

Jugoslav Med Biohem 25: 89–101, 2006

Revijski rad  
Review paper

## TUMORSKI MARKERI: METODE ODREĐIVANJA

Sanja Stanković

Institut za medicinsku biohemiju, Klinički centar Srbije i Farmaceutski fakultet  
Univerziteta u Beogradu, Beograd

*Kratak sadržaj:* Tumorski marker je supstanca koju produkuje tumor ili domaćin kao odgovor na prisustvo tumora i koji se koristi da diferencira tumor od normalnog tkiva ili da utvrdi prisustvo tumora na osnovu merenja u krvi ili sekretima. Tumorski markeri se u laboratorijama mogu meriti različitim analitičkim i instrumentalnim tehnikama koje obuhvataju određivanje aktivnosti enzima, imunoodređivanja (radio imunoodređivanje, enzimsko imunoodređivanje, mikročestica enzimsko imunoodređivanje, hemiluminiscencija, elektrohemiluminiscencija), elektroforezu, kao i masenu spektrometriju i »microarray« sisteme za određivanje proteinskih i genetskih tumorskih markera. Neslaganja u vrednostima tumorskih markera, zahtevi u smislu obezbeđivanja kvaliteta određivanja koji se odnose na pre-, analitičku i postanalitičku fazu, poređenje rezultata tumorskih markera i potencijalne interferencije koje se mogu javiti prilikom određivanja biće detaljno razmatrane u ovom radu.

*Cljučne reči:* tumorski markeri, imunoodređivanje, interferencije

Tumorski marker je supstanca koju produkuje tumor ili domaćin kao odgovor na prisustvo tumora i koji se koristi da diferencira tumor od normalnog tkiva ili da utvrdi prisustvo tumora na osnovu merenja u krvi ili sekretima. Takve supstance su pronađene u ćelijama, tkivima ili telesnim tečnostima i mogu se određivati kvalitativno ili kvantitativno hemijskim, imunološkim ili metodama molekularne biologije. Određivanje tumorskih markera u telesnim tečnostima doprinosi dijagnostici i lečenju pacijenata obolelih od malignih bolesti. Od 1847. god kada je Henry Bence Jones opisao prisustvo lakih lanaca imunoglobulina u urinu pacijenata s multiplim mijelomom, preko imunoelektroforeze sredinom dvadesetog veka, razvoja RIA tehnika 1960-tih do korišćenja monoklonskih antitela za određivanje tumorskih markera kao i za identifikaciju novih molekula povezanih sa kancerom, dalji razvoj imunometrijskih testova i njihova automatizacija, omogućio je širu primenu odre-

đivanja ovih markera i u rutinskim biohemijskim laboratorijama. Tumorski markeri se u laboratorijama mogu meriti različitim analitičkim tehnikama uključujući određivanje aktivnosti enzima, imunoodređivanja, testove na receptore i instrumentalnim tehnikama kao što su hromatografija, elektroforeza, masena spektrometrija/tečna (gasna) hromatografija i »microarray« sistemi. Merenje enzimske aktivnosti svakako je jedna od prvih korišćenih analitičkih metodologija za određivanje tumorskih markera. Najširu primenu u određivanju tumorskih markera našla su imunoodređivanja (testovi sa obeleživačima). Dva osnovna tipa reakcija koja se koriste u u imunohemijskim određivanjima analiza su kompetitivna (sa ograničenom količinom reagensa) i nekompetitivna (višak reagensa, dvostrani ili sendvič testovi) (1).

### Kompetitivno imunoodređivanje

U jednostepenom kompetitivnom imunoodređivanju svi reaktanti se dodaju istovremeno. Obeleženi i neobeleženi antigen takmiče se za vezivanje za ograničenu količinu antitela, pri čemu aviditet antitela za obeleženi i neobeleženi antigen mora biti isti; neobeleženi antigen blokira mogućnost obeleženog antigena da se veže jer je vezujuće mesto na antitelu već

Adresa autora:

Sanja Stanković  
Institut za medicinsku biohemiju  
Klinički centar Srbije i Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu  
Tel/fax: +381 11 3615631  
e-mail: sanjast@EUnet.yu

zauzeto. Verovatnoća vezivanja obeleženog antigena za antitelo obrnuto je proporcionalna koncentraciji neobeleženog antigena, tj. količina obeleženog antigena koja se vezala za antitelo je obrnuto proporcionalna koncentraciji neobeleženog antigena iz uzorka (količina antigena u uzorku je obrnuto proporcionalna dobijenom signalu).

U dvostepenom kompetitivnom imunoodređivanju, neobeleženi antigen iz uzorka se vezuje za antitela (koncentracija antitela u reakcionoj smeši prisutna je u višku u poređenju sa koncentracijom antigena). U drugom stupnju reakcije dodaje se obeleženi antigen. Nakon separacije određuje se količina obeleženog antigena i koristi se za izračunavanje koncentracije neobeleženog antigena. Koristeći dvostepeni metod, veća frakcija neobeleženog antigena može da se veže za antitelo nego u jednostepenim testovima, posebno kada je koncentracija antigena veoma mala. Manje vezanog obeleženog antigena ukazuje na to da je više antigena prisutno u uzorku. Dvostepeni testovi obezbeđuju i do nekoliko puta veću osetljivost testa u poređenju sa jednostepenim.

### **Nekompetitivno imunoodređivanje (sendvič tehnika)**

Nekompetitivno određivanje antigena, najčešće podrazumeva pasivnu adsorpciju ili kovalentno vezivanje antitela za površinu čvrste faze. Antigen iz uzorka reaguje sa antitelima vezanim za čvrstu fazu, nakon čega sledi ispiranje kojim se uklanja višak nevezanog obeleženog reagensa i nekih interferirajućih supstanci. Zatim se dodaju obeležena antitela (konjugat) koja reaguju sa drugim epitopom vezanog antigena. U nekompetitivnim testovima, oba korišćena antitela mogu biti poliklonska ili monoklonska. Ukoliko se koriste monoklonska antitela specifična za različite epitope, moguće je pojednostaviti protokol testa istovremenom inkubacijom konjugata i antigena. U nekompetitivnim testovima, količina obeleženog antigena direktno je proporcionalna količini antigena prisutnoj u uzorku. Što je više antigena prisutno, više obeleženog antitela će se vezati.

### **Homogena i heterogena imunoodređivanja**

Imunoodređivanje u kome je neophodno izvršiti razdvajanje vezanog kompleksa antitelo-Ag\* nazivaju se heterogenim imunoodređivanjem. Metode razdvajanja obuhvataju: adsorpciju, izolovanje proteina (pomoću amonijum-sulfata), denaturaciju/precipitaciju proteina pomoću organskih rastvarača ili polietilenglikola ili sekundarnim antitelom koje je specifično za primarno antitelo ili na drugi način korišćenjem elektroforeze, gel filtracije, jonskih izmenjivača itd. Imunoodređivanja u kojima nije potrebno izvršiti razdvajanje vezanog i slobodnog antitela ili antigena nazivaju se homogenim imunoodređivanjima.

### **Radio imunoodređivanje (RIA)**

Razvoj radioimunoodređivanja (RIA) datira s početka 1960-tih godina. U RIA se kao obeleživači koriste radioaktivni izotopi (jod  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$  ili tricijum  $^3\text{H}$ ). Obeležavanje antigena izotopom može da uzrokuje promene u reaktivnosti sa antitelom. Izmerena radioaktivnost je ili proporcionalna (sendvič određivanje) ili obrnuto proporcionalna količini analita u uzorku. Osnovni nedostatak ove tehnike odnosi se na opasnosti od zagađenja okoline nepravilnim rukovanjem radioaktivnim materijalom i na kratko poluvreme raspada izotopa. Probleme radioimunoloških metoda prevazišle su enzimska imunoodređivanja.

### **Enzimsko imunoodređivanje (EIA)**

U enzimskim imunoodređivanjima, kao obeleživači se koriste enzimi alkalna fosfatasa, peroksidaza rena, glukozo-6-fosfat dehidrogenaza,  $\beta$ -galaktozidaza). U ovom tipu reakcije enzimom obeležena antitela ili antigeni (konjugati) reaguju s ligandima, a zatim se dodaje supstrat za enzim. Za merenje koncentracije analita korišćenjem EIA koristilo se fotometrijsko merenje promene boje, a zatim kasnije i fluorescentni ili hemiluminiscentno obeleženi supstrati ili proizvodi. Najpopularniji test je ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), heterogena EIA, i predstavlja enzimsku varijantu sendvič testa. Ovom metodom mogu se određivati antitela. Za čvrstu podlogu vezana su antitela za koja se vezuje antigen iz uzorka. Nakon ispiranja dodaje se sekundarno antitelo (obeleženo enzimom) i formira se kompleks antitelo-antigen-antitelo-enzim. Višak nevezanog antitela se zatim ispira i dodaje se supstrat za enzim. Enzim katalitički konvertuje supstrat u proizvod, čija je količina proporcionalna količini antigena u uzorku. Antitela u uzorku takođe mogu da se kvantifikuju. U ovom slučaju za čvrstu podlogu vezan je antigen, zatim se dodaje uzorak koji sadrži određena antitela koja se određuju. Drugi reagens koji se dodaje je antitelo specifično za antitela iz uzorka. Sledi reakcija sa supstratom u kojoj nastaju obojeni proizvodi.

