

cobas

Life needs answers



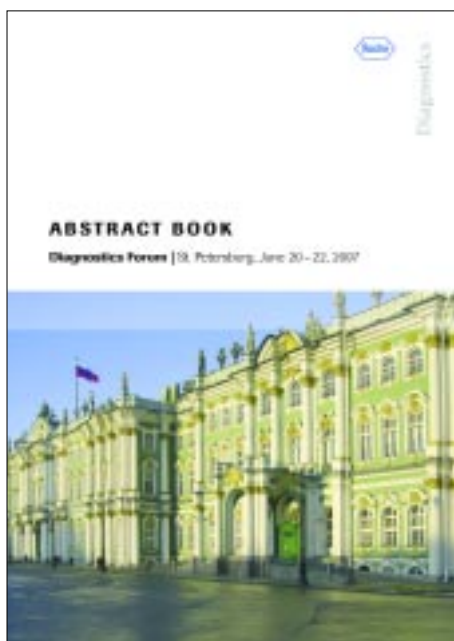
ISSN 1644-8448
nakład: 1000 egz.

Nr
32

LabForum

III Międzynarodowe Forum IVD
w St. Petersburgu





Streszczenia wykładów dostępne na stronach internetowych www.rochediagnostics.pl

Forum IVD Spotkanie ekspertów diagnostyki laboratoryjnej w St. Petersburgu



Szanowni Państwo,

pragnę poinformować, że pod koniec czerwca w St. Petersburgu odbyło się III Forum Diagnostyki In Vitro. Rosnąca liczba uczestników potwierdza wysoki poziom zainteresowania tego typu interdyscyplinarną wymianą na arenie międzynarodowej. Forum zgromadziło w pierwszym roku 120 uczestników, podczas gdy obecnie w St. Petersburgu powitaliśmy 170 gości z 15 krajów. Dziesięciu mówców z Grecji, Niemiec, Polski, Republiki Czeskiej, Rosji, USA i Węgier prezentowało szeroki zakres tematów, od antykoagulantów po wizję Roche Diagnostics, od markerów biochemicznych po przyszłość technologii PCR, od testów diagnostycznych i AIDS po zintegrowane sieci opieki zdrowotnej. Inne kraje uczestniczące w Forum to Cypr, Estonia, Kazachstan, Litwa, Południowa Afryka, Rumunia, Słowacja i Słowenia.

Podczas inauguracyjnego wystąpienia dr Jürgen Schwiezer, Przewodniczący Rady Wykonawczej Roche Diagnostics GmbH Niemcy i Prezydent Regionu Europy, Bliskiego Wschodu i Afryki (EMEA) oraz Ameryki Południowej (LATAM) Działu Diagnostyki powiedział „Unia Europejska stale powiększa się, jej polityczne granice rozszerzają się, a Europa wspólnie rozrasta się. [...] Celem pierwszego Forum zorganizowanego dwa lata temu była poprawa jakości i wydajności systemu opieki zdrowotnej w Europie Centralnej i Wschodniej dzięki stworzeniu wspólnej platformy, co pozwoli ekspertom z różnych krajów na wymianę ich doświadczeń. Forum zostało wysoko ocenione przez naszych gości, a pozytywny oddźwięk, z jakim spotkaliśmy się, zachęcił nas do zorganizowania następnego spotkania i oto zbieramy się już po raz trzeci z rzędu. Jesteśmy niezmiernie szczęśliwi, że staliśmy się inicjatorem tego owocnego dialogu na temat przyszłości diagnostyki wśród ekspertów, których doświadczenia i punkty widzenia są tak różne, jak kraje, z których pochodzą.”

Życzę miłej lektury bieżącego numeru LabForum, w którym znajdą Państwo m.in. ciekawą informację o mechanizmie działania witaminy D oraz artykuł poświęcony jednemu z najbardziej popularnych parametrów diagnostycznych – szybkości opadania erytrocytów.

Spis treści:

Spotkanie ekspertów diagnostyki laboratoryjnej w St. Petersburgu	2
Witamina D – mechanizm działania, badania epidemiologiczne, zasady suplementacji	3–6
Wirus zapalenia wątroby typu B: wirusmia a odpowiedź na leczenie	7–8
Stosowanie świeżej krwi do kontroli jakości	9–14
XVII Europejski Kongres Chemii Klinicznej i Medycyny Laboratoryjnej w Amsterdamie	14–15

Z poważaniem,

Andrzej Banaszkiewicz
wraz z zespołem RDP

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

Witamina D – mechanizm działania, badania epidemiologiczne, zasady suplementacji

Elżbieta Karczmarewicz¹, Jacek Łukaszewicz², Roman S. Lorenc¹

Słowa kluczowe

Witamina D, 25(OH)D, absorpcja wapnia, złamania, upadki, nowotwory

Keywords

Vitamin D, 25(OH)D, calcium absorption, fractures, falls, cancer

Wstęp

W Europie Centralnej wielkość zaopatrzenia organizmu w witaminę D dzieci, młodzieży i osób starszych jest niewystarczająca. Wymagana jest suplementacja farmakologicznymi dawkami witaminy D₃ w celu optymalizacji statusu kostno-mięśniowo-nerwowego, co obniża ryzyko upadków i ryzyko złamań kości. Protekcyjny efekt właściwej podaży witaminy D względem innych chorób cywilizacyjnych takich, jak nowotwory, cukrzyca i schorzenia sercowo-naczyniowe, wymaga dalszych badań.

Budowa cząsteczki witaminy D

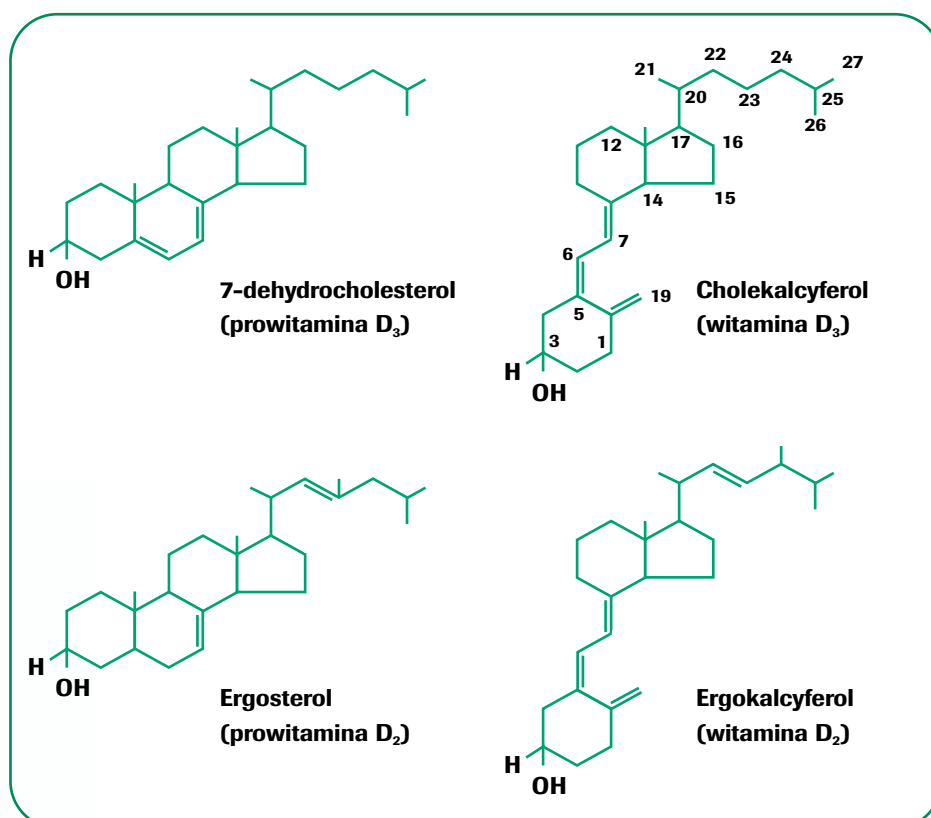
Witamina D i jej metabolity należą do grupy 9,10-sekosterydów. Związki te dzięki posiadaniu układu cis-trienowego mają charakterystyczne widmo absorpcyjne w ultrafiolecie z maksimum przy 264–265 nm.

Witamina D₂ (ergokalciferol, m.c.z. 396,7) występują w organizmach roślinnych, natomiast witamina D₃ (cholekalcyferol, m.c.z. 384,6) – w organizmach zwierzęcych. Różnią się one jedynie budową łańcucha bocznego (Rys. 1.).

Źródła witaminy D

Synteza skórna

Naturalnym i bezpiecznym źródłem witaminy D dla człowieka jest synteza skór-



Rysunek 1. Wzory witamin D₂ i D₃ oraz ich prekursorów.

na, która zachodzi pod wpływem promieniowania UVB (290–310 nm). W szerokości geograficznej Polski jest ona efektywna przez 3 godziny w marcu i wrześniu i przez 9 godzin w czerwcu i lipcu. Pod wpływem jednej dawki rumieniowej (ekspozycja 18% powierzchni ciała, do powstania lekkiego zaczerwienienia) następuje w skórze synteza około 10 000 jednostek (IU) witaminy D. Dostępne w Polsce solaria nie posiadają zazwyczaj lamp emitujących promieniowania 290–310 nm i powodują często katabolizm witaminy D.

