

Praca oryginalna • Original Article

# Porównanie wyników oznaczeń wolnej podjednostki $\beta$ ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (f $\beta$ HCG) i ciążowego białka osoczowego A (PAPP-A) uzyskanych przy zastosowaniu dwóch technologii pomiarowych: TRACE i ECLIA

## The results comparison of free $\beta$ subunit of human chorionic gonadotropin (f $\beta$ HCG) and pregnancy – associated plasma protein A (PAPP-A) in two immunochemistry assays: TRACE and ECLIA

Grzegorz Adam Kłoss<sup>1</sup>, Bożena Maj<sup>1</sup>, Krzysztof Łukaszuk<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Medyczne Laboratoria Diagnostyczne Invicta, <sup>2</sup>Gdański Uniwersytet Medyczny, <sup>3</sup>Uniwersytet Warmińsko-Mazurski

### Streszczenie

Jednym z testów wykorzystywanym w nieinwazyjnej diagnostyce prenatalnej jest test PAPP-A, w skład którego, oprócz standardowych parametrów biometrycznych płodu, wchodzi biochemiczne markery oznaczane w surowicy krwi ciężarnej: wolna podjednostka ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (f $\beta$ HCG) i ciążowe białko osoczowe A (PAPP-A). Różnorodność metod oznaczeń f $\beta$ HCG i PAPP-A dostępnych na rynku diagnostycznym sprawia, że otrzymywane wyniki nie zawsze są ze sobą porównywalne.

Celem pracy było porównanie wyników oznaczeń f $\beta$ HCG i PAPP-A uzyskanych przy pomocy dwóch w pełni automatycznych metod immunochemicznych: TRACE i ECLIA. W badaniach oceniono precyzję i poprawność obu metod, oraz porównano wyniki oznaczeń wykonane w surowicach krwi 150 pacjentek wysokiego ryzyka, między 11<sup>+0</sup>, a 13<sup>+6</sup> dni tygodniem ciąży. Zarówno precyzja, jak i poprawność uzyskanych wyników były satysfakcjonujące. Współczynniki zmienności w badaniach przeprowadzonych na trzech różnych poziomach materiału kontrolnego były niższe od 3 %, a błąd poprawności nie przekroczył 5 %. Obie z porównywanych technologii pomiarowych charakteryzowała zależność liniowa. Uzyskane współczynniki korelacji TRACE vs. ECLIA były wysokie i wynosiły: 0,98 dla f $\beta$ HCG i 0,99 dla PAPP-A. Wykazano, że wyniki oznaczeń f $\beta$ HCG wykonywane z zastosowaniem technologii TRACE były istotnie niższe od wyników uzyskanych metodą ECLIA. W przypadku PAPP-A wartości uzyskane metodą TRACE były istotnie wyższe od wartości uzyskanych metodą ECLIA. Choć obie z metod oznaczania f $\beta$ HCG i PAPP-A są rekomendowane przez Fundację Medycyny Płodu, pod względem analitycznym dają odmienne wyniki.

### Summary

The PAPP-A Test is one of the tests used in non-invasive prenatal diagnostics. On the top of the standard fetal biometric parameters the PAPP-A Test includes biochemical markers from serum of pregnant: free subunit  $\beta$  of human chorionic gonadotropin (f $\beta$ HCG) and pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A). A variety of methods available on diagnostic market for f $\beta$ HCG and PAPP-A measurements restricts the comparability of results.

The aim of the study was to compare results of two fully automated immunochemical methods: TRACE and ECLIA. The study assessed the precision and accuracy of both methods, and compared the results from the blood sera of 150 high-risk patients between 11<sup>+0</sup> and 13<sup>+6</sup> weeks of pregnancy. The precision and accuracy of both methods were satisfactory. Coefficients of variation obtained from the studies performed at three different levels of control material were less than 3%, and the bias does not exceed 5%. Both methods were characterised by linear relationship. The correlation coefficients TRACE vs. ECLIA were high: 0.98 and 0.99 for f $\beta$ HCG and PAPP-A, respectively. This study indicated that measurements of f $\beta$ HCG levels performed with TRACE were significantly lower in comparison with measurements from ECLIA. On the contrary, PAPP-A levels performed

with TRACE were significantly higher compared with ECLIA results. Although both methods are recommended by The Fetal Medicine Foundation, results obtained from both methods were not comparable from analytical point of view.

**Słowa kluczowe:** ECLIA, f $\beta$ HCG, PAPP-A, porównanie metod, TRACE

**Key words:** ECLIA, f $\beta$ HCG, method comparison, PAPP-A, TRACE

### Wstęp

Postęp w naukach medycznych, jaki nastąpił w ciągu ostatnich lat stworzył nowe możliwości wczesnej diagnostyki wad rozwojowych płodu. Wprowadzenie do powszechnego stosowania nieinwazyjnych metod diagnostyki prenatalnej z jednej strony pozwoliło na szybką diagnostykę aktualnego stanu płodu, z drugiej zaś na podejmowanie prób wewnątrzmacicznego leczenia niektórych chorób. Jedną z metod stosowanych w nieinwazyjnej diagnostyce prenatalnej I trymestru ciąży jest test PAPP-A [1, 2, 3, 4].

