

# Doporučení pro vyšetřování nádorových markerů: European Group on Tumor Markers (EGTM) 1999

Podle Sturgeon C., Aronsson A. C., Duffy M. J., Hansson L. O., Klapdorf R., van Dalen A. et al.: European Group on Tumor Markers. *Anticancer Res.* 19, 1999, 2785-2820

volně přeložila RNDr. Marta Šimíčková

## 1. Obecný úvod

Termín „nádorové markery“ (TM) zahrnuje široké spektrum molekul rozdílných vlastností, které se vážou k malignímu procesu, a tím napomáhají klinické detekci (diagnóze, screeningu), monitorování a hodnocení vývoje maligního onemocnění (tab.1). Využití pro diagnostiku má obecně menší význam, i když v některých případech mohou TM k diagnostickému procesu přispět. Výběr TM pro vyšetření před základní terapií u nemocných s podezřením na malignitu je dáno lokalitou suspektního nádoru (tab.1). Diagnostická hodnota nádorového markeru závisí na prevalenci choroby ve zvažované populaci a na senzitivitě a specifitě nádorového markeru. **Specifita** je definována jako procento normálních osob nebo nemocných s benigními chorobami s negativním výsledkem. Čím větší je specifita, tím nižší je falešná pozitivita. **Senzitivita** je procento výsledků, které jsou správně pozitivní, je-li nádor přítomen. Čím větší je senzitivita, tím nižší je falešná negativita. TM mohou napomáhat v diferenciální diagnostice, např. u karcinomů ze zárodečných buněk mohou rozlišit různé buněčné typy nádorů, nebo v pří-

padě neznámého primárního nádoru může vysoká hladina NSE detekovat plicní karcinom, CA 15-3 karcinom prsu apod. Je důležité si uvědomit, že žádný TM není specifický pro danou malignitu, zvýšení může provázet jiné maligní nebo i benigní onemocnění. Normální hladina TM nevyklučuje malignitu nebo návrat choroby. Je prokázáno, že monitorování koncentrace TM po terapii může sloužit jako časný indikátor návratu choroby, často i měsíce před evidentním klinickým průkazem („lead time“ TM). Tento „lead time“ však nemusí být přínosem pro pacienta, není-li možnost aplikace jiné léčby. Časná detekce návratu choroby pomocí TM však může v některých případech nahradit další ekonomicky náročná vyšetření, např. zobrazovací techniky. Pro potvrzení přínosu terapeutického zákroku na podkladě vzestupu hladin TM, který se dosud v klinické praxi neuvádí, je třeba provést další randomizované studie. Vývoj automatizovaných imunoanalýz umožňuje vyšetření TM, dříve centralizované na specializovaných pracovištích, i v běžných rutinních laboratořích. Snadno dostupné výsledky těchto vyšetření mohou vést ke špatným interpretacím, není-li klinik detailně seznámen s jejich hodnocením. Spolu s rostoucím tlakem

na laboratoř redukovat celkové náklady vyšetření, se snahou zavést „medicínu založenou na průkazech“ se objevují různá doporučení, jak lze tyto testy nejlépe užít. Jedním z nich jsou i závěry publikované EGTM, zaměřené na: 1) požadavky na kontrolu kvality stanovení, 2) TM v jednotlivých nádorových lokalizacích (karcinomy prsu, prostaty, gynekologické nádory, gastrointestinální nádory, plicní nádory, nádory zárodečných buněk).

## 2. Požadavky na kontrolu kvality stanovení TM

(Sturgeon C., Dati F., Duffy M. J., Hasholzer U., Klapdorf R., Lamerz R., Malbohan I., Martin M., Troonen H., van Dalen A., Zwirner M.)

### 2.1. Úvod

Kvalita výsledků TM reflektuje události během preanalytické, analytické i postanalytické fáze stanovení. Požadavky na kvalitu stanovení jsou obecně shodné s běžnými laboratorními testy (review viz seznam literatury u překladatele), jak je uvedeno ve stručném výčtu nejdůležitějších zásad.

