



ISSN 1644-8448
nakład: 1000 egz.

LabForum



cobas®
Life needs answers



więcej informacji na stronie:
www.hpv16and18.com

Szanowni Państwo,

Miło mi poinformować, że *Food and Drug Administration* (amerykańska Agencja Żywności i Leków, w skrócie FDA) zatwierdziła pierwszy test wykrywający DNA wirusa brodawczaka ludzkiego do pierwotnej profilaktyki raka szyjki macicy. Oznaczenie DNA HPV testem cobas HPV może być wykonywane samodzielnie u kobiet po 25 roku życia i pomóc lekarzom ocenić konieczność wykonania dodatkowych badań diagnostycznych na obecność raka szyjki macicy. Test dostarcza także informacji o ryzyku rozwoju tej choroby w przyszłości. Wcześniej, w 2011 roku, FDA zatwierdziła test do stosowania w połączeniu z lub jako uzupełnienie do badania cytologicznego (PAP test) wykrywającego zmiany w komórkach szyjki macicy.

Korzystając z próbki komórek pobranych z szyjki macicy, test cobas HPV wykrywa DNA z 14 typów wirusów HPV wysokiego ryzyka. Test specyficznie rozpoznaje HPV 16 i HPV 18, równocześnie wykrywając inne 12 typów HPV wysokiego ryzyka.

HPV to grupa ponad 40 powiązanych wirusów, zgodnie z *Centers for Disease Control and Prevention*, są to najczęstsze choroby przenoszone drogą płciową. Około 14 typów HPV wysokiego ryzyka związanych jest z rakiem szyjki macicy.

W większości przypadków zakażenie HPV wysokiego ryzyka nie powoduje żadnych problemów zdrowotnych. Jednak u około 10 procent zakażonych kobiet rozwija się trwała infekcja, która może narazić je na ryzyko zachorowania na raka. Typy HPV 16 i HPV 18 odpowiedzialne są za około 70 procent przypadków raka szyjki macicy.

Badania kliniczne nad testem cobas HPV obejmowały ponad 47 000 kobiet w wieku 25 lat i starszych poddanych rutynowym badaniom szyjki macicy oraz następne trzy lata obserwacji kobiet z pozytywnym wynikiem testu, które przeszły kolposkopię. Badania wykazały, że test jest bezpieczny i skuteczny wobec nowego wskazania.

Cobas HPV jest jedynym testem zaaprobowanym przez FDA, który może być użyty zamiast cytologii w profilaktyce raka szyjki macicy u kobiet powyżej 25 roku życia.

Zachęcam do lektury LabForum. W bieżącym numerze znajdą Państwo m.in. artykuły na temat zalet oznaczania parathormonu testami 3 gen. u chorych z przewlekłą chorobą nerek oraz rekomendacje czołowych opiniodawców środowiska medycznego odnośnie ujednolicenia wartości docelowych wyników badań lipidowych w polskich laboratoriach.

Spis treści:

Oznaczanie parathormonu testami trzeciej generacji, PTH(1-84) 3 gen., u chorych z przewlekłą chorobą nerek 3

Konieczność ujednolicenia wartości docelowych wyników badań lipidowych 6

Znaczenie kontroli negatywnych w laboratorium histopatologicznym 8

Zakażenie układu moczowego (ZUM) 15

Z poważaniem,

Tomáš Petr
wraz z zespołem RDP



Oznaczanie parathormonu testami trzeciej generacji, PTH(1-84) 3 gen., u chorych z przewlekłą chorobą nerek

Wiesław Piechota, Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej
Wojskowy Instytut Medyczny w Warszawie

PATOFIZJOLOGIA WYDZIELANIA PARATHORMONU W PRZEWLEKŁEJ CHOROBY NEREK

Przewlekła choroba nerek upośledza wiele ich czynności w tym syntezę aktywnej biologicznie formy witaminy D – kalcitriolu (1,25-dihydroksycholecalciferolu). Konsekwencją tego jest zmniejszenie wchłaniania wapnia w przewodzie pokarmowym i hipokalcemia. Obniżenie stężenia wapnia w osoczu krwi stymuluje przytarczycę do zwiększonej produkcji parathormonu (PTH). Hormon ten uwalnia wapń z kości w celu przywrócenia fizjologicznego stężenia wapnia, co prowadzi do złożonych zaburzeń w obrębie kości – osteodystrofii nerkowej. Nadczynność przytarczyc w przewlekłej chorobie nerek ma zatem charakter wtórny. Jej nasilenie określa się przez pomiar stężenia parathormonu w osoczu krwi. Parathormon wydzielany do krążenia jest biologicznie aktywnym polipeptydem zawierającym 84 aminokwasy. Biologiczne działanie PTH na układ kostny i nerki odbywa się poprzez interakcję jego pierwszych 34 aminokwasów, tj. jego N-końcowej struktury, z receptorem PTH/PTHrP aktywującym kinazy A i C w komórkach docelowych. Prócz tej postaci hormonu w krążeniu obecne są fragmenty PTH zawierające jego części C-końcowe lub N-końcowe powstające wewnątrz przytarczyc lub wskutek katabolizmu obwodowego. Fragment C-końcowy, zawierający ostatnie 50 aminokwasów, nie wykazuje bezpośredniego oddziaływania z wyżej wymienionym receptorem.¹ Inny fragment C-końcowy PTH (7-84), określany skrótem CIP (*cyclase inactive PTH*) także nie powoduje metabolicznych skutków typowego działania PTH.

METODY POMIARU PARATHORMONU W SUROWICY

Powszechnie dostępne metody immunochemiczne (testy drugiej generacji) służą do oznaczania PTH zawierającego 84 aminokwasy zwanego natywnym PTH, w języku angielskim *intact PTH* (iPTH). Metody te wykorzystują przeciwciała wychwytyjące przeciw epitopom w obrębie PTH (39-84) oraz znakowane w rejonie 13-34. Wadą testów drugiej generacji jest pomiar fragmentu PTH (7-84) dodatkowo, oprócz stężenia całej cząsteczki.² U osób z prawidłową czynnością nerek fragmenty PTH nie wykazujące typowej aktywności (non-(1-84)PTH fragments) stanowią około 20% immunoreaktywności określonej testami drugiej generacji. Odsetek ten zwiększa się do około 45% u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek (wskutek upośledzenia usuwania C-końcowych fragmentów przez nerki). U tych pacjentów oznaczanie PTH testami drugiej generacji skutkuje przeszacowaniem biologicznie aktywnego hormonu i tym samym nasileniem wtórnej nadczynności przytarczyc. Może mieć to istotne implikacje terapeutyczne, zarówno w odniesieniu do leczenia farmakologicznego jak i zabiegowego.

W celu zniwelowania tego wpływu w ostatnich latach opracowano metody oznaczania PTH, w których mierzone jest stężenie wyłącznie całej cząsteczki PTH tj. PTH(1-84). Przeciwciała wychwytyjące pozostało takie samo jak w testach drugiej generacji, natomiast przeciwciała znakowane skierowane jest przeciw epitopowi PTH zawierającemu pierwsze 4 aminokwasy struktury N-końcowej (PTH(1-6)). Metody te eliminują wpływ fragmentów na wynik oznaczania PTH i zatem uważa się je za zupełnie swoiste dla biologicznie aktywnej całej cząsteczki tego hormonu.³ W celu odróżnienia tych testów od poprzedniej (drugiej) generacji nazywa się niekiedy w piśmiennictwie mierzony analit całym PTH (*whole PTH*)⁴ lub *biointact PTH (1-84)*⁵. Wydaje się jednak słuszne zastosowanie do tych testów nazwy PTH(1-84) 3 generacji (aby nie powodować konfuzji związanej z mnogim nazewnictwem).



cobas e 601
· system immunochemiczny przeznaczony dla średnich i dużych laboratoriów



cobas® 6000
· zintegrowany system biochemiczno-immunochemiczny



cobas e 411
· system immunochemiczny przeznaczony dla małych i średnich laboratoriów

