

# Standardizace imunoanalytických metod a související klinické aspekty

I. Lochman, P. Malina

Imunoanalytické metody jsou metody využívající ve svém postupu protilátky k detekci antigenů nebo antigeny k detekci protilátek. Antigeny mohou být substance různého původu a složení, které mají afinitu k vazebnému místu protilátky. Protilátky nacházejí široké uplatnění v diagnostických metodách používaných v klinických laboratořích. Průkaz/stanovení samotných antigen-specifických protilátek se využívá k nepřímé diagnostice infekčních, alergických i autoimunitních onemocnění. Specifické, často monoklonální, protilátky se využívají k průkazu/stanovení nádorových, infekčních, ale i běžných antigenů v tělních tekutinách, na sliznicích a v tkáních. Jsou také součástí tzv. buněčných testů, kdy se po kultivaci patientského vzorku s příslušnými stimulans detekují/stanovují těmito metodami různé analyty produkované stimulovanými buňkami jak na povrchu těchto buněk, tak v supernatantech kultur. K vizualizaci těchto reakcí se dnes používají nejčastěji buď enzymem, luminoforem nebo fluorochromem značené protilátky nebo antigeny, což bývá uváděno i v názvu metody (např. ELISA, CLIA, ECLIA, FIA apod.).

Problémem je, že tyto metody není dodnes možné standardizovat. Zatím to bylo oficiálně řečeno jen pro diagnostiku alergen-specifických IgE (1, 2), ale toto konstatování je platné pro imunoanalytické metody obecně. Důvodem je také neexistence dostupných standardů pro látky, jejichž struktura není úplně jednoznačně definovatelná. Takovéto látky nemohou být dostatečně definovány chemickými a fyzikálními metodami, takže u nich není možné zajistit návaznost na jednotku SI a pro numerické vyjadřování velikosti odpovídajících veličin jsou pak používány mezinárodně dohodnuté jednotky (IU). Tak je tomu např. u řady složitějších biologicky aktivních látek jako například proteinových či peptidických hormonů, nádorových markerů bílkovinné povahy apod. Ze skutečnosti, že se v těchto případech nejedná o adekvátně definované analyty pak vyplývá i fakt, že pravá hodnota měřené veličiny je v těchto případech tudíž reálně neznámá. Významnou roli pro zhoršenou porovnatelnost výsledků imunoanalytických metod se

hrávají rovněž skutečnosti vyplývající z přímé podstaty imunochemické reakce, tedy vazby specifické protilátky a antigenu, ovlivněné nejen charakterem stanovovaného analytu, ale i vlastnostmi použitých protilátek (3). Kromě toho se zde také projevuje rozdílnost měřících technologií, principů metod a interních firemních standardizací.

V praxi se to ukazuje ve výstupech ze systémů EHK, kdy jsou vytvářeny zvláštní skupiny tzv. cílových hodnot pro různé výrobce, pokud je pro ně dostatečný počet uživatelů. Potvrzují to i závěry ze studie T01/22: Protilátky proti SARS-CoV-2 (www.sekk.cz, obr. 1). Proto pro tyto metody platí: Pokud výsledek vyšetření použitou metodou neodpovídá anamnéze a vašemu očekávání, opakuj je metodou jinou.

V případě imunochemických metod je důležité informovat klinika o typu použité metody. Při přechodu na metodu jiné provenience se doporučuje provádět určitou dobu paralelní stanovení pomocí staré a nové metody - tzv. „rebaselining“. Hodnoty získané různými soupravami na různých analyzátořích různých výrobců se mohou významně až diametrálně lišit v případě „identického“ analytu, který není dobře definován.

V akreditované laboratoři by měly být metody prováděné laboratoři verifikovány, a to i u diagnostik (testovacích souprav) se značkou CE IVD, popř. FDA. Jejich verifikace je jednodušší než u metod, které tuto značku nemají, a proto by mělo být používání těchto metod preferováno. Validaci souprav u IVD diagnostik by měl provádět již výrobce. S obavami se očekává implementace nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) IVDR 2017/746/EU revidované nařízením 2022/112, které se validací a verifikací také zabývají a její dopad na českou legislativu. Pokud nedojde v původních textech těchto nařízení k úpravám, mohou nastat problémy především u metod, které jsou z diagnostického hlediska velmi významné, ale jsou používány řídko.

Validace je ověření, že specifikované požadavky jsou přiměřené pro zamýšlené použití. Verifikace je potvrzení, že jsou požadované funkční vlastnosti dosaženy. Validaci a verifikaci můžeme rozdělit na analytickou a klinickou. V rámci analytické validace a verifikace by každá laboratoř měla srovnáním s jinými metodami a jejich výkonnostními charakteristikami a analytickými znaky doložit, že jejich metoda dává relevantní výsledky. Měla by si ověřit přesnost, pravdivost a klinickou použitelnost použité metody.