Witamina D w produktach żywnościowych

Ze wszystkich naturalnych źródeł witaminy D najbogatszym jest tran. W zależności od pochodzenia może on zawierać od poniżej 1 IU witaminy D na 1 gram (sola szara) do 45 000 IU (tuńczyk). Dostępny w aptekach tran zawiera około 1000 IU witaminy D w objętości jednej łyżki stołowej. Znacznie mniej witaminy D zawierają produkty żywnościowe zwyczajowo spożywane w Polsce (Tabela 1.). Niektóre środki żywnościowe, a w szczególności odżywki dla dzieci i niemowląt, mleko czy tłuszcze jadalne, bywają dodatkowo wzbogacone w witaminę D.

¹ Zakład Biochemii i Medycyny Doświadczalnej, Instytut „Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka”, Al. Dzieci Polskich 20, 04-730 Warszawa

² Akademia Medyczna w Warszawie, Wydział Farmaceutyczny, Katedra Biochemii i Chemii Klinicznej, ul Banacha 1, 02-097 Warszawa

Tabela 1. Zawartość witaminy D w niektórych surowych produktach żywnościowych

Nazwa produktu	Zawartość witaminy D	
	$\mu\text{g}/100\text{ g}$	IU/100 g
Węgorz	25,6	1024
Sandacz	24,6	984
Śledź	15,4	616
Łosoś	12,4	496
Żółtko jajka	7,8	312
Tuńczyk	7,2	288
Dorsz	7,0	280
Jajko całe	2,8	112
Wątróbka, wołowina	0,8	32
Masło	0,3	12

Metabolizm witaminy D

Hydroksylacja w pozycji „25”

Pierwszym etapem aktywacji metabolicznej witaminy D jest podstawienie grupy hydroksylowej przy atomie węgla numer 25. Głównym miejscem, w którym zachodzi 25-hydroksylacja witaminy D, jest wątroba. Aktywność 25-hydroksylazy stwierdzono we frakcji mikrosomalnej i mitochondrialnej hepatocytów. Oba enzymy zawierają cytochrom P450 i należą do klasy oksydaz o mieszanej funkcji.

Hydroksylacja w pozycji „1”

Główną lokalizacją 1-hydroksylazy witaminy D są nerki, a dokładnie proksymalna i dystalna część kanalik 1-hydroksylaza, podobnie jak 25-hydroksylaza, jest enzymem zawierającym cytochrom P450 i znajdującym się w mitochondriach. Jej substratem jest witamina D hydroksylowana w pozycji 25. Aktywność 1-hydroksylazy witaminy D wykryto również w jelicie, osteoblastach, makrofagach, komórkach układu immunologicznego, reprodukcyjnego, prostaty oraz w wielu innych miejscach. Są to tak zwane hydroksylazy obwodowe, którym przypisuje się coraz większą rolę w oddziaływaniu witaminy D na organizm.

Hydroksylacja w pozycji „24”

Największą jej aktywność stwierdzono w nerce (kanalik proksymalny), chociaż spotykana jest także w innych komórkach. W nerce aktywność jej wzrasta wraz ze wzrostem zawartości $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ przy równoczesnym spadku aktywności 1-hydroksylazy.

droksylazy. Zawiera ona również cytochrom P450 i jest enzymem multikatalitycznym. Enzym ten jest ważnym czynnikiem kontrolującym wytwarzanie $1,25(\text{OH})_2\text{D}$.

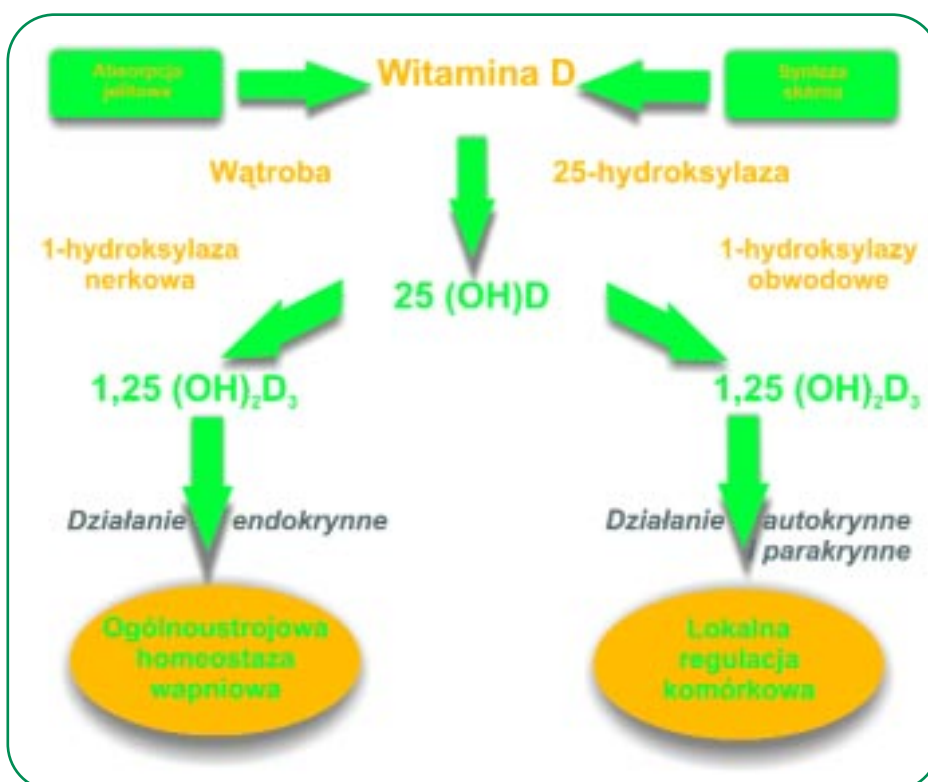
Działanie witaminy D

Witamina D działa za pośrednictwem specyficznych receptorów mających charakter typowych czynników transkrypcyjnych. Gen kodujący receptor witaminy D

znajduje się u człowieka na chromosomie 12q. Częsteczką receptora składa się z 427 aminokwasów. Mechanizm recepturowy umożliwia ekspresję funkcji regulacyjnej witaminy D ukierunkowanej zarówno na działanie w zakresie „klasycznym” (udział w regulacji homeostazy mineralnej organizmu), jak i „nieklasycznym” (poprzez receptory aktywnej formy witaminy D odkryte i nadal odkrywane w tkankach, narządach i komórkach nie związanych z gospodarką mineralną) (Rys. 2.). Gen kodujący białko receptora witaminy D (VDR) posiada szereg wariantów. Ich występowanie związane jest z efektywnością działania VDR. Aktualnie poszukuje się związków danego wariantu polimorficznego VDR z występowaniem takich schorzeń, jak osteoporoza czy różnego rodzaju nowotwory.

Udział witaminy D w regulacji gospodarki mineralnej organizmu człowieka – działanie klasyczne

Podstawową rolę hormonalnej formy witaminy D w utrzymaniu homeostazy mineralnej jest podwyższanie efektywności



Rysunek 2. Schemat metabolizmu i aktywacji witaminy D. Podkreślono różnice w działaniu witaminy D jako elementu układu endokrynnego oraz para- i autokrynnego.

jelitowej absorpcji wapnia i fosforanów. $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ zwiększa przenikanie wapnia do wnętrza enterocyta, zwiększa szybkość przepływu wapnia przez cytozol komórki oraz jego transfer przez błonę podstawną do układu krążenia. W podwyższaniu transportu fosforanów bierze udział zależny od witaminy D kotransporter sodowo-fosforanowy.

W przypadku kości witamina D niezbędna jest dla zapewnienia jej prawidłowej mineralizacji, przy czym czyni to poprzez zapewnianie właściwego stężenia wapnia i fosforanów w układzie krążenia. $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ jest również jednym z czynników stymulujących wytwarzanie przez osteoblasty kolagenu, na którym odkładają się nowe kryształy hydroksyapatytu. Jednak w obecności podwyższonych stężeń parathormonu (PTH) aktywna forma witaminy D stymuluje osteoblasty do wytwarzania cytokin pobudzających osteoklasty do wzmożonej resorpcji kości. Inne z wytworzonych przez osteoblasty cytokin powodują fuzję prekursorów osteoklastów i tworzenie dojrzałych osteoklastów. Ten kierunek działania witaminy D zwiększa stężenie wapnia i fosforanów w układzie krążenia związanych z resorpcją kości.

Kolejnym narządem biorącym udział w regulacji homeostazy mineralnej jest nerka. Wyprodukowana w nerce pod wpływem stymulacji PTH $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ poprzez receptory witaminy D znajdujące się w komórkach kanalików nerkowych hamuje swoją własną syntezę uruchamiając równocześnie 24-hydroksylazę, co prowadzi do zwiększenia produkcji $24,25(\text{OH})_2\text{D}$.

Kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy mineralnej odgrywają przytarczce. Poprzez zawarty w nich VDR aktywna forma witaminy D hamuje syntezę i wydzielanie PTH, którego synteza wzrasta w efekcie rozpoznawania przez właściwy receptor obniżenia się stężenia wapnia w układzie krążenia.