**2.2. Požadavky pre-analytické.** Pro vyšetřování většiny TM není třeba

	<i>Biochemické vlastnosti</i>	<i>Mol. hmotnost (kDa)</i>	<i>Primární klinická aplikace</i>
<i>Alfa-fetoprotein</i>	<i>Glykoprotein se 4% sacharidů, homologie s albuminem</i>	<i>- 70</i>	<i>Hepatocelulární karcinom a nádory zárodečných buněk (diagnóza a monitorování), prognóza nádorů ze zárodečných buněk</i>
<i>CA 125</i>	<i>Mucin identifikovaný monoklonálními protilátkami</i>	<i>- 200</i>	<i>Ovariální ca (monitorování, prognóza po chemoterapii)</i>
<i>CA 15-3 (BR.27.29)</i>	<i>Mucin identifikovaný monoklonálními protilátkami</i>	<i>&gt; 250</i>	<i>Karcinom prsu (monitorování)</i>
<i>CA 72-4</i>	<i>Glykoprotein identifikovaný monoklonálními protilátkami</i>	<i>- 48</i>	<i>Karcinom žaludku (monitorování)</i>
<i>CA 19-9</i>	<i>Glykolipidid nesoucí Lewisa determinantu</i>	<i>- 1 000</i>	<i>Karcinom slinivky (monitorování)</i>
<i>Karcinoembryonální antigen (CEA)</i>	<i>Glykoproteinová rodina, 45-60% sacharidů</i>	<i>- 180</i>	<i>GIT a další karcinomy (monitorování)</i>
<i>CYFRA 21-1</i>	<i>Fragmenty cytokeratinu 19</i>	<i>- 30</i>	<i>Ca plic a močového měchýře (monitorování)</i>
<i>Estrogenový receptor</i>	<i>Nukleární transkripční faktor</i>	<i>65</i>	<i>Ca prsu (predikce odpovědi na endokrinní terapii)</i>
<i>Lidský choriový gonadotropin (hCG)</i>	<i>Glykoproteinový hormon, <math>\alpha</math> a <math>\beta</math>-podjednotka</i>	<i>- 36</i>	<i>Neseminomy, chorio-ca, hydatidiformní mola (diagnóza, monitorování), nádory zárodečných buněk (prognóza)</i>
<i>Neuron-specifická enoláza (NSE)</i>	<i>Dimer enzymu enolázy</i>	<i>- 87</i>	<i>Malobuněčný ca plic, neuroblastom, apudom (monitorování)</i>
<i>Placentární alkalická fosfatáza (PLAP)</i>	<i>Termostabilní izoenzym alkalické fosfatázy</i>	<i>- 86</i>	<i>Seminomy (monitorování) *</i>
<i>Progesteronový receptor</i>	<i>Nukleární transkripční faktor</i>	<i>A forma: - 94 B forma: - 120</i>	<i>Ca prsu (predikce odpovědi na endokrinní terapii)</i>
<i>Prostatický specifický antigen (PSA)</i>	<i>Glykoprotein, serinová proteináza</i>	<i>- 36</i>	<i>Ca prostaty (diagnóza, screening, monitorování)</i>
<i>Antigen skvamózních buněk (SCC)</i>	<i>Glykoproteinová subfrakce antigenu T4</i>	<i>- 48</i>	<i>Karcinomy skvamózních buněk (monitorování)</i>
<i>Tkáňový polypeptidový antigen (TPA)</i>	<i>Fragment cytokeratinu 8,18,19</i>	<i>- 22</i>	<i>Ca plic a močového měchýře (monitorování)</i>
<i>Tkáňový polypeptidový specifický antigen (TPS)</i>	<i>Fragment cytokeratinu 18</i>	<i>- 22</i>	<i>Metastatický ca prsu (monitorování)</i>

Tab.1: Vlastnosti TM

\* Pozn. překladatele: Jeden z nadějných TM, dosud zveřejněny malé počty studií

dodržovat určité časování odběru. Někdy však mohou falešně zvýšené hodnoty vést k nežádoucímu stresu pacientů, zbytečným alarmům a z toho plynoucí nedůvěře k laboratorním vyšetřením (např. vyšetření PSA při prostatitidě, odběr hCG bezprostředně po chemoterapii atd.). Pro určité analyty je nutné dodržovat instrukce výrobce týkající se např. typu vzorku (sérum x plasma), délky

a podmínek oddělení krevních elementů, skladování vzorku atd. (tab.2). Je odpovědností laboratoře informovat kliniky o těchto podmínkách odběrů.

