



ISSN 1644-8448
nakład: 1000 egz.

LabForum



cobas[®]
Life needs answers



Życzymy wyjątkowych Świąt Bożego Narodzenia oraz wszelkiej pomyślności i wielu sukcesów w nadchodzącym Nowym Roku wraz z serdecznymi podziękowaniami za dotychczasową współpracę

Szanowni Państwo,

Uprzejmie informujemy, że firma Roche Diagnostics Roche wprowadziła do sprzedaży nowe testy **cobas** HIV-1, HCV i genotypowanie HCV w krajach stosujących oznakowanie CE. Nowa generacja testów do diagnostyki molekularnej wykorzystuje unikalne technologie wykrywania dwóch regionów HIV-1 oraz dwóch sond dla HCV. Wszystkie trzy testy mogą być wykonane równocześnie w jednym przebiegu z użyciem systemu **cobas** 4800, umożliwiając większą elastyczność w zarządzaniu próbkami pacjentów. W kolejnych miesiącach zostanie wprowadzony test **cobas** HBV, który uzupełni menu testów do monitorowania wirerii i genotypowania. Łącznie z nowymi testami system **cobas** 4800 posiada 12 testów IVD o udokumentowanej wartości medycznej, umożliwiając laboratorium dostarczanie wiarygodnych wyników do podjęcia szybkich decyzji klinicznych.

Roche udostępnił także drugą wersję testu **cobas**[®] EGFR, który wykorzystuje próbki osocza krwi lub tkanki do wykrywania 42 mutacji genu EGFR u pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca kwalifikowanych do leczenia inhibitorami kinazy tyrozynowej. Walidacja testu do wykrywania mutacji w pozakomórkowym DNA nowotworu krążącym w osoczu krwi obwodowej umożliwia badanie pacjentów, u których nie jest możliwe pobranie biopsji tkanki. Dodatkowo nowy test pozwala na półilościowy pomiar zmutowanego DNA w próbce osocza, umożliwiając śledzenie progresji nowotworu.

W bieżącym numerze polecam lekturze II część rekomendacji dot. diagnostyki kobiet w ciąży zakażonych parwowirusem B19, artykuł na temat diagnostyki kiły oraz oznaczeń wykonywanych poza laboratorium.

Życzę miłej lektury,

Z poważaniem

Tomáš Petr

wraz z zespołem RDP

Spis treści:

Diagnostyka laboratoryjna zakażenia parwowirusem B19 u kobiet w ciąży, cz. II	3
Kiła – powracający problem	12
Oznaczenia wykonywane poza laboratorium (POCT) – rola diagnostyki laboratoryjnego	18

Sprostowanie:

Redaktor naczelny LabForum, w związku z publikacją w numerze 63 artykułu pt „Zastosowanie testu CINtec PLUS w wykrywaniu stanów przednowotworowych raka szyjki macicy” autorstwa lek. Martyny Trzeszcz informuje, iż wymieniony artykuł został opublikowany bez ostatecznej korekty redakcyjnej doktor Martyny Trzeszcz oraz w artykule zostały umieszczone skróty i pogrubienia bez zgody autora tekstu. Redaktor naczelny informuje także, iż dr Maciej Mazurec pełnił w odniesieniu do w/w artykułu rolę wyłącznie konsultanta ginekologicznego i nie jest współautorem tekstu.

Diagnostyka laboratoryjna zakażenia parvowirusem B19 u kobiet w ciąży, cz. II

Piotr Grabarczyk¹, Aleksandra Kalińska¹, Bogumiła Litwińska², Marzena Dębska³,
Zbigniew Celewicz⁴, Dorota Nowakowska⁵, Elżbieta Puacz⁶

2. REKOMENDACJE DOTYCZĄCE PROWADZENIA DIAGNOSTYKI LABORATORYJNEJ ZAKAŻENIA PARVOWIRUSEM B19 U KOBIET W CIĄŻY

2.1. Zlecenie badania laboratoryjnego

- 2.1.1.** Laboratorium diagnostyczne opracowuje, wdraża i stosuje procedurę zlecenia badań laboratoryjnych oraz udostępnia formularz zlecenia badania laboratoryjnego zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia o standardach jakości w medycznym laboratorium diagnostycznym. Laboratorium diagnostyczne wykonujące badania dostarcza zleceniodawcy formularz zlecenia badania laboratoryjnego oraz przekazuje informacje dotyczące sposobu pobierania materiału do badań, jego przechowywania i transportu, a następnie zleceniodawca potwierdza pisemnie zapoznanie się z nimi.
- 2.1.2.** Laboratorium diagnostyczne prowadzi dokumentację medyczną (w tym zlecenia badań laboratoryjnych), przechowuje i przetwarza zgodnie z przepisami dotyczącymi dokumentacji medycznej.