Wprowadzenie testów PTH (1-84) 3 gen. stanowi niewątpliwie postęp w analizie tego hormonu – w końcu mierzymy określony polipeptyd o znanej biologicznej aktywności, bez dodatkowego spektrum mniej zdefiniowanych jego fragmentów pozbawionych tej aktywności lub o innym, słabiej poznanym działaniu. Innymi słowy, nastąpiło znaczne zwiększenie swoistości a zatem i dokładności tego testu. Ułatwi to w przyszłości standaryzację testów do oznaczania PTH w oparciu o międzynarodowy wzorzec PTH aprobowany przez WHO.⁶ Obecnie brak standaryzacji testów drugiej generacji do oznaczania PTH znacznie utrudnia lub wręcz uniemożliwia porównywanie wyników uzyskanych różnymi metodami w różnych laboratoriach (mimo stosowania różnych czynników przeliczeniowych). Mierzone różnymi testami stężenia PTH mogą się znacznie różnić (mimo zbliżonych wartości referencyjnych deklarowanych przez producentów).⁷ Wynika to w znacznym stopniu z różnic nasilenia reakcji przeciwciał z fragmentami PTH (głównie z PTH(7-84)) w testach różnych producentów. Różnice te zdają się być wyraźnie większe gdy badane próbki pochodzą od pacjentów z przewlekłą chorobą nerek (zwiększona zawartość fragmentów C-końcowych).

ZASTOSOWANIE TESTÓW TRZECIEJ GENERACJI

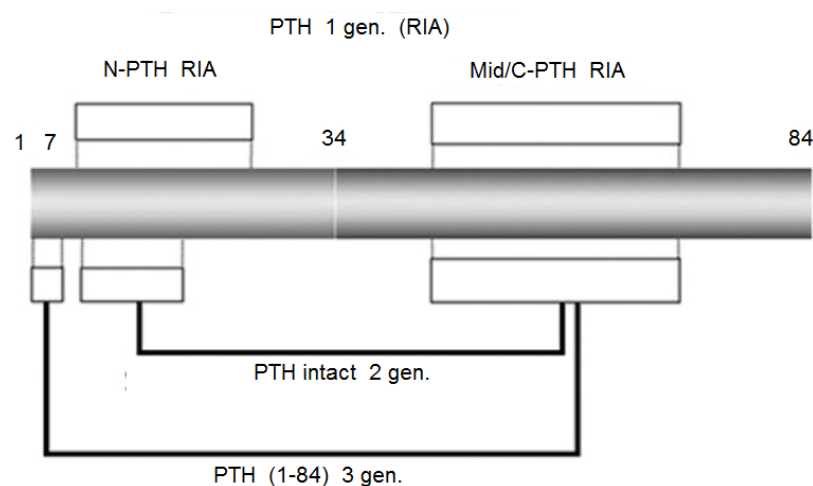
Według polskich rekomendacji z 2007 r. oznaczenia PTH powinny być wykonywane u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek w stopniu zaawansowania od 3 do 5-tego, z częstością największą w stopniu 5 (w stopniu 3 raz w roku a w stopniach późniejszych nie rzadziej niż co 3-6 miesięcy).⁸ Wartości stężeń PTH optymalne z punktu widzenia gospodarki wapniowo-fosforanowej u tych chorych zależą od stopnia niewydolności i tak np. dla stopnia 5 mieszczą się w przedziale 150 – 300 pg/ml. Wartości te wyznaczono stosując metody 2 generacji, w oparciu głównie o test Allegro firmy Nichols, który nie jest już produkowany. Ze względu jednak na brak standaryzacji tych testów ostatnio zrezygnowano z podawania wartości optymalnych stężeń i zaleca się, aby poziomy PTH u pacjentów z 5 stopniem niewydolności nerek leczonych dializami mieściły się pomiędzy 2-9-krotnością górnego zakresu wartości referencyjnych stosowanego w laboratorium testu.⁹ Wartości optymalnych stężeń PTH u pacjentów niedializowanych nie są dobrze zdefiniowane i nie są podawane w ostatnich rekomendacjach KDIGO (*Kidney Disease Improving Global Outcomes*). Stwierdzają one jedynie, że u pacjentów z GFR < 45 ml/min/1,73 m² PTH powinien być oznaczony przynajmniej jednokrotnie i w przypadku uzyskania stężenia powyżej wartości referencyjnej użytego testu należy w pierwszej kolejności ocenić możliwą hiperfosfatemię, hipokalcemię i niedobór witaminy D.¹⁰

Jak widać modyfikacje zaleceń biorą pod uwagę niedoskonałości testów PTH drugiej generacji. Mimo to, ze względu na rozpowszechnienie tych testów oraz wykazaną korelację ich stężeń ze zmianami dokumentowanymi oceną histopatologiczną próbek (biopsji) kości, mają one jeszcze do spełnienia swą diagnostyczną rolę. Testy trzeciej generacji do oznaczania PTH porównywane są z testami drugiej generacji pod względem ich zdolności do przewidywania złożonych zmian kostnych o charakterze osteodystrofii wykazanych w badaniu histomorfometrycznym. Badanie biopsyjne kości nie jest jednak rutynowe w przewlekłej chorobie nerek i m.in. dlatego materiał naukowy uzyskiwany jest powoli. Z badań Lehmana i wsp. którzy wykonali ilościowe badania histomorfometryczne oraz oznaczenia PTH testami 2 i 3 generacji u 130 pacjentów z przewlekłą chorobą nerek (stadia 3-5) wynika ekwiwalentność tych testów w identyfikowaniu pacjentów z obniżonym

obrotem kostnym oraz w odróżnianiu ich od grupy pacjentów z dużym obrotem kostnym.¹¹ W innym badaniu porównawczym testów do oznaczania PTH 2 i 3 generacji z udziałem pacjentów ze zróżnicowanym stopniem przewlekłej choroby nerek wykazano, że tylko wyniki PTH 3 gen. (*biointact PTH*) były skorelowane ze stężeniem wapnia, fosforanów i aktywnością kostnej frakcji fosfatazy zasadowej w surowicy krwi oraz z gęstością mineralną kości (BMD).⁵ Badanie to zdaje się wskazywać na lepsze odzwierciedlanie metabolizmu kostnego i BMD przez test 3 generacji (*biointact PTH (1-84)*) niż test 2 generacji (*intact PTH*). Stwierdzenie to jest zastanawiające szczególnie, gdy weźmie się pod uwagę fakt dość dużej korelacji pomiarów PTH uzyskiwanych obu rodzajami testu. Możliwe jest, iż pewną rolę odgrywa tu przypisywana fragmentowi PTH (7-84) aktywność fizjologiczna (przeciwstawna działaniu całej cząsteczki PTH). W badaniu CHOICE stężenie PTH oznaczane testami 3 generacji, w przeciwieństwie do testów 2 generacji, wykazało statystycznie istotny związek ze wzrostem ryzyka zgonu u pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek leczonych hemodializą.¹² Wykazano także przydatność testów PTH trzeciej generacji do monitorowania leczenia cinacalcetem pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek i wtórną nadczynnością przytarczyc.¹³

Wyniki powyższych i podobnych badań zachęcają do rozważnego przechodzenia z testów PTH drugiej generacji do dokładniejszych testów trzeciej generacji. U pacjentów z przewlekłą chorobą nerek testy trzeciej generacji pochodzące od różnych producentów (choć jest ich niewiele) dają wyniki PTH zbliżone,¹⁴ w przeciwieństwie do różnych testów drugiej generacji (znaczne różnice systematyczne, słaba porównywalność).¹⁵

Najprostszym sposobem zastosowania testu PTH trzeciej generacji i interpretacji wyników zgodnej z zaleceniami KDIGO¹⁰ jest wykorzystanie wartości referencyjnych podanych przez producenta: wówczas zakres wartości docelowych (optymalnych) dla pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek ustala się przez pomnożenie górnej granicy tych wartości przez odpowiednio 2 oraz 9. Sposób ten można udoskonalić ustalając takie zakresy we własnym laboratorium dla zdrowych osób bez niedoboru witaminy D.¹⁶ Wówczas ocena nasilenia nadczynności przytarczyc i klasyfikacja pacjentów do odpowiedniego leczenia będzie jeszcze dokładniejsza.