### **Mikročestica enzimsko imunoodređivanje – MEIA**

Mikročestica enzimsko imunoodređivanje (MEIA) koristi se za određivanje analita srednje i veće molekulske mase. U metodi se koristi izolacija antitelo/antigen kompleksa na čvrstoj površini malih lateks mikročestica. Redosled reakcija u MEIA određivanju je sledeći:

Lateks mikročestice obložene anti-analit antitelima i uzorak inkubiraju se zajedno i čine reakcionu smešu. Alikvot reakcione smeše prenosi se na staklena vlakna. Sledi ispiranje kako bi se uklonio nevezani materijal. Konjugat-alkalnom fosfatazom obeležena anti-analit antitela vezuje se za kompleks mikročestica-anti-analit antitela-uzorak. Sledi ispiranje kako bi

se uklonio nevezani materijal. Zatim se pipetira supstrat, 4-metilumbeliferil fosfat, a fluorescencija nastalog proizvoda meri se sistemom MEIA optike. Očitana fluorescencija direktno je proporcionalna koncentraciji analita u uzorku.

### **Hemiluminiscentno imunoodređivanje (CMIA)**

Razvoj novih tehnologija u određivanju tumorskih markera, prati povećanje potreba rutinskih laboratorija za automatskim analizatorima na kojima se vrše imunoodređivanja. Jedna od najčešće korišćenih metoda u imunoodređivanju tumorskih markera je hemiluminiscencija. Luminiscencija je pojava emisije svetlosti, za koju u procesu pobuđivanja nije korišćena termička energija. Pojava emisije svetlosti u hemiluminiscenciji slična je fluorescenciji u tom smislu da kada u procesu apsorpcije energije elektron iz osnovnog stanja prelazi u pobuđeno stanje (na jedan od viših singletnih nivoa), on u tom stanju ostaje vrlo kratko (vreme života pobuđenog stanja kraće od  $10^{-4}$  s) i vraća se u osnovno stanje emitujući kvant svetlosti. Hemiluminiscencija je tip luminiscencije u kome je ekscitacija uzrokovana hemijskom reakcijom (oksidacijom organskih jedinjenja kao što su luminal, izoluminol, akridinijum estri ili luciferin pomoću oksidacionih sredstava (vodonik peroksid, hipohlorit ili kiseonik)); svetlost emituju ekscitirani proizvodi formirani u reakciji oksidacije. Ove reakcije odvijaju se u prisustvu katalizatora kao što su enzimi (alkalna fosfataza, peroksidaza rena i mikroperoksidaza), joni metala ili kompleksi metala ( $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$  ftalocijanidni kompleksi) i hemin. Hemiluminiscentni testove karakteriše visoka osetljivost (detekcioni limit veličine atomola do ceptomola) i širok dinamički opseg.

Pipetiraju se uzorak, paramagnetna čestica (sas-tavljena od submikronskih polistirenskih čestica u koje je inkorporirano gvožđe, a koje na površini imaju reaktivne funkcionalne grupe koje omogućavaju kovalentno vezivanje antitela, antigena ili drugih liganda za ove čestice) obložena specifičnim antitelima i konjugat (antitelo obeleženo enzimom, npr. alkalnom fosfatazom). Sledi inkubacija, a zatim ispiranje u magnetnom polju kako bi se uklonile nespecifične supstance koje bi mogle da interferiraju u reakciji i pri merenju. Dodaje se hemiluminiscentni supstrat npr. akridinijum estar, dioksietan (Lumi-Phos 530<sup>TM</sup>) itd. Sledi inkubacija i detekcija signala, tj. merenje intenziteta emitovane svetlosti luminometrom.

### **Elektrohemi-luminiscencija**

Elektrohemi-luminiscencija je tip luminiscencije u kome je ekscitacija posledica elektrohemijske reakcije. Ona se razlikuje od hemiluminiscencije po tome što se proizvodi hemiluminiscentne reakcije stvaraju elektrohemijskom reakcijom iz stabilnih prekursora

na površini elektrode. Rutenijum (II) tris (bipiridil) helat je najčešće korišćen elektrohemiluminiscentni obeleživač, a elektrohemiluminiscencija se stvara na elektrodi u reakciji tipa oksido-redukcije sa ripropilaminom. Ovaj helat je veoma stabilan i relativno mali i može da se koristi za obeležavanje haptena ili velikih molekula (proteina ili oligonukleotida). Prednosti ovog određivanja su: povećana stabilnost reagensa, jednostavna priprema reagensa i povećana osetljivost.

Princip reakcije je sledeći: u prvoj inkubaciji, antitela iz uzorka, biotinom obeleženi antigen i antigen obeležen rutenijum kompleksom (rutenijum (II) tris(bipiridil) formiraju kompleks »sendvič«. Nakon dodatka streptavidinom obloženih mikročestica kompleks se vezuje za čvrstu fazu interakcijom biotina i streptavidina. Nakon inkubacije reakciona smeša se aspirira u mernu ćeliju gde mikročestice oblažu površinu elektrode. Nevezana supstance se uklanjaju sa puferom. Primenom napona na elektrodi dolazi do indukcije hemiluminiscentne emisije koja se meri pomoću fotomultiplikatora. Rezultati se određuju pomoću odgovarajućeg softvera poređenjem elektrohemiluminiscentnog signala dobijenog iz uzorka sa granicom odlučivanja prethodno dobijenom kalibracijom sa anti-analitom.

### **Masena spektrometrija**

Masena spektrometrija je moćna kvalitativna i kvantitativna analitička tehnika koja se koristi za merenje širokog opsega klinički relevantnih analita. Novija otkrića omogućila su identifikaciju jedinjenja velike molekulske mase uključujući i proteine i nukleinske kiseline metodom masene spektrometrije, uvođenjem novih jonizacionih tehnika, npr. MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) koja je originalno opisana 1987. god. Analit koji se određuje rastvori se u matriksu čija je uloga da izoluje molekule analita, da služi kao izvor protona koji će se preneti na molekule analita, a takođe ima i funkciju adsorbujućeg medijuma. Kako isparljivi rastvarači isparavaju, jedinjenje matriksa kristališe i inkorporira molekule analita. Lasersko zračenje adsorbuju molekule matriksa, dolazi do naglog zagrevanja područja na koje je delovao laser, sledi desorpcija-jonizacija molekula analita, a zatim analiziranje molekularnih jona TOF masenim spektrometrom. Rad TOF masenih spektrometara zasniva se na ubrzavanju jona pod dejstvom električnog polja, pri čemu joni imaju istu energiju, a različite mase, te manji joni stižu do detektora pre nego veći joni, a masa se određuje na osnovu vremena prispeća jona. Vreme za koje joni stignu do detektora proporcionalno je odnosu m/z (masa/naelektrisanje) i na osnovu toga se odvija separacija.

Dalje unapređenje ove tehnike predstavlja SELDI (Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization) tehnika. Ova tehnika koristi nerđajući čelik, aluminijumske podloge ili čipove sa hemijskim (hidrofil-

ini, hidrofobni, pre-aktivirani, katjonski, anjonski, itd.) ili biološkim (antitela, antigen vezujući fragmenti, DNK, enzimi, receptori) površinama prečnika 1–2 mm. Rastvori uzoraka tkiva ili telesnih tečnosti u veoma malim količinama nanose se na ove površine i proteini koji imaju afinitet za ove površine vezuju se za njih. Nakon serije ispiranja kako bi se uklonili nespecifični ili slabo vezani proteini, dodaje se matriks, nakon toga vezani proteini podležu desorpciji i jonizaciji nakon čega sledi MS analiza, najčešće TOF (time-of-flight) masenim spektrometrom. Mase ispitivanih proteina kreću se od hiljadu do nekoliko stotina hiljada daltona.

Ovom analizom dobija se veći broj pikova sa različitim m/z odnosom. Poređenjem uzorka pacijenata za koje se sumnja da imaju kancer sa uzorcima zdravih osoba analiziranih na isti način i korišćenjem sofisticiranog bioinformatičkog i kompjuterskih sistema, moguće je identifikovati uzorke pacijenata suspektih na kancer. Ova dijagnostika unapredila je dijagnozu kancera jajnika, prostate, bešike i mnogih drugih kancera. Dijagnostička osetljivost i specifičnost ove tehnologije je impresivna. Ova metoda nije još uvek prospektivno evaluirana, ali su klinička ispitivanja u toku. Ista tehnologija i principi se takođe koriste da se identifikuju novi biomarkeri kancera.

### **Microarray**

Microarray je silikonski mikročip koji sadrži veliki broj elemenata (spots) na dvodimenzionalnoj površini. Za svaki od ovih spotova vezane su različite molekule imobilizovanih kratkih lanaca oligonukleotida, cDNK različitih gena, proteina, antitela. Moguće je imobilizovati od 20 000 do 40 000 elemenata na takvom čipu, a zatim analizirati mRNK i proteine. Microarray se primenjuje za kvantitativnu procenu genske ekspresije, detekciju mutacija i polimorfizama (kao što su na primer SNP), DNA sekvenciranje i studije o ekspresiji proteina i interakcijama protein-protein. Ova metoda se koristi za detekciju novih biomarkera kancera.