2.2. Pobieranie i przygotowanie materiału do badań laboratoryjnych

- 2.2.1.** Należy ściśle przestrzegać zaleceń producentów odczynników, próbek i systemów pobranych stosowanych do pozyskania materiału do badań (stosowanych antykoagulantów) oraz parametrów wirowania. Systemy służące do pobierania próbek pochodzące od różnych producentów różnią się między sobą, dlatego przestrzeganie warunków postępowania z materiałem biologicznym może mieć istotny wpływ na uzyskane wyniki.
- 2.2.2.** W przypadku badań serologicznych należy pobierać krew na skrzep (najlepiej do próbki próżniowej z żelą separującym, którą trzeba odwirować) i przesłać do laboratorium wykonującego badanie. Laboratorium diagnostyczne informuje, jaka objętość próbki jest wymagana, uwzględniając: 1/ wymagania producenta stosowanego testu, 2/ potencjalne powtórzenie badania w przypadku uzyskania nieważnego wyniku badania oraz 3/ dostępność materiału (objętość krwi pobranej od dziecka/ płodu powinna być mniejsza niż od osoby dorosłej). W przypadku braku dostępu do próbki surowicy dopuszcza się wykonanie badania w osoczu (krew pobrana na EDTA w systemie zamkniętym).
- 2.2.3.** Krew na badania molekularne należy pobierać na skrzep wyłącznie do próbek próżniowych z żelą separującym w systemie zamkniętym i przesłać po odwirowaniu. Otwarcie próbek powinno nastąpić dopiero w laboratorium diagnostycznym wykonującym badanie z zachowaniem najwyższych procedur chroniących próbki przed zanieczyszczeniem. Takie postępowanie zmniejsza ryzyko kontaminacji na etapie przedanalizy i ogranicza prawdopodobieństwo otrzymania wyników fałszywie dodatnich. Dopuszcza się wykonanie badania w osoczu, przy czym należy stosować próbki z antykoagulantem – EDTA. Nie wolno pobierać krwi do próbek z antykoagulantami będącymi inhibitorami PCR (np. z heparyną). Objętość pobranego materiału powinna uwzględniać czynniki podane w pkt. 2.2.2.
- W przypadku zlecenia na wykonanie badania serologicznego i molekularnego w jednej próbce pacjenta należy wyłącznie pobierać krew (na skrzep lub EDTA) do próbek próżniowych.
- 2.2.4.** Probówka z pobranym materiałem powinna zawierać następujące dane pacjenta: 1/ imię i nazwisko, 2/ PESEL, 3/ datę pobrania lub 4/ kod paskowy.

Zespół autorów:

- 1 Instytut Hematologii
i Transfuzjologii w Warszawie
- 2 Narodowy Instytut Zdrowia
Publicznego - Państwowy
Zakład Higieny w Warszawie
- 3 II Klinika Położnictwa
i Ginekologii Centrum
Medycznego Kształcenia
Podyplomowego, Pracownia
Diagnostyki Prenatalnej
Szpitala Bielańskiego
w Warszawie
- 4 Klinika Medycyny Matczyno-
Płodowej i Ginekologii
Pomorskiego Uniwersytetu
Medycznego w Szczecinie
- 5 Klinika Medycyny Matczyno-
Płodowej i Ginekologii
Instytutu Centrum Zdrowia
Matki Polki w Łodzi,
III Katedra Ginekologii
i Położnictwa Uniwersytetu
Medycznego w Łodzi
- 6 Krajowa Izba Diagnostów
Laboratoryjnych

2.3. Transport materiału do badań

2.3.1. Informacje dotyczące pobierania materiału do badań, jego przechowywania i transportu.

Należy pamiętać, iż rodzaj badanego materiału (surowica lub osocze), system pobierania i transport muszą być zawsze zwalidowane ze stosowanym testem diagnostycznym w celu uniknięcia błędów przedanalitycznych oraz zapewnienia wiarygodnych wyników zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 23.03.2006 w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych [Dz.U. nr 61 poz. 435 z późn. zm.]. Warunki i czas transportu pobranej krwi muszą spełniać zalecenia laboratorium diagnostycznego wykonującego badania, patrz pkt. 2.1.1.

