



cobas

Life needs answers

Nr
25

ISSN 1644-8448

nakład: 1000 egz.

Lab*Forum*

Życzenia szczęścia i pomyślności
w nadchodzącym Nowym Roku 2006



Diagnostics



Świąteczne życzenia



Diagnostics

Szanowni Państwo,

Z okazji nadchodzących Świąt Bożego Narodzenia i Nowego Roku składam Państwu serdeczne życzenia szczęścia i zdrowia, powodzenia w realizacji wszystkich zamierzeń i spełnienia marzeń. Myśląc o Świątach i Wigilii przypominam mi się fragment wiersza Lucyny Krzemienieckiej „To właśnie tego wieczoru, gdy mróz łśni, jak gwiazda na dworze, przy stołach są miejsca dla obcych, bo nikt być samotny nie może.”, dlatego życzę również dużo radości i spokoju dla Państwa rodzin i znajomych.

Zgodnie z zeszłoroczną zapowiedzią o pełnieniu przez naszą firmę funkcji edukacyjnej, w roku 2005 zorganizowaliśmy kilka sympozjów szkoleniowo-naukowych dla użytkowników systemów analitycznych, w Krakowie, Łebie i Warszawie. Będziemy kontynuować ten program w roku następnym.

W roku bieżącym przeprowadziliśmy promocję marki **cobas**, m.in. na łamach naszego kwartalnika LabForum. Badania potwierdzają, że jest to marka coraz lepiej rozpoznawalna i nieodłącznie kojarzona już z firmą Roche Diagnostics. W ramach tej kampanii planujemy na rok 2006 instalację pierwszego analizatora **cobas** 6000.

Rok 2005 przyniósł również nowe rozwiązania techniczne przyczyniające się do podniesienia jakości życia ludzi z cukrzycą. Najnowsza pompa insulinowa Accu-Chek Spirit jest jedyną pompą mającą oprogramowanie w języku polskim, a także możliwość zasilania łatwo dostępną na rynku baterią. Oferta diabetologiczna wzbogaciła się również o nowy nakłuwacz, Multiclix, który charakteryzuje się zwiększonym stopniem bezpieczeństwa użycia, a jego specjalna konstrukcja znacznie zmniejsza bolesność nakłucia. Poszerzyliśmy naszą ofertę o produkty przeznaczone dla gabinetów lekarskich, a także bezpośrednio dla pacjentów, tj. ciśnieniomierze i termometry.

W przyszłym roku planujemy instalację pierwszego systemu preanalitycznego. Jest to nowoczesne rozwiązanie, które przenosi jakość pracy laboratorium na wyższy poziom, zwiększa wydajność i minimalizuje możliwość wystąpienia błędów przedanalitycznych. Bardzo ważnym projektem będzie również wprowadzenie na rynek najnowszego programu komputerowego łączącego pracę analizatorów **cobas** IT 5000. Polska jest drugim krajem na świecie, po Niemczech, który będzie miał własną wersję językową.

Polecam lekturę naszego kwartalnika, który z racji małego jubileuszu 25 wydania zwiększył nieco swą objętość.

Z poważaniem,

Andrzej Banaszkiewicz
wraz z zespołem Roche Diagnostics

Spis treści:

Świąteczne życzenia	2
Diagnostyka molekularna ptasiej grypy	3
Albumina zmodyfikowana niedokrwieniem – nowy biochemiczny marker niedokrwienia mięśnia serca	4–8
Peptyd C – zastosowanie w diagnostyce zaburzeń gospodarki węglowodanowej i jego nowe znaczenie w leczeniu cukrzycy	8–10
Rola badań laboratoryjnych w rozpoznawaniu zaburzeń równowagi kwasowo-zasadowej	10–12
Porównanie automatycznego liczenia leukocytów w płynie mózgowo-rdzeniowym z metodą tradycyjną przy wykorzystaniu analizatora hematologicznego SYSMEX XE-2100, cz. II	13–14
Nadchodzi cobas 6000	15

Nasz adres:

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

centrala: tel. 0-22/481 55 55, 56
faks 0-22/481 55 99

serwis: tel. 0-22/481 54 54–60
faks 0-22/481 55 95

obsługa klienta: tel. 0-22/481 54 00–05
faks 0-22/481 55 96

e-mail: polska.diagnostics@roche.com
internet: www.rochediagnostics.pl

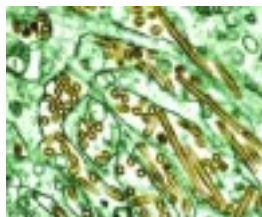
Gorący temat...

Diagnostyka molekularna ptasiej grypy

Ptasia grypa to choroba zakaźna występująca przede wszystkim wśród ptactwa. Wywoływana jest przez szczep wirusa grypy typu A. Choroba ta po raz pierwszy została zidentyfikowana we Włoszech 100 lat temu. Występuje praktycznie na całym świecie. Sądzi się, że wszystkie gatunki ptaków są podatne na zakażenie wirusem, chociaż niektóre mogą być bardziej odporne. Zakażenie wirusem wśród ptactwa wywołuje różne objawy łącznie z wysoce zakaźną i śmiertelną postacią powodującą epidemie. Ta ostatnia postać znana jest jako „wysoce chorobotwórcza grypa ptasia”.

Wirus ptasiej grypy, podobnie jak inne szczepy wirusa grypy, rozprzestrzeniają się w organizmie żywiciela poprzez dwa białka – hemaglutyninę i neuraminidazę. Umożliwiają one wirusowi H5N1 atakowanie zarówno ptaków, jak i ludzi.

Wirus grypy ma kształt kulisty, składa się z materiału genetycznego w postaci kwasu RNA, otoczonego płaszczem białkowym i lipidowym. Na powierzchni tego płaszcza znajdują się białka odpowiedzialne za rozpoznawanie komórek – hemaglutynina i neuraminidaza. Po wnikięciu do organizmu wirus atakuje komórki, niszcząc je i replikując się przy użyciu ich enzymów komórkowych.



Barwiony obraz pokazujący wirusa ptasiej grypy (złoty) rosnącego w komórkach nerki psa (zielony). (Photograph by C. Goldsmith/U.S. Centers for Disease Control)

Wszystkie typy wirusa grypy typu A, łącznie z powodującym sezonowe epidemie grypy u ludzi, są genetycznie niestabilne i znakomicie adaptują się w celu ominięcia systemów obronnych ofiary. Wirusy grypy nie posiadają mechanizmów naprawy kwasu nukleinowego podczas re-

plikacji. Wynikiem tego są częste zmiany składu genetycznego wirusa podczas namnażania u ludzi i zwierząt. W rezultacie może dojść do przekształcenia (zmutowania) wirusa o niskiej patogenności w odmianę o wysokim stopniu patogenności.

Wirus ptasiej grypy w regularnej postaci nie atakuje innych gatunków niż ptaki i świnie. Pierwszy udokumentowany przypadek infekcji u ludzi miał miejsce w Hong Kongu w 1997 roku, kiedy to wirus grypy H5N1 spowodował wystąpienie objawów u 18 ludzi, z których 6 zmarło.

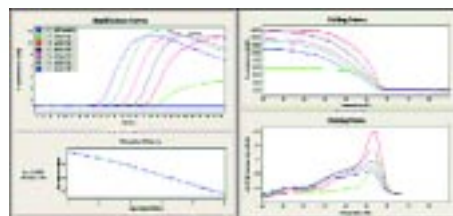
Obecnie poważnym problemem staje się możliwość precyzyjnej i szybkiej diagnostyki wirusa ptasiej grypy. Wyniki testów wykonywanych tradycyjnymi metodami są otrzymywane zbyt późno lub są zbyt ogólne, nie dają np. informacji o typie wirusa.

Firma Roche Diagnostics razem z firmą TIB MOLBIOL stworzyła jeden z pierwszych systemów do szybkiej diagnostyki molekularnej wirusa ptasiej grypy. System oparty jest na ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Składa się z zestawu odczynników diagnostycznych stosowanych wraz z urządzeniem LightCycler.

Dwa zestawy mieszaniny reakcyjnej (LightMix) wykrywają charakterystyczne elementy wirusa grypy. Zestaw LightMix A H5 jest zaprojektowany do wykrywania genu H5 wirusa, zaś LightMix A N1 genu N1.

Metoda składa się z dwóch reakcji następujących po sobie. W pierwszym etapie oczyszczane RNA z pobranego materiału

musi zostać przepisane do postaci cDNA. W drugim etapie w uzyskanym cDNA wykrywa się obecność genów H5 i N1 wirusa grypy. W drugiej reakcji wykorzystuje się aparat LightCycler w celu uzyskania możliwie najwyższej czułości reakcji. W wyniku przeprowadzenia obu reakcji w sposób zgodny z zaleceniami producenta, najmniejsza ilość wirusa, która zostanie wykryta to 10 kopii. Jest to wynik nieosiągalny przy zastosowaniu konwencjonalnych metod diagnostycznych. Cała metoda od momentu uzyskania materiału do badania do otrzymania wyniku z reakcji detekcyjnej zajmuje około 2,5 godziny.



Typowe wyniki uzyskiwane z użyciem zestawu LightMix i aparatu LightCycler

Oprogramowanie do aparatu LightCycler, w sposób automatyczny uwzględniając zastosowane kontrole, interpretuje wyniki dzieląc je na dodatnie i ujemne.

Wszystkie opisane cechy systemu detekcyjnego do diagnostyki ptasiej grypy firmy Roche Diagnostics udowadniają, iż jest to wartościowy i jak na razie unikatowy system pozwalający na szybką diagnostykę tej niebezpiecznej choroby.