Działanie „nieklasyczne” witaminy D

Oprócz tkanek i narządów biorących udział w utrzymaniu homeostazy mineralnej, receptory witaminy D odkryto w bardzo wielu innych lokalizacjach. W niektórych z nich, jak np.: trzustka, nadnercza, tarczyca, przysadka, witamina D

pełni rolę regulatora ich czynności wydzielniczej. W pozostałych, do których należą komórki układu odpornościowego, krwiotwórczego, skóry, mięśni, komórki różnych nowotworów (czerniak, nowotwory piersi, prostaty, jelita grubego i inne), witamina D spełnia rolę czynnika indukującego różnicowanie i antyproliferacyjnego. Jest to między innymi wynik zatrzymania cyklu odnośnych komórek we wczesnej fazie podziału – G1.

W ostatnich latach stało się wiadomym, że oprócz nerki, wytwarzanie $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ z $25(\text{OH})\text{D}$ zachodzi również w szeregu innych miejscach. Keratynocyty, aktywowane makrofagi, komórki prostaty, gruczołu sutkowego, nabłonka jelitowego i wiele innych mogą także przeprowadzać tę reakcję. Wiadomo też, że przy braku funkcji nerek poziom $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ w układzie krążenia spada do wartości niewykrywalnych. Tak więc, jeżeli inne tkanki produkują hormonalną formę witaminy D, to najwidoczniej nie jest ona uwalniana do układu krążenia, ale działa lokalnie, wewnątrz komórki, w której powstała lub

w komórkach sąsiadujących. Tego rodzaju model działania $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ obejmuje regulację proliferacji i różnicowania się komórek oraz apoptozy. Implikacją tych auto- i parakrynnych działań witaminy D jest przekonanie, że regulacja wytwarzanej przez hydroksylazy obwodowe $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ odbywa się na szczeblu lokalnym, w miejscu jej powstawania i działania, niezależnie od ogólnoustrojowego układu zapewniającego homeostazę mineralną. Równocześnie działanie lokalne $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ byłoby ograniczone tylko do najbliższego otoczenia komórki i nie miałoby wpływu na homeostazę wapniową w skali całego organizmu. Wyjątkiem byłyby tu choroby takie, jak gruźlica, sarkoidoza przebiegające ze znaczną aktywacją limfocytów układu odpornościowego, które wyprodukowany przez swoje 1α -hydroksylazy aktywny metabolit witaminy D, wydzielają do układu krążenia. Pojawiająca się poza systemem regulacyjnym pula $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ prowadzi do zaburzenia gospodarki mineralnej i zagrożenia hiperkalcemią (Rys. 3.).



Rysunek 3. Rozszerzające się znaczenie fizjologiczne receptora witaminy D i jego ligandu.

Witamina D – badania epidemiologiczne, implikacje kliniczne

Lata 2005/2007 przyniosły podsumowanie wielu badań dotyczących:

1. metodologii oceny zaopatrzenia organizmu w witaminę D,
2. biorównoważności witaminy D₂ i D₃,
3. nowych zasad suplementacji,
4. epidemiologicznych konsekwencji niedoboru witaminy D.

Głównym parametrem oceny zaopatrzenia organizmu w witaminę D jest pomiar stężenia w surowicy jej metabolitu syntetyzowanego w wątrobie – 25-hydroksywitaminy D (25(OH)D). Istotnym postępem w tej dziedzinie jest wprowadzenie pierwszej w pełni automatycznej metody oznaczania poziomu 25(OH)D opartej na technologii immunochemiluminescencyjnej, która rokuje duże nadzieje odnośnie poprawy wiarygodności analitycznej tego parametru klinicznego.

Pojawiły się jednocześnie prace dokumentujące zasadnicze różnice w efektywności biologicznej witaminy D₂ i D₃. Wykazano, że efektywność biologiczna witaminy D₃ jest dwukrotnie wyższa od witaminy D₂. Zaistniała także konieczność stosowania metod oznaczeń, które pozwolą na odrębną ocenę poziomu metabolitów witaminy D₂ i D₃ w surowicy dla rzetelnej oceny zaopatrzenia organizmu w witaminę D.

W zaleceniach oceny stanu zaopatrzenia organizmu w witaminę D postuluje się używanie nie tylko parametru statycznego, jakim jest poziom 25(OH)D w surowicy, ale również parametrów dyna-

micznych, które umożliwią ocenę efektywności biologicznej witaminy D na poziomie homeostazy wapniowo-fosforanowej oraz lokalnych efektów na poziomie tkankowym. Do głównych parametrów dynamicznych oceny zaopatrzenia organizmu w witaminę D zalicza się poziom PTH, poziomy markerów obrotu kostnego, optymalizację masy kostnej, optymalizację siły mięśniowej. Nowoczesną terminologię oceny zaopatrzenia organizmu w witaminę D przedstawia Tabela 2. Właściwy poziom 25(OH)D w surowicy musi zapewniać nie tylko odpowiednią syntezę 1,25(OH)₂D w nerkach (istotna w regulacji homeostazy Ca-P), ale również syntezę tego metabolitu w innych tkankach wykazujących aktywność 1 α -hydroksylazy witaminy D. Wykazano, że poziom 25(OH)D w zakresie 40–100 ng/ml optymalizuje gęstość mineralną kości, funkcje kończyn dolnych, zdrowie zębów, obniża ryzyko upadków, złamań kości oraz wystąpienia raka prostaty.

W przypadku niedoborów witaminy D (poziom 25(OH)D poniżej 20 ng/ml) mamy do czynienia z wyczerpaniem zasobów ustrojowych witaminy D. Może on zostać uzupełniony jedynie farmakologicznymi dawkami witaminy D. Zaleca się podawanie minimum 1000 IU dziennie przez 12 tygodni lub 15 000 IU raz na tydzień przez 8 tygodni. Preparaty multiwitaminowe nie są zalecane, gdyż zawierają wysokie dawki witaminy A.

U dzieci i młodzieży suplementacja w przypadku niedoborów witaminy D

powinna opierać się o farmakologiczne dawki na poziomie 400–1000 IU na dzień, w celu osiągnięcia optymalnego stężenia 30 ng/ml 25(OH)D w surowicy.

Działania profilaktyczne w populacji polskiej obejmują:

- u osób aktywnych fizycznie podawanie minimum 800 IU witaminy D₃ w okresie od października do kwietnia oraz ekspozycję 15% powierzchni ciała na słońce (bez stosowania filtrów ochronnych) minimum 20 minut dziennie w okresie od maja do września,
- u osób nieaktywnych fizycznie podawanie minimum 800 IU witaminy D₃ przez cały rok.

Celem postępowania jest osiągnięcie optymalnego poziomu 30–40 ng/ml 25(OH)D w surowicy. Badania populacyjne wykazały bowiem, że takie zaopatrzenie w witaminę D optymalizuje gęstość mineralną kości, funkcje kończyn dolnych, obniża ryzyko upadków i złamań kości zmniejsza częstość zapalenia przyzębia, redukuje o 30–50% ryzyko wystąpienia raka prostaty, jelita grubego, piersi i jajników. Niedobory witaminy D związane są również z 2,4 większym ryzykiem wystąpienia cukrzycy typu 1. W zastoinowej niewydolności serca witamina D normalizuje poziom cytokin o działaniu przeciwzapalnym (IL-10), a hamuje wydzielanie TNF-alfa. Niedobory witaminy D wykazano również u pacjentów z nadciśnieniem, kardiomiopatią przerostową oraz schizofrenią.

Tabela 2. Sugerowana terminologia umożliwiająca określenie stanu zaopatrzenia organizmu w witaminę D na podstawie stężenia 25(OH)D w surowicy.

	Stężenie 25(OH)D w surowicy		Symptomy biochemiczne/kliniczne
	nmol/l	ng/ml	
Deficyt	0–25	0–10	Ostry hiperparatyroidyzm, upośledzone wchłanianie wapnia, krzywica, osteomalacja, miopatia
Niedobór	>25–50	>10–20	Podwyższone stężenie PTH, obniżone wchłanianie jelitowe wapnia, obniżona gęstość minerału kostnego, subkliniczna miopatia
Hipowitaminoza D	>50–70	>20–28	Niskie zasoby witaminy D w organizmie, nieznacznie podwyższony PTH
Poziom zalecany	70–100	28–40	Nie obserwuje się zaburzeń związanych z funkcją witaminy D w organizmie
Poziom toksyczny	>250	>100	Wzmoczone wchłanianie wapnia w jelitach, hiperkalcemia

Wirus zapalenia wątroby typu B: wartość HBV DNA a odpowiedź na leczenie

Wprowadzenie ilościowych testów molekularnych bazujących na technice PCR pozwoliło na wykrywanie HBV DNA z większą czułością, nieosiągalną w poprzednio wykorzystywanych tradycyjnych testach hybrydizacyjnych. Doprowadziło to do zmiany poziomów wirerii HBV wykorzystywanych diagnostycznie jako marker prognostyczny dla określenia stanu choroby, jak również monitorowania terapii i przewidywania odpowiedzi na leczenie.

Przed leczeniem

Obecne wytyczne wskazują, że poziom wirerii 10^5 kopii/ml może odzwierciedlać reaktywację wirusa w przewlekłym zakażeniu nosicieli HBsAg.⁽¹⁻²⁾ Obserwacja ta jest spójna z ostatnimi danymi sugerującymi, powiązanie pomiędzy ilością kopii wirusa, postępem choroby i odpowiedzią na jej leczenie⁽³⁻⁴⁾, co zostało potwierdzone przez duże badania⁽⁵⁾. Czy 10^5 kopii/ml jest klinicznie znaczącym punktem odcięcia pozostaje do zbadania, ale wydaje się być użytecznym jako kryterium włączenia do terapii antywirusowej lub jako najlepszy moment na rozpoczęcie leczenia.