Podsumowanie

Dostępność testów trzeciej generacji do oznaczania PTH (tym razem faktycznie całej, nienaruszonej cząsteczki) umożliwi precyzyjniejsze ustalenie punktów odcięcia pomocnych w diagnostyce i leczeniu zaburzeń w układzie kostnym i prognozowaniu zdarzeń sercowo-naczyniowych związanych z nadczynnością przytarczyc u chorych z przewlekłą chorobą nerek.

*Piśmiennictwo
dostępne
w redakcji*

Generacje testów PTH

Punkty uchwytu dla przeciwciał stosowanych w reakcji oznaczania.

Konieczność ujednolicenia wartości docelowych wyników badań lipidowych

Janina Stępińska, Bogdan Solnica, Jan Kulpa, Piotr Jankowski, Zbigniew Kalarus,
Grzegorz Opolski, Dariusz Sitkiewicz

Stanowisko Polskiego
Towarzystwa Kardiologicznego,
Polskiego Towarzystwa
Diagnostyki Laboratoryjnej,
Konsultanta Krajowego
w dziedzinie Kardiologii
i Konsultanta Krajowego
w dziedzinie Diagnostyki
Laboratoryjnej

Dyslipidemie należą do najważniejszych modyfikowalnych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego.^{1,2} Ich rozpowszechnienie w populacji jest znaczne. Szacuje się, że częstość pierwotnej poligenowej hipercholesterolemii może sięgać 10% populacji, a dyslipidemii aterogennej – 20 do 30%. W badaniu NATPOL 2011 stwierdzono, że hipercholesterolemia, definiowana jako stężenie cholesterolu całkowitego w osoczu $\geq 5,0$ mmol/L (≥ 190 mg/dl) występuje w Polsce u 61% (ok. 18 mln) osób w wieku 18–79 lat [Zdrojewski T, Bandosz P. NATPOL 2011; *unpublished data*]. Wyniki badań epidemiologicznych oceniających między innymi występowanie czynników ryzyka sercowo-naczyniowego w populacji generalnej oraz u osób z chorobą niedokrwienną serca wskazują, że niedostateczne wykrywanie i nieskuteczne leczenie hipercholesterolemii jest jednym z największych zagrożeń dla zdrowia Polaków.^{3–7} W badaniu NATPOL 2011 stwierdzono, że 65% przypadków hipercholesterolemii w Polsce pozostaje nierozpoznanych, u 22% osób jest ona rozpoznana, ale nieleczona, w 6% przypadków jest ona leczona nieskutecznie, a jedynie u 8% Polaków z hipercholesterolemią choroba ta jest skutecznie leczona.

Jedną z przyczyn tej złej sytuacji epidemiologicznej jest błędna interpretacja wyników badań lipidowych na skutek zamieszczania na formularzach wyników badań laboratoryjnych niewłaściwych wartości odniesienia – docelowych stężeń cholesterolu całkowitego oraz we frakcjach LDL i HDL. Dyslipidemię definiuje się jako stan, w którym stężenia lipidów i lipoprotein w osoczu przekraczają wartości uznane za pożądane (docelowe).² Wartości docelowe są ustalane na podstawie wyników badań epidemiologicznych i klinicznych oceniających związek stężeń lipidów i lipoprotein z ryzykiem sercowo-naczyniowym. Są one publikowane m. in. w zaleceniach praktyki klinicznej i, z postępem wiedzy, ulegają zmianom. Ekspertki towarzystw naukowych (*European Society of Cardiology, European Society of General Practice/Family Medicine, European Association for the Study of Diabetes, European Atherosclerosis Society* i in.) są zgodni, że docelowym stężeniem cholesterolu frakcji LDL u osób o bardzo dużym ryzyku sercowo-naczyniowym jest wartość $< 1,8$ mmol/L (< 70 mg/dl), u osób o dużym ryzyku – $< 2,5$ mmol/L (< 100 mg/dl), a u osób o mniejszym ryzyku – $< 3,0$ mmol/L (< 115 mg/dl).¹ Tymczasem w wielu laboratoriach w Polsce jako wartość docelową lub górną granicę „normy” stężenia cholesterolu frakcji LDL na formularzach wyników badań zamieszcza się wartości od 2,5 mmol/L (100 mg/dl) do 4,0 mmol/L (150 mg/dl). Taka błędna informacja na wyniku badania może powodować samowolne odstawianie przez pacjentów leków hipolipemizujących lub zmniejszanie ich dawek oraz zmniejszać zaufanie pacjenta do wiedzy i profesjonalizmu lekarza. W niektórych przypadkach może też wprowadzać w błąd lekarzy sugerując znaczącą różnicę między „normalnym”, a docelowym stężeniem cholesterolu.

W celu poprawy skuteczności rozpoznawania i leczenia dyslipidemii konieczne jest ujednolicenie wartości docelowych wyników badań lipidowych w polskich laboratoriach – zamieszczanie na formularzach wyników wyłącznie podanych poniżej wartości rekomendowanych przez europejskie towarzystwa naukowe.

Ponieważ przedstawiony powyżej opis potrzebny do poprawnej interpretacji wyników oznaczeń cholesterolu LDL jest zbyt obszerny do zamieszczania go na formularzach wyników badań, proponujemy następującą jednolitą formę i treść części formularza zawierającej wyniki badań lipidowych:

Tabela 1. Uniwersalna

Cholesterol całkowity	<5,0 mmol/L	<190 mg/dl
Cholesterol LDL choroba wieńcowa, miażdżycy innych tętnic, stan po udarze mózgu, cukrzyca z powikłaniami narządowymi, przewlekła choroba nerek ≥4 stadium lub ryzyko ≥10% wg skali SCORE	<1,8 mmol/L	<70 mg/dl
Bardzo znacznie nasilony pojedynczy czynnik ryzyka, cukrzyca bez powikłań narządowych, 3 stadium przewlekłej choroby nerek lub ryzyko 5-10% wg skali SCORE	<2,5 mmol/L	<100 mg/dl
Mniejsze ryzyko sercowo-naczyniowe (ryzyko <5% wg skali SCORE)	<3,0 mmol/L	<115 mg/dl
Cholesterol HDL	M: ≥1,0 mmol/L K: ≥1,2 mmol/L	M: ≥40 mg/dl K: ≥45 mg/dl
Triglicerydy	≤1,7 mmol/L	≤150 mg/dl

Ujednolicenie wartości docelowych wpisywanych na formularzach wyników badań lipidów w polskich laboratoriach zmniejszy niepokój pacjentów, zwiększy ich zaufanie do lekarzy i przestrzeganie zaleceń, a także zaoszczędzi czas lekarzy poświęcany obecnie na wyjaśnienia – w efekcie przyczyni się do poprawy wykrywalności i skuteczności leczenia hipercholesterolemii w Polsce.

