

## Měření tyreoidních hormonů v séru technikou microarray pomocí systému Randox Evidence Investigator – krátké sdělení

Vávrová J., Friedecký B., Ulrychová M., Ličbinská E., Palička V.

Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF UK a FN, Hradec Králové

### SOUHRN

*Cíl sdělení:* Pilotní analytická studie použití technologie proteinových biočipů Randox Evidence Investigator pro stanovení tyreoidních hormonů a jejich srovnání s rutinně používanou metodou elektrochemiluminiscence Roche.

*Metodika:* Při měření TSH jsme srovnávali data naměřená systémem E-170 Modular (Roche) s výsledky měření na přístroji Evidence Investigator (Randox), získanými panely Thyroid total array a Thyroid free array. Systém Evidence Investigator™ firmy Randox pracuje s technologií proteinových biočipů umožňujících současné stanovení několika analytů z jednoho vzorku.

*Výsledky a závěry:* Použitím rozdílových Blandových-Altmanových diagramů bylo zjištěno, že oba systémy poskytují statisticky významně odlišné výsledky. Byly stanoveny intervaly spolehlivosti bias (95% CI): -1,3 až 2,7 mU/l pro TSH (total modul), -1,7 až 3,0 mU/l pro TSH (free modul), -53,9 až 54,0 nmol/l (T4), -1,11 až 0,66 nmol/l (T3), -4,7 až 3,0 pmol/l (fT4) a -1,4 až 4,2 pmol/l (fT3). Za hlavní příčinu nesouladu lze považovat nedostatečnou harmonizaci kalibrací biočipového systému s klasickými rutinními postupy.

*Klíčová slova:* imunochemické měření, biočip, rozhodovací limit, srovnatelnost.

### SUMMARY

**Vávrová J., Friedecký B., Ulrychová M., Ličbinská E., Palička V.: Measurement of thyroid hormones in serum by microarrays using the Randox Evidence Investigator System – short communication**

*Objective:* Presented is the pilot study using Randox Evidence Investigator biochip array technology in measurement of thyroid hormones in serum compared to electrochemiluminiscent immunoassay by Modular E-170 (Roche).

*Method:* In the determination of TSH we compared data measured by system Evidence Investigator (Thyroid total panel and Thyroid free panel, Randox), with results gained on equipment Modular E-170 (Elecys TSH, Roche). Investigator Biochip Array Technology is used to perform simultaneous quantitative detection of multiple analytes from a single patient. A combination of competitive and sandwich chemiluminiscent immunoassays is employed.

*Results and Conclusion:* The Bland & Altman plots comparing two measurements techniques shows statistically significant differences in results. We determined bias (95% confidence interval): -1.3 to 2.7 mU/l for TSH (Thyroid total panel); -1.7 to 3.0 mU/l for TSH (Thyroid free panel); -53.9 to 54.0 nmol/l (total T4), -1.11 to 0.66 nmol/l (total T3), -4.7 to 3.0 pmol/l (free T4) and -1.4 - 4.2 pmol/l (free T3). The main reason for result differences appears to be in insufficient harmonisation of biochip and routine method calibrations.

*Key words:* immunoassay, biochip, decision limit, traceability.

## Úvod

Systém evidence Investigator™ firmy Randox (Randox Laboratories Ltd., Velká Británie) pracuje s technologií proteinových biočipů umožňujících simultánní stanovení několika analytů z jednoho vzorku. Princip měření je založen na chemiluminiscenční reakci, jejíž signál je cíleně snímán z jednotlivých míst biočipu CCD kamerou. Vyšetřování tyreoidních hormonů tímto systémem bylo srovnáno s běžným vyšetřením na rutinním automatickém analyzátoru E-170 Modular Roche, používajícím elektrochemiluminiscenční detekci.

Technologie mikročipů je prozatím využívána zejména při genomické a proteomické analýze. Použití biočipového systému Evidence investigator je v odborné literatuře popisováno jen sporadicky, publikovány jsou práce zabývající se simultánním stanovením kardiálních markerů [1], paralelním měřením solubilních adhezních molekul (L-, P-, E- selektinů, VCAM-1, ICAM-1) [2]. Přehled aplikací měřících mikročipových metod v alergologii lze nalézt v přehledné práci rakouských autorů [3].