To podejście może być również użyteczne do badania utajonych infekcji HBV (bez innych markerów serologicznych), często pojawiających się u pacjentów już zarażonych HCV lub HIV⁽⁶⁻⁸⁾. W tych przypadkach pomocne może być badanie dodatkowych markerów serologicznych anti-HBc w rozróżnieniu pomiędzy infekcją latentną, a zakażeniem klinicznie znaczącym oraz w walidacji progu 10^5 kopii/ml.

Podczas terapii

Badania przeprowadzone na pacjentach z HBeAg (+) i anti-HBe (+) z przewlekłym zapaleniem wątroby otrzymujących klasyczny IFN (interferon) analizowały zachowanie w czasie markerów biochemicznych, serologicznych, immunologicznych i molekularnych. Raporty wyni-

ków wskazują, że wystąpiła pełna zgodność pomiędzy aktywnością ALT, statusem HBsAg, poziomem IgM anty-core i HBV DNA. Poziom wirerii HBV oznaczany testem ilościowym PCR pozwala wyodrębnić różne schematy reakcji pacjentów na leczenie. Pacjenci z biochemiczną odpowiedzią, serokonwersją w HBeAg, normalizacją IgM anty-HBeAg i ujemnym wynikiem HBV DNA testem hybrydizacyjnym posiadali wykrywalną wartość testem PCR. Tylko kilku pacjentów, którzy wyeliminowali później HBsAg miało ujemny wynik PCR 2-4 miesiące wcześniej⁽⁹⁾.

Wyniki te sugerują, że eradykacja wirusa może być osiągnięta wyłącznie u pacjentów, których replikacja HBV DNA jest hamowana do bardzo niskiego poziomu 10^2 kopii/ml lub poniżej, co jest granicą czułości testów PCR. Ta granica wykrywalności korelowała ze zniknięciem HBsAg również w badaniach kohortowych dzieci HBeAg-pozytywnych leczonych interferonem.

Analiza ilościowa HBV DNA pokazała również, że profil wirerii różni się znacząco pomiędzy pacjentami dopowiadającymi i nie odpowiadającymi na leczenie⁽¹⁰⁾. Różnica w nachyleniu krzywej spadku wirerii HBV DNA rozpoczyna się pomiędzy 6-8 tygodniem po rozpoczęciu leczenia, co daje możliwość identyfikacji pacjentów nie odpowiadających na leczenie na początku terapii kiedy jej modyfikacja może wpłynąć na ostateczną prognozę wyleczenia. Obserwacje te zostały potwierdzone w kolejnych badaniach obejmujących dużą populację pacjentów HBsAg negatywnych gdzie zaobserwowano znaczący statystycznie spadek HBV DNA poniżej 10^4 kopii/ml i 10^3 kopii/ml tylko w połączeniu z serokonwersją w HBeAg i HBsAg na zakończenie leczenia⁽¹¹⁾.

Powyższe dane sugerują, że wiremia HBV podobnie jak dla wirusa zapalenia wątroby typu C, może stać się markerem

wyboru do monitorowania leczenia antywirusowego i dostosowywania terapii przed i podczas leczenia. Badania wskazują, że monitorowanie czułym testem PCR pacjentów leczonych analogami nukleozydowymi pomaga w identyfikacji momentu zwrotnego, przed pojawieniem się wzrostu ALT i wykryciem mutacji oporności na lek. Zaobserwowano, że pacjent, który utrzymuje wartość HBV DNA wyższą niż 10^5 kopii/ml posiada znacząco większe ryzyko nawrotu w ciągu następnych 3 miesięcy leczenia.⁽¹²⁻¹⁶⁾

Stężenie wirusa pomiędzy 10^4 - 10^5 kopii/ml wydaje się reprezentować uzasadniony poziom odcięcia w dostosowywaniu leczenia i opracowywaniu bardziej efektywnych schematów postępowania. Ostatnie badania wykazują, że zmniejszenie liczby DNA HBV (< 300 kopii/ml) w 24 tygodniu leczenia prognozuje trwałą odpowiedź wirusologiczną u pacjentów leczonych telbivudyną, podczas gdy wiremia niższa niż 10^4 kopii/ml w 4 tygodniu leczenia i niższa niż 10^3 kopii/ml w 16 tygodniu leczenia są silnie skorelowane z trwałą odpowiedzią u pacjentów leczonych lamiwudyną⁽¹⁷⁻¹⁸⁾.

Ponieważ coraz więcej antywirusowych leków staje się dostępnych, wydaje się warta zbadania możliwość optymalizacji leczenia poprzez zmianę z monoterapii do terapii kombinowanej jeśli docelowa wielkość wirerii nie została osiągnięta we wczesnej fazie leczenia. W takim przypadku wydaje się to również kluczowe w ocenie i monitorowaniu oporności na wirus.

Przeszczepienie wątroby

Częstość reinfekcji następujących po przeszczepieniu wątroby może być zmniejszona poprzez profilaktykę immunoglobulinami lub lamiwudyną. Ostatnie badania pokazują, że reinfekcje mogą zostać zmniejszone o 50% jeśli lamiwudyna spowoduje spadek wirerii do wartości 10^4 kopii/ml⁽¹⁹⁻²⁰⁾.

Rak wątrobowokomórkowy

Badania wykazały również korelację pomiędzy średnim stężeniem HBV DNA i ryzykiem raka pierwotnego wątroby (HCC) u przewlekłych nosicieli HBsAg^(21,22). Pacjenci z wiremią większą niż 10^{4-5} mają 2 do 7 krotnie większe ryzyko HCC w porównaniu do pacjentów, u których stężenie wirusa nie przekracza 10^3 z uwzględnieniem ryzyka wzrostu w przyszłości w przypadku genotypu B⁽²⁾.

Powyższe dane podkreślają kliniczne znaczenie monitorowania wirerii w wirusowym zapaleniu wątroby typu C i B oraz jej rolę w ocenie skuteczności terapii antywirusowej.

Prognostyczna wartość profilu wirerii pozwala na wcześniejszy wybór schematu leczenia, dostosowywanie leczenia w trakcie trwania terapii, racjonalizację wydatków oraz motywację i wytrwałość pacjentów. Trwające badania kliniczne uwzględniające zmiany wartości HBV DNA prawdopodobnie pozwolą w przyszłości na potwierdzenie powyższego podejścia i optymalizację obecnych standardów leczenia.

Obecne standardy leczenia przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu B opracowane przez polską grupę ekspertów HBV zawierają zalecenie wykonywania ilościowych badań HBV DNA najczulszymi komercyjnie dostępnymi metodami⁽²³⁾. Zgodnie z opracowanymi zasadami kwalifikacja do leczenia odbywa się na podstawie wartości HBV DNA (1 IU/ml to 5,6 kopii/ml) równego lub wyższego od 20,000 IU/mL (112,000 kopii/ml czyli w przybliżeniu 100,000 kopii/ml) u pacjentów HBeAg(+) oraz równego lub większego od 2,000 IU/mL (11,200 kopii/ml czyli w przybliżeniu 10,000 kopii/ml) u pacjentów HBeAg(-). Wszyscy leczeni chorzy powinni mieć oznaczane HBV DNA po raz pierwszy po 3 miesiącach terapii, a następnie, co pół roku. Wystąpienie oporności na lek określa się jako 10-krotny wzrost w stosunku do najniższego wyniku HBV DNA osiągniętego w trakcie leczenia. Leczenie należy prowadzić do wyeliminowania HBV DNA zgodnie z kryteriami najczulszej, komercyjnie dostępnej, metody oznaczania HBV DNA, kierując się dwukrotnym oznaczeniem ww. parametru w ciągu 3 mies., a następnie – dodatkowo – po 6 mies.

Piśmiennictwo dostępne w redakcji.

Tabela 1. Zastosowanie testu ilościowego HBV DNA w monitorowaniu leczenia przewlekłego wirusowego zakażenia wątroby typu B.

Etapy leczenia przeciwwirusowego	Klasyfikacja	Kontrola	Oporność na lek	Skuteczność
Oznaczenie DNA HBV	≥ 20.000 IU/ml dla HBeAg(+) lub ≥ 2.000 IU/ml dla HBeAg(-)	po raz pierwszy po 3 mies., następnie co 6 mies.	10-krotny wzrost od minimalnego stężenia	ujemny wynik dwukrotnie w ciągu 3 mies., a następnie po 6 mies.

COBAS TaqMan 48

Testy PCR w czasie rzeczywistym dla laboratoriów klinicznych

Analizator COBAS TaqMan 48 pozwala na automatyczną amplifikację PCR i detekcję w czasie rzeczywistym (*real time PCR*) dwóch testów równocześnie. Może być użyty łącznie z aparatem COBAS AmpliPrep dla zwiększenia automatyzacji.



● Wyróżniające się testy diagnostyczne HBV, HCV i HIV-1

Wysoka czułość i swoistość, szeroki zakres liniowości minimalizujący konieczność powtarzania testu lub rozcieńczeń

● Szybka procedura, szybkie wyniki

PCR w czasie rzeczywistym pozwala na amplifikację i detekcję RNA lub DNA w 2 do 3 godzin

● Zminimalizowane ryzyko kontaminacji

Zamykane próbki i wykorzystanie enzymu AmpErase zapewnia najwyższą możliwą kontrolę kontaminacji

Test COBAS TaqMan HBV

Materiał:	0,5 ml, osocze-EDTA lub surowica
Czułość analityczna:	4,8 IU/ml w osoczu-EDTA 6,7 IU/ml w surowicy
Liniowość:	29-110 000 000 IU/mL
Wykrywane genotypy:	A-G, mutant pre-core
Czas badania:	~5 godz.

