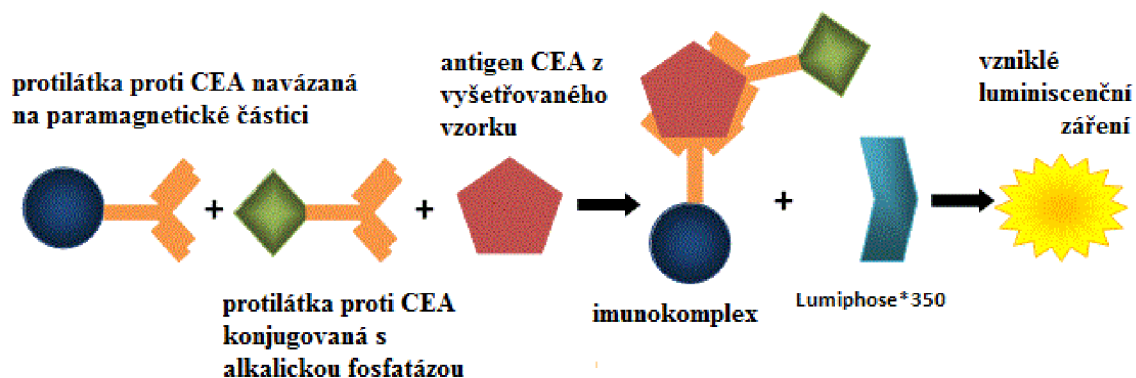


Obr. č. 23: Analyzátor UniCel[®] DxI 800 od firmy Beckman Coulter [28]

U skupiny analyzátorů Architect i1000SR/i2000SR od firmy Abbott jsou paramagnetické mikročástice pokryty krystaly oxidů železa, které vykazují magnetické vlastnosti. Na svém povrchu mají tyto mikročástice také navázány monoklonální (myší) protilátky, proti stanovovaným analytům. Imunochemická reakce naváže analyty na mikročástice. Během následného promývání se působením magnetu mikročástice zachytí na stěně reakční cely. Po odstranění nezreagovaných součástí se specificky naváže druhá polyklonální nebo monoklonální (myší, králičí) protilátka s chemiluminiscenční značkou a vznikne imunokomplex. Jako chemiluminiscenční značení se používá

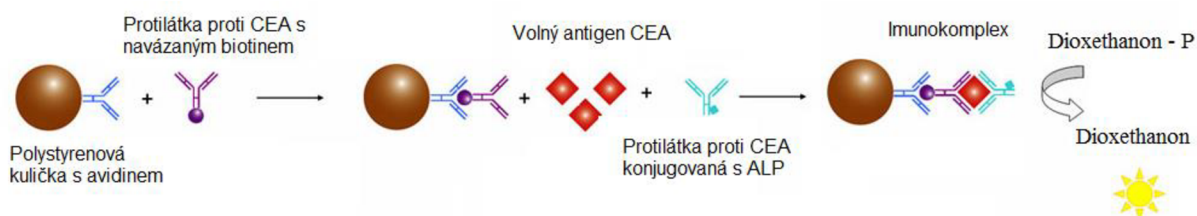
ester akridinu. K takto vytvořeným imunokomplexům se přidává peroxid vodíku, který zabraňuje předčasné emisi záření a odštěpuje akridinové barvivo z konjugátu v imunokomplexu. Chemiluminiscenční reakce se spouští přidáním hydroxidu sodného. Akridin se poté oxiduje pomocí peroxidu vodíku a hydroxidu sodného. Tento proces vede ke vzniku chemiluminiscenční reakce za uvolnění energie ve formě emise světla [61].

Analyzátor Advia Centaur CP/XP od firmy Siemens používá rozdílnou iniciační směs chemiluminiscenční reakce a to kyselinu dusičnou s hydroxidem sodným. Postup stanovení je totožný s analyzátory Architect [62]. Analyzátor Access od firmy Beckman používá první protilátku konjugovanou s ALP a druhá protilátka je navázaná na paramagnetické částice. Jako chemiluminiscenční substrát je používán Lumi-Phos* 530, což je Lumigen PPD (4-methoxy-4-(3-fosfaterphenyl)-spiro[1,2-dioxetane-3,2] adamantan. Stanovení nádorového markeru CEA od firmy Beckman Coulter založené na nekompetitivní heterogenní imunoanalýze je uvedeno na Obr. č. 24 [63].



Obr. č. 24: Princip stanovení CEA pomocí paramagnetických částic od firmy Beckman Coulter [63]

Lumigen PPD používá také analyzátor Immulite 2000 XPi od firmy Siemens. Stanovení nádorového markeru CEA založené na nekompetitivní heterogenní imunoanalýze (sendvičový princip) na Obr. č. 25 od firmy Siemens [64].

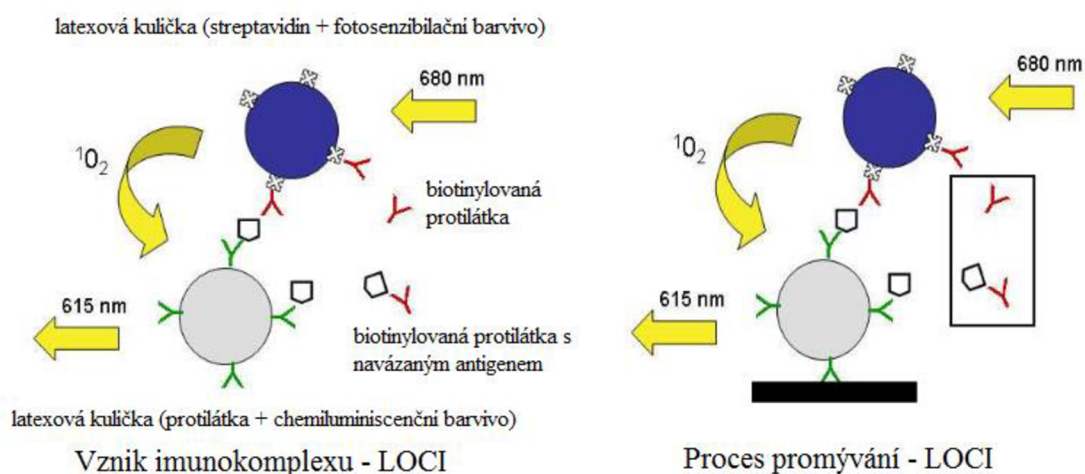


Obr. č. 25: Princip stanovení CEA pomocí CLIA na analyzátoru Immulite od firmy Siemens [65]

Analyzátory Vitros od společnosti Johnson&Johnson používají jako první protilátku s navázaným biotinem monoklonální protilátku vůči stanovovanému analytu. Druhá monoklonální myši protilátka je značená křenovou peroxidázou. Vzniklý imunokomplex se naváže na jamky potažené

streptavidinem svou biotinovou kotvou. Po inkubaci (30 min, 37 °C) se promytím odstraní volný materiál a přidá se luminogen (derivát luminolu + sůl peroxykyseliny), jehož oxidaci katalyzuje POD za vzniku světla. Činidlo pro přenos elektronů (substituovaný acetanilid) zvyšuje hladinu uvolněného světla a prodlužuje jeho emisi [66].

Poslední zmíněnou CLIA metodou pro stanovení tumorových markerů je nová technologie LOCI pracující na analyzátoch Dimension Vista a EXL od společnosti Siemens. LOCI je první homogenní chemiluminiscenční analýza, která je založená na přenosu kyslíku. Stanovení nádorových markerů probíhá většinou v sendvičovém uspořádání. Metoda pracuje s dvěma latexovými kuličkami. První latexová kulička (chemibeads) je potažena monoklonální specifickou protilátkou proti stanovovanému antigenu a obsahuje olefinové (chemiluminiscenční) barvivo. Druhá latexová kulička (sensibeads) je pokrytá streptavidinem a obsahuje fotosenzibilizační barvivo, které generuje singletový kyslík. Do reakce dále vstupuje biotinylovaná protilátka specifická proti stanovovanému antigenu. Vzorek (analyt) se inkubuje s biotinylovanou protilátkou a latexovou kuličkou chemibeads. Dojde k vytvoření sendvičového komplexu, které se skládá z monoklonální protilátky (latexová kulička), analytu a biotinylované protilátky. Následně je přidána latexová kulička sensibeads se streptavidinem a naváže se na biotin a dojde k vytvoření párových imunokomplexů s první a druhou latexovou kuličkou. Při ozáření těchto komplexů světlem ($\lambda = 680 \text{ nm}$) je z fotosenzibilizačního barviva na sensibead uvolněn singletový kyslík, který poté reaguje s chemiluminiscenčním barvivem obsaženým na chemibead za vzniku chemiluminiscenční reakce. Luminiscence je poté měřena při $\lambda = 612 \text{ nm}$ a je přímo úměrná koncentraci nádorového markeru ve vzorku. Pro přiblížení je princip metody uveden na Obr. č. 26 [67].

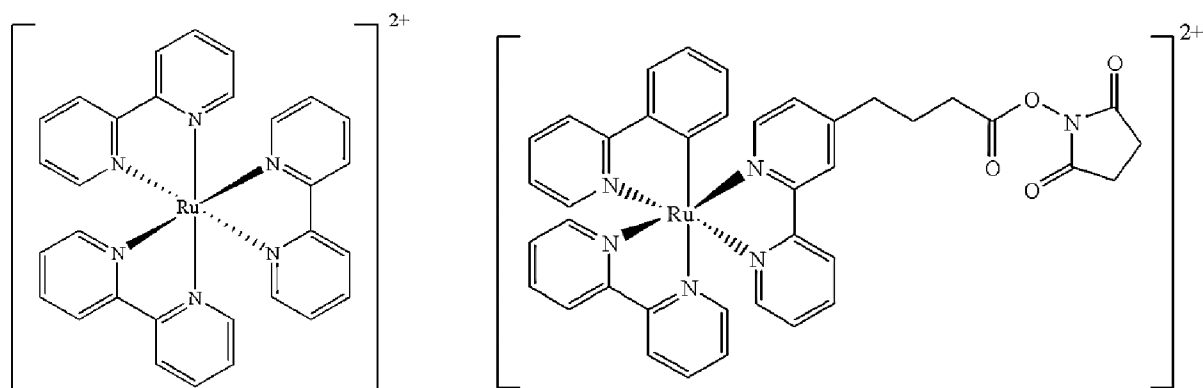


Obr. č. 26: Princip metody LOCI [67]



Obr. č. 27: Analyzátor Dimension Vista 1500 firmy Siemens [27]

Elektrochemiluminiscence (ECLIA) je modifikace chemiluminiscence, kdy luminiscenční záření je generováno chemickými reakcemi, které jsou iniciovány elektrochemicky [13]. Jako elektrochemiluminofory se používají zejména komplexy (cheláty) ruthenia (Ru), popřípadě rhodia (Rh) nebo osmia (Os). Oxidace elektrochemiluminoforu je prováděna elektrochemicky na povrchu anody ze zlata (Au) nebo platiny (Pt). V současnosti nejvýznamnějším komplexem je tris(2,2-bipyridyl)ruthenium $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, který má vysoké kvantové výtěžky a lze ho lehce navázat na celou řadu bílkovin, nukleových kyselin, protilátek a antigenů. Má také velmi dobrou rozpustnost a stálost ve vodě i v jiných roztocích. Dále se používají různé deriváty komplexů ruthenia a jiných kovů [36]. Na Obr. č. 28 je vyobrazena struktura tris(2,2-bipyridyl)ruthenia a struktura používaného derivátu esteru N-hydroxysukcinimidu $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ [32,79].

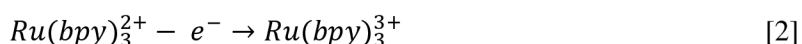


Obr. č. 28: Struktura tris(2,2-bipyridyl)ruthenia a esteru N-hydroxysukcinimidu $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ [32]

Imunoanalytická reakce probíhá na pevné fázi, která se skládá z magnetických částic s navázaným streptavidinem. Streptavidin (avidin) je látka bakteriálního původu, která se silně a specificky váže na biotin, což se využívá v laboratorní medicíně. Na streptavidin je vázán biotinylovaný antigen nebo protilátka, kterou chceme stanovit [11,90].

Jako luminiscenční značka je používán již zmíněný rutheniový komplex. Po proběhnutí imunochemické reakce jsou magnetické částice přichyceny na permanentní magnet. Na elektrody je přiveden elektro impulz a poté je odstartována elektrochemická reakce.

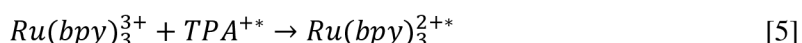
Během této reakce je oxidován komplex ruthenia Ru^{2+} na Ru^{3+} . Současně je také oxidován a následně redukován přítomný tripropylamin (TPA), který udržuje cykličnost reakce [90].



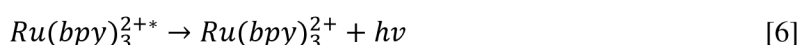
TPA má tu vlastnost, že při své oxidaci na anodě na kationtový radikál (TPA^{+*}) se chová jako redukční činidlo, který po uvolnění protonu přechází na nestabilní radikál TPA^* .



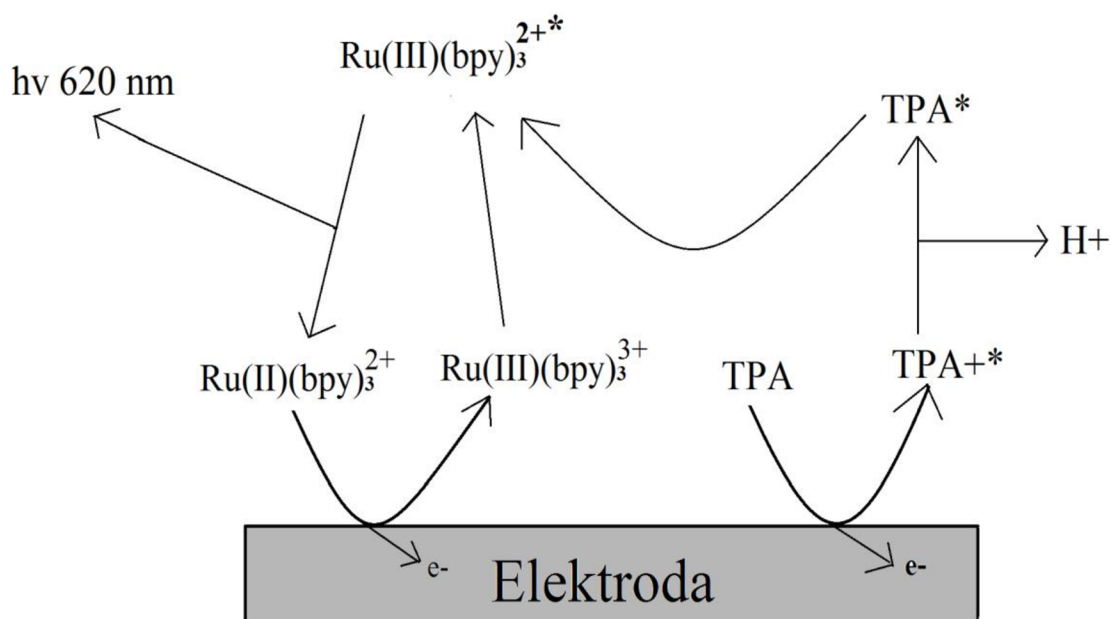
TPA^* jako redukční činidlo snadno redukuje komplex Ru^{3+} a z důvodů velkého rozdílu potenciálů přejde z TPA^* elektron do excitovaného stavu rutheniového kationtu, na Ru^{2+*} .



Přechodem z excitovaného stavu Ru^{2+*} na stav základní Ru^{2+} dojde ke stabilizaci komplexu a zároveň emisi luminiscenčního záření o vlnové délce 620 nm.



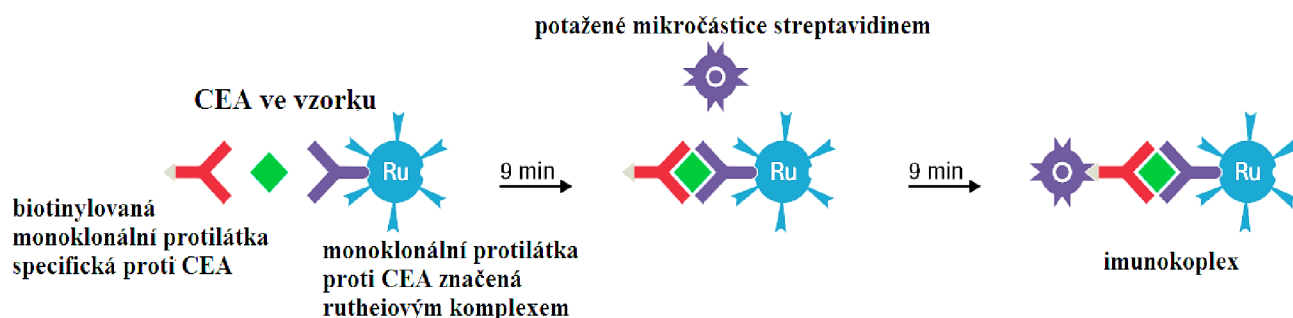
Rutheniový komplex je poté opět schopen další oxidace. TPA slouží tedy jako substrát a Ru komplex jako enzym [9,11,90]. Následující Obr. č. 29 popisuje již zmíněnou reakci.



Obr. č. 29: Schéma reakcí ECLIA

ECLIA metody se v praxi liší v použití různých elektrochemiluminoforů a dále také v použití rozdílných redukovadel. Výhodou elektrochemiluminiscenčních metod ve srovnání s přímou fluorescenční analýzou je vyšší citlivost a zejména lepší specifita [9,90].

Elektrochemiluminiscenční imunoanalýza (ECLIA) využívá pro stanovení nádorových markerů bezmála 400 klinických laboratoří a pracovišť. ECLIA je tedy jednou z nejrozšířenějších metod pro stanovení tumorových markerů v ČR. Metodu ECLIA vyvinula mezinárodní společnost Roche, která se věnuje in vitro diagnostice. ECLIA se provádí na systémech cobas E, elecsys 2010 a modular E170 firmy Roche. Princip stanovení je u všech zmíněných analyzátorů stejný. ECLIA využívá pro značení chelát ruthenia, který odpovídá za světelnou emisi. Iniciátorem celé ECLIA reakce je tripropylamin (TPA), který slouží jako přenašeč elektronu na chelát ruthenia. Přenosem elektronu na rutheniový chelát dojde k jeho redukci na nestabilní excitovanou formu a při návratu do základního stavu dojde k vyzaření fotonu, který se detekuje fotonásobičem. Pomocí analog digitálního konvertoru dostaneme tzv. „counts“, které jsou kvantifikací vyzařených fotonů. Počet „counts“ je pak úměrný koncentraci analytu ve vzorku. Hlavní výhodou celé technologie je neustálé opakování oxidoredukčních dějů na pracovní elektrodě až do spotřebování TPA, což snižuje mez detekce a zvětšuje měřicí rozsah. K dalším výhodám ECLIA patří velmi nízký objem vzorku potřebného pro analýzu (10 - 50 μ l) a také krátké časy stanovení. Vlastní stanovení tumorového markeru probíhá dle následujících kroků: Vzorek se inkubuje s monoklonální protilátkou proti stanovovanému antigenu s navázaným biotinem a monoklonální protilátkou specifickou proti dalšímu epitopu značenou ruthenioým komplexem. Z imunoreakce vznikne sendvičový komplex. Následuje promytí. Do reakce se poté přidají mikročástice, potažené streptavidinem. Probíhá druhá inkubace, kdy komplex se váže na pevnou fázi prostřednictvím interakce mezi biotinem a streptavidinem. Reakční směs je nasáta do měřicí komůrky, kde jsou mikročástice zachyceny magnetickým polem na povrchu elektrody. Nenavázané složky jsou odstraněny roztokem. Přivedené napětí na elektrodě vyvolá chemiluminiscenční emisi fotonů, která je změřena fotonásobičem. Stanovení nádorového markeru CEA založené na nekompetitivní heterogenní imunoanalýze (sendvičový princip) od firmy Roche na Obr. č. 30 [59].



Obr. č. 30: Princip stanovení CEA pomocí ECLIA [60]



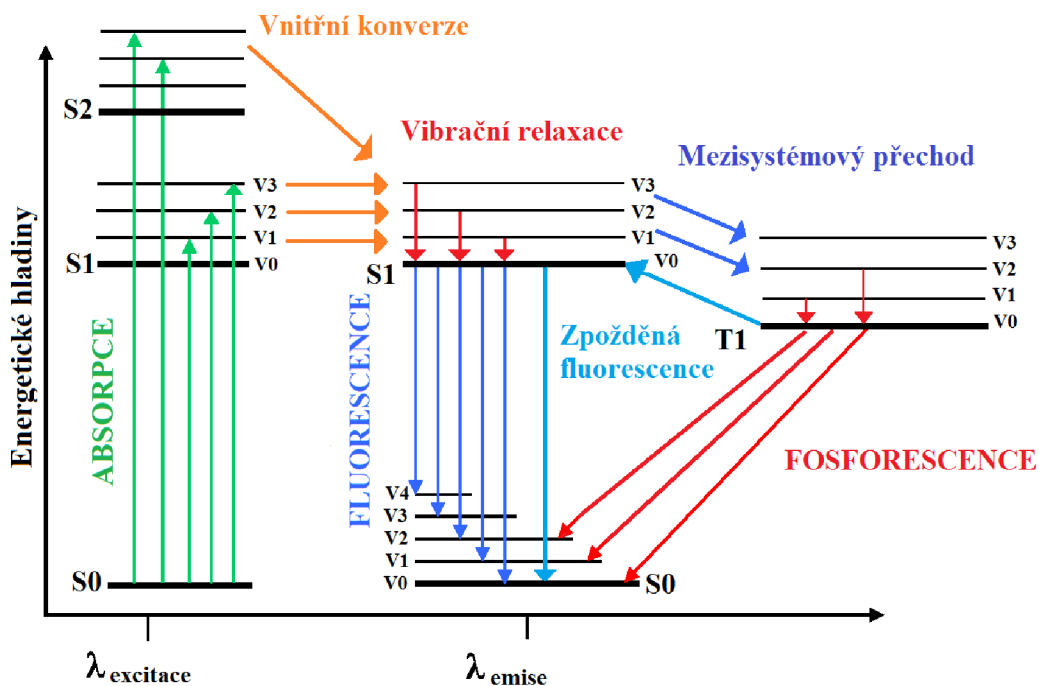
Obr. č. 31: Systém cobas 6000 s modulem pro imunoanalýzu e 601 firmy Roche [71]

2.9.4 Fluorescenční imunoanalytické metody

Fluorescenční imunoanalytické metody používají jako indikátory imunochemické reakce fluoreskující látky obsahující fluorofory. Fluorescenční imunoanalýzu (FIA) lze opět rozdělit na kompetitivní a nekompetitivní uspořádání. Fluorescenční polarizační imunoanalýza (FPIA) je kompetitivní homogenní metoda, která využívá imunochemickou reakci a měření vertikálně polarizovaného fluorescenčního záření. Dalšími modifikacemi FIA jsou časově rozlišená zesílená homogenní fluorescenční imunoanalýza (TRACE) nebo zesílená prodloužená fluorescenční heterogenní imunoanalýza (DELFI) [9,11,91].

Fotoluminiscence vzniká po absorpci energie ve formě světelného záření (excitační záření) molekulou obsahující fluorofor a následném vyzáření fotonu o jiné (delší) vlnové délce [17].

Fotoluminiscence se dělí na fluorescenci, fosforescenci a zpožděnou fluorescenci. Fotoluminiscence molekuly je charakterizována emisním (fluorescenčním, fosforescenčním) a excitačním (absorpčním) spektrem. K deexcitaci molekuly může docházet buď zářivými přechody (fotoluminiscence) nebo nezářivými přechody (vnitřní konverze, mezisystémové přechody, vibrační relaxace) [17,91]. Zjednodušené schéma zářivých a nezářivých přechodů mezi elektronovými a vibračními stavy je (Jablonského diagram) uvedeno na Obr. č. 32.



Obr. č. 32: Jablonského diagram

Vznik fotoluminiscence látky předurčuje její struktura, která musí absorbovat UV nebo VIS záření. Čím více je látka schopná absorbovat záření, tím bude větší intenzita fotoluminiscence. Luminiscence je pozorována u látek s konjugovanými násobnými vazbami hlavně u aromatických látek s π -elektrony. Tyto látky, které absorbují elektromagnetické záření v UV-VIS oblasti se nazývají fluorofory (fosforofory). Pozornost bude zaměřena zejména na fluorofory, které se používají v klinické praxi a ke sledovaným molekulám se vážou kovalentní vazbou [9,17].

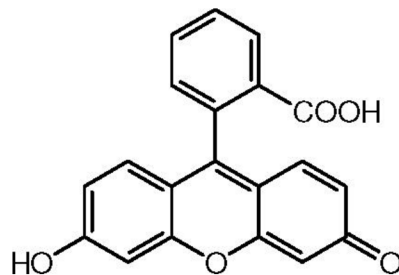
Do skupiny přirozených fluoroforů patří také velká skupina biomolekul, např.

- aminokyselina tyrosin (absorpční max. 274 nm a emisní max. 303 nm),
- aminokyselina tryptofan (absorpční max. 280 nm a emisní max. 348 nm),
- aminokyselina fenylalanin (absorpční max. 257 nm a emisní max. 282 nm),
- nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) (absorpční max. 340 nm a emisní max. 450 nm),
- flavinadenindinukleotid (FAD) (absorpční max. 450 nm a emisní max. 515 nm),
- hemoglobin a další.

Hlavními požadavky na fluorescenční indikátor vhodný pro použití v imunoanalýze jsou:

- vysoký kvantový výtěžek,
- velký Stokesův posun,
- vysoký molární absorpční koeficient [79,91].

Nejpoužívanější fluoreskující sloučeninou je fluorescein a jeho deriváty, např. FITC (fluorescein-5-isothiokyanát) a TRITC (tetramethylrhodamin-5-isothiokyanát, tetramethylrhodamin-5-isothiokyanát). Jeho struktura je zobrazena na Obr. č. 33. Dalším často používaným fluoroforem je 4-methylumbelliferon, který vznikne při katalýze ALP s 4-methylumbelliferylfosfátu [9].



Obr. č. 33: *Struktura fluoresceinu*[31]

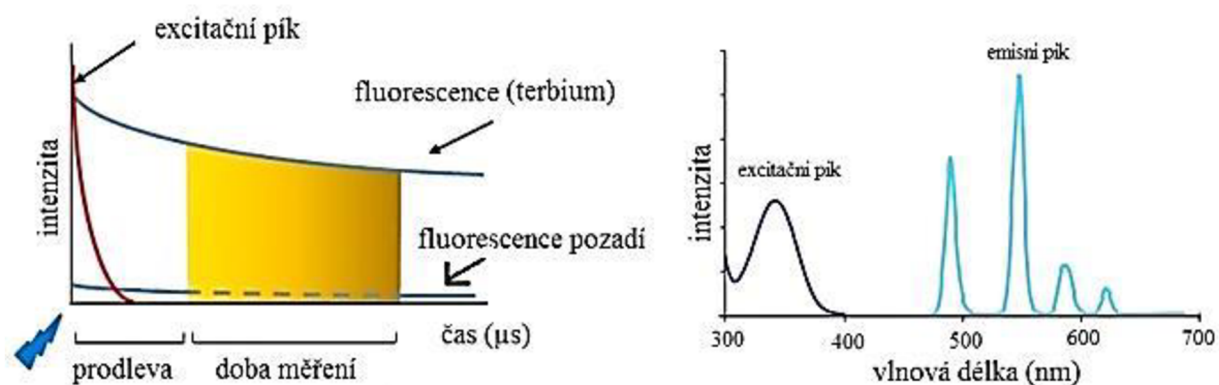
Vlnová délka FITC excitačního záření je 492 nm a emisní maximum má při 520 nm. Při analýze krevního séra však při těchto vlnových délkách interferují fluorescenci některé analyty, což se projevuje zhasením. Fluorescence je zde silně ovlivňována prostředím. Hlavním problémem v bioanalýze krevního séra je fluorescence z různých přirozených zdrojů v séru, které se vzhledem k podobné vlnové délce absorpčních i emisních maxim a také časovému průběhu nedají od značených fluoroforů rozeznat. Proto se pro měření fluorescence používá technika zvaná TR fluorescence - časově rozlišená detekce fluorescence [9,98].

Heterogenní FIA

Velkou výhodou použití heterogenní fluoroimunoanalýzy je oddělení ostatních sérových analytů z reakce před měřením intenzity fluorescence. Šum pozadí a citlivost metody tedy budou lepší než u homogenní FIA. Tato metoda existuje jak v podobě kompetitivní, tak i v nekompetitivním uspořádání. Jako pevná fáze se používají polyakrylamidové kuličky s kovalentně vázanou protilátkou nebo antigenem. Analýza se provádí nejdříve smícháním stanovovaného séra s označeným antigenem např. fluoresceinem. Směs obou antigenů se přidá ke kuličce s navázanou protilátkou. Po reakci se oddělí volná frakce a měří se fluorescence [9,11].

TR fluorescence – časově rozlišená detekce fluorescence

V této technice se používají jako fluorescenční indikátory cheláty lanthanoidů (europium (Eu), terbium (Te), thulium (Tm), samarium (Sm)). Pomocí těchto fluoroforů se snížilo fluorescenční pozadí sérových interferentů. Tyto indikátory mají velmi dlouhou dobu dosvitu fluorescence a jejich detekce je časově rozlišená. Po excitaci z excitačního zdroje krátkým pulzem xenonové výbojky nebo laseru (pulzní excitace) je fluorescence měřena s časovým odstupem, čímž se vyhneme překrytí piků. Čas excitačního pulzu (šířka piků) by měl být co nejkratší a naopak doba života (doba dohasínání) fluorescence by měla být co nejdélejší. Na Obr. č. 34 je zobrazena TR – fluorescence kryptátu terbia. Terbium má 4 emisní píky při vlnových délkách 490 nm, 548 nm, 587 nm, 621 nm [11,40].



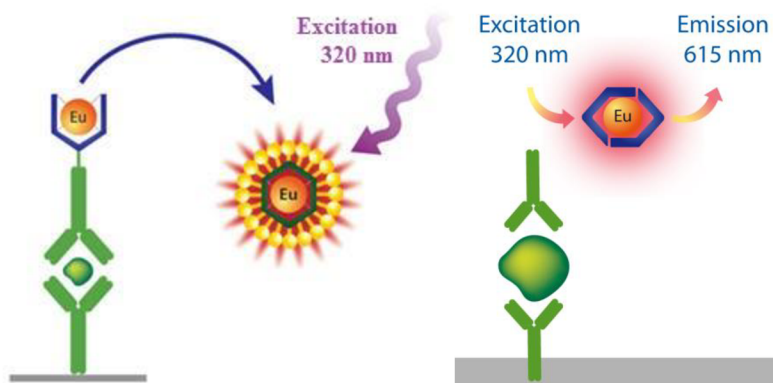
Obr. č. 34: TR – fluorescence kryptátu terbia [30]

Fluorofory na bázi chelátů lanthanoidů mají dosvit mezi 10 – 1000 μs . Jak vidíme na Obr. č. 34, Stokesův posun je také daleko větší než u běžných fluoroforů. Intenzita fluorescence se měří s časovým odstupem v intervalu 400 až 800 μs , kdy se oddělí píky matricových analytů, které mají významně kratší dobu dosvitu fluorescence [40,91].

Mezi další fluorofory patří:

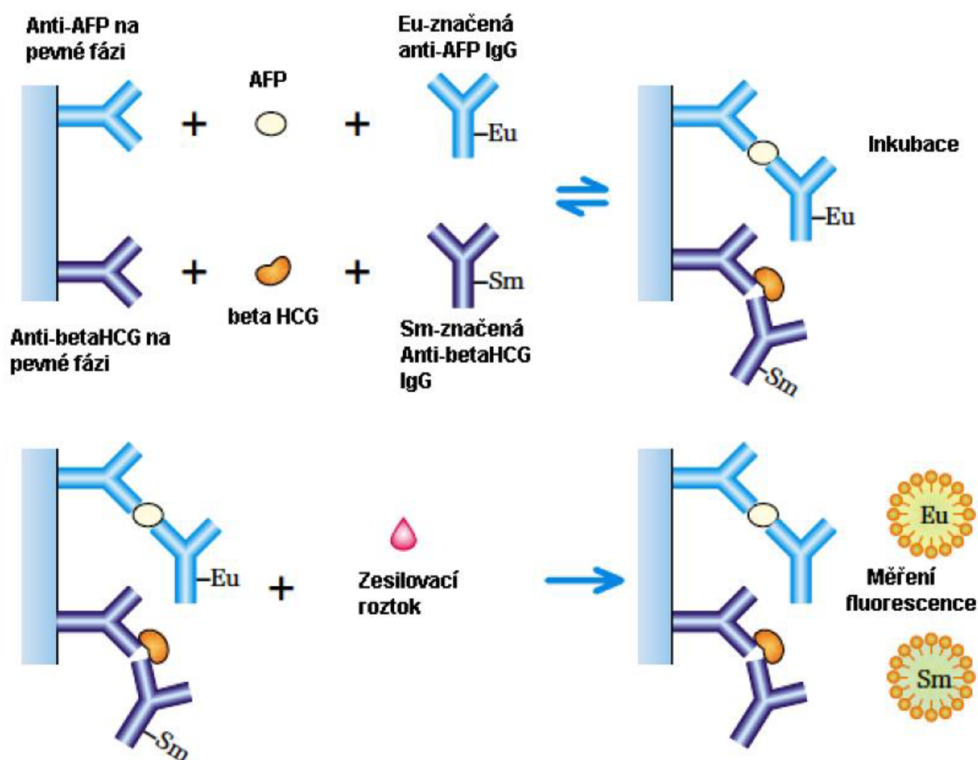
- polycyklické aromatické uhlovodíky (anthracen),
- rhodamin B a jeho deriváty (absorpční max. 550 nm a emisní max. 585 nm),
- chinin (absorpční max. 349 nm a emisní max. při 464 nm),
- akridinová oranž (DNA) a další.

