

# Elecsys Calcitonin

*- nová úroveň klinické hodnoty*

## Úvod

Soupravu na kvantitativní stanovení koncentrace kalcitoninu v séru a plazmě uvedla firma Roche na svých automatizovaných analyzátoch založených na technologii elektrochemiluminiscence na jaře minulého roku. Tento parametr nalézá své využití nejen při diagnostice a léčbě onemocnění štítné žlázy a příštítných tělísek, včetně karcinomu a hyperparatyreoidismu, ale také při diagnostice a léčbě hyperkalcemie a Pagetovy choroby.

Právě v rámci asi nejvyužívanější indikace - medulární karcinom štítné žlázy - se tento parametr rutinně využívá od poloviny roku 2013 v Centru pro tyreoidální onkologii a endokrinní orbitopatie při FN Motol na Klinice nukleární medicíny a endokrinologie. Vlastní stanovení se realizuje na tamním Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie na analytickém systému **cobas e 411**. Před zavedením metody Elecsys se na tomto pracovišti používala pro tyto účely metoda IRMA Calcitonin od firmy IBL International. Nejen z důvodu odlišných deklarovaných citlivostí obou metod bylo nutné před zahájením rutinní aplikace stanovení Elecsys Calcitonin provést srovnání obou metod na sérii reálných pacientů v oblasti celé šíře měřícího rozsahu. Kromě toho byly prověřovány vlastnosti, jako je opakovatelnost či mezilehlá preciznost, a na základě více než půlročního měření byla rovněž zhodnocena reálná kalibrační stabilita metody.

## Biochemické, fyziologické a klinické aspekty stanovení

Lidský kalcitonin (hCT) je proteohormonem složeným z 32 aminokyselin s mole-



*cobas e 411*

kulovou hmotností 3 418 Daltonů, který je vylučován primárně parafolikulárními C-buňkami štítné žlázy<sup>(1)</sup>. Metabolizován je v játrech a ledvinách a regulován hladinami sérového vápníku. Fyziologicky ovlivňuje metabolismus vápníku a fosforu, působí antagonisticky k parathormonu (PTH). Kalcitonin také snižuje aktivitu osteoklastů, což napomáhá k následné inhibici resorpce kostí, ke které dochází nejen v postmenopauzálním období, ale i při tzv. kalciovém stresu (např. těhotenství, laktace a růst)<sup>(2,3)</sup>. Dosud byl CT izolován z více než 15 živočišných druhů. Léčebně se používá kalcitonin lidský, lososí a úhoří. Nejúčinnější je kalcitonin lososí.

Hladiny hCT v séru jsou relativně vysoké u kojenců a v průběhu dětství, v dospělosti prudce poklesnou a jsou pak relativně stabilní. Hladiny hCT v séru jsou obecně vyšší u mužů než u žen, přičemž kouření může vést k dalšímu nárůstu hladin v séru<sup>(4,5,6)</sup>. Zvýšené hladiny hCT lze nalézt u různých patologických stavů,

jako je např. medulární karcinom štítné žlázy. Zvýšený bývá hCT často rovněž při leukemických a myeloproliferativních poruchách<sup>(7)</sup> nebo může být produkován ektopicky v nádorech, jako je např. karcinom plic (malobuněčný karcinom) nebo prsu<sup>(8,9,10)</sup>. Zvýšené hladiny lze dále pozorovat ve spojení s hyperparatyreoidismem, hypergastrinemií, selháním ledvin a chronickým zánětlivým onemocněním<sup>(3,11)</sup>.