2.3.2. Materiał do badań laboratoryjnych jest traktowany jako potencjalnie zakaźny i musi być przesłany do laboratorium zgodnie z zasadami transportu tego typu materiału. W skrócie - szczelny pojemnik z materiałem biologicznym powinien być umieszczony w większym pojemniku zabezpieczającym przed zgnieceniem i zawierającym absorbent wchłaniający materiał biologiczny w przypadku ewentualnego uszkodzenia próbowki. Ten pojemnik należy następnie umieścić w opakowaniu oznakowanym „materiał zakaźny” z odpowiednimi wkładkami chłodzącymi umożliwiającymi zachowanie wymaganej temperatury w czasie transportu.

2.4. Przyjmowanie materiału do badań

2.4.1. Laboratorium opracowuje, wdraża i stosuje procedury przyjmowania, rejestrowania i oznakowania materiału do badań.

2.4.2. Laboratorium sprawdza zgodność danych ze zlecenia z oznakowaniem materiału oraz przydatność materiału do badania.

2.4.3. W przypadku stwierdzenia przez laboratorium niezgodności otrzymanego materiału z wymaganiami dotyczącymi pobierania, transportu lub innych nieprawidłowości powodujących, że materiał nie może być wykorzystany do badania pracownik zgłasza ten fakt kierownikowi laboratorium lub osobie przez niego upoważnionej, którzy w razie potwierdzenia niezgodności mogą zakwalifikować materiał jako niezdatny do badania i odmówić wykonania badania. Odmowę wykonania badania odnotowuje się w dokumentacji. Dalsze postępowanie laboratorium uzgadnia ze zleceniodawcą.

2.4.4. Laboratorium prowadzi dokumentację dotyczącą sposobu postępowania z materiałem biologicznym przed i po wykonaniu badania. W przypadku archiwizacji próbek uwzględnia się miejsce, czas oraz temperaturę ich przechowywania.

2.5. Wymagania dotyczące stosowanej aparatury i testów diagnostycznych

2.5.1. Do diagnostyki medycznej *in vitro* należy stosować wyroby medyczne, tj. aparaturę i testy diagnostyczne spełniające wymagania określone w ustawie o wyrobach medycznych. W związku z powyższym aparatura i odczynniki muszą posiadać deklarację zgodności z dyrektywą 98/79/EC. Tego rodzaju dokument, jak również inne certyfikaty renomowanych instytucji zajmujących się ochroną zdrowia (np. FDA) służą potwierdzeniu jakości produktu, w tym przeznaczonego do laboratoryjnych badań markerów zakażenia B19V.

2.5.2. Stosowane testy diagnostyczne powinny spełniać wymagania zasadnicze określone przez Ministra Zdrowia. Powyższe musi być potwierdzone wpisem do bazy danych o wyrobach medycznych przeznaczonych do używania w Rzeczypospolitej Polskiej prowadzonej przez Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów

Medycznych i Produktów Biobójczych. Prezes tego urzędu udziela informacji publicznej o zawartości bazy na wniosek zainteresowanego podmiotu (np. wytwórcy, dystrybutora czy laboratorium), stąd zaleca się weryfikację czy usługodawca spełnia wymagania gwarantujące jakość oferowanego produktu.

2.5.3. Stosowanie testów PCR wytworzonych przez laboratorium (typu *home-made*) jest możliwe wyłącznie po przeprowadzeniu pełnej walidacji metody ze szczególnym uwzględnieniem czułości i swoistości.

2.5.4. Wyroby medyczne (aparaty i/lub odczynniki) powinny być właściwie dostarczone, prawidłowo zainstalowane i utrzymywane oraz używane zgodnie z przewidzianym zastosowaniem, a użytkownik jest obowiązany do przestrzegania instrukcji użytkowania. Badania należy wykonywać i interpretować ich wyniki zgodnie z instrukcją wytwórcy testów diagnostycznych.

2.5.5. Wymagania dotyczące testów wykrywających DNA parwowirusa B19. Badania metodami biologii molekularnej charakteryzują się bardzo wysoką czułością i wykorzystywane są do wykrywania DNA parwowirusa B19 w surowicy lub osoczu. Niektóre testy są dopuszczone do wykonywania badań w pełnej krwi oraz płynie owodniowym.