DELFA je firemní označení heterogenní fluorescenční imunoanalýzy od firmy Perkin Elmer, která může být v kompetitivním i nekompetitivním uspořádání. Prodloužená fluorescence Eu^{3+} je zesílena speciálním roztokem, který uvolňuje Eu^{3+} do roztoku a současně tvoří jeho ochranný chelát. Na mikrotitračních destičkách je zakotvena protilátka vůči stanovovanému TM. V sekvenčním uspořádání se pipetuje vzorek a po inkubaci a promytí se přidá specifická protilátka značená Eu^{3+} . Poté se ke vzniklému komplexu přidává zesilovací roztok, který odtrhne Eu^{3+} z komplexu a přemění jej na nový intenzivně fluoreskující chelát. Poté je Eu^{3+} excitován zářením o vlnové délce 340 nm. Vzniklá fluorescence se měří při 620 nm do 1 hodiny a její intenzita je přímo úměrná koncentraci TM ve vzorku. Touto metodou lze detekovat koncentrace 10^{-17} mol/l Eu^{3+} , což vysoce převyšuje detekční limit fluorescenční imunoanalýzy bez časově rozlišené fluorescence [25,98].

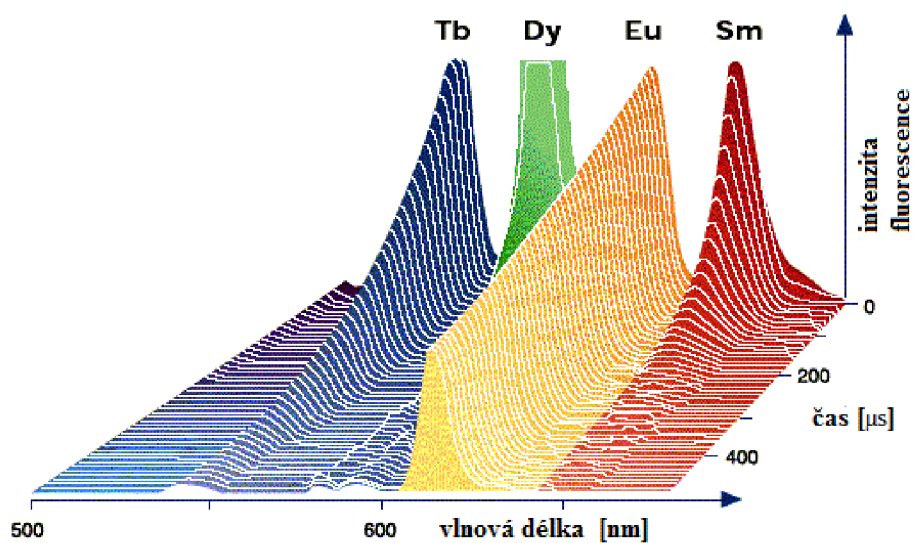


Obr. č. 35: Schéma stanovení DELFIA [25]

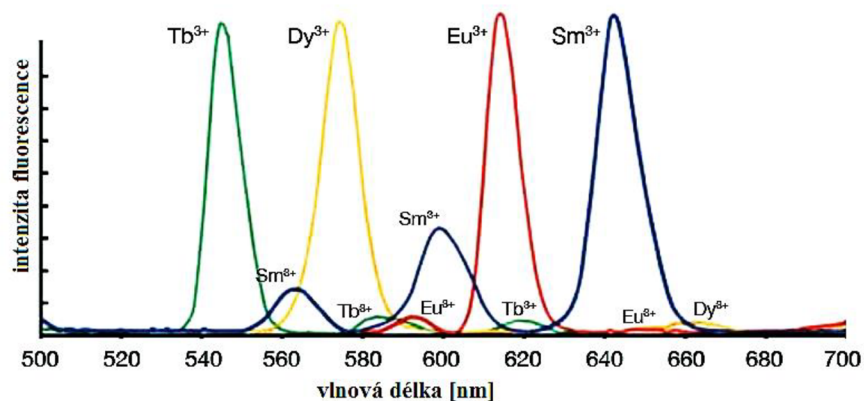
Metoda DELFIA může nabídnout stanovení více analytů současně. Využívá se odlišných chelátů lanthanoidů, např. Eu a Sm, které mají různou dobu trvání fluorescence a odlišné emisní maximum. Při měření se tedy nepřekrývají vlnové délky fluorescence Eu a Sm. Stanovení tumorového markeru AFP současně s volnou podjednotkou HCG je znázorněno na Obr. č. 36. Emisní spektrum až pro čtyři různé cheláty lanthanoidů (Tb, Dy, Eu, Sm) použité pro simultánní stanovení je na Obr. č. 37 a č. 38.



Obr. č. 36: Stanovení AFP a volné β podjednotky HCG metodou DELFIA [23]



Obr. č. 37: Emisní spektrum chelátů lanthanoidů (Tb, Dy, Eu, Sm) [23]

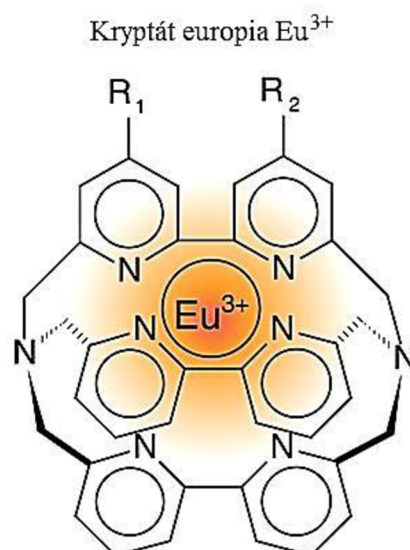


Obr. č. 38: Emisní spektrum chelátů lanthanoidů (*Tb, Dy, Eu, Sm*) [23]

Homogenní FIA se používá pro stanovení malých molekul. Zde se využívá různé polarizace (rychlosti rotace molekul). Fluorescenční polarizace kombinuje fluorimetrii s polarimetrií, neboť využívá polarizované světlo [9,11].

Fluorescenční polarizační imunoanalýza (FPIA) je metoda využívající princip měření vertikálně polarizovaného fluorescenčního záření, které je emitováno po excitaci polarizovaným světlem. Malé molekuly se v roztoku otáčejí vysokou rychlostí. Tyto molekuly jsou označeny fluorescenčním indikátorem, který absorbuje polarizované světlo. Emise záření při fluorescenci probíhá do všech směrů. Pokud je tato emise měřena v polarizované vertikální rovině, je detekována pouze její malá část. Malá molekula se však naváže na specifickou protilátku a dochází ke vzniku komplexu s nižší rychlostí rotace, což zvýší množství detekovatelné polarizované emise fluorescenčního záření (emitované světlo kmitá ve stejné rovině jako excitační). Pokud při kompetitivní reakci stanovovaný vzorek obsahuje velkou koncentraci analytu, bude naměřena malá polarizovaná fluorescence a naopak. Naměřená intenzita fluorescence je tedy nepřímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu (protilátky) ve vzorku. V kompetitivním uspořádání není nutné separovat volné a vázané frakce fluoroforu [11,13]. Jako excitační zdroj se používá wolframová (halogenová) žárovka, která přes filtr propouští pouze modré světlo o vlnové délce 485 nm. Toto světlo je následně polarizováno přes polarizátor do jedné roviny. Toto polarizované excitované záření dopadá na fluorofor a způsobuje jeho excitaci. Při deexcitaci fluorofor emituje zelené světlo o vlnové délce 530 – 550 nm [13].

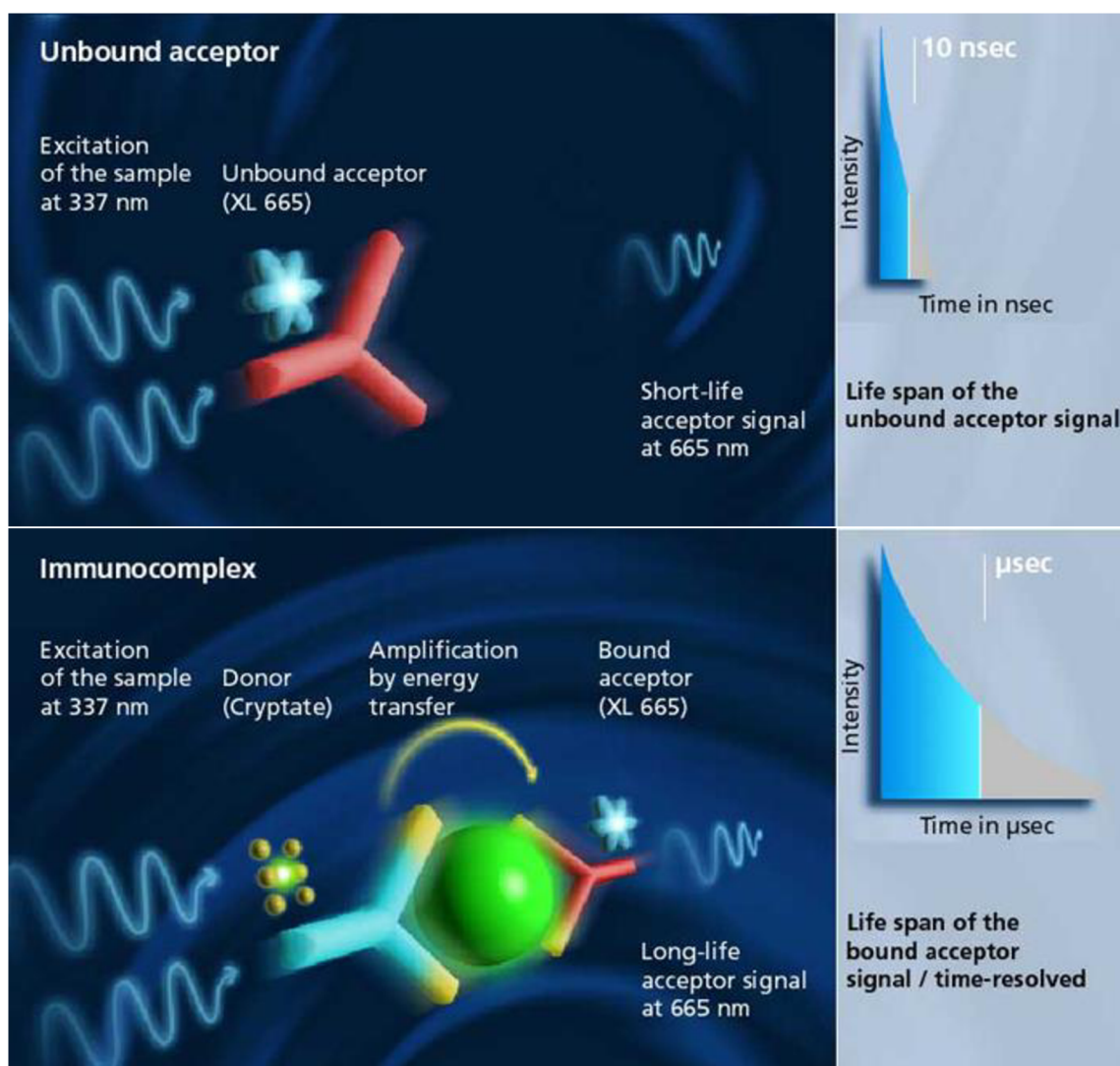
Homogenní fluorescenční imunoanalýza (TRACE) patří mezi nejpropracovanější techniku homogenní imunoanalýzy. Metoda používá ke značení fluorescenční indikátory s kryptátovou strukturou (iont kovu v centru) prvků vzácných zemin, např. europium (Eu). Jak již bylo zmíněno, tyto fluorofory mají dlouhotrvající emisi fluorescence až do 1000 μ s, proto je možné použít TR - časově rozlišenou detekci fluorescence [13,39]. Iont europia (Eu^{3+}) je zabudován do kryptátové struktury tris-bipyridin-diaminu, která je zobrazena na Obr. č. 39 [29].



Obr. č. 39: *Struktura kryptátu europa [29]*

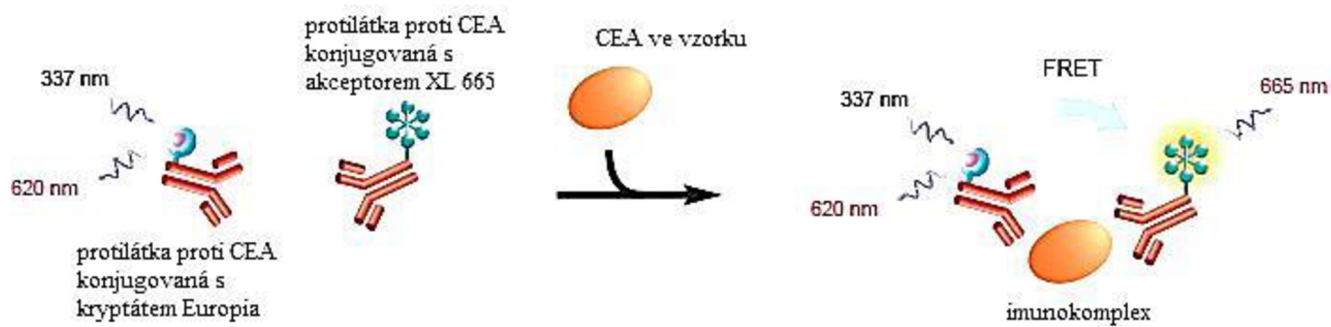
Tento kryptát Eu^{3+} vykazuje velkou stabilitu a dobré fluorescenční vlastnosti. Pro excitaci se používá většinou laser o vlnové délce 337 nebo 370 nm. Emisní maxima kryptátu jsou v oblasti 550 – 720 nm. Kryptáty jsou kovalentně navázány buď na antigen, nebo na protilátku. Základem metody TRACE je přenos neradioaktivní energie na krátkou mezimolekulární vzdálenost (FRET) mezi donorem (kryptát) a akceptorem, kterým je chemicky modifikovaný protein absorbující světlo. Schéma FRET je uvedeno na Obr. č. 39. Akceptorem je chemicky modifikované rostlinné proteinové barvivo z červených řas, které má maximální absorpci v rozmezí 600 – 650 nm. Při excitaci nenavázaného donoru dochází k emisi dlouhotrvající záření (10 - 1000 μs) při 620 nm, zatímco volný akceptor emituje krátkotrvající záření při 665 nm. Pokud se donor s akceptorem dostatečně přiblíží, dochází k přenosu energie z excitovaného kryptátu europa na akceptor XL 665 (označení chemicky modifikovaného proteinu). K přiblížení může dojít při vytvoření imunokomplexu u sendvičové imunoanalýzy obsahující dvě protilátky, kdy první je značená kryptátem Eu^{3+} a druhá XL 665. Když jsou obě značené protilátky navázány na imunokomplex, přenáší se dlouhotrvající charakteristika fluorescence z donoru na akceptor a dochází k zesílení signálu fluorescence, který lze měřit po dobu několika mikrosekund.

Všechny nespecifické signály (volného akceptoru, matrice) jsou potlačeny měřením časově modulované fluorescence. Detekční systém měří simultánně vlnovou délku 620 nm donoru a vlnovou délku 665 nm akceptoru. Z tohoto simultánního měření se vypočítá poměr signálů 665/620 nm. Tímto poměrem se zjistí, kolik molekul stanovovaného analytu (antigenu) se naváže na obě protilátky. Množství měřeného analytu je pak přímo úměrné intenzitě poměru signálů 665/620 nm. Tento systém lze aplikovat na kompetitivní i nekompetitivní imunoanalýzy a vyznačuje se velkou citlivostí, přesností a robustností [11,38]. Pro lepší pochopení technologie je uvedeno schéma na Obr. č. 40 [37].

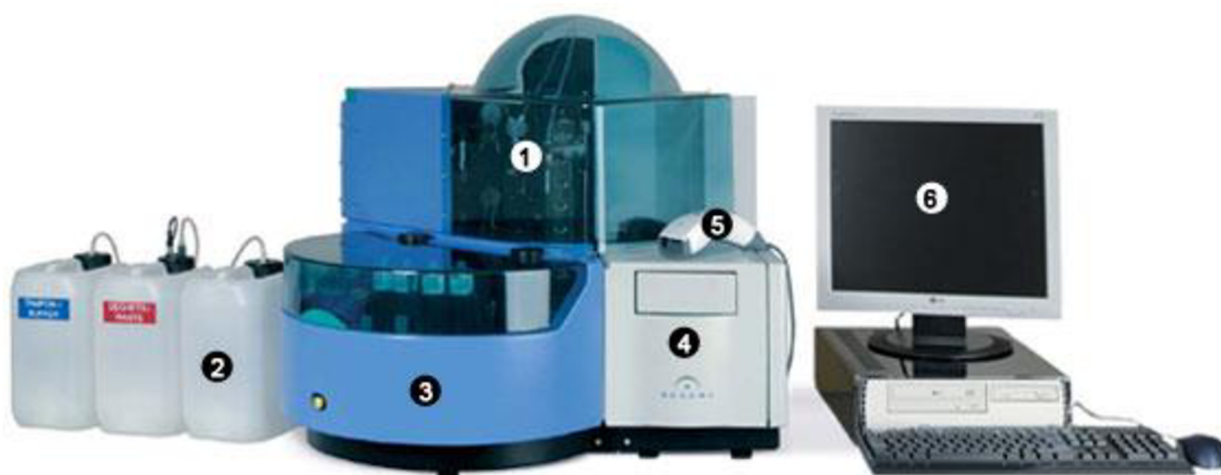


Obr. č. 40: Originální schéma technologie TRACE od firmy BRAHMS [37]

Unikátní technologie TRACE je k měření některých tumorových markerů používána pouze v 7 laboratořích v ČR. Metoda TRACE od firmy B. R. A. H. M. S. je pokládána za nejpokročilejší homogenní imunoanalytickou metodu, která může pracovat v kompetitivním i nekompetitivním uspořádání. Stanovení probíhá na analyzátoch Kryptor od firmy B. R. A. H. M. S. Imunofluorescenční sendvičové stanovení tumorových markerů využívá monoklonální myší protilátku proti stanovovanému analytu s navázaným akceptorem (XL 665) a druhou polyklonální králičí protilátku proti stanovovanému analytu konjugovanou s kryptátem europia. Neprobíhá zde separace ani promytí, protože jde o homogenní metodu. V dalším kroku dusíkový laser excituje kryptát. Signál generovaný kryptátem při 620 nm slouží jako interní reference a měří se simultánně se signálem akceptoru o dlouhé životnosti při 665 nm, který je specifickým signálem. Interferenční vlivy, například ze zakalených sér, jsou automaticky korigovány pomocí interně vypočítaného poměru intenzit při těchto vlnových délkách. Signál s dlouhou životností je úměrný koncentraci měřeného analytu. Příklad stanovení nádorového markeru CEA založené na nekompetitivní homogenní imunoanalýze je uveden na Obr. č. 41 od firmy B. R. A. H. M. S. [57,98].



Obr. č. 41: Princip stanovení CEA metodou TRACE [38]



Obr. č. 42: Analyzátor Kryptor firmy B. R. A. H. M. S. [72]

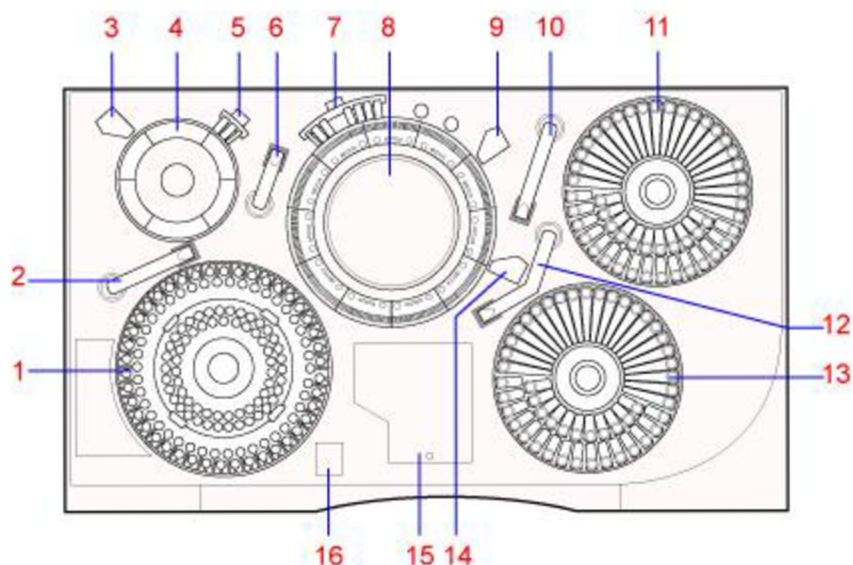
2.10 Přístrojová technika

2.10.1 Biochemický analyzátor Siemens Advia 1800

Imunoturbidimetrická metoda ADVIA chemistry Systém Feritin (FRT), která je v naší laboratoři rutinně používaná, je zavedená na analyzátoru Siemens ADVIA 1800. ADVIA 1800 je plně automatický biochemický analyzátor firmy Siemens určený pro použití in vitro, který může vyšetřovat vzorky lidského séra, plazmy, moče nebo likvoru. Analyzátor umožňuje provádění analýz pomocí metod absorpční spektrofotometrie, turbidimetrie a potenciometrické měření pomocí iontově selektivních elektrod (ISE). Analyzátor je schopen vykonat 1200 fotometrických testů a 600 ISE testů za hodinu. V analyzátoru lze současně analyzovat 52 metod pro stanovení různých analytů. Jako zdroj záření je zde použita halogenová lampa o výkonu 50 W, která má vodní chlazení. Analyzátor dokáže měřit na 14 vlnových délkách (340, 410, 451, 478, 505, 545, 571, 596, 658, 694, 751, 805, 845 a 884 nm) i bichromaticky. V analyzátoru je instalována konkávní difrakční mřížka s diodovým polem. Reakční kolo obsahuje 221 plastových kyvet, kde probíhá měření absorbance. Kyvety jsou umístěny v olejové lázni vyhřívané na $37^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Optická dráha kyvety je 1 cm. Objem vyšetřovaného materiálu (sérum, plazma), který je pipetován do reakční kyvety, se pohybuje od 2 do 30 μl . Objem reagensii dávkovaných do kyvety se pohybuje v rozmezí 80 – 120 μl . Absorbance v kyvetách je měřena každých 6 sekund. Průměrná doba do vydání prvního výsledku je 10 – 15 minut v závislosti na typu metody. Na Obr. č. 43 je vyobrazen analyzátor Siemens Advia 1800 [44]. Popis analyzátoru je uveden na Obr. č. 44 [43].



Obr. č. 43: Analyzátor Siemens Advia 1800 [44]



Obr. č. 44: Popis analyzátoru Siemens Advia 1800 [43]

Vysvětlivky

- | | |
|----------------------|-----------------------------|
| 1 Vzorkový disk | 9 Reagenční míchadlo 2 |
| 2 Vzorkový pipetor | 10 Reagenční pipetor 2 |
| 3 Ředící míchadlo | 11 Reagenční kolo 2 |
| 4 Přeřadovací disk | 12 Reagenční pipetor 1 |
| 5 Ředící stanice | 13 Reagenční kolo 1 |
| 6 Vzorkovací pipetor | 14 Reagenční míchadlo 1 |
| 7 Mycí stanice | 15 Spektrofotometr |
| 8 Reakční disk | 16 Ovládání vzorkového kola |



Obr. č. 45: Reagenční kola analyzátoru Siemens Advia 1800 [44]

- **Princip metody**

Princip stanovení feritinu je založen na imunoturbidimetrickém stanovení (IMT). Imunoturbidimetrie využívá imunochemickou reakci specifických protilátek navázaných na latexových částicích s antigenem obsaženým ve vzorku. Vzniklé imunokomplexy (precipitát) jsou poté měřeny turbidimetricky při dané vlnové délce. Turbidimetrie je založena na měření stupně zákalu neboli turbidity. Na vzniklých imunokomplexech (částicích) dochází při průchodu monochromatického záření k rozptylu a částečně i k absorpci a odrazu tohoto záření. Měří se pokles intenzity procházejícího záření zeslabeného rozptylem na vzniklých imunokomplexech. Měření turbidity (zákalu) se provádí v ose světelného zdroje záření, jako u absorpční spektrometrie. Pokles intenzity záření v důsledku rozptylu je úměrný množství imunokomplexů v roztoku. Množství rozptýleného záření závisí zejména na koncentraci a velikosti částic a na vlnové délce procházejícího záření. Obecně je závislost absorbance na koncentraci měřeného analytu většinou nelineární [13,43]. Imunoturbidimetrická metoda pro stanovení feritinu obsahuje latexové částice potažené protilátkou proti feritinu. Turbidita se měří při vlnové délce 658 nm [45].

- **Analytické znaky metody**

Tabulka č. 4: *Analytické znaky IMT metody feritin na analyzátoru Advia 1800 [45]*

Parametr	Hodnoty (jednotky)
Analytický rozsah	6,0 – 455 ng/ml
Mez blanku (LoB)	2,4 ng/ml
Mez detekce (LoD)	4,5 ng/ml
Mez stanovitelnosti (LoQ)	6,0 ng/ml
Maximální hodnota analytu, kterou lze získat po naředění analyzátozem	4500 ng/ml
Prozónový efekt	40 000 ng/ml
Doba analýzy	10 minut
Objem vzorku do reakce	25 µl
Objem reagentů R1 a R2 do reakce	60 µl a 30 µl
Interference	(koncentrace, která ještě neovlivňuje analýzu)
Ikerita (koncentrace bilirubinu)	do 60 mg/dl
Lipémie (koncentrace triacylglycerolů)	do 1000 mg/dl
Hemolýza (koncentrace hemoglobinu)	do 1000 mg/dl

Tabulka č. 5: *Preciznost pro stanovení feritinu v séru (plazmě) dle firemní dokumentace Siemens [45]*

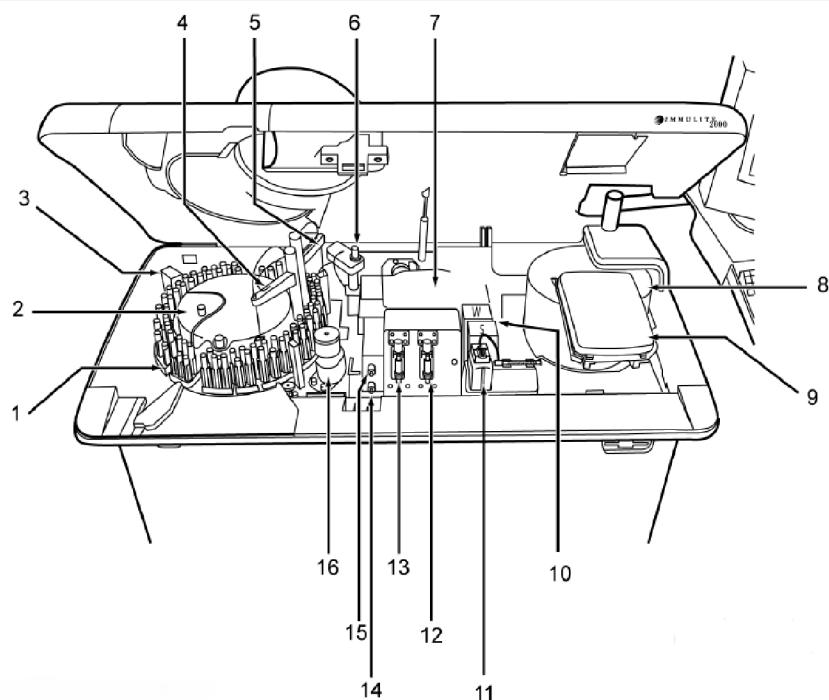
Preciznost			Opakovatelnost (přesnost v sérii)		Mezilehlá preciznost (přesnost mezi dny)		Celková preciznost	
Vzorek č.	Počet	Hodnota (ng/ml)	SD (ng/ml)	CV (%)	SD (ng/ml)	CV (%)	SD (ng/ml)	CV (%)
Sérum 1	80	12,0	0,44	3,7	0,56	4,6	1,04	8,7
Sérum 2	80	28,8	0,40	1,4	0,64	2,2	0,89	3,1
Sérum 3	80	185,3	0,78	0,4	1,15	0,6	1,49	0,8
Sérum 4	80	222,8	0,87	0,4	0,00	0,0	3,99	1,8
Sérum 5	80	297,0	1,06	0,4	1,97	0,7	2,45	0,8
Sérum 6	80	347,0	3,78	1,1	3,23	0,9	4,97	1,4

2.10.2 Imunochemický analyzátor Siemens Immulite 2000 XPi

Immulite 2000 XPi je automatický imunochemický analyzátor, který provádí kvantitativní i kvalitativní imunochemické analýzy vzorku lidského séra, plazmy a moče. Pracuje technologií chemiluminiscenční imunoanalýzy na pevné fázi (CLIA). Analyzátor umožňuje provádění analýz pomocí metod sendvičové i kompetitivní analýzy. Immulite je schopný vykonat až 200 testů za hodinu s vydáním prvního výsledku za 35 minut, další vždy po 18 s. V analyzátoru lze současně pracovat s 24 diagnostickými soupravami pro stanovení různých analytů. Diagnostické soupravy se vždy skládají ze zásobníku s kuličkami a reagensií. Kulička je dávkovaná do speciální reakční tuby, kde probíhá specifická imunochemická reakce. Po přidání vzorku a specifické protilátky se značenou ALP dochází k inkubaci při 37 °C. Po inkubaci je nenavázaná reakční směs separována od kuličky odstředivým promýváním, které je zobrazeno na Obr. č. 47. Promytí probíhá čtyřikrát ve speciální koaxiální komůrce, která pracuje jako promývací stanice. Do promytých speciálních reakčních tub se následně přidává substrát dioxethanu, který reaguje s ALP za vzniku luminiscenčního záření. Intenzita luminiscenčního záření je detekována fotonásobičem. V závislosti na typu imunochemické reakce jsou jednotlivé kroky různé [46].

• Princip metody

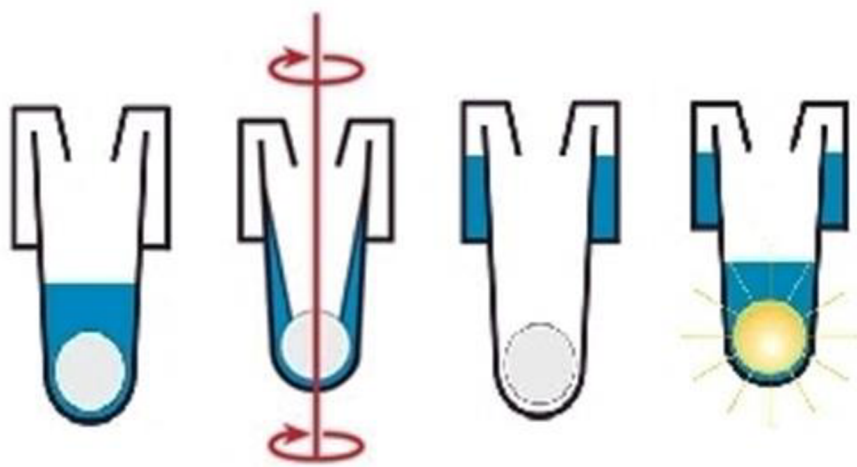
Princip stanovení feritinu imunochemickou metodou na analyzátoru Immulite 2000 XPi je založen na sendvičové chemiluminiscenční imunochemické reakci na pevné fázi. Pevná fáze (kulička) je potažena monoklonální myší protilátkou proti feritinu. Kapalná fáze obsahuje polyklonální kozí protilátku proti feritinu v pufru s konjugovanou alkalickou fosfatázou z telecího střeva. Vzorek pacienta a reagensie s potaženou kuličkou jsou inkubovány společně po dobu 30 minut. Během této doby se feritin ve vzorku váže s monoklonální protilátkou na polystyrenové kuličce a s polyklonální kozí protilátkou konjugovanou s ALP v kapalném činidle. Tím se formuje protilátkový sendvičový komplex. Reakční směs a konjugované enzymy jsou pak odstraněny centrifugálním promytím. Po promytí je ke kuličce přidán chemiluminiscenční substrát a je měřena intenzita luminiscenčního záření [46,81].