Badanie to wykonywane jest między 11<sup>+0</sup>, a 13<sup>+6</sup> dni tygodniem ciąży i należy obecnie do testów rekomendowanych przez Polskie Towarzystwo Ginekologiczne. W skład testu wchodzi ocena parametrów morfologicznych płodu w badaniu ultrasonograficznym, wykonywanym zgodnie z zaleceniami Fundacji Medycyny Płodu (Fetal Medicine Foundation, FMF) oraz pomiar stężenia wolnej podjednostki  $\beta$  ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (f $\beta$ HCG) i osoczowego białka ciążowego A (PAPP-A) w surowicy krwi ciężarnej. Kombinacja uzyskanych wyników biochemicznych wraz z pomiarami parametrów USG oraz informacjami z wywiadu przeprowadzonego z ciężarną pozwala na oszacowanie statystycznego ryzyka wystąpienia u płodu trisomii chromosomów: 21 (zespół Downa), 13 (zespół Patau) i 18 (zespół Edwardsa) [5, 6, 7, 8, 9].

Otrzymywanie poprawnych wyników oznaczeń f $\beta$ HCG oraz PAPP-A jest podstawą ich użyteczności klinicznej. Niepoprawne wyniki markerów biochemicznych mogą być przyczyną uzyskiwania fałszywie ujemnych, lub fałszywie dodatnich wyników testu PAPP-A i przyczynić się do podjęcia przez klinicystę niewłaściwych decyzji co do dalszego postępowania diagnostycznego. Fałszywie ujemne wyniki testu mogą spowodować, że pomimo występowania wady genetycznej płodu, pacjentka nie zostanie zdiagnozowana i wada nie zostanie wykryta. W przypadku wyników fałszywie dodatnich, mimo braku wady, pacjentka zostanie niepotrzebnie narażona na inwazyjne i ryzykowne dla płodu zabiegi inwazyjne (amniopunkcja, amniocenteza, kordocenteza) [10, 11].

W diagnostyce laboratoryjnej do ilościowych oznaczeń f $\beta$ HCG i PAPP-A wykorzystuje się powszechnie metody immunochemiczne z różnymi systemami detekcji. Na rynku diagnostycznym w Polsce, oprócz klasycznych, manualnych i półautomatycznych zestawów wykorzystujących do oznaczeń technikę ELISA, pojawiły się zestawy, których aplikacje dostępne są na dużych platformach analitycznych. W zależności od rodzaju systemu analitycznego i zastosowanej technologii pomiarowej f $\beta$ HCG i PAPP-A może być oznaczane techniką CMIA (chemiluminescencja), TRACE (amplifikacja emisji kryptatu z rozdzielczością czasową sygnałów),

ECLIA (elektrochemiluminescencja) i innymi technikami. Tak duża różnorodność dostępnych metod, stosowanie różnych wzorców i dowolność w doborze przeciwciał wchodzących w skład zestawów odczynnikowych oraz różna ich podatność na czynniki interferujące sprawia, że testy poszczególnych producentów mogą różnić się między sobą czułością, swoistością, zakresem liniowości, precyzją i poprawnością, a uzyskiwane wyniki oznaczeń nie zawsze muszą być ze sobą porównywalne. Fakt ten sprawia, że nie wszystkie z dostępnych na rynku technologii pomiarowych zostały zaaprobowane przez FMF i nie wszystkie z nich mogą być rutynowo stosowane w przesiewowych nieinwazyjnych testach prenatalnych. W obecnej chwili według rekomendacji FMF badania f $\beta$ HCG i PAPP-A dla potrzeb kalkulacji ryzyka w diagnostyce prenatalnej I trymestru ciąży, można wykonywać systemami analitycznymi Auto Delfia, Delfia Express i Manual Delfia firmy Perkin Elmer, Kryptor i Kryptor compact firmy Brahms, oraz cobas e i Elecsys firmy Roche Diagnostics [10, 12]. Celem podjętych badań było porównanie wyników oznaczeń f $\beta$ HCG i PAPP-A uzyskanych przy użyciu zestawów odczynnikowych i systemów analitycznych dwóch różnych producentów.

### Materiał i metody

Oznaczenia f $\beta$ HCG i PAPP-A wykonywano zestawami odczynnikowymi firmy Brahms oraz Roche Diagnostics przy zastosowaniu dwóch analizatorów immunochemicznych: Kryptor (Brahms) i cobas e411 (Roche Diagnostics). Kalibrację odczynników, przeprowadzono zgodnie z zaleceniami podanymi przez producentów, stosując w tym celu dostarczone przez nich materiały kalibracyjne. W kolejnym etapie badań dokonano oceny precyzji oznaczeń f $\beta$ HCG i PAPP-A dla trzech różnych poziomów, mianowanych surowic kontrolnych (GM QC Kryptor 1, 2, 3 dla Brahms i Precicontrol Maternal Care 1, 2, 3 dla Roche Diagnostics). Surowice kontrolne firmy Brahms były gotowe do użycia. Materiały kontrolne firmy Roche Diagnostics dostarczone w formie liofilizatu, przed użyciem rekonstruowano w 2,0 ml wody dejonizowanej. Badania precyzji oznaczeń w wyżej wymienionych materiałach kontrolnych przeprowadzono zgodnie z protokołem CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) oznaczając poziom f $\beta$ HCG i PAPP-A dwukrotnie w ciągu dnia, w co najmniej 2 godzinnych odstępach i w dwóch powtórzeniach. Analizy prowadzono przez 5 kolejnych dni (n=20). W ocenie poprawności wyników posłużono się stopniem zgodności pomiędzy wartością średnią, uzyskaną z serii wyników oznaczeń próbek kontrolnych, a wartością należną dla określonego poziomu materiału kontrolnego, deklarowaną przez producenta [13].