**2.3. Požadavky na analytickou fázi.** Uspokojivý výsledek měření analytu musí splňovat kritéria vnitřní i vnější kvality kontroly (IQA, EQA) (tab.3). Laboratoř si musí být vědoma možných úskalí měření jednotlivých

TM, která mohou vést k vážným diagnostickým chybám (tab.4).

**2.4. Post-analytické předpoklady.** Vzhledem ke zvýšené spolehlivosti měření TM na automatických analyzátořech je možno zaměřit se na maximální klinické využití těchto důležitých testů. Hlavní aspekty postanalytické interpretace TM jsou uvedeny v tab.5 a 6.

Čas odběru vzorku	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Je třeba odebrat vždy vzorek před terapií.</li> <li>• Diurnální variace pro většinu TM neprokázána.</li> <li>• Vliv postoperačního peritoneálního traumatu může vést k falešně pozitivním výsledkům (např. CA 125).</li> <li>• Je vhodné vyloučit odběr séra během menstruace (např. pro CA 125 při screeningu).</li> <li>• Vyloučení manipulace prostaty před odběrem na stanovení PSA snižuje ev. falešnou pozitivitu (prostatická biopsie, transuretrální resekce, katetrizace, digitální rektální vyšetření, ejakulace), dále vyloučení odběru PSA při infekci močových cest, prostatitidě.</li> </ul>
Vliv diagnostických nebo léčebných postupů	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interference lidských anti-mýších protilátek (HAMA) vede k falešné pozitivitě. Doporučeno značit léčbu monoklonálními protilátkami na žádanku.</li> </ul>
Vliv poškození ledvin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Falešně zvýšené hladiny CEA, TPA a dalších cytokeratinů.</li> <li>• Je třeba lépe prostudovat a dokumentovat.</li> </ul>
Vliv cholestázy	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Může vést ke zvýšení CA 19-9.</li> </ul>
Kontaminace slinami	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Falešně zvýšené hodnoty CA 19-9, SCC, CEA, TPS.</li> </ul>
Typ vzorku	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Obvykle je vhodné jak sérum, tak i plasma.</li> <li>• Diference mezi sérem a EDTA-plasmou mohou být způsobeny vlivem komplementu nebo užitím separací séra na gelu.</li> </ul>
Stabilita vzorku	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TM obecně stabilní, separaci séra a úschovu při 4 °C (krátkodobě) nebo minus 30 °C (dlouhodobě) však provést co nejrychleji, pro fPSA nejpozději do 3 hod.</li> <li>• Zabíjení vzorku nežádoucí (obzvláště pro hCG, PSA).</li> </ul>

Tab.2: Pre-analytické požadavky pro odběr vzorku na stanovení TM

<b>Interní kontrola kvality (IQA)</b>	
Reprodukovatelnost	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Intra-assay variabilita &lt; 5%, interassay variabilita &lt; 10%.</li> </ul>
Kritéria pro přijetí stanovení	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Výběr vhodných logických kritérií pro IQC, např. Westgardova pravidla.</li> </ul>
Kontroly co nejvíce podobné autentickým séřům nemocných	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Není doporučeno spoléhat se pouze na kontrolní materiál poskytnutý v soupravě.</li> <li>• Je doporučeno užívat kontrolu se srovnatelnou sérovou matrix z jiných zdrojů.</li> </ul>
Vzorky IQC o koncentracích vhodných pro klinickou aplikaci	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Koncentrace analytu v kontrolách má pokrývat celé měřené rozmezí, tj. v rámci referenčních hodnot, mírně i výrazně zvýšené hladiny.</li> </ul>
Stanovení interference	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Příležitostně je třeba kontrolovat interferenci (např. HAMA, látky užívané pro separaci séra atd.).</li> </ul>
<b>Externí kontrola kvality (EQA)</b>	
Vhodná koncentrace kontrolních vzorků	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Koncentrace pokrývající pracovní oblast měřeného analytu, i včetně ředěných vzorků, ev. vzorků bez obsahu testovaného analytu.</li> </ul>
Dlouhodobá „stabilita“	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Opakované stanovení téhož vzorku v průběhu např. 6-12 měsíců.</li> </ul>
Správnost a reprodukovatelnost cílových hodnot	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mezinárodní standardy definovány pouze pro AFP (BS 72/225), hCG (IS 75/537) a CEA (IRP 63/601).</li> <li>• Ostatní TM jsou definovány na podkladě průměru všech laboratoří („consensual mean“).</li> </ul>
Interpretace	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Srovnání různých laboratorních způsobů práce.</li> </ul>

