

Zkušenosti s novou reagenční soupravou Elecsys Prolactin II

Možnosti přesného a mezilaboratorně porovnatelného stanovení prolaktinu, proteohormonu důležitého k navození a udržování laktace savců, jsou v současné době omezeny rozdílnou zkříženou reaktivitou protilátek jednotlivých reagenčních souprav na jednu z forem prolaktinu - biologicky neaktivní makroprolaktin. Laboratoř OKBH Endokrinologického ústavu po dobu 20 měsíců sledovala u rutinních vyšetření prolaktinu podíl makroprolaktinu na celkovém obsahu stanovovaného analytu, a to postupně dvěmi generacemi souprav firmy Roche - Elecsys Prolactin I a Elecsys Prolactin II. Výsledky jsou diskutovány v tomto článku.

Úvod

Prolaktin (PRL, laktogenní hormon, mamotropin) je proteohormon tvořený 198 aminokyselinami a secernovaný laktotropy patřícími k acidofilním buňkám adenohipofýzy. Jeho hlavní fyziologickou funkcí je navození a udržování laktace u savců. U jiných živočišných druhů může mít i další účinky (např. svlékání kůže plazů) (1).

Prolaktin se v normálním séru vyskytuje jako monomerní „malý“ prolaktin s molekulovou hmotností 23 kDa, se zastoupením asi 85 - 95 % a dále „velký“ (big-PRL) prolaktin s molekulovou hmotností do 100 kDa. Další možnou formou je makroprolaktin (big-big prolaktin, makro-PRL) o molekulové hmotnosti nad 150 kDa. Jde o komplex prolaktinu a anti-prolaktinu IgG. Mimo výše zmiňovaných agregátů prolaktinu se mohou v cirkulaci objevovat také jeho fragmenty o velikosti 8 - 16 kDa (2). Sekrece prolaktinu je pulsativní a je kontrolována prolaktin inhibičním faktorem (PIF). Cílovým orgánem pro prolaktin je mléčná žláza, kdy během těhotenství hladina prolaktinu stoupá pod vlivem vzrůstající produkce estrogenů a progesteronu. Krátce po porodu hladina estrogenu prudce poklesne a prolaktin stimuluje mléčnou žlázu k iniciaci laktace. Prolaktin má však i další metabolické funkce jako je například retence draselných a fosforeč-

ných iontů. Vysoké hladiny prolaktinu inhibují steroidogenezu v ovariích (3).

Stanovení hladin makroprolaktinu při současném stanovení prolaktinémie je důležité především z hlediska managementu terapie, protože za biologicky aktivní je považován pouze monomerní prolaktin. Makroprolaktin nevykazuje biologickou aktivitu, čímž však není dotčena jeho schopnost imunoreaktivity spojené s tvorbou specifických autoprotilátek reagujících s jeho makromolekulami (4). Známé procentuální zastoupení makroprolaktinu je výchozí při diagnosticko-terapeutickém algoritmu hyperprolaktinémie.

Hyperprolaktinémie je často příčinou poruch menstruačního cyklu, galaktorey nebo sterility u žen a impotence a gynekomastií u mužů. Hyperprolaktinémie je nejčastěji důsledkem přítomnosti adenomu hypofýzy - tzv. mikroprolaktinomu, a to až v 90 % a dále při chronickém renálním selhání, hypothyreóze a iatrogeně při léčbě některými typy antidepressiv (5). Chirurgická léčba je využívána v případech makroprolaktinomů s mechanickým útlakem, ostatní hyperprolaktinémie jsou řešeny farmakologicky s použitím antagonistů dopaminergních receptorů např. Bromocriptin, Cabergolin (6).

Současná instrumentální analýza nabízí několik možností stanovení makroprolaktinu. K nejběžnějším patří gelová chro-

matografie, ultrafiltrace nebo precipitace s polyethylenglykolem (PEG) v návaznosti na stanovení celkových hladin prolaktinu imunochemicky (4,7,8).

Naše laboratoř započala se stanovením prolaktinu v séru v roce 2004 s diagnostickou soupravou Elecsys Prolactin (Roche) na automatickém analyzátoru Modular E170 využívajícím principu elektrochemiluminiscence. Poměrně vysoké procento výsledků nad referenčním rozmezím s podezřením na současnou detekci makroprolaktinu si zanedlouho (říjen 2005) vyžádalo současné rutinní stanovování makroPRL, a to metodou precipitace s PEG. V květnu 2006 uvedla firma Roche na trh novou soupravu Elecsys Prolactin II, u které se předpokládalo vylepšení kitu především z hlediska minimalizace zkřížených reakcí s makroprolaktinem.