Badania porównawcze f $\beta$ HCG i PAPP-A na analizatorze Kryptor i cobas e411 przeprowadzone zostały w grupie 150 pacjentek pomiędzy 11<sup>+0</sup>, a 13<sup>+6</sup> dni tygodniem ciąży, w wieku od 20 do 44 lat. Krew do badań pobierano do probówek z aktywatorem wykrzepiania, próżniowym systemem pobierania krwi Vacutainer firmy Becton Dickinson. Po całkowitym wykrzepieniu, próbki krwi odwirowano (10 minut, 1500 x g) w celu uzyskania surowicy. Na analizatorze Kryptor oznaczenia f $\beta$ HCG i PAPP-A wykonano w dniu pobrania materiału. Badania na analizatorze cobas e411 wykonano w terminie późniejszym. Do tego czasu surowicę przechowywano w temperaturze -80°C. Przed wykonaniem badań próbki surowicy rozmrożono, dokładnie wymieszano i ponownie odwirowano.

W badaniach na analizatorze Kryptor stosowano metodę TRACE – homogeną metodę immunologiczną opartą o technikę immunofluorescencji, wykorzystującą możliwość

amplifikacji emisji kryptatu z rozdzielczością czasową sygnałów. W oznaczeniach na analizatorze cobas e411 stosowano metodę ECLIA – heterogeną metodę immunologiczną typu „sandwich”. W przypadku obu zastosowanych technik pomiarowych wyniki prezentowane były w jednostkach mIU/ml. Próbkę surowicy, w których stężenia badanych analitów przekroczyły górną granicę zakresu pomiarowego dla danej metody, były automatycznie rozcieńczane przy użyciu odczynników dostarczonych przez producentów testów i ponownie analizowane. Zakresy pomiarowe stosowanych metod, ich czułość funkcjonalną i analityczną podano w tabeli I (dane producenta).

W opracowaniu wyników posłużono się pakietem statystycznym MedCalc 12.1.4.0 i SPSS 8.0. Do oceny zależności pomiędzy wynikami uzyskanymi z zastosowaniem różnych analizatorów, wykorzystano analizę korelacji Pearsona i równanie regresji metodą Passing Bablok. W ocenie istotności

Tabela I. Charakterystyka zastosowanych metod oznaczeń (dane producentów zestawów odczynnikowych)

zestaw odczynnikowy	zakres pomiarowy (mIU/ml)	czułość (mIU/ml)	
		analityczna	funkcjonalna
TRACE, Kryptor – Brahms			
f $\beta$ HCG	0,16 – 150	0,16	0,5
PAPP-A	0,004 – 6,0	0,004	0,01
ECLIA, cobas e411 – Roche Diagnostics			
f $\beta$ HCG	0,1 – 190	0,1	0,5
PAPP-A	0,004 – 10,0	0,004	0,02

ECLIA – metoda elektrochemiluminescencyjna, f $\beta$ HCG – wolna podjednostka  $\beta$  ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej, PAPP-A – osoczowe białko ciężowe A, TRACE – metoda immunofluorescencyjna z możliwością amplifikacji emisji kryptatu i rozdzielczością czasową sygnałów

Tabela II. Wyniki precyzji i poprawności oznaczeń f $\beta$ HCG i PAPP-A na analizatorze Kryptor i cobas e411

materiał kontrolny	wartość nominalna	precyzja					poprawność	
		średnia	min	max	SD	CV%	(mIU/ml)	%
f $\beta$ HCG, Kryptor								
GM QC1	86,3	82,65	79,3	85,5	2,067	2,5	-3,65	-4,2
GM QC2	21,3	20,80	20,0	21,3	0,424	2,0	-0,50	-2,4
GM QC3	8,09	7,90	7,52	8,27	0,213	2,7	-0,19	-2,4
f $\beta$ HCG, cobas e411								
MC3	93,8	89,96	85,4	94,1	2,607	2,9	-3,84	-4,1
MC2	47,2	45,83	43,2	47,2	1,238	2,6	-1,37	-2,9
MC1	13,9	13,34	12,9	14,1	0,350	2,6	-0,56	-4,0
PAPP-A, Kryptor								
GM QC1	0,326	0,331	0,32	0,35	0,009	2,7	0,005	1,5
GM QC2	1,641	1,685	1,63	1,76	0,040	2,4	0,044	2,7
GM QC3	4,461	4,438	4,45	4,64	0,115	2,6	-0,023	-0,5
PAPP-A, cobas e411								
MC3	0,250	0,259	0,25	0,27	0,007	2,7	0,009	3,6
MC2	2,450	2,502	2,40	2,61	0,063	2,5	0,050	2,1
MC1	4,920	4,937	4,68	5,81	0,113	2,3	0,017	0,4

CV – współczynnik zmienności, f $\beta$ HCG – wolna podjednostka  $\beta$  ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej, GM QC 1, 2, 3 – mianowane materiały kontrolne firmy Brahms, MC 1, 2, 3 – mianowane materiały kontrolne firmy Roche, PAPP-A – osoczowe białko ciężowe A, SD – odchylenie standardowe