Szybkość opadania erytrocytów

Stosowanie świeżej krwi do kontroli jakości

dr n. med. Mario Plebani i dr n. med. Elisa Piva, Department of Laboratory Medicine, University-Hospital of Padua, Padwa, Włochy.

Od redakcji

Mimo, że od opisu odczynu opadania krwinek przez Edmunda Faustyna Biernackiego minęło już 110 lat zjawisko to jest nadal powszechnie wykorzystywane w diagnostyce szeregu chorób zapalnych czy nowotworów. Dlatego automatyczna metoda pomiaru OB, którą posługiwali się Autorzy artykułu powinna znaleźć zastosowanie w wielu dużych laboratoriach. Zasada pomiaru sprowadza się do umieszczenia próbki antykoagulowanej krwi w pionowej cienkiej kapilarze, w której rozpoczyna się proces sedymentacji erytrocytów. Następnie, układ oznacza zawartość krwinek na poszczególnych poziomach kapilary i porównując uzyskane wartości wylicza szybkość opadania wyrażoną w „milimetrach Westergrena”. Zaletą metody jest możliwość badania 180 próbek na godzinę, mała pracochłonność oraz ograniczenie kontaktu pracowników laboratorium z potencjalnie zakaźnym materiałem.

Problemem związanym z pomiarem sedymentacji erytrocytów jest brak odpowiednich materiałów referencyjnych, które mogą być użyte dla kontroli jakości wyników metody automatycznej. Zgodnie z zaleceniami ICSH materiał przed badaniem może czekać w temperaturze pokojowej przez 2 godziny lub 12 godzin w 4°C. Autorzy pracy podają metody kontroli jakości automatycznego pomiaru OB, w oparciu o analizę kolejnych średnich dziennych oraz jedną z zasad Westgarda. Wskazują także na przydatność porównania wyniku uzyskanego z krwi świeżej i przechowywanej przez 24 godziny. W tabeli 4 podają dopuszczalny zakres różnicy pomiędzy kolejnymi oznaczeniami w próbkach o różnych wyjściowych wartościach OB. Proponowane metody kontroli jakości należy uzupełnić, raz w tygodniu, równoczesnym badaniem tych samych próbek metodą automatyczną i klasyczną.

Streszczenie

Szybkość opadania erytrocytów (OB) pozostaje najczęściej stosowanym testem laboratoryjnym do monitorowania przebiegu infekcji, chorób zapalnych oraz pewnych rodzajów nowotworów. W ostatnim czasie opracowano kilka metod testu, dzięki czemu poprawiło się bezpieczeństwo i niezawodność procedur oznaczania OB. Metoda pomiaru OB zalecana przez International Council for Standardization in Haematology oraz National Committee for Clinical Laboratory Standards oparta jest na tradycyjnej metodzie Westergrena z użyciem nierozcieńczonych próbek antykoagulowanych EDTA. W laboratoriach klinicznych wymagane są rzetelne metody kalibracji oraz stosowanie właściwego materiału kontroli do sprawdzania dokładności i precyzji metody rutynowej. W tym miejscu opisujemy i dokonujemy oceny procedury otrzymywania dziennej kontroli jakości OB oraz ustalania granic zgodności pomiędzy metodą stosowaną a referencyjną. Do obliczenia łącznej dziennej średniej i do monitorowania jej odtwarzalności w czasie użyto danych z rutynowych próbek pacjentów. Na koniec, aby sprawdzić jakość pomiarów analitycznych, przeprowadzono porównanie wyników pomiaru OB w próbkach przechowywanych 24 godziny w 4°C z wynikami otrzymanymi dla świeżych próbek.

Słowa kluczowe: Szybkość opadania erytrocytów, metoda Westergrena, metoda zalecana przez ICSH, standard zatwierdzony przez NCCLS, zautomatyzowane systemy pomiaru OB, gwarancja jakości OB

Oznaczenie szybkości opadania erytrocytów (OB), bardziej prawidłowo nazywane „długością reakcji sedymentacji

we krwi” ma długotrwałą historię i tradycję w laboratoriach klinicznych.¹ OB, najpowszechniej stosowany pomiar laboratoryjny zaawansowania choroby w medycynie klinicznej, nadal uznany jest za przydatny do monitorowania chorób zapalnych, w szczególności reumatoidalnego zapalenia stawów.² Ostatnie prace przeglądowe i wyszukiwanie z wykorzystaniem MEDLINE wskazują, że test ten jest powszechnie stosowany zarówno do diagnozowania, jak i obserwacji pacjentów z tymi chorobami.³⁻⁶

W ostatnich dziesięcioleciach opracowano i wprowadzono do laboratoriów klinicznych kilka nowych technik pomiaru OB, aby uwzględnić następujące potrzeby:

1. Zagwarantowanie bezpieczeństwa obsługi przez zastosowanie zautomatyzowanych i zamkniętych systemów,
2. Zautomatyzowanie samego pomiaru oraz optymalizacja organizacji pracy i wykorzystania zasobów ludzkich,
3. Stworzenie wyjątkowej stacji roboczej do pomiaru wartości OB, a także wykonywanie w jednej próbce innych testów hematologicznych (np. pomiaru liczby erytrocytów, leukocytów i retikulocytów). Wedle wytycznych International Council for Standardization in Haematology (ICSH) oraz National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) powinno być to wykonywane przy użyciu zalecanej próbki – nierozcieńczonej krwi z K₃EDTA (wersenian trójpotasowy), który jest bardziej niezawodny niż tradycyjny cytrynian sodu.^{7,8}

Ostatnio ocenialiśmy i walidowaliśmy nową procedurę pomiaru, tak zwany TEST_{1EC} (SIRE Analytical System, Udine, Włochy), który umożliwia zautomatyzowany, bezpieczny, precyzyjny i dokładny

pomiar OB w próbkach pobieranych zarówno na cytrynian sodu, jak i K_3EDTA .⁹

W erze gwarancji jakości i akredytacji laboratoriów medycznych, znaczna uwaga powinna być zwrócona na kwestię kontroli jakości i gwarancję jakości dla pomiaru OB. Ponieważ opadanie ludzkich erytrocytów dotyczy świeżej krwi i ma zmienny charakter, to referencyjne lub kontrolne materiały zwykłego rodzaju nie są dostępne. Stabilizowane próbki od ludzi czy zwierząt nie mogą być uznane za dopuszczalne zamiast ludzkiej świeżej krwi, ani też odpowiednie do użycia w metodach takich jak $TEST1_{EC}$, które mierzą kinetykę sedimentacji czerwonych krwinek, a nie zwyczajne opadanie czerwonych krwinek po ustalonym czasie.

Celem niniejszego badania był opis i ocena procedury opartej na użyciu świeżej ludzkiej pełnej krwi do dziennej kontroli jakości oznaczania wartości OB w laboratoriach klinicznych.

MATERIAŁY I METODY

Pacjenci

Do niniejszego badania dobrano losowo osoby z całej populacji pacjentów zarówno hospitalizowanych, jak i ambulatoryjnych. Probki krwi otrzymano i przetwarzano do analizy podczas rutynowej pracy. Do oceny użyto nierozcieńczonych próbek krwi antykoagulowane K_3EDTA (Becton Dickinson System Europe, Meylan Cedex-Francja). Probki otrzymano w standaryzowanych warunkach (pobranie rano na czczo) i badano w ciągu 4 godzin od nakłucia żyły, zgodnie z wytycznymi ICSH. Następnie w każdej próbce mierzono liczbę erytrocytów, leukocytów i stężenie hemoglobiny i objętość frakcji erytrocytów przy użyciu systemu Coulter GenS System (Coulter, Miami, FL).

Analizator $TEST1_{EC}$

$TEST1_{EC}$, zamknięty zautomatyzowany analizator oznacza OB w szczelnych próbkach próżniowych standardowego rozmiaru z perforowaną zatyczką. Probki umieszczano w odpowiednich statywach, a ich zawartość mieszano powoli na mieszadle przez około 3 minuty. W podajniku próbek umieszczano jednocze-

śnie 4 statywy po 15 próbek. Probka krwi pobierana bezpośrednio z probówki do pobrania przy pomocy zamkniętej igły aspiracyjnej przenoszona była do kapilary, gdzie była przyspieszana przez układ „zatrzymanego przepływu”, który powoduje sedimentację erytrocytów. Obszar odczytu utrzymywany był w temperaturze $37^{\circ}C$. System stosuje mikrofotometr na podczerwień o długości fali światła 650 nm. Impulsy elektryczne zbierane przez detektor fotodiody są bezpośrednio korelowane z liczbą erytrocytów obecnych na każdym poziomie kapilary. Mierzone na jednostkę czasu impulsy są następnie używane do wykreślenia krzywej sedimentacji dla każdej próbki przy pomocy algorytmu matematycznego. Średni spadek sygnału na jednostkę czasu zwany średnim sygnałem i pierwiastek kwadratowy z sygnału całkowitego były przekształcane na porównywalne wartości Westergrena przy pomocy modelu regresji liniowej.