Tab.3: Analytické předpoklady kontroly kvality měření TM

Vliv zahnutí křivky při vysoké dávce („hook effect“)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Měřitelná oblast koncentrace TM obvykle přesahuje několik řádů, zahnutí křivky při výrazně vysokých koncentracích analytu může vést k falešné negativitě, obzvláště u vzorků stanovených poprvé.</li> <li>Minimalizace tohoto jevu: stanovení vzorku ve dvou ředěních, sekvenční stanovení s promývacím stupněm, protilátky na pevné fázi s vyšší vazebnou kapacitou.</li> </ul>
Přenos mezi vzorky	<ul style="list-style-type: none"> <li>Možný obzvláště u vysokých koncentracích analytu.</li> <li>Je třeba příležitostně kontrolovat.</li> </ul>
Interference HAMA	<ul style="list-style-type: none"> <li>Přítomnost HAMA, indukovaných u nemocných po užití myších monoklonálních protilátek k zobrazení nebo terapii.</li> <li>Průkaz interference: stanovení v přítomnosti blokujičho činidla, ev. přidavkem myšního neimunního séra, ev. stanovením jinou metodou.</li> </ul>

Tab.4: Možné příčiny chybných výsledků TM

Klinická informace ordinujícího lékaře	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ke každému odběru je třeba uvést stručnou klinickou informaci (např. pooperační odběr, po 6. cyklu chemoterapie. *</li> </ul>
Příslušné referenční rozmezí	<ul style="list-style-type: none"> <li>Obvykle definováno pro zdravou populaci, jsou vhodné především pro nemocné před a bezprostředně po primární léčbě. **</li> <li>Je výhodné stanovit vlastní bazální linie individuálního nemocného.</li> <li>Klinický význam má i vzestup hladin TM i v rámci referenčního rozmezí</li> </ul>
Klinicky relevantní změna koncentrace	<ul style="list-style-type: none"> <li>Zahrnuje biologickou i analytickou variabilitu.</li> <li>Obvykle je to vzestup nebo pokles o 25%, je třeba dále upřesnit.</li> </ul>
Postup při změně metody	<ul style="list-style-type: none"> <li>Indikovat změnu metody na dlouhodobém výpisu.</li> <li>Analyzovat předchozí odběr novou metodou, ev. potvrdit hodnotu (ať už reálný trend, nebo posun v základní linii hladiny TM novým odběrem v kratším časovém intervalu.</li> </ul>
Znalost poločasu TM v krvi	<ul style="list-style-type: none"> <li>Poločas jako 50% snížení koncentrace v cirkulaci po kompletním odstranění nádoru.</li> <li>Především vhodné pro AFP, hCG.</li> </ul>
Využitelnost TM	<ul style="list-style-type: none"> <li>Objektivní klinická informace o využitelnosti TM.</li> </ul>

Tab.5: Požadavky na post-analytickou interpretaci

Pozn. překladatele:

\* Údaj o klinickém stavu a terapii je vhodné definovat co nejpřesněji, kódování (např. CR, PD apod) značně zjednoduší další statistické zpracování.

\*\* Doporučujeme znát rovněž cut-off pro skupinu benigních onemocnění, ev. referenční rozmezí pro nemocné v kompletní remisi, které může být proti hodnotám normální populace zvýšené.

2.5. Závěr. Význam provedení vysoce kvalitního analytického servisu pro stanovení TM je pouze stručně naznačen, pro další informace viz citovaná literatura u překladatele.

Kumulativní výsledky s klinickými údaji	<ul style="list-style-type: none"> <li>Informativní je trend v koncentraci TM.</li> <li>Grafická interpretace je výhodná.</li> </ul>
Frekvence měření	<ul style="list-style-type: none"> <li>Závisí na typu TM, poločasu, fázi onemocnění.</li> </ul>
Konfirmace	<ul style="list-style-type: none"> <li>Další odběry v případě výrazného růstu hladiny TM potvrdí nebo vyvrátí trend.</li> </ul>
Komunikace laboratoř - klinické pracoviště.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Je nutná pro usnadnění dobré interpretace výsledků</li> </ul>

Tab.6: Požadavky na souhrnný servis stanovení TM