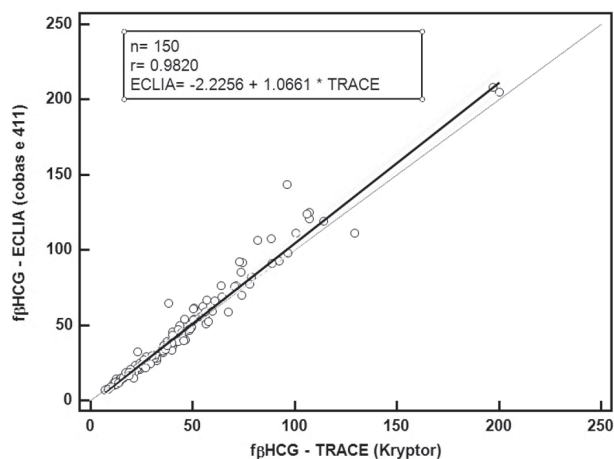
różnic posłużono się testem t-Studenta dla par zależnych, a w celu zwizualizowania rozproszenia danych zastosowano wykresy Blanda i Altmana [14, 15].

### Wyniki

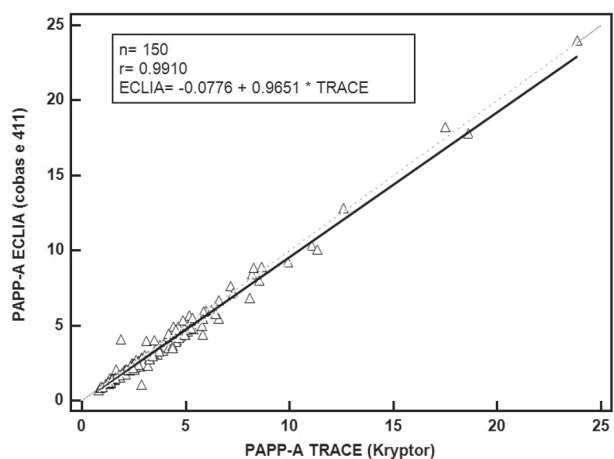
Wyniki oceny precyzji i poprawności oznaczeń poziomów f $\beta$ HCG i PAPP-A na analizatorach Kryptor i cobas e411 przedstawiono w tabeli II. Współczynniki zmienności dla obu porównywanych metod badawczych i ocenianych analizów były niższe od 3 %. Poprawność wyników oznaczeń PAPP-A na analizatorze Kryptor była nieznacznie lepsza niż na analizatorze cobas e411, natomiast dla oznaczeń f $\beta$ HCG na obu analizatorach zbliżona. W żadnym z analizowanych przypadków błąd poprawności dla oznaczeń f $\beta$ HCG i PAPP-A nie przekroczył 5 %. Wyniki badań porównawczych f $\beta$ HCG i PAPP-A wykonanych w surowicy krwi pacjentek ciężarnych, przeprowadzonych równoległe na dwóch systemach analitycznych zestawiono w tabeli III. Analiza statystyczna wykazała, że średnie wartości wyników oznaczeń f $\beta$ HCG uzyskane metodą TRACE były istotnie niższe od średnich uzyskanych z zastosowaniem metody ECLIA, w szczególności w wyższych zakresach oznaczanych stężeń. W przypadku białka PAPP-A oznaczanego analizatorem Kryptor, wartości średnie były istotnie wyższe od uzyskiwanych analizatorem cobas e411. Wyznaczone wartości median dla f $\beta$ HCG i PAPP-A oznaczanych metodą TRACE wynosiły odpowiednio 35,850 i 3,314 mIU/ml i były wyższe od median wyznaczonych dla metody ECLIA (mediana f $\beta$ HCG: 34,235 mIU/ml, mediana PAPP-A: 3,044 mIU/ml). Współczynnik korelacji Pearsona wyliczony dla zależności pomiędzy oznaczeniami f $\beta$ HCG był wysoki i wynosił: 0,9820, a równanie regresji obliczone metodą Passing Bablok przedstawiało się następująco:  $f\beta HCG_{(cobas\ e411,\ ECLIA)} = -2,2256 + 1,0061 * f\beta HCG_{(Kryptor,\ TRACE)}$  (ryc. 1). Dla PAPP-A współczynnik korelacji Pearsona był wyższy i wynosił: 0,9910. Równanie regresji wykazało zależność:  $PAPP-A_{(cobas\ e411,\ ECLIA)} = -0,0776 + 0,9651 * PAPP-A_{(Kryptor,\ TRACE)}$  (ryc. 2). Dla obu porównywanych technologii pomiarowych wykazano zależność liniową. Rozproszenie uzyskanych wyników oznaczeń f $\beta$ HCG i PAPP-A przedstawiono na wykresach Blanda – Altmana (ryc. 3 i 4).

### Dyskusja

Zapewnienie odpowiedniej jakości oznaczeń parametrów biochemicznych wchodzących w skład nieinwazyjnych testów prenatalnych, jest podstawą dobrze funkcjonującej jed-



Rycina 1. Zależność pomiędzy wynikami oznaczeń f $\beta$ HCG (mIU/ml) na analizatorze Kryptor i cobas e411. Linia ciągła: krzywa regresji ECLIA vs TRACE, linia przerywana: krzywa tożsamości (y=x).