Tato práce se pokusila zmapovat stav stanovení prolaktinu a makroprolaktinu s použitím diagnostické soupravy Elecsys Prolactin I. a následně II. generace.

Metodika, porovnávání soubory

V rámci laboratoře OKBH Endokrinologického ústavu bylo provedeno v období 31. 10. 2005 - 9. 1. 2007 u pacientů celkem 1730 stanovení prolaktinu, z toho původní soupravou Elecsys Prolactin 948 vyšetření (31. 10. 2005 - 2. 6. 2006) a novou soupravou Elecsys Prolactin II 782 vyšetření (5. 6. 2006 - 9. 1. 2007). V tomto souboru byli zahrnuti pacienti s nejrůznějšími diagnózami, především pak hyperprolaktinemií, ovariálními dysfunkcemi, thyroditidami, hypofyzárními dysfunkcemi a jinými endokrinními onemocněními.

Vyšetření byla provedena na imuno-

nalyzátoru Modular E 170 pracujícím na principu elektrochemiluminiscence. U vzorků se zjištěným obsahem prolaktinu větším než 50 ng/ml (1060 mIU/l) bylo následně vždy provedeno recovery po vysrážení podílu makroprolaktinu polyethylenglykolem. Hranice 50 ng/ml byla stanovena účelově pro potřeby lékařů našeho zařízení po dohodě s nimi.

Metodika převzatá z literatury (4) využívá srážení séra 25% roztokem PEG 6000 v fosfátovém pufru o pH 7,4 v podílu 1:1 (300 µl séra + 300 µl 25% PEG protřepat na vortexu 1 minutu, inkubace 10 minut při laboratorní teplotě a následná centrifugace při 3000g 30 minut). V supernatantu byl stanoven znovu prolaktin a vypočítáno recovery v % původního stanovení. Kvůli správné reprodukovatelnosti bylo druhé stanovení prováděno vždy v týž den jako první, materiál nebyl mezitím zmrazován ani rozmrazován.

Interpretace výsledků byla prováděna dle schématu (tab. 1):

Uváděné výpočty a grafy byly vytvořeny v programu Microsoft Excel a statistickém programu GraphPad Prism 4 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA).

Výsledky

Základní statistika

Jak vyplývá z tabulky č.2., zavedením nové metody se změnila hodnota referenčního rozmezí k nižším hranicím jak u mužů, tak u žen. Ve shodě s tím poklesly u nového stanovení absolutní hodnoty výsledků vyšetření prolaktinu jak v průměru, tak v mediánu. Počet výsledků nad 50 ng/ml, u kterých bylo třeba provádět doplňkové recovery vyšetření obsahu makroprolaktinu, poklesl u nového testu zhruba o polovinu - z 12,2 % na pouhých 6,3 %. Vzhledem k tomu, že porovnávaná období sledování výsledků u pacientů byla dostatečně dlouhá a skladba diagnóz v obou obdobích prakticky shodná (graf č.1), lze předpokládat, že tyto statisticky významné změny (Mann-Whitney test, $P < 0,0001$) byly způsobeny změnou reagenční soupravy.

Podíl makroprolaktinu ve stanovení

U vzorků se zjištěným obsahem prolaktinu vyšším než námi stanovená mez 50 ng/ml jsme prováděli následně druhé stanovení po vysrážení přítomného makroprolaktinu.

Recovery	Interpretace
<30 %	Výsledek ovlivněn přítomností makroprolaktinu v séru
30 - 65 %	Nejednoznačné výsledky - nelze přesně určit vliv makroprolaktinu na výsledek vyšetření
>65 %	V séru je predominantní monomerní složka prolaktinu

Tabulka 1. Interpretace výsledků při stanovení podílu makroprolaktinu

		Elecsys Prolactin	Elecsys Prolactin II
Referenční rozmezí (ng/ml)	Muži	4,6 - 21,4	4,1 - 15,3
	Ženy	6,0 - 29,9	4,8 - 23,4
Celkový počet vyšetření		948	782
Průměr (ng/ml)		30,1	19,2
Směrodatná odchylka		46,2	22,9
Medián		17,7	13,2
Minimum		0,70	0,2
Maximum		639,3	228,5
Výsledky > horní referenční mez		249	182
% z celkového počtu vyšetření		26	23
Výsledky > 50 ng/ml		116	48
% z celkového počtu vyšetření		12,2	6,3