Ostatnio dokonano ulepszeń wyjściowej techniki. Przede wszystkim podwyższono prędkość wirowania z 16 na 60 obr./min., aby osiągnąć lepsze, bardziej dokładne wymieszanie krwi. System pracuje z szybkością 180 próbek na godzinę przy nieprzerwanym ładowaniu, dając wynik co 20 sekund i wymaga na każdą próbkę 150 μl krwi. $TEST1_{EC}$ podaje dzienne i łączne średnie wartości OB dla 30 dni wstecz. Wyniki wyrażane są w milimetrach.

Porównanie pomiędzy metodą rutynową a Westergrena

Do badania porównawczego wybrano próbki z wartościami OB oznaczanymi w $TEST1_{EC}$ w zakresie od 2 do 120 mm. Do tego celu używano metodę Westergrena, którą wykonywano zgodnie z zaleceniem ICSH.⁷ W skrócie, używano plastikowe probówki o długości 250 mm ze średnicą obwodu 2,55 mm; wszystkie próbki wybrane z rutynowych pobrań były antykoagulowane EDTA. Test wykonywano w ciągu 4 godzin od nakłucia żyły, a krew była dokładnie wymieszana przed mechaniczną aspiracją. Następnie określaliśmy odchylenie, granice zgodności oraz 95% przedział ufności (CI) metody rutynowej ($TEST1_{EC}$) w porównaniu z metodą ICSH (Westergrena). Dla 10 re-

prezentatywnych grup wartości OB wyliczono 95% CI średniego odchylenia. Również porównywaliśmy 2 metody używając próbek jako „materiałów referencyjnych”. Probki przygotowywano zgodnie z wytycznymi odnośnie ICSH standaryzacji (metoda referencyjna), używając próbek krwi pacjentów z wartościami hematokrytu pomiędzy 33% (0,33) a 35% (0,35).

Porównanie pomiędzy świeżymi a przechowywanymi próbkami (kontrola między jednym dniem a drugim)

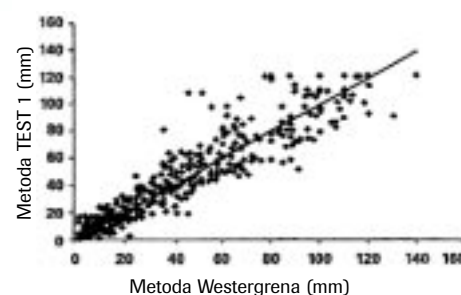
Przez cały okres badania mierzono OB w każdej próbce w ciągu 4 godzin po pobraniu krwi i 24 godziny po przechowywaniu w $4^{\circ}C$. W 10 różnych reprezentatywnych grupach wartości OB ocenialiśmy odchylenie, granice zgodności i ich 95% CI.

Średnie wartości łączne

Codziennie przez 20 dni obliczaliśmy średnie wartości średnich danych od 100 pacjentów, po czym obliczano średnią, odchylenie standardowe i współczynnik wariancji łącznej średniej.

Analiza statystyczna

Statystyczną analizę danych przeprowadzono przy użyciu programu MS Excel'98 (Microsoft, Seattle, WA), aby wyznaczyć współczynnik korelacji, regresję liniową oraz korelację pomiędzy $TEST1_{EC}$ a metodą Westergrena. Porównanie metod i różnic pomiędzy wartościami OB między jednym dniem a drugim wykonano przy



Rycina 1. Zależność pomiędzy metodą referencyjną (Westergrena, zgodnie z wytycznymi International Council for Standardization in Haematology) i rutynową ($TEST1_{EC}$) pomiaru szybkości opadania erytrocytów. Probki ($n = 509$) pobierano na K_3EDTA z różnym zakresem wartości hematokrytu ($y = 3,54 + 0,92x$; $r = 0,93$).

Tabela 1. Odchylenie, granice górne i dolne oraz 95% przedział ufności odchylenia dla różnych wartości OB wyników otrzymanych metodami TEST_{1EC} i Westergrena (n = 509)*

Wartości OB (zakres, mm)	Odchylenie	Górne i dolne granice odchylenia	95% przedział ufności odchylenia
2–10	1,77	–6,10 do 9,65	0,90 do 2,64
11–20	–0,94	–15,94 do 14,05	–2,56 do 0,67
21–30	–1,43	–14,96 do 12,10	–3,24 do 0,38
31–40	–1,35	–15,63 do 12,92	–3,54 do 0,83
41–50	3,42	–17,76 do 24,61	–0,03 do 6,88
51–60	2,29	–26,46 do 31,05	–2,59 do 7,18
61–70	1,7	–28,32 do 31,72	–3,19 do 6,59
71–80	4,4	–21,32 do 30,12	–0,50 do 9,30
81–90	4,41	–31,18 do 40	–4,92 do 13,75
91–100	–1,7	–46,63 do 43,23	–18,09 do 14,69

OB. szybkość opadania erytrocytów

* Szczegółowe informacje – patrz tekst

Tabela 2. Granice dopuszczalności (2,5-ty i 97,5-ty percentyl) wyników OB otrzymanych w TEST_{1EC}*

Wartość OB (metoda Westergrena, mm)	Średnia wartość OB ± SD (metoda TEST _{1EC} , mm)	2,5-ty i 97,5-ty percentyl
20	20,5 ± 4,3	10–33
30	25,3 ± 11,4	10–42
40	37,8 ± 5,9	30–50
50	57,5 ± 13,4	41–83
60	68 ± 20,9	50–98
70	69 ± 14,4	51–93
80	75,12 ± 24,8	52–117
90	80,25 ± 23,2	53–115
100	100,18 ± 13,0	72–117
110	95,26 ± 16,1	73–120
120	103 ± 19,4	75–120

OB. szybkość opadania erytrocytów

* Szczegółowe informacje – patrz tekst

Tabela 3. Odchylenie, górne i dolne granice i 95% przedział ufności odchylenia dla różnych wartości OB w porównaniu próbek świeżych z przechowywanymi*

Wartości OB (zakres, mm)	Odchylenie	Górne i dolne granice odchylenia	95% przedział ufności odchylenia
2–10	0,32	–3,18 do 3,82	–0,13 do 0,50
11–20	1,05	–5,74 do 7,85	0,60 do 1,51
21–30	1,92	–13,29 do 17,14	0,56 do 3,3
31–40	4,32	–5,85 do 14,5	3,23 do 5,42
41–50	4,18	–8,83 do 17,2	2,37 do 6,0
51–60	4,14	–12,84 do 21,13	1,16 do 7,12
61–70	5,83	–13,67 do 25,33	2,04 do 9,61
71–80	9,38	–15,28 do 34,04	4,59 do 14,16
81–90	10,17	–12,35 do 32,70	4,26 do 16,08
>90	9,55	–6,32 do 25,43	6,81 do 12,96

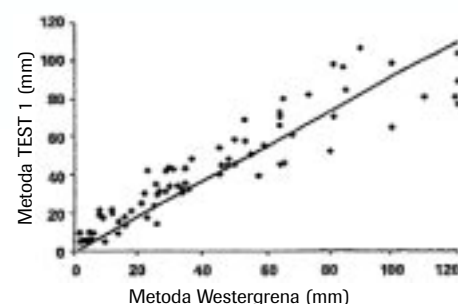
OB. szybkość opadania erytrocytów

* Przechowywane 24 godziny.

pomocy analizy Blanda-Ahmana z pakietem Astute (Diagnostic Development Unit, University of Leeds, Leeds, Anglia). Analiza statystyczna przedziału ufności (CI) danych została przeprowadzona przy użyciu programu CIA (Confidence Interval Analysis), jak opisano przez Gardner i wsp.¹⁰

WYNIKI

Ryciny 1. i 2. przedstawiają porównanie pomiędzy wynikami otrzymanymi metodą referencyjną (Westergrena) a TEST_{1EC}



Rycina 2. Zależność pomiędzy metodą referencyjną (Westergrena) i rutynową (TEST_{1EC}) pomiaru szybkości opadania erytrocytów. Próbkę (n = 75) pobierano na K₂EDTA z wartościami hematokrytu pomiędzy 33% (0,33) a 35% (0,35) zgodnie z zalecaną przez International Council for Standardization in Haematology procedurą przygotowywania „materiału referencyjnego” (y = –3,38 + 1,094x; r = 0,92).

w wybranych losowo próbkach otrzymanych podczas rutynowego klinicznego pobierania i przy użyciu materiałów referencyjnych (próbki świeżej ludzkiej krwi z hematokrytem pomiędzy 33% [0,33] a 35% [0,35]). Stwierdzono znaczącą różnicę pomiędzy wartością przecięcia z osią współrzędnych 2 grup (3,54; 95% CI, od 1,85 do 5,23; P=0,0001; i –3,38; 95% CI, od –8,87 do 2,09; P = 0,22).

Tabela 1. przedstawia wyniki porównania pomiędzy danymi otrzymanymi metodami Westergrena i TEST_{1EC} w 509 próbkach zgrupowanych w 10 klas na podstawie wartości OB. Przedstawiono względny estymator odchylenia, granice zgodności i 95% CI. Nie stwierdzono znaczącego odchylenia dla żadnej z grup z klinicznie istotnymi wartościami OB (Tabela 2.).