Tabela 2. Uszkodzenia

Oznaczenie	Wartości referencyjne/docelowe
Cholesterol całkowity	3,0 - 5,0 mmol/L (115 - 190 mg/dl)
Cholesterol LDL	< 1,8 mmol/L (<70 mg/dl) – u osób z bardzo dużym ryzykiem, po zawale serca i udarze mózgu, ≥10% wg skali SCORE < 2,5 mmol/L (<100 mg/dl) u osób z dużym ryzykiem, w tym z ryzykiem 5-10% wg skali SCORE < 3,0 mmol/L (<115 mg/dl) – u osób z umiarkowanym lub małym ryzykiem (ryzyko <5% wg skali SCORE)
Cholesterol HDL	M: ≥1,0 mmol/L (≥40 mg/dl) K: ≥1,2 mmol/L (≥45 mg/dl)
Triglicerydy	≤1,7 mmol/L (≤150 mg/dl)

Piśmiennictwo:

1. Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012): the Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. Eur J Prev Cardiol 2012; 19: 585-667.
2. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). Atherosclerosis 2011; 217: 3-46.
3. Pietrasik A, Starczewska M, Głównczyńska R, et al. Secondary prevention of myocardial infarction in primary care – selected results of POLCARD-SPOK Study. Kardiol Pol 2006; 64: 210-217.
4. Banasiak W, Wilkins A, Pociupany P, Ponikowski P. Pharmacotherapy in patients with stable coronary artery disease on an outpatient basis in Poland. RECENT study. Kardiol Pol 2008; 66: 642-649.
5. Pająk A, Jankowski P, Kawecka-Jaszcz K, et al. Changes in secondary prevention of coronary artery disease 1997-2007. Results of the Cracovian Program for Secondary Prevention of Ischaemic Heart Disease and Polish parts of EUROASPIRE II and III surveys. Kardiol Pol 2009; 67: 1353-1359.
6. Śliż D, Mamcarz A, Filipiak K, et al. 3ST-POL trial: Standards of statin use in Poland in the context of the European Society of Cardiology guidelines. Pol Arch Med Wewn 2010; 120: 328-333.
7. Bala M, Leśniak W, Placzkiewicz-Jankowska E, et al. Cardiovascular risk factors control in Polish patients with type 2 diabetes within the first two years of diagnosis: results of the ARETAEUS 1 study. Kardiol Pol 2011; 69: 1249-1257.

**Analizator cobas c 311**

· system biochemiczny
przeznaczony
dla laboratoriów
średnich i dużych

**cobas® 6000**

· zintegrowany system
biochemiczno-
immunochemiczny

Przedruk za:
Diagnostyka Laboratoryjna
Journal of Laboratory
Diagnostics 2012 • Volume 48 •
Number 4 • 473-474

Znaczenie kontroli negatywnych w laboratorium histopatologicznym

Eric Walk & Peter Banks, College of American Pathologists

Często decyzje o postępowaniu z chorym w znacznym stopniu zależą od wyników badań immunohistochemicznych (IHC). Nowoczesne oznaczenia IHC wykonane na odpowiednio przygotowanych wycinkach tkanek, przy pomocy sprawdzonych przeciwciał i systemów detekcji, pozwalają szybko wykryć i ocenić ekspresję biomarkerów związanych z występowaniem choroby i odpowiedzią na leczenie. W ostatnich 20 latach badania te stały się szczególnie istotne dla rozpoznawania i prognozowania przebiegu nowotworów.¹ Jakkolwiek zasady oznaczeń IHC są oczywiste, to jednak sam proces opiera się na złożonych reakcjach fizycznych z udziałem wielu współdziałających składników.^{1,2} Przydatność oznaczeń IHC niezwykle zależy od „absolutnej” swoistości współdziałania tych elementów i od precyzyjnej detekcji/wizualizacji produktów reakcji. Efekty tych badań są czasem niwelowane przez wybarwienie tła (barwienie niebędące rezultatem reakcji biomarkera i pierwotnego przeciwciała) albo/i przez barwienie się innych niż poszukiwane składniki tkanki.^{1,2} W najlepszym razie, nieoptymalne wyniki oznaczeń IHC spowalniają pracę interpretującego je patologa, w najgorszym razie – powodują uzyskanie błędnie pozytywnego lub błędnie negatywnego wyniku, co prowadzi do poważnych błędów w prowadzeniu pacjentów.

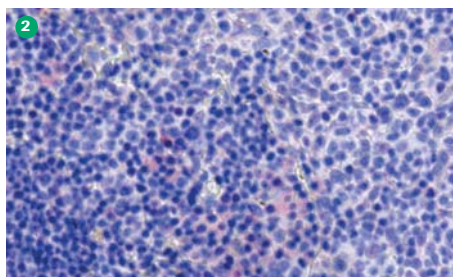
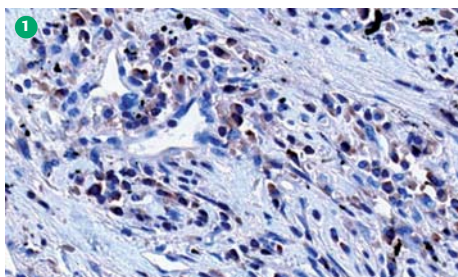
TYPY KONTROLI NEGATYWNYCH STOSOWANYCH W OZNACZENIACH IHC

Do monitorowania niespecyficzných rezultatów barwień IHC używa się dwóch typów kontroli negatywnych: negatywne kontrole odczynników i negatywne kontrole materiału (tkanki) – Tabela 1. Negatywne kontrole odczynników (*negative reagent control-NRC*) dla oznaczeń IHC dla danego przypadku (pacjenta) typowo przeprowadza się stosując równoległe skrawki pochodzące z tego samego bloczka tkankowego (idealnie – sąsiadujące ze sobą skrawki). Procedury stosowane dla par skrawków są identyczne poza jedną: niektóre istotne elementy procedury zastąpione są przez nieaktywne substancje. W większości przypadków pierwotne (specyficzne dla danego biomarkera) przeciwciała zastępowane jest przez nieswoiste przeciwciała, przeciwciała w znacznym rozcieńczeniu (mniej polecane) albo bufor (rozwiązanie najmniej optymalne).^{3,4} Skrawek tkanki pacjenta przeprowadzany w procedurze NRC powinien dać ujemny wynik barwienia (brak barwienia).

Negatywny rezultat stanowi kliniczny dowód, że zabarwienia obserwowane w równoległym skrawku na którym przeprowadzamy oznaczenie IHC jest prawdziwe (to znaczy powstałe w wyniku reakcji z pierwotnym przeciwciałem a nie w wyniku działania innego składnika czy procesu). Jeżeli w rezultacie procedury NRC obserwujemy specyficzne barwienie preparatu uważa się je za fałszywie dodatnie. Oznacza to, że inny niż pierwotne przeciwciała element stosowany w procedurze badania IHC, jak odczynniki używane w systemie detekcji, spowodował zabarwienie tkanki. W takim przypadku wynik badania konkretnego materiału nie może być uznany z pewnością za identyfikujący poszukiwany biomarker ponieważ mógł powstać nie w wyniku interakcji biomarkera z przeciwciałem (Fot.1 i 2).

Uwaga techniczna:

Każde zastąpienie substancji czynnej przez nieczynną w oznaczeniu może być uznane za negatywną kontrolę, jednak największe znaczenie ma zastąpienie swoistego przeciwciała przeciwciałem nieswoistym takiego samego pochodzenia gatunkowego i w podobnym rozcieńczeniu.^{1,3-5} Taki typ kontroli identyfikuje barwienie niezwiązane z reakcją pierwotnego przeciwciała z biomarkerem.



Uwaga techniczna:

Jeżeli używamy poliklonalnego przeciwciała pierwotnego możliwą do użycia negatywną kontrolą odczynników może być frakcja immunoglobulin osocza, mieszanina oczyszczonych izotypów immunoglobulin albo płyn wysiękowy, pochodzące od nieimmunizowanych zwierząt tego samego gatunku. Przeciwciała kontrolne należy rozcieńczyć do takiego samego stężenia jak pierwotne przeciwciała używając do rozcieńczenia identycznego podłoża.

Ponadto, ponieważ procedury przedanalizyczne – z których wiele nie podlega standaryzacji, mogą powodować nieswoiste barwienie tkanki chorego^{1,7} dlatego nie można uważać za taki sam materiał tkankowego pochodzącego od różnych pacjentów. W związku z tym każdemu oznaczeniu IHC musi towarzyszyć procedura NRC na duplikacie tkanki z tego samego bloczka.^{1,3-6,8-13}

Innym typem negatywnej kontroli oznaczeń IHC jest badanie IHC przeprowadzone na tkance (negatywna kontrola tkankowa), o której wiadomo, że nie występuje w niej poszukiwany biomarker.^{1,3-6,8-13} Wspomniany typ kontroli nie zastępuje procedury NRC, stosuje się go do monitorowania swoistości pierwotnego przeciwciała. Co istotne, z samej definicji, tkanka używana jako negatywna kontrola pochodzi z innej niż badany materiał, wobec tego jej właściwości mogą być inne niż tkanki badanej co może wpływać na efekt barwienia. Fałszywie dodatni wynik uzyskany na negatywnej kontroli tkankowej wskazuje na niespecyficzność pierwotnego przeciwciała. Tego typu kontroli używa się raczej w procedurach walidacyjnych niż w codziennych kontrolach jakości.¹⁰ (Wyniki fałszywie ujemne można wykazać w systemie pozytywnych kontroli tkankowej).