Druga aplikacija microarrays je u klasifikaciji kancera zasnovanih na njihovom profilu genske ekspresije. Postoje brojni primeri subklasifikacije kancera dojke, jajnika, prostate, mozga, hematoloških i dr. kancera koristeći ovu tehnologiju. Posebno za pacijente sa tumorom dojke prikazano je da ova analiza može da ukaže na prognozu bolesti, a pomaže i u izboru terapije. Relativno mali broj gena (70) može da se koristi za podelu pacijenata u visoko rizične i grupu pacijenata s malim rizikom. Od juna 2003. ova metoda se primenjuje u klinici da bi se odredila dodatna hemoterapija kod pacijenta s kancerom dojke.

Neophodna je dalja standardizacija ovih metoda.

### **Ograničenja tehnika za određivanje tumorskih markera**

Kako se vrednosti tumorskih markera sve češće određuju u biohemijskim laboratorijama, javljaju se i mnogi problemi vezani kako za analitičke, tako i za kliničke probleme u smislu pravilne interpretacije dobijenih rezultata. Fundamentalna klinička ograničenja testova za određivanje tumorskih markera odnose se na osetljivost i specifičnost. Generalno, preanalitička ograničenja testova za određivanje tumorskih markera slična su uobičajenim ograničenjima koja se odnose na sve testove u kliničkoj hemiji, a analitička ograničenja na ona koja se odnose na sva imuno-određivanja. Proizvođači komercijalnih testova ukazuju na ova ograničenja koja se odnose kako na analit, tako i na metodu. Veoma je važno da postoji kako unutrašnja, tako i spoljašnja kontrola kvaliteta i da se adekvatno reaguje ukoliko se pojave neki problemi vezani za neadekvatne rezultate u ovim određivanjima. Kako se broj tumorskih markera povećava, raste i mogućnost od analitičkih neslaganja dobijenih rezultata i drugih grešaka koji mogu imati neželjene efekte na lečenje pacijenata. Ova analitička ograničenja posebno su važna u slučajevima kada se pacijenti prate tokom dužeg vremenskog perioda, ponekad i u različitim laboratorijama i kada se pri tome koriste različite metode.

Problemi koji se odnose na neslaganje pri analiziranju tumorskih markera mogu se svrstati u tri grupe:

- Poređenje rezultata određivanja tumorskih markera (tačnost, kalibracija, nepreciznost, analitička specifičnost),
- Preanalitički faktori (tip uzorka, vreme uzorkovanja),
- Interferencije pri određivanju (heterofilna antitela, hook efekat).

Automatizacija je doprinela napretku u analitičkim performansama određivanja, ali je veliki problem ostao poređenje rezultata dobijenih određivanjem različitim metodama. Esencijalno je prepoznati da se vrednosti dobijene različitim metodama ne mogu upoređivati.

### **Uticaj detekcije signala (obeleživača) na performanse testa**

Testovi u kojima je ograničena količina reagensa danas se ređe koriste. Testovi koji koriste enzimске obeleživače (peroksidaza rena ili alkalna fosfataza) retko imaju analitičku osetljivost kao testovi u kojima se koriste radioaktivni obeleživači (najčešće <sup>125</sup>I-obeleženi antigeni). Oni su ograničeni donjom i gornjom granicom spektrofotometrijskih merenja i mnogo su osetljiviji na interferencije i promene u uslovima određivanja tokom generisanja mernog signala. Ove poteškoće se mogu umanjiti uklanjanjem sastojaka seruma pre enzimske reakcije.

Analitička osetljivost se može poboljšati korišćenjem enzim amplifikacionih tehnika. Dalje poboljšanje postignuto je korišćenjem istih enzimskih obeleživača sa supstratima koji se konvertuju u fluorescentne produkte. Ovi proizvodi mogu biti stimulisani ponovo da produkuju signal u kratkom vremenskom periodu. Direktni fluorescentni testovi u kojima su fluorescentni obeleživači zamenili radioaktivne obeleživače takođe su dostupni na tržištu i kod njih je značajno povećan opseg merenja i eliminisana interferencija pozadinske fluorescencije koji mogu uticati na osetljivost metode. Hemiluminiscentne reakcije ili elektrohemiluminiscencija danas su našle veliku primenu za određivanje tumorskih markera na automatskim analizatorima (2).

### Osetljivost i detekcioni limiti

Detekcioni limit je koncentracija koja je za  $2S_d$  veća od izmerene srednje vrednosti nultog kalibratora i predstavlja najmanju merljivu koncentraciju analita koja se razlikuje od nule. Postoje razlike u poređenju detekcionih limita dobijenih korišćenjem testova različitih proizvođača, jer se nulti kalibratori razlikuju po sastavu (pufer, životinjski serum, itd.). Detekcioni limiti određeni u puferu mogu biti vrlo mali jer nema uticaja matriksa. S toga se pretpostavlja da je realno detekcioni limit i do  $5 \times$  veći. Bilo bi korisno kada bi proizvođač naveo i minimalnu koncentraciju koja se može odrediti (najmanja koncentracija za koju je koeficijent varijacije 20%). Za neke tumorske markere, npr. AFP, hCG i PSA dobra preciznost pri niskim koncentracijama je esencijalna, jer odluka kliničara o daljoj terapiji pacijenta može zavisiti od dobijenih rezultata određivanja, tj. i malo povećanje koncentracije tumorskih markera može da navede kliničara na pogrešan put. Pogodan metod detekcije i minimalne nespecifične interferencije su zbog toga naročito značajne za ova merenja (2).

### Opseg određivanja

Koncentracije tumorskih markera u serumu mogu varirati od koncentracija koje se postojećim metodama ne mogu detektovati kod zdravih osoba do nekoliko miliona jedinica na litar kod osoba sa malignitetima, posebno AFP, hCG i CEA. Kako su najveće koncentracije kalibratora u testovima između 500 i 1000 jedinica na litar, neki se uzorci moraju razblažiti. Poželjno je da test ima što je moguće širi merni opseg, kako bi se smanjio broj uzoraka koji moraju da se razblažuju. Potrebno je da u testove budu uključeni i odgovarajući diluenti, a poželjna je i opcija automatskog razblaživanja uzorka na analizatorima, kako bi se izbegle greške pri manuelnom razblaživanju (2).

### Nepreciznost

Generalno, preciznost automatizovanih metoda je veoma dobra, ali poznavanje individualnih performansi metoda je uvek esencijalno. Koji konstituenti analitički značajno menjaju rezultat najbolje može da se vidi iz izračunavanja kritične razlike (RCV) koja se računa prema sledećoj formuli:  $RCV = \sqrt{2} \times Z \times (Kv_a)$ , gde je  $Z$  standardna normalna devijacija ili Z-score, a  $Kv_a$  je koeficijent (analitičke) varijacije (analitička preciznost).  $Kv_a$  se može za bilo koji analit izračunati iz podataka rutinske interne kontrole kvaliteta; preciznost u seriji se mora koristiti ako su podaci analizirani u seriji, a preciznost između serija ukoliko su uzorci analizirani u više serija. Z-score od 1,96 i 2,58 koristi se da se izračuna verovatnoća da je dobijena promena značajna (95% verovatnoće) ili veoma značajna (99% verovatnoće). Proizvođači testova obično sprovode ovakve studije koristeći NCCLS protokol, ali je poređenje s drugim kitovima uglavnom vrlo retko. Minimiziranje varijabilnosti od lota do lota je odgovornost proizvođača. Relativno male promene mogu da utiču na rezultate pacijenta, naročito za metode sa veoma dobrom preciznošću (2).

### Tačnost/kalibracija

Određivanje recovery vrednosti za pulove normalnih seruma kojima je dodata određena količina kalibratora obično su prikazane u uputstvima uz reagens i kreću se od 95–105%. Neki proizvođači takođe daju podatke o vrednostima recovery dobijenih za uzorke koji sadrže poznate koncentracije odgovarajućih internacionalnih standarda prema NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control) (IS72/225 za AFP, IRP73/601 za CEA, IS 96/670 za PSA, IS 96/668 za slobodan PSA itd.) (3–7). Korišćenje ovih standarda postalo je imperativ za proizvođače od 2003. god u Evropi. Za nekoliko značajnih tumorskih markera nije utvrđen internacionalni standard (CA125, CA 15-3 i CA 19-9). Poređenje vrednosti recovery IS u različitim metodama su dostupni korišćenjem podataka iz spoljašnje kontrole kvaliteta i mogu da daju objektivne informacije o tome koje metode su kalibrirane i na koje treba obratiti pažnju. Teškoće npr. kod CEA: većina proizvođača kalibriše njihove metode u jedinicama mase (ng/mL). Specifični konverzioni faktori za pretvaranje rezultata izraženih u ng/mL CEA u U/L internacionalnog standarda za CEA (IRP 73/601) kreću se u opsegu od 11,4 do 18,6. Uvođenje prvog internacionalnog standarda za PSA predstavlja veliki doprinos u određivanju ovog tumorskog markera zajedno s korišćenjem tzv. ekvivalentnih testova.