Obr. č. 46: *Popis analyzátoru Immulite 2000XPi [46]*

Vysvětlivky:

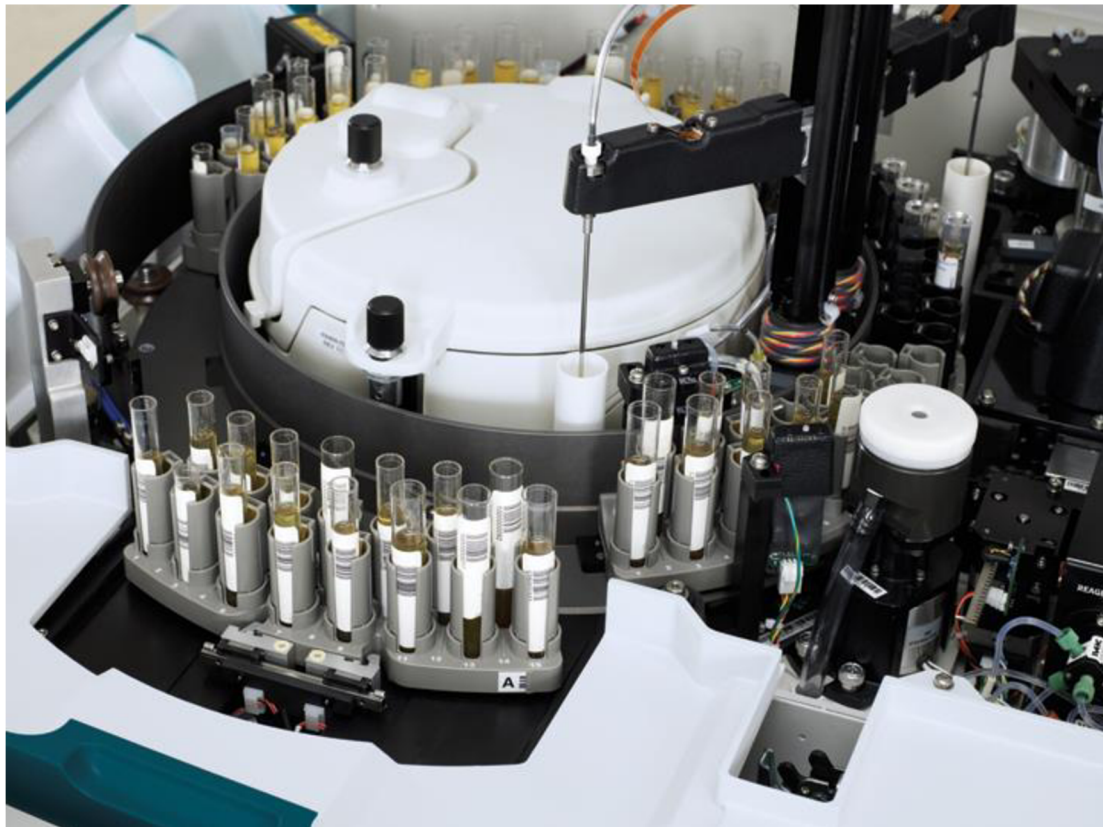
- | | |
|--|------------------------------|
| 1 Vzorkový karusel | 9 Kryt kuličkového karuselu |
| 2 Reagenční karusel | 10 Čerpadla substrátu a vody |
| 3 Čtečka čárových kódů vzorků a reagensů | 11 Zásobník substrátu |
| 4 Vzorková jehla | 12 Reagenční ředící ventil |
| 5 Reagenční jehla | 13 Vzorkový ředící ventil |
| 6 Promývací stanice pro kuličky | 14 Vzorkový ventil |
| 7 Inkubace vzorku | 15 Reagenční ventil |
| 8 Kuličkový karusel | 16 Nádobka pro ředění vzorku |



Obr. č. 47: *Odstředivé promývání kuličky [50]*



Obr. č. 48: *Siemens Immulite 2000 XPi* [50]



Obr. č. 49: *Dávkování vzorků* [50]

- **Analytické znaky metody**

Tabulka č. 6: *Analytické znaky metody pro stanovení feritinu [47]*

Parametr	Hodnoty (jednotky)
Analytický rozsah	1,5 - 1500 ng/ml
Mez detekce (LoD)	0,4 ng/ml
Mez stanovitelnosti (LoQ)	1,5 ng/ml
Hook efekt	150 000 ng/ml
Doba analýzy	35 minut
Objem vzorku do reakce	10 µl
Objem reagensů	55 µl
Interference	(koncentrace, která ještě neovlivňuje analýzu)
Ikerita (koncentrace bilirubinu)	do 20 mg/ml
Lipémie (koncentrace triacylglycerolů)	do 5000 mg/dl
Hemolýza (koncentrace hemoglobinu)	do 30 µl/ml

Tabulka č. 7: *Preciznost pro stanovení feritinu v séru (plazmě) dle firemní dokumentace [47]*

Preciznost			Opakovatelnost (přesnost v sérii)		Celková preciznost	
Vzorek č.	Počet opakování	Hodnota (ng/ml)	SD (ng/ml)	CV (%)	SD (ng/ml)	CV (%)
Sérum 1	110	13	0,44	3,4	0,76	5,9
Sérum 2	110	158	4,7	3,0	6,3	4,0
Sérum 3	110	323	11	3,4	18	5,6
Sérum 4	110	531	21	4,0	28	5,3
Sérum 5	110	1081	57	5,3	78	7,2

Tabulka č. 8: *Ověření linearity dle firemní dokumentace [47]*

Ředění	Naměřená hodnota (ng/ml)	Očekávaná hodnota (ng/ml)	naměřená/očekávaná hodnota (%)
1:1	1121	1121	100
1:2	571	561	102
1:4	289	280	103
1:8	148	140	108
1:16	73	70	104

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité přístroje a vybavení

- biochemický analyzátor ADVIA 1800, Siemens, Japonsko
- imunochemický analyzátor IMMULITE 2000 XPI, Siemens, USA
- systém na zpracování vzorku VersaCell (SMS), Siemens, USA
- přístroj pro přípravu deionizované vody, ELIX 35 CLINICAL, Merck Millipore, Francie
- digitální centrifuga Jouan C3i, Francie
- běžné laboratorní vybavení (reakční zkumavky, uzávěry na zkumavky, pipety, odměrné válce, kádinky, zkumavky, špičky)

3.2 Použité reagenční soupravy, chemikálie, kalibrační standardy, kontrolní vzorky, software

3.2.1 Reagenční souprava IMMULITE 2000 Feritin

Reagenční souprava IMMULITE 2000 Feritin (I2KFE) pro stanovení chemiluminiscenční metodou je určena pro in vitro diagnostické použití ke stanovení koncentrace feritinu (FER) v lidském séru nebo plazmě. Souprava obsahuje zásobník s kuličkami (L2FE12), zásobník s reagensiemi (L2FEA2) a kalibrátory (LFEL, LFEH). Ke stanovení je nutný chemiluminiscenční substrát (L2SUBM), který je dodáván samostatně. Reagensie jsou stabilní při teplotě 2 – 8 °C do data expirace [47].

Tabulka č. 9: Složení reagenční soupravy [47]

Reagensie	Složení
Feritin zásobník s kuličkami (L2FE12)	200 kuliček, které jsou potaženy monoklonální myší protilátkou proti feritinu
Feritin reagensie (L2FEA2)	11,5 ml ALP (z telecího střeva) konjugované s polyklonální kozí protilátkou proti feritinu v pufru s konzervačním prostředkem (azid sodný o koncentraci 1 g/l)
Feritin adjustory (LFEL, LFEH)	dvě ampulky po 2,5 ml s vysokou a nízkou koncentrací feritinu v matrixu na bázi lidského proteinu, s konzervačním prostředkem.
Chemiluminiscenční substrát (L2SUBM)	substrát obsahuje: Lumigen PPD 4-methoxy-4(3-fosfatfenyl)-spiro- (1,2-dioxethan-3,2-adamantyl); pufr AMP: 2-amino-2-methyl-1-propanol; polyvinylbenzyltributylfosfonium chlorid Substrát je náchylný na kontaminaci a na přímé sluneční světlo.
Multidiluent 2 (L2M2Z)	Multidiluent slouží pro automatické ředění vzorků, jedná se o nehumánní bílkovinový matrix s konzervačním prostředkem.

3.2.2 Adjustory soupravy IMMULITE 2000 Feritin

Součástí soupravy IMMULITE 2000 Feritin jsou dvě ampulky adjustorů po 2,5 ml s vysokou a nízkou koncentrací feritinu v matrici na bázi lidského proteinu. Adjustory jsou kapalné a určeny přímo k použití. Před adjustací necháme lahvičky nejprve vytemperovat 30 minut při teplotě 20 °C. Poté obsah lahviček mícháme mírným překlápěním. Adjustory se poté umístí do ledničky a uchovávají se při teplotě 2 - 8 °C. Stabilita adjustoru je po otevření 30 dní při teplotě 2 - 8 °C nebo do data expirace uvedené na obalu.

3.2.3 Reagenční souprava Advia Chemistry Systems Feritin (FRT)

Reagenční souprava Advia Chemistry Systems Feritin (FRT) pro stanovení imunoturbidimetrickou metodou obsahuje 2 nádoby s reagensy o objemu 20 ml. Reagencie jsou určeny k přímému použití a nemohou se od sebe oddělovat. Činidla jsou skladována před i po otevření při +2 až +8 °C, chráněna světlem a kontaminací jsou stabilní do doby expirace vyznačené na obalu. Stabilita reagenzí v analyzátoru je 60 dní [45].

Tabulka č. 10: Složení reagenční soupravy [45]

Reagencie	Složení	Koncentrace
Reagencie č. 1 (4x16,7 ml)	Glycinový pufr o pH 8,3 Chlorid sodný Hovězí sérový albumin Azid sodný	170 mmol/l 100 mmol/l 0,5 % 0,09 %
Reagencie č. 2 (4x10,1 ml)	Latexové částice potažené králičími protilátkami proti feritinu Glycinový pufr o pH 7,3 Chlorid sodný Hovězí sérový albumin Azid sodný	velmi specifické 170 mmol/l 100 mmol/l 0,1 % 0,09 %

3.2.4 Kalibrační standardy Advia Chemistry Systems Feritin (FRT)

Ke kalibraci soupravy se využívá kalibrační sérum humánního původu ADVIA Chemistry Liquid Specific Protein Calibrator firmy Siemens o šesti kalibračních hodnotách [49]. Kalibrační séra jsou kapalná a určena přímo k použití. Před kalibrací necháme lahvičky nejprve vytemperovat 30 minut při teplotě 20 °C. Poté obsah lahviček mícháme mírným překlápěním. Kalibrační séra se poté umístí zpět do ledničky a uchovávají se při teplotě 2 - 8 °C. Kalibrační séra jsou stabilní do data expirace uvedené na obalu nebo 30 dní po otevření při teplotě 2 - 8 °C.

Tabulka č. 11: *Kalibrační hodnoty [49]:*

KAL 1 (ng/ml)	KAL 2(ng/ml)	KAL 3 (ng/ml)	KAL 4 (ng/ml)	KAL 5 (ng/ml)	KAL 6 (ng/ml)
0,0	23,4	53,7	102,0	222,0	454,8

3.2.5 Kontrolní materiál

Jako kontrolní materiál se používá Lyphocheck Immunoassay Plus Control třístupňová kontrola od firmy Biorad. Kontrolní vzorky jsou vždy měřeny každý den na dvou hladinách. Každá sada kontrolních materiálů se skládá z patnácti lahviček s konzervačním prostředkem, obsahující pět ampulí od každé hladiny. Všechny informace potřebné pro přesnou činnost jsou načteny automaticky z čárového kódu reagentie [48].

- **Příprava kontrolního materiálu**

Rekonstruuje každou ampulku přidáním 5,0 ml destilované nebo deionizované vody, necháme stát 30 minut. Pak mícháme mírným překlápěním nebo inverzí do úplného rozpuštění. Obsah lahvičky se rozdělí po 0,5 ml do předem označených uzavíratelných zkumavek a ihned zamrazí pro další analýzu.

- **Stabilita kontrolního materiálu**

Po rekonstrukci je stabilita 7 dní při teplotě 2 - 8 °C, po rozdělení na alikvotní části 2 měsíce při teplotě -20 °C.

Tabulka č. 12: *Hodnoty kontrolních materiálů ADVIA CHEMISTRY SYSTEMS Feritin (FRT) [48]*

Hladina 1		Hladina 2		Hladina 3	
Průměr (ng/ml)	Rozsah (-2s až +2s)	Průměr (ng/ml)	Rozsah (-2s až +2s)	Průměr (ng/ml)	Rozsah (-2s až +2s)
63,3	50,7 – 76,0	116,0	93,0 – 140,0	295,0	236,0 – 354,0

Tabulka č. 13: *Hodnoty pro SIEMENS IMMULITE 2000/2000 XPi Feritin (FRT) [48]*

Hladina 1		Hladina 2		Hladina 3	
Průměr (ng/ml)	Rozsah (-2s až +2s)	Průměr (ng/ml)	Rozsah (-2s až +2s)	Průměr (ng/ml)	Rozsah (-2s až +2s)
67,6	54,1 – 81,1	118	94,1 – 141,0	310	248,0 – 372,0

3.2.6 Vzorčky SEKK (cyklus TM4/13)

Sada vzorků z externí kontroly kvality (SEKK) obsahuje 2 vzorky A a B po 2,5 ml. Kontrolní vzorky obsahují neznámé koncentrace následujících parametrů: CA 125, CA 15-3, CA 19-9, CA 72-4, CYFRA 21-1, AFP, hCG, CEA, TPS, PSA celkový, NSE, SCCA, TPA, PSA volný, S-100, kalcitonin, tyreoglobulin, β -2-mikroglobulin.

Příprava kontrolního materiálu

Kontrolní vzorky jsou v lyofilizovaném stavu. Rekonstituujeme tedy každou ampulku přidáním 2,5 ml destilované nebo deionizované vody, poté necháme stát 30 minut. Pak mícháme jemným kroužením nebo mírným překlápěním až do úplného rozpuštění lyofilizovaného materiálu.

Stabilita kontrolního materiálu

Stabilita kontrolního materiálu je do data expirace 31. 03. 2016.

3.2.7 Chemikálie

- Kondicionér kyvet (sorbát draselný 0,2 %, kyselina citronová 0,07 %, povrchově aktivní látky)
- Mycí roztok ADVIA 1 (NaOH 3,6 %)
- Mycí roztok ADVIA 2 (KOH 4,5 %, NaClO 4,7 %, Polyakrylát sodný 4,0 %, povrchově aktivní látky)
- Inkubační olej pro kyvety ADVIA
- Fyziologický roztok (NaCl 0,9 %)
- Promývací roztok IMMULITE 2000 (roztok fosfátového pufru, detergenty 0,9 %)
- Čistící roztok na jehly IMMULITE 2000 (NaClO 4,08 %)

3.2.8 Použitý software

- Microsoft Office Word 2010
- Microsoft Office Excel 2010
- Statistický software MedCalc
- Ovládací software k analyzátoru Advia 1800 a Immulite 2000 XPi

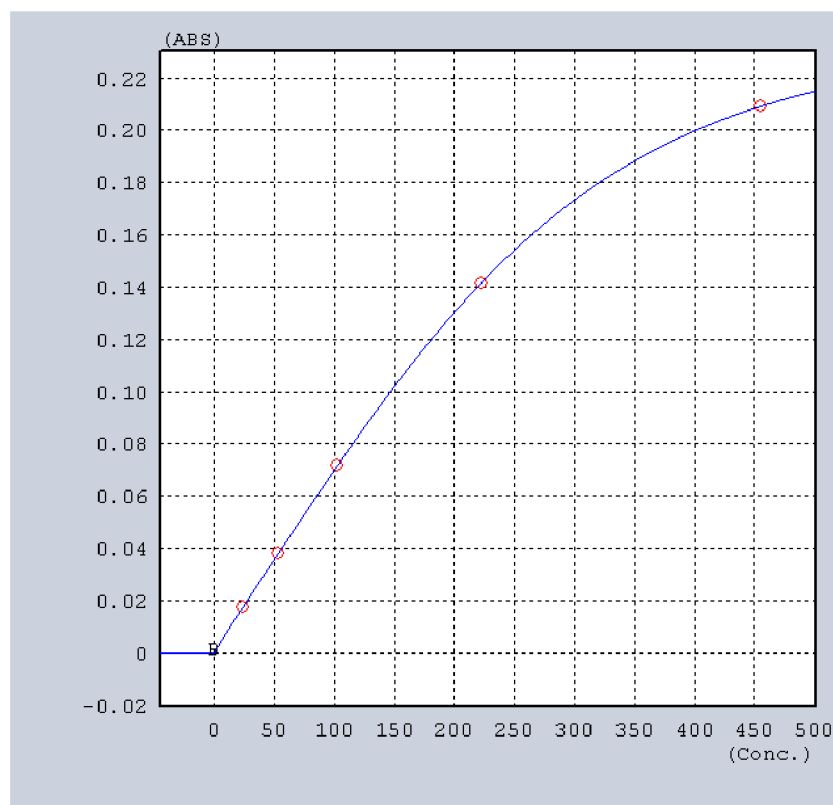
3.3 Pracovní postupy

3.3.1 Kalibrace soupravy Advia Chemistry Systems Feritin (FRT)

Kalibrace se provádí vždy pro novou šarži reagenční soupravy, anebo když výsledek analýzy kontrolního vzorku je mimo určené rozmezí 2s (dále dle Westgardových pravidel). Rekalibrace pro stejnou šarži je doporučena po 60 dnech. Kalibraci provede analyzátor po zadání požadavku. Výpočet kalibrační funkce je zajištěn prostřednictvím software analyzátoru. Kalibrační křivka pro imunoturbidimetrickou metodu je šestibodová nelineární funkce zobrazená na Obr. č. 50. Závislost absorbance na koncentraci feritinu je v tabulce č. 14.

Tabulka č. 14 *Kalibrační hodnoty metody IMT*

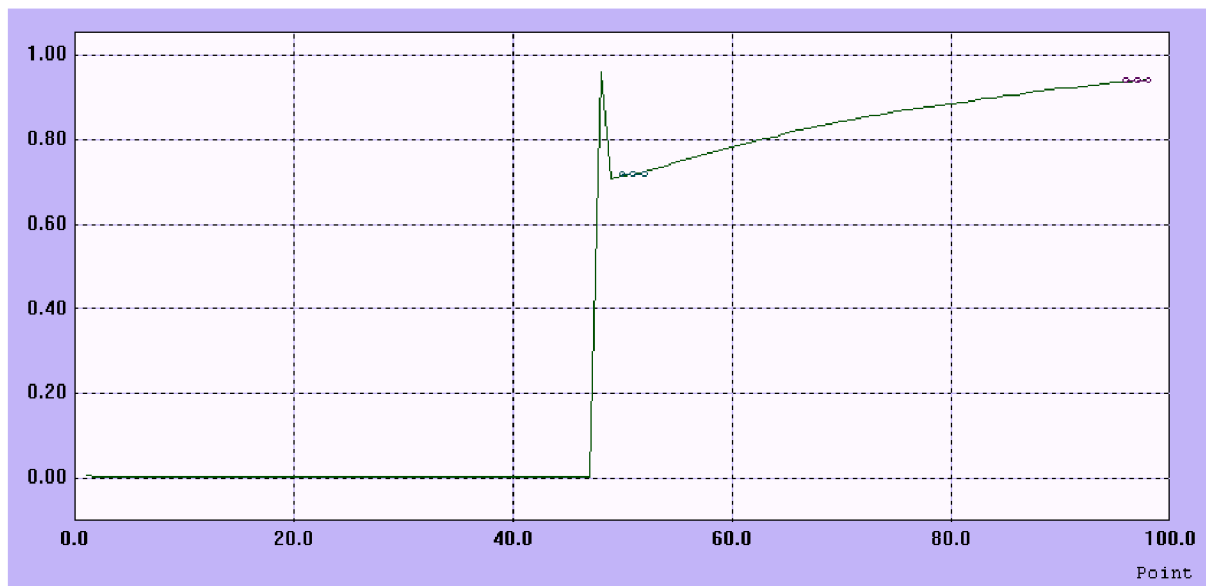
kalibrační body	koncentrace [ng/ml]	absorbance
1	0,0	0,00205
2	23,4	0,01753
3	53,7	0,03826
4	102,0	0,07148
5	222,0	0,14147
6	454,0	0,20918



Obr. č. 50: *Kalibrační křivka IMT metody pro analyt feritin*

- **Reakční křivka**

Reakční křivka je zobrazena na Obr. č. 51. Na ose x (časová osa) jsou jednotlivé měřící body, pro které jsou na ose y uvedeny změřené absorbance vzorku. Nejdříve se do měřící kyvety nadávkuje vzorek a reagensie R1, které se promíchají a inkubují 5 minut při 37 °C. Po 5 minutách se nadávkuje reagensie R2. Poté se odečte absorbance v 50 až 52 bodě. Promíchání a inkubace probíhá přibližně 5 minut při 37 °C. Poté se odečte absorbance v 96 až 98 bodě [45].



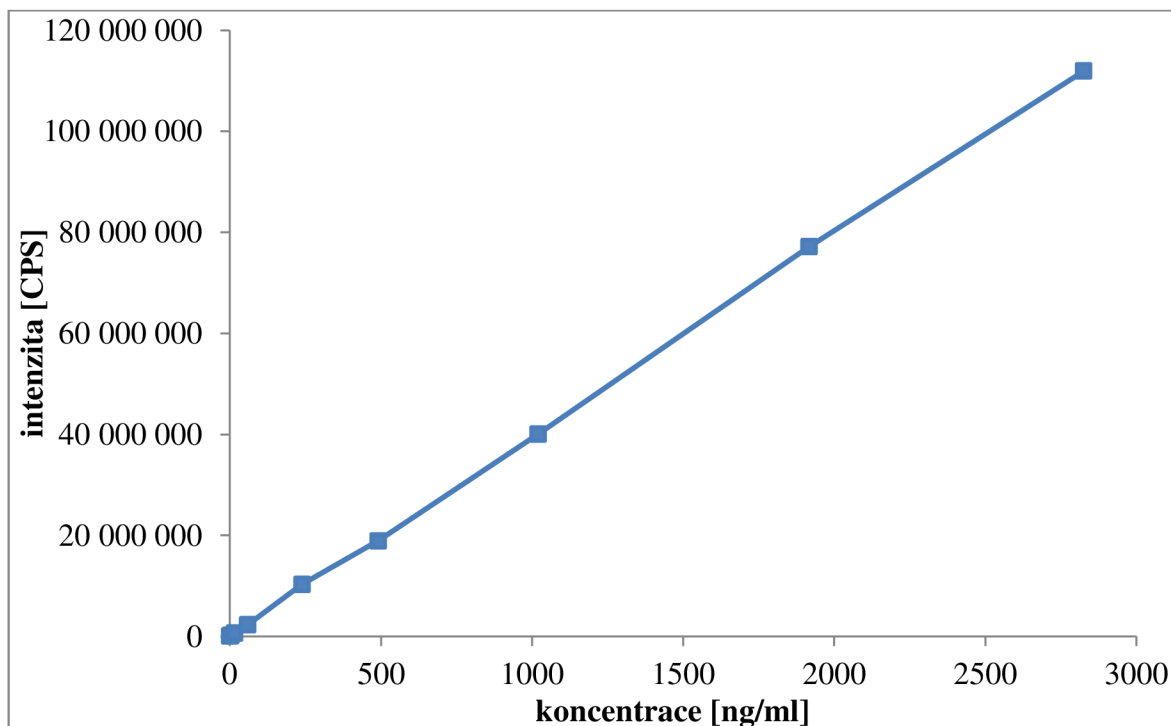
Obr. č. 51: Reakční křivka stanovení feritinu

3.3.2 Kalibrace soupravy IMMULITE 2000 Feritin

Kalibrační křivku u chemiluminiscenční metody vytváří výrobce soupravy. Kalibrační křivka soupravy IMMULITE 2000 Feritin (I2KFE) je nelineární desetibodová závislost intenzity luminiscence (CPS) na koncentraci (ng/ml) [47].

Tabulka č. 15: Hodnoty primární kalibrační křivky [47]

kalibrační body	koncentrace (ng/ml)	intenzita (CPS)
1	0	83 735
2	2,00	158868
3	3,97	238075
4	16,30	669181
5	59,60	2324857
6	239,00	10312224
7	491,00	18947921
8	1021,00	40082540
9	1917,00	77179529
10	2826,00	111947307



Obr. č. 52: Primární kalibrační křivka [47]

- **Adjustace**

Adjustace znamená ověření primární kalibrační křivky zadané výrobcem soupravy na konkrétním analyzátoru. K adjustaci soupravy se využívají adjustory, které jsou vždy součástí soupravy. Adjustory jsou charakterizovány hodnotou intenzity luminiscence (CPS) při načtení čárového kódu soupravy [47]. Adjustace (ověření) se provádí vždy pro novou šarži soupravy, anebo když výsledek analýzy kontrolního vzorku je mimo určené rozmezí $2s$ (dále dle Westgardových pravidel). Doporučený interval mezi adjustacemi je 4 týdny od první adjustace. Před adjustací se nalepí na testovací zkumavky příslušné alikvotní štítky dodávané se soupravou a poté analyzátor automaticky provede adjustaci po zadání požadavku. Každý adjustor je změřen 4 krát a poté je jedna odlehlá hodnota vyloučena. Z průměrů intenzit (CPS) se automaticky vypočítá hodnota směrnice (slope) a posun po ose y (intercept). První adjustace proběhla na začátku zavedení soupravy zobrazená na Obr. č. 53. Po adjustaci následovalo měření kontrolních vzorků na třech hladinách. Dvě ze tří hodnot kontrolních vzorků se odchylovaly o více jak dvě směrodatné odchylky, což dle westgardových pravidel vede k opakování kontrolních vzorků popř. k zastavení analýzy. Při měření nízkého adjustoru tato analýza vykazovala větší variační koeficient o hodnotě 6,559 %. Na analyzátoru následně proběhla kompletní dekontaminace vodních cest pomocí promývacích a čistících roztoků, aby se vyloučila jakákoliv systémová interference. Nepřesná adjustace je často způsobena špatnou přípravou adjustoru, což v tomto případě nelze uvažovat, protože souprava obsahuje kapalně adjustory u kterých se chyba ředění nevyskytuje. Po dekontaminaci vodních cest se znovu souprava adjustovala pomocí nízkého a vysokého adjustoru. Následné měření kontrolních vzorků nevykazovalo žádné výrazné odchýlení od hodnot výrobce. Následná adjustace je zobrazena na Obr. č. 54.

Lab Name	Customer Name	Instrument ID:	B0142
		Instrument S/N:	B0142
Test Code	FER	Kit Lot	323 Agn Lot
Slope:	1,3151		Intercept: -30.817
Instrument Slope Range:	N/A	N=3	Intercept guideline: 116.850
±10% of Previous FER Slope:	N/A		
FER Average Slope:	N/A	N=0	

Low Adjustor 389.499

	<u>Test Code</u>	<u>CPS</u>	<u>Lot #</u>	<u>Date</u>	<u>Time</u>
1st rep.	FER	341.852	126	24/02/2014	13:31:48
2nd rep.	FER	291.767	126	24/02/2014	13:32:06
3rd rep.	FER	318.391	126	24/02/2014	13:32:24
4th rep.	FER	326.461	126	24/02/2014	13:32:42

Mean CPS = 319.618 CV = 6,559%

High Adjustor 12.244.640

	<u>Test Code</u>	<u>CPS</u>	<u>Lot #</u>	<u>Date</u>	<u>Time</u>
1st rep.	FER	9.176.575	126	24/02/2014	13:33:00
2nd rep.	FER	9.405.408	126	24/02/2014	13:33:18
3rd rep.	FER	9.238.451	126	24/02/2014	13:33:36
4th rep.	FER	9.517.722	126	24/02/2014	13:33:36

Mean CPS 9.334.539 CV = 1,668%

Obr. č. 53: Adjustace soupravy IMMULITE 2000 Feritin (I2KFE)

Lab Name	Customer Name	Instrument ID:	B0142
		Instrument S/N:	B0142
Test Code	FER	Kit Lot	323 Agn Lot
Slope:	1,2569		Intercept: -12.206
Instrument Slope Range:	N/A	N=4	Intercept guideline: 116.850
±10% of Previous FER Slope:	1,18 - 1,45		
FER Average Slope:	N/A	N=1	

Low Adjustor 389.499

	<u>Test Code</u>	<u>CPS</u>	<u>Lot #</u>	<u>Date</u>	<u>Time</u>
1st rep.	FER	313.266	126	26/02/2014	08:35:17
2nd rep.	FER	320.620	126	26/02/2014	08:35:35
3rd rep.	FER	332.304	126	26/02/2014	08:35:53
4th rep.	FER	312.240	126	26/02/2014	08:36:11

Mean CPS = 319.608 CV = 2,894%

High Adjustor 12.244.640

	<u>Test Code</u>	<u>CPS</u>	<u>Lot #</u>	<u>Date</u>	<u>Time</u>
1st rep.	FER	9.385.955	126	26/02/2014	08:36:29
2nd rep.	FER	9.530.625	126	26/02/2014	08:36:47
3rd rep.	FER	9.868.156	126	26/02/2014	08:37:05
4th rep.	FER	10.222.793	126	26/02/2014	08:37:24

Mean CPS 9.751.882 CV = 3,828%

Obr. č. 54: Readjustace soupravy IMMULITE 2000 Feritin (I2KFE)

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Zavedení nové metody tumorového markeru

Cílem této části práce je verifikace nově zaváděné chemiluminiscenční metody pro stanovení feritinu na analyzátoru Siemens Immulite 2000 XPi. Důvodem zavedení nové chemiluminiscenční metody je její větší pracovní rozsah, lepší citlivost stanovení a snadnější provozní obsluha. Vzhledem k narůstajícím nárokům na kvalitu vyšetření v klinické praxi, je dalším důvodem přechodu na novou metodu CLIA, zastoupení této metody od firmy Siemens v Systému externí kontroly kvality. Stávající metoda IMT zatím v Systému externí kontroly kvality (SEKK) zastoupená není. Mezi základní nevýhody této nové metody bude patřit zřejmě doba analýzy, horší opakovatelnost a vyšší cena stanovení. Nově zavedená metoda bude porovnána se stávající imunoturbidimetrickou metodou z hlediska analytických parametrů a také z provozních a ekonomických aspektů. V experimentální části práce budou ověřeny analytické parametry nad rámec verifikačního postupu a vyhodnoceny dle doporučení ČSKB. V závěru této práce budou všechny parametry porovnány se stávající metodou a vyhodnoceny dle jejich výsledků. Na závěr je cílem této práce rozhodnout, zda nová CLIA metoda nahradí stávající IMT metodu v rutinní praxi.

4.1.1 Verifikace a validace metody

Validace a verifikace metod v klinické laboratoři vychází z doporučení k validaci a verifikaci analytických metod v klinických laboratořích z roku 2010 vydané Českou společností klinické biochemie. Validace je obecně ověření požadavků metody pro specifické použití. Validace je potvrzení, že analytická metoda nebo jiný výrobek (IVD MD) je schopný splnit požadavky kladené na tyto metody (výrobky). Klinická laboratoř musí používat validované metody. Metody validuje v naprosté většině výrobce in vitro diagnostik. Pouze u metod, které byly vyvinuty v laboratoři, se musí přikročit k validačnímu procesu [51].

Verifikace je také ověření požadavků metody a poskytnutí důkazů, že daný parametr splňuje určené požadavky. K potvrzení funkčních vlastností (validované) analytické metody musí dojít v dané laboratoři pro určitý měřicí systém. Verifikace většinou probíhá již u validovaných metod s určitými parametry danými výrobcem. Stejně jako validace, tak i verifikace prokazuje způsobilost k provádění dané měřicí metody. Splnění verifikačních požadavků se rozumí, že analytická metoda je plně funkční v dané laboratoři. Verifikace by měla probíhat u všech metod a postupů, které se v klinické laboratoři používají. Jsou nejčastěji ověřovány základní analytické znaky metody uvedené v tabulce č. 16 pro validaci i verifikaci [51].

Tabulka č. 16: *Základní analytické znaky metody [51]*

Validace	Verifikace
opakovatelnost	opakovatelnost
mezilehlá preciznost	mezilehlá preciznost
vychýlení (Bias)	vychýlení (Bias)
pracovní rozsah (linearita)	pracovní rozsah (linearita)
mez detekce, stanovitelnosti a blanku	
porovnání s jinou metodou	
srovnání pomocí EHK	
výtěžnost	
interference	
ostatní parametry	

Při ověření nově zavedené chemiluminiscentní metody feritin na analyzátor Immulite 2000XPi byly určeny následující analytické znaky metody:

- Opakovatelnost
- Mezilehlá preciznost
- Pracovní rozsah
- Vychýlení (Bias)
- Porovnatelnost metod

4.1.1.1 Opakovatelnost

Opakovatelnost je definována jako těsnost shody mezi nezávislými výsledky měření získaných za podmínek opakovatelnosti. Měření probíhá na stejném analyzátoru, stejnou reagentií, stejným pracovníkem, za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu (v sérii) [9]. Pomocí opakovatelnosti se vyjadřuje náhodná chyba měření. Dle doporučení se pro opakovatelnost může využít měření patientských vzorků, kontrolních nebo referenčních materiálů. Vzorky jsou měřeny v sérii, kdy počet stanovení je určen na 20 opakování. Měření by mělo probíhat minimálně na dvou různých koncentracích. Jedna hodnota koncentrace by se měla nacházet uvnitř referenčního intervalu a druhá nad hranicí referenčního intervalu [51]. Z měření se stanovuje aritmetický průměr, směrodatná odchylka a variační koeficient.

Tabulka č. 17: *Firemní dokumentace pro opakovatelnost CLIA [47]*

č. měření	1	2	3	4	5
Aritmetický průměr (ng/ml)	13,00	158,00	323,00	531,00	1081,00
SD (ng/ml)	0,44	4,70	11,00	21,00	57,00
CV (%)	3,40	3,00	3,40	4,00	5,30

Vypočtené hodnoty budou porovnány s hodnotami výrobce soupravy a také se zavedenou metodou. Pro měření opakovatelnosti byly využity patientské vzorky o pěti hodnotách koncentrace 10,30 ng/ml, 153,05 ng/ml, 313,40 ng/ml, 516,70 ng/ml, 898,00 ng/ml, které se příliš neliší od testovaných koncentrací ve firemní dokumentaci a lze je tedy porovnat. Opakovatelnost byla měřena v 20 replikacích v jednom dni na stejnou kalibraci. Pro klinicky důležité hodnoty feritinu byly testovány zejména vzorky č. 1, 2, 3. U těchto testovaných vzorků byly variační koeficienty ve srovnání s firemními hodnotami průměrně o 2 % vyšší. U nejvyšší testované hodnoty vyšel variační koeficient o 3,2 % nižší v porovnání s firemní dokumentací, což značí lepší opakovatelnost na vyšších hodnotách. Hodnoty variačních koeficientů nově zaváděné chemiluminiscenční metody (příloha č. 1) byly také porovnány se zavedenou imunoturbidimetrickou metodou na podobných koncentračních hladinách v tabulce č. 19.