2.5.5.1. Do wykrywania DNA B19V zaleca się stosowanie metody ilościowej. Ten rodzaj badania umożliwia odróżnienie przewlekłego zakażenia relatywnie częstego w populacji, zazwyczaj charakteryzującego się niską zawartością DNA ($<10^4$ IU/ml), któremu nie towarzyszą objawy kliniczne od zakażenia w ostrej fazie z wysokim stężeniem DNA i współwystępującymi objawami chorobowymi.

2.5.5.2. Czułość analityczna testu oraz wynik badania powinny być wyrażane w jednostkach międzynarodowych na mililitr (IU/ml). Taki sposób charakteryzowania testu oraz wyrażania wyniku umożliwia zarówno porównywanie testów, jak i wyników uzyskiwanych różnymi testami w różnych laboratoriach.

2.5.5.3. Test stosowany do wykrywania DNA B19V musi wykrywać wszystkie znane genotypy wirusa (1-3) z taką samą czułością. Czułość analityczna wykrywania form polimorficznych wyrażona w 95% LOD (*limit of detection* – granica wykrywalności) w IU/ml musi być potwierdzona przez wytwórcy testu odpowiednimi dokumentami. Ocena czułości analitycznej i określenie wykrywalności genotypów 1-3 parwowirusa B19 dokonywane są poprzez badanie specjalnie zaprojektowanego panelu rozcieńczeń standardu międzynarodowego o ściśle określonym stężeniu parwowirusa B19 wyrażonym w jednostkach międzynarodowych.^{40,41}

2.5.5.4. W przypadku monitorowania DNA-emii B19V konieczne jest analizowanie tego samego rodzaju materiału biologicznego (np. tylko surowicy lub tylko pełnej krwi) ze względu na różnice stężenia B19V w różnych materiałach klinicznych. Stężenie DNA B19V jest najwyższe w pełnej krwi, niższe w surowicy i osoczu.⁴² Porównanie wyników uzyskanych w próbkach jednocześnie pobranych od zakażonej matki i płodu wykazuje większą DNA-emię, o kilka rzędów wielkości, we krwi zakażonego płodu aniżeli we krwi matki.

2.5.5.5. Należy stosować wyłącznie testy wyposażone w kontrolę wewnętrzną (IC – *internal control*). W przypadku uzyskania wyniku negatywnego IC konieczne jest wdrożenie postępowania wskazanego przez producenta testu. Analiza wyników kontroli wewnętrznej pozwala na ocenę prawidłowości wykonania całego badania – od ekstrakcji kwasów nukleinowych po uzyskanie wyniku



cobas z 480

· system do wykrywania B19V metodą PCR w czasie rzeczywistym (RT PCR)

reakcji RT PCR. Taka procedura umożliwia wykluczenie obecności w badanej próbce inhibitorów reakcji enzymatycznych zachodzących w trakcie procedury diagnostycznej. Wykonanie badania rozcieńczonej próbki (eluatu otrzymanego w procesie ekstrakcji kwasów nukleinowych) umożliwia identyfikację zakażenia i określenie rzeczywistego poziomu DNA w przypadku otrzymania wyniku fałszywie ujemnego B19V przy równocześnie uzyskanym wyniku ujemnym IC. Takie wyniki spowodowane są wysoką wiremią B19V.

2.5.5.6. W przypadku każdego wyniku, a zwłaszcza ujemnego należy przeprowadzać analizę krzywej fluorescencji. Takie działanie umożliwia identyfikację wyników fałszywie ujemnych będących następstwem wiremii przekraczającej górny próg liniowości testu ilościowego.³⁸

2.5.5.7. Laboratorium jest zobowiązane do wykonywania minimum 100 badań ilościowych DNA B19V na rok w celu zapewnienia wymaganej jakości wykonywanych badań molekularnych.

2.5.5.8. Należy ściśle zachować procedury ograniczające kontaminację. Zalecenie to podyktowane jest specyfiką metody PCR, która z jednej strony polega na namnażaniu fragmentów genomu wirusa, z drugiej zaś na ich detekcji. Dodatkowo, w przypadku B19V istnieje znaczące prawdopodobieństwo badania próbek ze skrajnie wysoką wiremią.