Hlavním klinickým syndromem spojeným s hypersekrecí hCT je medulární karcinom štítné žlázy (MTC), který tvoří 5 - 10 procent všech karcinomů štítné žlázy a vyskytuje se v každém věku s maximem ve 4. - 6. decenniu života<sup>(16)</sup>. Může se objevit sporadicky (70 - 75 procent případů) nebo ve familiární formě (25 - 30 procent případů), která se dědí jako autosomální dominantní znak, přičemž obě pohlaví jsou postižena stejně. Klinicky se tato forma vyskytuje nejčastěji ve 2. a 3. decenniu života. Klinicky se MTC obvykle projevuje strumou, popř. uzlem s typickou loka-

lizací ve středních partiích a při horních pólech štítné žlázy, kde je fyziologicky nejvyšší koncentrace C-buněk. U nemocných s již hmatným nádorem je časté i metastatické postižení regionálních lymfatických uzlin, u sporadických forem až v 65 - 70 procentech případů. Funkce štítné žlázy bývá obvykle normální, struma ani uzliny nebývají palpačně citlivé a přes vysoké hladiny kalcitoninu nebývá zaznamenán pokles hladiny vápníku v krevním séru. U malého, ale narůstajícího procenta pacientů jsou však bazální hladiny hormonu nerozlišitelné od normálních. Někteří z těchto subjektů představují raná stadia neoplázie C-buněk nebo hyperplázii, které se nejčastěji řeší chirurgickým zásahem. K identifikaci těchto pacientů v raném stadiu nemoci je nezbytné použít stimulační test pro sekreci hCT, aby došlo k vyloučení falešně negativních výsledků. Většina nádorů reaguje nárůstem hladin hCT po podání vápníku nebo pentagastrinu nebo použitím obou způsobů stimulace<sup>(14,15)</sup>.

Totální tyreoidektomie a odstranění

veškeré přítomné nádorové tkáně je základem léčby jak u familiární, tak i sporadické formy MTC. Po chirurgickém výkonu je v odstupu tří měsíců ve FN Motol v následném sledování pacientů s MTC provedeno měření kalcitoninu vždy zároveň se stimulačním testem (glukonát vápenatý v dávce 2,5 - 3 mg elementárního kalcia/kg tělesné hmotnosti) měření kalcitoninu, kde zvýšené hodnoty ukazují na nedostatečnou radikalitu chirurgické léčby či výskyt metastatických ložisek, které je nutno potvrdit zobrazovacími metodami (ultrazvuk krku, CT, scintigrafie, PET/CT). Kompletní remise je potvrzena neměřitelnou hladinou kalcitoninu. U pacientů s prostou a polyendokrinní strumou se zvýšeným bazálním hCT nad 100 ng/L či stimulovaným kalcitoninem (3 - 5x vyšší hodnota po stimulaci) je diagnóza MTC jistá. Naopak normální hladina kalcitoninu medulární karcinom prakticky vylučuje. Stanovení hladiny kalcitoninu je proto nezbytné u pacientů při klinickém podezření na malignitu či při nejasném cytologickém nálezu<sup>(23)</sup>.

## Design a analytické vlastnosti metody Elecsys Calcitonin

Stanovení Elecsys Calcitonin využívá monoklonální protilátky specificky směřované proti hCT. Protilátky značené rutheniovým komplexem se skládají z myších specifických komponent. Na obrázku č. 1 je znázorněn design celého stanovení.

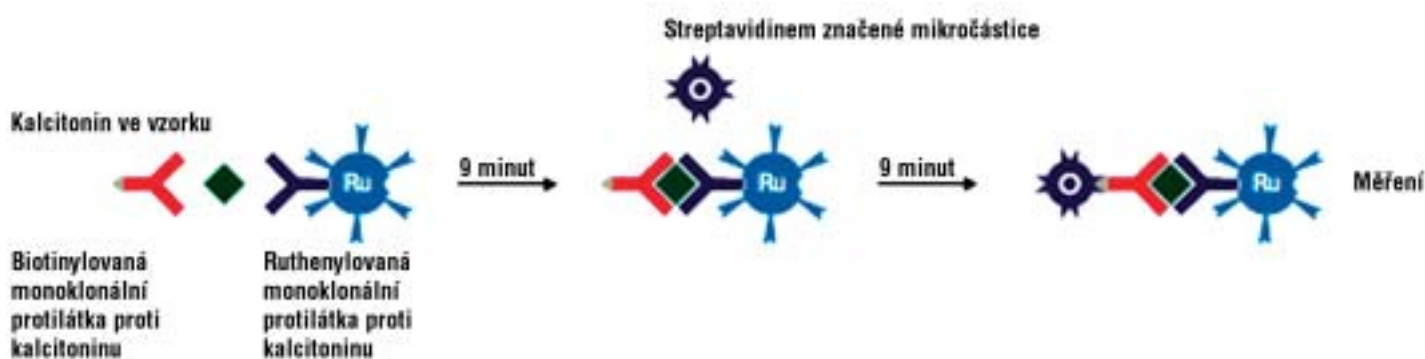
### Princip zkoušky: jednokroková sendvičová analýza