Tabulka č. 18: *Měřené hodnoty opakovatelnosti patientských vzorků (CLIA):*

č. měření	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5
AM (ng/ml)	10,30	153,05	313,40	516,70	898,00
SD	0,56	7,26	16,33	28,20	18,83
CV (%)	5,43	4,74	5,21	5,46	2,10

Variační koeficienty pro imunoturbidimetrickou metodu ve srovnání s nově zaváděnou chemiluminiscenční metodou jsou nižší o 2 až 4 % v závislosti na koncentračních hladinách. Pro nejvyšší testovanou hodnotu (vzorek č. 5) odpovídá nižší variační koeficient pro chemiluminiscenční metodu. V hodnotách referenčního intervalu pro feritin vykazuje lepší výsledky opakovatelnosti používaná imunoturbidimetrická metoda.

Tabulka č. 19: *Porovnání variačních koeficientů CLIA a IMT metody*

Imunoturbidimetrie					
Vzorek č.	1	2	3	4	5
Aritmetický průměr (ng/ml)	12,20	162,89	322,55	430,35	908,23
SD (ng/ml)	0,42	2,28	3,01	3,93	37,75
CV (%)	3,48	1,40	0,93	0,91	4,16
Chemiluminiscence					
Vzorek č.	1	2	3	4	5
Aritmetický průměr (ng/ml)	10,30	153,05	313,40	516,70	898,00
SD (ng/ml)	0,56	7,26	16,33	28,20	18,83
CV (%)	5,43	4,74	5,21	5,46	2,10

4.1.1.2 Mezilehlá preciznost

Mezilehlá preciznost je definována jako těsnost souhlasu mezi nezávislými výsledky měření stejného vzorku získaných stejným analyzátozem a stejnou měřicí metodou, ale za delší časové období. Při měření mezilehlé preciznosti se připouští nová kalibrace, změna šarže nebo změna pracovníka, který měření provádí [9]. Pomocí mezilehlé preciznosti se vyjadřuje náhodná chyba měření. Dle doporučení ČSKB se mezilehlá preciznost určí z vnitřní kontroly kvality proměřením dvou až tří kontrolních materiálů v období 3 až 6 měsíců. Mezilehlou preciznost lze také určit z měření 10 až 20 dní po sobě. Každý kontrolní vzorek byl tedy měřen 20 dní po sobě po dobu 4 týdnů [51]. Z měření mezilehlé preciznosti se stanovuje aritmetický průměr, směrodatná odchylka a variační koeficient.

Tabulka č. 20: *Mezilehlá preciznost (IMT)*

hladina	L1	L2	L3
AM (ng/ml)	62,68	113,74	297,02
SD (ng/ml)	1,98	3,07	6,07
CV (%)	3,16	2,70	2,04

Tabulka č. 21: *Mezilehlá preciznost (CLIA)*

hladina	L1	L2	L3
AM (ng/ml)	66,59	112,66	286,40
SD (ng/ml)	1,36	4,52	5,66
CV (%)	2,05	4,01	1,98

Pro měření mezilehlé preciznosti byly využity kontrolní vzorky o třech hodnotách koncentrace 67,6 ng/ml; 118,0 ng/ml; 310,0 ng/ml. Vypočtené hodnoty byly porovnány se získanými hodnotami variačních koeficientů z příbalového letáku pro zavedenou metodu. Naměřené hodnoty pro mezilehlou preciznost jsou uvedeny v příloze č. 2. Vypočtené hodnoty variačních koeficientů byly také porovnány s hodnotami variačních koeficientů zavedené imunoturbidimetrické metody. Ze srovnání metod vyplývá, že hodnoty CV pro mezilehlou preciznost se významně neliší. Lze tedy říci, že hodnoty mezilehlé preciznosti jsou u obou metod vyhovující a srovnatelné.

4.1.1.3 Pracovní rozsah měření

Pracovní rozsah měření je uzavřený interval hodnot koncentrace, v němž lze dosáhnout požadované hodnoty přesnosti a pravdivosti (vychýlení) měření daného analytu. Dolní hranice rozsahu nesmí být menší než hodnota meze stanovitelnosti. V oblasti pracovního rozsahu je tedy nejistota měření přijatelná. Při verifikaci (validaci) se ověřuje platnost pracovního rozsahu (linearity) na konkrétním analyzátozem. Výrobce metody je povinen uvádět validovaná data o pracovním rozsahu, popř. o linearitě. U imunoanalytických metod je pracovní rozsah ověřen dilučním (ředícím) pokusem. Diluční pokus se vyjadřuje pomocí hodnot výtěžnosti R v %. Pro ověření pracovního rozsahu chemiluminiscenční metody pro stanovení feritinu bude použit diluční pokus. Pro diluční pokus se

používají biologické vzorky o koncentraci blízké horní hranici pracovního rozsahu. Z tohoto vzorku se naředí 5 a více alikvotů s klesající koncentrací měřeného analytu. Ideální diluční pokus pokryje celý pracovní rozsah měření nebo alespoň diagnosticky nejdůležitější rozhodovací interval. Lze použít více vzorků o různých koncentracích pro pokrytí celého pracovního rozsahu. Každý z naředěných vzorků se změří třikrát s náhodným pořadím analýzy. Diluční pokus je hodnocen určením výtěžnosti (R) u jednotlivých zředěných vzorků [51].

Výtěžnost (R) se vypočítá dle vztahu [51,93]:

$$R = 100 * \left(\frac{\text{výsledek měření}}{\text{teoretická hodnota}} \right) \quad [7]$$

CLIA metoda má pracovní rozsah v rozmezí 1,5 – 1500,0 ng/ml. Dle doporučení byl tento pracovní rozsah ověřen ředěním koncentrace 1408,3 ng/ml, která je blízko horní hranice pracovního rozsahu. Z výsledků vyplývá, že naměřené hodnoty jsou rozptýleny kolem vypočtené hodnoty s odchylkou 1,8 – 9,9 %. Při čtyřiceti násobném zředění je rozdíl teoretické a naměřené hodnoty překvapivě nízký. Lze tedy říct, že metoda CLIA poskytuje přesné výsledky i při vysokém ředění vzorků.

Tabulka č. 22: Diluční pokus pro metodu CLIA dle firemní dokumentace [47]

ředění	naměřená hodnota - průměr triplikátu (ng/ml)	teoretická hodnota (ng/ml)	výtěžnost R (%)
1,0	1121,0	1121,0	100,0
2,0	571,0	560,5	101,9
4,0	289,0	280,3	103,1
8,0	148,0	140,1	105,6
16,0	73,0	70,1	104,2

Tabulka č. 23: Diluční pokus pro metodu CLIA

ředění	naměřená hodnota - průměr triplikátu (ng/ml)	teoretická hodnota (ng/ml)	výtěžnost R (%)
1,0	1408,3	1408,3	100,0
1,5	970,0	938,9	103,3
2,0	741,8	704,2	105,3
3,0	505,4	469,4	107,7
5,0	286,6	281,7	101,8
10,0	150,7	140,8	107,0
20,0	77,4	70,4	109,9
40,0	37,6	35,2	106,8

Tabulka č. 24: *Diluční pokus pro metodu IMT*

ředění	naměřená hodnota průměr triplikátu (ng/ml)	teoretická hodnota (ng/ml)	výtěžnost R (%)
1,0	451,66	451,66	100,00
1,5	283,25	301,11	94,07
2,0	210,52	225,83	93,22
3,0	131,73	150,55	87,50
4,0	95,39	112,92	84,48
5,0	80,79	90,33	89,44
7,0	56,28	64,52	87,22
9,0	44,89	50,18	89,45
11,0	34,89	41,06	84,97
17,0	22,12	26,57	83,26
33,0	10,46	13,69	76,42

Diluční pokus byl také proveden u IMT metody. Pracovní rozsah IMT metody je v rozmezí 6,0 až 450,0 ng/ml. Pracovní rozsah je ověřen ředěním koncentrace 451,6 ng/ml, která je blízko horní hranice pracovního rozsahu. Diluční pokus je uveden v tabulkách č. 23 a č. 24. Z výsledků tohoto pokusu vyplývá, že u IMT metody s narůstajícím ředěním vzorku stoupá chyba měření o – 6 % až -24 %. Metoda IMT poskytuje v oblasti vyššího zředění horší přesnost než metoda CLIA.

4.1.1.4 Pravdivost (vychýlení - Bias)

Vychýlení je rozdíl mezi střední hodnotou výsledků zkoušky a přijatou referenční hodnotou [9]. Pomocí vychýlení se vyjadřuje odhad celkové systematické chyby měření na rozdíl od náhodné chyby. Vychýlení se stanoví pomocí analýzy referenčního materiálu s udanou nejistotou měření. V praxi však není vždy dostupný referenční materiál s udanou nejistotou, proto lze volit pro výpočet vychýlení další možnosti. V mnoha případech se volí postup, kdy laboratoř získané výsledky porovnává s průměrnými výsledky dalších laboratoří používajících stejné materiály, např. v Systému externí kontroly kvality. Hodnotu vychýlení může laboratoř využít k odhadu nejistoty měření jen tehdy, pokud je získána za podmínek opakovatelnosti. Pro výpočet vychýlení se doporučuje analyzovat 10 měření za podmínek opakovatelnosti v jedné sérii dvou referenčních materiálů o dvou koncentracích. Jedna hodnota by měla být uvnitř referenčního rozmezí a druhá nad horní hranicí. Z měření se určí aritmetický průměr, směrodatná odchylka, variační koeficient a hodnota vychýlení jako výtěžnost. Jelikož pro stanovení vychýlení feritinu není dostupný žádný referenční materiál s udanou nejistotou, k jeho výpočtu byl použit průměr výsledků měření účastníků mezilaboratorního srovnání ze Systému externí kontroly kvality firmy SEKK [51].

Výpočet vychýlení [51,93]:

$$B_r = \left(\frac{c_{\text{průměr měření}} - c_{\text{referenční měření}}}{c_{\text{referenční měření}}} \right) \cdot 100 \% \quad [8]$$

Výpočet kombinované nejistoty:

$$u_r = \sqrt{u_{r, \text{repro}}^2 + u_{r, \text{ref}}^2 + B_r^2 + u_{r, \text{xp}}^2} \quad [9]$$

Výpočet rozšířené kombinované nejistoty [51,93]:

$$U_r = k \cdot u_r \quad [10]$$

Výpočet nejistoty reprodukovatelnosti (mezilehlé preciznosti) [51,93]:

$$u_{r, \text{repro}} = CV_{\text{repro}} = \frac{SD_{\text{repro}}}{X_p} \cdot 100 \quad [11]$$

Výpočet standardní nejistoty průměru X_p [51,93]:

$$u_{r, \text{xp}} = CV_{\text{xp}} = \frac{SD_{\text{xp}}}{X_p} \cdot 100 \quad [12]$$

Výsledky měření vychýlení (BIAS) jsou uvedeny v tabulce č. 26 Výsledek měření se pohybuje v 95 % intervalu spolehlivosti u vzorku E21/14 A v intervalu 48,55 - 75,05 ng/ml a u vzorku E21/14 B v intervalu 80,57 - 107,43 ng/ml. U vzorku E21/14A s cílovou hodnotou 61,80 ng/ml byl vypočítáno vychýlení 0,89 ng/ml, což je vyšší o 1,44 % než je cílová hodnota. U vzorku E21/14B s cílovou hodnotou 94,00 ng/ml byl vypočítáno vychýlení 1,07 ng/ml což je vyšší o 1,14 % než je cílová hodnota. Analytické vychýlení by mělo být menší než jedna čtvrtina celkové biologické variability (B_A), která se vypočítá dle vztahu [52,93]:

$$\text{Celková biologická variabilita} = \sqrt{CV_i^2 + CV_G^2} \quad [13]$$

Tabulka č. 25: *Biologická variabilita pro feritin [47]*

CV_i (Intraindividuální biologická variabilita)	14,2
CV_G (Interindividuální biologická variabilita)	15,0
B_A (Celková biologická variabilita)	20,7
I_{biol} (Přesnost odvozená z biologických variabilit)	7,1
B_{biol} (Vychýlení z biologických variabilit)	5,2
TE_{biol} (Celková chyba odvozená z biologických variabilit)	16,9

Vypočítané vychýlení splňuje předchozí podmínku. Kombinovaná nejistota u vzorku A vyšla 10,84 % a rozšířená nejistota (k=2) 21,69 %, u vzorku B vyšla kombinovaná nejistota 7,26 % a rozšířená nejistota (k=2) 14,52 %. Mezní hodnota nejistoty určená pro analyt feritin je na hranici 24,00 %. Porovnáním mezní nejistoty 24,00 % s vypočítanými rozšířenými nejistotami 21,69 % pro vzorek A a 14,52 % pro vzorek B vyhovuje měření analytickým požadavkům, protože vypočítané nejistoty nepřekročili mezní hodnotu nejistoty. Výsledek rozšířené nejistoty měření nejvíce zvyšuje nejistota kontrolního materiálu určená ze Systému externí kontroly kvality z průměru všech účastníků dané skupiny.

Tabulka č. 26: Měření vychýlení pro CLIA metodu

číslo měření	E21/14 A	E21/14 B
1	62,40	95,30
2	62,50	95,50
3	63,10	94,80
4	62,80	95,90
5	62,90	94,70
6	63,00	95,80
7	61,50	94,60
8	62,70	93,90
9	62,10	94,20
10	63,90	96,00
Aritmetický průměr (ng/ml)	62,69	95,07
cílová hodnota (ng/ml)	61,80	94,00
SD (ng/ml)	0,64	0,74
CV (%)	1,02	0,77
Nejistota (%)	10,50	6,85
Výtěžnost R (%)	101,44	101,14
vychýlení (BIAS) (ng/ml)	0,89	1,07
vychýlení (BIAS) (%)	1,44	1,14
CV repro (%)	2,05	1,98
u (kombinovaná) (%)	10,84	7,26
U (rozšířená k=2) (%)	21,69	14,52

4.1.1.5 Porovnatelnost metod

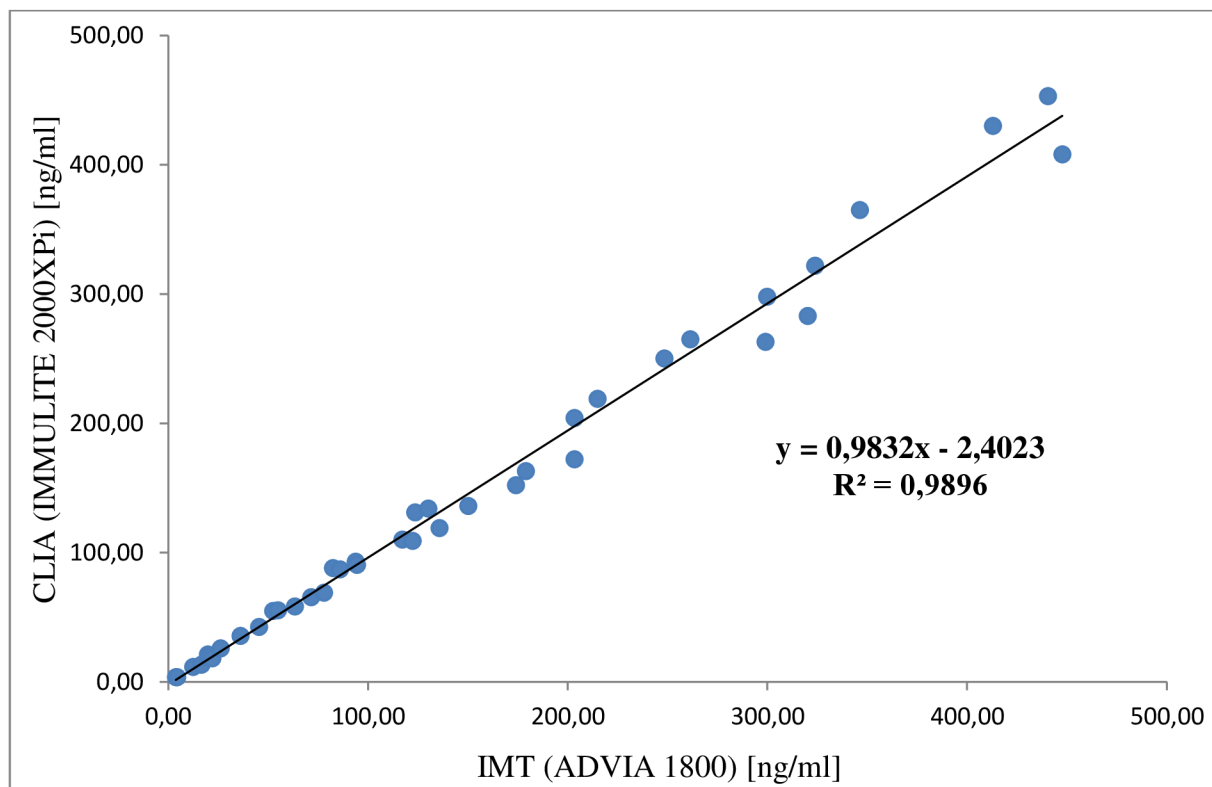
Pro srovnání metody je ideální použít referenční měřicí metodu. Referenční metody jsou však v praxi obvykle nedostupné, a proto se používají pro srovnání již validované metody. Pro porovnání metod je doporučeno použít minimálně 40 patientských vzorků, které by měly pokrývat celý pracovní rozsah měření. Důležitý je zejména výběr vhodné koncentrace než počet analyzovaných vzorků. Vzorky je doporučeno měřit v duplikátech v jednom dni [51]. Hodnoty srovnávací metody (IMT) jsou naneseny na osu x a hodnoty validované metody (CLIA) jsou naneseny na osu y. Porovnání metod bylo vyhodnoceno pomocí metody lineární regrese, neparametrické regrese Passing - Bablock a také pomocí rozdílového grafu dle Bland - Altmana. U lineární regrese byla určena rovnice přímky $y = a + bx$ a koeficienty determinace R^2 . U neparametrické regrese Passing - Bablock byla určena rovnice regrese a další parametry. U rozdílového grafu jsou na ose x naneseny absolutní difference (rozdíly metod) v jednotkách (ng/ml) nebo relativní difference (%) a na ose y je nanesen průměr měření (ng/ml) obou metod. Pro porovnání nově zaváděné metody bylo změřeno 70 vzorků uvedených v příloze č. 3. Pracovní rozsah IMT metody je 6,0 – 450,0 ng/ml, tudíž hodnoty nad 450,0 ng/ml byly ředěny fyziologickým roztokem dle návodu. Pracovní rozsah CLIA metody je 1,5 – 1500,0 ng/ml, hodnoty nad 1500,0 ng/ml byly automaticky ředěny analyzátozem dodávaným firemním multidiluentem. Porovnání bylo rozděleno na dvě oblasti hodnot. První oblast se týká hodnot feritinu do 450,0 ng/ml a druhá oblast se týká hodnot feritinu od 450,0 ng/ml.

4.1.1.5.1 Lineární regrese

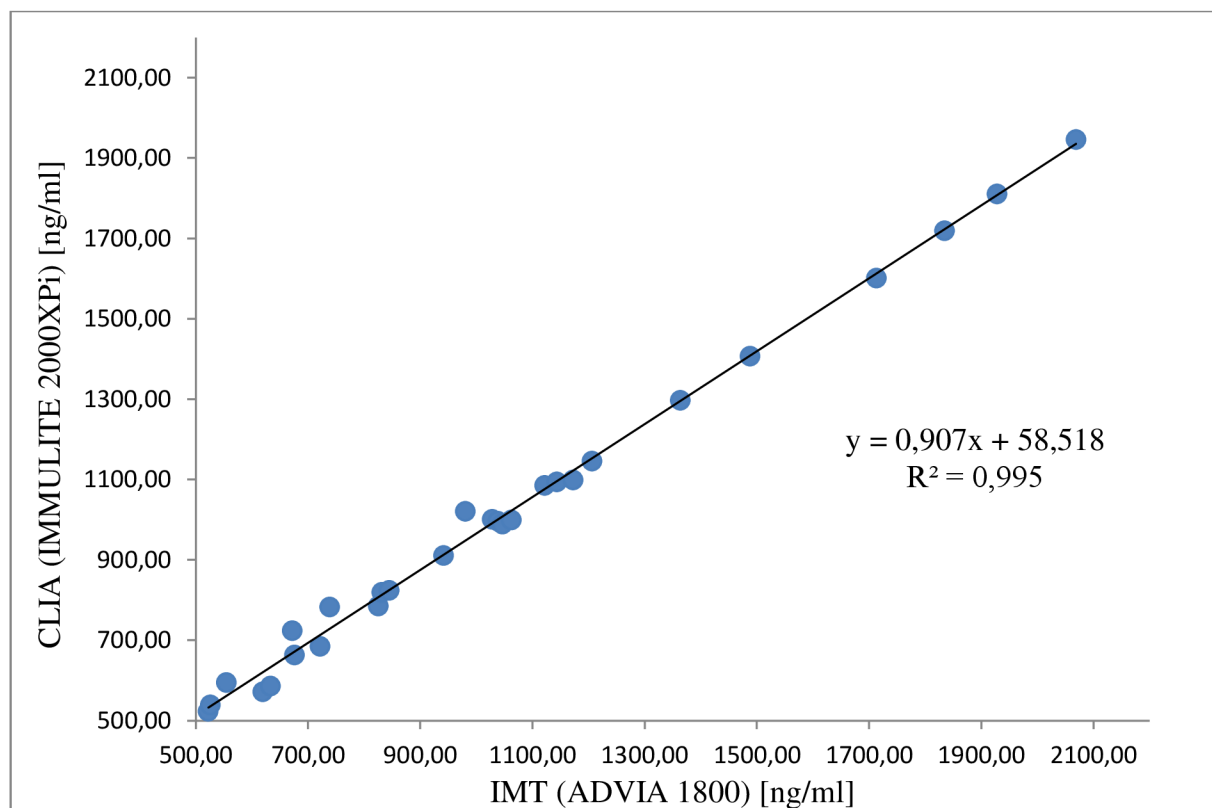
Lineární regrese je zobrazena na Obr. č. 55 a č. 56. Z obou grafů lineární regrese je jasné, že metoda IMT dobře koreluje s metodou CLIA. Vypočítané koeficienty determinace (R^2) mají hodnotu 0,9896 a 0,9950. Lepší rozlišení mezi metodami mohou poskytnout rozdílové grafy. [76]

Rovnice lineární regrese:

Oblast do 450,0 ng/ml (Obr. č. 55):	$y = 0,9832x - 2,4023$	$R^2 = 0,9896$
Oblast od 450,0 ng/ml (Obr. č. 56):	$y = 0,907x + 58,518$	$R^2 = 0,9950$



Obr. č. 55: Lineární regrese hodnot feritinu do 450,0 ng/ml



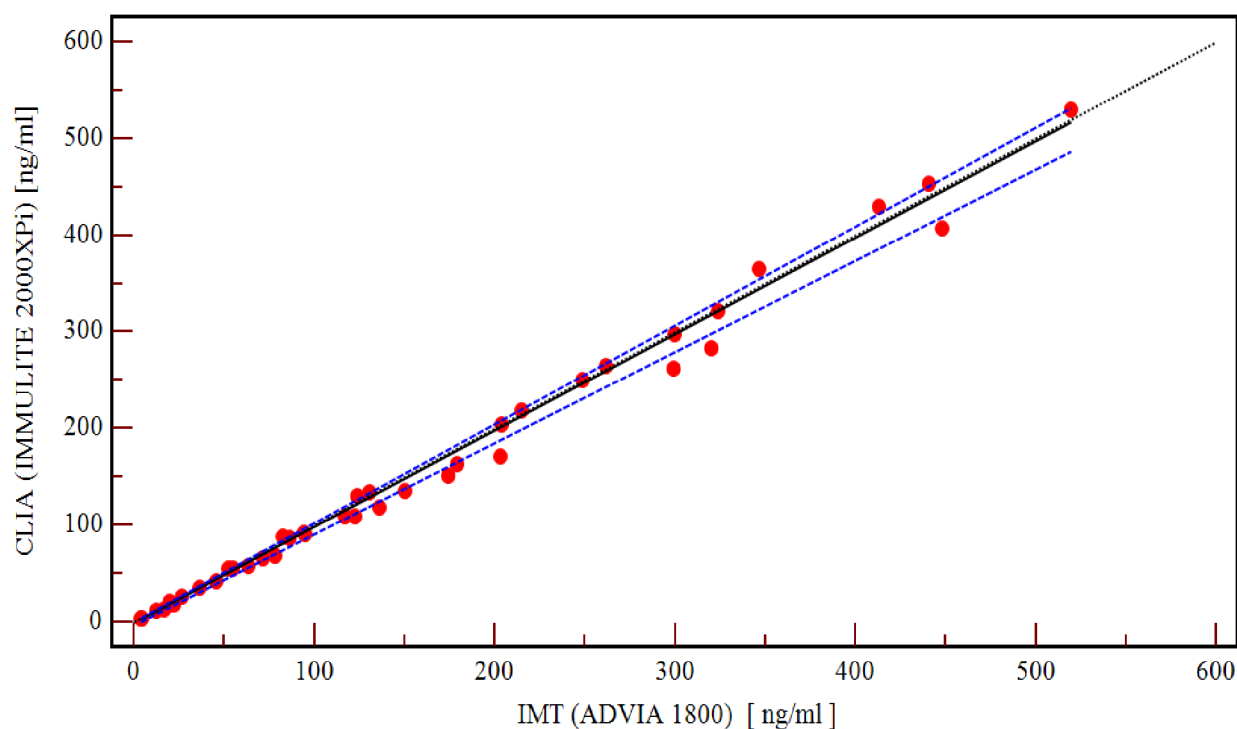
Obr. č. 56: Lineární regrese hodnot feritinu od 450,0 ng/ml

4.1.1.5.2 Passing - Bablokova neparametrická regrese

Neparametrická regrese Passing - Bablokova je více odolná vůči odlehlým hodnotám. Na ose x jsou naneseny hodnoty srovnávací IMT metody [93]. Při hodnocení této regrese se studuje, jestli interval spolehlivosti pro 95 % zahrnuje úsek na ose y = 0 a směrnici = 1. Pro první oblast měření hodnot feritinu do 450,0 ng/ml jsou tyto podmínky splněny a lze říci, že měření neobsahuje systematickou chybu [52,76].

Tabulka č. 27: Výsledky Passing - Bablok regrese hodnot feritinu do 450,0 ng/ml

Passing – Bablok regrese	CLIA	IMT
Nejnižší hodnota (ng/ml)	3,42	3,7900
Nejvyšší hodnota (ng/ml)	530,00	519,26
Aritmetický průměr (ng/ml)	152,14	156,64
Medián (ng/ml)	109,50	119,76
Standardní odchylka (SD)	138,80	139,11
Standardní odchylka průměru	21,42	21,46
Rovnice regrese	$y = -0,9984 + 0,9973 x$	
Úsek na ose Y	-0,9984	
Interval spolehlivosti úseku na ose Y (95%)	-3,4827 až 0,6048	
Směrnice	0,9973	
Interval spolehlivosti směrnice (95%)	0,9447 až 1,0234	

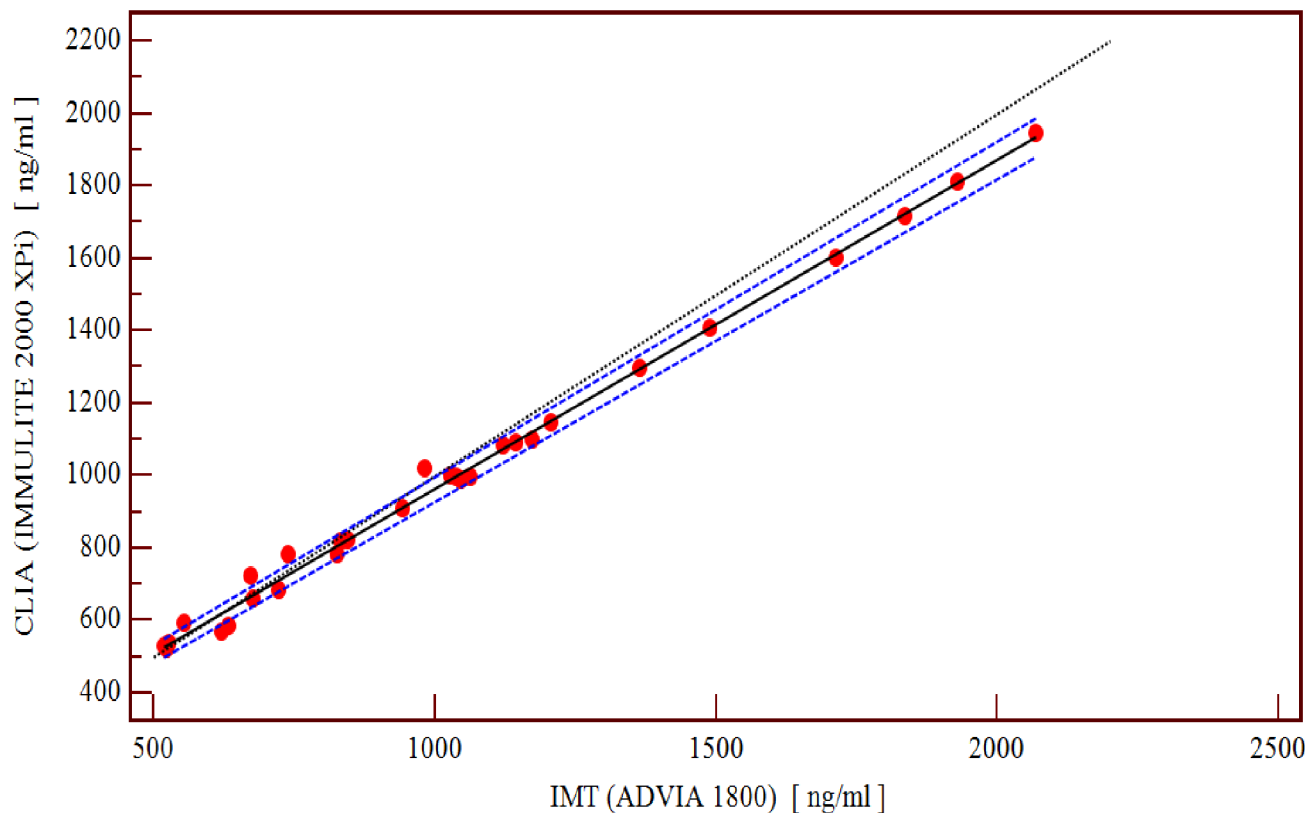


Obr. č. 57: Passing – Bablokova regrese hodnot feritinu do 450,0 ng/ml

Tabulka č. 28: Výsledky Passing- Bablok regrese od 450 ng/ml

Passing – Bablok regrese	CLIA	IMT
Nejnižší hodnota (ng/ml)	523,00	519,26
Nejvyšší hodnota (ng/ml)	1946,00	2068,85
Aritmetický průměr (ng/ml)	991,38	1028,45
Medián (ng/ml)	989,00	980,79
Standardní odchylka (SD)	394,77	434,23
Standardní odchylka průměru	73,31	80,66
Rovnice regrese	$y = 52,2608 + 0,9109 x$	
Úsek na ose Y	52,2608	
Interval spolehlivosti úseku na ose Y (95%)	34,4045 až 70,9832	
Směrnice	0,9109	
Interval spolehlivosti směrnice (95%)	0,8921 až 0,9259	

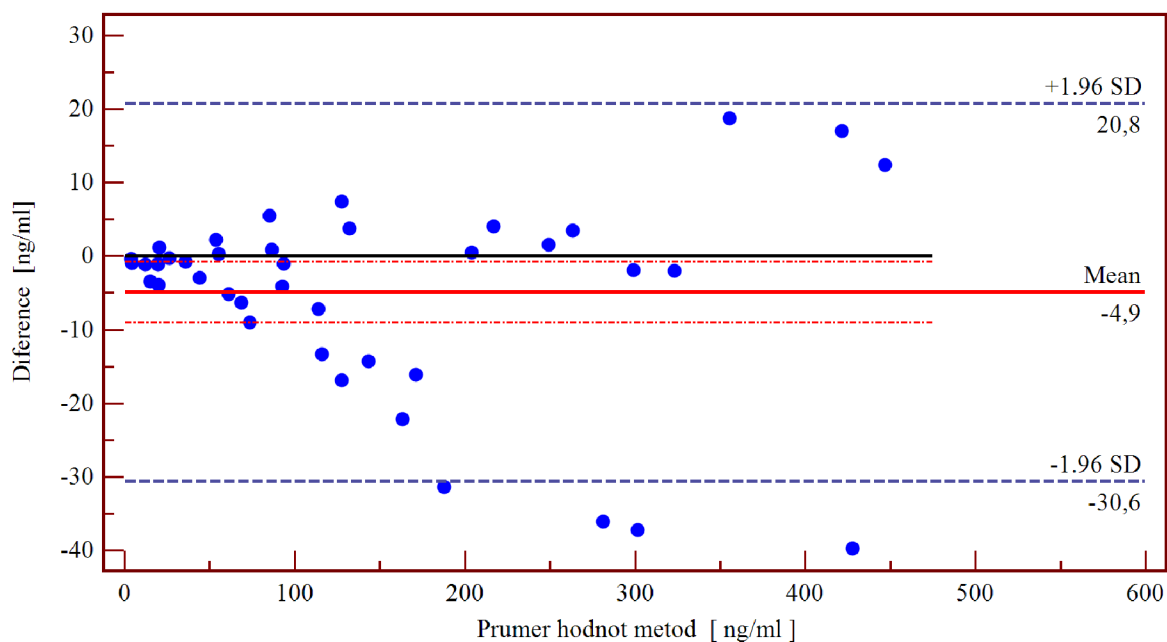
Pro druhou oblast měření nejsou podmínky vyhodnocení splněny. Toto měření je tedy zatížené systematickou chybou.