W szczególności wskazane jest wykonywanie ekstrakcji kwasów nukleinowych i przygotowywanie reakcji RT PCR oraz jej przeprowadzanie w termocyklerze w różnych pomieszczeniach (oddzielenie w części preamplifikacyjnej i postamplifikacyjnej). Również ważne jest stosowanie rękawiczek beztalkowych (talk zwiększa ryzyko przeniesienia amplikonów), a także dekontaminacja powierzchni przy pomocy roztworów podchlorynu sodu (bielinki) lub preparatów typu DNA-away oraz naświetlanie pomieszczeń lampami UV. Należy stosować wyłącznie drobny sprzęt jednorazowego użytku (m.in. końcówki z filtrem do pipet, probówki, pipetki).

2.5.6. Wymagania dotyczące testów wykrywających przeciwciała skierowane przeciwko parwovirusowi B19

W przypadku badań serologicznych bardzo istotna jest jakość stosowanych testów diagnostycznych. Polskie doświadczenia wykazały, że używanie nieodpowiednich testów prowadzi do otrzymywania większej liczby wyników fałszywych/nieinformatywnych. W doborze odpowiednich testów pomocne jest śledzenie aktualnego piśmiennictwa naukowego, w którym na podstawie badań prowadzonych w niezależnych ośrodkach naukowych publikowane są analizy dotyczące charakterystyki/porównania dostępnych na rynku zestawów do oznaczania przeciwciał anty-B19V.⁴³

2.5.6.1. Przy wyborze testu należy brać pod uwagę swoistość, czułość oraz powtarzalność i odtwarzalność uzyskiwanych wyników. Jest to bardzo istotne w badaniu przeciwciał klasy IgM, które są markerem ostrego zakażenia.

2.5.6.2. W przypadku badania przeciwciał klasy IgG, wynik ilościowy pomaga w różnicowaniu zakażenia przewlekłego i niedawno przebytego.

2.6. Zapewnienie jakości badań laboratoryjnych

2.6.1. Laboratorium diagnostyczne prowadzi wewnętrzną kontrolę jakości badań i uczestniczy w zewnętrznej kontroli jakości zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia co najmniej raz w roku.

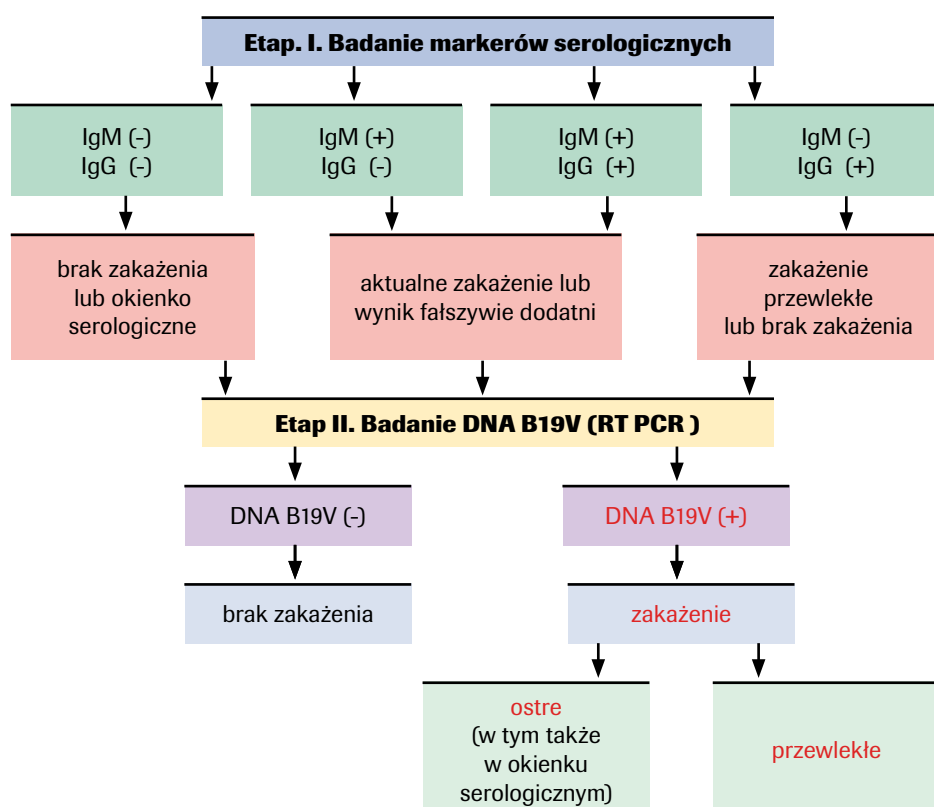
2.6.2. Kierownik laboratorium lub wyznaczony przez niego pracownik odpowiada za prowadzenie wewnętrznej kontroli jakości oraz uczestnictwo w programach zewnętrznej oceny jakości laboratorium diagnostycznego.