### Linearnost

Većina proizvođača daje podatke o linearnosti, što uglavnom podrazumeva podatke o analiziranju

serijskih razblaženja seruma. Dobra linearnost dilucije uglavnom je karakteristika većine testova. U rutinskoj praksi, devijacije od linearnosti za većinu tumorskih markera su veoma retke i najčešće su posledica prisustva interferirajućih supstanci prisutnih u nekim uzorcima. Takva nelinearnost razblaženja sa povećanim recoveryem antigena se najčešće zapaža kod imunoodređivanja mucina (CA125, CA15-3) (8), zbog različitih faktora uključujući prisustvo veće količine antiugljeno hidratnih antitela u serumu (koja stvaraju komplekse).

### Specifičnost metode

Specifičnost imunoodređivanja je primarno determinisana korišćenim antitelima, mada je i dizajn metode veoma značajan. Korišćenje monoklonskih antitela olakšalo je razvoj specifičnih procedura za merenje tumorskih markera, mada je specifičnost testa povećana korišćenjem dva antitela. Ako su metode korektno kalibrisane u smislu korišćenog standarda, onda glavni faktor koji doprinosi razlikama vezanim za rezultate određivanja različitim metodama potiče od specifičnosti korišćenih antitela.

ISOBM iniciralo je seriju sastanaka sa primarnim ciljem poređenja različitih monoklonskih antitela pri identifikaciji istog antigena. Heterogenost antitela u smislu specifičnosti i afiniteta pomaže da se objasne razlike u rezultatima određivanja tumorskih markera dobijenih sprovođenjem spoljašnje kontrole kvaliteta.

Za neke analite, važno je utvrditi spektar molekula koje mogu ukršteno da reaguju, mada to zavisi od kliničke aplikacije. Tako na hCG utiču intaktni hCG, alfa i beta subjednice hCG i jezgro hCG (prisutno uglavnom u urinu, a u maloj koncentraciji u plazmi). Za praćenje normalne trudnoće važno je određivanje intaktnog hCG. Kada se hCG koristi kao tumorski marker treba meriti najmanje hCG i beta hCG ili koristiti test koji prepoznaje obe molekule ili koristiti dve metode: jednu koja prepoznaje intaktni hCG i drugu koja meri beta lanac hCG. S obzirom da dve metode povećavaju troškove određivanja ovakvi testovi nisu popularni.

Osim toga nije samo važno koje se molekule mere datim testom, već koje molekule je klinički značajno meriti. Microarray tehnologija omogućuje da se meri veći broj analita, npr. šest ili više povezanih molekula hCG na jednom čipu, zajedno s izoformama drugih relevantnih tumorskih markera.

Važne kliničke odluke donose se na osnovu dobijenih rezultata određivanja tumorskih markera u smislu postavljanja dijagnoze (npr. povećane vrednosti kalcitonina u multiplim endokrinim neoplazijama), skrininga (npr. povećane vrednosti PSA kod asimptomatskih pacijenata zahtevaće biopsiju prostate), pre-

dikciju (npr. HER2/neu kod pacijenata s kancerom jajnika na terapiji).

Primarni cilj NACB preporuka (National Academy of Clinical Biochemistry Guidelines) je da obezbedi informacije zasnovane na dokazima o optimalnom korišćenju kao i o ograničenjima ovakvih testova u smislu primene u kliničkoj praksi. Preporuke se odnose na: pre-analitičke zahteve (izbor tumorskog markera, tip uzorka, vreme uzimanja, rukovanje s uzorkom), analitičke zahteve (standardizacija testa, spoljašnja i unutrašnja kontrola kvaliteta, interferencije), post-analitičke zahteve (intervali referentnih vrednosti, intrerpretacija i izdavanje rezultata tumorskih markera).

### Preanalitički faktori koji utiču na rezultate određivanja tumorskih markera

Preanalitička faza čini značajan deo svih laboratorijskih određivanja, a sa sobom nosi i veliki broj grešaka (41% grešaka u preanalitičkoj u odnosu na 4% greške u analitičkoj fazi). Kao i za druge analite većina preanalitičkih grešaka za tumorske markere odnosi se na neodgovarajuće rukovanje uzorcima, hemolizirane uzorke, nedovoljno uzorka, neadekvatne uzorke i ovi uzroci se mogu minimizirati. Najčešće greške odnose se na korišćenje neadekvatnih epruveta, tj. antikoagulanasa i uzoraka pri zahtevima za određivanje ili kada uzorci već stignu u laboratoriju. Dok prvi tip greške može da se prepozna i koriguje (ponovljenim uzimanjem uzorka krvi u odgovarajuću epruvetu) kada uzorak stigne u laboratoriju, drugi se najčešće identifikuje nakon određivanja, kada rezultati stignu do kliničara. Ovakvi uzroci greške mogu se izbeći sprovođenjem unutrašnje ili spoljašnje kontrole kvaliteta.

NACB preporuke u vezi sa zahtevima o kvalitetu pre-analitičke faze odnose se na one vezane za analit (izbor tipa uzorka, stabilnost uzorka) i one koji su vezani za pacijenta (izbor testa, vreme uzorkovanja, kliničko stanje, lečenje, kontaminacija uzorka).

*Tip uzorka.* U pogledu izbora uzorka koji će se koristiti, treba pročitati preporuke proizvođača u uputstvu priloženom uz reagens. Uzorci izbora su uglavnom serum ili plazma. Epruvete koje sadrže separator sa gelom ne mogu se koristiti za sakupljanje uzoraka za određivanje svih tumorskih markera. Antikoagulansi kao što je npr. EDTA mogu interferirati u nekim metodama detekcije. Standardizacija uslova sakupljanja uzorka i fiksacije su ključni za imunohistohemijske analize. Konzervansi kao što je natrijum azid, koji se može nalaziti u uzorcima za spoljašnju kontrolu kvaliteta mogu takođe interferirati sa detekcijom signala. Razlike između rezultata dobijenih određivanjem u serumu i EDTA ili citratnoj plazmi mogu nastati zbog inhibicije aktivnosti kompleksa helirajućim agensima. Uzorci sakupljeni u epruvetama sa NaF često mogu biti neodgovarajući.

Kontaminacija uzorka može biti problem: prisustvo radioizotopa davanih u dijagnostičke ili terapijske svrhe i koji imaju slični energetski spektar kao trešeri korišćeni u imuno određivanjima, mogu interferirati sa RIA (1, 2).

*Stabilnost i čuvanje uzorka.* Tumorski markeri su generalno stabilni i ukoliko se serum odvoji od koaguluma, odnosno plazma od ćelija može se čuvati kraće vreme na 4 °C, a duže vreme na -30 °C, odnosno na -70 °C. Zagrevanje uzoraka u cilju inaktivacije komponenata komplementa ili inaktivacije HIV-a obično nije poželjno (npr. hCG, PSA). HCG npr. može disociirati pri povišenoj temperature na slobodne  $\alpha$ - i  $\beta$ -subjedinice (9).

*Vreme uzorkovanja.* Vreme uzorkovanja nije kritično za merenje koncentracije tumorskih markera. Nema dokaza o diurnalnim varijacijama za većinu tumorskih markera, tako da se uzorci mogu uzimati u bilo koje doba dana. Uzimanje uzorka za određivanje CA 125 post-operativno može usloviti povećanje nakon peritonealne traume ili kod žena tokom menstruacije (2-3 puta). Povećanje hCG zapaža se kod žena nakon hemoterapije. Biopsija prostate/transuretralna resekcija ili traumatska kateterizacija mogu značajno da povećaju koncentraciju PSA/slobodnog PSA u serumu. Uzorak za analizu PSA mora se uzeti pacijentu pre bilo kakve manipulacije prostatom. Digitalni rektalni pregled može usloviti prolazno povećanje PSA u serumu (10).

*Izbor testa.* Izbor odgovarajućih tumorskih markera koje treba određivati u određenoj patologiji mora biti u skladu s odgovarajućim nacionalnim/ internacionalnim protokolima. Iako u nekim slučajevima određivanje tumorskih markera može biti od velike važnosti u postavljanju dijagnoze, postoje špekulativna merenja panela tumorskih markera (npr. rutinsko merenje PSA kod žena, rutinsko merenje CA 125 kod muškaraca, itd.). Značajno je određivanje bazalnih nivoa tumorskih markera pre praćenja terapije (11, 12).

*Klinička stanja.* CA125 može biti umereno povećan kod endometrioze i u prva dva trimestra trudnoće i značajno povećan kod benignih ascita. Prostatitis takođe može da poveća koncentracije PSA u serumu. Uzorke treba uzeti nekoliko nedelja nakon izlečenja prostatitisa ili infekcije urinarnog trakta. Bubrežna insuficijencija utiče na vrednosti CEA, tkivnog polipeptidnog specifičnog antigena (TPS) i drugih citokeratina. Holestaza može da uslovi povećanje koncentracije CA 19-9 (2, 13, 14).