Obr. č. 58: Passing – Bablokova regrese hodnot feritinu od 450,0 ng/ml.

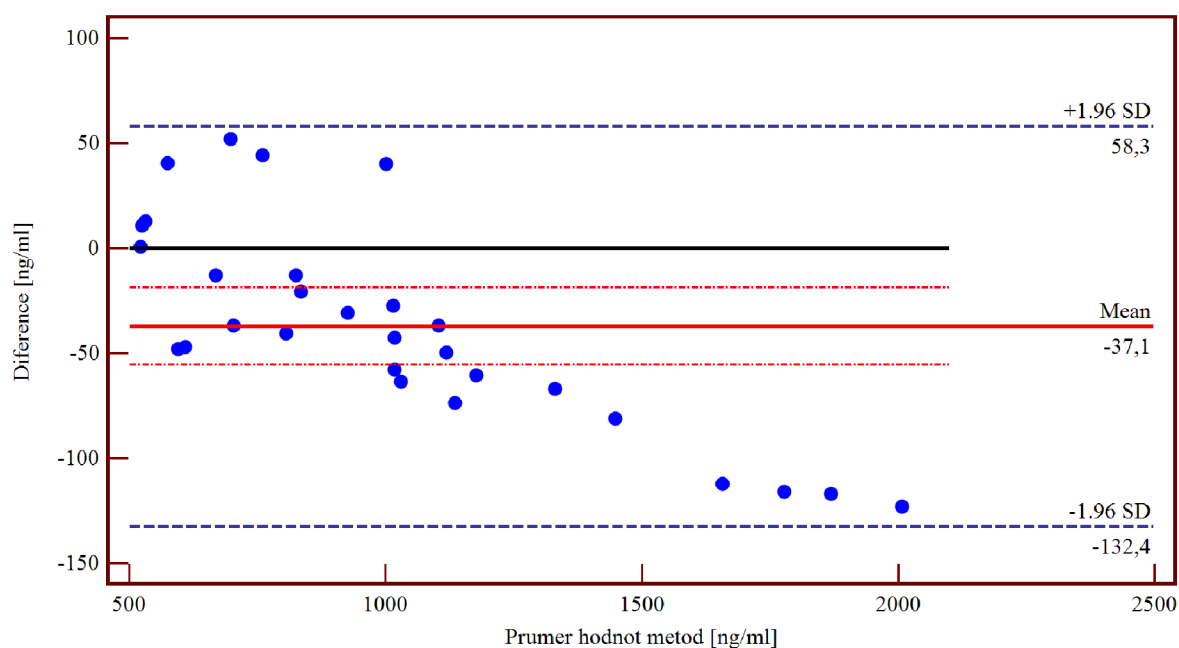
4.1.1.5.3 Rozdílové grafy dle Bland - Altmana

Hodnoty pro rozdílové grafy jsou také rozděleny do dvou oblastí. Na ose y jsou naneseny nejdříve absolutní diference v ng/ml a poté relativní diference v %. Pro každou oblast hodnot je vypočítaná průměrná diference mezi metodami s intervalem spolehlivosti. Obr. č. 59 popisuje oblast hodnot feritinu do 450,0 ng/ml s průměrnou diferencí -4,88 ng/ml s intervalem spolehlivosti pro 95 % od -0,86 do -8,89 ng/ml. Meze shody jsou v tomto případě 20,83 a -30,59 ng/ml.



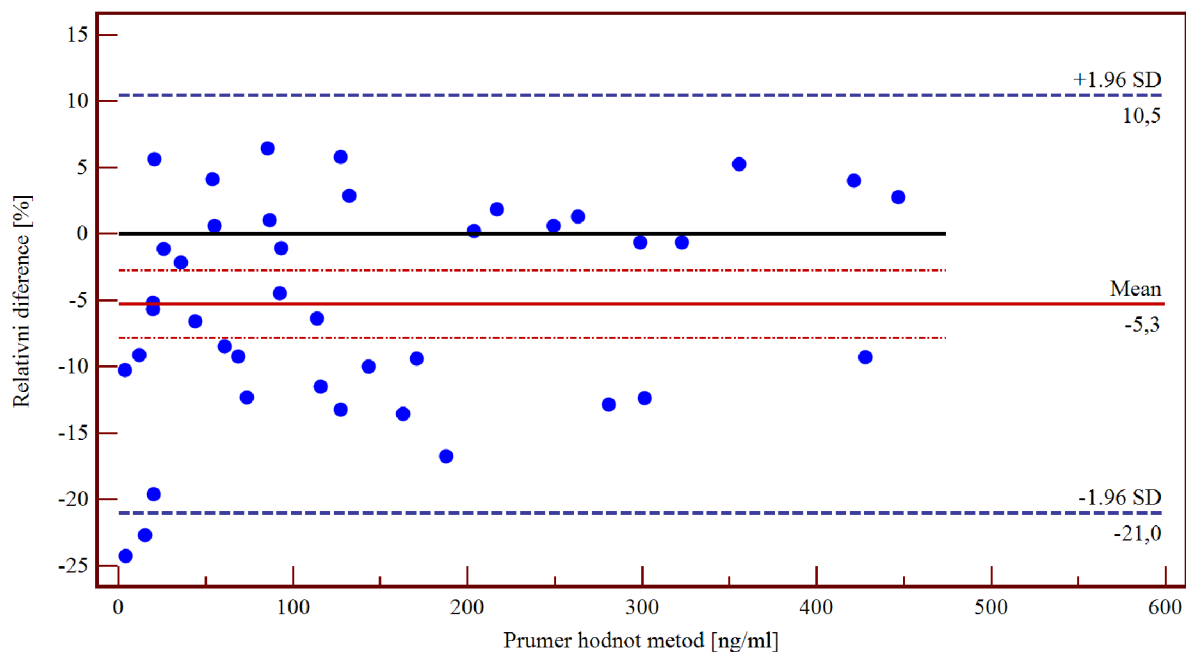
Obr. č. 59: Rozdílový graf pro hodnoty do 450,0 ng/ml

Obr. č. 60 popisuje oblast hodnot feritinu od 450,0 ng/ml s průměrnou diferencí -37,07 ng/ml s intervalem spolehlivosti pro 95 % od -19,37 do -54,77 ng/ml. Meze shody jsou v tomto případě 58,25 a -132,39 ng/ml.



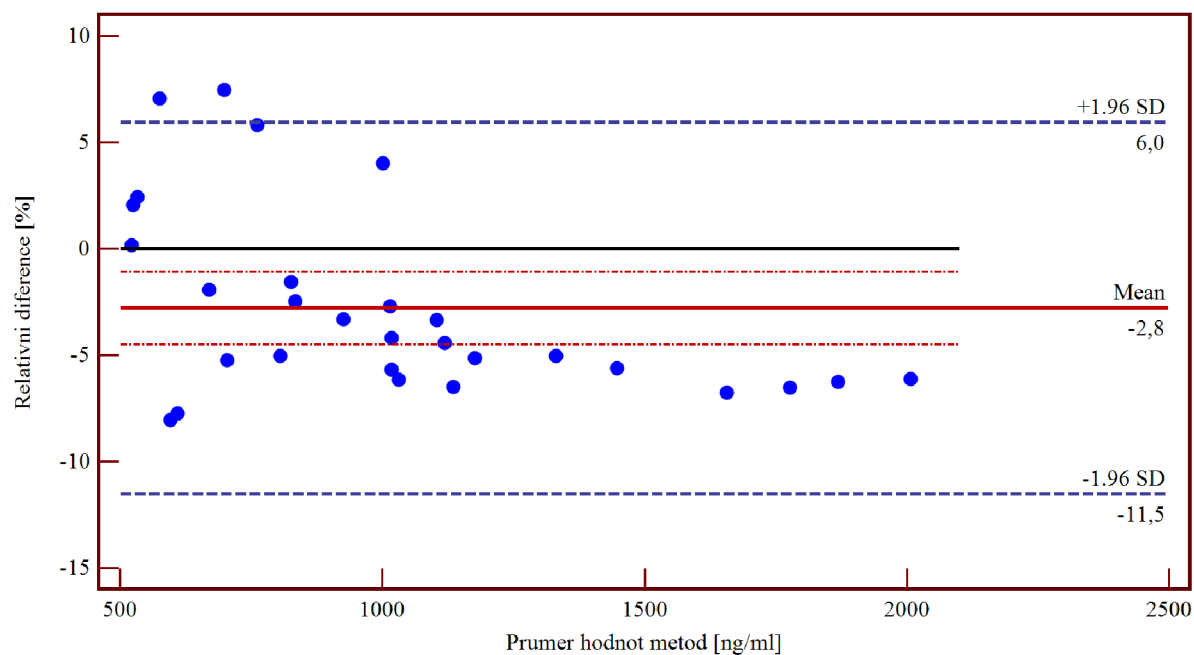
Obr. č. 60: Rozdílový graf pro hodnoty feritinu od 450,0 ng/ml

V následujících grafech jsou na ose y naneseny relativní difference v %. Obr. č. 61 popisuje oblast hodnot feritinu do 450,0 ng/ml s průměrnou diferencí -5,26 % s intervalem spolehlivosti pro 95% od -2,80 do -7,71 %. Meze shody jsou v tomto případě 10,46 a -20,98 %.



Obr. č. 61: Rozdílový graf pro hodnoty feritinu do 450,0 ng/ml

Obr. č. 62 popisuje oblast hodnot feritinu od 450,0 ng/ml s průměrnou diferencí -2,71 % s intervalem spolehlivosti pro 95 % od -1,05 do -4,37 %. Meze shody jsou v tomto případě 6,24 a -11,66 %.



Obr. č. 62: Rozdílový graf pro hodnoty feritinu od 450 ng/ml

4.1.2 Porovnání obou metod

Zavedení nové metody pro vyšetření feritinu v séru bylo provedeno dle doporučení ČSKB k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích. Dle doporučení proběhla validace těchto analytických parametrů: opakovatelnost, mezilehlá preciznost, ověření pracovního rozsahu, vychýlení a porovnání metod. Nad rámec verifikace bylo provedeno porovnání metod. Nová chemiluminiscenční metoda byla realizována na analyzátoru Siemens Immulite 2000 XPi. Získané výsledky byly porovnány s hodnotami uvedenými ve firemní dokumentaci a s hodnotami pro stávající IMT metodu. Přesnost metody se určila pomocí opakovatelnosti a mezilehlé preciznosti. Pro měření opakovatelnosti byly využity patientské vzorky, pro mezilehlou preciznost vzorky kontrolní. Variační koeficienty pro IMT metodu ve srovnání s nově zaváděnou chemiluminiscenční metodou jsou nižší o 2 až 4 % v závislosti na koncentračních hladinách. V hodnotách referenčního intervalu pro feritin vykazuje tedy lepší výsledky opakovatelnosti používaná IMT metoda. Pro klinicky důležité hodnoty feritinu byly hodnoty variačních koeficientů dostatečné i u CLIA metody. Pracovní rozsah metody CLIA byl ověřen dilučním pokusem. Lze konstatovat, že metoda CLIA poskytuje přesné výsledky i při vysokém ředění vzorků. Metoda IMT poskytuje v oblasti vyššího zředění horší přesnost než metoda CLIA. Pomocí materiálu ze Systému externí kontroly kvality (SEKK) byla snaha určit vychýlení (Bias) pro metodu CLIA. Použitý materiál ze Systému externí kontroly kvality však neposkytoval nejistotu materiálu. K výpočtu byl tedy použit průměr výsledků účastníků mezilaboratorního srovnání a právě tento parametr nejvíce zvyšoval vypočítanou nejistotu měření. Vypočítané vychýlení lze tedy považovat jako orientační. V závěru práce byla porovnána nově zaváděná metoda CLIA s metodou IMT na 70 patientských vzorcích. Jelikož pracovní rozsah metody IMT dosahoval pouze do koncentrace 450,0 ng/ml feritinu, porovnání hodnot bylo vždy rozděleno do dvou oblastí. První oblast se týká hodnot feritinu do 450,0 ng/ml a druhá oblast se týká hodnot feritinu od 450,0 ng/ml. Porovnání metod bylo vyhodnoceno pomocí metody lineární regrese, neparametrické regrese Passing-Bablok a také pomocí rozdílových grafů dle Bland - Altmana. Vypočítané koeficienty determinace (0,9896 a 0,9950) u lineární regrese potvrdily dobrou korelaci mezi hodnotami metod CLIA a IMT. Neparametrická regrese dle Passing - Babloka vyloučila systematickou chybu měření v první oblasti hodnot (do 450,0 ng/ml). V druhé oblasti (od 450,0 ng/ml) hodnot byla nalezena systematická chyba. Rozdílové Grafy dle Bland - Altmana poskytly následující výsledky. V oblasti hodnot feritinu do 450,0 ng/ml poskytovala metoda CLIA v průměru nižší výsledky s průměrnou diferencí -4,88 ng/ml (-5,26 %) v rozmezí od -0,86 do -8,89 ng/ml (-2,80 do -7,71 %). V oblasti od 450,0 ng/ml poskytovala metoda CLIA v průměru nižší výsledky s průměrnou diferencí -37,07 ng/ml (-2,71 %) v rozmezí od -19,37 do -54,77 ng/ml (-1,05 do -4,37 %). Porovnání všech získaných a dostupných parametrů srovnávaných metod je uvedeno v tabulce č. 29. Pracovní rozsah metody CLIA dosahuje do hodnoty 1500,0 ng/ml, což u metody IMT je pouze do hodnoty 455,0 ng/ml. Metoda CLIA má také nižší mez stanovitelnosti než metoda IMT. Nízké hodnoty feritinu kolem meze stanovitelnosti však v klinické diagnostice onkologických pacientů nemají takový význam jako vysoké, a proto srovnání tohoto parametru nemá velkou váhu při výběru metody. Naopak ředění vysokých hodnot feritinu patří mezi důležitý parametr při výběru metody. Metoda CLIA

umožňuje ředit vysoké hodnoty do 150 000 ng/ml, přičemž IMT metoda pouze do 4500 ng/ml. Hodnota 4500 ng/ml je pro diagnostiku onkologického pacienta dostačující, avšak metoda IMT poskytuje při vysokých hodnotách vysokou chybu ředění a proto ji pro měření vysokých hodnot nelze doporučit. Hodnoty variačních koeficientů opakovatelnosti a mezilehlé preciznosti vycházejí lépe pro metodu IMT. Interference u srovnávaných metod CLIA a IMT jsou dostatečné v obou případech. Rozhodujícím parametrem pro výběr metody je doba stanovení. Doba stanovení CLIA metody je 35 minut, což je přibližně trojnásobek doby stanovení IMT metody. Při stanovení feritinu u onkologických pacientů se hodnoty tohoto analytu běžně pohybují kolem 1000 ng/ml, což při měření IMT by vyžadovalo ředění vzorku a tedy i doba analýzy by se dvojnásobně prodloužila. Cena stanovení metodou CLIA je 245,- Kč, což je dvojnásobek oproti metodě IMT. Metoda CLIA se vyznačuje menší potřebou objemu vzorku pro analýzu, než metoda IMT. Vyžadované objemy vzorků pro analýzu 10 µl a 25 µl jsou však nízké u obou metod. Vzhledem k narůstajícím nárokům na kvalitu vyšetření patří zastoupení CLIA metody v Systému externí kontroly kvality pořádanou firmou SEKK k jejím velkým výhodám. Z uvedeného srovnání všech testovaných parametrů byla pro používání doporučena nově zavedená metoda CLIA, zejména díky většímu pracovnímu rozsahu a lepší automatizaci stanovení.

Tabulka č. 29: Porovnání metod CLIA a IMT pro stanovení feritinu

Analytické parametry	CLIA (Immulite 2000 XPi)	IMT (Advia 1800)
Pracovní rozsah	1,5 – 1500,0 ng/ml	6,0 – 455,0 ng/ml
Mez stanovitelnosti	1,5 ng/ml	6,0 ng/ml
Ředění (vysoké hodnoty)	dosah do 1500 ng/ml, dále 150 000 ng/ml chyba ředění je 1,8 % až 9,9 %	dosah do 455,0 ng/ml, dále 4500 ng/ml chyba ředění je -6 % až -24 %
Opakovatelnost	průměr CV 4,6 %	průměr CV 2,2 %
Mezilehlá preciznost	průměr CV 2,7 %	průměr CV 2,6 %
Interference	ikterita 60 mg/dl lipémie 1000 mg/dl hemolýza 1000 mg/dl	ikterita 20 mg/ml lipémie 5000 mg/dl hemolýza 30 µl/ml
Doba stanovení	35 minut	10 minut
Cena stanovení	245,- Kč	113,- Kč
Provozní obsluha	snadnější	náročnější
Objem vzorku	10 µl	25 µl
Zastoupení v SEKK	Ano	Ne

4.2 Porovnání metod v Systému externí kontroly kvality (SEKK)

V teoretické části byl proveden základní přehled možných metod stanovení tumorových markerů. V této části práce byly porovnány soupravy od různých výrobců reagensů, které se pravidelně zúčastňují mezilaboratorního srovnávání v Systému externí kontroly kvality (SEKK). Český zástupce EHK SEKK spolupracuje s německou společností pro hodnocení externí kontroly kvality Referenzinstitut für bioanalytik. Vzhledem k velkému počtu stanovovaných tumor markerů, ke srovnání metod byl vybrán nejdříve objevený nádorový marker karcinoembryonální antigen (CEA). Metody účastníků se SEKK budou nejdříve porovnány pomocí svých analytických parametrů uváděné výrobcem. Na závěr práce proběhne diskuze výsledků kontrolních vzorků ze SEKK v závislosti na metodě stanovení. Diskuze se také bude týkat vlivu rozdílných výsledků nádorových markerů na klinické využití. Každá akreditovaná biochemická laboratoř je povinna se účastnit externího hodnocení kvality (EHK). Stanovení CEA se obecně řadí do skupiny heterogenní (nekompetitivní) imunoanalýzy.

4.2.1 Analytické parametry pro metody účastníků se v SEKK

U každé metody stanovení CEA, která se zúčastnila kontrolního cyklu TM4/13, byly porovnány základní analytické parametry jako mez stanovitelnosti a pracovní rozsah. Důležitými provozními parametry jsou objem vzorku potřebný pro reakci, doba a cena stanovení. Cena stanovení je jedním z nejdůležitějších parametrů v dnešní době. Cenu stanovení se však nepodařilo získat od všech výrobců, a proto není ve srovnání uvedena. Cena stanovení ve srovnání tedy nebyla uvažována, v praxi však má zásadní vliv při výběru metody stanovení. Pro podrobnější srovnání je třeba uvést další parametry, např. interference, hodnoty opakovatelnosti a mezilehlé preciznosti, výtěžnosti atd.

Tabulka č. 30: Porovnání metod dle firemních dokumentací výrobců

	Mez stanovitelnosti [ng/ml]	Pracovní rozsah [ng/ml]	Objem vzorku [μl]	Doba stanovení [min]	Efekt nadbytku antigenu [ng/ml]
LIA, ILMA (Beckman Coulter)	0,10	1000	10	15	100 000
LIA, ILMA (Roche)	0,20	1000	10	18	200 000
LIA, ILMA (Siemens DPC)	0,15	550	15	60	250 000
LIA, ILMA (Johnson Johnson)	0,31	400	20	38	180 000
LIA, ILMA (Abbott)	0,50	500	60	29	60 000
LIA, ILMA (Siemens Bayer)	0,50	100	50	18	100 000
FPIA, MEIA (Abbott)	0,50	500	150	18	70 000
FPIA, MEIA (B. R. A. H. M. S)	0,20	160	70	39	100 000
FPIA, MEIA (TOSOH)	0,50	100	100	18	20 000
IRMA (Imunotech)	0,38	325	30	121	10 000

4.2.2 Výsledky ze Systému externí kontroly kvality (SEKK)

Srovnatelnost výsledků účastníků jednotlivých kontrolních cyklů je hodnocena ve stejnorodých skupinách uspořádaných podle principu měření a výrobce metody. Toto posouzení je zřejmě nejobjektivnějším způsobem zhodnocení relativní správnosti výsledků. První podmínkou hodnocení srovnatelnosti je zařazení výsledků účastníka do některé konkrétní stejnorodé skupiny a druhou podmínkou je, aby počet výsledků v takové skupině byl alespoň 5. Při nesplnění těchto podmínek nelze výsledky hodnotit a jsou zařazeny v nehodnocené skupině Ostatní. Pro stanovení CEA je dle pravidel vytvořeno 10 skupin z toho je 1 RIA (IRMA), 3 skupiny FPIA (MEIA) a zbylých 6 skupin je zařazeno do LIA (ILMA). V tabulce č. 31 a jsou zobrazeny výsledky z kontrolního cyklu TM4/13 pro vzorek A a B [68]. V tabulce jsou zvýrazněny metody, které dosáhly nejvyšší a nejnižší průměrné hodnoty v daném cyklu TM4/13.

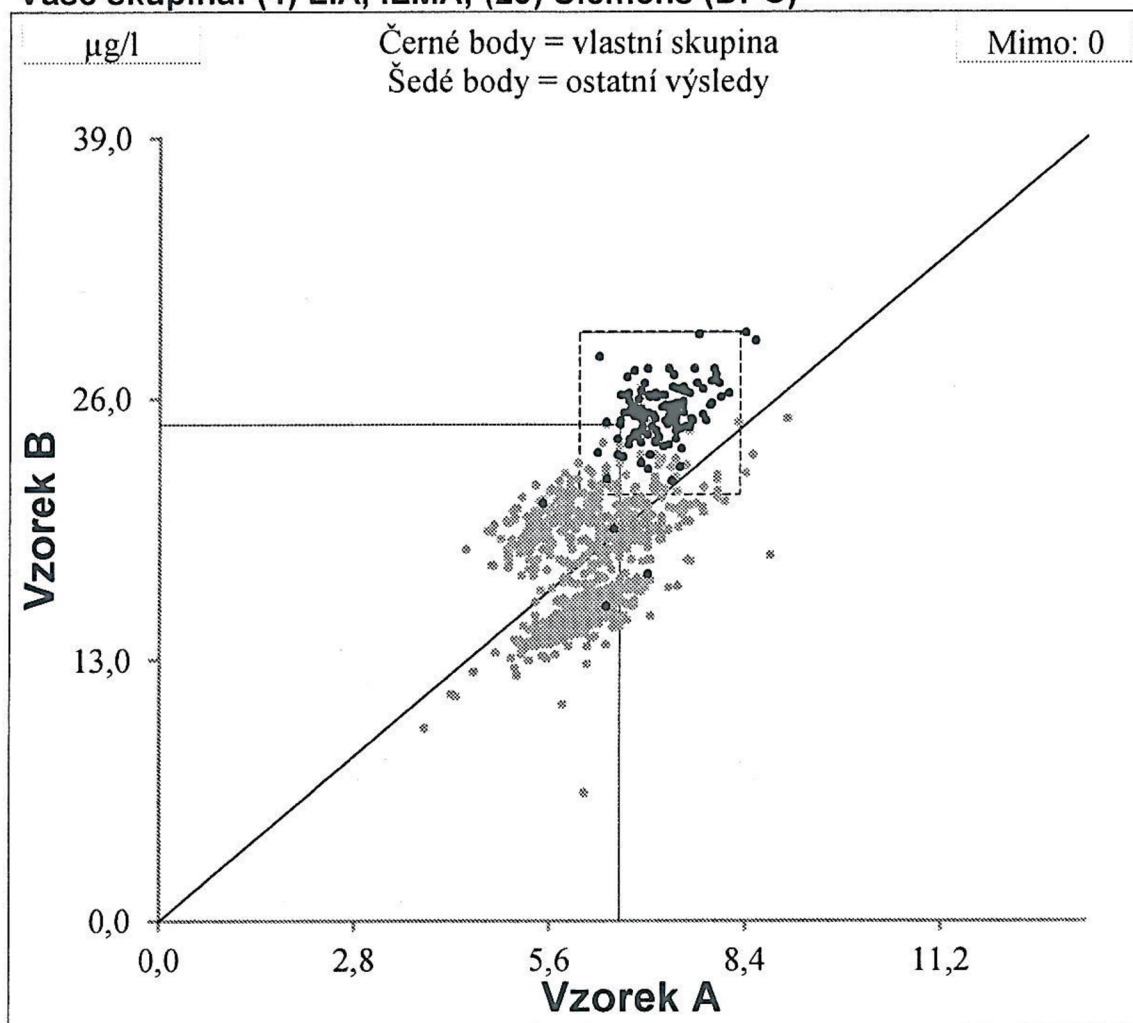
Tabulka č. 31: Výsledky ze Systému externí kontroly kvality z cyklu TM4/13 – Tumorové markery [68]

Vzorek A	CVP	LL	UL	n	RoM	SD	CV%
Všechny výsledky	6,28	5,28	7,29	933	6,28	0,693	11,00
RIA, IRMA (Immunotech)	5,49	4,61	6,37	9	5,49	0,178	3,24
FPIA, MEIA (Abbott)	6,19	5,20	7,18	14	6,19	0,514	8,30
FPIA, MEIA (B.R.A.H.M.S)	6,24	5,24	7,24	6	6,24	0,074	1,19
FPIA, MEIA (TOSOH)	7,66	6,43	8,89	12	7,66	0,557	7,27
LIA, ILMA (Abbott)	6,68	5,61	7,75	125	6,68	0,420	6,28
LIA, ILMA (Beckman Coulter)	6,51	5,47	7,55	73	6,51	0,575	8,82
LIA, ILMA (Siemens DPC)	7,17	6,02	8,32	119	7,17	0,453	6,31
LIA, ILMA (Johnson& Johnson)	7,33	6,16	8,50	7	7,33	0,993	13,60
LIA, ILMA (Roche)	6,06	5,09	7,03	382	6,06	0,385	6,36
LIA, ILMA (Siemens Bayer)	5,50	4,62	6,38	110	5,50	0,383	6,96
Ostatní metody	5,92	4,97	6,87	17	5,92	1,190	20,10
Vzorek B	CVP	LL	UL	n	RoM	SD	CV%
Všechny výsledky	18,5	15,5	21,5	933	18,5	3,780	20,40
RIA, IRMA (Immunotech)	18,8	15,8	21,8	9	18,8	0,897	4,77
FPIA, MEIA (Abbott)	18,3	15,4	21,2	14	18,3	1,620	8,88
FPIA, MEIA (B.R.A.H.M.S)	20,7	17,4	24,0	6	20,7	0,222	1,08
FPIA, MEIA (TOSOH)	20,6	17,3	23,9	12	20,6	1,360	6,59
LIA, ILMA (Abbott)	19,2	16,1	22,3	125	19,2	0,973	5,06
LIA, ILMA (Beckman Coulter)	20,4	17,1	23,7	73	20,4	1,720	8,47
LIA, ILMA (Siemens DPC)	25,3	21,3	29,4	119	25,3	1,400	5,55
LIA, ILMA (Johnson& Johnson)	20,5	17,2	23,8	7	20,5	2,300	11,20
LIA, ILMA (Roche)	15,3	12,9	17,8	382	15,3	0,927	6,07
LIA, ILMA (Siemens Bayer)	19,7	16,5	22,9	110	19,7	1,140	5,77
Ostatní metody	18,3	15,4	21,2	17	18,3	4,500	24,60

Do skupiny LIA, ILMA (Siemens DPC) patří i naše laboratoř s analyzátořem Siemens Immulite 2000 XPi. Youdenův graf (Obr. č. 63) zobrazuje výsledek naší laboratoře v kontrolním cyklu TM4/13 pro analyt CEA. Na ose x je vždy nanesena hodnota vzorku A a na ose y je vždy nanesena hodnota vzorku B [68].

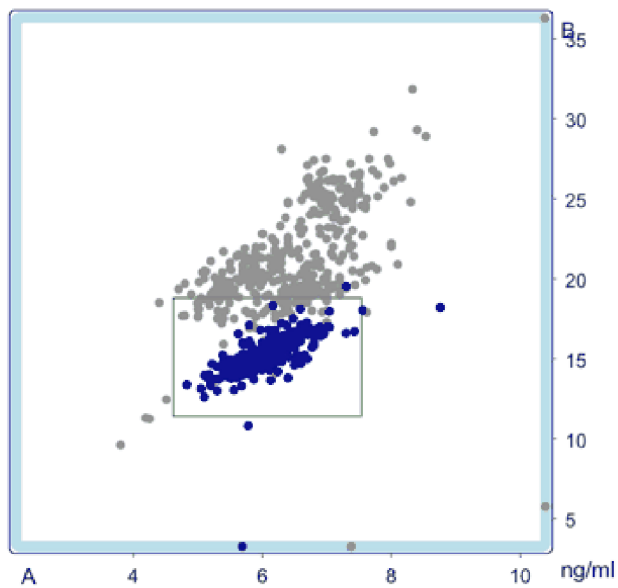
Vaše výsledky [$\mu\text{g/l}$]: A = 6,6 B = 24,7

Vaše skupina: (4) LIA, ILMA; (29) Siemens (DPC)

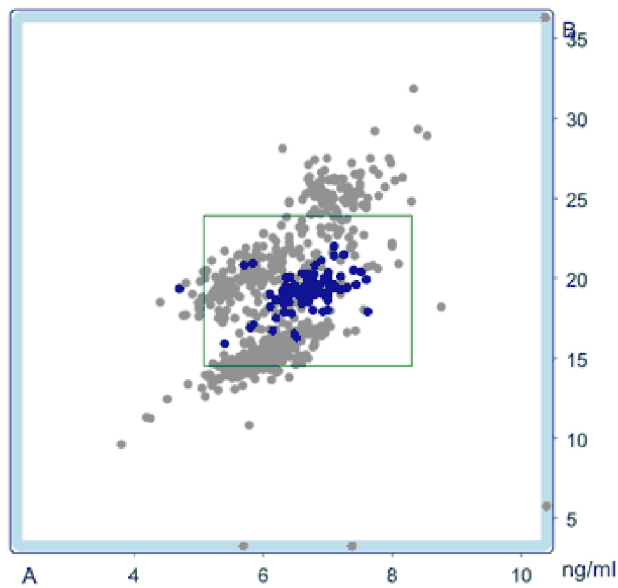


Obr. č. 63: Youdenův graf naší laboratoře v cyklu TM4/13 pro analyt CEA

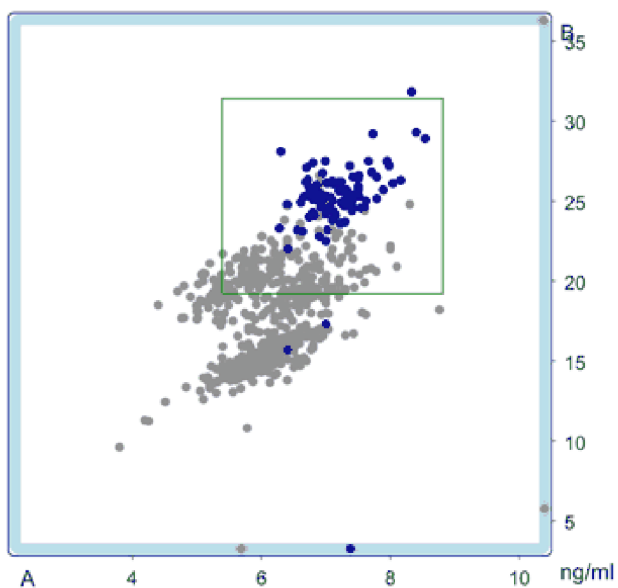
Pro lepší ilustraci rozdílů mezi jednotlivými metodami a výrobci jsou zde uvedeny 4 nejpoužívanější metody v ČR v grafické podobě (Obr. č. 64 - 67). Nejpoužívanější metodou pro stanovení CEA je LIA, ILMA (Roche), která je zobrazena na obr. č. 64. Druhou nejpoužívanější metodou je skupina LIA, ILMA (Abbott) na obr. č. 65. Třetí a čtvrtou příčku obsadila společnost Siemens se skupinami LIA, ILMA (Siemens DPC) Obr. č. 66 a LIA, ILMA (Siemens Bayer) Obr. č. 67. Na uvedených Youdenových grafech lze pozorovat značnou rozdílnost výsledků pro analyt CEA.