2.6.3. Dokumentacja kontroli jakości badań jest przechowywana przez okres 20 lat zgodnie z przepisami dotyczącymi dokumentacji medycznej.

2.7. Algorytm postępowania diagnostycznego oraz ogólne zasady interpretacji wyników

2.7.1. Diagnostyka zakażenia parwowirusem B19 u kobiet w ciąży winna łączyć badania: swoistych przeciwciał, zarówno klasy IgG jak i IgM, metodami immunoenzymatycznymi oraz DNA B19V metodami biologii molekularnej.

2.7.2. Sposób prowadzenia laboratoryjnej diagnostyki zakażenia B19V u kobiet w ciąży został przedstawiony na Schemacie 1.



2.7.2.1. W sytuacji, kiedy przeciwciała anti-B19V nie są wykrywane w surowicy kobiety ciężarnej jedynym instrumentem diagnostycznym potwierdzającym infekcję jest badanie metodą molekularną. Ma to szczególne znaczenie u kobiet krótko po ekspozycji na zakażenie - w okienku serologicznym. Badanie przeciwciał anti-B19V należy wykonywać nie wcześniej niż 2 tygodnie po kontakcie z osobą zakażoną, np. z rumieniem zakaźnym.

2.7.2.2. W przypadku wykrycia przeciwciał anti-B19V klasy IgM bądź jednocześnie IgM i IgG badanie RT PCR pozwala potwierdzić aktualną infekcję, a tym samym może



cobas z 480

· system do wykrywania B19V metodą PCR w czasie rzeczywistym (RT PCR)

1 Algorytm postępowania

diagnostycznego u kobiet w ciąży z podejrzeniem zakażenia parwowirusem B19

być pomocne w podjęciu decyzji co do dalszego postępowania terapeutycznego. Swoistość pierwotnego wyniku dodatniego w klasie IgM musi być potwierdzona wykryciem DNA B19V lub/i udokumentowaniem serokonwersji.

2.7.2.3. Wobec wykrytych przeciwciał anty-B19V klasy IgG u kobiety ciężarnej aktualną infekcję można wykluczyć wykonując badanie metodą molekularną. W przypadku potwierdzenia obecności DNA B19V wynik badania ilościowego pomaga rozstrzygnąć czy mamy do czynienia z zakażeniem, do którego doszło w ciągu ostatnich kilku miesięcy czy też z zakażeniem przewlekłym.

W Tabeli I przedstawiono charakterystykę markerów wirusologicznych B19V u kobiet w ciąży zakażonych parwowirusem B19 (dane IHiT, 2014 r.). Wśród 30 ciężarnych największy odsetek stanowiły pacjentki z jednocześnie wykrytymi przeciwciałami klasy IgM i IgG, mniejszy ze specyficznymi przeciwciałami jednej lub drugiej klasy. W przedstawionych przypadkach badanie metodą molekularną potwierdziło zakażenie, a ilościowy wynik był pomocny w ocenie przebiegu/fazy infekcji. Dwa przypadki (6,7%), gdzie jedynym markerem było DNA wirusa ilustrują znaczenie metod biologii molekularnej w diagnostyce zakażenia u kobiet ciężarnych bez wykrywalnych przeciwciał.

Tabela I. Markery wirusologiczne u kobiet ciężarnych w momencie zdiagnozowania zakażenia B19V (IHiT, 2014 r.)