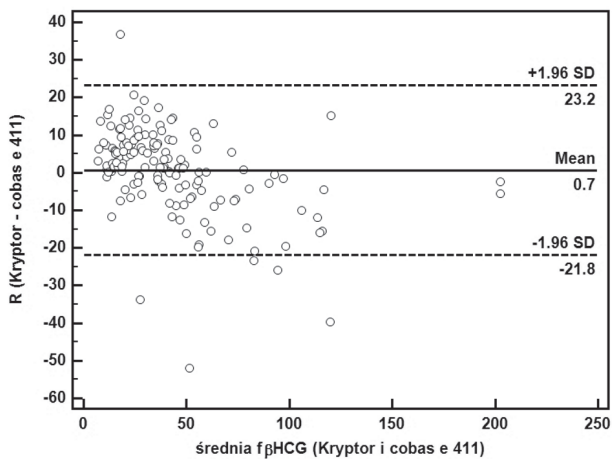
Rycina 2. Zależność pomiędzy wynikami oznaczeń PAPP-A (mIU/ml) na analizatorze Kryptor i cobas e411. Linia ciągła: krzywa regresji ECLIA vs TRACE, linia przerywana: krzywa tożsamości (y=x).

nostki zajmującej się badaniami przesiewowymi w kierunku wrodzonych wad rozwojowych płodu. Oznaczenia poziomu f $\beta$ HCG i PAPP-A wykonywane w I trymestrze ciąży powinny charakteryzować się odpowiednią czułością analityczną i funkcjonalną, a zakres mierzonych stężeń powinien być adekwatny do tych, które najczęściej spotyka się w badanej populacji. Ponadto, według kryteriów FMF stosowane w oznaczeniach f $\beta$ HCG i PAPP-A metody analityczne muszą być standaryzowane z wykorzystaniem odpowiednich wzorców, a uzyskiwane w ocenie precyzji współczynniki zmienności powinny być niższe od zakładanych. Zgodnie

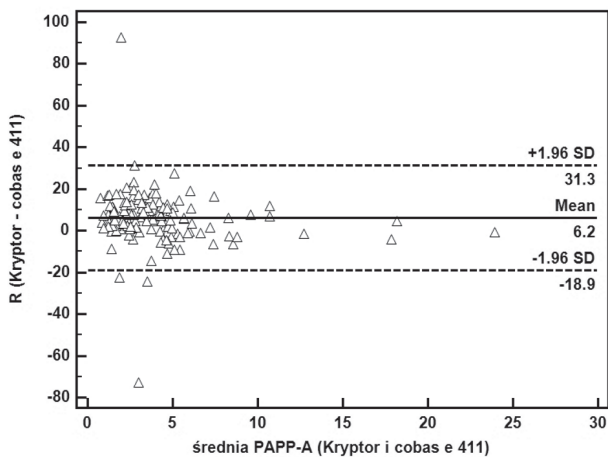
Tabela III. Porównanie wyników oznaczeń f $\beta$ HCG i PAPP-A na analizatorze Kryptor i cobas e411 - wyniki testu t dla par zależnych

	analizator	N	mediana	zakres	średnia	SD	p
f $\beta$ HCG	Kryptor	150	35,850	7,00 – 200,30	42,062	30,8126	0,025
f $\beta$ HCG	cobas e411	150	34,235	6,78 – 208,20	43,377	34,3665	
PAPP-A	Kryptor	150	3,314	0,80 – 23,84	4,012	3,1524	0,000
PAPP-A	cobas e411	150	3,044	0,68 – 24,00	3,820	3,1461	

f $\beta$ HCG – wolna podjednostka  $\beta$  ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej, N – liczba próbek, p – prawdopodobieństwo, PAPP-A – osoczowe białko ciążowe A, SD – odchylenie standardowe



Rycina 3. Zależność różnic pomiędzy wynikami oznaczeń fβHCG porównywanymi metodami od średnich stężeń fβHCG w badanej grupie pacjentek – wykres Blanda – Altmana. Linia ciągła: średnia procentowa różnica dwóch metod (mean), linia przerywana: 95 % przedział ufności.



Rycina 4. Zależność różnic pomiędzy wynikami oznaczeń PAPP-A porównywanymi metodami od średnich stężeń PAPP-A w badanej grupie pacjentek – wykres Blanda – Altmana. Linia ciągła: średnia procentowa różnica dwóch metod (mean), linia przerywana: 95 % przedział ufności.

z dokumentem FMF, dotyczącym certyfikacji laboratoriów wykonujących oznaczenia dla potrzeb nieinwazyjnej diagnostyki prenatalnej, współczynniki precyzji dla oznaczeń fβHCG prowadzonych w serii niejednoczesnej dla trzech różnych poziomów materiału kontrolnego powinny wynosić: < 3,0 % dla wartości 85 mIU/ml, < 3,0 % dla wartości 20 mIU/ml i < 3,5 % dla wartości 8 mIU/ml. Dla białka PAPP-A uzyskiwane CV powinny wynosić: < 3,0 % dla wartości 4 mIU/ml, < 3,5 % dla wartości 1,5 mIU/ml i < 3,5 % dla wartości 0,3 mIU/ml [12].