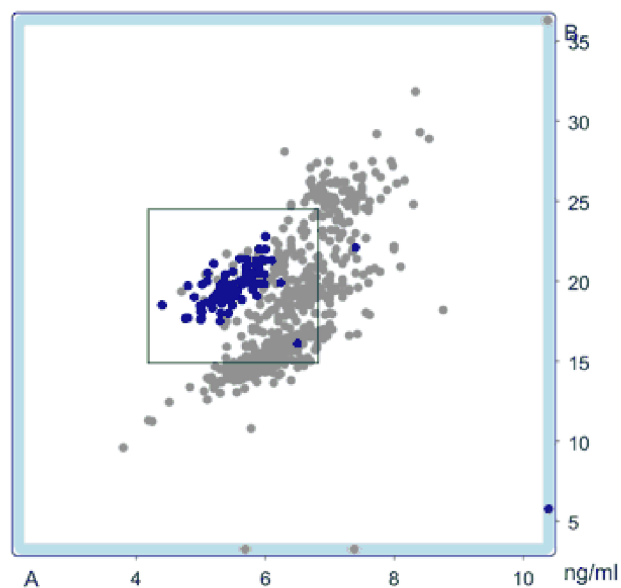
Obr. č. 64: LIA, ILMA (Roche) [69]



Obr. č. 65: LIA, ILMA (Abbott) [69]



Obr. č. 66: LIA, ILMA (Siemens DPC) [69]



Obr. č. 67: LIA, ILMA (Siemens Bayer) [69]

4.2.3 Diskuze výsledků ze Systému externí kontroly kvality

Z porovnání základních analytických parametrů uvedené ve firemní dokumentaci lze konstatovat, že k nejvýkonnějším metodám pro stanovení vybraného tumor markeru CEA na našem trhu patří soupravy od výrobce Beckman Coulter a Roche. Z výsledků pro kontrolní cyklus TM4/13 z Systému externí kontroly kvality vyplývají následující závěry. Vzorku A byl vypočítán průměr 6,28 ng/ml napříč všemi použitými metodami. Nejnižších hodnot u vzorku A dosahovala metoda RIA, IRMA (Immunotech) s průměrem 5,49 ng/ml. Naopak nejvyšších hodnot u vzorku A dosahovala metoda FPIA, MEIA (TOSOH) s průměrem 7,66 ng/ml. Vzorku B byl vypočítán průměr 18,50 ng/ml napříč všemi použitými metodami. Nejnižších hodnot u vzorku B dosahovala nejrozšířenější metoda LIA, ILMA (Roche) s průměrem 15,30 ng/ml. Naopak nejvyšších hodnot u vzorku B dosahovala námi používaná metoda LIA, ILMA (Siemens DPC) s průměrem 25,30 ng/ml. Rozdíly mezi výsledky měření kontrolních vzorků tumorových markerů získaných na různých měřících systémech mohou být způsobeny vlastnostmi užívaných vzorků v kontrolním cyklu, které jsou upravovány přísadami různých substancí (pacientské vzorky s vysokou koncentrací nádorového markeru, extrakt nádoru, atd.), tak, aby bylo dosaženo vyšších nebo patologických hodnot. Tyto obohacené analyty (kontrolní vzorky) mohou mít odlišnou analytickou odezvu na rozdíl od měření skutečného lidského vzorku bez přidávaných látek a lze tedy také uvažovat odlišnou diferenciaci mezi hodnotami při měření patientských a kontrolních vzorků od různých metod stanovení. Diferenci mezi výslednými hodnotami od odlišných metod může také způsobovat rozdílné technické provedení dané metody od výrobců in vitro diagnostik, použití různě specifických protilátek proti stanovovaným analytům a v neposlední řadě také navázání metod na odlišné primární standardy.

4.3 Sledování onkologických pacientů

Poslední část praktické práce je zaměřená na sledování průběhu nádorových onemocnění a efektu léčby u vybraných skupin pacientů pomocí hodnot nádorových markerů. Monitorování onkologických pacientů se provádí nejen pomocí nádorových markerů, ale také pravidelným vyšetřením krevního obrazu (dále jen KO) a základním biochemickým vyšetřením (dále jen BV). Sledování pacientů probíhalo ve spolupráci s klinickou onkologií Třebíč pod vedením MUDr. Jana Šebka. Celkově bylo sledováno přibližně 40 pacientů. Z tohoto souboru pacientů byly sledovány ženy s karcinomy prsu a vaječníků a muži s karcinomy plic, prostaty, jater a slinivky břišní. V práci je uvedeno 7 pacientů, u kterých se podařilo dlouhodobě sledovat hladinu nádorových markerů při léčebné terapii. Hodnoty tumorových markerů byly stanoveny na analyzátoru Siemens Immulite 2000 XPi, hodnoty biochemických vyšetření byly stanoveny na analyzátoru Siemens Advia 1800 a hodnoty krevního obrazu byly stanoveny na analyzátoru Sysmex XT-1800i.

Tabulka č. 32: Referenční hodnoty biochemických hodnot naší laboratoře

Vyšetření (jednotky)	Referenční rozmezí
urea (mmol/l)	2,5 - 8,3
kreatinin (μmol/l)	53 - 100
kyselina močová (μmol/l)	202 - 414
bilirubin celkový (μmol/l)	do 20,5
ALT (μkat/l)	do 0,8
AST (μkat/l)	do 0,7
GGT (μkat/l)	0,18 – 0,84

Tabulka č. 33: Referenční hodnoty nádorových markerů naší laboratoře

Vyšetření (jednotky)	Referenční rozmezí
CEA (ng/ml)	do 5
CA 19-9 (U/ml)	do 60
CA 125 (U/ml)	do 21
CA 15-3 (U/ml)	do 38
PSA (ng/ml)	do 4
free PSA/PSA (%)	15 – 25
HCG (mIU/ml)	muži do 1 ženy do 5
free-beta HCG (ng/ml)	do 2,0
AFP (ng/ml)	do 5
Feritin (ng/ml)	muži 20 – 250 ženy 10 -120
TPA (U/l)	do 70

4.3.1 Sledování pacientů

Pacient č. 1

Pacient: žena, 85 let.

Diagnóza: C 501 Zhoubný novotvar prsu (střední část prsu)

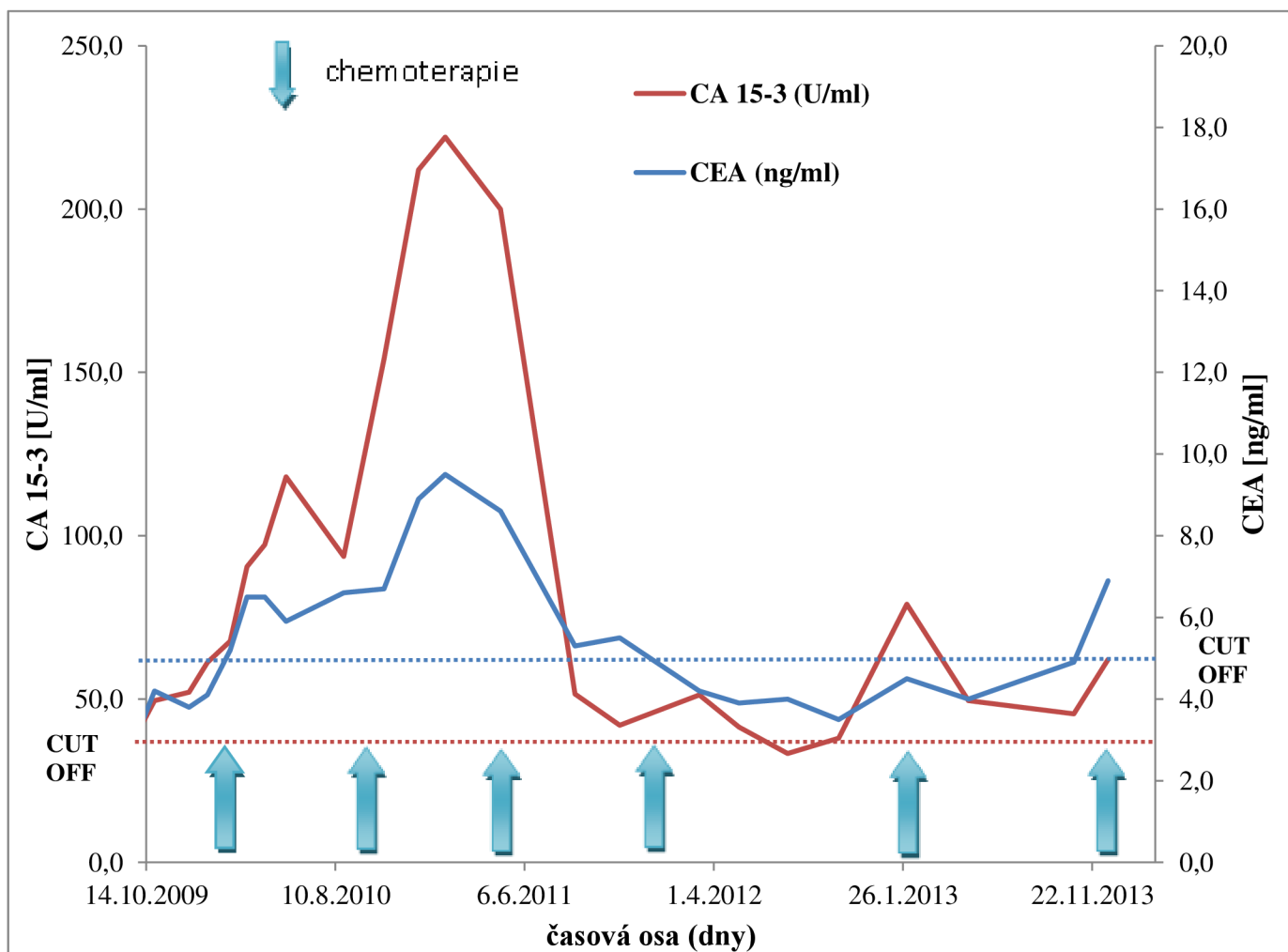
Typ nádoru: tubulární karcinom s přilehlou exulcerovanou epidermis

Pacientu č. 1 byl v roce 2006 diagnostikován tubulární karcinom s přilehlou exulcerovanou a tumorosně infiltrovanou epidermis. Po diagnóze zahájení radioterapie s navazující chemoterapií (cyklofosfamid + metotrexát + fluorouracil, navelbin) do roku 2009. Po lokální progresi onemocnění zahájena chemoterapie pomocí docetaxelu. Od roku 2009 pacient monitorován pomocí CA 15-3 (marker první volby) a CEA (doplňkový marker). Hodnoty hlavního markeru CA 15-3 poměrně dobře korelují s doplňkovým markerem CEA při progresi i aplikované léčbě. Marker první volby CA 15-3 se vyznačuje lepší dynamikou při sledování onemocnění. Doplňkový marker CEA spíše potvrzuje tendenci hodnot CA 15-3. U pacienta byl potvrzen dostatečný růst hodnoty CA 15-3 při progresi i při odpovědi na léčbu a splňuje tedy hodnoty dané doporučením. Dynamika doplňkového markeru CEA byla nižší. U pacienta se neprojevila hepatotoxicita na podávaná cytostatika.

Monitorování léčby:

- **leden 2009 – zahájena chemoterapie v kombinaci Gemcitabin a Bonefos**
- *únor 2009:* hodnoty BV a KO: vše v normě.
- *květen 2009:* hodnoty BV: zvýšená hodnota CA 15-3 (63,2 U/ml), CEA v normě.
- **únor 2010 - chemoterapie v kombinaci Gemcitabin + karboplatina + Bonefos**
- *únor 2010:* hodnoty BV: zvýšené hodnoty CA 15-3 (67,7 U/ml) a CEA (5,2 ng/ml).
- **září 2010 - chemoterapie v kombinaci Citegin + karboplatina**
- *říjen 2010:* hodnoty BV: vysoká hodnota CA 15-3 (154,0 U/ml) a zvýšená hodnota CEA (6,7 ng/ml).
- *leden 2011:* hodnoty BV: vysoká hodnota CA 15-3 (222,0 U/ml) a zvýšená hodnota CEA (9,5 ng/ml), dále snížená hodnota vápníku (1,83 mmol/l) a zvýšená hodnota kreatininu (106 µmol/l), hodnoty KO: snížená hodnota leukocytů ($3,1 \cdot 10^9/l$), erytrocytů $3,78 \cdot 10^{12}/l$ a hemoglobinu 112 g/l).
- **prosinec 2011 - chemoterapie v kombinaci Citegin, karboplatina a Metotrexát**
- *březen 2011:* hodnoty BV: zvýšené hodnoty CA 15-3 (51,3 U/ml) kreatininu (101 µmol/l), ostatní v normě, hodnoty KO: snížená hodnota erytrocytů $3,19 \cdot 10^{12}/l$ a hemoglobinu 102 g/l.
- **únor 2013 - chemoterapie v kombinaci docetaxel a endoxan – intolerance**
- *únor 2013:* hodnoty BV: zvýšené hodnoty CA 15-3 (79,0 U/ml) a urey (9,35 mmol/l), ostatní v normě.
- **březen 2013 – chemoterapie v kombinaci endoxan a fluorouracil (5-FU)**

- *květen 2013*: hodnoty BV: zvýšené hodnoty CA 15-3 (49,5 U/ml) a urey (11,72 mmol/l) a kreatininu (110 $\mu\text{mol/l}$), ostatní v normě, hodnoty KO: snížená hodnota erytrocytů $3,52 \cdot 10^{12}/\text{l}$ a hemoglobinu 109 g/l.
- *prosinec 2013*: hodnoty BV: zvýšené hodnoty CA 15-3 (62,1 U/ml), urey (10,71 mmol/l), kreatininu (105 $\mu\text{mol/l}$), hraniční CEA (5,0 ng/ml), hodnoty KO: snížená hodnota erytrocytů $3,76 \cdot 10^{12}/\text{l}$ a hemoglobinu 112 g/l.



Obr. č. 68: Sledování nádorových markerů u pacienta č. 1

Pacient č. 2

Pacient: žena, 76 let

Diagnóza: C 509 Zhoubný novotvar prsu (zhoubný nádor prsu, nespecifický)

C 56 Zhoubný novotvar vaječníku

Typ nádoru: prs – infiltrovaný lobulární karcinom

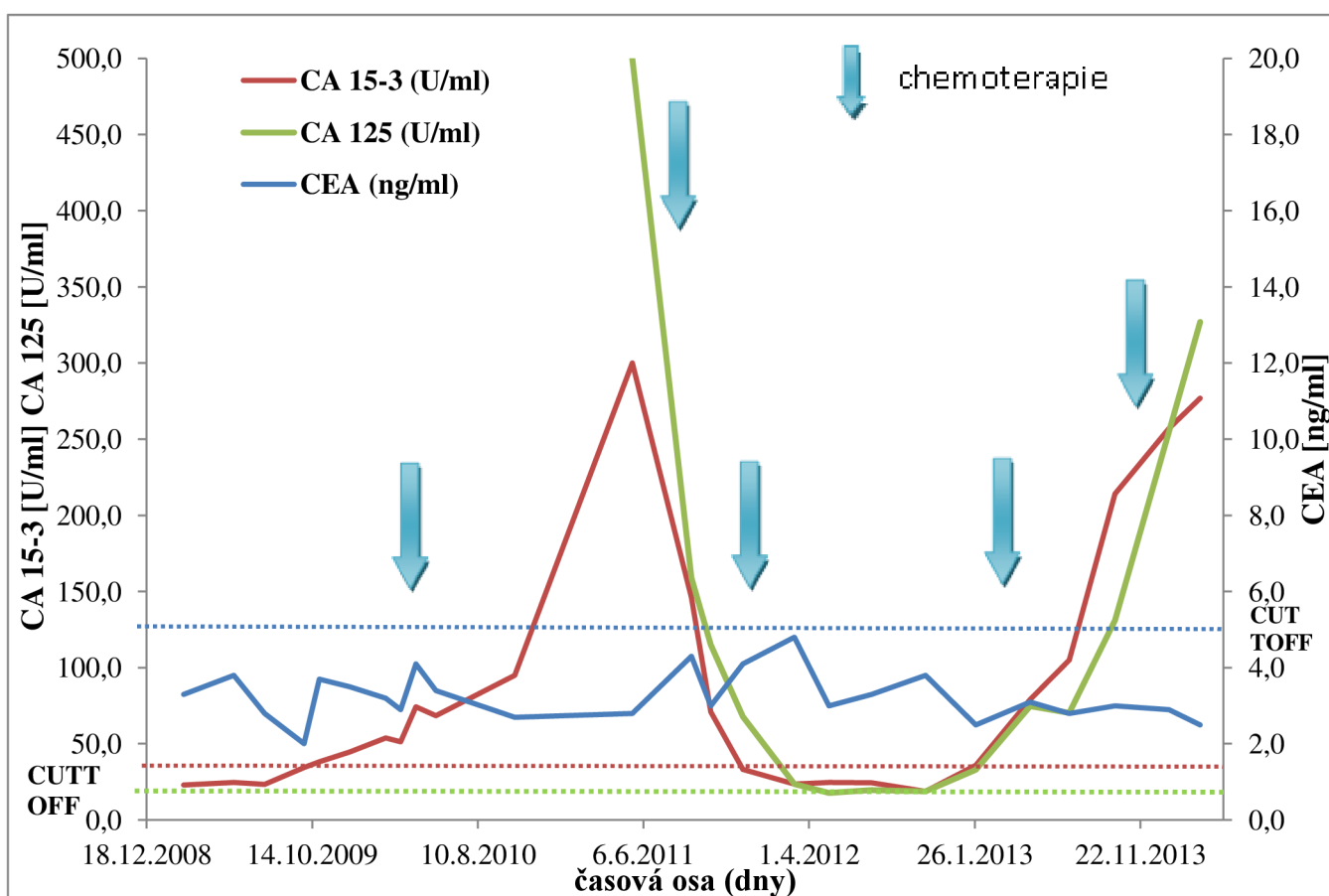
Pacientu č. 2 byl v roce 2002 diagnostikován infiltrovaný lobulární karcinom prsu a později karcinom vaječníků. V roce 2008 nastala progresí onemocnění (vysoké hodnoty CA 125, CA 19-9, CA 15-3), zahájení paliativní chemoterapie v kombinaci Docetaxel + Cyklofosfamid. Od roku 2009 pacient monitorován pomocí CA 15-3 (marker první volby) a CEA (doplňkový marker) a od roku 2011 sledování karcinomu vaječníku pomocí CA 125 (marker první volby). V tomto případě hladina CEA vůbec nekoreluje s hodnotami hlavního markeru CA 15-3, jak při progresi onemocnění, tak i při léčebné terapii. Doporučený doplňkový marker CEA, jehož hladina nepřekročila hodnotu cut - off se stává při sledování onemocnění málo specifickým a neúčinným nástrojem diagnostiky. Při progresi i aplikované léčbě však reaguje s velkou dynamikou marker první volby CA 15-3. Při progresi onemocnění je nárůst hladiny CA 15-3 o 210 % a při efektu terapie je pokles hodnoty rovný přibližně 90 %. S dynamikou poklesu a růstu CA 15-3 velmi dobře koreluje marker CA 125 určený jako marker první volby pro karcinomy vaječníků. Při progresi a při efektu terapie se CA 125 vyznačuje vysokou dynamikou se zvýšením a snížením v řádu stovek % a je tedy dobrým ukazatelem pro sledování onkologického pacienta s karcinomem vaječníků. U pacienta se projevila mírná hepatotoxicita na cytostatika v kombinaci paclitaxel + doxorubicin + cyklofosfamid.

Monitorování léčby:

- **říjen 2009 - chemoterapie v kombinaci hycamtin + bonefos + topotecan**
- *únor 2010:* hodnoty BV: zvýšená hodnota CA 15-3(53,8 U/ml) a CEA v normě.
- *duben 2010:* hodnoty BV: zvýšená hodnota CA 15-3(74,3 U/ml) a CEA v normě.
- **duben 2010 - chemoterapie paclitaxel**
- *květen 2010:* hodnoty BV: zvýšená hodnota CA 15-3(68,4 U/ml) a CEA v normě.
- *říjen 2010:* hodnoty BV: zvýšená hodnota CA 15-3(95,0 U/ml) a CEA v normě.
- **prosinec 2010 – pacient se nedostavil na testy a odmítl léčbu**
- *květen 2011:* hodnoty BV: vysoké hodnoty CA 15-3 (>300 U/ml) a CA 125 (> 500 U/ml), CEA v normě, hodnoty KO v normě.
- **červen 2011 – histologické vyšetření – generalizace onemocnění, vysoká proliferační aktivita, metastáze do kostí a do sleziny**
- **červenec 2011 - chemoterapie paclitaxel - intolerance – progresí onemocnění**
- *červenec 2011:* hodnoty KO: nízká hodnota leukocytů $0,7 \cdot 10^9/l$.
- **srpen 2011 - chemoterapie v kombinaci paclitaxel + doxorubicin + cyklofosfamid**
- *srpen 2011:* hodnoty BV: zvýšené jaterní testy v závislosti na chemoterapii: bilirubin celkový (25,1 $\mu\text{mol/l}$), AST (0,99 $\mu\text{mol/l}$), GGT (4,03 $\mu\text{mol/l}$).
- *září 2011 :* hodnoty BV: vysoké hodnoty CA 15-3 (146,0 U/ml) a CA 125 (159 U/ml),

CEA v normě, hodnoty KO v normě.

- říjen 2011 : hodnoty BV: zvýšené hodnoty CA 15-3 (70,9 U/ml) a CA 125 (114,9 U/ml), CEA v normě, hodnoty KO v normě.
- prosinec 2011: hodnoty BV: zvýšené hodnoty CA 125 (67,8 U/ml), CEA a CA 15-3 v normě, hodnoty KO v normě.
- leden 2012 - chemoterapie v kombinaci paclitaxel + karboplatina
- březen 2012: hodnoty BV: vše v normě.
- leden 2013: hodnoty BV: zvýšená hodnota CA 125 (33,0 U/ml), CEA a CA 15-3 (36,0 U/ml) v normě, hodnoty KO v normě.
- březen 2013 – změna chemoterapie v kombinaci paclitaxel + cyklofosfamid
- květen 2013: hodnoty BV: zvýšené hodnoty CA 15-3 (79,2 U/ml) a CA 125 (74,8 U/ml), CEA v normě. hodnoty KO v normě.
- říjen 2013: hodnoty BV: vysoké hodnoty CA 15-3 (214,0 U/ml) a CA 125 (131,0 U/ml), CEA v normě. hodnoty KO v normě.
- listopad 2013 - chemoterapie v kombinaci endoxan + fluorouracil (5-FU)
- leden 2013: hodnoty BV: vysoké hodnoty CA 15-3 (257,0 U/ml) a CA 125 (255,0 U/ml), CEA v normě. hodnoty KO v normě.
- březen 2013: hodnoty BV: vysoké hodnoty CA 15-3 (277,0 U/ml) a CA 125 (327,0 U/ml), CEA v normě, hodnoty KO v normě.



Obr. č. 69: Sledování nádorových markerů u pacienta č. 2

Pacient č. 3

Pacient: žena, 47 let, nekuřačka

Diagnóza: C 56 Zhoubný novotvar vaječníku

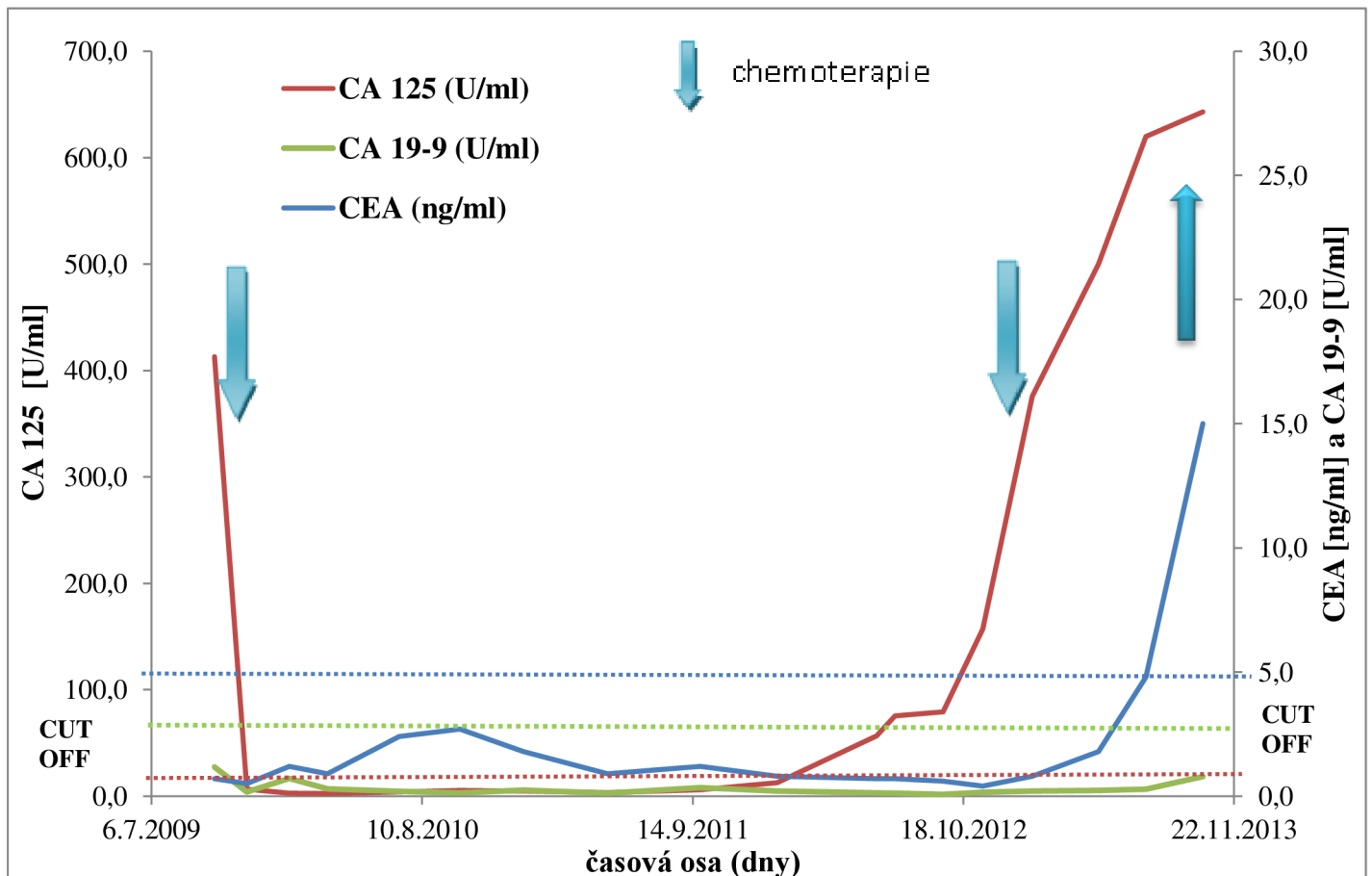
Typ nádoru: infiltrativní ovariální karcinom

Pacientu č. 3 byl v roce 2009 diagnostikován infiltrativní solidní karcinom v celém rozsahu postihující obě ovária. Zahájení adjuvantní chemoterapie v kombinaci paclitaxel + karboplatina a endoxan. Pacient monitorován od roku 2009 pomocí CA 125 (marker první volby), CEA a CA 19-9 (pro mucinózní karcinom je marker první volby). Při progresi i aplikované léčbě reaguje s velkou dynamikou marker první volby CA 125. Nárůst a pokles hladiny CA 125 při progresi onemocnění a efektu terapie je v řádu stovek procent. V tomto případě hodnoty markeru CEA nereagují dostatečně rychle na léčbu a vyznačují se pozdějším nástupem na rozdíl od markeru CA 125. Proto marker CEA není doporučován jako doplňkový marker pro karcinomy ovárií. Pomocný marker CA 19-9 vykazuje negativní hodnoty pod hranicí cut - off po celou dobu sledování onemocnění. U pacienta se projevila mírná hepatotoxicita na cytostatika v kombinaci paclitaxel + karboplatina.

Monitorování léčby:

- **listopad 2009 - chemoterapie v kombinaci paclitaxel + karboplatina + endoxan**
- *říjen 2009:* hodnoty BV: vysoké hodnoty CA 125 (413,0 U/ml), CEA a CA 19-9 v normě.
- *listopad 2009:* hodnoty BV: CA 15-3, CA 125, CEA v normě.
- *červen 2012:* hodnoty BV: zvýšená hodnota CA 125 (56,5 U/ml), CEA a CA 19-9 v normě, jaterní testy v normě. hodnoty KO v normě.
- *listopad 2012:* hodnoty BV: vysoká hodnota CA 125 (157,0 U/ml), zvýšená hodnota CRP (14,7 mg/l) a glukózy (6,81 mmol/l), CEA, CA 19-9, minerály, jaterní testy v normě.
- **leden 2013 - chemoterapie v kombinaci paclitaxel + karboplatina – lokální recidiva (nelze operovat)**
- *leden 2013:* hodnoty BV: vysoké hodnoty CA 125 (375,0 U/ml), ostatní v normě. hodnoty KO: zvýšená hodnota leukocytů ($12,8 \cdot 10^9/l$), ostatní v normě.
- *květen 2013:* hodnoty BV: vysoké hodnoty CA 125 ($>500 \text{ U/ml}$), zvýšené hodnoty GGT (0,86 $\mu\text{kat/l}$), ostatní v normě, hodnoty KO: zvýšená hodnota leukocytů ($14,2 \cdot 10^9/l$), ostatní hodnoty v normě.
- *červenec 2013:* hodnoty BV: vysoké hodnoty CA 125 ($>500 \text{ U/ml}$), zvýšené hodnoty GGT (2,40 $\mu\text{kat/l}$), ostatní v normě, hodnoty KO: zvýšená hodnota leukocytů ($14,5 \cdot 10^9/l$), vysoká hodnota trombocytů ($631 \cdot 10^9/l$), snížená hodnota hemoglobinu (116 g/l), ostatní hodnoty v normě.
- *říjen 2013:* hodnoty BV: vysoké hodnoty CA 125 ($>500 \text{ U/ml}$), zvýšené hodnoty CEA (15,0 ng/ml), GGT (4,73 $\mu\text{kat/l}$), AST (1,02 $\mu\text{kat/l}$), ostatní v normě. hodnoty KO: vysoká hodnota leukocytů ($19,5 \cdot 10^9/l$), vysoká hodnota trombocytů ($482 \cdot 10^9/l$), snížená hodnota hemoglobinu (101g/l) a erytrocytů ($3,34 \cdot 10^{12}/l$).

- říjen 2013 - vyšetření CT břicha a malé pánve: infiltrace v malé pánvi vlevo, infiltrace střeva a břišní stěny, metastatická ložiska v břišní stěně, metastatický rozsev jater
- listopad 2013 - chemoterapie v kombinaci paclitaxel + karboplatina – progrese
- listopad 2013: hodnoty KO: nízké hodnoty erytrocytů ($2,85 \cdot 10^{12}/l$), trombocytů ($68 \cdot 10^9/l$) a hemoglobinu (91 g/l).
- Pacient převeden na vyšší pracoviště MOU BRNO



Obr. č. 70: Sledování nádorových markerů u pacienta č. 3

Pacient č. 4

Pacient: muž, 82 let.

Diagnóza: C 20 Zhoubný novotvar konečníku - recta

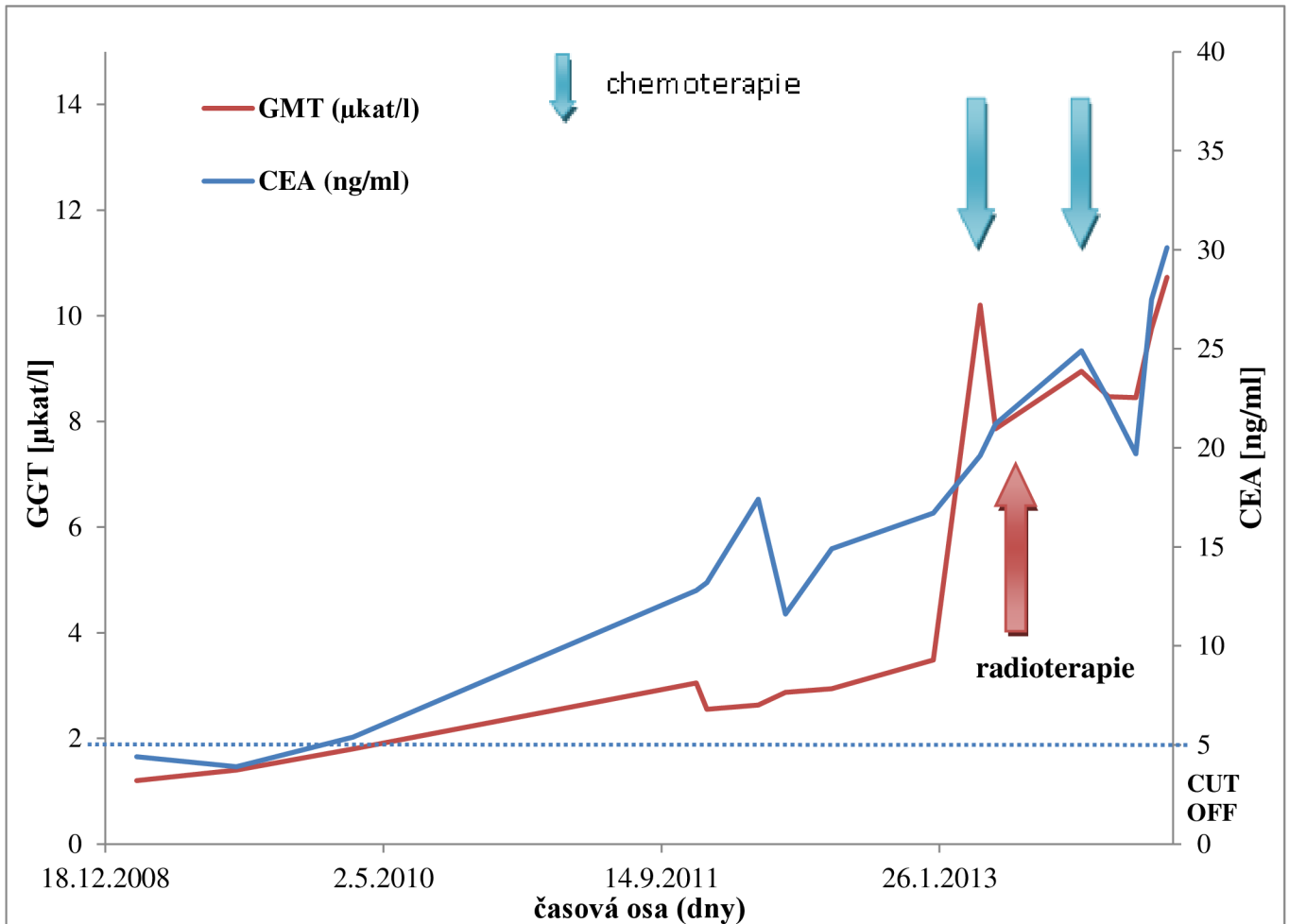
C 341 Zhoubný novotvar průdušky bronchu a plíce - horní lalok

Pacientu č. 4 byl v roce 2008 diagnostikován pomocí biopsie parciálně nekrotický adenokarcinom plic. Pacientovi byla ordinována chemoterapie v kombinaci fluouracil + foliniová kyselina kontinuálně s radioterapií. Ve stejném roce pacientovi diagnostikován zhoubný novotvar rekta. Od roku 2009 pacient sledován pomocí markeru CEA, CA 19-9 a dalších biochemických hodnot. Základní markery pro sledování nádorových onemocnění Cyfra 21-1 a NSE zde nejsou ordinovány z ekonomických důvodů. Sledování karcinomu plic a konečníku probíhá pomocí hodnot markerů CEA a CA 19-9. Marker CA 19-9 byl po celou dobu sledování negativní. Sledovaný marker CEA dosahoval poměrně dobré dynamiky zejména při progresi plicního onemocnění. Dobrymi ukazateli mohou být další nespecifické biochemické hodnoty. V grafu je uvedena dynamika změn jaterního vyšetření GGT, které reaguje na hepatotoxicitu použití chemoterapie a poměrně dobře koreluje s hladinou CEA.