Markery serologiczne	N (%)	Średnie stężenie DNA B19V [IU/ml]
IgM (-) IgG (-)	2 (6,7)	$7,2 \times 10^8$
IgM (+) IgG (-)	1 (3,3)	$5,8 \times 10^7$
IgM (+) IgG (+)	20 (66,7)	$7,9 \times 10^5$
IgM (-) IgG (+)	7 (23,3)	$9,6 \times 10^3$

Zarówno obserwacje dotyczące pacjentów, jak i zdrowych dawców krwi wykazują, że DNA B19V po okresie bardzo wysokiej wiremii może utrzymywać się na niskim, jednak wciąż wykrywalnym poziomie we krwi przez wiele lat. Takiej przewlekłej infekcji z niskim stężeniem DNA, która jest w pełni kontrolowana przez układ odpornościowy zazwyczaj nie towarzyszą objawy kliniczne i nie wymaga ona leczenia.^{13,25,44,45}

2.7.3. Postępowanie diagnostyczne u płodów z podejrzeniem zakażenia parwowirusem B19 powinno opierać się na badaniu RT PCR.

Wiremię u płodu można określić jedynie na podstawie badania krwi płodu uzyskanej drogą kordocentezy (nakłucie żyły pępowinowej pod kontrolą USG). Zabieg kordocentezy jest działaniem inwazyjnym i jest obarczony około 1% ryzykiem powikłań. Wskazaniem do kordocentezy może być podejrzenie niedokrwistości u płodu, ale zabieg ten jest również wykonywany z innych wskazań, na przykład w celu oceny kariotypu płodu. Po potwierdzeniu niedokrwistości rozpoczyna się leczenie transfuzjami dopłodowymi specjalnie do tego celu przygotowanych KKCZ (krwinki O Rh minus, niereagujące z surowicą matki, filtrowane, napromieniane).

Ze względu na niedojrzałość układu immunologicznego płodu, zwłaszcza w pierwszej połowie ciąży, podstawą diagnostyki zakażenia u płodu nie jest ocena przeciwciał, ale bezpośrednie wykrywanie wirusa. W przypadku wykrycia przeciwciał klasy IgG u płodu

nie ma możliwości potwierdzenia czy zostały one wytworzone przez płód czy ich obecność jest wynikiem biernego przeniesienia przeciwciał matki przez barierę łożyskową. Obecne we krwi matki przeciwciała anty-B19V nie zawsze są wykrywane we krwi płodu, co świadczy o wybiórczym transporcie przeciwciał neutralizujących przez łożysko. W Tabeli II przedstawiono trzy przypadki zdiagnozowania przeniesienia zakażenia B19V od matki na płód za pomocą metody RT PCR. Porównano status markerów serologicznych zakażenia B19V u kobiety ciężarnej i płodu. We wszystkich przypadkach u płodu obserwowano wiramię wyższą o przynajmniej dwa rzędy wielkości w porównaniu do matki.



cobas z 480
· system do wykrywania
B19V metodą PCR
w czasie rzeczywistym
(RT PCR)

Tabela II. Potwierdzenie przeniesienia zakażenia B19V od matki na płód metodą RT PCR oraz porównanie statusu serologicznych markerów diagnostycznych u kobiet ciężarnych i płodów (IHIT, 2014 r.)

Nr przypadku	Matka			Płód		
	IgG	IgM	DNA B19V [IU/ml]	IgG	IgM	DNA B19V [IU/ml]
1	(+)	(-)	2,1x10 ⁷	(-)	(-)	2,3x10 ⁹
2	(+)	(+)	4,3x10 ⁴	(-)	(-)	1,7x10 ⁸
3	(+)	(+)	8,6x10 ⁶	(-)	(-)	3,9x10 ⁸

2.7.4. W sytuacji wystąpienia powikłań u płodu monitorowanie DNA-emii B19V może być pomocne w podjęciu decyzji o postępowaniu leczniczym, np. podaniu transfuzji dopłodowej czy immunoglobulin.⁴⁶

2.8. Formułowanie, interpretacja i wydawanie wyników

2.8.1. Formularz sprawozdania z badań parwowirusa B19 musi być zgodny z rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 21 grudnia 2010 r. w sprawie dokumentacji medycznej.

2.8.2. Wyniki badania markerów zakażenia B19V muszą być autoryzowane przez diagnostę laboratoryjnego posiadającego odpowiednią specjalizację lub/i co najmniej dwuletnie doświadczenie w tej dziedzinie diagnostyki lub lekarza będącego jednocześnie diagnostą laboratoryjnym czy też posiadającego wiedzę i umiejętności w zakresie wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej uzyskanych w ramach specjalizacji zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 11.12.2012 roku w sprawie wykazu specjalizacji uprawniających lekarza do samodzielnego wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej w medycznym laboratorium diagnostycznym [Dz.U. 2012 poz. 1420] i posiadającego co najmniej dwuletnie doświadczenie w tej dziedzinie diagnostyki. W przypadku badań DNA B19V osoba autoryzująca wynik powinna legitymować się doświadczeniem w diagnostyce molekularnej wirusów.