Biorąc pod uwagę dane zawarte w ulotkach metodycznych producentów zestawów odczynnikowych, obie opisywane w niniejszej pracy techniki immunochemiczne charakteryzowały się podobną czułością analityczną i funkcjonalną (tabela I – dane producentów). Nieco węższy zakres liniowości fβHCG i PAPP-A dla metody TRACE firmy Brahms, w porównaniu do metody ECLIA firmy Roche, nie miał większego znaczenia praktycznego. Uzyskane w badaniach porównaw-

czych zakresy stężeń fβHCG i PAPP-A dla obu metod były bardzo zbliżone, a odsetek próbek powyżej górnej granicy zakresu pomiarowego był podobny dla obu metod. Przedstawione powyżej wyniki badań dotyczące precyzji oznaczeń fβHCG i PAPP-A dowodzą, że zarówno technologia TRACE firmy Brahms, jak i ECLIA firmy Roche, spełniają założone przez FMF wymagania, a deklarowana przez producentów testów precyzja jest zgodna z wynikami badań przeprowadzonymi w naszym ośrodku. Analiza poprawności oznaczeń fβHCG wykazała, że zarówno metoda TRACE, jak i metoda ECLIA charakteryzowały się tendencją do nieznaczniego zaniżania wyników. W przypadku białka PAPP-A takiej tendencji nie zaobserwowano. Niezależnie od zastosowanej technologii pomiarowej błąd poprawności oznaczeń fβHCG i PAPP-A nie przekraczał 5 % i był niższy od zakładanego przez większość organizatorów sprawdzianów międzylaboratoryjnych (dla parametrów immunochemicznych: od 15 do 20 %).

Pomimo zadowalających wyników dotyczących precyzji i poprawności oznaczeń fβHCG i PAPP-A uzyskanych w materiałach kontrolnych, analiza porównawcza wyników tych samych parametrów oznaczonych w surowicy krwi pacjentek w I trymestrze ciąży wykazała, że stężenie fβHCG oznaczone metodą TRACE było istotnie niższe od stężenia fβHCG oznaczonego metodą ECLIA. Ponadto wykazano, że tendencja do uzyskiwania niższych poziomów fβHCG metodą TRACE wzrastała wraz ze wzrostem stężenia tego analitu w badanych próbkach (ryc. 3). W przypadku białka PAPP-A oznaczanego na analizatorze Kryptor, wartości średnie były istotnie wyższe od oznaczonych z zastosowaniem analizatora cobas e411. Pozwala to stwierdzić, że wyniki oznaczeń fβHCG i PAPP-A uzyskiwane wyżej wymienionymi metodami oraz wyznaczone na ich podstawie mediany nie do końca są ze sobą porównywalne.

Przyczyn tych rozbieżności doszukiwać się można w charakterystyce zastosowanych technologii pomiarowych. W metodzie TRACE (analizator Kryptor), podstawą testu jest transfer energii od donora (struktura szkieletowa z jonem europu w centrum) do akceptora (białko XL665 posiadające zdolność pobierania światła). W następujących po sobie reakcjach immunologicznych zachodzących w fazie płynnej, monoklonalne przeciwciała sprzężone z kryptatem europu, oraz monoklonalne przeciwciała sprzężone z XL665 reagują z określonymi epitopami fβHCG lub PAPP-A. Powstałe w tych warunkach kompleksy immunologiczne stwarzają warunki bliskości donora i akceptora. Po pobudzeniu kompleksów laserem azotowym o długości fali 337 nm, kryptat europu emituje długotrwały sygnał fluorescencyjny o długości fali 620 nm, podczas gdy białko XL665 sygnał o długości fali 665 nm. Stosunek sygnałów 665/620 nm jest wprost proporcjonalny do stężenia badanego analitu. Stężenie fβHCG i PAPP-A obliczane jest w oparciu o wcześniej wprowadzoną do analizatora krzywą kalibracyjną i kalibrację przeprowadzoną przez operatora [16].

W metodzie ECLIA (analizator cobas e411) do ilościowego

oznaczenia f $\beta$ HCG i PAPP-A zastosowano biotynylowane oraz znakowane kompleksem rutenu ( $Ru^{2+}$ ) przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko różnym epitopom tych białek. Powstałe w początkowym okresie reakcji kompleksy immunologiczne wiązane są do fazy stałej, którą stanowią cząsteczki magnetyczne sprzężone ze streptawidyną. W dalszych etapach, mieszanina reakcyjna przenoszona jest do celki pomiarowej. Pod wpływem pola magnetycznego kompleksy immunologiczne związane z mikrocząsteczkami osadzone są na powierzchni elektrody platynowej, a nadmiar nieprzereagowanych odczynników ulega odpłukaniu. Napięcie przyłożone do elektrody zapoczątkowuje reakcje utleniania i redukcji  $Ru^{2+}$  w obecności trójpropyloaminy zawartej w buforze Procell. Zmiana stanu redox cząsteczki rutenu powoduje emisję światła o długości fali 620 nm, które rejestrowane jest przez fotodetektor. Poziom f $\beta$ HCG oraz PAPP-A obliczany jest w oparciu o wcześniej wprowadzoną krzywą kalibracyjną i dwupunktową kalibrację przeprowadzoną przez operatora [17, 18].