*Lečenje/drugi tretmani.* Inhibitori 5 $\alpha$ -reduktaze [Finasterid (Proscar®; Propecia®), Dutasterid (Avodart®)] uzrokuju smanjenje medijane koncentracije PSA za ~50%. Prolazno povećanje koncentracije tumorskih markera može da se javi nakon hemoterapije. Kanabis može prolazno da poveća koncentraciju hCG. Pušenje može blago povećati koncentraciju CEA u nekim imunoodređivanjima (2, 15, 16).

*Kontaminacija uzorka.* Kontaminacija sa salivom može usloviti povećanje koncentracija CEA, CA 19-9 i TPS. Ukoliko se posumnja na kontaminaciju uzorka treba ponoviti vađenje (2).

Prema preporukama NACB zahtevi u vezi *analitičke faze* odnose se na kontrolu validacije testa, unutrašnju kontrolu kvaliteta i spoljašnju kontrolu kvaliteta (17, 18) i obuhvataju:

*Validaciju testa.* Dobro okarakterisanu metodu pre uvođenja u rutinsku kliničku praksu; i imunoodređivanja i imunohistohemijske metode moraju biti okarakterisane definisanim protokolima (FDA u SAD i CE oznakom u Evropi). Metode za imunohistohemiju moraju biti posebno dobro opisane ukoliko referentni material ne postoji.

*Unutrašnju kontrolu kvaliteta,* uključujući procenu reproducibilnosti (Intra-assay variability <5%; inter-assay variability <10%), uspostavljanje objektivnih kriterijuma za prihvatanje testa (prema Westgardu); odgovarajući broj uzorka za unutrašnju kontrolu kvaliteta, najmanje jedan uzorak seruma kao kontrolni uzorak nezavisno od komercijalnog kontrolnog uzorka; uzorci za unutrašnju kontrolu kvaliteta u koncentracijama koje odgovaraju kliničkoj aplikaciji (negativna i pozitivna kontrola).

*Spoljašnju kontrolu kvaliteta* korišćenjem uzorka za spoljašnju kontrolu kvaliteta sa odgovarajućom koncentracijom analita, uzoraka za spoljašnju kontrolu kvaliteta koji odgovaraju uzorcima seruma pacijenta, uzoraka za spoljašnju kontrolu kvaliteta koji su stabilni pri transportu. Neophodno je i utvrđivanje tačnih i stabilnih očekivanih vrednosti, kao i procenu interferencije u testu.

NACB preporuke koje se odnose na postanalitičku fazu odnose se na dobru komunikaciju lekara i laboratorije. Uz uzorak pacijenta poželjno je laboratoriji priložiti kratak opis kliničkih informacija koje bi ukazivale na izvor suspektnog/dijagnostikovanog maligniteta i status pacijenata (npr. postoperativni). Kliničari moraju da budu obavešteni o intervalu referentnih vrednosti za određeni tumorski marker, o bazalnim vrednostima tumorskog markera kod pacijenata koji se podvrgavaju terapiji u cilju daljeg praćenja i upoređivanja rezultata, o definisanom procentu povećanja ili smanjenja koje se može smatrati značajnim i uzima u obzir analitičke i biološke varijacije, o promeni metode određivanja određenog tumorskog markera. Takođe laboratorije moraju da izračunaju poluvreme života tumorskih markera (AFP, hCG), tj. vreme za koje se koncentracija cirkulišućeg tumorskog markera samnji za 50% nakon potpunog uklanjanja tumorskog tkiva. Preporuke se odnose i na odgovarajuće frekvencije kojima se moraju vršiti merenja tumorskih markera, a poseban akcent se stavlja na komunikaciju laboratorije i kliničara (19-21).

Koncentracije tumorskih markera u uzorcima, određene testovima različitih proizvođača ne mogu se

međusobno porediti zbog razlika u dizajnu metodologije određivanja i specifičnosti korišćenih antitela, kao i u nedostatku standardizovane i tačne kalibracije za koju bi se koristili samo standardi napravljeni u skladu sa internacionalnim standardima ili referentnim reagensima.

### Potencijalne interferencije

Interferencija se definiše kao efekat supstance prisutne u analitičkom sistemu koja uzrokuje devijaciju izmerene vrednosti od prave vrednosti, koja se obično izražava kao koncentracija ili aktivnost. Definicija interferencije po IFCC: analitička interferencija je sistematska greška merenja uzrokovana komponentama uzorka koje same po sebi ne daju signal u merenom sistemu. Interferencije mogu zavisi od uzorka ili biti nezavisne od uzorka i mogu biti pozitivne ili negativne, tj. uticati na povećanje, tj. sniženje rezultata. Pozitivna interferencija je obično rezultat nedostatka specifičnosti.

Interferencije mogu biti egzogene ukoliko potiču od testa, odnosno opreme koja se koristi pri određivanju ili egzogene ukoliko potiču od karakteristika analiziranog uzorka. Ove interferencije su svakako najozbiljniji uzrok neslaganja dobijenih rezultata sa kliničkom slikom pacijenta iz nekoliko razloga: one su sporadične i variraju u efektu tokom vremena; one se ne detektuju sprovođenjem unutrašnje kontrole kvaliteta; zavise od metode i od dizajna testa. Interferencije nije moguće u potpunosti izbeći, ali se njihov uticaj može smanjiti pažljivim izborom dizajna metoda i obučenošću kadra (2).

### Egzogene interferencije

*Carry-over* je potencijalni problem kada se analiziraju uzorci s visokim koncentracijama analita. Kada se uzorci analiziraju u seriji, postoji opasnost od kontaminacije uzorka prethodnim. Ona se obično javlja ako se ista igla za uzorak ili pipeta koristi za različite uzorke i neadekvatno se isperu i obično se češće dešava kod testova koji se rade ručno. Posledice su obično veće kod onih tumorskih markera čiji su opsezi koncentracija širi. Ukoliko je *carry-over* uzorka koji sadrži velike koncentracije tumorskog markera, npr. 100 000 kU/L AFP 0,1%, onda se u sledećem analiziranom uzorku (u kome se koncentracija AFP skoro ne može detektovati) može očekivati koncentracija od 100 kU/L. Pažljivim posmatranjem rezultata ova greška se može izbeći u slučaju da se primeti da je izostalo slaganje rezultata određivanja sa kliničkom slikom pacijenta. Greška se može prevideti ukoliko se u prvom uzorku ispolji »hook« efekat i u tom uzorku određena koncentracija bude lažno niska, a zatim se u sledećem određivanom uzorku dobije neočekivano visoka koncentracija tumorskog markera. Takođe, kod random access analizatora može

se desiti sledeći tip greške: ako se u prvom uzorku ne određuje hCG npr. već se određuju tiroidni hormoni kod trudnice, a sledećoj pacijentkinji (koja nije trudnica) određuje hCG, može doći do *carry over* (2).

*Kontaminacija koja može da utiče na detekciju obeleživača.* Neizotopska imunoodređivanja su mnogo osetljivija na ovu vrstu interferencije od izotopskih određivanja. Lažni signali u detekciji mogu biti rezultat kontaminacije uzorka, reagensa ili plastičnih epruveta ili plastičnih bunara s bojama, fluoroforima ili česticama. Dobra laboratorijska praksa, posebno odvajanje laboratorijskog prostora na deo za pripremu reagensa od analitičkog dela, smanjiće rizik od ove kontaminacije. Kod izotopskih imunoodređivanja, radioaktivna jedinjenja su najčešći uzrok kontaminacije. Merenjem radioaktivnosti u radnoj prostoriji i pozadinske radijacije može se izbeći ovaj rizik. Kontaminacija radne sredine prilikom pripreme neizotopskih obeleživača takođe može uticati na rezultate određivanja.

Faktori koji interferiraju sa merenjem obeleživača su inhibitori enzima u enzimskim imunoodređivanjima, endogeni fluorofori u fluorimuno određivanjima, radioaktivna kontaminacija uzoraka. Visoke vrednosti hCG u fluorometrijskim određivanjima mogu se pripisati kontaminaciji mikrotitarske ploče tatkod iz laboratorijskih rukavica. Visoka radioaktivnost pozadine, može uticati na radioizotopska određivanja i više utiču na imunoradiometrijske testove pri niskim koncentracijama.

U egzogene interferencije (koje potiču od opreme ili testa za određivanje) spada izbor korišćenih epruveta za venepunkciju, zagrevanje uzorka pre analiziranja, kao i greške pri uzorkovanju na automatskim analizatorima koje su najčešće greške u mehanizmima za merenje nivoa uzorka (ukoliko je prisutan mehur vazduha), zbog čega neke laboratorije rutinski centrifugiraju uzorke pre određivanja ili detekciju koaguluma. Od nekoliko stotina grešaka koje su se javile pri određivanju AFP, hCG i CEA tokom dvogodišnjeg perioda, samo četiri je bilo uzrokovano greškom pri uzorkovanju na automatskim analizatorima (3, 22–26).

Fundamentalni problem sa analiziranjem komponenta u biološkom materijalu je efekat izuzetno kompleksne i promenljive smeše proteina, ugljenih hidrata, lipida, malih molekula ili soli koje su sastavni deo uzorka. Ovaj efekat naziva se efektom matriksa koji se definiše kao suma efekata svih komponenta, kvalitativnih ili kvantitativnih u sistemu sa izuzetkom merenog analita (27).