Zestaw odczynników do diagnozowania ptasiej grypy:

Produkt	Opakowanie	Nr katalogowy
LightCycler 2.0 Instrument CE/IVD	1 aparat	03 531 414 001
High Pure RNA Isolation Kit	1 zestaw 50 reakcji	11 828 665 001
LightCycler FastStart DNA Master HybProbe	1 zestaw 96 reakcji	03 003 248 001
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	1 zestaw 50 reakcji	04 379 012 001
LightMix for the detection of Influenza virus A H5	1 zestaw 96 reakcji	40-0219-16
LightMix for the detection of Influenza virus A N1	1 zestaw 96 reakcji	40-0230-16

Albumina zmodyfikowana niedokrwieniem – nowy biochemiczny marker niedokrwienia mięśnia serca

Wiesław Piechota, Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Wiktor Piechota, Klinika Chorób Wewnętrznych i Kardiologii, Wojskowy Instytut Medyczny w Warszawie

Wstęp

Rozwój metod immunochemicznych i trwające od wielu lat badania nad markerami kardiologicznymi doprowadziły do niewątpliwego sukcesu, jakim jest prawie już powszechne wykorzystanie troponin do diagnostyki zawału mięśnia sercowego. Zwiększenie stężenia sercowych troponin wywołane niedokrwieniem decyduje o rozpoznaniu zawału i ma ważne znaczenie w rokowaniu. Stężenie troponiny wzrasta w przebiegu nasilonego niedokrwienia, kiedy dochodzi już do nieodwracalnych, martwiczych zmian w mięśniu sercowym. Do takich zmian dochodzi zwykle po upływie co najmniej kilku godzin od początku ostrego niedokrwienia. Spośród pacjentów z bólem w klatce piersiowej szukających pomocy w szpitalnych izbach przyjęć tylko kilkanaście procent ma zawał serca. Pozostali pacjenci mogą mieć ból wywołany spoczynkowym niedokrwieniem bez martwicy (niestabilna choroba wieńcowa) lub ból o charakterze wysiłkowym, bez cech progresji (nasilenia) w krótkim czasie, (stabilna choroba wieńcowa) albo ból niewieńcowy. Rozpoznanie i różnicowanie tych przyczyn bólu w klatce piersiowej zapewnia głównie badanie elektrokardiograficzne. Obniżenie odcinka ST, inwersja, względnie pseudonormalizacja załamek T¹ i brak zwiększonego stężenia markerów martwicy mięśnia serca wskazuje na niestabilną chorobę wieńcową.

Pozostaje jednak grupa pacjentów z bólami w klatce piersiowej, których charakter w połączeniu z innymi danymi klinicznymi, wywiadem i informacjami demographicznymi (wiek, płeć, profil lipidowy, nadciśnienie tętnicze, palenie papiero-

sów, inne) silnie przemawia za obecnością niedokrwienia przy braku zmian elektrokardiograficznych lub nieczytelnym/niedyagnostycznym elektrokardiogramie i ujemnym wyniku oznaczeń markerów martwicy mięśnia serca. U stabilnych klinicznie pacjentów z tej grupy możliwe jest wykonanie badań nieinwazyjnych, takich jak elektrokardiograficzna lub scyntygraficzna próba wysiłkowa czy echokardiografia dobutaminowa, które przybliżają właściwe rozpoznanie tzn. kwalifikację bólów jako wieńcowych lub pozawieńcowych.² Jest to jednak diagnostyka wymagająca czasu i dodatkowych kosztów. Dlatego, m.in. od pewnego czasu trwają poszukiwania nowych biomarkerów, które wskazywałyby przede wszystkim na niedokrwienie mięśnia serca i różnicowałyby pacjentów z niedokrwieniem od pacjentów bez niedokrwienia oraz pacjentów z niedokrwieniem bez martwicy (zawału) od pacjentów, u których ischemia doprowadziła do martwicy. Opracowanie metody laboratoryjnej ułatwiającej rozpoznanie niedokrwienia zmniejszyłoby niepewność diagnostyczną u pacjentów bez zmian

w EKG i bez biochemicznych cech martwicy mięśnia serca, umożliwiłoby ograniczenie uciążliwych i niekiedy kosztownych badań czynnościowych u tych pacjentów i, być może, zredukowałoby liczbę pozwów o błąd w sztuce lekarskiej spowodowanych odesłaniem do domu pacjenta zagrożonego ostrym incydentem wieńcowym.³

Wczesne rozpoznanie niedokrwienia mięśnia sercowego, jeszcze przed ewentualnymi zmianami martwiczymi umożliwiłoby ponadto wczesną stratyfikację ryzyka i niezwłoczne podjęcie działań terapeutycznych przeciwdziałających ewolucji niedokrwienia do martwicy.

Oznaczenie albuminy zmodyfikowanej niedokrwieniem (IMA)

Pomysł oznaczania albuminy zmodyfikowanej niedokrwieniem (ang. *ischemia modified albumin*, IMA) narodził się, gdy zaobserwowano, że w wyniku niedokrwienia tkanek dochodzi do zmniejszenia powinowactwa albumin do metali grup pośrednich, m.in. kobaltu i niklu.



Rycina 1. Zjawisko wykorzystane w teście do oznaczania IMA

Pierwsze takie dane pochodzą z obserwacji pacjentów poddawanych planowej przezskórnej angioplastyce wieńcowej, u których zaobserwowano zmniejszenie wiązania kobaltu z albuminami bezpośrednio i 6 godzin po zabiegu.⁴ Autorzy tego pionierskiego badania zastosowali stworzony przez siebie wcześniej test⁵ oparty na pomiarze ilości niezwiązanego kobaltu po dodaniu jego roztworu do preparatu oczyszczonej ludzkiej albuminy pochodzącej z badanej surowicy pacjenta. Im większe niedokrwienie, tym bardziej zmniejsza się powinowactwo albuminy do kobaltu, czego mechanizm nie jest całkowicie wyjaśniony – postuluje się rolę zmian w N-końcowym fragmencie albuminy wywołanych przez wolne rodniki tlenowe, stres oksydacyjny i zaburzenia działania wymienników sodowo-wapniowych.⁶ Ilość niezwiązanego kobaltu mierzy się metodą kolorymetryczną po dodaniu ditiotretiolu (DTT) (odczytując wartość absorbancji przy długości fali 470 nm).⁶ Uzyskaną wartość wyraża się bezpośrednio w jednostkach absorbancji (ang. *albumin binding serum units*, ABSU) lub skrótowo w jednostkach na ml (U/mL). Test oznaczający IMA nazwany jest skrótowo ACB od *Albumin Cobalt Binding*, czyli test wiązania kobaltu przez albuminę.

Dotychczasowe doniesienia na temat IMA dotyczą wyłącznie mięśnia serca, co może przemawiać za pewną swoistością narządową tego markera, przynajmniej w stanach ostrego niedokrwienia miokardium przy jednoczesnym braku istotnego niedokrwienia innych narządów. Autorzy nie znaleźli jednak prac, które potwierdzałyby taką spekulację, co jednak nie umniejsza potencjalnego znaczenia IMA w diagnostyce ostrych postaci choroby wieńcowej, gdyż nie współlistnieją one często z ostrym niedokrwieniem innych narządów (np. jedynie 4,59% pacjentów z zawałem serca doświadcza udaru w toku hospitalizacji, zwykle po pierwszej dobie od początku incydentu wieńcowego – a zatem po kluczowym z diagnostycznego punktu widzenia czasie).⁷

Czynniki wpływające na wynik oznaczenia IMA

Na wartość IMA wpływ mogą mieć różne czynniki poza obecnością i nasileniem niedokrwienia, takie jak stężenie albuminy. Wykazano dużą ujemną korelację między stężeniem albuminy w badanej próbce, a otrzymywanym wynikiem (ABSU), wyrażoną współczynnikiem korelacji $r = -0,7$. Ilość wolnego kobaltu zmniejsza się w obecności zwiększonego stężenia albuminy, a uzyskana wartość wyrażona w ABSU jest niższa.¹⁰ W innym badaniu korelacja ta była jeszcze silniejsza i wynosiła $r = -0,88$ lecz tylko w grupie pacjentów z hipalbuminemią, natomiast wśród osób z prawidłowymi stężeniami albuminy wynosiła jedynie $r = -0,37$.⁸ Wskazuje to na brak konieczności uwzględniania stężenia albumin przy oznaczaniu IMA u pacjentów z normoalbuminemią, i potencjalnie mniejszą przydatność testu u chorych z obniżonym stężeniem albuminy (< 34 mmol/L).

Wydaje się również, że wartość IMA zależy od stopnia wydolności nerek. W grupie pacjentów dializowanych wartość IMA była skorelowana ze stężeniem kreatyniny ($r = 0,39$, $p < 0,05$), a ponadto była podwyższona (powyżej przyjętego w badaniu punktu odcięcia 85 U/mL) u wszystkich pacjentów z podwyższoną TnT, co pośrednio wskazuje, że tłąca się martwica mięśnia sercowego u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek może mieć mechanizm niedokrwienny.⁹

Zmiany w strukturze albuminy także mogą decydować o wiązaniu przez nią metali. Mutacja powodująca usunięcie ostatnich dwóch aminokwasów N-końcowego fragmentu albuminy prowadzi do utraty powinowactwa tego białka do kobaltu i wysokich wartości ABSU, które mogą wskazywać na niedokrwienie przy jego rzeczywistym braku. Rozpowszechnienie tej odmiany w populacji nie jest znane – w omówionym dalszej części tej pracy materiale Bhagavana zidentyfikowano jedną osobę z taką delecją w grupie 167 badanych.^{6,10}

Zmiany stężenia IMA u pacjentów z bólem w klatce piersiowej

Jak zaznaczono we wstępie idealny marker niedokrwienia wykrywałby niedo-

krwienie przebiegające bez martwicy mięśnia serca i/lub wyprzedzające pojawienie się martwicy. Umożliwiłoby zatem rozpoznawanie niedokrwienia w niestabilnej dławicy piersiowej, szczególnie w tych przypadkach, w których nie występują zmiany w EKG lub zapis nie jest diagnostyczny (blok odnogi pęczka Hisa, szczególnie lewej, stymulacja komorowa, rzadziej zespół preekscytacji), a markery martwicy pozostają jeszcze niezmienione. Kolejną sytuacją jest niedokrwienie poprzedzające martwicę, a zatem zawał w okresie, w którym nie doszło jeszcze do uwolnienia markerów martwicy mięśnia serca. Idealny marker niedokrwienia umożliwiłby także rozróżnienie tych dwóch stanów (niedokrwienia bez następnej martwicy i niedokrwienia prowadzącego do martwicy).