Jak wynika z przedstawionej powyżej charakterystyki obu metod, zastosowane technologie pomiarowe różnią się między sobą zasadniczo. Odmienna konstrukcja zestawów odczynnikowych, użycie przez producentów różnych przeciwciał oraz sam przebieg reakcji immunologicznej w różnych fazach mogą być powodem stwierdzonych rozbieżności. Nie bez znaczenia przy interpretacji uzyskanych wyników wydaje się również fakt ewentualnego wpływu czynników interferujących, których obecność w surowicy krwi badanych pacjentek mogła mieć wpływ na oznaczone wartości stężeń wyżej wymienionych analitów.

Należy pamiętać, że z punktu widzenia lekarza klinicysty istotne są nie tyle bezwzględne wartości stężeń f $\beta$ HCG i PAPP-A, co ich wartości względne wyrażone jako MoM (Multiples of Median). W oparciu o wartości MoM oraz pomiary uzyskane z badania USG i dane zebrane od pacjentki dokonywana jest kalkulacja ryzyka wad rozwojowych płodu. Kalkulacja ta prowadzona jest z zastosowaniem specjalistycznego, certyfikowanego przez FMF oprogramowania, które zawiera algorytmy uwzględniające między innymi zastosowaną w oznaczeniach f $\beta$ HCG i PAPP-A technologię pomiarową.

Pomimo tego faktu obliczone na ich podstawie wartości MoM wydają się nie do końca trafnie szacować statystyczne ryzyko wad rozwojowych u płodu. Wstępne badania przeprowadzone w naszym ośrodku, polegające na oszacowaniu ryzyka z wykorzystaniem powyższych wyników, wykazały w pojedynczych przypadkach istnienie różnic interpretacyjnych w teście PAPP-A (dane nieopublikowane). Do podobnych, choć nie identycznych wniosków doszli badacze niemieccy. W swoich badaniach dotyczących porównania dwóch systemów immunochemicznych (cobas i Kryptor), wykazali, że wartości MoM wyznaczone na podstawie pomiarów stężeń PAPP-A przeprowadzonych z użyciem analizatora cobas, są istotnie wyższe od wartości MoM uzyskiwanych przy zastosowaniu analizatora Kryptor. W przypadku

f $\beta$ HCG wyznaczone wartości MoM nie różniły się istotnie [19]. Dowodzi to, że nawet dyskretne przesunięcia pomiędzy średnimi i wyznaczonymi wartościami median mogą wpływać na kalkulacje ryzyka i decyzje kliniczne lekarzy, co nie do końca jest zgodne z filozofią stworzonego przez FMF standardu postępowania z pacjentką ciężarną – niezależnego od lekarza oraz systemu analitycznego oceny ryzyka w teście PAPP-A.

Pomimo, że diagnostyka prenatalna I trymestru ciąży prowadzona zgodnie z zaleceniami FMF jest stosunkowo szeroko rozpowszechniona w Polsce, brak jest jak dotąd wystarczającej ilości publikacji przedstawiających analizę wartości średnich stężeń f $\beta$ HCG i PAPP-A w naszej populacji, wyznaczanych na podstawie wyników uzyskanych różnymi metodami analitycznymi. Choć próby te zostały już podjęte przez badaczy z kilku polskich ośrodków, nie obejmują one jednak porównań dla wszystkich stosowanych na polskim rynku analitycznym metod oznaczania f $\beta$ HCG i PAPP-A. W polskim wieloośrodkowym badaniu przeprowadzonym w grupie 800 kobiet pomiędzy 11<sup>+0</sup>, a 13<sup>+6</sup> dni tygodniem ciąży, badacze wyznaczyli średnie stężenia f $\beta$ HCG i PAPP-A oraz ich mediany. Oznaczenia prowadzone były technologią TRACE z zastosowaniem analizatora Kryptor. Wartości median wynosiły odpowiednio 41,13 mIU/ml dla f $\beta$ HCG i 3,45 mIU/ml dla PAPP-A i były wyższe od wartości median wyznaczonych w populacji pacjentek z naszego ośrodka (Kryptor, TRACE: mediana f $\beta$ HCG: 35,85 mIU/ml, mediana PAPP-A: 3,31 mIU/ml) [20]. Choć stwierdzone różnice w wyznaczonych medianach (wynikające zapewne z badanych populacji pacjentek) wydają się niewielkie, mogą w sposób istotny wpływać na kalkulacje ryzyka wad rozwojowych płodu.

Nieinwazyjna diagnostyka prenatalna jest jednym z najczęściej wykorzystywanych narzędzi służących ocenie prawidłowości rozwoju płodu. Dane uzyskane z badania USG oraz pomiary stężenia f $\beta$ HCG i PAPP-A w surowicy krwi ciężarnej, pozwalają obecnie na wczesne wykrycie lub wykluczenie wad rozwojowych płodu, umożliwiając tym samym określenie dalszego sposobu postępowania z pacjentką ciężarną. W związku z tym niezmiernie ważne jest, aby stosowane w oznaczeniach f $\beta$ HCG i PAPP-A metody immunochemiczne charakteryzowały się odpowiednią czułością i swoistością, a uzyskiwane wyniki były powtarzalne i porównywalne.

W pracy wykazano, że obie z dostępnych na rynku diagnostycznym metod spełniają wymagania FMF i nadają się do rutynowego stosowania. Stwierdzono jednak, że średnie stężenie f $\beta$ HCG i PAPP-A u kobiet pomiędzy 11<sup>+0</sup>, a 13<sup>+6</sup> dni tygodniem ciąży, oznaczone z zastosowaniem technologii TRACE oraz wyznaczone na ich podstawie mediany różnią się od wartości uzyskanych metodą ECLIA.