#### 1. inkubace (9 minut)

Inkubuje se 50 µL vzorku, biotinylovaná specifická monoklonální protilátka proti hCT a specifická monoklonální protilátka proti hCT značená rutheniovým komplexem. Vznikne sendvičový komplex s hCT a oběma protilátkami.

#### 2. inkubace (9 minut)

Po přidání mikročásteček pokrytých streptavidinem se komplex díky interakci biotinu a streptavidinu naváže na pevnou fázi.



Obr. 1: Design testu Elecsys Calcitonin

Vlastnosti testu	Elecsys Calcitonin	IRMA Calcitonin
Doba měření	18 min.	16 - 24 hodin
Princip metody	Jednokroková sendvičová analýza	Imunoradiometrická metoda (IRMA)
Kalibrace	Dvoubodová v duplexu	Šestibodová v duplexu v sérii
Vyšetřovaný materiál	Sérum Plazma s heparinátem lithným Plazma s K2-EDTA, plazma s K3-EDTA	Sérum
Objem vzorku	50 µL	2 x 200 µL
Limit blanku	0,3 ng/L	
Limit detekce	0,5 ng/L	1,0 ng/L - analytická senzitivita
Limit kvantifikace	1 ng/L s celkovou přípustnou chybou ≤ 30 %	
Měřicí rozsah	0,5 - 2 000 ng/L	1,0 - 1 000 ng/L
Návaznost	IRP WHO 89/620	IRP WHO 89/620
Opakovatelnost a mezilehlá preciznost (NCCLS)	Opakovatelnost: 1,4 - 3,4 % (kontroly a vzorky) Mezilehlá preciznost: 1,6 - 5,2 % (kontroly a vzorky)	Opakovatelnost: 1,76 - 9,24 % (vzorky) Mezilehlá preciznost: 2,33 - 9,72 % (vzorky)
Očekávané hodnoty	Zdravé ženy 6,39 ng/L (97,5. percentil, N = 193) Zdraví muži 10,2 ng/L (97,5. percentil, N = 162)	1,0 - 8,0 ng/L (N = 72) 3,0 - 21 ng/L (N = 53)

Tab. 1: Srovnání základních charakteristik obou metod

## Měření

Reakční směs je nasáta do měřicí cely, kde se mikročástice magneticky zachytí na povrchu elektrody. Poté se odstraní nenavázané látky. Napětí přivedené na elektrodu pak indukuje chemiluminiscenční emisi, která se měří fotonásobičem.

Uvedená tabulka č. 1 sumarizuje nej důležitější analytické charakteristiky obou používaných metod.

Firemní kontrolní materiál	Elecsys PC VARIA 1	Elecsys PC VARIA 2
Průměr v ng/L	10,72	99,52
Mezilehlá preciznost, CV v %	2,56	2,77

Tab. 2: Mezilehlá preciznost měření interních kontrolních materiálů pro metodu Elecsys Calcitonin

Nativní patientský vzorek	A	B
Průměr v ng/L	172,20	6,83
Opakovatelnost, CV v %	2,30	3,10

Tab. 3: Opakovatelnost metody Elecsys Calcitonin pro patientská séra

V případě IRMA metody se pracuje v sériích, kdy vlastnímu stanovení koncentrace v patientském vzorku předchází šestibodová kalibrace v duplexu a následná kontrola kvality na dvou hladinách rovněž v duplikátu. Příbalový leták metody IRMA navíc hovoří o nutnosti stanovení koncentrace prokalcitoninu u pozitivních vzorků z důvodu odhalení falešné positivity.