### Endogene interferencije

Faktori koji potencijalno mogu da uzrokuju konfuziju ili lošu interpretaciju rezultata tumorskih markera uključuju prisustvo u uzorku ukršteno reagujućih



supstanci, anti-reagens antitela i neočekivano visokih koncentracija analita, tzv. hook efekat. Problemi vezani za heterofilna antitela i hook efekat u imunometrijskim određivanjima su veoma važni jer nijedan od njih izgleda ne uzrokuje veće poteškoće u kompetitivnim radioimunoodređivanjima.

*Ukrštena reakcija supstanci.* Pogrešni rezultati mogu se dobiti kada se u uzorku neočekivano nađe supstanca koja reaguje ukršteno s antitelom na analit. Mehanizam ovakve reakcije zavisi od specifičnosti i homogenosti korišćenog antitela kao i od tipa reakcije. Za kompetitivna imuno određivanja, potrebno je koristiti visoko afinitetna, specifična anti-analit antitela kako bi se minimalizovala ukrštena reaktivnost sa sličnim molekulama (npr. hLH utiče na određivanje hCG). Većina tumorskih markera danas se meri korišćenjem dvostranog nekompetitivnog imunoodređivanja koje se odlikuju visokom specifičnošću jer se samo supstance sa dva epitopa za dva antitela detektuju. Kako se dva antitela dodaju u relativno visokim koncentracijama, ona mogu da reaguju i sa supstancama čiji su epitopi isti kao i kod analita, čak iako je konstanta ravnoteže ovih supstanci relativno mala.

Zavisno od toga da li se ukršteno reagujuće jedinjenje vezuje za jedno ili oba antitela u dvostranom imunometrijskom testu, interferencija može biti pozitivna ili negativna. Za tumorske markere takva ukrštena reaktivnost je verovatno najrelevantnija za hCG (sa hLH i hCG sličnim molekulama), PSA (sa slobodnim PSA i PSA-povezanim antigenima kao što su kalikreini) i CEA (sa normalnim ukršteno vezujućim antigenima). CA125, CA 15-3 i drugi mucini su mnogo veće i heterogenije molekule (esencijalno glikoproteinski agregati velike molekulske mase) koje su definisane njihovom imunoreaktivnošću sa relevantnim monoklonskim antitelima. Ukrštena reaktivnost sa povezanim antigenima je verovatno manje relevantna za ove markere, mada ugljeno hidratna mikroheterogenost doprinosi uglavnom razlikama u rezultatima određenim različitim metodama u pojedinačnim uzorcima (2, 25, 26).

*Nespecifične interferencije.* Uzroci nespecifičnih interferencija, nekad označenih terminom efekti matriksa nisu u potpunosti poznati, ali se oni ispoljavaju kao signali nastali prilikom određivanja u odsustvu analita ili ukršteno reagujućeg jedinjenja, tj. razlike u odgovoru testa koje daje nulti kalibrator, kao i ona koju daje serum koji ne sadrži analit. Ono što doprinosi ovim nespecifičnim interferencijama može poticati od nespecifičnog vezivanja obeleživača za epruvetu ili druge komponente testa, ali se može minimizirati dodatkom nosača proteina (npr. 0,5% goveđi serum albumin) u pufer. Nespecifične interferencije mogu da se reflektuju u stepenu nepreciznosti dobijene za niske koncentracije analita, što je posebno važno kod određivanja AFP, hCG i PSA kod pacijenata nakon terapije, jer se sledeća terapija može planirati čak i prema veoma malom porastu nivoa

ovih markera. Za većinu automatizovanih analizatora na kojima se određuju tumorski markeri utvrđena je odlična preciznost pri određivanju uzoraka koji imaju male koncentracije. Predlaže se uključivanje uzoraka sa niskim koncentracijama u kontrolu kvaliteta koja se sprovodi rutinski u laboratoriji.

Veoma je važno naglasiti da konstantno malo povećanje bez pravog razloga (umereno povećanje koje ostaje konstantno ili se spontano normalizuje tokom ponovljenih merenja) u nivou serumskih markera ne mora da ukazuje na aktivnu bolest.

Razlike u rezultatima određivanja tumorskih markera različitim metodama su evidentne. Npr. bazalne vrednosti AFP i hCG su izmerene korišćenjem poliklonskog radioimunoodređivanja i monoklonskim fluorimunoesejom. Nisu utvrđene razlike u AFP, ali jesu u hCG.

*Anti-reagens antitela.* Neki pacijenti u serumu sadrže imunoglobuline koji mogu da reaguju sa antitelima životinjskog porekla koja se koriste u testovima za određivanje tumorskih markera i da uzrokuju interferenciju. Postoji nekoliko izveštaja o interferenciji anti-reagens antitela u kompetitivnim određivanjima, ali su interferencije mnogo češće u dvostranim imunometrijskim testovima sa monoklonskim antitelima. Lažno povećani rezultati mogu se dobiti ako se anti-reagens antitela vežu i za mesta za koja se ne vezuje analit i vezuje oba antitela koja se koriste u testu. Ako se interferirajuća antitela vežu i blokiraju samo jedno antitelo iz reagensa, dobiće se niži rezultati. Kao rezultat drugih sternih smetnji, interferirajuća antitela mogu da utiču na prepoznavanje pomoću reagens antitela, kao i da interferiraju direktnim vezivanjem za antitela iz reagensa.

### **Minimiziranje interferencije anti-reagens antitela**

Sam test za određivanje tumorskog markera utiče na verovatnoću interferencije anti-reagens antitela. Metode koje koriste samo jedno mišije antitelo (i drugo antitelo poliklonsko) su manje osetljivi na interferenciju od onih koji koriste dva monoklonska antitela. Trebalo bi izbegavati korišćenje dijagnostičkih kitova koji sadrže monoklonska antitela koja se koriste za in vivo imaging. Npr. zamenom monoklonskog antitela OC125 sa alternativnim monoklonskim antitelom M11 u komercijalnim testovima za određivanje CA125 u kojima se koristi OC125 kao obeleženo monoklonsko antitelo, interferencija HAMA se značajno smanjuje. Korišćenje himernih humanih mišijih antitela može takođe da smanji interferenciju anti-reagens antitela.

U praksi, dodatak ne-imunih životinjskih seruma u test eliminiše interferenciju anti-reagens antitela. Poželjno je da serum potiče od iste vrste koja se koristi u testu (npr. mišiji). Ne-imuni serum sadrži

imunoglobuline drugih vrsta (konj, krava, koza) i takođe će smanjiti efekte interferirajućih antitela, ukazujući na sličnost strukture imunoglobulina ovih vrsta. Iz nekoliko razloga, dodatak ne-imunog životinjskog seruma nije uvek efikasan u eliminaciji interferencije dodatkom anti-reagens antitela:

- Individualni humani imuni odgovori na životinjske imunoglobuline mogu se razlikovati kvalitativno, kvantitativno i tokom vremena.
- Koncentracija blokirajućeg životinjskog imunoglobulina obično se određuje empirijski.
- Interferirajuće antitelo može da se veže za specifične Fab epitope na antitelima reagensa koji nisu prisutni na dodatim životinjskim imunoglobulinima.

Ukoliko se očekuje anti-reagens interferencija, uprkos korišćenju ne imunog seruma, alternativne metode za detekciju ili uklanjanje anti-reagens interferencije moraju da se koriste. To uključuje:

- Prethodnu ekstrakciju analita iz uzorka.
- Dodatak imobilizovanog neimunog seruma, suspenzije proteina A ili G.
- Precipitaciju polietilen glikolom (koristeći 50% v/v 16% PEG6000).
- Zagrevanje u acetatnom puferu (70–90 °C), pH 5,0 (pogodan samo za analite kao što je npr. CEA koji je otporan na ove denaturišuće uslove za antitelo)
- Analiziranje uzoraka koji su razblaženi u različitom odnosu kako bi se procenila linearnost dilucije, pri čemu se uzorci koji sadrže interferirajuća antitela ne razblažuju paralelno.
- Pretretman sa komercijalno dostupnim antitelima koja blokiraju epurvetu.
- Analiziranje uzoraka drugom metodom, koja se zasniva na različitom principu, npr. radioimunoodređivanje.

### **Identifikacija moguće interferencije anti-reagens antitela**

Često je veoma teško identifikovati uzorke kojima se može pripisati anti-reagens interferencija, a potrebno je i veliko kliničko iskustvo. Ukoliko je potrebno uraditi niz testova istom pacijentu (npr. profil reproduktivnih hormona) interferencija može da se očekuje češće ako su samo jedan ili dva testa podložna ovom uticaju, što će dati rezultate koji se ne slažu sa rezultatima merenja drugih analita. Međutim ukoliko je potrebno analizirati samo jedan uzorak, kao što je to slučaj kod tumorskih markera, onda je mogućnost da interferencija prođe nezapaženo veća. Lakše je primetiti veću nego manju interferenciju. Veličina interferencije može ukazati na tip antitela koja je uzrokuje.