ZASTOSOWANIE NEGATYWNYCH ODCZYNNIKÓW KONTROLNYCH W OCENIE JAKOŚCI OZNACZEŃ IHC

Zważywszy, że procedura NRC wykrywa fałszywie dodatnie wyniki barwienia, które mogą wpłynąć na błędną interpretację badania IHC, uważa się ją za niezbędny element kontroli jakości w pracy laboratorium klinicznego.^{1,3-6,8-10} Organizacje patologów, biorące udział w akredytacji laboratoriów jak *Collage of American Pathologists* (CAP) i *Canadian Association of Pathologists* zawsze rekomendowały stosowanie procedur NRC w badaniu materiału od każdego chorego.^{4,8,13}

Podobnie zalecenia dotyczące oznaczeń IHC, jak zawarte *Clinical Laboratory Improvement Amendments Act* z roku 1988^{9,10} czy opracowane w *Clinical and Laboratory Standards Institute*³ uwzględniają stosowanie procedur NRC w każdym badanym przypadku. Podobnie, stosowanie ich w każdym przypadku zalecają też producenci diagnostycznych zestawów IHC.

1 Negatywna kontrola odczynników

dla oznaczeń nacieków okołonaczyniowych ukazująca niespecyficzne barwienie komórek plazmatycznych (kolor brązowy)

2 Negatywna kontrola odczynników

przy barwieniu migdałków ukazująca niejednolite, niespecyficzne barwienie komórek limfatycznych (kolor czerwony)



Aparat BenchMark GX
· system do
automatycznego
barwienia metodą IHC/
ISH



Aparat BenchMark XT
· system do
automatycznego
barwienia metodą
IHC/ISH

Pomimo znacznej wartości procedur NRC w potwierdzaniu swoistości oznaczeń i ocenie niespecyficznego barwienia się tła, ostatnio obserwuje się tendencję do zaniechania tych procedur w niektórych oznaczeniach IHC.⁶ Na szczególną uwagę zasługuje rewizja stanowiska CAP w odniesieniu do wymagań akredytacyjnych dla laboratoriów, łagodząca wymogi dotyczące stosowania procedur NRC w kontroli jakości.¹⁴ W przeszłości zalecenia CAP obejmowały stosowanie kontroli negatywnej przy każdym oznaczeniu IHC, procedury te pozwalały patologom na ocenę barwienia się tła i innych nieswoistych efektów barwienia i ułatwiały identyfikację prawdziwego, efektu barwienia przy użyciu specyficznego przeciwciała.^{8,13} W przeciwieństwie do opisanego stanowiska dokument z 2012 roku stwierdza: „Oznaczenia immunohistochemiczne, w których stosuje się polimerowe systemy detekcji (nie zawierające biotyny) nie wiążą się z występowaniem istotnej reakcji tła i decyzje co do potrzeby stosowania procedur NRC można pozostawić kierownikowi laboratorium”.¹⁴ W świetle nacisków na obniżanie kosztów opieki zdrowotnej, przyspieszanie wykonywania oznaczeń i zwiększanie wydajności, takie stanowisko może prowadzić do łatwego podejmowania decyzji o niemal całkowitym zaniechaniu stosowania procedur NRC. Współcześnie, zmianę stanowisk wobec NRC uzasadnia się głównie udoskonaleniem strony technicznej oznaczeń IHC. W przeszłości, większość nieswoistych wyników badań IHC wynikała z niedoskonałości stosowanych systemów detekcji. W szczególności jedna z najpopularniejszych metod oparta na biotynie-streptawidynie była podatna na zakłócenia wynikające z obecności endogennej biotyny^{2,5} często znajdującej się w badanych tkankach pacjentów. W tych oznaczeniach stosowanie negatywnej kontroli dla oceny nieswoistych efektów barwienia było niezbędne. Wiele nowoczesnych zestawów do oznaczeń IHC nie wykorzystuje reakcji biotyna-awidyna, w zamian stosuje się polimery dające bardziej selektywne efekty barwienia.^{5,13,15,16} Wspomniane nowoczesne zestawy wraz z automatycznymi systemami barwienia obejmującymi cały proces od odparafinowania tkanki do zaklejenia preparatu znacznie zmniejszyły możliwość powstawania błędnie pozytywnych efektów barwienia.

Szerokie stosowanie nowoczesnych urządzeń do oznaczeń IHC a także udoskonalonych systemów detekcji poprawiło jakość oznaczeń w laboratoriach klinicznych, zmniejszając różnice oznaczeń uzyskiwanych w różnych laboratoriach i niwelując nieswoiste barwienia.^{1,5} Jednak szereg czynników może wpływać na poszczególne etapy oznaczenia dając w efekcie nieswoiste barwienie tła. Powyższe czynniki mogą różnić się w poszczególnych laboratoriach.^{2,6,7,12} Niektóre z tych czynników opisuje Tabela 2. Obejmują one procedury i odczynniki używane do przeprowadzania tkanki, jej utrwalenia i przechowywania, poszczególne przeciwciała i substancje używane w barwieniach (także rodzaje przeciwciał i odczynników konkretnych producentów), wybór metody barwienia (ręczna, półautomatyczna, całkowicie zaautomatyzowana) a także szczególne własności biologiczne badanych tkanek.

Zmienność wyników barwienia wywołana działaniem omawianych czynników może niekorzystnie wpłynąć na rozpoznanie. Szczęśliwie, nieswoiste reakcje barwne przez nie wywołane można wykryć stosując procedury kontroli negatywnych. Włącznie negatywnej kontroli odczynników do każdego badania pozwala na wykrycie wyników fałszywie dodatnich spowodowanych niewłaściwym przechowywaniem i przeprowadzaniem tkanki, stosowaną metodą detekcji czy niesprawnością aparatury.

W związku z narastającą presją na redukcję kosztów opieki zdrowotnej i obciążenia pracą laboratoriów bez pogorszenia bezpieczeństwa pacjentów, osoby kierujące laboratoriami

zostały dodatkowo obarczone odpowiedzialnością za decyzje stosowania lub nie procedur NRC. Każda taka osoba musi liczyć się z koniecznością uzasadnienia swoich decyzji. Przy ich podejmowaniu należy uwzględnić szereg istotnych czynników. Przede wszystkim powodem stosowania procedur NCR jest potrzeba uniknięcia uznania fałszywie dodatnich wyników za „prawdziwe”. Błędnie pozytywne barwienie może powstać w wyniku działania różnych czynników związanych z przechowywaniem i przeprowadzaniem tkanki, jak również w wyniku błędów w samej procedurze oznaczenia, włączając w to właściwości badanego materiału, warunki jego przechowywania i różne inne niestandardyzowane i wymykające się kontroli okoliczności powstałe w pracy laboratorium klinicznego.^{1,7}

Ponadto, proporcjonalne znaczenie procedur NRC w oznaczeniach IHC może zależeć od specyficznej charakterystyki technicznej poszczególnych testów i implikacji klinicznych wynikających z tych oznaczeń. W niektórych, często stosowanych testach, niecharakterystyczne barwienie się innych niż poszukiwane struktur, jest łatwo rozpoznawane przez doświadczonego patologa.⁶ Przeciwnie, jeżeli za dodatnie uznaje się tylko niewielkie i nieliczne ogniska widocznego zabarwienia, albo jeżeli zastosowanie konkretnego sposobu leczenia chorego zależy od wyniku oznaczenia IHC, należy oceniać uzyskany wynik z większą uwagą. Do takich sytuacji należą badania poszukiwania patogenów bakteryjnych czy wirusowych¹, albo pojedynczych komórek nowotworowych przy stosowaniu takich markerów jak cytokeratyna, CD30 czy S100. We wspomnianych sytuacjach niespecyficzne barwienie się nielicznych komórek czy „cząstek” prowadzi do błędnej interpretacji i niewłaściwych rozpoznań.² Dodatkowo, niespecyficzne wiązanie immunoglobulin czy odczynników stosowanych w systemach detekcji obserwuje się w komórkach ulegających apoptozie, komórkach tłuszczowych, a także w innych normalnych strukturach jak komórki chromochłonne jelit.²

Na szczególną uwagę zasługuje zastosowanie badań IHC w kwalifikowaniu pacjentów do leczenia szczególnymi typami leków. W tych przypadkach dokładność oznaczenia ma wyjątkową wartość. W sytuacjach takich jak poszukiwanie ekspresji HER 2 w raku żołądka, gdzie liczy się nawet znalezienie tylko niewielkich, pojedynczych ognisk „dodatnich” komórek¹⁷ procedury NRC należy uznać za niezbędne.