Pojawiły się pierwsze badania oceniające pod tym kątem wartość oznaczania stężenia albuminy modyfikowanej niedokrwieniem. W pracy Bhagavana i wsp.¹⁰ mierzono stężenie IMA u pacjentów bez niedokrwienia mięśnia serca oraz w grupie pacjentów z niedokrwieniem, na którą składały się osoby bez zawału (z niestabilną chorobą wieńcową) i zawałem mięśnia serca. Różnica w stopniu wiązania kobaltu przez albuminy między grupą z niedokrwieniem i bez niedokrwienia była wyraźna i wysoce znamienna statystycznie. Optymalna wartość wypadkowa czułości i swoistości wykrywania niedokrwienia/zawału ustalona w oparciu o krzywą ROC wyniosła 0,95 (pole pod krzywą) przy 0,50 ABSU (zakres 0,30–1,00 ABSU). W tym punkcie czułość wynosiła 88%, swoistość 94%, a dodatnia i ujemna wartość predykcyjna odpowiednio 92 i 91%. Są to doskonale wyniki. Niestety znacznie gorsze rezultaty uzyskano przy różnicowaniu niedokrwienia (bez zawału) z zawałem (niedokrwieniem i martwicą). Pole pod krzywą ROC wynosiło 0,66, co oznacza, że test słabo różnicuje niedokrwienie od niedokrwienia z martwicą kardiomiocytów. Morrow i wsp. omawiając powyższe badanie w artykule redakcyjnym uznali IMA za test o dobrej czułości i swoistości w diagnozowaniu niedokrwienia mięśnia serca.³ To, że test ten słabo różnicuje niestabilną dławicę od zawa-

lu upewnia nas niejako, iż jest to głównie test niedokrwienia, bez względu na zjawiska towarzyszące, czyli dyskryminuje dobrze między niedokrwieniem i jego nieobecnością.

W innym, wielośrodkowym badaniu z udziałem 256 pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym oceniano zdolność IMA do wczesnego wykluczania zawału lub przewidywania wzrostu stężenia cTn w późniejszym okresie (krew do oznaczeń IMA i cTn pobierano przy przyjęciu oraz 6–24 godziny później). Test wykazał się zadowalającą czułością i swoistością (odpowiednio 83 i 69%) oraz wysoką ujemną wartością predykcyjną (96%).¹¹ Należy zwrócić uwagę na to, że w badaniu tym traktowano IMA raczej jako wczesny marker uszkodzenia/martwicy mięśnia serca służący przede wszystkim wczesnemu wykluczeniu zawału, a nie stwierdzeniu niedokrwienia.

W podobny sposób wykorzystano IMA w pracy Collisona i wsp.¹² W badaniu tym oznaczono IMA i troponinę T u 540 pacjentów zgłaszających się do oddziału ratunkowego z powodu bólu w klatce piersiowej (początek do 3 godzin). Uczestników podzielono w oparciu o retrospektywną analizę rozpoznań na grupę z zawałem mięśnia serca i bez zawału. Istotne jest to, że u wszystkich pacjentów, u których wykluczono ostry zawał serca, oba testy (IMA i TnT) wypadły ujemnie, co pozostaje w zgodzie z innymi obserwacjami wskazującymi na wysoką ujemną wartość predykcyjną IMA. Test był także bardzo dobrym predyktorem ujemnych lub dodatnich wyników troponin mierzonych w czasie 6–24 godzin od początku bólu.

Powyższe wyniki zostały w dużej mierze potwierdzone przez ostatnie badanie Sinha i wsp.¹³, w którym u 208 pacjentów przyjmowanych do szpitala w czasie do 3 godzin od ostrego bólu w klatce piersiowej oznaczano IMA, troponinę T i wykonywano badanie elektrokardiograficzne. Uzyskane wyniki pojedynczych badań oraz łącznie odnoszono do ostatecznej diagnozy. Czułość wykrywania niedokrwienia przez IMA w momencie przyjęcia do szpitala wynosiła 82% w porównaniu z 45% czułością EKG oraz 20% troponiny T (Tabela 1.).

Tabela 1. Czułość wykrywania niedokrwienia mięśnia serca przez IMA na tle innych parametrów w momencie przyjęcia chorych z ostrym zespołem wieńcowym do szpitala

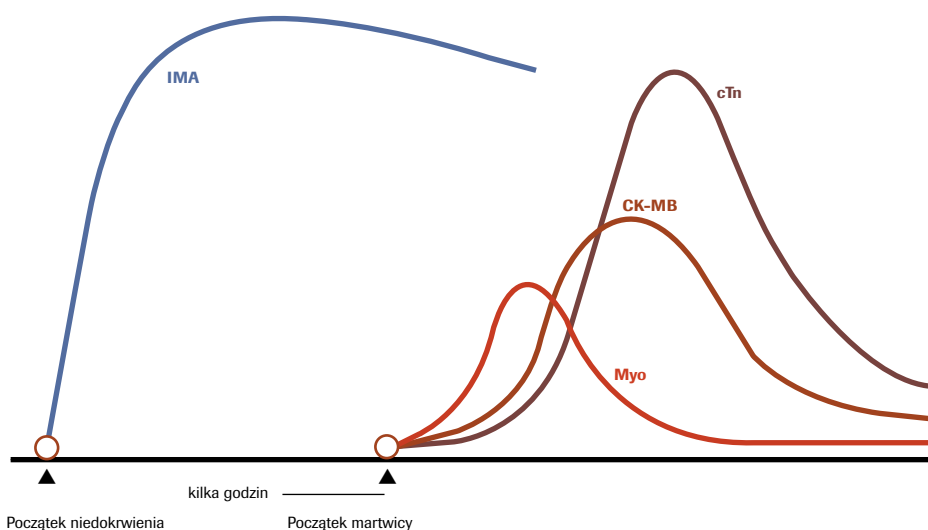
Parametr	IMA	EKG	cTnT	IMA + cTnT	IMA + EKG	IMA + EKG + cTnT
Czułość (%)	82	45	20	90	92	95

Na uwagę zasługuje prawie dwukrotnie większa czułość IMA w porównaniu z EKG oraz fakt, że taktyka wieloparametrowa zwiększa czułość wykrywania niedokrwienia zaraz po przyjęciu do szpitala aż do 95%. U chorych z niestabilną dusznicą czułość wyłącznie testu IMA była taka sama jak czułość IMA i EKG łącznie. Test IMA jest szczególnie wskazany dla pacjentów izby przyjęć z bólem w klatce piersiowej lub objawami sugerującymi ich sercowe pochodzenie oraz z małym lub umiarkowanym ryzykiem ostrego zespołu wieńcowego, prawidłowym lub niediagnostycznym EKG i normalnym stężeniem troponin w pierwszej pobranej próbce. Zestaw IMA, EKG i troponina ma największą spośród innych pojedynczych testów lub ich kombinacji negatywną wartość predykcyjną (95%) nadaje się zatem doskonale do wykluczenia ostrego niedokrwienia serca.¹⁴

Test IMA może nadawać się do oceny powtarzających się sercowych incydentów

niedokrwienych, gdyż wyniki po ustaniu niedokrwienia dość szybko się normalizują. Sinha i wsp. wykazali wzrost IMA pół godziny po PTCA u chorych z przejściowymi niedokrwieniami zmianami odcinka ST, który wyraźnie utrzymywał się około 30 minut.¹⁵ Wyniki wróciły do poziomu sprzed zabiegu po 12 godzinach. Na Rycinie 2 przedstawiono w uproszczony sposób czasowy przebieg zmian stężenia IMA na tle innych markerów martwicy mięśnia serca. Szereg innych danych wskazuje na to, że stężenie IMA zwiększa się w kilka minut od początku niedokrwienia mięśnia serca i powraca do poziomu wyjściowego po 6 godzinach od jego ustąpienia.

Najlepszym dowodem na to, że IMA zwiększa się także w przemijającym niedokrwieniu bez martwicy mięśnia sercowego jest stwierdzanie nieprawidłowych wartości u znacznej liczby pacjentów w trakcie leczenia PTCA, podczas gdy tylko nieduża część z nich ma również zwiększenie stężenia troponin.

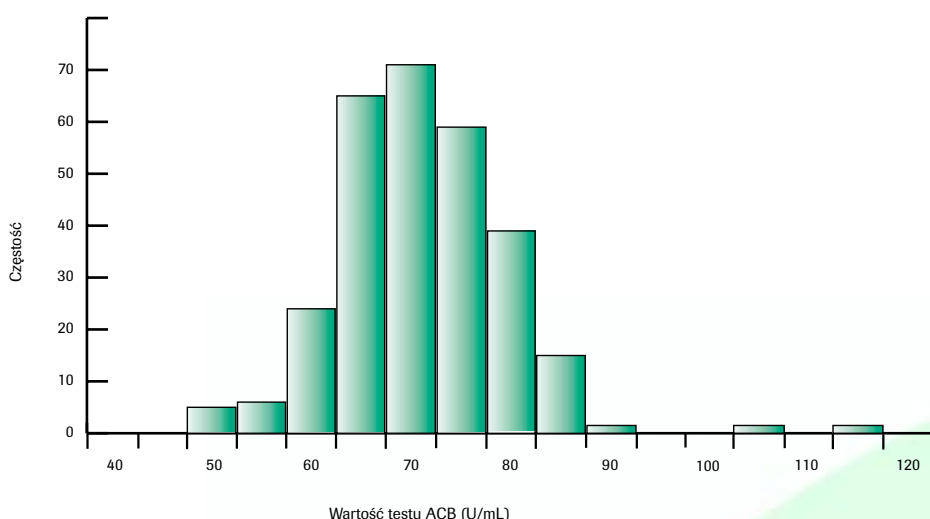


Rycina 2. Dynamika zmian stężenia IMA w porównaniu z innymi wskaźnikami martwicy mięśnia serca

Aspekty praktyczne i inne uwagi

IMA oznacza się za pomocą testu ACB w próbkach surowicy. Pobieranie próbek do probówek ze związkami chelatującymi (np. EDTA) nie jest dopuszczalne. Próbkę nie może być zhemolizowana ani zawierać resztek włókna. Oznaczenie należy wykonać w ciągu 2,5 godziny albo zamrozić próbkę w temp. -20°C .¹⁶ Nie zaleca się rozcieńczania próbek.