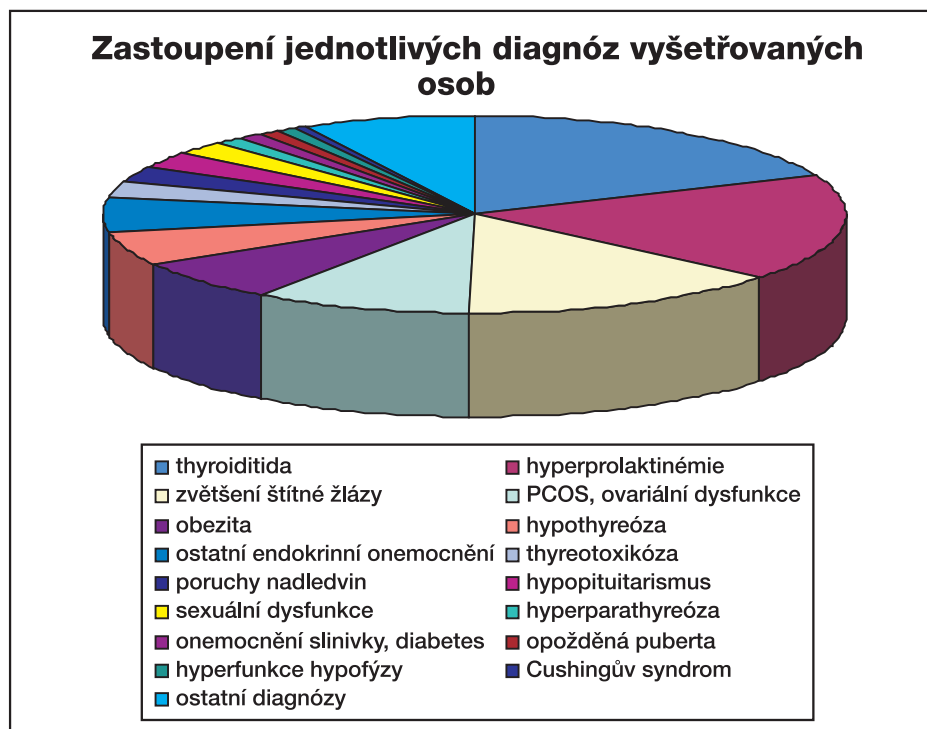
Tabulka 2: Základní charakteristika souborů

	Prolactin I (XI. 2005 - V. 2006)		Prolactin II (VI. 2006 - I. 2007)	
	Počet	%	Počet	%
S makroprolaktinem	45	38,8	0	0
Nejednoznačné	14	12,1	7	14,3
Bez makroprolaktinu	57	49,1	41	85,7

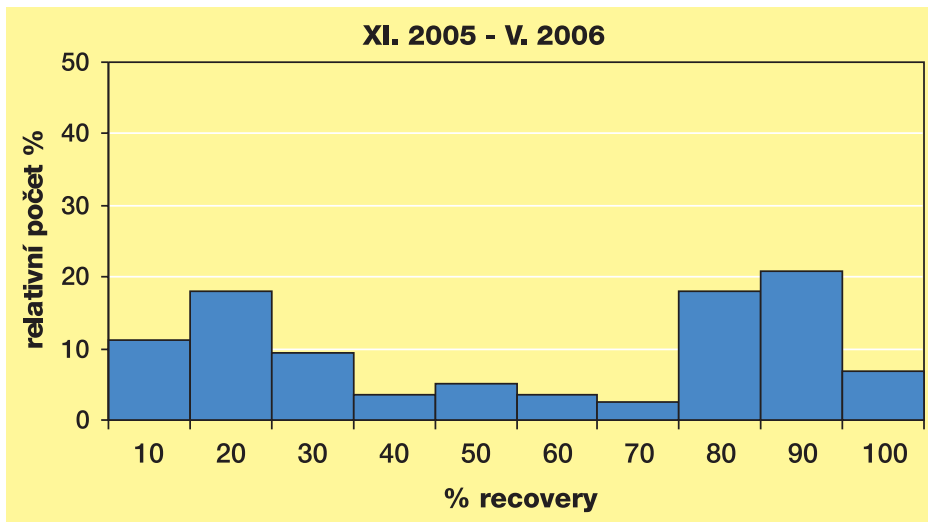
Tabulka 3: Stanovení podílu makroprolaktinu ve vzorcích s obsahem prolaktinu > 50 ng/ml