## Materiál a metody

### Měřicí systémy

Imunochemický modul E-170 Modular (Roche Diagnostics, SRN) s chemiluminiscenční detekcí pracuje s diagnostickými soupravami určenými pro jednotlivé analyty. Kalibrace je poskytnuta kalibrační laboratoří výrobce. Šestibodová kalibrační funkce je součástí čárového kódu každé soupravy, uživatel provádí adjustaci této křivky na laboratorní podmínky pomocí dvou kalibrátorů.

Systém Evidence Investigator™ firmy Randox (Randox Laboratories Ltd., Velká Británie) pracuje s technologií proteinových biočipů umožňujících současné stanovení několika analytů z jednoho vzorku. Devítibodová kalibrační závislost sestavená výrobcem je součástí doprovodného elektronického média každé soupravy. Uživatel tuto závislost ověřuje aplikací devíti kalibrátorů. Pro stanovení tyreoidních hormonů byly použity dva diagnostické panely: Thyroid total array se spektrem analytů TSH, T3, T4 a Thyroid free array pro stanovení TSH, fT3 a fT4.

Oběma měřicími systémy byly měřeny tyroid stimulační hormon (TSH), trijodtyronin (T3), tyroxin (T4), volný trijodtyronin (fT3) a volný tyroxin (fT4).

## Materiály

Měřeny byly vzorky sér skladovaných při -20 °C po dobu 14 dnů (stabilita analytů deklarovaná výrobcem diagnostik je 1 měsíc). Vzorky byly získány od pacientů nemocniční populace, u nichž bylo požadováno rutinní vyšetření tyreoidních hormonů na měřicím systému Modular Roche E-170. U TSH jsou v práci hodnoceny dva soubory odpovídající dvěma různým měřicím panelům Randox Evidence Investigator (Thyroid free array a Thyroid total array).

První soubor porovnává data naměřená systémem E-170 Modular (Roche) s výsledky měření panelem Thyroid total array. V souboru bylo 70 vzorků osob ve věku 61 ± 18 let, z toho 53 žen a 17 mužů. Byly měřeny hodnoty TSH (označeny ve výsledcích jako TSH-E170 TOT pro systém Roche a TSH-EV TOT pro systém Randox), T4 a T3. Druhý soubor porovnává data naměřená imunochemickým systémem E-170 s výsledky získanými systémem Evidence Investigator panelem Thyroid free array. Zde bylo použito 42 vzorků sér dospělých osob (26 žen, 16 mužů) ve věku 27–67 let. Byly měřeny opět hodnoty TSH (značeny ve výsledcích jako TSH-E170 FREE pro systém Roche a TSH-EV FREE pro Randox, fT4 a fT3).

Pro vnitřní kontrolu kvality byly použity kontrolní materiály výrobců dodávané výrobcem jako součást měřicích systémů.

Ke statistickému zpracování výsledků byl použit program MedCalc (Belgie).

## Výsledky

V tabulce 1 jsou uvedeny základní statistické údaje všech měření: nejnižší a nejvyšší naměřené hodnoty, aritmetické průměry a mediány.

Diference byly vyhodnocené Blandovými-Altmanovými diagramy zobrazenými na obrázku 1. U všech

Table 1. Summary statistics

	n	Lowest value	Highest value	Arithmetic mean	Median
TSH E170 TOT	70	0.0050	48.5400	2.8877	1.7800
TSH EV TOT	70	0.0100	41.9100	2.1427	1.1900
TSH E170 FREE	42	0.0050	15.8400	3.0990	1.8100
TSH EV FREE	42	0.0400	11.6300	2.4536	1.7200
fT3 E170	42	1.9000	27.7000	4.9405	4.3500
fT3 EV	42	1.5000	19.2800	3.5231	2.9300
fT4 E170	42	9.0000	36.6000	15.7878	14.7000
fT4 EV	42	4.4900	39.3300	16.2079	14.9000
T3 E170	70	0.3000	5.3000	2.1217	2.1000
T3 EV	70	0.4600	6.0900	2.3369	2.2300
T4 E170	70	7.6000	279.300	115.0145	109.6000

měřených analytů byly pozorovány významné difference mezi výsledky mikročipové a klasické (Roche) metody. Dokonce i hodnoty TSH naměřené dvěma různými panely na přístroji Evidence investigator nasvědčují významně rozdílné kalibraci obou panelů při měření TSH.