Zasady dobrej praktyki laboratoryjnej idą w parze z bezpieczeństwem chorego. Rozważenie odpowiedniego stosowania kontroli jest istotne w dobrej praktyce laboratorium patologicznego tak samo jak w laboratoriach chemii klinicznej czy mikrobiologicznych.¹

Decyzje o modyfikacji lub zaniechaniu stosowania procedur NRC dla oznaczeń IHC wymagają restrykcyjnego sprawdzania ich uzasadnienia aby być pewnym braku zagrożeń dla pacjenta.⁶

Przy braku pewnych danych o możliwości niestosowania procedur NRC Roche Tissue Diagnostics nadal rekomenduje posługiwanie się nimi w badaniach IHC.

WNIOSKI

Oznaczenia IHC są obecnie integralną częścią histopatologicznej diagnostyki w onkologii.^{1,10} Dlatego błędna interpretacja ich wyników potencjalnie może wpłynąć niekorzystnie na rezultaty leczenia chorych z nowotworami. Technologiczne doskonalenie oznaczeń IHC, jak automatyzacja barwienia, stosowanie systemów bez streptawidyny/biotyny znacznie poprawiło przydatność i wiarygodność wyników, jednak nadal trzeba pamiętać o wielu zmiennych mogących wpłynąć niekorzystnie na efekty barwienia. Jakkolwiek wyraźnie



Aparat BenchMark ULTRA

· system kolejnej generacji do automatycznego barwienia metodą IHC/ISH



Aparat BenchMark GX

· system do automatycznego barwienia metodą IHC/ISH



Aparat BenchMark XT

· system do automatycznego barwienia metodą IHC/ISH

„Jest godnym uwagi choć mało uświadomionym fakt, że dawno już wprowadzone standardy kontroli jakości pracy laboratoriów szpitalnych tradycyjnie nie miały zastosowania w praktycznej diagnostyce patomorfologicznej. Kiedy miarą poprawności w tej dziedzinie była jakość obrazu preparatu, podobne wymagania nie były konieczne. Jednak rosnąca liczba „testów” o zasadniczym znaczeniu prognostycznym i predykcyjnym wprowadzana w anatomii patologicznej wymusza postęp... Jeżeli w badaniach takich jak IHC wprowadzimy kryteria stosowane na przykład w oznaczeniach ELISA możemy osiągnąć podobną dokładność i powtarzalność. Dla wyników badań o znaczeniu prognostycznym potrzebne jest wprowadzenie i stosowanie rygorystycznej kontroli jakości”

C.R. Taylor w *Diagnostic Immunohistochemistry*, wydanie 3 (2011)¹

rysuje się perspektywa możliwości rezygnacji z procedur NRC i tym samym zmniejszenia kosztów oznaczeń i obciążenia pracą laboratoriów, należy jednak mieć na uwadze potencjalny niekorzystny wpływ takiego postępowania na jakość wyników. Decyzje o zaniechaniu stosowania procedur NRC w konkretnych sytuacjach za każdym razem należy krytycznie rozważać, szczególnie jeżeli modyfikujemy parametry oznaczeń IHC takie jak sama procedura, rodzaj przeciwciała, źródło odczynnika, typ badanej tkanki czy laboratorium. Kierownicy laboratoriów zobowiązani są do szczegółowej wiedzy na temat różnych aspektów przygotowania tkanek i samego procesu barwienia i muszą mieć świadomość klinicznego znaczenia konkretnego badania. Muszą być pewni, że uzyskują powtarzalne rezultaty w warunkach zmienności czynników związanych z przechowywaniem, utrwalaniem i przeprowadzaniem tkanek i w samej procedurze. Wiarygodność badań IHC musi być poddana wewnętrznej walidacji, udokumentowanej odpowiednią liczbą prób. Biorąc pod uwagę złożony charakter badań IHC i brak jego standaryzacji nie wydaje się, żeby same laboratoria kliniczne były w stanie spełnić wszystkie wymogi kontroli jakości dla większości badań IHC o znaczeniu diagnostycznym i prognostycznym. Jak długo bezpieczeństwo pacjenta zależy od wysokiej jakości pracy laboratorium, procedury NRC pozostaną istotnym elementem kontroli jakości laboratorium klinicznego.

Uwaga techniczna:

Negatywne kontrole odczynnikowe służą nie tylko wykryciu fałszywie dodatnich wyników ale także określają barwienia się tła. Dla dokładnego określenia intensywności barwienia w reakcji IHC, patolog musi mieć możliwość oceny preparatu z negatywnej kontroli odczynnikowej. Niedoszacowanie intensywności barwienia się tła może prowadzić do „nadmiernych” rozpoznań i terapii chorego, przeszacowanie zaś powoduje efekty odwrotne. Ponadto nieznaną intensywności barwienia się tła oznacza mniejszą przydatność uzyskanych danych do badań porównawczych czy retrospektywnych w warunkach stosowania przez różne laboratoria różnych metod, odczynników czy sprzętu.

Tabela 1. Rodzaje i zastosowania negatywnych kontroli w badaniach IHC

	Tkanka	Odczynniki	Rola	Możliwe znaleziska/postępowanie
Preparat testowy	Fragment tkankowy pacjenta	Wszystkie odczynniki używane do oznaczeń IHC	Wizualizacja poszukiwanego biomarkera	
Negatywna kontrola odczynnika	Fragment tkankowy od pacjenta, „zdublowany”	Pierwotne przeciwciało zastąpione przeciwciałem niespecyficznym	Ocena stopnia zabarwienia tła związanego z badaniem IHC niezależnego od poszukiwanego biomarkera.	Intensywne zabarwienie tła może utrudniać wizualizację „prawdziwego” dodatniego barwienia. Oceń krytycznie używane w badaniu odczynniki i warunki badania tak aby zmniejszyć intensywność zabarwienia tła.

			Wykrycie elementów tkanki barwiących się niezależnie od reakcji pierwotnego przeciwciała z poszukiwanym biomarkerem.	Falszywie dodatnie barwienie prowadzi do nieprawidłowej identyfikacji biomarkera albo utrudnia ocenę dodatnio barwiących się istotnych elementów preparatu. Rozwiąż problem z odczynnikami i warunkami badania tak aby uniknąć niespecyficznego barwienia z elementami innymi niż poszukiwane, weź pod uwagę możliwość fałszywie dodatniego barwienia przy ocenie preparatu.
Negatywna kontrola odczynnikowa	Fragment tkankowy od pacjenta, „zduplikowany”	Aktywny odczynnik stosowany w oznaczeniu IHC zastąpiony odczynnikiem nieaktywnym innym niż pierwotne przeciwciało	Usuwa problemy związane z barwieniem się tła lub elementami innymi niż poszukiwane	
Negatywna kontrola tkankowa	Fragment tkanki o którym wiadomo, że nie zawiera poszukiwanego biomarkera	Odczynnik stosowane w oznaczeniu IHC	Identyfikacja innych niż poszukiwane elementy barwiących się dodatnio w reakcji z pierwotnym przeciwciałem	Barwienie może rzeczywiście być związane z reakcją poszukiwanego markera z pierwotnym przeciwciałem ale także wynikiem nieistotnych reakcji z pewnymi składnikami tkanki (komórki czy ich składniki), które mogą zawierać dany biomarker lecz bez znaczenia dla ostatecznego rozpoznania. Te fałszywie dodatnie elementy mogą być błędnie rozpoznane jako poszukiwane biomarkery, mogą też zakrywać prawdziwe składniki. Dodatnie barwienie może zachodzić niezależnie od reakcji pierwotnego przeciwciała z poszukiwanym elementem, wskazuje to na brak specyficzności pierwotnego przeciwciała.