**Humana anti-mišija antitela (HAMA).** Direktno intravensko davanje mišijih monoklonskih antitela (često anti-CEA ili anti-CA 125) za snimanje ili u

terapeutske svrhe u onkologiji produkuju anti-mišija antitela kod pacijenata. Ukazano je na prevalencu >70% kod ovih pacijenata, dok se broj ljudi u populaciji koji imaju HAMA u opsegu od <0,1% do 80%. Ove varijacije ukazuju da je teško izmeriti ova antitela; nije dostupan univerzalan kit jer antigen koji utiče na odgovor HAMA kod ovih pacijenata nije poznat. Odgovor čoveka na životinjska antitela može biti klase IgG, IgA, IgM ili retko IgE klase. Specifičnost antitela može biti anti-izotipska ili anti-idiotipska, usmerena na hipervarijabilan ili konstantan region molekule imunoglobulina. Iako postoji nekoliko testova za merenje HAMA ova metoda još uvek nije standardizovana, postoje razlike u kalibratorima (koriste se dva kalibratora: majmunski anti-mišiji igG i plazma pacijenata sa monoklonskim antitelima). Koncentracije HAMA u serumu pacijenata (mg/L ili g/L) koji su HAMA pozitivni rezultat je davanja mišijih monoklonskih antitela, pošto se HAMA produkuje kao odgovor na direktnu stimulaciju antigena. Trajanje odgovora na HAMA varira, ali antitela se u cirkulaciji nalaze najmanje 30 meseci nakon davanja mišijih imunoglobulina. Merenja koja se preduzimaju da bi se minimizirala indukcija HAMA odgovora kod pacijenata koji primaju monoklonska antitela uključuje sledeće postupke:

- Imunosupresivi pre i nakon terapije antitelima,
- Korišćenje Fab fragmenata (koji su manje imunogeni) umesto cele molekule imunoglobulina,
- Korišćenje humanih i himernih antitela (mada je IgG potencijalno antigen),
- Oblaganje monoklonskih antitela sa polietilen glikolom kako bi se smanjila njihova imunogenost (28–33).

Sa povećanjem korišćenja mišijih monoklonskih antitela u snimanju, važno je imati u vidu njihov efekat na druga imunoodređivanja (srčani markeri, reproduktivni hormoni) kod pacijenata sa kancerom.

### **Heterofilna antitela**

Druga interferencija može poticati od heterofilnih antitela koja se stvaraju kao odgovor na neki imunogen i nisu specifična. Heterofilna antitela se javljaju u nižoj koncentraciji u odnosu na HAMA i imaju manji afinitet za druga antitela. Postoje najmanje dve klase heterofilnih antitela, jedna su usmerena na epitop prisutan samo na zečijem imunoglobulinu, a druga na epitop na kozijem, konjskom i mišijem imunoglobulinu, ali ne i na zečijem; oko 40% zdravih osoba poseduje ova antitela, koja primarno prepoznaju epitope na Fab fragmentu i koji imaju sposobnost da Fab-Fab interakcija sa reagens antitelom.

Mogući nejatrogeni uzroci prisustva heterofilnih antitela uključuju blizak kontakt sa životinjama, prenos antigena hrane kroz zid creva (govedi imunoglobulin iz mesa ili mleka) i neke bolesti kao što je npr.

idiopatska kardiomiopatija. Mogući jatrogeni uzroci uključuju izlaganje dijagnostičkim i farmaceutskim agensima životinjskog porekla, desorpciju imobilizovanog IgG tokom prečišćavanja rekombinantnih proteina koji se koriste u terapijske svrhe, vakcinaciju protiv infektivnih bolesti i transfuziju krvi.

Na testove za određivanje CEA, CA125 i hCG utiču heterofilna antitela (34).

**Reumatoidni faktori.** Antitela prisutna u serumu pacijenata s reumatoidnom bolešću (drugim autoimunim bolestima, SLE, sklerodermi i hroničnom aktivnom hepatitisu) mogu se vezivati za nekoliko antigenskih determinanti na Fc regionu IgG. Nazvana reumatoidni faktori, ova antitela mogu biti IgM, IgG ili IgA klase i naročito mogu uzrokovati lažno povišene vrednosti u testovima koji se zasnivaju na turbidimetrijskom određivanju ili latex-aglutinaciji. Interferencije u dvostranim imunoodređivanjima mogu biti posledica delovanja različitih mehanizama, uključujući agregaciju molekula antitela vezivanjem Fc regiona za druge imunoglobuline. Da li ona imaju dovoljno veliki afinitet da uzrokuju fenomen ukrštanja kao HAMA ili heterofilna antitela nije u potpunosti razjašnjeno. Posebno treba voditi računa kada se analiziraju serumi pacijenta s reumatskim bolestima, zbog velike mogućnosti interferencije u ovim uzorcima.

Ova antitela su prisutna i kod 5% normalne populacije. Ova interferencija može biti tako velika da se ne može sprečiti korišćenjem Fc bez antitela, ukazujući na neku drugu vrstu interferencije. Uzorci pacijenata sa reumatoidnim artritisom često pokazuju povećane koncentracije antitela na proteine hrane, kao rezultat smanjenje GI tolerancije i mogu uzrokovati interferencije (2, 25).

### **Interferencije različitih antitela**

Iznenadujuće visoke vrednosti hCG, AFP, CA125 i TSH izmerene su u serumu pacijenata sa septikemijom uzrokovanom *E. coli*. Ovo je interesantno, pošto je poznato da mikroorganizmi u eksperimentalnim uslovima mogu indukovati sintezu antiimunoglobulin antitela (2, 24, 35).

### **High-dose hook efekat (efekat prozona)**

Dvostrana imunoodređivanja u kojima se oba antitela dodaju istovremeno posebno su osetljiva na high dose hook ili prozon efekat. Pri visokim koncentracijama analita, kada količina oba antitela postane ograničavajući faktor, mogu se dobiti niski rezultati. Pod ovim uslovima, dolazi do kompeticije slobodnog analita i analita vezanog za obeleženo antite-

lo za ograničeni broj mesta na antitelima vezanim za čvrstu podlogu. Vezivanje obeleživača za čvrstu fazu će zbog toga da se smanjuje u prisustvu veće koncentracije analita. Ako je koncentracija analita dovoljno velika i ne prepozna se kao takva, mogu se dobiti lažno niski rezultati, koji mogu biti u referentnom opsegu koncentracija. Rizik od ovog efekta se može smanjiti korišćenjem dvostepenih testova koji uključuju korak ispiranja, koristeći antitela vezana za čvrstu fazu većeg kapaciteta i analiziranjem uzoraka koristeći dva razblaženja. Svaki od ovih prilaza ima mana: izvođenje dvostepene reakcije zahteva više vremena i manji broj uzorak pa se može uraditi na automatskim analizatorima, a korišćenje antitela sa većim kapacitetom, kao i analiziranje uzoraka dva puta (koristeći dva razblaženja) povećava cenu određivanja tumorskog markera. Kinetičko merenje može eliminisati ovaj efekat. Mnogi proizvođači ukazuju na koncentracije iznad kojih se može javiti hook efekat. Iako je procenat pacijenata sa izuzetno visokim tumorskim markerima koji bi mogli usloviti pojavu hook efekata izuzetno mali, kliničke posledice neprepoznavanja ovakvih uzoraka pacijenta mogu biti izuzetno ozbiljne, posebno u slučajevima kada je bolest potencijalno fatalna, ali izlečiva, kao kada se meri hCG u suspektom karcinomu ili AFP u suspektom hepatoblastomu kod dece.

U endogene interferencije (potiču od karakteristika uzorka) i mogu potencijalno uticati na rezultate imuno određivanja tumorskih markera spadaju i jatrogeni uzroci (korišćenje kanabisa može prolazno povećati koncentracije hCG u serumu), prisustvo lipida, hemoglobina, paraproteina i dr. sastojaka seruma mogu da dovedu do problema u homogenim imunoodređivanjima, a komplement interferira u testovima za određivanje CEA, bakterijska kontaminacija (mucini i imunoodređivanja koja su osetljiva na virusne i bakterijske neuraminidaze, mogu usloviti lažno negativne rezultate) (36–40).

Kliničari i biohemičari moraju da vode računa o mnogim faktorima koji mogu da uslove razlike u rezultatima i greške pri određivanju tumorskih markera. Osnovni je cilj da se izbegnu laboratorijske greške koje potiču od razlika u rezultatima određivanja tumorskih markera, ma kog porekla one bile. Iako je identifikacija ovih grešaka često veoma teška, uspostavljanjem dobre komunikacije između laboratorije i kliničara i analiziranjem svakog rezultata određivanja koji nije u skladu sa kliničkom slikom pacijenta, mogu se sprečiti mnoge nepotrebne kliničke intervencije kod pacijenata koje bi se zasnivale na pogrešnom rezultatu laboratorijskog određivanja tumorskih markera. U tom smislu, na laboratoriji je velika odgovornost izdavanja tačnih rezultata određivanja tumorskih markera, a primarno u interesu pacijenata.