Přesnost měření systému E-170 vyjádřená daty (variačními koeficienty) vnitřní kontroly kvality pro jednotlivé analyty je 5,9 % pro T3; 6,8 % pro T4; 3,0 % pro TSH; 5,3 % pro fT3 a 6,0 % pro měření fT4 v sérii. Hodnocení přesnosti měření na systému Randox Evidence Investigator bylo z důvodu limitovaného počtu dostupných analýz omezeno na měření deseti duplikátů pro analyty měřené panelem Thyroid total array. Byly získány hodnoty variačních koeficientů 9,3 % pro TSH, 4,0 % pro T3 a 4,0 % pro T4.

## Diskuse

Srovnatelnost mikročipové metody s klasickou elektrochemiluminiscenční rutinní metodou je problematická. Tomu nasvědčují už data tabulky 1. Rozsah a charakter diferencí je ještě zřejmější z diagramů podle Blanda a Altmana (viz graf 1). Rozdíly mezi srovnávanými metodami ukazují v případě TSH přítomnost jak kalibrační, tak i proporcionální složky systematické chyby. U ostatních analytů (T4, T3, fT4, fT3) dominují rozdíly, jejichž původ můžeme hledat především v kalibrační složce systematické chyby. Nápadná je nesrovnatelnost výsledků měření TSH mezi oběma použitými panely proteinových mikročipů (total a free). Je zajímavé, že experimentálně verifikované rozdíly mezi oběma panely při stanovení TSH jsou v dobré shodě s regresními závislostmi se srovnávací metodou, uvedenými v pracovní dokumentaci výrobce. To znamená, že i výrobce patrně potvrzuje daty své dokumentace významné kalibrační rozdíly i mezi oběma svými panely. Jedná se o údaje regresní analýzy  $y = 1,1 x - 0,43$  ( $r = 0,978$ ) pro Thyroid total array respektive  $y = 0,75 x + 0,07$ , ( $r = 0,976$ ) pro Thyroid free array.

Na druhé straně dávají jak námi zjištěná experimentální data, tak i uvedená data výrobce naději, že úroveň srovnatelnosti by bylo možné řešit pečlivou rekalicací obou panelů s použitím referenčních materiálů návazných na vhodný mezinárodní referenční materiál.

## Závěr

Výsledky získané použitím proteinových mikročipů Randox jsou nedostatečně srovnatelné s rutinní metodou měření. Pravděpodobnou příčinou jsou kalibrační rozdíly mezi měřicími systémy. Analýza tyreoidních hormonů v séru proteinovými mikročipy Randox je však cennou zkušeností pro budoucnost, v níž můžeme nasazení metod tohoto typu očekávat i mimo sféru, v níž doposud jednoznačně dominují, tj. i mimo oblast genomických a proteomických analýz.

