

Μέθοδοι προσδιορισμού ορμονών- Ανοσοπαρεμβολές

Παπαπαναγιώτου Αγγελική , MD, PhD

Βιοπαθολόγος, Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ.

Οι εργαστηριακές μετρήσεις των ορμονών και των σχετικών με αυτές βιοδεικτών είναι πλέον καθοριστικές και πρακτικά απαραίτητες στην ιατρική διάγνωση, στην διαφορική διάγνωση, στην αξιολόγηση, στην παρακολούθηση της θεραπείας και στην πρόβλεψη της έκβασης της νόσου. Το εργαστήριο πρέπει να εγγυάται την τεχνική εγκυρότητα και την αναπαραγωγικότητα των μετρήσεων των ορμονών μέσω τυποποιημένων εργαστηριακών διαδικασιών και κατάλληλων προτύπων ποιότητας.

Τα τελευταία 60 χρόνια έχει σημειωθεί τεράστια πρόοδος στην ευαισθησία, ειδικότητα και στην απλοποίηση της διαδικασίας των μεθόδων μέτρησης των ορμονών σαν επακόλουθο της ανάπτυξης της βιοτεχνολογίας. Ο ρόλος ενός αξιόπιστου εργαστηρίου είναι ιδιαίτερα σημαντικός για ασθενείς με πιθανές ενδοκρινικές διαταραχές και η λειτουργία ή δυσλειτουργία των αξόνων του ενδοκρινικού συστήματος ελέγχεται με τον προσδιορισμό των βασικών ορμονών.

Κατά την εργαστηριακή διαδικασία διακρίνουμε τρία στάδια : Το **προαναλυτικό** (συλλογή ή παραλαβή του δείγματος), το **αναλυτικό** (μεθοδολογίες-τεχνικές προσδιορισμού) και το **μετα-αναλυτικό** (επικύρωση-εκτύπωση αποτελεσμάτων).

Οι **μέθοδοι προσδιορισμού** διακρίνονται σε : βιολογικές, χημικές, ανοσοχημικές ή ανοσοπροσδιορισμοί , HPLC (High-performance liquid chromatography), GC-MS ((Gas chromatography-Mass spectrometry) και Multiple assay.

Ανοσοχημικές : Διακρίνονται σε **έμμεσες** όπου γίνεται ποιοτική ή ημιποσοτική εκτίμηση της ποσότητας του συμπλόκου (Νεφελομετρία, ανοσοηλεκτροφοροση, Κυκλοτερής ανοσοδιάχυση, αντιδράσεις συγκόλλησης)

και σε **άμεσες** με χρήση επισημασμένου αντιγόνου ή αντισώματος(ποσοτικές μέθοδοι) .

HPLC: τεχνική διαχωρισμού υψηλής ευαισθησίας.

GC-MS: Συνδυασμός μιας τεχνικής διαχωρισμού (αέρια χρωματογραφία) με μια τεχνική ταυτοποίησης (φασματομετρία μάζας MS). Πολύ ισχυρή αναλυτική τεχνική με υψηλή ευαισθησία.

Multiple assay όπου εξετάζονται ταυτόχρονα περισσότεροι από έναν προσδιορισμοί.

Χαρακτηριστικά και αξιολόγηση αναλυτικών μεθόδων

Τα μεθοδολογικά χαρακτηριστικά μιας αναλυτικής μεθόδου είναι :

–**Αναλυτική ευαισθησία (Analytical sensitivity)**: Η δυνατότητα της μεθόδου να προσδιορίζει μικρές ποσότητες της προς ανάλυση ορμόνης.

–**Αναλυτική ειδικότητα (Analytical specificity)**: Η ικανότητα της μεθόδου να προσδιορίζει εκλεκτικά και αποκλειστικά την ορμόνη.

–**Ακρίβεια (Accuracy)**: Η δυνατότητα της μεθόδου να προσδιορίζει την «πραγματική» ποσότητα της ορμόνης.

–**Επαναληψιμότητα(Precision)**: Η ικανότητα της μεθόδου να δίνει το ίδιο αποτέλεσμα σε επανειλημμένες μετρήσεις του ίδιου δείγματος.

-**Όριο ανίχνευσης (Detection limit):** Ελάχιστη δυνατή ποσότητα της ουσίας (ορμόνης) που μπορεί να μετρηθεί με την μέθοδο(LOD) .

- **Γραμμικότητα ή αναλυτικό εύρος (linearity, analytical range).**

Έλεγχος ποιότητας εργαστηριακών αποτελεσμάτων

Αποτελεί το σημαντικότερο εργαλείο του εργαστηριακού για την παραγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων. Διακρίνεται σε δύο παράλληλους και συμπληρωματικούς μηχανισμούς:

-Τον **εσωτερικό (ενδο-εργαστηριακό) έλεγχο** όπου η ορθότητα των αποτελεσμάτων των ασθενών εξασφαλίζεται με την αξιολόγηση της συμπεριφοράς δειγμάτων ελέγχου που αναλύονται παράλληλα με τους ορούς των ασθενών. Χρησιμοποιούνται τα διαγράμματα ελέγχου που είναι στατιστικά εργαλεία για να συγκριθεί το αποτέλεσμα του ορού ελέγχου με προηγούμενα αποτελέσματα (κατανομή των τιμών).