V případě reagenční soupravy Elecsys Prolactin šlo o 116 vzorků, tj. 12,2 % z celkového stanoveného množství. V případě

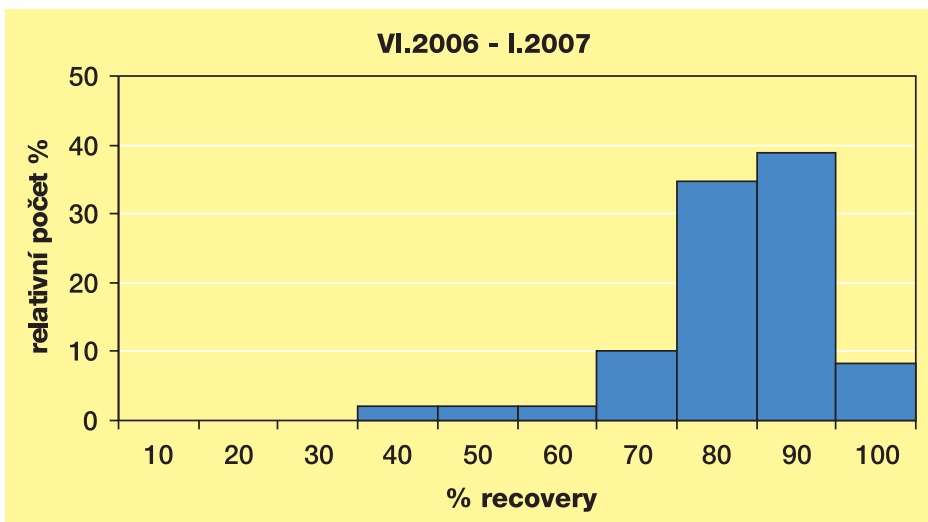
nové soupravy Elecsys Prolactin II počet vysokých vzorků klesl na 48, tedy na 6,3 %. Zjištěné výsledky obsahu makro-



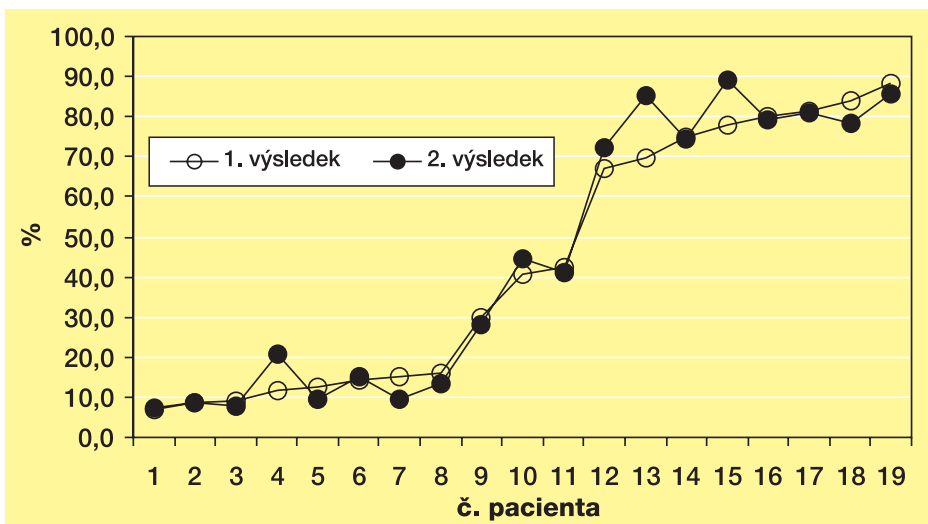
Graf 1. Podíl jednotlivých diagnóz u osob vyšetřovaných na obsah prolaktinu v séru



Graf 2: Souprava Elecsys Prolactin I - % recovery po vysrážení makroprolaktinu



Graf 3: Souprava Elecsys Prolactin II - % recovery po vysrážení makroprolaktinu



Graf 4: % recovery u jednotlivých pacientů (obě vyšetření soupravou Prolactin I)

prolaktinu vykázaly s novou reagenční soupravou také změny zobrazené v grafech č.2. a č.3.