„Random access“ stanovení Elecsys se pyšní vysokou mírou kalibrační stability. V motolské laboratoři nebylo nutno po celou dobu měření metodu recalibrovat při trvalém pobytu soupravy na palubě ana-

lyzátoru. Zkušenosti z jiných pracovišť, kde se provádí stanovení kalcitoninu s nižší četností, potvrzují rovněž tato zjištění s tím, že se prakticky kalibruje pouze s novou šarží reagencie.

Parametry opakovatelnosti - viz tabulka č. 3 a mezilehlé preciznosti - viz tabulka č. 2 metody Elecsys byly ověřovány pracovníky ÚLCH a KB FN Motol a výsledky uvedené v příložených tabulkách demon-

strují vysokou mírou shody s daty deklarovanými příbalovým letákem.

## Porovnání metod

Zkraje této části bychom rádi poděkovali RNDr. Zdenku Kubíčkoví za vlastní provedení statistického porovnání obou metod pomocí programu MedCalc. Pro tyto účely byly zvoleny Passing-Bablokova regrese - viz tabulky č. 5, 6, 7 a graf č. 1 a Bland-Altmanův rozdílový graf - viz graf č. 2. Níže uvedená tabulka č. 4 demonstuje surové výsledky dosažené oběma metodami u 43 pacientů. Jak již bylo řečeno, u pacientů s hodnotami

0,50 ng/L došlo k úplné tyreoidektomii. Hodnota 0,5 ng/L tak představuje spodní limit měřicího rozsahu a koncentrace kalcitoninu jsou v těchto případech neměřitelné.

Jsmo si vědomi toho, že statistická vypovídací hodnota tohoto porovnání je

RIA - IRMA [ng/L]	cobas e 411 [ng/L]
1,81	0,50
2,08	0,50
2,90	0,50
3,06	0,50
3,09	0,50
3,32	0,50
3,43	0,50
3,45	0,50
3,80	0,50
3,86	0,50
3,93	0,50
4,07	0,50
4,70	0,50
4,75	0,50
5,75	0,50
5,81	0,50
5,89	0,50
6,64	0,50
8,12	6,31
9,61	7,46
10,08	13,18
12,09	13,76
13,82	15,08
13,89	10,52
19,52	18,77
24,67	21,87
27,82	28,20
32,58	28,49
33,99	29,68
39,04	31,62
49,59	48,89
56,26	61,42
60,82	31,90
107,99	108,60
138,06	142,60
227,21	163,90
240,20	182,70
263,66	178,90
283,70	220,00
313,35	277,80
473,68	433,30
527,08	587,30
562,46	601,70

Tab. 4: Hodnoty koncentrací kalcitoninu u totožných pacientů dosažené oběma metodami



značně snížena nedostatečným množstvím použitých probandů. Navíc plných 18 výsledků z celkových 43 u metody Elecsys Calcitonin představuje neměřitelnou hodnotu po totální tyreoidektomii, zaznamenanou v SW analyzátoru jako 0,5 ng/L. Nicméně i přesto je možné konstatovat, že přes velké rozdíly v povaze, citlivosti a přesnosti obou metod bylo dosaženo uspokojivé korelace. Odchyly jsou v rámci klinického hodnocení nevýznamné. Vyšší průměrná diference v Bland-Altmanově rozdílovém grafu je ovlivněna právě vysokým počtem neměřitelných hodnot kalcitoninu metodou Elecsys, což je přičítáno lepší analytické sensitivitě a specifičnosti této metody.



Passing-Bablokova regrese		
Proměnná X	Kalcitonin cobas e 411 (ng/L)	Počet vzorků 43
Proměnná Y	Kalcitonin RIA (ng/L)	
	X	Y
Nejnižší hodnota	0,5000	1,8100
Nejvyšší hodnota	601,7000	562,4600
Aritmetický průměr	76,1151	84,2240
Medián	13,1800	12,0900
Směrodatná odchylka	147,0213	147,8168
Směrodatná odchylka průměru	22,4205	22,5418