Należy w związku z tym brać pod uwagę fakt, że pomimo stosowania certyfikowanych i zaaprobowanych przez FMF immunochemicznych metod oznaczania f $\beta$ HCG i PAPP-A, uzyskiwane wyniki nie do końca muszą być ze sobą porównywalne. Sprawą niezwykle ważną jest również

fakt, że wartości median fβHCG i PAPP-A służące do wyliczenia wartości MoM oraz kalkulacji indywidualnego ryzyka wad rozwojowych płodu, zależą w dużym stopniu od charakterystyki badanej populacji pacjentek. Celowe wydaje się więc wyznaczenie tych wartości dla możliwie dużej grupy ciężarnych.

Ostateczna ocena przydatności klinicznej, uwzględniająca między innymi różnice w czułości i swoistości diagnostycznej testu PAPP-A z zastosowaniem oznaczeń fβHCG i PAPP-A metodą TRACE i ECLIA jest tematem obecnie prowadzonych przez nas badań.

### **Podziękowania**

*Autorzy pracy składają podziękowania firmie Roche Diagnostics Polska za nieodpłatne dostarczenie zestawów odczynnikowych i innych materiałów niezbędnych do przeprowadzenia badań z zastosowaniem technologii ECLIA.*

### **Piśmiennictwo**

1. Eiben B, Glaubitz R. First-trimester screening: an overview. *J Histochem Cytochem* 2005; 53(3): 281-283.
2. Knutsen-Larson S, Flanagan JD, Van Eerden P, et al. The first trimester screen I clinical practice. *S D Med* 2009; 62:392-393.
3. Nicolaides HK. First-trimester screening for chromosomal abnormalities. *Semin Perinatol* 2005; 29(4): 190-194.
4. Nicolaides HK. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenat Diagn* 2011; 31(1): 7-15.
5. Nicolaides HK, Spencer K, Avigidou K, et al. Multicenter study of first-trimester screening for trisomy 21 in 75 821 pregnancies: results and estimation of the potential impact of individual risk-orientated two-stage first-trimester screening. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2005; 25: 221-226.
6. Spencer K. Aneuploidy screening in the first trimester. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 2007; 145C: 18.
7. Stembalska A, Łączmańska I, Dudarewicz L. Test PAPP-A – Prenatalne badanie skriningowe aneuploidii chromosomów 13, 18 i 21. *Perinatologia, Neonatologia i Ginekologia* 2011; 1(4): 49-53.
8. Kotarski J, Wielgoś M, Brązert J, et al. Polish Gynaecological Society Guideline on Prenatal Diagnosis. *Ginekol Pol* 2009; 80(5): 390-393.
9. Opszała A, Piotrowski K, Zajączek S. Markery biochemiczne w krwi matki i ich rola w nieinwazyjnej diagnostyce. *Badanie i diagnoza* 2012; 18(3): 17-22.
10. Opszała A, Piotrowski K, Zajączek S. Metody oznaczania markerów biochemicznych w diagnostyce prenatalnej. *Badanie i diagnoza* 2012; 18(3): 22-24.
11. Reroń A, Sajewicz M. Badania nieinwazyjne (PRISCA 4) – określenie ryzyka wystąpienia wad genetycznych płodu. *Bliżej Diagnostyki* 2008; 19: 21-22.
12. FMF Certification of Biochemical Laboratoires. <http://www.fetal-medicine.com>
13. Garett PE, Lasky FD, Meier KL. User protocol for evaluation of qualitative test performance: Approved guideline – Second edition. CLSI EP12-A2 2008, <http://www.clsi.org>
14. Passing H, Bablok W, et al. A general regression procedure for method transformation. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988; 26: 783-790.
15. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; 1: 307-310.
16. Mathis G, Lehn JM. Trace – Another Story of Time. *Isotopics* 1995; Vol.9.
17. Richter MM. Electrochemiluminescence. *Chem Rev* 2004; 104: 3003-3036.
18. Kuramitz H. Magnetic microbead-based electrochemical immunoassays. *Anal Bioanal Chem* 2009; 394(1): 61-69.
19. Hörmansdörfer C, Soergel P, Hillemanns P, et al. Comparison of measured concentration values of biochemical serum markers with two immunoassay systems in first trimester screening for fetal aneuploidy. *Arch Gynecol Obstet* 2012; 285(2): 553-555.
20. Borowski D, Czuba B, Cnota W, i wsp. Ocena poziomów osocznego białka ciążowego A (PAPP-A) i wolnej podjednostki gonadotropiny kosmówkowej (beta hCG) między 11 a 14 tygodniem ciąży – polskie badanie wieloośrodkowe. *Ginekol Pol* 2007; 78(5): 384-387.

### **Adres do korespondencji:**

mgr Grzegorz Adam Kłoss  
Medyczne Laboratoria Diagnostyczne Invicta  
Gdański Park Naukowo – Technologiczny  
80-172 Gdańsk, ul. Trzy Lipy 3  
Tel/Fax: 0048 58 5858804  
E-mail: grzegorz.kloss@invicta.pl

Zaakceptowano do publikacji: 10.09.2013