Zatímco v případě původní reagenční soupravy byla ve 38 % prokázána ve stanoveném vzorku přítomnost makroprolaktinu,

u nové soupravy Elecsys Prolactin II byl počet vzorků, ve kterých se na celkovém obsahu prolaktinu podílel jednoznačně makroprolaktin, nulový. Naopak počet vzorků bez prokázání makroprolaktinu vzrostl z 57 % na 86 %. (tabulka 3.)

Porovnání výsledků stanovení makroprolaktinu u jednotlivých pacientů

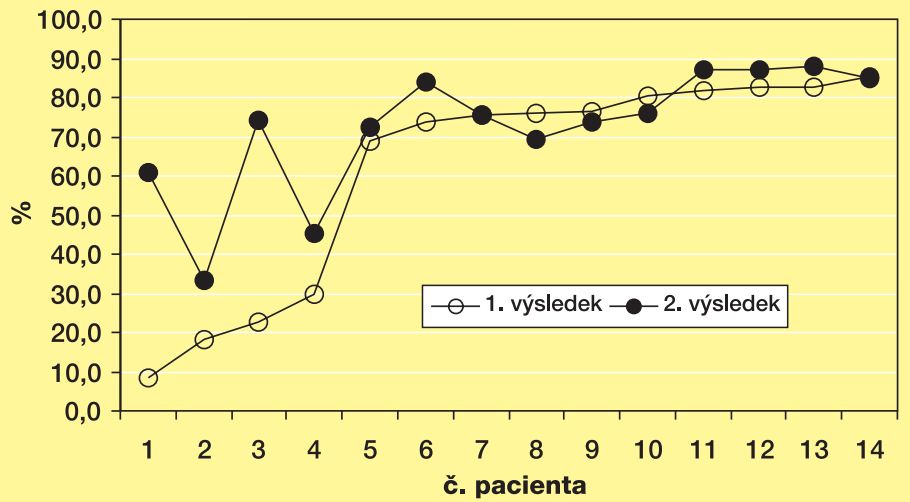
Ve sledovaných obdobích jsme měli možnost porovnat i data u konkrétních pacientů, kterým byl prolaktin stanovován opakovaně po určitém období. Zatímco hodnoty celkového prolaktinu se často i výrazně lišily v závislosti na léčbě i dalších faktorech, podíl makroprolaktinu u individuálních pacientů byl ve většině případů na stejné úrovni (viz graf 4 a 5). Jedinou výjimku tvořili pacienti, u kterých bylo každé měření provedeno jinou soupravou. Pokud první souprava v tomto případě prokázala přítomnost makroprolaktinu, při stanovení soupravou druhé generace již detekován nebyl (vzorky 1.-4. v grafu 5).

Diskuse a závěr

Stanovení prolaktinu je jedním ze základních vyšetření v endokrinologii a reprodukční medicíně. Kvalitní laboratorní analýza je tak nezbytná pro další diagnostiku a eventuální terapii. Tato práce se pokusila zmapovat trendy ve vývoji stanovení prolaktinu a makroprolaktinu za použití testu Elecsys Prolactin (Roche) I. a II. generace.

K samotnému porovnání byl použit soubor osob léčených či vyšetřovaných v Endokrinologickém ústavu v Praze v období roku 2005 - 2007. Mezi nejčastější diagnózy vyšetřovaných osob patřila thyroditida, hyperprolaktinémie a syndrom polycystických ovárií.

Po zavedení metodiky na oddělení bylo naším cílem zjistit, jak námi používaná souprava reaguje na přítomnost makroprolaktinu v séru. Výsledky zjištěné u náhodných vzorků byly podnětem k zahájení paralelního rutinního stanovování podílu makroprolaktinu na celkovém výsledku ve vzorcích s vysokým obsahem prolaktinu. Při používání reagenční soupravy I. generace Elecsys Prolactin při celkovém záchytu 12 % patientských vzorků nad 50 ng/ml činilo množství vzorků s detekovaným makroprolaktinem 38,8 %, bez makroprolaktinu pak 49,1 %. Po přechodu na novou reagenční soupravu II. generace Elecsys Prolactin II jsme při celkovém záchytu 6,3 % vzorků nad 50 ng/ml v žádném séru nedetekovali jednoznačně přítomnost makroprolaktinu a množství vzorků bez makroprolaktinu vzrostlo na 85,7



Graf 5: % recovery u jednotlivých pacientů (druhé vyšetření soupravou Prolactin II)

% . Tato skutečnost se nám zdá dostatečným důkazem pozitivní změny u soupravy II. generace z hlediska snížení zkřížených reakcí s makroprolaktinem.