Tabela 2. Niektóre czynniki sprzyjające barwieniu się tła i dodatnie barwienia się elementów innych niż poszukiwane w badaniach IHC opartych na polimerach. (1,2,5,6,10,12).

Przyczyna	Czynnik	Możliwy wpływ na barwienie/interpretację
Biologiczna	Właściwości tkanki	Barwniki tkankowe: Barwniki tkankowe jak hemosyderyna czy melanina mogą maskować „prawdziwe” zabarwienie i wpłynąć na ocenę preparatu, szczególnie jeżeli ich zabarwienie podobne jest do użytego chromogenu. Unaczynienie tkanki: Dyfuzja pseudoperoxydazowej aktywności krwi z silnie unaczynionych tkanek zwiększa barwienie się tła w systemach detekcji opartych na peroksydazie. Typ tkanki: Endogenna aktywność fosfatazy zasadowej występuje w wielu tkankach jak jelito, nerki, tkanka limfoidalna, śródbłónki. W tych przypadkach może występować silniejsze barwienie się tła w systemach detekcji opartych na fosfatazie zasadowej.
Przedanalizyczna	Pobieranie tkanki Krojenie wycinków	Opóźnione utrwalenie: Niedotlenienie tkanki sprzyja uwalnianiu się elementów komórek, które wiążą odczynniki używane w detekcji. Wysuszenie powierzchni sprzyja niespecyficznemu barwieniu powstającemu w wyniku oddziaływań elektrostatycznych. Dyfuzja antygenów z poszukiwanych struktur w sąsiednie tkanki zwiększa nasilenie niespecyficznego barwienia. Uszkodzenie mechaniczne; Uszkodzenie mechaniczne tkanek, takie jak ich miażdżenie może sprzyjać powstaniu rozlanej reakcji. Zanieczyszczenia mikrobiologiczne: Bakterie i wirusy znajdujące się w łaźniach wodnych mogą spowodować fałszywie dodatnie reakcje. Substancje białkowe: Substancje białkowe obecne w łaźniach wodnych mogą powodować rozlane barwienie się tła, szczególnie w procedurach o dużej czułości.

Przyczyna	Czynnik	Możliwy wpływ na barwienie/interpretację
	Utrwalanie tanki	Typ utrwalacza: Różne typy utrwalaczy znacznie różnią się wpływem na konfigurację i zdolność do przylegania białek. Czas utrwalania: Przedłużone utrwalanie w utrwalaczach aldehydowych zwiększa interakcje hydrofobowe nasilając możliwość wystąpienia niespecyficznych i błędnie dodatnich reakcji. Utrwalanie może modyfikować konfigurację lub elektryczny ładunek antygenu zmieniając jego reakcje z odczynnikami stosowanymi w detekcji.
	Odwapnianie tkanki	Intensywne odwapnianie tkanki może prowadzić do uszkodzenia tkanki i nieswoistego barwienia się różnych jej elementów. Stosowanie silnych kwasów może skutkować powstaniem silnych, błędnie pozytywnych artefaktów w barwieniu się jąder komórkowych.¹¹
	Przeprowadzanie tkanki	Stosowanie nadmiernie wysokiej temperatury przeprowadzania tkanki lub inne niewłaściwe przeprowadzanie tkanki sprzyja niewłaściwemu wiązaniu się odczynników stosowanych w detekcji.
„Analityczny”	Odparafinowanie	Niecałkowite odparafinowanie może zwiększać nieswoiste barwienie się tła.¹⁷
	Odkrywanie antygenu	Działanie proteolityczne może rozlegle strawić tkankę co prowadzi do powstania nowych powierzchni wiążących pierwotne przeciwciała lub odczynniki stosowane w detekcji. Podgrzewanie: Podgrzewanie może uszkodzić tkankę co sprzyja powstawaniu nieswoistego barwienia się różnych elementów tkanki. Wysokie stężenia EDTA lub wysokie pH może wywołać fałszywe wybarwienie jąder komórkowych w niektórych tkankach.
	Pierwotne przeciwciała	Krzyżowa reaktywność przeciwciała: Epitop poszukiwanego biomarkera może być podobny do epitopu innych niż poszukiwany antygenów powodując zabarwienie tła. Receptory Fc mogą łączyć się z immunoglobulinami, komórkami zawierającymi przeciwciała jak komórki plazmatyczne oraz z grupami zasadowymi włókien kolagenowych w skrawkach parafinowych nieutrwalonych lub niedostatecznie utrwalonych tkanek. Niezwiązane z poszukiwanym biomarkerem reakcje między białkami: Łączenie się pierwotnego przeciwciała z białkami inne niż poszukiwany biomarker o podobnych właściwościach strukturalnych czy elektrostatycznych. Przeciwciała poliklonalne: Przeciwciała poliklonalne są bardziej czułe niż przeciwciała monoklonalne ale ich stosowaniu częściej towarzyszy powstawanie nieswoistego barwienia. Duża liczba i różnorodność klonów zawartych w stosowanym przeciwciele sprzyja potencjalnemu wiązaniu się z większą liczbą miejsc antygenowych. Pierwotne przeciwciała przygotowane w oparciu o surowicę lub wysięk otrzewnowy, które nie są dostatecznie oczyszczone mogą zawierać inne przeciwciała co prowadzi do nieswoistego barwienia.
	Wiązanie się enzymu z polimerem	Elementy tkanki mogą nieswoiście wiązać się ze składnikami używanymi w detekcji w zależności od ładunku jonowego polimeru.¹⁶ Niedostateczne płukanie po zastosowaniu koniugatów polimerowych sprzyja przyleganiu ich do tkanek.
	Użyty chromogen/substrat	Enzymy endogenne: Endogenne izoenzymy mogą katalizować reakcje chromogen-substrat. Endogenna aktywność fosfatazy zasadowej pozostaje w niedostatecznie podgrzanej tkance, endogenna aktywność peroksydazy może pozostać w niedostatecznie blokowanej tkance. Pseudo-peroksydazy: Hemoproteidy (jak hemoglobina, mioglobina, cytochromy, katalazy mogą działać jak peroksydazy. Rozpuszczenie chromogenu: Ziarna nierozpuszczonego chromogenu mogą powodować powstanie barwnych artefaktów.
	Wadliwy sprzęt	Wysuszenie badanych preparatów na skutek odparowania pomiędzy poszczególnymi etapami nakładania odczynników czy niedostateczne płukanie zastosowane pomiędzy tymi etapami sprzyja niespecyficznemu wiązaniu się komponentów stosowanych w detekcji.

*Piśmiennictwo dostępne
w redakcji*

Zakażenie układu moczowego (ZUM)

ZROZUMIEĆ ZNACZENIE ZUM

Ostre zakażenie układu moczowego jest jedną z najczęstszych przyczyn, dla których ludzie szukają pomocy lekarskiej. Według statystyk ZUM występuje co najmniej raz w życiu u około 20% kobiet.¹ Optymalizacja procesu diagnostycznego może zmniejszyć zachorowalność i poprawić wyniki oraz satysfakcję pacjenta.

PROSTE I BEZPIECZNE POSTĘPOWANIE

Należy doceniać praktyczną wartość analizy moczu. Łatwe w użyciu i czułe paski testowe są standardem diagnostycznym i mogą wykryć około 90% ZUM.⁵ Szybkie rozpoznanie pozwala na odpowiednie leczenie, a tym samym zapobiega poważnym komplikacjom.