Rozkład wartości stężeń w populacji ludzi zdrowych jest zbliżony do rozkładu normalnego (Rycina 3.).



Rycina 3. Rozkład wartości IMA uzyskanych w teście ACB u zdrowych osób

Diagnostyczny punkt odcięcia, odpowiadający 95 percentylowi tego rozkładu wynosi dla jednego testu dostępnego komercyjnie (Ischemia Technologies, USA) 85 U/mL.

Test ten został zatwierdzony w USA przez *Food and Drug Administration* w 2003 roku. Od początku 2005 roku w USA koszt badania refundowany jest przez państwowe ubezpieczenie Medicare.

Podsumowanie

Omówione powyżej badania nad diagnostyczną rolą oznaczania IMA u pacjentów z bólem w klatce piersiowej wskazują jednoznacznie na istotną rolę tego nowego markera przede wszystkim w rozpoznaniu

waniu niedokrwienia prowadzącego do martwicy czy zachodzącego równocześnie z martwicą. IMA dobrze różnicuje pacjentów z niedokrwieniem mięśnia serca od osób bez niedokrwienia, jednocześnie słabo dyskryminując między pacjentami z zawałem od pacjentów z niedokrwieniem bez zawału. Zatem test ten jest przede wszystkim markerem niedokrwienia i jest dodatni zarówno w niestabilnej chorobie wieńcowej, jak i zawale serca. Zaletą IMA jest fakt, iż jest to wczesny marker niedokrwienia mięśnia serca, wy-

przedzający wzrost stężenia troponin. Przy tym IMA wykazuje wysoką ujemną wartość predykcyjną, może więc służyć jako wczesny test wykluczający zawał.

Zatem test określający zmodyfikowaną niedotlenieniem zdolność albuminy do wiązania kobaltu (IMA) lub ACB (od *Albumin Cobalt Binding*) jest pierwszym badaniem biochemicznym wykrywającym niedotlenienie mięśnia sercowego bardzo wcześnie, nawet przy braku zmian wskazujących na martwicę. W połączeniu z zapisem EKG i pomiarem stężenia troponin lub innymi wczesnymi markerami martwicy (np. H-FABP) odegra on niewątpliwie istotną rolę w segregacji pacjentów z bólem w klatce piersiowej na izbie przyjęć.

Piśmiennictwo:

1. Dąbrowska B, Dąbrowski A. *Podręcznik elektrokardiografii*, wydanie IV, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 1999.
2. Opolski G, Filipiak K, Poloński L. *Ostre zespoły wieńcowe*, Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław 2002.
3. Morrow DA, de Lemos JA, Sabatine MS, et al.: *The search for a marker of cardiac ischemia*. *Clin Chem* 2003, 49: 537–538.
4. Bar-Or D, Winkler JV, Vanbenthuyzen K, et al.: *Reduced albumin-cobalt binding with transient myocardial ischemia after elective percutaneous transluminal coronary angioplasty: a preliminary comparison to creatinine kinase-MB, myoglobin, and troponin I*. *Am Heart J* 2001, 141: 985–991.
5. Bar-Or D, Lau E, Winkler JV. *A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia – a preliminary report*. *J Emerg Med* 2000, 36: 959–969.
6. Bar-Or D, Curtis G, Rao N, et al.: *Characterization of the Co (2+) and Ni (2+) binding amino-acid residues of the N-terminus of human albumin. An insight into the mechanism of a new assay for myocardial ischemia*. *Eur J Biochem* 2001, 268: 42–47.
7. Pi Y, Zhang W, Shi L, Wang R, et al.: *Study on the incidence and risk factors for in-hospital stroke in patients with acute myocardial infarction*. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2002, 23: 457–460.
8. Gaze DC, Crompton L, Collinson PO: *Ischemia modified albumin should be interpreted with caution in patients with low serum albumin concentrations*. *Clin Chem* 2004, 50: Supplement, A-67.
9. Gaze DC, Crompton L, Collinson PO: *Ischemia modified albumin and cardiac troponin in haemodialysis patients*. *Clin Chem* 2004, 50: Supplement, A-64.
10. Bhagavan NV, Lai EM, Rios PA, et al.: *Evaluation of human serum albumin cobalt binding assay for the assessment of myocardial ischemia and myocardial infarction*. *Clin Chem* 2003, 49: 581–585.

11. Christenson RH, Duh SH, Sanhai WR, et al.: Characteristics of an albumin cobalt binding test for assessment of acute coronary syndrome patients: a multicenter study. *Clin Chem* 2001, 47: 464–470.

12. Collinson PO, Gaze DC, Bainbridge K, et al.: Utility of admission cardiac troponin and ischemia modified albumin measurements for rapid rule out of myocardial infarction in the Emergency Department. *Clin Chem* 2004, 50: Supplement, A-64.

13. Sinha MK, Roy D, Gaze DC, et al.: Role of ischemia modified albumin, a new marker of myocardial ischaemia, in the early diagnosis of acute coronary syndromes. *EMJ* 2004, 21: 29–34.

14. Anwaruddin S. i wsp.: Ischemia Modified Albumin Improves the Usefulness of Standard Cardiac Biomarkers for the Diagnosis of Myocardial Ischemia in the Emergency Department Setting. *Am J Clin Path* 2005, 123, 140–145.

15. Sinha MK, Gaze DC, Tippins JR, et al.: Ischemia modified albumin is a sensitive marker of myocardial ischemia after percutaneous coronary intervention. *Circulation*, 2003, 107, 2403–2405.

16. Apple F.S. i wsp.: Future Biomarkers for Detection of Ischemia and Risk Stratification in Acute Coronary Syndrome. *Clin Chem*, 2005, 51, 810–824.

Peptyd C – zastosowanie w diagnostyce zaburzeń gospodarki węglowodanowej i jego nowe znaczenie w leczeniu cukrzycy

Marianna I. Bąk, Katedra i Klinika Gastroenterologii i Chorób Przemiany Materii AM w Warszawie

Peptyd C, pomimo iż został odkryty prawie 40 lat temu przez D. Steinera i P. Oyerę (1967), był zawsze uznanym markerem sekrecji insuliny, jednakże dopiero w ostatniej dekadzie pojawiły się prace eksperymentalne i pierwsze badania kliniczne, które wyraźnie wskazują na jego specyficzną aktywność biologiczną endogennego hormonu.

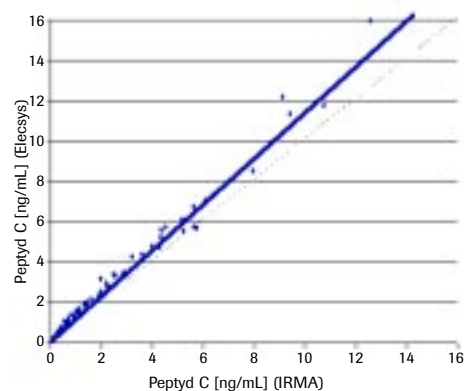
Uwalnianie peptydu C i insuliny z komórek β trzustki

W przeciwieństwie do innych typów komórek organizmu ssaków, komórka β w sposób nieprzerwany rejestruje poziom związków energetycznych zawartych w swojej cytoplazmie i natychmiast, poprzez szereg sygnałów wewnątrzkomórkowych, zmienia ilość wytwarzanej insuliny. Uwalnianie insuliny do krwi krążącej jest regulowane przez wewnątrzkomórkowy metabolizm glukozy w komórce β . Wzrost stężenia glukozy we krwi prowadzi do zmiany stężenia glukozy w komórce β , zwiększa transkrypcję genu proinsuliny i translację mRNA dla pre-proinsuli-

ny i już w ciągu kilku sekund prowadzi do zmiany wydzielania insuliny. W odpowiedzi na podwyższenie glikemii (np. po posiłkach) komórki β wysp trzustkowych rozpoczynają syntezę pre-proinsuliny, białka zawierającego 110 aminokwasów. Ten pro-hormon jest prawie natychmiast rozkładany i powstaje proinsulina. Częste cząsteczki proinsuliny są transportowane do aparatu Golgiego, a następnie rozkładane przez kolejną endopeptydazę do insuliny i peptydu C, które są przechowywane w dojrzałych ziarnistościach komórek β .

U ssaków, glukoza jest transportowana do komórki β przez odpowiedni przekaźnik (GLUT-2), a następnie fosforylowana przez glukokinazę, która jest jednocześnie bardzo czułym enzymem regulującym stężenie glukozy i stymulującym syntezę insuliny w komórce β . W uproszczeniu można powiedzieć, iż zmiany stężenia glukozy w komórce β wpływają na wielkość syntezy ATP w procesie glikolizy, przez co zmienia się stosunek ATP/ADP (ilość wolnego ADP). Relacja ATP do ADP wpływa na czynność kanałów potasowych

zależnych od ATP, które modyfikują wartość potencjału błony komórkowej w komórce β . Efektem końcowym tego łańcucha zmian błonowo-cytoplazmatycznych jest zwiększenie stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia i rozpoczęcie egzocytozy insuliny z komórki β . Insulina jest uwalniana z dojrzałych ziarnistości komórek β jednocześnie z peptydem C, w ilościach równomolowych.