**Obrázek 3.** Tři nejpoužívanější automatizované metody stanovení NT-proBNP v ČR a hodnoty NYHA skóre uvedené v jednotlivých příbalových letáčích

Veličina	Metoda NT-proBNP	NYHA I	NYHA II	NYHA III	NYHA IV
Průměr (pg/ml)	Roche Elecsys	1 016	1 666	3 029	3 465
	Siemens Centaur/Atellica	1 541	4 603	6 565	13 824
	Abbott Architect/Alinity	1 191	1 870	3 360	5 207
Medián (pg/ml)	Roche Elecsys	342	951	1 571	1 707
	Siemens Centaur/Atellica	524	2 266	2 835	8 906
	Abbott Architect/Alinity	454	914	1 783	3 070

NYHA = New York Heart Association

srdečního selhání: >450 pg/ml u věku <55 let, >900 pg/ml u věku 55 až 75 let a >1800 pg/ml u věku >75 let dle příbalového letáku Roche Elecsys NT-proBNP (5) se výsledky významně rozcházejí. Dokládá to jednak práce z motolské laboratoře (4) a také data z příbalových letáků tří metod stanovení NT-pro BNP - Abbott Architect/Alinity, Roche Elecsys a Siemens Atellica (5), která byla porovnána v tabulce na obrázku č.3.

**Závěr:** Opomenutí nedostatečné standardizovatelnosti imunochemických metod v případě nedostatečně definovatelných analytů u řady složitějších biologicky aktivních látek jako například proteinových či peptidických hormonů, nádorových markerů bílkovinné povahy apod. (3) vedoucí k nedostatečné porovnatelnosti různých metod, může být vážným rizikem v péči o pacienty. Konkrétně v případě stanovení NT-proBNP Roche existuje dostatečná evidence jak v oblasti diagnostické, tak v oblasti terapie srdečního selhání vedené podle hodnot NT-proBNP. Za více než 20 let existence metody Roche Elecsys NT-proBNP bylo provedeno nespočet klinických studií u více než 150 000 zdravých jedinců a pacientů pro řadu klinických indikací, které jsou rovněž uváděny jako oficiální zamýšlená použití v příbalovém letáku (5):

1. Diagnostika jedinců se suspektním kongestivním srdečním selháním, a to jak v chronické, tak v akutní podobě
2. Detekce mírných forem kardiálních dysfunkcí
3. Posuzování závažnosti kongestivního srdečního selhání
4. Stratifikace rizika u pacientů s akutním koronárním syndromem a kongestivním srdečním selháním
5. Monitorování průběhu léčby u pacientů s dysfunkcí levé komory

6. Hodnocení kardiovaskulárního rizika u pacientů s DM 2. typu
7. Identifikace rizikových pacientů s DM 2. typu bez známých kardiovaskulárních onemocnění k optimalizaci kardioprotektivní terapie
8. Identifikace starších jedinců s vysokým rizikem fibrilace síní.

Pro stanovení NT-proBNP Siemens a Abbott, která jsou na trhu přibližně o 15 let kratší dobu ve srovnání s metodou Roche bude zapotřebí řada klinických studií k odvození vlastních validních cut-off hodnot, které se budou u pacientů s přítomností srdečního onemocnění velmi pravděpodobně lišit od cut-off hodnot NT-proBNP Roche. Licenční dohoda firmy Roche s ostatními výrobci kitu NT-proBNP zajišťuje pouze některé technické podmínky designu testu, nikoli však záruku pro shodnou klinickou interpretaci a výsledky.

Neuvážené použití cut-off hodnot Roche pro stanovení NT-proBNP soupravou a analyzátozem jiného výrobce by mohlo vést k poddiagnostikování či naopak k over-diagnosis a tím pádem k nedostatečné nebo zbytečné léčbě srdečního selhání. Mohlo by tak být ohroženo zdraví pacientů, zhoršena jejich prognóza a tím pádem i zkrácen život pacientů se srdečním onemocněním. V každém případě je nutné informovat klinika o typu použité soupravy a o její případné změně i s uvedením potenciálních klinických dopadů, protože řada kliniků nedokáže zohlednit aspekty takového změny plynoucí z principu nedostatečné porovnatelnosti imunochemických metod.

## Literatura

1. Cox L, Williams B, Sicherek S, Oppenheimer J, Sher L, Hamilton R, Golden D. Pearls and pitfalls of allergy diagnostic testing: report from

the American College of Allergy, Asthma and Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology Specific IgE Test Task Force. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 2008; 101 (6): 580-592

2. Mattson PEJ, Hamilton RG, Adkinson N.F, Wsch R, Homburger H, Maxim P, Williams B. Analytical Performance Characteristics and Clinical Utility of Immunological Assays for Human Immunoglobulin E (IgE) Antibodies and Defined Allergen Specificities; Approved Guideline-Second Edition, I/LA20-A2 CLSI document 2009, 156 pages
3. Šafarčík K., Bartoš V., Karlíková M. Principy imunoanalytických metod. <https://postudium.cz/mod/book/view.php?id=5374&chapterid=2204>
4. Illner J., Kotaška K., Čepová J., Průša R. Porovnání imunochemického stanovení NT-proBNP na analytických systémech Siemens Atellica IM a Roche cobas 6000. *FONS* 2022; 1: 16-17
5. Příbalový leták Elecsys® proBNP II. 08836752190; 2021-12, V 4.0., příbalový leták Alere NT-proBNP for Alinity i Reagent Kit. 04S79, G82749R04, B4S797, červen 2020, příbalový leták Atellica® IM NT-proBNP (PBNP), 11200584\_CS Rev. 04, 2019-05