Rycina 3 obrazuje dane otrzymane przez wyliczenie średniej dziennej wartości dla rutynowo pobieranych próbek

Tabela 4. Granice dopuszczalności (2,5-ty i 97,5-ty percentyl) w praktyce kontroli jakości dla próbek przechowywanych przez 24 godziny

Wartość OB* (świeże próbki, mm)	Średnia wartość OB $\pm$ SD po 24 h w 4°C	2,5-ty i 97,5-ty percentyl
10	9 $\pm$ 2,8	5–19
15	14 $\pm$ 2,48	11–21
20	19 $\pm$ 3,73	15–32
25	22 $\pm$ 4,62	16–34
30	28 $\pm$ 4,12	23–40
35	31 $\pm$ 2,77	26–40
40	38 $\pm$ 4,74	33–46
45	42 $\pm$ 3,19	38–48
50	43 $\pm$ 2,69	40–51
55	52 $\pm$ 6,13	45–63
60	57 $\pm$ 4,6	51–64
65	64 $\pm$ 16,7	51–97
70	64 $\pm$ 5,5	52–80
75	72 $\pm$ 11,3	65–80
80	76 $\pm$ 7,3	60–90
90	82 $\pm$ 10,1	61–106
100	93 $\pm$ 5,5	85–101
115	96 $\pm$ 2,5	93–115
120	115 $\pm$ 4,5	107–120

* OB – szybkość opadania erytrocytów

w czasie i odpowiadających odchylen standardowych przez przedstawienie tych danych na tradycyjnym wykresie kontroli jakości. Pojedyncze dzienne średnie znajdowały się wokół przeciętnej średniej (26,57 $\pm$ 3,81) i były zawsze w zakresie $\pm$ 2 odchylenia standardowego.

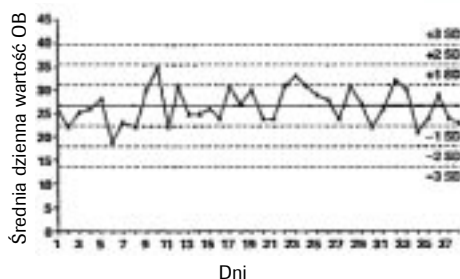
Przechowywanie 1140 próbek pełnej krwi 24 godziny w 4°C spowodowało spadek wartości OB otrzymanych przez 2 różne analizatory TEST1_{EC} w odniesieniu do wartości początkowej: średnie

różnice wynosiły odpowiednio 2,86 (95% CI, od 2,41 do 331) i 2,28 (95% CI, od 1,90 do 2,65). To może być odpowiednio przełożone na średnie spadki procentowe 9% i 11% od jednego dnia do następnego. Przez analizę tych danych zidentyfikowaliśmy 10 grup próbek z różnymi wartościami OB i dla każdej podgrupy otrzymaliśmy odchylenie, granice zgodności i 95% CI (Tabela 3.). Ponadto obliczyliśmy granice dopuszczalności dla próbek przechowywanych (Tabela 4.), w ten sposób pozwalając laboratorium na łatwe monitorowanie rzetelności systemu testów od dnia do dnia.

DYSKUSJA

Odczyn opadania krwinek, od nazwiska odkrywcy – Edmunda Biernackiego, który opisał go w 1987 roku, zwany w naszym kraju odczynem Biernackiego (OB.) jest nadal powszechnie stosowany w praktyce medycznej jako wskaźnik stanów zapalnych, infekcji, urazów czy chorób nowotworowych i codziennie w labo-

ratoriach klinicznych na świecie wykonuje się kilka miliardów testów. W 1918 roku szwedzki patolog **Robert Sanno Fåhrus** opisał podobne zjawisko i razem z internistą **Alfem Vilhelmem Albertssonem Westergrenem** opracowali metodę oznaczania OB (na świecie określana jako ESR, erythrocyte sedimentation test lub metoda Westergrena), która przez lata utrzymała swój status. Obecna metoda referencyjna wykorzystuje szklane lub plastikowe próbki rodzaju Westergrena oraz nierozcieńczone i wolne od hemolizy próbki krwi pobierane z antykoagulantem K₃EDTA. Ostatnio ocenialiśmy i walidowaliśmy nową zautomatyzowaną procedurę pomiaru, tak zwany TEST1_{EC}, który umożliwia zautomatyzowany, bezpieczny, precyzyjny i dokładny pomiar OB w praktyce klinicznej. Zalety stosowania tej techniki w laboratoriach klinicznych obejmują bezpieczeństwo obsługi, pełną automatyzację, obniżenie czasu przetwarzania i ograniczenie nieścisłości w analityce. Jednak w naszej opinii główną korzyścią jest stosowanie nierozcieńczonych próbek antykoagulowanych K₃EDTA. Wiadomo, że na OB głównie wpływa agregacja i rulonizacja erytrocytów. Pobieranie próbek na K₃EDTA zwiększa stabilność komórek krwi, w ten sposób sprzyjając tworzeniu rulonów, zachowując właściwości morfologiczne i zapobiegając нефизjologicznym wpływom na komórki, a ma to kluczowe znaczenie w reakcji OB. Jak wykazały nasze wyniki, ten rodzaj antykoagulantu i procedury przed mieszaniem stosowane przez TEST1_{EC} poprawiają stabilność próbki, a zatem umożliwiając pomiar OB po czasie 4 godzin zalecanych przez NCCLS. i upraszczając obsługę i przenoszenie próbek. Ponieważ próbka z EDTA stosowana jest w większości oznaczeń hematologicznych, to analiza OB z tej samej próbki oznacza dalsze usprawnienie: wymagana jest mniejsza objętość próbki (szczególnie przydatne u noworodków, dzieci i pacjentów onkologicznych), zredukowane są koszty pobierania oraz obróbki próbek, a także oznaczenia hematologiczne z OB mogłyby być analizowane w wyjątkowej stacji roboczej, w ten sposób przyczyniając się do optymalizacji cy-



Rycina 3. Wykres Levey-Jenningsa dziennej łącznej średniej dla szybkości opadania erytrocytów (OB) danych pacjentów. Łączna średnia wartość $\pm$ SD, obliczona z rutynowych danych wyniosła 26,57 $\pm$ 3,81 mm (n = 20).

klu pracy w laboratoriach klinicznych. I wreszcie nierozcieńczone próbki antykoagulowane EDTA obniżają ryzyko błędów przed analizą spowodowanych częściowym skrzepnięciem próbki lub małymi skrzepami, zmienioną proporcją krew-cytrynian sodu i problemami związanymi z objętością końcową, nieodłącznych głównie w technikach z wykorzystaniem specjalnych probówek zarówno dla pobierania próbek i pomiaru OB.^{11,12}

Podczas gdy w podręcznikach stwierdza się, iż „jest bardziej prawdopodobne, że procedura pomiaru OB zostanie wykonana bez kontroli jakości niż jakiegokolwiek inny powszechny test hematologiczny”,¹³ a NCCLS oznajmia: „pomimo że procedura pomiaru OB nie może być kalibrowana, to jest ona z natury całkiem stabilna”, to w erze gwarancji jakości, certyfikacji i akredytacji laboratoria kliniczne muszą dokumentować jakość pomiarów OB. Jednakże z powodu istoty reakcji sedymentacji ludzkich erytrocytów, materiały referencyjne czy kontrolne zwykłego rodzaju nie są dostępne do testu OB, reakcja sedymentacji przejściowa i ograniczona do świeżej krwi. Mimo że kilka stabilizowanych próbek pochodzenia ludzkiego dostępnych na rynku zostało wprowadzonych do laboratoriów klinicznych, ich właściwości kinetyczne, które są różne od własności erytrocytów świeżej krwi, wykluczają ich zastosowanie do oznaczania OB przy użyciu takich technik jak TEST_{1EC}, która raczej ocenia szybkość sedymentacji niż zwyczajnie mierzy końcowy opad erytrocytów po 60 minutach. Dokument NCCLS zaleca weryfikację roboczej rutynowej metody wobec metody referencyjnej z częstością określoną przez standardową procedurę roboczą laboratorium szczególnie wtedy, kiedy wprowadzane są jakiejkolwiek zmiany w pipetach, personelu lub inne takie zmienne. Dodatkowo stwierdza on, że obecnie jedynie wykonalnym sposobem zapewnienia materiału kontrolnego jest określenie metody produkcji takiego materiału w laboratorium, gdzie ma on być używany.⁸ Dlatego też ocenialiśmy procedurę kontroli jakości, która wykorzystuje próbki świeżej pełnej krwi. Jest ona niedroga i łatwa do wykonania w la-

boratoriach klinicznych. Z powodu obserwowanej podobnej zależności pomiędzy metodą referencyjną (Westergrena), a techniką roboczą (TEST_{1EC}) w wybranych losowo próbkach i próbkach referencyjnych (próbki z hematokrytem <35% [$<0,35$]), nie ma potrzeby wcześniejszej selekcji próbek na podstawie wartości hematokrytu. Przeciętna dzienna średnia, która jest stosunkowo stała w naszych warunkach pracy, powinna być stosowana w procedurze kontroli jakości. Przechowywanie próbek 24 godziny w 4°C pozwala na użycie tych próbek do oceny nieścisłości analitycznej, ponieważ granice zgodności dla grup próbek z różnymi wartościami OB zostały teraz zdefiniowane. I wreszcie porównanie pomiędzy metodą referencyjną a wynikami TEST_{1EC} gwarantuje monitorowanie dokładności w czasie.