Rycina 1.

Insulina już przy pierwszym przejściu przez wątrobę (zanim pojawi się w krążeniu systemowym i dotrze do wszystkich tkanek) ulega aż w ok. 50% rozkładowi przez insulinazę wątrobową. Peptyd C, w przeciwieństwie do insuliny, nie ulega rozkładowi w wątrobie i dlatego jego stężenie w krążeniu systemowym bardziej precyzyjnie oddaje ilość wydzielanej insuliny. Fakt ten jest obecnie szeroko wykorzystywany w badaniach klinicznych oceniających czynność wydzielniczą komórek β , a nawet nierzadko wykonuje się oznaczanie peptydu C na czczo i po stymulacji już bez oznaczeń insuliny. W warunkach prawidłowej równowagi metabolicznej z komórek β są uwalniane do krwiobiegu: insulina, peptyd C i w śladowych ilościach proinsulina. W ciągu doby insulina i peptyd C są uwalniane do krążenia w formie pulsacyjnej i szczyty ich stężenia we krwi występują co ok. 12 minut.

Pomiary stężenia insuliny i peptydu C

W pomiarach stężeń insuliny i peptydu C w praktyce codziennej stosowane są metody immunoradiometryczne i enzymoimmunologiczne. U osób zdrowych stężenie obu hormonów oznaczane na czczo ma dość dużą rozpiętość, ponieważ jest w bezpośrednim związku z masą ciała, pożywieniem spożywanym w ciągu ostatnich 24 godzin i aktywnością fizyczną. Jednakże, jeśli zostaną zachowane standardowe warunki (pobranie krwi na czczo, 12 godzin od ostatniego posiłku, bez głodzenia i nadmiernej ilości węglowodanów w ciągu 3 dni poprzedzających badanie) to wyniki oznaczeń praktycznie nie różnią się od siebie na przestrzeni 1–5 lat. Istotnym elementem precyzji pomiarów peptydu C jest stosowanie tej samej metody (zestawów tej samej firmy). Rycina 1. przedstawia porównanie 72 oznaczeń (w surowicach uzyskanych od osób badanych w warunkach na czczo) wykonanych dwoma metodami: zestawami firmy Immunotech metodą IRMA i zestawami firmy Roche metodą elektrochemiluminescencji⁽¹⁾. Zwraca uwagę bardzo dobra korelacja wyników ($r = 0,957$).

Tabela 1. Zakres wartości prawidłowych stężeń insuliny i peptydu C mierzonych na czczo

	Jednostki pomiaru	Metody pomiaru	Zakresy wartości
Insulina	$\mu\text{U/mL}$	IRMA	2,4–25,0
Insulina	$\mu\text{U/mL}$	Elecsys	2,6–24,9
Peptyd C	ng/mL	IRMA	0,7–3,3
Peptyd C	ng/mL	Elecsys	1,1–4,4

Peptyd C jest degradowany w nerkach i usuwany z moczem. Jego stężenie w moczu jest 20–50 razy większe niż w surowicy. W praktyce, pomiary peptydu C w moczu wykonujemy u dzieci i w niektórych sytuacjach, takich jak ciąża u kobiet z cukrzycą. Prawidłowe stężenie peptydu C w moczu wynosi 30–150 $\mu\text{g}/24$ godziny. W chorobach, które przebiegają z upośledzeniem funkcji nerek, co powoduje wzrost stężenia kreatyniny we krwi, stwierdza się zwiększone wydalanie peptydu C w moczu.

Podwyższony poziom insuliny i peptydu C stwierdza się u osób otyłych, u osób z hipersekrecją komórek β i insulinoopornością, po spożyciu posiłków, w trakcie leczenia sterydami oraz w guzach wydzielających insulinę (*insulinoma*). Ponieważ peptyd C jest wolno degradowany w nerkach, to w chorobach przebiegających z upośledzeniem funkcji nerek stwierdza się znacznie zwiększone stężenia peptydu C na czczo i po posiłkach, a także w moczu. Natomiast niskie wartości stężenia insuliny i peptydu C stwierdza się w stanach głodzenia i w różnych chorobach przebiegających z uszkodzeniem mięszu trzustki.

Tabela 2. Wskazania do wykonania oznaczeń peptydu C

- 1) Ocena resztkowego wydzielania komórek β w: świeżo rozpoznanej cukrzycy typu 1, świeżo rozpoznanej cukrzycy typu LADA*, w przewlekłym zapaleniu trzustki przebiegającym z uszkodzeniem mięszu;
- 2) Diagnostyka tolerancji glukozy (prawidłowa/nieprawidłowa/cukrzyca typu 2.);
- 3) Diagnostyka stanów hipoglikemicznych (przerost mięszu trzustki/*insulinoma*);
- 4) Podejrzanie wstrzykiwania insuliny (psychogenne) celem wywołania hipoglikemii;
- 5) Diagnostyka endogennej funkcji przeszczepionej trzustki.

* Utajona cukrzyca u dorosłych o podłożu autoimmunologicznym.

Charakterystyka strukturalna i efekty komórkowe peptydu C

Peptyd C (składa się z 31 aminokwasów) pochodzi ze środkowej części proinsuliny i u poszczególnych ssaków różni się kilkoma aminokwasami. Peptyd C wiąże się ze specyficznym dla siebie receptorem w błonie komórkowej (prawdopodobnie powiązanym z układem białek G), który to receptor nie posiada żadnej zdolności krzyżowej wiązania innych hormonów. Całkowita saturacja receptora występuje już przy stężeniu peptydu równym 0,9 nM, a więc w granicach stężenia fizjologicznego. Ten fakt może wyjaśniać brak efektów działania peptydu C u ludzi, którym podawano stosunkowo wysokie dawki peptydu i na tej podstawie oceniano, iż peptyd C nie ma specyficznego działania biologicznego.

Dopiero w ostatnich latach w warunkach eksperymentalnych stwierdzono, że peptyd C:

- 1) indukuje fosforylację kinazy białkowej aktywowanej mitogenami (MAPK);
- 2) stymuluje aktywność Na^+/K^+ -ATPazy w błonach komórkowych różnych tkanek *in vitro* i *in vivo*;
- 3) indukuje uwalnianie NO (tlenku azotu) z komórek śródbłonna;

4) *in vitro* w kilku tkankach stwierdzono też przyspieszenie obrotu glukozy, ale bez udziału receptora insulinowego w tym działaniu.

Znaczenie peptydu C u osób chorych na cukrzycę typu 1

W ciągu ostatnich kilku lat ukazały się prace świadczące o potencjalnym znaczeniu peptydu C w powstawaniu przewlekłych powikłań w cukrzycy.

Podawanie peptydu C zwierzętom z cukrzycą doświadczalną wyraźnie poprawiało przewodnictwo w nerwach obwodowych, a podanie peptydu C już po ujawnieniu zmian cukrzycowych w nerwach obwodowych u szczurów z cukrzycą streptozocynową (neuropatia obwodowa) poprawiało przewodnictwo nerwowe o ok. 70%. Badania K. Ekberga i wsp. (2003) pokazały, że podawanie pepty-

du C przez 3 miesiące pacjentom z cukrzycą typu 1. trwającą 10 lat odwróciło w ok. 80% zaburzenia neuropatii czuciowej i ruchowej.

Ostatnio, opublikowano wyniki wpływu podawania peptydu C na strukturę i funkcje nerek w cukrzycy. W eksperymentach na zwierzętach stwierdzono, że podanie peptydu C obniżało hiperfiltrację i wydalanie albumin z moczem. B-L Johansson w roku 2000 przedstawił pierwszą pracę, w której chorym z cukrzycą podawano peptyd C i insulinę przez 3 miesiące. Takie postępowanie doprowadziło do zmniejszenia mikroalbuminurii o 40%, efekt ten nie był zależny od kontroli glikemii i kontroli ciśnienia tętniczego.

Podsumowanie

Pomiary stężenia peptydu C zarówno w warunkach na czczo, jak i w testach sty-

mulujących funkcję sekrecyjną komórek β wysp Langerhansa są obecnie uznawane metodą diagnostyczną w ocenie zaburzeń gospodarki węglowodanowej. Badania ostatnich lat pokazały, iż deficyt peptydu C u osób z cukrzycą typu 1. może mieć istotny wpływ na powstawanie przewlekłych powikłań cukrzycy. Tak więc, po prawie 40 latach od odkrycia peptydu C, obecnie jest wiele dowodów na jego specyficzną aktywność biologiczną i perspektywę jego zastosowania nie tylko do diagnostyki zaburzeń sekrecji insuliny.

⁽¹⁾ Oznaczenia peptydu C metodą elektrochemiluminescencji wykonano na aparacie ELECSYS 1010 (Roche Diagnostics) w Pracowni Naukowej Kliniki Endokrynologii AM w Warszawie; Kierownik: dr Z. Bartoszewicz.

⁽²⁾ Piśmiennictwo dostępne u autora.

Rola badań laboratoryjnych w rozpoznawaniu zaburzeń równowagi kwasowo-zasadowej

Józefa Lorenc, Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Dla prawidłowej oceny stanu równowagi kwasowo-zasadowej (rkz) organizmu i rozpoznawania istniejących zaburzeń niezbędne są oprócz badania lekarskiego chorego następujące grupy badań laboratoryjnych:

- badanie gazometryczne krwi tętniczej lub arterializowanej krwi włosniczkowej,
- oznaczenie stężenia podstawowych elektrolitów surowicy (sód, potas, chlorki),
- wyliczenie luki anionowej,
- oznaczenie stężenia hemoglobiny krwi (dla prawidłowego wyliczenia nadmiaru/niedoboru zasad BE),
- oznaczenie stężenia albumin w surowicy.

W wybranych stanach wskazane jest także oznaczenie stężenia wapnia zjonizowanego. Wymieniony pełny zestaw badań laboratoryjnych, wykonany z zapewnie-

niem bardzo wysokiej wiarygodności analitycznej, umożliwia nie tylko prawidłowe rozpoznanie istniejących zaburzeń, lecz jest także niezbędną pomocą we właściwej terapii oraz jej monitorowaniu.