S přihlédnutím k tomuto faktu naše laboratoř z praktických důvodů ustoupila od rutinního sledování obsahu makroprolaktinu ve všech vysokých vzorcích. Toto zpřesnění analýzy je nadále k dispozici v individuálních a opodstatněných případech. Samozřejmě zůstává i další důsledné sledování metodiky jako takové. Věříme, že výsledky naší srovnávací práce mohou přinést užitek i dalším pracovištím zabývajícím se stanovením prolaktinu stejným analytickým systémem, i vyšetřovaným klientům, kteří zůstávají na prvním místě našeho zájmu.

Literatura:

1) Granner D. K.: *Hormony hypofýzy a hypothalamu*. V: Harperova biochemie, Murray R.K. a kol., H a H, Praha, 521-533, 2001.
 2) Suliman A.M., Smith T.P., Gibney J., McKenna T.J.: *Frequent misdiagnosis and mismanagement of hyperprolactinemic patients before the introduction of macroprolactin screening: application of a new strict laboratory definition of macroprolactinemia*, *Clin. Chem.* 49 (9): 1504-1509, 2003.
 3) Buhimschi C.S.: *Endocrinology of lactation*,

Obstet. Gynecol. Clin. North. Am. 31 (4): 963-79, 2004.
 4) Escobar-Morreale H.F.: *Macroprolactinemia in women presenting with hyperandrogenic symptoms: implications for the management of polycystic ovary syndrome*, *Fertil. Steril.* 82(6): 1697-1699, 2004.
 5) Todd J.F.: *Prolactin disorders*, *Medicine* 33 (11): 16-17, 2005.
 6) Crosignani P.G.: *Current treatment issues in female hyperprolactinaemia*, *Eur. J. Obstet.*

Gynecol. Reprod. Bio. 125 (2): 152-164, 2006.
 7) Prazeres S., Santos M.A., Ferreira H.G., Sobrinho L.G.: *A practical method for the detection of macroprolactinemia usiny ultrafiltration*, *Clin. Endocrinol.* 58: 686-690, 2003.
 8) Gibney J, Smith TP, McKenna TJ: *The impact on clinical practice of routine screening for macroprolactin*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90 (7): 3927-3932, 2005

Roche v boji proti AIDS

Tradiční zimní AIDS walk, který se koná vždy v Den světového boje proti AIDS 1. prosince, je hlavní a celosvětovou aktivitou, již Roche přispívá k boji proti AIDS. Všichni zaměstnanci poboček Roche po celém světě vyberou mezi sebou finanční dary na podporu vzdělávání sirotků v Malawi, jedné z afrických zemí, kde je onemocnění AIDS velice časté. Částku vybranou svými zaměstnanci Roche zdvojnásobí a věnuje organizaci ECPP (European Coalition of Positive People), provozující v Malawi střediska denní péče o děti, jež přišli v důsledku infekce HIV o oba rodiče. Celková vybraná částka za všechny ročníky se vyšplhala na téměř 4 miliony švýcarských franků.

Od loňského října spolupracuje Roche také s organizací UNICEF, a to na projektu „Schools for Africa“, který řídí UNICEF ve spolupráci s nadací Nelsona Mandely.

V rámci České republiky jsme loni přispěli k boji proti šíření viru HIV velkou osvětovou akcí. V srpnu jsme uspořádali tiskovou konferenci pod názvem „Nechte si udělat test HIV - včasná diagnóza vám může zachránit život“.

V ČR žije v současné době 981 HIV infikovaných osob, u 202 z nich bylo diagnostikováno onemocnění AIDS, 121 nemocných doposud zemřelo. Odborníci však předpokládají, že počet HIV infikovaných v naší populaci je až 5 až 10krát



vyšší než uvádějí oficiální statistiky.

Letos bychom chtěli započít spolupráci s organizací ACET (AIDS Care, Education and Training - Sdružení pro péči, vzdělání a vyučování o AIDS), která pořádá na českých základních a středních školách přednášky o prevenci AIDS. ACET se této přednáškové činnosti věnuje již 11 let a oslovil již více než 700 tisíc studentů.