Z praktycznego punktu widzenia procedura kontroli jakości oparta jest na następujących kwestiach: (1) obliczeniu i monitorowaniu dziennej łącznej średniej, która jest wartością stosunkowo stałą, kiedy analizuje się co najmniej 100 próbek w stałym ustawieniu klinicznym; przeciętna wartość tej znaczącej liczby próbek waha się w dopuszczalnych granicach ze współczynnikiem zmienności niższym niż 15% i wydaje się adekwatnym wskaźnikiem do monitorowania pracy aparatu; (2) porównaniu próbek świeżych z przechowywanymi, mianowicie pomiar trzech próbek z różnymi wartościami OB przechowywanych 24 godziny w 4°C, dopuszczalne granice odchylenia definiowane dla grup próbek z różnymi średnimi wartościami OB; oraz (3) porównanie pomiędzy wynikami z metody roboczej (TEST_{1EC}) a wynikami metody referencyjnej. Ponownie, również określiliśmy dopuszczalne granice odchylenia dla grup próbek z różnymi wartościami OB.

Podczas gdy dzienna łączna średnia danych pacjentów powinna być monitorowana i 3 próbki przechowywane 24 godzinny powinny być mierzone codziennie, metoda rutynowa TEST_{1EC} i referencyjna powinny być porównywane raz na tydzień w stałych warunkach lub w krótszych odstępach, jeśli pojawiają się jakiejkolwiek problemy z aparatem lub z po-

wodów technicznych zostanie zmodyfikowane ustawienie aparatu. Laboratoria kliniczne z obciążeniem niższym niż 100 próbek na dzień mogłyby wziąć pod uwagę łączną średnią z 200 do 300 wartości OB mierzonych przez kilka dni. To jest informacja wynikająca bezpośrednio z aparatu.

Aby zidentyfikować sytuacje „niekontrolowane”, ustaliliśmy następujące procedury referencyjne:

1. Granice dopuszczalnego działania dla łącznej dziennej średniej ustawione są na $3 \pm$ standardowe odchylenie średniej.
2. Co najmniej 3 przechowywane próbki muszą znajdować się w zaproponowanych granicach dopuszczalności.
3. Odnośnie porównywalności pomiędzy metodą referencyjną a rutynową, ta druga musi być uznana za „pod kontrolą”, jeśli 95% wyników znajduje się w granicach dopuszczalności.
4. Przyjmując częściowo zasadę Westgarda, uznaliśmy aparat za „niekontrolowany”, kiedy wartości dziennych łącznych średnich przez 10 kolejnych dni wypadają na tę samą stronę średniej.^{14,15}

Jakkolwiek kontrola jakości była kiedyś uważana za nieważną dla OB i innych testów hematologicznych, teraz powinny być podjęte wysiłki mające na celu zapewnienie adekwatnych materiałów kontroli i procedury. Nasze wyniki uzyskane dla próbek świeżej krwi wskazują, że z TEST_{1EC} kontrola jakości dla pomiaru OB jest wykonalna, niedroga i niezawodna.

Tłumaczenie artykułu zamieszczonego w Clinical Chemistry International Journal of Laboratory Medicine and Molecular Diagnostics, CLCHAU 46 1725-1882 (2000)

AM J Clin Pathol 2002; 117:621-626

© American Society for Clinical Pathology

Piśmiennictwo

1. Piva E, Sanzari MC, Servidio G, et al. Length of sedimentation reaction in undiluted blood (erythrocyte sedimentation rate): variations with sex and age and reference limits. *Clin Chem Lab Med.* 2001;39:451-454.

2. Wolfe F, Pincus T. The level of inflammation in rheumatoid arthritis is determined early and remains stable over the longterm course of the illness. *J Rheumatol.* 2001;28:1817-1824.
3. Cantini F, Salvarani C, Olivieri I, et al. Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in the evaluation of disease activity and severity in polymyalgia rheumatica: a prospective follow-up study. *Semin Arthritis Rhum.* 2000;30:17-24.
4. Brigden ML. The erythrocyte sedimentation rate: still a helpful test when used judiciously. *Postgrad Med.* 1998;103:257-274.
5. Saadeh C. The erythrocyte sedimentation rate: old and new clinical application. *South Med J.* 1998;91:220-225.
6. Wolfe F, Michaud K. The clinical and research significance of the erythrocyte sedimentation rate. *J Rheumatol.* 1994;21:1177-1178.
7. International Council for Standardization in Haematology. ICSH recommendation for measurement of erythrocyte sedimentation rate. *J Clin Pathol.* 1993;46:198-203.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference and Selected Procedure for Erythrocyte Sedimentation (ESR) Test; Approved Standard, 4th ed. H2-A4. Villanova, PA: NCCLS; 2000.
9. Plebani M, De Toni S, Sanzari MC, et al. The TEST1 automated system: a new method for measuring the erythrocyte sedimentation rate. *Am J Clin Pathol.* 1998;110:334-340.
10. Gardner MJ, Gardner SB, Winter PD. Confidence Interval Analysis Microcomputer Program. London, England: British Medical Journal Publishing Group; 1989.
11. Horsti J, Kovanen M. Using EDTA as an anticoagulant for ESR to replace citrate. *Klin Lab.* 2000;4:97-100.
12. Koepke JA, van Assendelft OW. Bull BS, et al. Standardization of EDTA anticoagulation of blood counting procedures. *Labmedica.* 1989;5(6):15-17.
13. Bull BS. Quality assurance strategies. In: Koepke JA. ed. *Practical Laboratory Hematology.* New York, NY: Churchill Livingstone; 1991.
14. Westgard JO, Groth T, Aronsson T, et al. Performance characteristics of rules for internal quality control: probabilities for false rejection and error detection. *Clin Chem.* 1997;23:1857-1867.
15. Cembrowski GS, Carey RN. *Laboratory Quality Management: QC-QA.* Chicago, IL: ASCP Press; 1989.

XVII Europejski Kongres Chemii Klinicznej i Medycyny Laboratoryjnej w Amsterdamie

W dniach 3–7 czerwca 2007 odbył się XVII Europejski Kongres Chemii Klinicznej i Medycyny Laboratoryjnej w Amsterdamie.

Firma Roche Diagnostics należała do głównych sponsorów zjazdu razem z: Menarini Diagnostics; Abbot Diagnostics; Beckman Coulter; Dade Behring; Ortho-Clinical Diagnostics; Randox i Siemens Medical Solutions Diagnostics.

Zarejestrowano 3357 uczestników z całego świata. 632 wystawców prezentowało swoje produkty na wystawie, którą obejrzało 1529 osób. Stoisko Roche Diagnostics, w barwach marki cobas, mieściło się tuż przy wejściu, co powodowało, że każdy je odwiedzał, a królowa Beatrix była pierwszym gościem po otwarciu wystawy.

Wystawiono 1117 plakatów (w tym 54 z Polski), odbyły się 34 prezentacje prac

własnych. Aktywnym wykładowcą z naszego kraju była Pani profesor Grażyna Odrowąż-Sypniewska z Collegium Medicum w Bydgoszczy, która w sesji doniesień oryginalnych przedstawiła interesujący

wykład pt. „Website conception and information design.”

Codziennie równolegle odbywały się 3 sesje tematyczne przedpołudniowe i 3 popołudniowe oraz firmowe warsztaty.



Tematy prezentowane przez Roche Diagnostics w trakcie spotkań firmowych, to:

1. Modularny system preanalizy MPA – możliwości i zalety
2. **cobas** 6000 – nowa generacja systemów zintegrowanych
3. NT pro BNP – nowoczesny marker sercowy, wspólnie z firmą z Dade Behring.

Trudno było wyróżnić temat wiodący Zjazdu. Sesje tematyczne dotyczyły wszystkich dziedzin diagnostyki laboratoryjnej ze szczególnym uwzględnieniem genetyki. Wydaje się, że dano szansę autorom artykułów naukowych z ostatnich 2 lat na prezentację swoich osiągnięć.

Bardzo ciekawie przedstawiał się program imprez towarzyszących zjazdowi:

1. Ceremonia otwarcia, którą uświetniły występy Międzynarodowego Teatru Tańca z pokazami tańca nowoczesnego, jak i stylizowanego na ludowy taniec holenderski. Podczas ceremonii otwarcia wręczona została nagroda ufundowana przez firmę Roche dla Prof. Mathiasa M. Muellera z Wiednia za promowanie chemii klinicznej na rynku europejskim i jego zasługi nie tylko jako klinicysty, ale także jako nauczyciela i naukowca.
2. Wykład inauguracyjny i otwarcie wystawy, które swoją obecnością zaszczyliła Jej Wysokość Królowa Holandii Beatrix i dokonała uroczystego otwarcia wystawy.
3. Koncert muzyki klasycznej w wykonaniu Holenderskiej Orkiestry Kameralnej.
4. Gala Dinner – Congress Party, w stylu holenderskim. Na rozpoczęcie w takt werbli wkroczyli na salę statyści w strojach z epoki Rembrandta i odtworzyli na scenie obraz „Straż nocna”. Na rozległym terenie przyjęcia kongresowego przygotowano stoisko wyrobu holenderskich chodaków, poczęstunek-degustacja serów holenderskich oraz salę kinową z prezentacją filmów i kronik poświęconych Holandii.
5. Ceremonia zamknięcia Kongresu obejmowała jego podsumowanie, zaproszenie za rok do Brazylii na kongres międzynarodowy i do Insbruku za 2 lata na 18 Kongres IFCC. Atrakcją były pokazy akrobatyczne na rowerach.