-Τον **εξωτερικό (δι-εργαστηριακό) έλεγχο**. Γίνεται με τη συμμετοχή του εργαστηρίου στα «Δι-εργαστηριακά προγράμματα εξωτερικής αξιολόγησης ποιότητας» (EQAS).

Οι Παράγοντες που επηρεάζουν τα αποτελέσματα ορμονικών προσδιορισμών είναι :

-Παράγοντες που σχετίζονται με τον ασθενή και την προετοιμασία του (διαιτητική κατάσταση, φύλο, ηλικία, φυλή, φάρμακα, κύηση κλπ.).

- Παράγοντες που σχετίζονται με το δείγμα(αιμοληψία, φιαλίδια, φυγοκέντρηση).

-Παράγοντες που σχετίζονται με την ίδια τη φύση των ορμονών αλλά και με ενδογενείς περιορισμούς των ανοσομετρήσεων (βιολογικοί ρυθμοί , φορείς πρωτεϊνών).

Ενδογενείς περιορισμοί των ανοσομετρήσεων.

-**Μέτρηση της ανοσολογικής δραστικότητας.** Οι ανοσοπροσδιορισμοί μετρούν την ανοσολογική όχι την βιολογική δραστικότητα των ορμονών.

- **Μη ειδικές παρεμβολές** στις ανοσοαναλύσεις μπορεί να προέλθουν από : Παρουσία αντισωμάτων προς την ίδια την ορμόνη, από ετερόφιλα αντισώματα και από Ρευματοειδείς παράγοντες.

- **Φαινόμενο hook** στις υψηλές συγκεντρώσεις το οποίο επηρεάζει δείγματα με πολύ ψηλές τιμές ορμόνης, τις ανοσομετρικές μεθόδους δύο θέσεων (two site-IMA) και προκαλεί ψευδώς χαμηλές ή μηδενικές τιμές.

Κλινική αξιολόγηση εργαστηριακών αποτελεσμάτων. Το εργαστηριακό αποτέλεσμα πρέπει να συσχετίζεται με την κατάσταση του εξεταζομένου προκειμένου να διαγνώσουμε κάποια παθολογία, να διαφοροδιαγνώσουμε μια παθολογία από μια άλλη, να παρακολουθήσουμε την εξέλιξη της νόσου καθώς και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Σχετίζεται με το Ιστορικό του ασθενούς, την τρέχουσα κατάσταση του ασθενούς και την αξιοπιστία εργαστηριακού αποτελέσματος. Απαιτείται συνεργασία Κλινικών-Εργαστηριακών.

Πως γίνεται η κλινική αξιολόγηση των εργαστηριακών αποτελεσμάτων

-**Τιμές αναφοράς :** Το σύνολο των τιμών μιας βιολογικής παραμέτρου που μετρήθηκε σε πληθυσμό ατόμων που βρίσκονταν σε ορισμένη κατάσταση υγείας.

-**Δείκτες διαγνωστικής ποιότητας** εξετάσεων που χρησιμοποιούνται για να εκφράσουμε πόσο «ικανή» είναι μια εξέταση να βοηθήσει στη διάγνωση μιας νόσου. Αυτοί είναι η

Κλινική ευαισθησία (Το ποσοστό των ασθενών που δίνουν θετική την δοκιμασία) και η **Κλινική ειδικότητα** (Το ποσοστό των υγιών που έχουν αρνητική την δοκιμασία).

Για να μπορέσουμε να απαντήσουμε στο βασικό ερώτημα της διαγνωστικής τι πιθανότητες έχει ένα άτομο να πάσχει από ένα νόσημα με δεδομένο το αποτέλεσμα μιας δοκιμασίας (εξέτασης) χρησιμοποιούμε τους δείκτες που αφορούν τα αποτελέσματα των εξετάσεων και είναι:

Δείκτες διαγνωστικής ή προβλεπτικής αξίας: Προγνωστική αξία (+) αποτελέσματος και η Προγνωστική αξία (-) αποτελέσματος.

Λόγοι πιθανοφάνειας (Likelihood ratio) : Θετικός λόγος πιθανοφάνειας και Αρνητικός λόγος πιθανοφάνειας.

Συμπερασματικά για την επίτευξη και διατήρηση υψηλής ποιότητας μέτρησης ορμονών στο εργαστήριο πρέπει να γίνεται επιλογή κατάλληλων αναλυτικών μεθόδων, καθορισμός στόχων ποιότητας για κάθε προσδιορισμό, ύπαρξη συστημάτων παρακολούθησης της αναλυτικής ποιότητας και καλή συνεργασία με τους κλινικούς ιατρούς.