Monitorování léčby:

- **duben 2013 – rutinní odběr**
- **duben 2013** hodnoty BV: zvýšená hodnota CEA (19,6 ng/ml), GGT (10,20 μ kat/l), AST (1,10 μ kat/l), Bilirubin celkový (29,0 μ mol/l), CA 19-9 negativní, ostatní v normě. hodnoty KO: snížené hodnoty hemoglobinu (130 g/l), ostatní v normě.
- **duben 2013 - chemoterapie v kombinaci docetaxel + karboplatina – bez efektu**
- **květen 2013** Hodnoty BV: Zvýšená hodnota CEA (21,2 ng/ml), GGT (7,86 μ kat/l), bilirubin celkový (27,6 μ mol/l), CA 19-9 negativní, ostatní v normě, hodnoty KO: snížené hodnoty hemoglobinu (130 g/l), ostatní v normě.
- **červenec 2013 - radioterapie – bez efektu**
- **říjen 2013** hodnoty BV: Zvýšená hodnota CEA (24,9 ng/ml), GGT (8,95 μ kat/l), bilirubin celkový (33,9 μ mol/l), CA 19-9 negativní, hodnoty KO: vše v normě.
- **říjen 2013 - chemoterapie v kombinaci Navelbin + karboplatina – progrese**
- **listopad 2013** hodnoty BV: Zvýšená hodnota CEA (22,4 ng/ml), GGT (8,47 μ kat/l), bilirubin celkový (23,6 μ mol/l), CA 19-9 negativní, ostatní v normě, hodnoty KO: snížené hodnoty hemoglobinu (130 g/l), ostatní v normě.
- **listopad 2013 - chemoterapie v kombinaci Navelbin + karboplatina**
- **prosinec 2013** hodnoty KO: Nízká hodnota leukocytů (0,9 $10^9/l$), po týdnu vysoká hodnota leukocytů (12,9 $10^9/l$), snížená hodnota erytrocytů (3,54 $10^{12}/l$) a hemoglobinu (107 g/l).
- **prosinec 2013 - chemoterapie v kombinaci navelbin + karboplatina**
- **leden 2014:** hodnoty BV: zvýšená hodnota CEA (19,7 ng/ml), GGT (8,45 μ kat/l), bilirubin celkový (20,9 μ mol/l), CA 19-9 negativní, ostatní v normě.

- leden 2014: hodnoty KO: leukocyty v normě, snížená hodnota erytrocytů ($3,37 \cdot 10^{12}/l$) a hemoglobinu (100 g/l).
- únor 2014: hodnoty BV: zvýšená hodnota CEA (27,5 ng/ml), GGT (9,76 μ kat/l), Bilirubin celkový (22,2 μ mol/l), CA 19-9 negativní, ostatní v normě.
- březen 2014: hodnoty BV: zvýšená hodnota CEA (30,1 ng/ml), GGT (10,73 μ kat/l), CA 19-9 negativní, ostatní v normě.



Obr. č. 71: Sledování nádorových markerů u pacienta č. 4

Pacient č. 5

Pacient: muž, 76 let

Diagnóza: C61 Zhoubný novotvar předstojné žlázy – prostaty

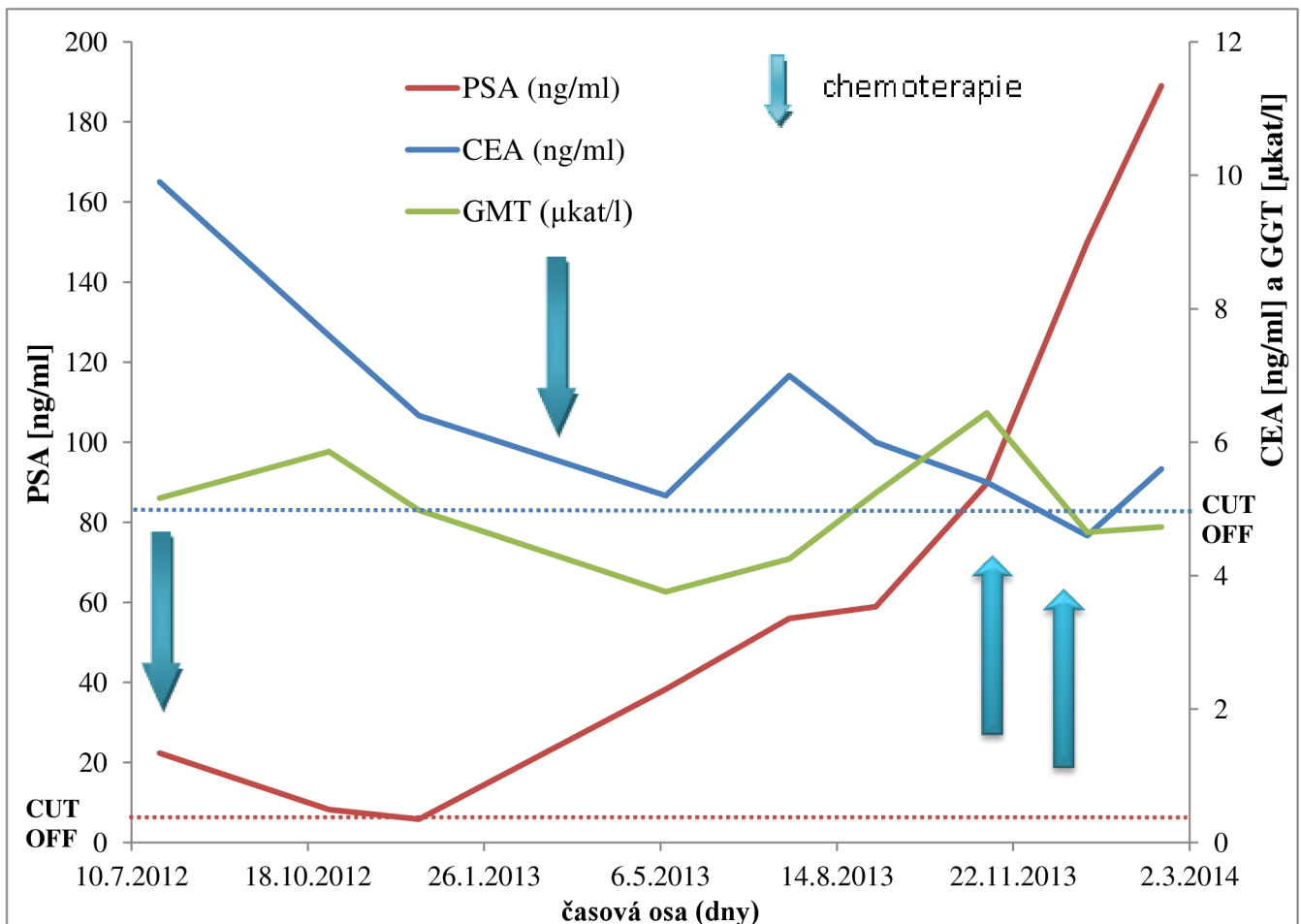
C67 Zhoubný novotvar močového měchýře – vesicae urinariae

Pacientu č. 5 byl v roce 2009 diagnostikován dobře diferencovaný adenokarcinom prostaty. Pacientu byl následně adenokarcinom chirurgicky odstraněn. Po operaci nasazena hormonoterapie Bicalutamidem. Dále pacient sledován pomocí markerů CEA, PSA a dalších biochemických vyšetření. Sledování onemocnění močového měchýře probíhá pomocí doplňkového markeru CEA, naopak sledování onemocnění prostaty probíhá pomocí markeru první volby PSA. Marker CEA má klesající tendenci, která reaguje na efekt léčebné terapie s malou dynamikou a těsně nad hranicí cut - off. Při progresi onemocnění dosahuje hodnota PSA vysoké dynamiky v řádu stovek procent a potvrzuje tedy dobrou specifickou účel. Trvalý nárůst hodnoty PSA však značí neúčinnou léčebnou terapii. U pacienta se také projevila zvýšená hepatotoxicita na cytostatikum docetaxel.

Monitorování léčby:

- *červenec 2012 - rutinní odběr – progrese onemocnění - metastázy do kostí (dle CT a scintigrafie) - nasazena paliativní chemoterapie v kombinaci docetaxel + bisfosfonáty*
- *červenec 2012:* hodnoty BV: zvýšená hodnota PSA (22,30 ng/ml), CEA (9,9 ng/ml) a GGT (5,16 μ kat/l), ostatní v normě, hodnoty KO: vše v normě.
- *srpen 2013:* hodnoty KO: snížená hodnota erytrocytů (3,2 $10^9/l$) a hemoglobinu (101g/l), ostatní v normě.
- *říjen 2012:* hodnoty BV: zvýšená hodnota PSA (8,24 ng/ml), CEA (7,6 ng/ml) a GGT (5,86 μ kat/l), ostatní v normě.
- *prosinec 2012:* hodnoty BV: zvýšená hodnota PSA (5,86 ng/ml), CEA (6,4 ng/ml) a GGT (4,98 μ kat/l), ostatní v normě, hodnoty KO: vše v normě.
- *březen 2013 - rutinní odběr – progrese onemocnění - metastázy – nasazena paliativní chemoterapie v kombinaci docetaxel + bisfosfonáty*
- *květen 2013:* hodnoty BV: zvýšená hodnota PSA (38,30 ng/ml), CEA (5,2 ng/ml) a GGT (3,76 μ kat/l), ostatní v normě. hodnoty KO: snížená hodnota erytrocytů (3,9 $10^9/l$) a hemoglobinu (101 g/l), ostatní v normě.
- *červenec 2013:* hodnoty BV: vysoká hodnota PSA (56,00 ng/ml), zvýšená hodnota CEA (7,0 ng/ml) a GGT (4,25 μ kat/l), ostatní v normě, hodnoty KO: snížená hodnota erytrocytů (3,9 $10^9/l$) a hemoglobinu (108 g/l), ostatní v normě.
- *srpen 2013 - léčba přerušena z důvodů nesouhlasu pacienta*
- *září 2013:* hodnoty BV: vysoká hodnota PSA (58,90 ng/ml), zvýšená hodnota CEA (6,0 ng/ml) a GGT (5,24 μ kat/l), ostatní v normě. hodnoty KO: snížená hodnota hemoglobinu (114 g/l), ostatní v normě.

- *listopad 2013 nasazena paliativní chemoterapie v kombinaci docetaxel + bisfosfonáty intolerance - ukončení léčby*
- *listopad 2013: hodnoty BV: zvýšená hodnota AST (0,99 μ kat/l) a GGT (5,24 μ kat/l), ostatní v normě. hodnoty KO: snížená hodnota hemoglobinu (110 g/l).*
- *prosinec 2013 změna chemoterapie v kombinaci navelbin + hydrocortizon*
- *leden 2014: hodnoty BV: vysoká hodnota PSA (> 150 ng/ml), zvýšená hodnota GGT (5,24 μ kat/l) a AST (1,02 μ kat/l), ostatní v normě. hodnoty KO: snížená hodnota erytrocytů (3,0 $10^9/l$) a hemoglobinu (84 g/l), ostatní v normě.*
- *únor 2014: hodnoty BV: vysoká hodnota PSA (> 150 ng/ml), zvýšená hodnota CEA (5,6 ng/ml) a GGT (4,73 μ kat/l), ostatní v normě. hodnoty KO: snížená hodnota leukocytů (3,8 $10^9/l$), erytrocytů (3,13 $10^{12}/l$) a hemoglobinu (91 g/l), ostatní v normě.*
- *březen 2014: hodnoty KO: snížená hodnota leukocytů (2,2 $10^9/l$), erytrocytů (2,78 $10^{12}/l$) a hemoglobinu (83 g/l), ostatní v normě.*



Obr. č. 72: Sledování nádorových markerů u pacienta č. 5

Pacient č. 6

Pacient: muž, 66 let

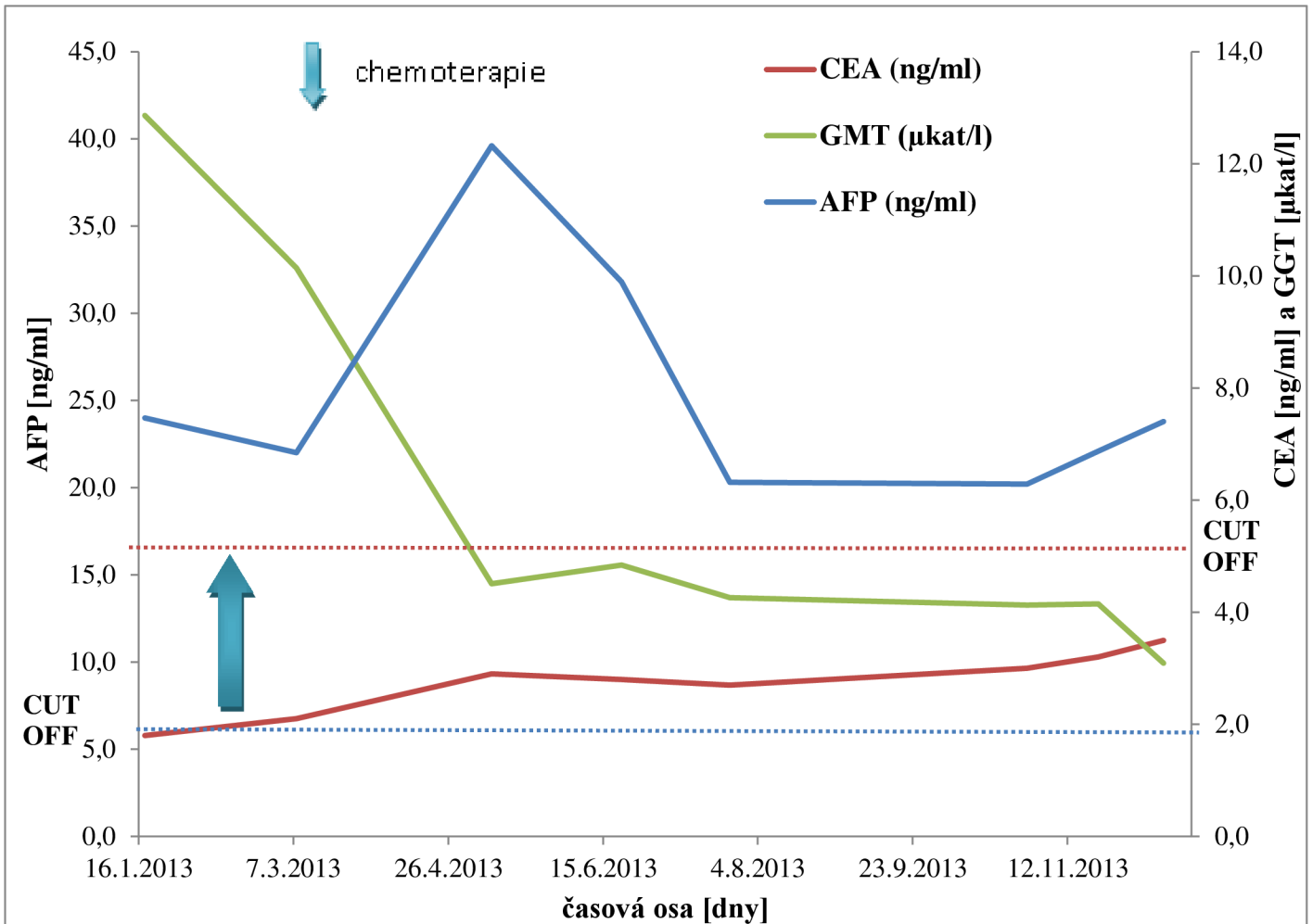
Diagnóza: C220 Zhoubný novotvar jater – hepatocelulární karcinom

Pacientu č. 6 byl v roce 2013 diagnostikován inoperativní karcinom jaterních buněk v pokročilém stádiu. Pacient sledován pomocí markerů CEA, AFP a dalších biochemických vyšetření. Marker CEA se v některých případech doporučuje i pro karcinomy jater. U našeho pacienta lze však sledovat negativní hodnoty po celou dobu monitoringu onemocnění. Při progresi i aplikované léčbě reaguje s poměrně dobrou dynamikou marker první volby AFP. Nárůst a pokles hladiny AFP je při progresi onemocnění a efektu terapie dostatečný. Hladina AFP tedy dobře koreluje s aplikovanou léčbou pacienta. Pomocnými hodnotami pro sledování pacienta jsou jaterní testy. Klesající hodnota GGT koreluje s účinnou léčbou pacienta.

Monitorování léčby:

- *leden 2013 – preventivní odběr – diagnostikován hepatocelulární karcinom v pokročilém stavu - nelze operovat*
- *leden 2013:* hodnoty BV: zvýšená hodnota bilirubinu (33,9 $\mu\text{mol/l}$), AST (1,12 $\mu\text{kat/l}$), GGT (12,86 $\mu\text{kat/l}$), CRP (16,5 mg/l), ostatní v normě.
- *únor 2013 - nasazena paliativní chemoterapie v kombinaci citegin + 5-fluorouracil + leukovorin*
- *únor 2013 :* hodnoty KO: vše v normě.
- *březen 2013:* hodnoty BV: zvýšená hodnota AFP (22,0 ng/ml), bilirubinu (33,9 $\mu\text{mol/l}$) a GGT (10,14 $\mu\text{kat/l}$), ostatní v normě. hodnoty KO: vše v normě.
- *květen 2013:* hodnoty BV: zvýšená hodnota AFP (39,6 ng/ml) a GGT (4,51 $\mu\text{kat/l}$), ostatní v normě., hodnoty KO: vše v normě.
- *červen 2013:* hodnoty BV: zvýšená hodnota GGT (4,84 $\mu\text{kat/l}$), ostatní v normě.
- *červenec 2013:* hodnoty BV: zvýšená hodnota AFP (20,3 ng/ml) a GGT (4,26 $\mu\text{kat/l}$), ostatní v normě. hodnoty KO: snížená hodnota leukocytů (3,6 $10^9/\text{l}$), hemoglobinu (124 g/l) a trombocytů (106 $10^9/\text{l}$) ostatní v normě.
- *srpen 2013:* hodnoty KO: snížená hodnota leukocytů (3,5 $10^9/\text{l}$), hemoglobinu (115 g/l) a erytrocytů (3,87 $10^{12}/\text{l}$) ostatní v normě.
- *říjen 2013:* hodnoty KO: snížená hodnota leukocytů (3,1 $10^9/\text{l}$), hemoglobinu (112 g/l), erytrocytů (3,75 $10^{12}/\text{l}$) a trombocytů (121 $10^9/\text{l}$), ostatní v normě, hodnoty BV: zvýšená hodnota AFP (20,2 ng/ml) a GGT (4,13 $\mu\text{kat/l}$), ostatní v normě.
- *listopad 2013:* hodnoty BV: zvýšená hodnota celkového bilirubinu (27,1 $\mu\text{mol/l}$), urey (10,18 mmol/l), GGT (4,15 $\mu\text{kat/l}$) a AST (1,04 $\mu\text{kat/l}$), ostatní v normě. hodnoty KO: snížená hodnota hemoglobinu (107 g/l), erytrocytů (3,59 $10^{12}/\text{l}$) a trombocytů (105 $10^9/\text{l}$), ostatní v normě.

- *prosinec 2013*: hodnoty BV: zvýšená hodnota AFP (23,8 ng/ml), celkového bilirubinu (28,5 μmol/l), urey (11,90 mmol/l), GGT (3,09 μkat/l), AST (1,44 μkat/l), Na (145 mmol/l), ostatní v normě, hodnoty KO: snížená hodnota hemoglobinu (93 g/l), erytrocytů (3,03 10¹²/l) a trombocytů (127 10⁹/l), ostatní v normě.
- *leden 2014- pacient zemřel*



Obr. č. 73: Sledování nádorových markerů u pacienta č. 6

Pacient č. 7

Pacient: muž, 59 let

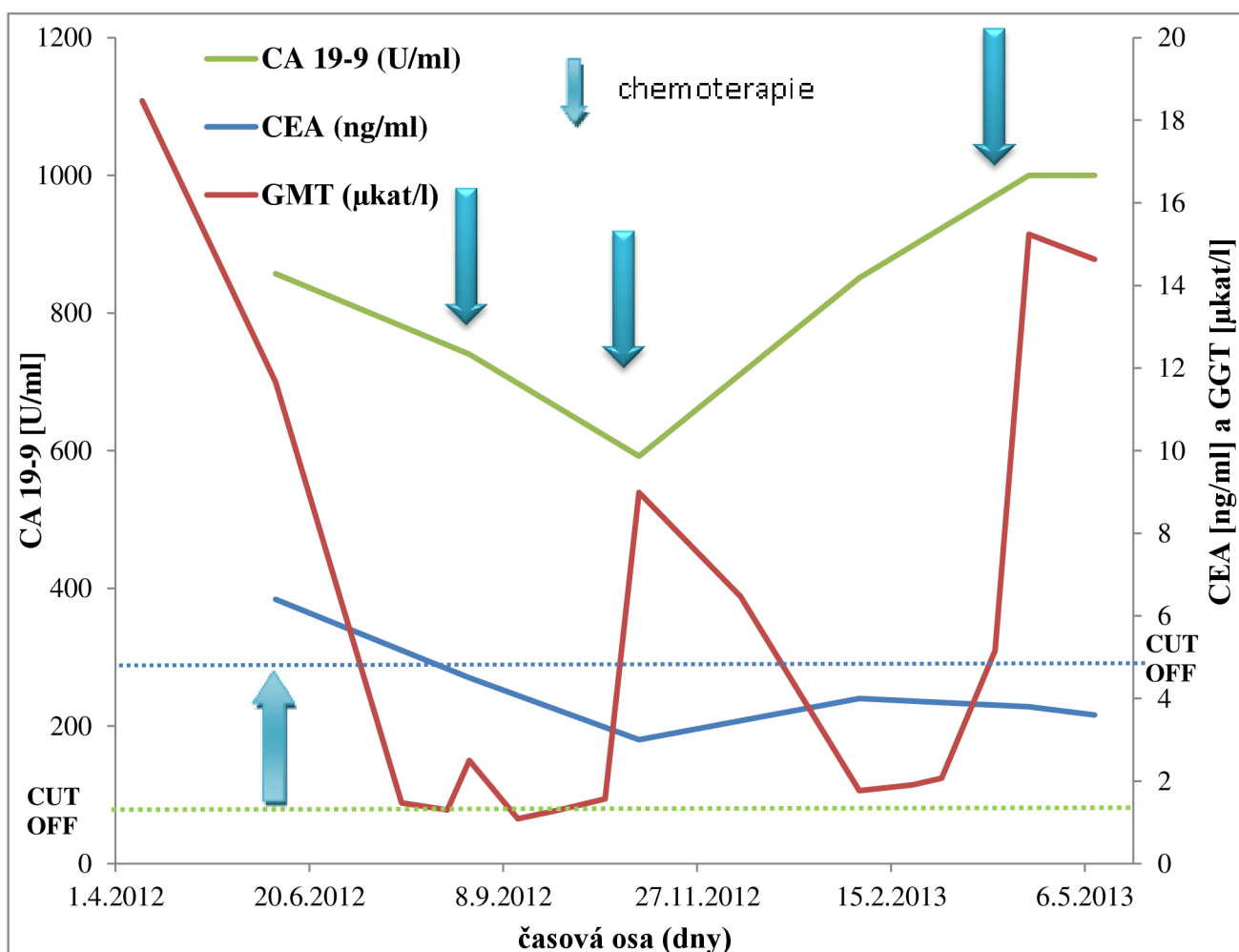
Diagnóza: C250 Zhoubný novotvar slinivky břišní – karcinom hlavy slinivky břišní

Pacientu č. 7 byl v roce 2012 diagnostikován karcinom slinivky břišní s metastázami do jater. Pacient sledován pomocí markerů CEA, CA 19-9 a dalších biochemických vyšetření. Doplnkový marker CEA se v případě karcinomu pankreasu jeví jako málo specifický s minimální reakcí na progresi a efekt léčebné terapie. Naopak marker první volby CA 19-9 dosahuje vysokých hodnot s velkou dynamikou vyšetření. Užitečným nástrojem pro sledování hepatotoxicity chemoterapie je vyšetřování jaterních testů, zejména GGT. Na křivce hodnot GGT můžeme pozorovat opakovaně zvýšenou hodnotu po aplikaci cytostatik.

Monitorování léčby:

- **duben 2012 – preventivní odběr – diagnostikován generalizovaný karcinom slinivky břišní s rozsáhlými metastázami do jater**
- **duben 2012:** hodnoty BV: zvýšená hodnota bilirubinu (25,6 $\mu\text{mol/l}$) a AST (4,65 $\mu\text{kat/l}$), vysoké hodnoty GGT (18,47 $\mu\text{kat/l}$) a ALT (23,75 $\mu\text{kat/l}$), KO: vše v normě.
- **červen 2012 - nasazena paliativní chemoterapie 1 série v kombinaci cítegin + fluorouracil**
- **červen 2012:** hodnoty BV: zvýšená hodnota AST (1,22 $\mu\text{kat/l}$) a ALT (2,60 $\mu\text{kat/l}$), vysoké hodnoty bilirubinu (52,8 $\mu\text{mol/l}$) a GGT (11,66 $\mu\text{kat/l}$), KO: vše v normě.
- **červenec 2012:** hodnoty BV: zvýšená hodnota AST (1,24 $\mu\text{kat/l}$) a ALT (1,76 $\mu\text{kat/l}$), GGT (1,47 $\mu\text{kat/l}$), ostatní v normě.
- **srpen 2012 – chemoterapie 2 série v kombinaci cítegin + fluorouracil**
- **srpen 2012:** hodnoty BV: zvýšená hodnota AST (1,01 $\mu\text{kat/l}$) a ALT (1,10 $\mu\text{kat/l}$), GGT (1,30 $\mu\text{kat/l}$), ostatní v normě.
- **září: 2012:** hodnoty BV: vysoká hodnota CA 19-9 (740 U/ml) a GGT (2,50 $\mu\text{kat/l}$), CEA v normě, ostatní v normě, hodnoty KO: vše v normě.
- **říjen 2012 – chemoterapie 3 série v kombinaci cítegin + fluorouracil**
- **říjen 2012:** hodnoty BV: zvýšená hodnota ALT (1,27 $\mu\text{kat/l}$), GGT (1,57 $\mu\text{kat/l}$), ostatní v normě.
- **listopad 2012:** hodnoty BV: vysoká hodnota CA 19-9 (592,0 U/ml) a GGT (8,99 $\mu\text{kat/l}$), AST (1,47 $\mu\text{kat/l}$) a ALT (2,77 $\mu\text{kat/l}$), ostatní v normě, hodnoty KO: snížená hodnota hemoglobinu (126 g/l) a erytrocytů (3,82 $10^{12}/l$) ostatní v normě.
- **prosinec 2012:** hodnoty BV: zvýšená hodnota GGT (6,47 $\mu\text{kat/l}$) a AMS (3,5 $\mu\text{kat/l}$) ostatní v normě, hodnoty KO: snížená hodnota hemoglobinu (120 g/l) a erytrocytů (3,85 $10^{12}/l$) ostatní v normě.
- **únor 2013:** hodnoty BV: vysoká hodnota CA 19-9 (851 U/ml) a GGT (1,77 $\mu\text{kat/l}$), ostatní v normě, hodnoty KO: snížená hodnota hemoglobinu (111 g/l) a erytrocytů (3,63 $10^{12}/l$) ostatní v normě.

- *březen 2013*: hodnoty BV: zvýšená hodnota GGT (2,07 $\mu\text{kat/l}$), ostatní v normě.
- hodnoty KO: snížená hodnota hemoglobinu (115 g/l) a erytrocytů ($3,90 \cdot 10^{12}/\text{l}$) ostatní v normě.
- **duben 2012 – chemoterapie 4 série v kombinaci cítegin + fluorouracil**
- *duben 2013*: hodnoty BV: zvýšená hodnota AST (0,92 $\mu\text{kat/l}$) a ALT (1,08 $\mu\text{kat/l}$), GGT (5,16 $\mu\text{kat/l}$), ostatní v normě.
- *duben 2013*: hodnoty BV: vysoká hodnota CA 19-9 ($>1000 \text{ U/ml}$), zvýšená hodnota AST (2,71 $\mu\text{kat/l}$) a ALT (2,65 $\mu\text{kat/l}$), GGT (15,24 $\mu\text{kat/l}$), ostatní v normě.
- *květen 2013*: hodnoty BV: vysoká hodnota CA 19-9 ($>1000 \text{ U/ml}$), zvýšená hodnota AST (2,03 $\mu\text{kat/l}$) a ALT (1,41 $\mu\text{kat/l}$), GGT (14,63 $\mu\text{kat/l}$), urey (13,34 mmol/l), kreatininu (177 $\mu\text{mol/l}$), bilirubinu (24,0 $\mu\text{mol/l}$), ostatní v normě, hodnoty KO: snížená hodnota hemoglobinu (101 g/l) a erytrocytů ($3,21 \cdot 10^{12}/\text{l}$) ostatní v normě.
- **červen 2013 - pacient zemřel**



Obr. č. 74: Sledování nádorových markerů u pacienta č. 7

4.3.2 Vyhodnocení sledování onkologických pacientů

Ze sledování onkologických pacientů lze konstatovat několik závěrů. Hladiny nádorových markerů dosahovaly vysokých hodnot, vyšší dynamiky nárůstu při progresi a vyšší dynamiky poklesu při správné léčebné terapii u primárních nádorových onemocnění. Generalizované onemocnění se vyznačovalo stejnými projevy nárůstu a poklesu jako u primárních nádorových onemocnění. Nižších hodnot nádorových markerů s nízkými dynamickými změnami dosahují choroby v remisi. Hladiny nádorových markerů tedy lépe vystihují změny choroby u primárních a generalizovaných nádorových onemocnění. Při sledování pacientů se jako velice důležitá ukázala volba nádorových markerů. Zejména doplňkové nádorové markery se často liší v různých doporučeních a jsou v mnoha případech málo specifické. např. CEA. U sledované skupiny pacientů se tato malá specifická a špatná volba doplňkových markerů potvrdila. U nádorů prsu, vaječnicků, plic a močového měchýře je doporučováno vyšetření TPS/TPA, které by i přes svou špatnou specifitu mohlo mít velký přínos pro sledování pacientů. Hodnota TPA/TPS je v mnoha případech úměrná rychlosti nádorového růstu a vyznačuje se velmi dobrou dynamikou změn. Doporučené doplňkové markery TPS/TPA se však z ekonomických důvodů standardně neordinují. Například u onemocnění prsu by mohla mít velký přínos kombinace markerů CA 15-3 + HE4. HE4 je ale zatím málo rozšířený, a tedy i málo vyšetřovaný marker. Dobrým pomocníkem sledování terapie se také ukázala biochemická a hematologická vyšetření. Při sledování nádorových markerů je třeba počítat s falešnou negativitou i pozitivitou v určitém procentu případů. Základním předpokladem interpretace vyšetření nádorových markerů je stanovení hodnoty cut - off mezi benigním a maligním nádorem, který by si měla každá laboratoř určit.

5. ZÁVĚR

V rámci diplomové práce se podařilo splnit všechny zadané cíle. Nově zavedená metoda CLIA pro stanovení feritinu v séru byla úspěšně verifikována. Porovnání metod CLIA a stávající IMT pomocí získaných výsledků a parametrů je znázorněno v tabulce č. 29. Hlavními výhodami CLIA metody je větší pracovní rozsah, nižší mez stanovitelnosti, možný dosah pomocí ředění, snadnější provozní obsluha, nižší objem vzorku potřebný pro analýzu a zastoupení v Systému externí kontroly kvality provozovanou firmou SEKK. Mezi nevýhody CLIA metody patří horší opakovatelnost ve srovnání s IMT, delší doba stanovení a dražší cena vyšetření. Jak již bylo zmíněno, feritin se vyšetřuje u onkologických pacientů a pacientů na dialýze. Tyto skupiny pacientů dosahují vysokých hodnot, což nyní znamená časté ředění u používané metody IMT. Při ověření pracovního rozsahu IMT metoda vykazovala s rostoucím ředěním také rostoucí chybu. Z toho vyplývá, že IMT poskytuje v oblasti vyššího zředění horší přesnost než metoda CLIA. Na základě získaných výsledků a ostatních parametrů pro stanovení feritinu v séru byla pro rutinní praxi doporučena nově zavedená metoda CLIA na analyzátoru Siemens Immulite 2000 XPi.