Przemiana materii jest potencjalnym źródłem zarówno lotnych, jak i nielotnych kwasów, a także zasad, które byłyby zagrożeniem dla zachowania homeostazy w zakresie izohydrii, tj. równowagi dla pH w środowisku wewnątrz- i pozakomórkowym. Dla utrzymania tej równowagi organizm dysponuje następującymi mechanizmami obronnymi:

- bufony zewnątrzkomórkowe, głównie wodorowęglanowy,
- bufony środowiska wewnątrzkomórkowego,
- płuca i nerki.

Pełne wykorzystanie buforów środowiska wewnątrzkomórkowego wymaga 2–3

godzin i może powodować przesunięcia jonów, głównie potasu, pomiędzy poszczególnymi przestrzeniami płynowymi organizmu (transmineralizację). Wykorzystanie w pełni układu oddechowego, regulującego zawartość CO_2 w organizmie, następuje w czasie od 12 do 20 godzin. Natomiast nerki, których rola polega przede wszystkim na reabsorpcji prze-filtrowanych HCO_3^- oraz na wydalaniu jonów H^+ w postaci NH_4^+ i wytwarzaniu kwaśności miareczkowej, organizm uruchamia w pełni w ciągu 2 dni. Znajomość tych danych jest niezbędna do oceny stopnia wyrównania zaburzeń rkz. Kliniczny podział zaburzeń rkz wyróżnia zaburzenia proste, tj. wyrównane, oraz znacznie częściej występujące zaburzenia mieszane. Podstawą takiego podziału jest właściwa ocena wyrównania, w której uwzględnia

się także czas trwania zaburzenia konieczny dla pełnego uruchomienia odpowiednich mechanizmów obronnych.

Zaburzenia proste, do których zalicza się: Zaburzenia oddechowe:

- kwasica i zasadowica oddechowa w postaci ostrej lub przewlekłej
- Zaburzenia metaboliczne:
- kwasica metaboliczna z prawidłową lub z poszerzoną luką anionową
- zasadowica wrażliwa na chlorki (*chloride-responsive*) lub oporna na chlorki (*chloride-resistant*).

Wyrównanie zaburzeń oddechowych oblicza się na podstawie wielkości zmian zmiennej wtórnej – zależnej ($\uparrow$ lub $\downarrow$), tj. $\Delta [\text{HCO}_3^-]$, będącej funkcją zmian P_{CO_2} , tj. zmiennej pierwotnej – niezależnej ($\uparrow\uparrow$ lub $\downarrow\downarrow$).

Przewlekła kwasica oddechowa:

$\Delta [\text{HCO}_3^-] \uparrow \pm 1 \text{ mEq/l} = 0,4 \times \Delta P_{\text{CO}_2} \uparrow\uparrow$; wartość graniczna dla wyrównania wynosi 45 mEq/L; długo trwająca przewlekła kwasica oddechowa wyrównana, czyli prosta, może niekiedy charakteryzować się prawidłowym pH.

Przewlekła zasadowica oddechowa:

$\Delta [\text{HCO}_3^-] \downarrow \pm 1 \text{ mEq/l} = 0,5 \times \Delta P_{\text{CO}_2} \downarrow\downarrow$; wartość graniczna dla wyrównania wynosi 12 mEq/L; prostą zasadowicę oddechową charakteryzuje powrót pH do wartości prawidłowych.

W przypadku zaburzeń metabolicznych oblicza się zmianę ΔP_{CO_2} ($\downarrow$ lub $\uparrow$) zależną od wielkości zmian $\Delta [\text{HCO}_3^-]$, zmiennej pierwotnej ($\downarrow\downarrow$ lub $\uparrow\uparrow$).

Kwasica metaboliczna:

$\Delta P_{\text{CO}_2} \downarrow \pm 2 \text{ mm Hg} = 1,2 \times \Delta [\text{HCO}_3^-] \downarrow\downarrow$; wartość graniczna dla wyrównania wynosi 10 mm Hg; w prostej, tj. wyrównanej, kwasicy metabolicznej pH nie normalizuje się.

Zasadowica metaboliczna:

$\Delta P_{\text{CO}_2} \uparrow \pm 2 \text{ mm Hg} = 0,6 \times \Delta [\text{HCO}_3^-] \uparrow\uparrow$; wartość graniczna dla wyrównania 55 mm Hg; prostą zasadowicę metaboliczną nie charakteryzuje prawidłowe pH.

Wynik badania wskazujący na zaburzenie metaboliczne lecz zawierający prawidłową wartość pH z założenia wskazuje na obecność zaburzenia mieszanego.

Zaburzenia mieszane mogą być oddechowo-metaboliczne, np. u chorego z przewlekłą zaawansowaną niewydolnością nerek (kwasica metaboliczna z posze-

rzoną luką anionową) i zapaleniem płuc (zasadowica oddechowa); mieszane metaboliczne u chorego z kwasicą ketonową i obfitymi wymiotami, które wywołały zasadowicę metaboliczną. Gdyby wymienione powyżej zmiany wystąpiły u chorego z niewydolnością oddechowo-krążeniową, możliwe byłoby współistnienie dodatkowo przewlekłej kwasicy oddechowej, tj. obecność zaburzenia złożonego, często zwanego „zaburzeniem potrójnym”.

Peter A. Stewart^(1,2) do pierwotnych przyczyn zaburzeń rzk, tj. zmiennych niezależnych, zalicza poza P_{CO_2} i osoczwymi zasadami buforującymi, które określa jako *Strong Ion Difference* (SID), także całkowite stężenie nietlotnych słabych kwasów, głównie albuminy oraz nieorganiczne fosforany osocza. Podział zaburzeń rzk wg Stewarta jest następujący:

Zaburzenia oddechowe, wywołane

- hipokapnię – pierwotna zasadowica oddechowa,
- hiperkapnię – pierwotna kwasica oddechowa.

Zaburzenia nieoddechowe – metaboliczne, wywołane

- zmianami zasad buforujących:
 - wzrost stężenia → zasadowica,
 - zmniejszenie stężenia → kwasica;
- niedoborem / nadmiarem wody:
 - zagęszczenie → zasadowica,
 - rozcieńczenie → kwasica;
- zmianami izotonii:
 - hipochloremia → zasadowica,
 - hiperchloremia → kwasica;
- wzrostem stężenia kwasów organicznych → kwasica z poszerzoną luką anionową.

Przyczyną zaburzeń metabolicznych mogą być także zmiany stężenia nietlotnych słabych kwasów. Ich zmniejszenie wynikające z hipoalbuminemii może być

przyczyną zasadowicy; natomiast zwiększenie wskutek hiperalbuminemii lub hiperfosfatemii wywołuje kwasicę.

Uwzględniając ilości wydalanych z moczem chlorków wyróżnia się:

- zasadowicę metaboliczną z małym wydalaniem chlorków z moczem, tj. poniżej 10 mmol/L (*chloride responsive*), np. u chorych z utratą znacznej ilości soku żołądkowego lub leczonych intensywnie diuretykami, u których udaje się wyrównać te zaburzenia rzk podawaniem płynów bogatych w chlorki;
- zasadowicę metaboliczną z wydalaniem chlorków w ilości powyżej 20 mmol/L (*chloride resistant*), np. u chorych z nadmiernym wydzielaniem mineralokortykoidów i znaczną hipokaliemią (zespół Conna, zespół Barttera), u których konieczne jest przede wszystkim wyrównanie niedoboru potasu.

Z uwagi na wartość stężenia chlorków i wielkość luki anionowej wyróżnia się dwie postacie kwasicy nieoddechowej – metabolicznej:

- kwasica z normalną luką anionową i hiperchloremią, uwarunkowana utratą zasad, np. u chorych z nerkową kwasicą kanalikową typu 2. lub z powodu biegunk,
- kwasica z poszerzoną luką anionową i normochloremią, uwarunkowana zmniejszonym wydalaniem kwasów przez nerki, np. u chorych z niewydolnością nerek, lub kwasica ketonowa czy mleczanowa, spowodowane wzmożoną syntezą mocnych związków organicznych.

Prawidłowe rozpoznanie zaburzeń rzk i ustalenie zasad postępowania terapeutycznego opiera się na badaniu lekarskim i badaniach laboratoryjnych. Już dane z badania podmiotowego mogą sugerować rodzaj zaburzeń, np. uporczywe wy-

Przyczyny zaburzeń metabolicznych wg Stewarta

Zasadowica:

wzrost stężenia zasad buforujących,
deficyt chlorków,
hipokaliemia,
hipoalbuminemia,
odwodnienie (zagęszczenie).

Kwasica:

wzrost stężenia mocnych jonów organicznych,
zmniejszenie stężenia zasad buforujących,
hiperchloremia,
hiperalbuminemia,
hiperfosfatemia,
przewodnienie (rozcieńczenie).

miotą wystąpienie zasadowicy metabolicznej; podobnie stwierdzony badaniem przedmiotowym stan odwodnienia. Lecz do całościowej oceny rodzaju i stopnia zaawansowania zmian konieczne są następujące badania laboratoryjne wykonane jednocześnie: badanie gazometryczne we krwi tętniczej lub arterializowanej krwi włosniczkowej, oznaczenie sodu, potasu i chlorków oraz albumin w surowicy, stężenie hemoglobiny we krwi.