## TUMOR MARKERS: ANALITICAL METHODOLOGIES

Sanja Stanković

*Institute of Medical Biochemistry, Clinical Center of Serbia and University School of Pharmacy, Belgrade*

**Summary:** A tumor marker is a substance produced by a tumor or by the host in response to a tumor that is used to differentiate a tumor from normal tissue or to determine the presence of tumor based on measurements in the blood or secretions. Tumor markers are measured by a variety of analytical and instrumental techniques such as enzyme assay, immunoassays (radioimmunoassay, enzyme immunoassay, microparticle enzyme immunoassay, chemiluminiscence, electrochemiluminiscence), electrophoresis, and also mass spectrometry and microarrays for the assay of protein and genetic tumor markers. The discrepancies in tumor marker analysis, quality requirements relevant to all tumor marker measurements (pre-analytical, analytical and post-analytical), comparability of tumor marker results and individual method robustness to potential interferences will be reviewed.

**Key words:** tumor markers, immunoassays, interferences

**Literatura**

- Chan DW, Booth RA, Diamandis EP. Tumor markers. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Elsevier Saunders, 2006: 745–95.
- Sturgeon CM. Limitations of assay techniques for tumor markers. Chapter 6 in: Tumor Markers: Physiology, Pathobiology, Technology, and Clinical Applications, eds Diamandis EP, Fritsche HA, Lilja H, Chan DW, Schwartz MK. AACR Press, Washington DC 2002, 65–81.
- Sizaret P, Anderson SG. The International Reference Preparation for Alpha-foetoprotein. J Biol Standardization 1976; 4: 149.
- Laurence DJR, Turberville C, Anderson SG, Neville AM. First British Standard for carcinoembryonic antigen (CEA). Br J Cancer 1975; 32: 295–9.
- Storring PL, Gaines-Das RE, Bangham DR. International reference preparation of human chorionic gonadotrophin for immunoassay: potency estimates in various bioassay and protein binding assay systems; and international reference preparations of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of human chorionic gonadotrophin for immunoassay. J Endocrinol 1980; 84: 295–310.
- Bristow A, Berger P, Bidart J-M, Birken S, Normal R, Stenman U-H, et al. Establishment, Value Assignment, and Characterization of New WHO Reference Reagents for Six Molecular Forms of Human Chorionic Gonadotropin. Clin Chem 2005; 51: 177–82.
- Rafferty B, Rigsby P, Rose M, Stamey T, Gaines Das R. Reference reagents for prostate specific antigen (PSA): Establishment of the First International Standards for free PSA and PSA (90:10). Clin Chem 2000; 46: 1310–17.
- Milford WA, White PA. External quality assessment of commercial assays for CA125. Contemp Rev Obstet Gynecol 1997; 319–23.
- Price CP, Allard J, Davies G, Dawnay A, Duffy MJ, France M, et al. Pre-and post-analytical factors that may influence use of serum prostate specific antigen and its isoforms in a screening programme for prostate cancer. Ann Clin Biochem 2001; 38: 188–216.
- Nonogaki H, Fujii S, Konishi I, Nanbu Y, Kobayashi F, Mori T. Serial changes of serum CA125 levels during menstrual cycles. Asia Oceania J Obstet Gynaecol 1994; 17: 369–78.
- Sturgeon CM. Practice guidelines for tumor marker use in the clinic. Clin Chem 2002; 48: 1151–9.
- Association of Clinical Biochemists in Ireland: Guidelines for the use of tumor markers. 1999. [<http://www.iol.ie/~deskenny/acbi.html>]
- Muyldermans M, Cornillie FJ, Koninckx PR. CA125 and endometriosis. Hum Reprod Update 1995; 1: 173–87.
- Singh R, Cahill D, Popert R, O'Brien TS. Repeating the measurement of prostate-specific antigen in symptomatic men can avoid unnecessary prostatic biopsy. BJU Int 2003; 92: 932–5.
- Sturgeon CM, McAllister EJ. Analysis of hCG: clinical applications and assay requirements. Ann Clin Biochem 1998; 35: 460–91.
- Cuckle HS, Wald NJ, Densem JW, Royston P. The affect of smoking in pregnancy on maternal alpha-fetoprotein, unconjugated oestriol, human chorionic gonadotrophin, progesterone and dehydro-epiandrosterone sulphate levels. Br J Obstet Gynaecol 1991; 97: 1160–2.
- Seth J, Sturgeon CM, Al-Sadie R, Hanning I, Ellis AR. External quality assessment of immunoassays of pep-

- tide hormones and tumour markers: principles and practice. *Ann Ist Super Sanita* 1991; 27: 359–64.
18. Schreiber WE, Endres DB, McDowell GA, Palomaki GE, Elin RJ, Klee GG, et al. Comparison of fresh frozen serum to proficiency testing material in College of American pathologists Surveys.  $\alpha$ -Fetoprotein, carcinoembryonic antigen, human chorionic gonadotropin and prostate-specific antigen. *Arch Pathol Lab Med* 2005; 129: 331–7.
  19. Fleisher M, Dnistrian AM, Sturgeon CM, Lamerz R, Wittliff JL. Practice guidelines and recommendations for use of tumor markers in the clinic. Chapter 5 in: *Tumor Markers: Physiology, Pathobiology, Technology, and Clinical Applications*, eds Diamandis EP, Fritsche HA, Lilja H, Chan DW, Schwartz MK. AACCC Press, Washington DC 2002, 33–64.
  20. Sölétormos G, Schioler V, Nielsen D, Skovsgaard T, Dombrowsky P. Interpretation of results for tumor markers on the basis of analytical imprecision and biological variation. *Clin Chem* 1993; 39: 2077–83.
  21. Sölétormos G, Semjonow A, Sibley PE, Lamerz R, Petersen PH, Albrecht W, Bialk P, Gion M, Junker F, Schmid HP, Van Poppel H. Biological variation of total prostate-specific antigen: a survey of published estimates and consequences for clinical practice. *Clin Chem* 2005; 51 (8): 1342–51.
  22. Bjerner J, Nustad K, Norum LF, Olsen KH, Borner OP. Immunometric assay interference: incidence and prevention. *Clin Chem* 2002; 48 (4): 613–21.
  23. Kricka LJ. Interferences in Immunoassay-still a threat. *Clin Chem* 2000; 46 (8): 1037–8.
  24. Selby C. Interference in immunoassays. *Ann Clin Biochem* 1999; 36: 704–21.
  25. Weber TH, Kapyaho KI, Tanner P. Endogenous interference in immunoassays in clinical chemistry. *Scand J Clin Lab Invest* 1990; 50: Suppl 201: 77–82.
  26. Ismail AAA, Walker PL, Cawood ML, Barth JH. Interference in immunoassay is an under-estimated problem. *Ann Clin Biochem* 2002; 39: 366–73.
  27. Wood WG. Matrix effects in immunoassays. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1991; 205: 105–12.
  28. Ismail AAA. A radical approach is needed to eliminate interference from endogenous antibodies in immunoassays. *Clin Chem* 2005; 51 (1): 25–6.
  29. Bjerner J, Borner OP, Nustad K. The War on Heterophilic Antibody Interference. *Clin Chem* 2005; 51 (1): 9–11.
  30. Butler J. Negative interference in immunoassays [Letter]. *Clin Chem* 1995; 41: 481–2.
  31. Kricka L, Schmerfeld-Pruss, Senior M, Goodman DBP, Kaladas P. Interference by human anti-mouse antibody in two-site immunoassays. *Clin Chem* 1990; 36: 892–4.
  32. Madry N, Auerbach B, Schelp C. Measures to overcome HAMA interferences in immunoassays. *Anticancer Res* 1997; 17: 2883–6.
  33. Hasholzner U, Stieber P, Meier W, Lamerz R. Value of HAMA – determination in clinical practice – an overview. *Anticancer Res* 1997; 17: 3055–8.
  34. Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. *Clin Chem* 1988; 34: 27–33.
  35. Covinsky M, Laterza O, Pfeifer JD, Farkas-Szallasi T, Scott MG. An IgM I antibody to *Escherichia coli* produces false-positive results in multiple immunometric assays. *Clin Chem* 2000; 46: 1157–61.
  36. Rodbard D, Feldman Y, Jaffe ML, Miles LE. Kinetics of two-site immunoradiometric (sandwich) assays – II. Studies on the nature of the high dose hook effect'. *Immunochemistry* 1978; 15: 77–82.
  37. AA, Ramey ML, Dean JJ. High dose hook effect in immunoluminimetric thyrotropin assay: the open-faced sandwich artefact. *Ann Clin Biochem* 1993; 30: 413–4.
  38. Ryall RG, Story CJ, Turner DR. Reappraisal of the causes of the 'hook effect' in two-site immunoradiometric assays. *Anal Biochem* 1982; 127: 308–15.
  39. Fernando SA, Sportsman JR, Wilson GS. Studies of the low dose hook effect in a competitive homogeneous immunoassay. *J Immunol Methods* 1992; 151: 27–46.
  40. Fernando SA, Wilson GS. Studies of the hook effect in the one step sandwich immunoassay. *J Immunol Methods* 1992; 151: 47–66.

*Rad primljen: 10. 03. 2006.*

*Prihvaćen za štampu: 27. 03. 2006.*