Dále byly porovnány metody z externí kontroly kvality, konkrétně z kontrolního cyklu pro tumorové markery TM4/13. Pro porovnání metod byl vybrán tumorový marker CEA, u kterého byla zjištěna poměrně velká rozdílnost výsledných hodnot. Vzhledem k rozdílnosti výsledků je tedy nutné sledovat vyšetřovaný tumor marker po celou dobu monitorování pacienta pomocí stejné metody, nejlépe v jedné laboratoři.

Ze sledování onkologických pacientů vyplynuly základní možnosti indikace tumorových markerů při aplikované nádorové léčbě. Stanovení nádorových markerů má v diagnostice onkologických onemocnění nesporný význam, avšak jedná se pouze o pomocnou diagnostickou metodu. Absolutní hodnoty tumorových markerů mají jen informativní charakter a pro vlastní interpretaci se vždy využívají dynamické změny nádorových markerů v určitém časovém rozmezí. Pro optimální klinické využití je důležitá účelná indikace vyšetření. Ke správné interpretaci výsledků a eliminaci celé řady faktorů je důležitá spolupráce mezi laboratorními pracovníky a onkologem.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] ADAM, Zdeněk a Jiří VORLÍČEK. *Obecná onkologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2004, 440 s. ISBN 80-210-3574-9.
- [2] MASOPUST, Jaroslav. *Klinická biochemie: požadování a hodnocení biochemických vyšetření*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1998, 2 sv. ISBN 80-7184-649-X2.
- [3] ZIMA, Tomáš. *Laboratorní diagnostika*. 3., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2013. 1146 s. ISBN 978-80-7492-062-2.
- [4] TOPOLČAN, Ondřej a Marie KARLÍKOVÁ. Biomarkery v onkologii. In: [online]. 2009 [cit. 2014-02-16]. Dostupné z: <http://www.imunokurzy.cz/>
- [5] Doporučení odborných společností. *Doporučení České společnosti klinické biochemie (ČSKB ČLS JEP), České onkologické společnosti (ČOS ČLS JEP), České společnosti nukleární medicíny (ČSNM ČLS JEP) – sekce imunoanalytických metod k využití nádorových markerů v klinické praxi*. 2008. [online]. [cit. 2014-01-07]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporučení--tumorove-markery>
- [6] NEZBEDA, Pavel. CEVA INSTITUT. *Klinická biochemie – Markery* [online]. [cit. 2014-03-25]. Dostupné z: http://ceva-edu.cz/pluginfile.php/2338/mod_resource/content/0/120504Markery_v4.pdf
- [7] NEKULOVÁ, Marie a Marie ŠIMIČKOVÁ. ROCHE S. R. O. *Nádorové markery*. BRNO: MedProGO, 2004, 45 s.
- [8] VRÁNOVÁ, J, J HORÁK, K KRÁTKÁ, M HENDRICHOVÁ a K KOVAŘÍKOVÁ. ROC analýza a využití analýzy nákladů a přínosů k určení optimálního dělicího bodu. *Časopis lékařů českých* [online]. roč. 2009, č. 148, 410 - 415 [cit. 2014-01-03]. Dostupné z: <http://www.prolekare.cz/casopis-lekaru-ceskych-clanek?id=15445>
- [9] CHROMÝ, Vratislav a Miroslava BITTOVÁ. *Bioanalytika: analytické metody v klinické chemii a laboratorní medicíně*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2011, 331 s. ISBN 978-809-0453-937.
- [10] SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS. *Pracovní návody tumorových markerů*. 2008. vyd. UK.
- [11] TOPOLČAN, Ondřej a Marie KARLÍKOVÁ. Imunoanalytické metody a jejich využití v biomedicínském výzkumu a klinické praxi. In: [online]. 2009 [cit. 2014-01-16]. Dostupné z: <http://www.imunokurzy.cz/>
- [12] RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Galén, 2006, 329 s. ISBN 80-726-2324-9.

- [13] MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR. *Datový standart DASTA* [databáze online]. Praha, 2014 [cit. 2014-01-20]. Dostupné z: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz>
- [14] KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2005, 258 s. ISBN 80-708-0586-2.
- [15] ČERMÁKOVÁ, Marta a Irena ŠTĚPÁNOVÁ. *Klinická biochemie*. 2. upr. vyd. Brno: NCONZO, 2010, 130 s. ISBN 978-807-0135-150.
- [16] MURRAY, Robert K. *Harperova ilustrovaná biochemie*. 5. české vyd., 1. v nakl. Galén. Překlad Bohuslav Matouš. Praha: Galén, c2012, xii, 730 s. ISBN 978-807-2629-077.
- [17] NĚMCOVÁ, Irena. *Spektrometrické analytické metody I*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2004, 166 s. ISBN 80-246-0776-X.
- [18] NEKULOVÁ, Mirka. Současné možnosti laboratorního vyšetřování pro onkologicky nemocné. *Onkologie* [online]. 2008, č. 2, s. 229 - 232 [cit. 2014-03-03]. Dostupné z: <http://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2008/04/06.pdf>
- [19] KRÁLOVÁ, Blanka. *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, 254 s. ISBN 80-708-0449-1.
- [20] ROC curve CEA and CA 19-9: [obrázek]. In: *Spandidos Publications*. [online]. [cit. 2014-03-21]. Dostupné z: http://www.spandidos-publications.com/article_images/ol/5/2/OL-05-02-0613-g03.jpg
- [21] IZIP. *Databáze* [databáze online]. Praha, 2014 [cit. 2014-04-27]. Dostupné z: <http://oldweb.izip.cz/ds3/hypertext/AJDLQ.htm>
- [22] MROCZKO, B, M GROBLEWSKA, B OKULCZYK, B KEDRA a M SZMITKOWSKI. The diagnostic value of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 (TIMP-1) determination in the sera of colorectal adenoma and cancer patients. *Open i beta* [online]. 2010 [cit. 2014-01-24]. Dostupné z: http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=2928442_384_2010_991_Fig2_HTML&query=The%20diagnostic%20value%20of%20matrix%20metalloproteinase%209%20%28MMP9%29&fields=all&favor=none&it=none&sub=none&uniq=0&sp=none&coll=none&req=4&npos=2&prt
- [23] PERKIN ELMER LIFE AND ANALYTICAL SCIENCES. *Immunodiagnosics system*. USA, 2006. Dostupné z: http://www.perkinelmer.com/PDFs/downloads/BRO_Complete%20DELFI%20%28Dec06%29.pdf
- [24] QIAN, Jing, Dengfu YAO, Zhizhen DONG, Wei WU, Liwei QIU a Ninghua LI. Characteristics of Hepatic IGF-II Expression and Monitored Levels of Circulating IGF-II mRNA in Metastasis of Hepatocellular Carcinoma. *The American Society for Clinical Pathology* [online]. 2010, č. 134, s. 799-806 [cit. 2014-01-11]. Dostupné z: <http://ajcp.ascpjournals.org/content/134/5/799/F1.expansion.html>

- [25] PERKIN ELMER. *DELFLIA time-resolved fluorescence assays*. 2014. [on-line]. [cit. 1. 2. 2014].
Dostupné z: <http://www.perkinelmer.com/Resources/TechnicalResources/ApplicationSupportKnowledgebase/DELFLIA/delfia.xhtml>
- [26] ANASTASI, Emanuela, Teresa GRANATO, Renato FALZARANO, Paola STORELLI, Adele TICINO, Luigi FRATI, Pierluigi Benedetti PANICI a Maria Grazia PORPORA. The use of HE4, CA125 and CA72-4 biomarkers for differential diagnosis between ovarian endometrioma and epithelial ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research* [online]. 2013, vol. 6, issue 1, s. 44, [cit. 2014-02-01]. DOI: 10.1186/1757-2215-6-44.
Dostupné z: <http://www.ovarianresearch.com/content/6/1/44>
- [27] SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS. *Dimension Vista 1500 Intelligent Lab System* [online]. 2013, 2014 [cit. 2014-02-13]. Dostupné z: <http://www.healthcare.siemens.com/integrated-chemistry/systems/dimension-vista-1500-intel-lab-sys>
- [28] UniCel® DxI 800 Immunoassay System. BECKMAN COULTER. [online]. 2014 [cit. 2014-01-09].
Dostupné z: <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/diagnostics/clinical-products/immunoassay/unicel-dxl-800/index.htm>
- [29] BIOTEK. *Synergy™ Microplate Readers and HTRF® Detection*. 2009. [on-line]. [cit. 8. 2. 2014].
Dostupné z: <http://www.biotek.fr/fr/resources/articles/synergy-microplate-readers-HTRF-detection.html>
- [30] COTTET, Martin, Orestis FAKLARIS, Damien MAUREL, Pauline SCHOLLER, Etienne DOUMAZANE, Eric TRINQUET, Jean-Philippe PIN a Thierry DURROUX. BRET and Time-resolved FRET strategy to study GPCR oligomerization: from cell lines toward native tissues. *Frontiers in Endocrinology* [online]. 2012, vol. 3, s. - [cit. 2014-02-08]. Dostupné z: <http://www.frontiersin.org/Journal/10.3389/fendo.2012.00092/full>
- [31] Fluorescein. In: *Answers* [online]. 2012 [cit. 2014-01-19].
Dostupné z: <http://www.answers.com/topic/fluorescein>
- [32] RICHTER, Mark M, Christopher M BELISLE a Michael J POWELL. BIOVERIS CORPORATION. *Assays employing electrochemiluminescent labels and electrochemiluminescence quenchers* [patent]. USA. 60/047, US7314711 B2. Uděleno 1997-05-23. Dostupné z: <http://www.google.com/patents/US7314711>
- [33] SHINOHARA, Hiroaki, Feifei WANG a S M Zakir HOSSAIN. A convenient, high-throughput method for enzyme-luminescence detection of dopamine released from PC12 cells. In: *Nature Protocols* [online]. 2008, s. 1639-1644. ISSN 1754-2189. DOI: 10.1038/nprot.2008.158.
Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nprot.2008.158>
- [34] Detection Methods. BIO-RAD. [online]. 2014 [cit. 2014-01-24]. Dostupné z: <http://www.bio-rad.com/en-cz/applications-technologies/detection-methods>

- [35] ŠIMSÁ, D a J SKOPAL. Chemická luminiscence luminolu a jeho syntéza ze snadno dostupných chemikálií. *Chemické Listy*. 2008, č. 102, s. 1017-1019. ISSN 1213-7103.
- [36] MARQUETTE, Christophe A. a Loïc J. BLUM. *Analytical and Bioanalytical Chemistry: Electro-chemiluminescent biosensing*. Berlin: Springer, 2008, s. 155-168. ISBN 1618-2650.
- [37] TRACE Technologie. In: *B·R·A·H·M·S KRYPTOR* [online]. 2013 [cit. 2014-02-06].
Dostupné z: <http://www.kryptor.net/Default.aspx?tabindex=3&tabid=254>
- [38] TRACE Technologie. In: *Thermo Fisher* [online]. 2012 [cit. 2014-01-26].
Dostupné z: <http://www.kryptor.net/Default.aspx?tabindex=3&tabid=254>
- [39] B.H.R.A.H.M.S. *TRACE technologie* [online]. 2014 [cit. 2014-03-14].
Dostupné z: <http://cezanne.fr/en/technology-34200-2.php>
- [40] PERKIN ELMER. *DELFLIA time-resolved fluorescence assays*. 2014. [on-line]. [cit. 1. 2. 2014].
Dostupné z: <http://www.perkinelmer.com/Resources/TechnicalResources/ApplicationSupportKnowledgebase/DELFLIA/delfia.xhtml>
- [41] An antibody therapy for hemophilia A?. In: PERKEL, Jeffrey. *DoubleXScience* [online]. 2012 [cit. 2014-04-27]. Dostupné z: <http://www.doublexscience.org/an-antibody-therapy-for-hemophilia-a/>
- [42] Antigen.: In: *About Mutation* [online]. 2008 [cit. 2014-01-13]. Dostupné z: <http://mutation.blogspot.cz/2011/10/antigen.html>
- [43] SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS. *Firemní dokumentace k analyzátoru Siemens Advia 1800*. Japonsko, 2007.
- [44] ADVIA 1800 Chemistry System. SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS. [online]. 2014 [cit. 2014-03-04]. Dostupné z: <http://www.healthcare.siemens.com/clinical-chemistry/systems/advia-1800-chemistry-system>
- [45] SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS. *Příbalový leták Feritin ADVIA Chemistry systems*. Japonsko, 2010.
- [46] IMMULITE® 1000 Chemiluminescent Technology. *SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS* [online]. 2014 [cit. 2014-02-06]. Dostupné z: <http://www.healthcare.siemens.com/immunoassay/immulite-1000-chemiluminescent-technology>
- [47] SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS. *Příbalový leták IMMULITE 2000 Feritin*. USA, 2008.
- [48] BIO-RAD. *Příbalový leták Lyphochek immunoassay Plus Control*. [online]. USA, 2014.
Dostupné z: <http://www.qcnet.com/cz/QCDokumenty/tabid/3199/language/en-US/Default.aspx>
- [49] SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS. *Příbalový leták ADVIA Chemistry Liquid Specific Protein Calibrator*. USA, 2014.

- [50] SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS. *Siemens Immulite 2000 XPi*. USA, 2014.
Dostupné z: <http://www.healthcare.siemens.com/immunoassay/systems/immulite-2000-xpi-immunoassay-system>
- [51] FRIEDECKÝ, Bedřich, Luděk ŠPRONGL a Josef KRATOCHVÍL. Doporučení. *Validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích*. Praha: ČSKB, 2010.
Dostupné z: http://www.cskb.cz/res/file/doporučení/valid/Validace_2010.pdf
- [52] CHROMÝ, Vratislav a Luděk DOHNAL. *Management kvality v analytické a klinické chemii*. 1. vyd. Brno: Pro Ústav chemie Přírodovědecké fakulty MU vydala Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, 2009, 215 s. ISBN 978-80-903732-6-6.
- [53] STRATEC BIOMEDICAL. *Příbalový leták CEA pro analyzátor STRATEC*. Německo, 2013.
- [54] STAPRO PARDUBICE. *Příručka laboratorních vyšetření (FONS)* [database online]. Praha, 2014 [cit. 2014-01-16]. Dostupné z: <http://www.katalogfons.cz/Produkty/AB2EBF17-6AC8-4F30-97CC-ED0F1760EDB9>
- [55] AxSYM. *Abbott Laboratories* [online]. 2014 [cit. 2014-03-01]. Dostupné z: <http://www.abbottdiagnostics.cz/Katalog-produktu/Platformy/Imunoanalýza/AxSYM/5-7-q9-14.instrument.aspx>
- [56] TOSOH. *Návod k použití ST AIA-PAC CEA*. Japonsko, 2013.
Dostupné z: <http://www.tosoh.com/our-products/bioscience/clinical-diagnostics>
- [57] B.H.R.A.H.M.S. *Návod k použití CEA KRYPTOR*. 2012.
- [58] ADVIA CENTAUR XP. *SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS*. [online]. 2012 [cit. 2014-01-29]. Dostupné z: <http://www.healthcare.siemens.com/immunoassay/systems/advia-centaur-xp>
- [59] ROCHE. *Příbalový leták pro CEA*. 2014. Dostupné z: <http://objednavky.roche-diagnostics.cz/objednavky/hledani.asp?act=search&ids=&q=CEA&c=n>
- [60] ROCHE. *Elecsys Calcitonin*. 2014. Dostupné z: http://www.roche-diagnostics.ch/content/dam/corporate/roche-dia_ch/documents/broschueren/professional_diagnostics/immunologie/schilddruesendiagnostik/EN_EA_Calcitonin-FactSheet.pdf
- [61] ABBOTT LABORATORIES. *Příbalový leták ARCHITECT CEA*. USA, 2014.
Dostupné z: http://www.ilexmedical.com/files/PDF/CEA_ARC.pdf
- [62] SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS. *Pracovní návod CEA ADVIA Centaur*. USA, 2013.
Dostupné z: http://labmed.ucsf.edu/labmanual/db/resource/Centaur_CEA.pdf
- [63] BECKMAN COULTER. *Návod k použití Access immunoassay systems CEA*. France, 2014.
Dostupné z: <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/diagnostics/clinical-products/immunoassay/access-2/index.htm>

- [64] SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS. *Průručka uživatele analyzátoru Immulite 2000XPi firmy siemens*. Japonsko, 2010.
- [65] SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS. *Pracovní návod CEA firmy Siemens Immulite*. USA, 2014. Dostupné z: <http://www.healthcare.siemens.com/immunoassay/systems/immulite-2000-xpi-immunoassay-system>
- [66] JOHNSON & JOHNSON. *Pracovní návod CEA VITROS firmy*. USA, 2014. Dostupné z: http://www.cmmc.org/cmmclab/IFU/CEA_020.PDF
- [67] SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS. *Dimension Vista 1500 Intelligent Lab System* [online]. 2013, 2014 [cit. 2014-01-23]. Dostupné z: <http://www.healthcare.siemens.com/integrated-chemistry/systems/dimension-vista-1500-intel-lab-sys>
- [68] SYSTÉM EXTERNÍ KONTROLY KVALITY SEKK. [online]. 2014 [cit. 2014-01-22]. Dostupné z: <http://www.sekk.cz/>
- [69] EHK REFERENZINSTITUT FÜR BIOANALYTIK. *Gesamtauswertung TM4/13* [online]. 2014 [cit. 2014-01-04]. Dostupné z: https://www.dgkl-rfb.de/cgi/displayAnaStats?rv_type=all&rvTypeForDetails=TM&year=2013&rv_num=4&analyte=CEA&searchType=analyte&anaV=5
- [70] STRATEC BIOMEDICAL. SR300. Německo, 2013. [on-line]. [cit. 1. 2. 2014]. Dostupné z: http://www.stratec.com/en/instrumentation/Off_the_shelf/SR300/index.php
- [71] ROCHE. *Cobas 6000*. 2014. Dostupné z: <http://objednavky.roche-diagnostics.cz/objednavky/hledani.asp?act=search&ids=&q=CEA&c=n>
- [72] B.H.R.A.H.M.S. *KRYPTOR*. 2012. [on-line]. [cit. 3. 1. 2014]. Dostupné na: <http://www.kryptor.net/Default.aspx?tabindex=1&tabid=252>
- [73] ABBOTT LABORATORIES. *AxSYM*. USA, 2014. [on-line]. [cit. 20. 1. 2014]. Dostupné na: <http://www.abbottdiagnostics.cz/Katalog-produktu/Platformy/Imunoanalýza/AxSYM/5-7-q9-14.instrument.aspx>
- [74] ABBOTT LABORATORIES. *Architect*. USA, 2014. [on-line]. [cit. 20. 1. 2014]. Dostupné na: <http://www.abbottdiagnostics.cz/Katalog-produktu/Platformy/Imunoanalýza/ARCHITECT-i2000-i2000SR/5-7-q9-h.instrument.aspx>
- [75] JABOR, A a J FRANEKOVÁ. ROCHE. *Principy interpretace laboratorních testů*. Praha: Roche s. r. o., 2013, 381 s. ISBN 978-80-260-5094-0.
- [76] BABLOK, W., H. PASSING, R. BENDER a B. SCHNEIDER. A General Regression Procedure for Method Transformation. Application of Linear Regression Procedures for Method Comparison Studies in Clinical Chemistry, Part III. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* [online]. 1988, vol. 26, issue 11, s. - [cit. 2014-01-03]. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/cclm.1988.26.issue11/cclm.1988.26.11.783/cclm.1988.26.11.783.xml>

- [77] THOMAS, Peter, Carol Ann TOTH, Kulvinder S. SAINI, J. Milburn JESSUP a Glenn STEELE. The structure, metabolism and function of the carcinoembryonic antigen gene family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* [online]. 1990, vol. 1032, 2-3, s. 177-189 [cit. 2014-01-20].
- [78] DIAMANDIS, Eleftherios P. *Tumor markers: physiology, pathobiology, technology, and clinical applications*. Washington, DC: AACC Press, c2002, 541 p., 12 p. of plates. ISBN 18-908-8371-9.
- [79] DIAMANDIS, Eleftherios P a Theodore K CHRISTOPOULOS. *Immunoassay: physiology, pathobiology, technology, and clinical applications*. San Diego: Academic Press, c1996, 579 p. ISBN 01-221-4730-8.
- [80] WILD, David a Theodore K CHRISTOPOULOS. *The immunoassay handbook: theory and applications of ligand binding, ELISA, and related techniques*. 4th ed. Waltham, MA: Elsevier, 2013, 1013 p. ISBN 00-809-7037-0.
- [81] BLACKMORE, Sheena, Malcolm HAMILTON, Anne LEE, Mark WORWOOD, Matthew BRIERLEY, Alan HEATH a Susan J. THORPE. Automated immunoassay methods for ferritin: recovery studies to assess traceability to an international standard. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* [online]. 2008-01-01, vol. 46, issue 10, s. - [cit. 2014-01-09]. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/cclm.2008.46.issue-10/cclm.2008.304/cclm.2008.304.xml>
- [82] ŠUSTA, Petr. *X. Mezinárodní konference o nádorových markerech CECHTUMA: 16.-18. května 2010 : sborník konference = X. International Conference on Tumor Markers CECHTUMA : May 16-18, 2010 : conference book : [Mikulov, Hotel Galant. V Tribunu EU vyd. 1. Brno: Tribuna EU, 2010, 73, 78 s. ISBN 978-80-7399-952-0.*
- [83] VORLÍČEK, Jiří. *Klinická onkologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 1995, S. 232-455. ISBN 80-210-1257-9.
- [84] ECKSCHLAGER, Tomáš a Richard PRŮŠA. *Laboratorní vyšetření v onkologii: [molekulárně biologické a imunologické vyšetření pacientů s nádory]*. Vyd. 1. Praha: Triton, 2002, 254 s. ISBN 80-7254-186-2.
- [85] DRÁBEK, Jiří. *Detekce nádorových biomarkerů v molekulárně biologické laboratoři*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2012, 142 s. ISBN 978-80-244-3002-7.
- [86] ZDRAŽILOVÁ DUBSKÁ, Lenka. *Od fyziologie k medicíně: laboratorní diagnostika*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2010, 85 s. ISBN 978-80-7305-116-7.
- [87] DUFFY, M.J, A VAN DALEN, C HAGLUND, L HANSSON, R KLAPDOR, R LAMERZ, O NILSSON, C STURGEON a O TOPOLCAN. Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer. *European Journal of Cancer* [online]. 2003, vol. 39, issue 6, s. 718-727 [cit. 2014-02-02]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804902008110>

- [88] YIN, B. W. T., A VAN DALEN, C HAGLUND, L HANSSON, R KLAPDOR, R LAMERZ, O NILSSON, C STURGEON a O TOPOLCAN. Molecular Cloning of the CA125 Ovarian Cancer Antigen. IDENTIFICATION AS A NEW MUCIN, MUC16. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2003, vol. 276, issue 29, s. 27371-27375 [cit. 2014-02-13]. Dostupné z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M103554200>
- [89] LOCKER, G. Y., S. HAMILTON, J. HARRIS, J. M. JESSUP, N. KEMENY, J. S. MACDONALD, M. R. SOMERFIELD, D. F. HAYES a R. C. BAST. ASCO 2006 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Gastrointestinal Cancer. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 2006-01-03, vol. 24, issue 33, s. 5313-5327 [cit. 2014-02-12]. Dostupné z: <http://www.jco.org/cgi/doi/10.1200/JCO.2006.08.2644>
- [90] FORSTER, Robert J., Paolo BERTONCELLO, Tia E. KEYES, J. M. JESSUP, N. KEMENY, J. S. MACDONALD, M. R. SOMERFIELD, D. F. HAYES a R. C. BAST. Electrogenenerated Chemiluminescence. *Annual Review of Analytical Chemistry* [online]. 2009-07-19, vol. 2, issue 1, s. 359-385 [cit. 2014-01-20]. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-anchem-060908-155305>
- [91] GOLDYS, Ewa. *Fluorescence applications in biotechnology and life sciences*. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2009, xiii, 367 s. ISBN 978-0-470-08370-3.
- [92] UCHIDA, Masaki, Michelle L. FLENNIKEN, Mark ALLEN, Deborah A. WILLITS, Bridgid E. CROWLEY, Susan BRUMFIELD, Ann F. WILLIS, Larissa JACKIW, Mark JUTILA, Mark J. YOUNG a Trevor DOUGLAS. Targeting of Cancer Cells with Ferrimagnetic Ferritin Cage Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2006, vol. 128, issue 51, s. 16626-16633 [cit. 2014-01-27]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja0655690>
- [93] ZVÁROVÁ, J. *Základy statistiky pro biomedicínské obory*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2002, 218 s. ISBN 80-718-4786-0.
- [94] PETRUŽELKA, Luboš a Bohuslav KONOPÁSEK. *Klinická onkologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2003, 274 s. ISBN 80-246-0395-0.
- [95] Tumor Markers: Questions and Answers *National Cancer Institute*. [online]. 2014 [cit. 2014-02-24]. Dostupné z: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/detection/tumor-markers>
- [96] HOPLEY, Lara a Jo VAN SCHALKWYK. The magnificent ROC. *Anaesthetis* [online]. 2001 [cit. 2014-02-24]. Dostupné z: <http://www.anaesthetist.com/mnm/stats/roc/Findex.htm>
- [97] AHMED, Nessar. *Clinical biochemistry*. New York: Oxford University Press, 2011, 714 p. Fundamentals of biomedical science. ISBN 01-995-3393-8.
- [98] GOSLING, James P. *Immunoassays: a practical approach*. New York: Oxford University Press, 2000, xix, 304 p. ISBN 01-996-3710-5.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

Ab	protilátka
ACP	kyselá fosfatáza
Ag	antigen
AK	aminokyseliny
ALP	alkalická fosfatáza
ALT	alaninaminotransferáza
AM	aritmetický průměr
AST	aspartátaminotransferáza
BIAS	vychýlení
BV	biochemické vyšetření
CL	chemiluminiscence
CLIA	chemiluminiscenční metoda
ČSKB	Česká společnost klinické biochemie
CV	variační koeficient
CVP	konsenzus účastníků
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EHK	externí hodnocení kvality
ELFO	elektroforéza bílkovin
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
GGT	gama-glutamyltransferáza
GMD	glutamátdehydrogenáza
IMT	imunoturbidimetrická metoda
KO	krevní obraz
LD	laktátdehydrogenáza
LL	dolní mez
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
PTH	parathormon
ROC	receiver operating characteristic
RoM	robustní průměr
SD	směrodatná odchylka
SEKK	Systém externí kontroly kvality pořádaný firmou SEKK
TM	tumorové markery
UL	horní mez

8. SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1 Opakovatelnost CLIA

Příloha č. 2 Mezilehlá preciznost CLIA

Příloha č. 3 Porovnání metod IMT a CLIA

Příloha č. 1: Opakovatelnost (CLIA)

č. měření	Vzorek 1 (ng/ml)	Vzorek 2 (ng/ml)	Vzorek 3 (ng/ml)	Vzorek 4 (ng/ml)	Vzorek 5 (ng/ml)
1	10,97	165,00	319,00	543,00	919,00
2	10,88	160,00	294,00	487,00	879,00
3	9,67	148,00	299,00	548,00	901,00
4	10,34	157,00	325,00	544,00	893,00
5	9,84	146,00	337,00	492,00	896,00
6	10,36	149,00	299,00	560,00	920,00
7	9,56	145,00	304,00	497,00	893,00
8	9,71	151,00	340,00	496,00	904,00
9	10,72	156,00	306,00	526,00	891,00
10	10,93	154,00	305,00	503,00	886,00
11	9,55	149,00	297,00	557,00	940,00
12	10,39	167,00	314,00	495,00	871,00
13	10,65	149,00	341,00	494,00	907,00
14	9,88	157,00	311,00	536,00	885,00
15	10,64	146,00	323,00	489,00	879,00
16	9,72	142,00	295,00	559,00	933,00
17	10,99	164,00	313,00	489,00	877,00
18	10,78	153,00	343,00	492,00	909,00
19	9,46	145,00	300,00	539,00	895,00
20	10,89	158,00	303,00	488,00	882,00
Aritmetický průměr (ng/ml)	10,30	153,05	313,40	516,70	898,00
SD (ng/ml)	0,56	7,26	16,33	28,20	18,83
CV (%)	5,43	4,74	5,21	5,46	2,10

Příloha č. 2: Mezilehlá preciznost (CLIA)

č. vzorku	L1 (ng/ml)	L2 (ng/ml)	L3 (ng/ml)
1	65,30	116,00	286,00
2	68,50	114,00	290,00
3	66,00	120,00	281,00
4	68,50	107,00	292,00
5	68,80	108,00	296,00
6	66,70	116,00	278,00
7	65,40	115,00	282,00
8	66,60	110,00	282,00
9	65,10	117,00	280,00
10	66,20	106,00	283,00
11	68,20	113,00	289,00
12	65,80	119,00	287,00
13	67,20	107,20	291,00
14	65,80	109,00	294,00
15	66,70	117,00	279,00
16	65,20	109,00	280,00
17	68,60	108,00	287,00
18	67,20	116,00	289,00
19	65,80	109,00	286,00
20	64,10	117,00	296,00
Aritmetický průměr (ng/ml)	66,59	112,66	286,40
SD (ng/ml)	1,36	4,52	5,66
CV (%)	2,05	4,01	1,98

Příloha č. 3: Porovnání metod IMT a CLIA

č. měření	IMT (ADVIA 1800) [ng/ml]	CLIA (IMMULITE 200XPi) [ng/ml]	diference (ng/ml)	průměr (ng/ml)	relativní diference (%)
1	3,79	3,42	-0,37	3,61	-10,26
2	4,44	3,48	-0,96	3,96	-24,24
3	12,49	11,40	-1,09	11,95	-9,13
4	16,70	13,30	-3,40	15,00	-22,67
5	19,85	21,00	1,15	20,43	5,63
6	20,21	19,10	-1,11	19,66	-5,65
7	20,22	19,20	-1,02	19,71	-5,18
8	22,03	18,10	-3,93	20,07	-19,59
9	26,19	25,90	-0,29	26,05	-1,11
10	36,17	35,40	-0,77	35,79	-2,15
11	45,39	42,50	-2,89	43,95	-6,58
12	52,57	54,80	2,23	53,69	4,15
13	54,95	55,30	0,35	55,13	0,63
14	63,46	58,30	-5,16	60,88	-8,48
15	71,62	65,30	-6,32	68,46	-9,23
16	77,93	68,90	-9,03	73,42	-12,30
17	82,48	88,00	5,52	85,24	6,48
18	86,07	87,00	0,93	86,54	1,07
19	93,88	92,90	-0,98	93,39	-1,05
20	94,52	90,40	-4,12	92,46	-4,46
21	117,20	110,00	-7,20	113,60	-6,34
22	122,31	109,00	-13,31	115,66	-11,51
23	123,58	131,00	7,42	127,29	5,83
24	130,18	134,00	3,82	132,09	2,89
25	135,83	119,00	-16,83	127,42	-13,21
26	150,28	136,00	-14,28	143,14	-9,98
27	174,12	152,00	-22,12	163,06	-13,57
28	179,05	163,00	-16,05	171,03	-9,38
29	203,36	172,00	-31,36	187,68	-16,71
30	203,50	204,00	0,50	203,75	0,25
31	214,91	219,00	4,09	216,96	1,89
32	248,40	250,00	1,60	249,20	0,64
33	261,46	265,00	3,54	263,23	1,34
34	299,05	263,00	-36,05	281,03	-12,83
35	299,84	298,00	-1,84	298,92	-0,62
36	320,22	283,00	-37,22	301,61	-12,34
37	323,93	322,00	-1,93	322,97	-0,60

38	346,27	365,00	18,73	355,64	5,27
39	413,01	430,00	16,99	421,51	4,03
40	440,54	453,00	12,46	446,77	2,79
41	447,72	408,00	-39,72	427,86	-9,28
42	519,26	530,00	10,74	524,63	2,05
43	522,16	523,00	0,84	522,58	0,16
44	526,06	539,00	40,56	532,53	7,62
45	554,44	595,00	-47,86	574,72	-8,33
46	619,86	572,00	12,94	595,93	2,17
47	633,10	586,00	52,06	609,55	8,54
48	671,94	724,00	-47,10	697,97	-6,75
49	675,82	663,00	-12,82	669,41	-1,92
50	721,77	685,00	-36,77	703,39	-5,23
51	738,72	783,00	44,28	760,86	5,82
52	825,57	785,00	-40,57	805,29	-5,04
53	831,69	819,00	-12,69	825,35	-1,54
54	844,68	824,00	-20,68	834,34	-2,48
55	941,58	911,00	-30,58	926,29	-3,30
56	980,79	1021,00	40,21	1000,90	4,02
57	1028,43	1001,00	-27,43	1014,72	-2,70
58	1038,51	996,00	-42,51	1017,26	-4,18
59	1046,61	989,00	-57,61	1017,81	-5,66
60	1062,39	999,00	-63,39	1030,70	-6,15
61	1121,75	1085,00	-36,75	1103,38	-3,33
62	1143,66	1094,00	-49,66	1118,83	-4,44
63	1172,75	1099,00	-73,75	1135,88	-6,49
64	1206,45	1146,00	-60,45	1176,23	-5,14
65	1364,00	1297,00	-67,00	1330,50	-5,04
66	1488,20	1407,00	-81,20	1447,60	-5,61
67	1713,00	1601,00	-112,00	1657,00	-6,76
68	1835,00	1719,00	-116,00	1777,00	-6,53
69	1928,00	1811,00	-117,00	1869,50	-6,26
70	2068,85	1946,00	-122,85	2007,43	-6,12
Aritmetický průměr (ng/ml)			-18,22		-4,20
SD (ng/ml)			36,26		6,88