Wyniki badania gazometrycznego pozwalają na ocenę nie tylko równowagi kwasowo-zasadowej, lecz także gospodarki tlenowej w organizmie, dlatego tak ważne jest pobranie właściwego materiału do badania i ścisłe przestrzegania warunków anaerobowych. Krew włosniczkowa może zastąpić krew tętniczą tylko wówczas, jeśli spowoduje się, przez właściwe ogrzanie miejsca pobrania, przyspieszenie przepływu krwi przez włosniczki, tj. wystąpienie przekrwienia czynnego. Bowiem przekrwienie bierne wywołuje zastój krwi, co dyskwalifikuje ją do badania gazometrycznego. Parametry oznaczane w tym badaniu to: pH, P_{CO_2} , P_{O_2} ; wyliczane: HCO_3^- , BE. Jednakże do prawidłowego wyliczenia nadmiaru/niedoboru zasad (BE) konieczne jest oznaczenie stężenia hemoglobiny we krwi. Wartość BE jest składową wzoru Möllemgaarda – Astrupa, według którego można obliczyć wielkość dawki koniecznej do wyrównania istniejących zmian:

$$\begin{aligned} & \text{niedobór } HCO_3^- \text{ (mEq/L)} \\ &= BE \times 0,3 \times \text{masa ciała (kg)} \end{aligned}$$

U chorego ze znaczną niedokrwistością, przykładowo stężeniem hemoglobiny równym 5,0 g/dL i kwasicią metaboliczną, niedobór zasad będzie prawie dwukrotnie mniejszy niż u chorego z takim samym stanem zaburzeń rzk lecz bez niedokrwistości (Hb 15,0 g/dL). Brak uwzględnienia tej zależności, w trakcie prowadzenia terapii może być przyczyną niebezpiecznego wywołania u chorego z kwasicią metaboliczną, w stosunkowo krótkim czasie, stanu zasadowicy.

Oznaczenie stężenia sodu, chlorków i potasu jest bardzo ważną składową badania stanu równowagi kwasowo-zasadowej i bezwzględny warunkiem prawidłowego leczenia. Kwasicy metabolicznej, głów-

Propozycja pełnego wyniku badania równowagi kwasowo-zasadowej:

● pH	7,521	● Na	141 mmol/L
● PC_{CO_2}	48,0 mm Hg	● K	3,82
● P_{O_2}	62,0 mm Hg	● Cl	89,0
● HCO_3^-	38,0 mEq/L	● Hb	14,9 g/dL
● BE	+ 13,2	● albuminy	30,0 g/L
● Sat. O_2	93,6 %	● Ca zjonizowany	0,90 mmol/L
● AG	14,0 mEq/L		

Wniosek: Zasadowica metaboliczna prosta z możliwością wystąpienia drgawek tężyczkowych. Bez epikryzy (związanych danych klinicznych) pełny wniosek diagnostyczny jest niemożliwy.

nie ketonowej – cukrzycowej, towarzyszy hiperkaliemia będąca wynikiem buforowania wewnątrzkomórkowego i transmineralizacji, którą stymuluje dodatkowo niedobór insuliny. Normokaliemia u chorego ze znaczną kwasicią wskazuje na niedobór potasu w organizmie. Zasadowicę metaboliczną charakteryzuje hipokaliemia, która może być jej przyczyną, jak też wynikiem buforowania wewnątrzkomórkowego. Tę zależność ustalono ilościowo: zmianie pH o 0,10 towarzyszy zmiana kaliemii średnio o 0,6 mEq/L (0,3–1,3).

Zatem u chorego z pH 7,1 stężenie potasu w surowicy 4,1 mEq/L jest sygnałem ostrzegawczym!! (winno być co najmniej 5,5 mEq/L). Przykład ten potwierdza konieczność bardzo wysokiej wiarygodności analitycznej wykonywanych badań, bowiem niebezpiecznym błędem jest wykonanie tych oznaczeń w surowicy, nawet ze śladami hemolizy.

Lukę anionową (anion gap AG) wylicza się ze wzoru:

$$AG = Na^+ - (Cl^- + HCO_3^-)$$

Jest ona istotną cechą kwasicy metabolicznej i wykazuje ujemną korelację ze stężeniem wodorowęglanów. Wzrostowi luki anionowej (ΔAG) o 1 mEq/L towarzyszy zmniejszenie stężenia HCO_3^- (ΔHCO_3^-) o 1 mEq/L. Jeśli $\Delta AG > \Delta HCO_3^-$ wskazuje to na obecność zaburzenia mieszanego – kwasicy z poszerzoną luką anionową i zasadowicy ($AG = 20$ mEq/L, $HCO_3^- = 25$ mEq/L).

Piśmiennictwo:

1. Stewart Peter A.: *Modern quantitative acid-base chemistry*. Can. J. Physiol. Pharmacol. 61: 1444–1461, 1983.
2. Fenel V., Leith D.E.: *Stewart's quantitative acid-base chemistry: Applications in biology and medicine*. Respir. Physiol. 91: 1–16, 1993.



cobas b 121

Porównanie automatycznego liczenia leukocytów w płynie mózgowo-rdzeniowym z metodą tradycyjną

przy wykorzystaniu analizatora hematologicznego SYSMEX XE-2100, cz. II

cd. z poprzedniego numeru

Badanie wpływu tła

Bezwzględny wpływ tła dla leukocytozy liczonej na XE-2100 w kanałach DIFF i WBC-Baso zmierzono dla trzech próbek pełnej krwi w podwójnej próbie, przy czym każdy pomiar został poprzedzony 3 pomiarami tła w pustych kanałach pomiarowych a wyniki zostały przedstawione w Tabeli 3. Wyniki wykazały wyższość kanału DIFF. Metodą Brouthtona wyliczono proporcjonalny wpływ dla obu kanałów, który wyniósł 0,0% dla próbki PMR: o dużej (180 kom/μL) i małej (1 kom/μL) leukocytozie.

Tabela 3. Całkowity wpływ tła na wyniki leukocytozy w kanałach pomiarowych XE-2100

cytoza	kanał DIFF (komórek/μL)					kanał WBC/BASO (komórek/μL)				
	próbka	próbka	tło 1	tło 2	tło 3	próbka	próbka	tło 1	tło 2	tło 3
wysoka	189.992	190.034	74	0	0	188.128	187.086	74	1	3
prawidłowa	5.008	4.995	1	0	0	5.198	5.222	5	5	4
niska	1.826	1.801	0	0	1	1.897	1.778	1	11	5

Tabela prawdopodobieństwa fałszywego odrzucenia

Prawdziwie prawidłowe i prawdziwie patologiczne wyniki leukocytozy w metodzie referencyjnej w porównaniu do pomiarów z kanałów DIFF i WBC-Baso dla wszystkich 226 próbek PMR zostały przedstawione w Tabeli 4.

Tabela 4. Prawdopodobieństwo fałszywego odrzucenia wyników z kanałów pomiarowych XE-2100 i wyników uzyskanych metodą referencyjną

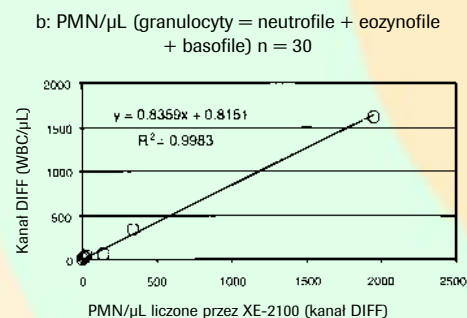
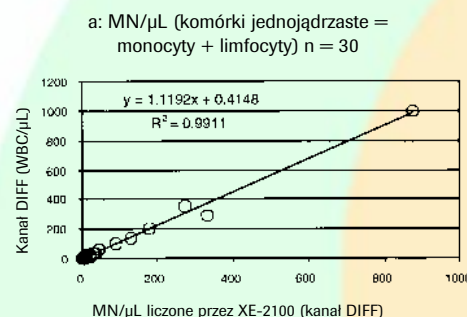
	kanał DIFF		kanał WBC/BASO	
	WBC >4 komórek/μL	WBC >5 komórek/μL	WBC >4 komórek/μL	WBC >5 komórek/μL
WBC > 4 komórki /μL	próbka zgodna 84/226 100%	próbka niezgodna 0/226 0%	próbka zgodna 82/226 97%	próbka niezgodna 2/226 3%
WBC > 4 komórki /μL	próbka niezgodna 24/226 17%	próbka zgodna 118/226 83%	próbka niezgodna 101/226 71%	próbka zgodna 41/226 29%

Metoda referencyjna wykazała, że w 84 z 226 próbek wartość odcięcia przekraczała 4 komórki w μL. Kanał DIFF nie zawierał żadnych niepoliczonych próbek i fałszywych wyników, czyli zgodność dla nieprawidłowych próbek osiągnęła 100%. Natomiast kanał WBC-Baso wykazał fałszywe wyniki dla 2 prawidłowych próbek zatem zgodność dla próbek patologicznych wyniosła 97%.

Metoda referencyjna wykazała 142 prawidłowe próbki z punktem odcięcia < 5 komórek/μL. Znajdowały się tam 24 fałszywie policzone leukocytozy przez

Porównanie różnicowania leukocytów

Krzywe regresji (n=30) dla PMN komórek/μL i MN komórek/μL między wynikami różnicowania mikroskopowego i różnicowania z kanału XE-2100 DIFF są przedstawione na wykresach 2 a, b. Uzyskano znakomitą korelację dla PMN i MN – $R^2 = 0,99$.



Wykres 2 a, b: Krzywe regresji dla różnicowania leukocytów na komórki PMN /μL i komórki MN /μL dla metody manualnej i pomiarów w kanale DIFF analizatora XE-2100

DYSKUSJA I WNIOSKI

Manualne liczenie cytozy płynu mózgowo-rdzeniowego pod mikroskopem jest czasochłonne, wyczerpujące, subiektywne i często nieprecyzyjne, ale pozostaje złotym standardem według zaleceń NCCLS. Obecnie, w pełni zautomatyzowane analizatory łączą w swojej pracy wymagania czasowe poprzez szybkość pomiarów i ja-



kość, a poza tym są obiektywne. Do dziś nie były dostępne specyficzne, zautomatyzowane systemy do liczenia komórek w PMR. Dla takiego systemu konieczne są określone wymagania, aby pomiary były precyzyjne, szczególnie na poziomie decyzyjnym 4 komórek/ μL oraz aby różnicować leukocyty na PMN i MN. Na podstawie tych wymagań i badań wdrożeniowych zalecamy stosowanie analizatora hematologicznego Sysmex XE-2100 z jego odmiennymi kanałami pomiarowymi i różnicującymi leukocyty w rutynowych badaniach PMR.