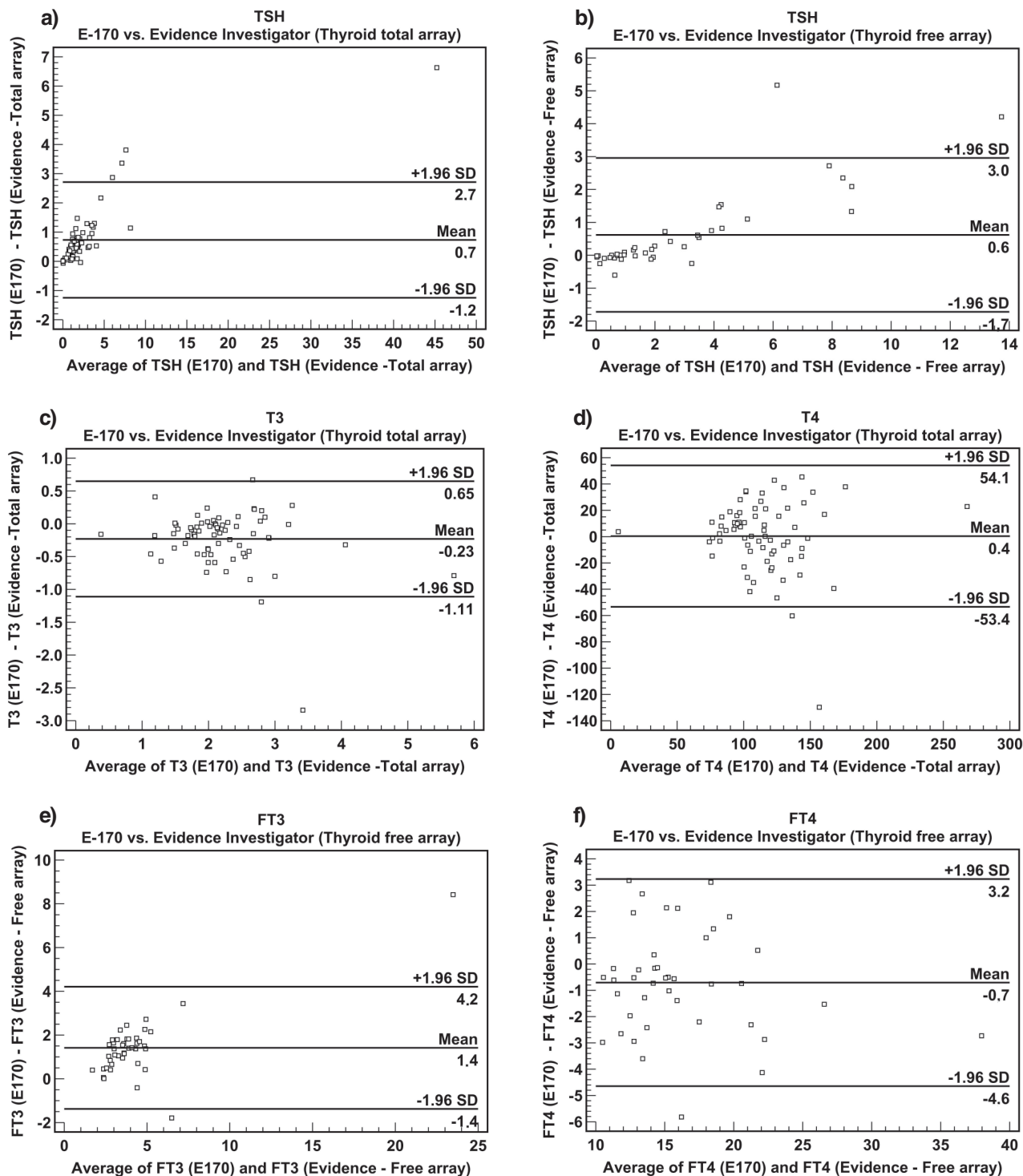


Fig. 1. Bland-Altman difference diagrams

## Literatura

1. Di Serio, F., Amodio, G., Ruggieri, E. et al. Proteomic approach to the diagnosis of acute coronary syndrome: Preliminary results. *Clinica Chimica Acta*, 2005, 357, 2, p. 226–235.
2. McAleer, D., McPhillips, F. M., Fitzgerald, S. P. et al. Application of Evidence Investigator for the simultaneous measurement of soluble adhesion molecules: L-, P-, E-selectins, VCAM-1, ICAM-1 in a biochip platform. *J. Immunoassay Immunochem.*, 2006, 27, 4, p. 363–378.

3. Horwanegg, C., Hiller, R. Protein microarrays for the diagnosis of allergic diseases: state-of-the-art and future development. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2005, 43, 12, p. 1321–1326.

Do redakce došlo 22. 7. 2007.

Adresa pro korespondenci:  
Ing. Jaroslava Vávrová, Ph.D.  
ÚKBD LF UK a FN  
Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové  
e-mail: vavrovaj@lfhk.cuni.cz