Tab. 5: Passing-Bablokova regresní analýza

Regresní rovnice	
$y = 2,546758 + 1,086483 x$	
Systematické diference	
Posun A	2,5468
95% konfidenční interval (CI)	1,4692 to 3,3147
Proporcionální diference	
Směrnice B	1,0865
95% CI	0,9705 to 1,2217
Náhodné diference	
Směrodatná odchylka reziduí (RSD)	19,2738
± 1.96 RSD interval	-37,7767 to 37,7767
Lineární model validity	
Cusumův test linearity	Signifikantní odchylka od linearity (P=0,04)

Tab. 6: Regresní rovnice, diference

Pořadová korelace		
Proměnná X	Kalcitonin cobas e 411 (ng/L)	Počet vzorků 43
Proměnná Y	Kalcitonin RIA (ng/L)	
Spearmanův koeficient pořadové korelace $\rho$		0,961
Úroveň významnosti		P<0,0001
95% CI pro $\rho$		0,929 to 0,979

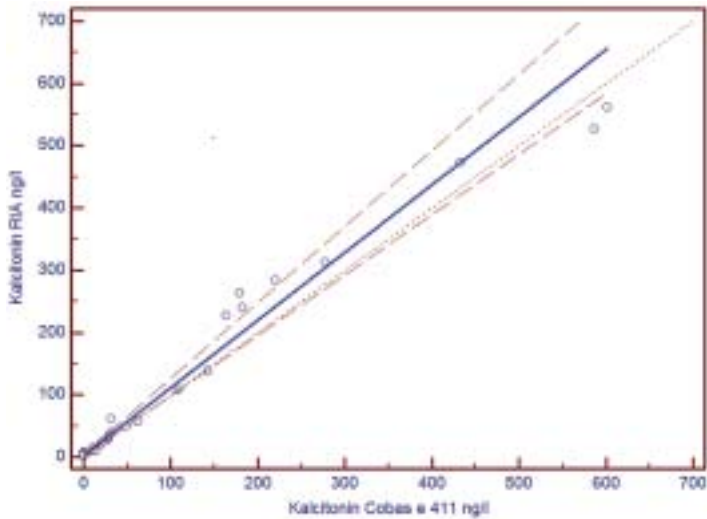
Tab. 7: Pořadová korelace

## Závěr

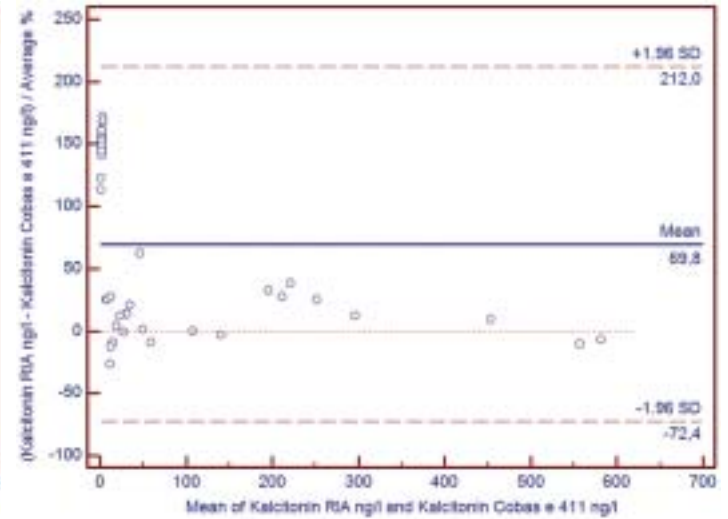
Diagnostický marker kalcitonin je citlivý a specifický nádorový marker pro diagnostiku i celoživotní sledování pacientů s MTC po operaci štítné žlázy<sup>(17-22)</sup>. Parametr vykazuje vysokou míru korelace s nádorovou zátěží a napomáhá včasné detekci nových zbytkových onemocnění<sup>(18)</sup>. Některá guidelines dokonce doporučují screening kalcitoninu u všech pacientů s tyroidálními uzly<sup>(17, 20)</sup>. Zavedení metody Elecsys s vylepšenou citlivostí a specifičností tvrzení těchto guidelines ještě více podporuje.