W 226 próbkach PMR, reprezentatywnych dla rutynowych badań laboratoryjnych, dokonaliśmy pomiarów wartości leukocytozy w kanałach DIFF i WBC/Baso XE-2100, a uzyskane wyniki porównywaliśmy z liczeniem manualnym z zastosowaniem komory Fuchsa-Rosenthala.

Porównanie wyników pomiarów z kanału DIFF z metodą referencyjną wykazało, że były one wyższe niż z kanału WBC-Baso na wszystkich trzech badanych poziomach (0–3000/ μL , 0–50/ μL , 51–1000/ μL), ale głównie w zakresie o znaczeniu klinicznym wynoszącym 0–50 / μL . Metoda referencyjna wykazała małą korelację z wynikami leukocytozy liczonymi w kanale WBC/Baso, gdyż często zgłaszane by-

ły przez analizator wyniki fałszywie zwiększone.

Zostały również sprawdzone linioowość, precyzja i interferencje. Uzyskane wyniki wskazują, że kanał DIFF w analizatorze XE-2100 jest lepszy od kanału WBC-Baso w pomiarach cytozy dla PMR, a wyniki z tego kanału mogą być uznane za zadowalające. Te dane dowodzą, że w kanale DIFF nie ma żadnych interferencji (np.: pęcherzykami powietrza, brudem, itp.) mających wpływ na wynik pomiaru. Z tego powodu nasza standardowa procedura zaleca wykorzystanie kanału DIFF do pomiarów leukocytozy w PMR, poprzedzając każdorazowo pomiar próbki pacjenta 1–2 pomiarami tła oraz zastosowaniem oprogramowania XE-PRO.

Tabela prawdopodobieństwa fałszywego odrzucenia (prawdziwie prawidłowe i prawdziwie patologiczne wyniki) wykazała zawyżone wyniki pomiarów z kanału DIFF dla leukocytozy $> 4/\mu\text{L}$. Nie było tam fałszywie prawidłowego wyniku pomiaru leukocytozy i żadnego przykładu patologicznej pleocytozy. Dla zakresu decyzyjnego cytozy $< 5/\mu\text{L}$ otrzymaliśmy w kanale DIFF 24 wyniki zawyżone (17%). Dużo gorsza sytuacja jest w kanale WBC-Baso. W obu metodach istnieje możliwość popełnienia błędu poprzez za-

wyżenie liczby leukocytów w decydującym zakresie cytozy $< 5/\mu\text{L}$. Fakt ten należy uwzględnić przy interpretacji danych przez klinicystę.

Różnicowanie leukocytów na granulocyty – PMN i komórki jednojądrzaste – MN w kanale DIFF wykazało dobrą korelację z wcześniejszymi analizami mikroskopowymi różnicującymi leukocyty. Wyniki te są obiecujące, jakkolwiek liczba porównanych próbek jest niewielka ($n=30$) i dlatego te badania będą poszerzone. Z klinicznego punktu widzenia kanał DIFF w XE-2100 daje wyniki cytozy w PMR na tyle zadowalające i o dostatecznej jakości, aby w oparciu o uzyskane wyniki wdrożyć odpowiednie leczenie pacjenta.

Piśmiennictwo:

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS): Reference leukocyte count in CSF: Approved standard NCCLS document H20-A, Villanova, PA, 1992.
2. Sysmex Announces FDA Clearance of Body Fluids Application on Its Automated Hematology Analyser XE-2100. PR Newswire:03/26/04,10:00a (Copyright© 2004, PR Newswire).
3. Worofka B., Lassman J., Bauer K., Kristoferitsch W. *Praktische Liquordiagnostik*. Springer, Wien 1997.
4. Stamminger G., Auch D., Diem H., Sinha P.: Performance of the XE-2100 Leukocyte differential. *Clin Lab Haem*.24: 271–280, 2002.
5. Passing H., Bablock W.: A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. *Clin Chem Clin Biochem*, 21: 709–720, 1983.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS): Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurements Procedures; A Statistical Approach: Approved Guideline EP6-A. Wayne, PA, USA, 2003.
7. Guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leukocyte and reticulocyte counting and cell marker applications. International Committee for Standardization in Hematology (ICSH), 16: 173, 1994.

Nadchodzi cobas 6000

Dobiega końca rok 2005. Nie jest to jednak koniec promocji marki **cobas** i wdrażania produktów objętych tą marką. Rok 2006 będzie poświęcony nowemu systemowi analitycznemu **cobas 6000**.

Roche Diagnostics jest pionierem we wdrażaniu zintegrowanych systemów analitycznych. Modular *Analytics* SWA jest pierwszym systemem łączącym aparaty wykonujące oznaczenia z dziedziny chemii klinicznej i immunodiagnostyki. Korzystając z dotychczasowych doświadczeń firma Roche Diagnostics rozszerza ofertę systemów zintegrowanych o nowy produkt – **cobas modular platform**.

Platformy analityczne **cobas** łączą w sobie najlepsze cechy znanych i sprawdzonych systemów Modular *Analytics* i Cobas INTEGRA. Modułową koncepcję budowy, ideę jednostki łączącej oraz filozofię oprogramowania Modular połączono z prostotą obsługi i koncepcją kaset odczynnikowych zaczerpniętą z systemów Cobas INTEGRA. Platformy analityczne **cobas** oferować będą Użytkownikowi szeroki panel oznaczeń biochemicznych i immunochemicznych opartych o dwa rodzaje odczynników Cobas INTEGRA i Elecsys. Wszystkie systemy zintegrowane **cobas** zarządzane będą jednym wspólnym oprogramowaniem.

Począwszy od roku 2006 w ofercie Roche Diagnostics znajdą się platformy analityczne **cobas 4000**, **6000** i **8000**. Pierwszy na rynku pojawi się **cobas 6000**. W platformie analitycznej **cobas 6000** zastosowano nowy moduł biochemiczny **cobas c 501**. Moduł immunochemiczny to E 170, który zmieni swą nazwę na **cobas e 601**. **Cobas 6000** dostępny będzie w siedmiu konfiguracjach, począwszy od pojedynczego modułu biochemicznego lub immunochemicznego do kombinacji trzech różnych modułów. Transportem prób badanych wewnątrz modułów i między nimi zarządza nowa jednostka łącząca Core Unit 150.

Zastosowanie mieszania ultradźwiękowego wyeliminowało ryzyko przeniesienia (kontaminacji) podczas mieszania próbek badanych z odczynnikiem. Czujnik skrępow sygnalizuje błąd pipetowania spowo-



cobas 6000

dowany niewłaściwym przygotowaniem próbki. Możliwe jest automatyczne podawanie kaset odczynnikowych podczas pracy analizatora. Z kolei funkcja **cobas link** umożliwia stały bezpośredni dostęp (*on-line*) do danych aplikacyjnych, kalibracyjnych, wartości należnych kontroli. Podobnie, jak w analizatorach Cobas INTEGRA możliwe jest oznaczanie HbA1c w krwi pełnej. Funkcja indeksy surowicze (*serum indices*) umożliwia wnioskowanie czy na oznaczony parametr ma wpływ hemoliza, bilirubinemia czy lipemia.

Pojedynczy moduł biochemiczny **cobas 6000** dysponuje 60 chłodzonymi miejscami odczynnikowymi dla 60 różnych testów oraz wbudowanymi elektrodami jonoselektywnymi (ISE). Wydajność wynosi ok. 600 oznaczeń fotometrycznych na godzinę, z ISE do 1000 oznaczeń w ciągu godziny. Moduł immunochemiczny zawiera 25 miejsc na odczynniki, a jego wydajność maksymalna wynosi do 170 oznaczeń na godzinę. Jednorazowo można podać do 150 prób badanych, z możliwością stałego dostawiania oraz rozcieńczeń, powtórek i *reflex testing*. Sze-

rokie menu, koncepcja kaset odczynnikowych i budowa platformy analitycznej **cobas 6000** daje możliwość skonsolidowania ponad 90% pracy rutynowej laboratorium w jednym systemie analitycznym.

Zgodnie z maksymą „każdy może mieć swojego **cobasa**” dla Użytkowników, którym liczba oznaczeń uniemożliwia posiadanie systemu **cobas 6000** firma Roche Diagnostics przygotowała propozycję platformy analitycznej **cobas 4000**. Analizator ten stanowi wirtualne połączenie nowego modułu biochemicznego **cobas c 311** z modulem immunochemicznym **cobas e 411**, będącym następcą sprawdzonego systemu Elecsys 2010, oferując wszystkie zalety platform analitycznych **cobas**. W systemie zastosowano w mieszanie ultradźwiękowe, czujnik skrępow, **cobas link**, możliwość oznaczania HbA1c z krwi pełnej, wyposażony jest w funkcję *serum indices*, a wszystko to w oparciu o kasety odczynnikowe Cobas INTEGRA i odczynniki Elecsys z oprogramowaniem wspólnym dla wszystkich systemów **cobas**.

Polecamy nowoczesne rozwiązania technologiczne.



ACCU-CHEK® Active

**Sprawdzona jakość
– stylowe wzornictwo**

- Szybki pomiar – wynik już po 5 sekundach*
- Bezpieczeństwo – łatwy w obsłudze test paskowy
- Mała próbka krwi – 1-2 µl
- Małe wymiary – pełna dyskrecja

Wielej! Gumowana obudowa gwarantuje pewny chwyt

*około

Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o.
ul. Wybrzeże Gdynskie 68, 01-531 Warszawa
tel. 022 481 55 55, fax 022 481 55 94
www.accu-chek.pl

Bezpłatna infolinia 0-800 401 061

ACCU-CHEK®
Ciesz się życiem. Tak jak chcesz.