ZARZĄDZANIE CZASEM

Korzystanie z szybkiej i łatwej analizy moczu, tj. oznaczanie leukocytów, azotynów i erytrocytów przy użyciu pasków testowych do rozpoznawania ZUM, oszczędza czas.² Możliwe jest badanie na miejscu a nawet samokontrola pacjentów w domu, dzięki czemu można natychmiast wykryć bakteriomocz, ropomocz i krwawienie.

WSPARCIE ROZPOZNANIA KLINICZNEGO

Nie należy polegać jedynie na rozpoznaniu klinicznym. Trzeba również potwierdzić obecność uropatogenów za pomocą pasków testowych.² Wykrywają one esterazy leukocytów o specyficzności do 98 % i czułości do 96 %.³ Oznaczenia azotynów mają swoistość 95% i czułość do 85%.⁴

OSZCZĘDNOŚĆ PIENIĘDZY

Tylko w Stanach Zjednoczonych koszty opieki zdrowotnej związane z zakażeniem układu moczowego przekraczają miliard dolarów rocznie. Postępy w diagnostyce mogą mieć znaczący wpływ na gospodarkę.⁵ Paski testowe do moczu Combur zapewniają opłacalną metodę wykrywania ZUM.

UNIKNĄĆ NIEPOTRZEBNEGO LECZENIA ANTYBIOTYKAMI

Optymalizacja procesów diagnostycznych używając pasków testowych do moczu Combur pozwala uzyskać wiarygodne rozpoznanie. Należy unikać zbędnej antybiotykoterapii wynikającej z fałszywie dodatnich wyników, co zmniejsza ryzyko działań niepożądanych i powikłań, w tym rozwoju oporności na antybiotyki.

CECHY

Definicja:

Zakażenie mikroorganizmami patogennymi jakiegokolwiek części dróg moczowych.

Epidemiologia:

Drugi najczęstszy rodzaj infekcji po zakażeniach dróg oddechowych.⁶ ZUM występuje co najmniej raz w życiu u co piątej kobiety. U mężczyzn nie jest tak częste jak u kobiet, ale w razie wystąpienia nie może mieć ciężkiego przebiegu. ZUM bez powikłań, występuje najczęściej u młodych, aktywnych seksualnie kobiet. W ciągu roku może dotyczyć do 15 % kobiet. Ponad 25 % kobiet, które przeżyły ZUM doświadcza nawrotu choroby.¹ Najczęściej czynnikiem sprawczym niepowikłanego ZUM (75-95%) jest *Escherichia coli*^{5,7} i inne bakterie: *Proteus*, *Klebsiella*.

*Artykuł przygotowany
na podstawie
materiałów własnych
Roche Diagnostics*



Combur 10 Test M
· paski testowe do
badania właściwości
fizyko-chemicznych
moczu

Czynniki ryzyka:

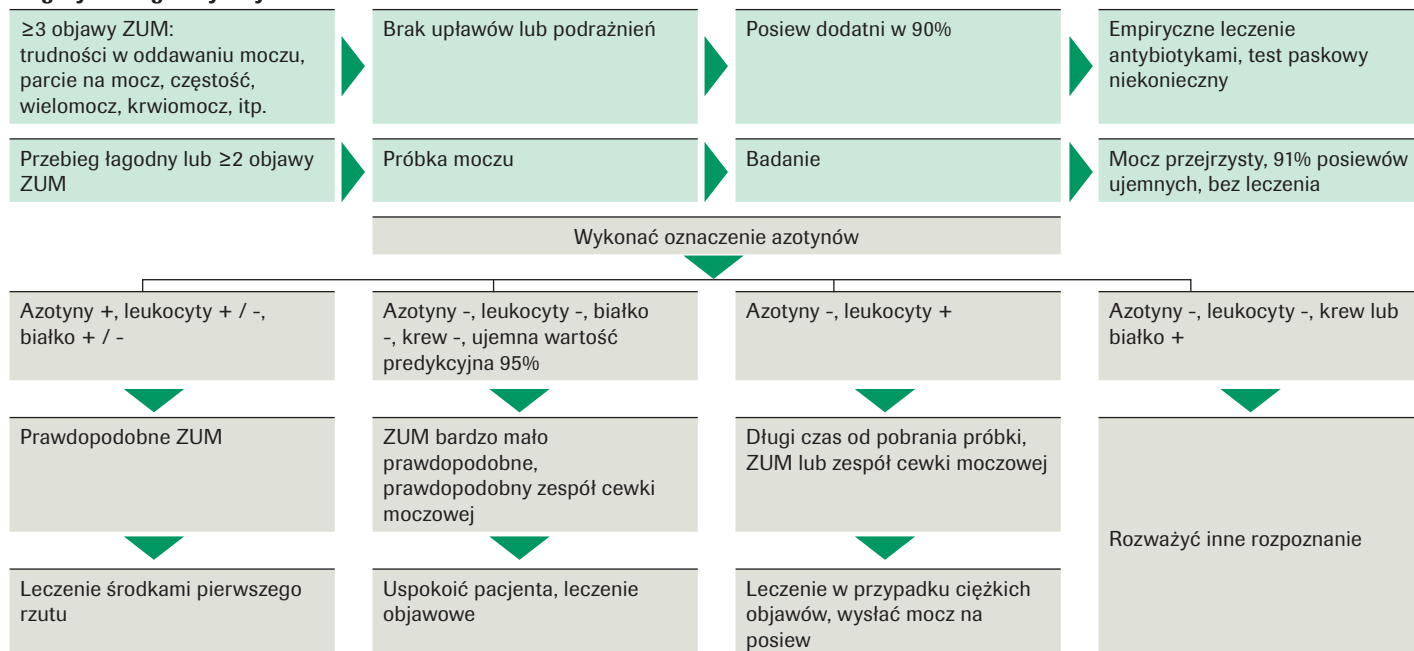
Anatomiczne lub czynnościowe zaburzenia układu moczowego, immunosupresja lub niedobór odporności, cukrzyca, ciąża, zapalenie pęcherza moczowego, występowania torbieni układu moczowego, częsta lub niedawna aktywność seksualna, zabiegi urologiczne, np. cewnikowanie, itp.

Objawy:

Bolesne oddawanie moczu, wielomocz, częste oddawanie moczu, nagłe parcie na pęcherz moczowy, ból nadłonowy, krwimocz. Gorączka, ból w okolicy lędźwiowej, nudności i wymioty mogą wskazywać na zakażenia górnych dróg moczowych (odmiedniczkowe zapalenie nerek).^{7,8}

Rozpoznanie:

Paski testowe do moczu, liczba bakterii (znaczna bakteriuria : ≥ 105 organizmów/ml zazwyczaj wskazuje na obecność infekcji), posiew moczu (z badaniem wrażliwości), badanie mikroskopowe moczu. Rozpoznanie zakażenia dróg moczowych jest potwierdzane wykryciem pojedynczego szczepu organizmów uropatogennych w połączeniu z leukocyturią. Występowanie mniej niż 105 organizmów/ml nie wyklucza obecności ZUM.

Algorytm diagnostyczny**Leczenie:**

Trzydniowa podwójna dawka kotrimoksazolu (TPM-SMX (trimetoprim-sulfametoksazol)) w terapii empirycznej.
Fluorochinolony nie są zalecane jako leki pierwszego rzutu (możliwość wystąpienia oporności).
Leczenie alternatywne: tygodniowa dawka nitrofurantoiny lub pojedyncza dawka fosfomycyny.
Beta-laktamy nie są zalecane.

Piśmiennictwo dostępne w redakcji



Nasz adres:
Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o.
ul. Wybrzeże Gdyńskie 6B
01-531 Warszawa

obsługa klienta: tel. 22 481 54 00-05
faks 22 481 55 96
e-mail: polska.diagnostics@roche.com
internet: www.roche.pl

COBAS i LIFE NEEDS ANSWERS są znakami
towarowymi należącymi do Roche
©2013 Roche Diagnostics

centrala: tel. 22 481 55 55, 56
faks 22 481 55 99
call center: tel. 22 481 54 54
e-mail: dia.callcenterpl@roche.com

Przygotowanie do druku:
TAMKAPRESS