Test Elecsys Calcitonin disponuje nadstandardními analytickými vlastnostmi a splňuje tak veškeré požadavky, které jsou na dnešní moderní metody kladeny. Uvedením tohoto stanovení Roche doplňuje své špičkové portfolio automatizovaných vyšetření tyroidálních markerů, které tak zahrnuje nejen úplnou nabídku protilátek, nýbrž také parametry pro management onkologických onemocnění štítné žlázy (Calcitonin, Elecsys Tg hs).





Graf 1: Grafické znázornění Passing-Bablokovy regrese



Graf 2: Bland-Altmanův rozdílový graf, relativní rozdíly v %

## Literatura:

- 1) Zaidi M, Moonga BS, Bevis PJ, et al. Expression and function of the calcitonin gene products. *Vit Horm* 1991;46:87-164.
- 2) Inzerillo AM, Zaidi M, Huang CL. Calcitonin: physiological actions and clinical applications. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2004;17(7):931-940.
- 3) Austin LA, Heath H 3rd. Calcitonin: physiology and pathophysiology. *New Engl J Med* 1981;304(5):269-278.
- 4) Mitchell DM, Jüppner H. Regulation of calcium homeostasis and bone metabolism in the fetus and neonate. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010;17:25-30.
- 5) Machens A, Hoffmann F, Sekulla C, et al. Importance of genderspecific calcitonin thresholds in screening for occult sporadic medullary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2009;16:1291-1298.
- 6) d'Herbomez M, Caron P, Bauters C, et al. Reference range of serum calcitonin levels in humans: influence of calcitonin assays, sex, age, and cigarette smoking. *Eur J Endocrinol* 2007;157(6):749-755.
- 7) Hillyard CJ, Oscier DG, Foa R, et al. Immunoreactive calcitonin in leukemia. *Br Med J* 1979;2(6202):1392-1393.
- 8) Mulder H, Hackeng WH. Ectopic secretion of calcitonin. *Acta Med Scand* 1978;204(4):253-256.
- 9) Schwartz KE, Wolfsen AR, Forster B, et al. Calcitonin in nonthyroidal cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 1979;49(3):438-444.
- 10) Wallach SR, Royston I, Taetle R, et al. Plasma calcitonin as a marker of disease activity in patients with small cell carcinoma

- of the lung. *J Clin Endocrinol Metab* 1981;53(3):602-606.
- 11) Mulder H, Silberbusch J, Hackeng WH, et al. Hypercalcitoninaemia in patients with chronic inflammatory disease. *Neth J Med* 1980;23(3):129-131.
- 12) Leboulleux S, Baudin E, Travagli J-P, et al. Medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol* 2004;61:299-310.
- 13) Elisei R, Pinchera A. Advances in the follow-up of differentiated or medullary thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol* 2012;8:466-475.
- 14) Kratzsch J, Petzold A, Raue F, et al. Basal and stimulated calcitonin and procalcitonin by various assays in patients with and without medullary thyroid cancer. *Clin Chem* 2011;3:467-474.
- 15) Kudo T, Miyauchi A, Ito Y, et al. Serum calcitonin levels with calcium loading tests before and after total thyroidectomy in pati-

- ents with thyroid diseases other than medullary thyroid carcinoma. *Endocr J* 2011;58(3):217-221.
- 16) U.S. National Library of Medicine, Medline Plus, accessed Jan-21-2013.
- 17) Elisei R, Pinchera A. (2012). *Nature Reviews, Endocrinology, Volume 8, August 2012, 467-475.*
- 18) Costante, G. et al. (2009). *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 5:35-44.
- 19) Cooper, D.S. et al. (2009). *Thyroid* 19(11):1-48.
- 20) BTA and RCP guidelines for the management of thyroid cancer (2007).
- 21) Pacini, F. et al. 2006. *Eur J Endocrinol* 154:787-8037.
- 22) Kloos, R. et al. (2009). *Thyroid* 19:565-612.
- 23) Vlček, P. Medulární karcinom štítné žlázy - diagnostické a léčebné možnosti. *Onkologie* 2011; 5(6): 336-339.