2.8.3. Interpretacja uzyskanych wyników badań przeciwciał anty-B19V klasy IgM i IgG oraz formułowanie wyniku na sprawozdaniu muszą być zgodne z zaleceniami producenta dostępnymi w ulotce załączonej do testu. Wyniki mają format jakościowy lub ilościowy (wyrażane są w jednostkach na mililitr [U/ml]) i interpretowane są w następujący sposób:

- dodatni (+) (odpowiednio w klasie IgM lub IgG) – co oznacza: stwierdzono obecność przeciwciał (odpowiednio w klasie IgM lub IgG),
- ujemny (-) – nie stwierdzono obecności przeciwciał (odpowiednio w klasie IgM lub IgG),

- wątpliwy (+/-) (odpowiednio w klasie IgM lub IgG) – przeciwciała na granicy wartości wyniku dodatniego i ujemnego (odpowiednio w klasie IgM lub IgG). Wynik ilościowy najlepiej wyrażać w jednostkach międzynarodowych, gdyż wówczas możliwe jest porównanie rezultatów badań różnymi testami oraz interpretowanie ich w oparciu o piśmiennictwo światowe posługujące się tymi samymi jednostkami. W przypadkach stosowania innych jednostek te same wartości mogą być nieporównywalne.

2.8.4. Wyniki badań ilościowych DNA B19V muszą zawierać informację o rodzaju badanego materiału, a także muszą być podawane w jednostkach międzynarodowych [IU/ml]. Są one interpretowane w następujący sposób:

- wykryto DNA B19V – obecny parwovirus B19 we krwi kobiety ciężarnej – wartość stężenia podana w IU/ml (aktualne zakażenie B19V – poziom DNA pomaga w rozstrzygnięciu czy mamy do czynienia z zakażeniem toczącym się od niedawna czy ma ono charakter przewlekły),
- nie wykryto DNA B19V – brak parwovirusa B19 we krwi kobiety ciężarnej (brak aktualnego zakażenia B19V).

2.8.5. Formularz sprawozdania z badania laboratoryjnego może być przekazany w formie elektronicznej z zachowaniem wymagań prawnych.

2.8.6. Medyczne laboratorium diagnostyczne archiwizuje wyniki przez czas określony w przepisach dotyczących dokumentacji medycznej [rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 21 grudnia 2010 r. w sprawie dokumentacji medycznej].

W Tabeli III dodatkowo przedstawiono postępowanie diagnostyczne w sytuacji szczególnej – gdy badanie DNA B19V nie jest dostępne.

2.9. Postępowanie w przypadku stwierdzenia zakażenia B19V u kobiety w ciąży

2.9.1. W przypadku stwierdzenia zakażenia (patrz Schemat 1, Tabela III) na sprawozdaniu z badania należy umieścić komentarz "Pacjentka w ciąży, u której potwierdzono zakażenie powinna zostać skierowana do ośrodka położniczego na III poziomie referencyjności w celu przeprowadzenia dalszej specjalistycznej diagnostyki oraz monitorowania dobrostanu płodu". W ośrodku położniczym na III poziomie referencyjności płód będzie monitorowany w kierunku objawów niedokrwistości poprzez wykonanie badania ultrasonograficznego, w tym MCA-PSV (zazwyczaj 1 raz w tygodniu aż do 20 tygodnia po ekspozycji).

2.9.2. Prenatalne podejrzenie niedokrwistości u płodu postawione na podstawie nieprawidłowych przepływów w tętnicy środkowej mózgu płodu (MCA PSV - wzrost MCA PSV > 1,5 krotności mediany - MoM) z towarzyszącym lub nie obrzękiem płodu) jest wskazaniem do pobrania krwi płodu. U płodów monitorowanych z powodu podejrzenia zakażenia/infekcji B19V pobiera się próbkę krwi w celu oznaczenia parametrów morfologicznych (stężenie hemoglobiny, liczba płytek krwi oraz retikulocytów) oraz wykonania badania DNA B19V i potwierdzenia przeniesienia zakażenia B19V od matki do płodu. Dalsze postępowanie uzależnione jest od stanu płodu i wyników badań laboratoryjnych. Najczęściej, w przypadku niedokrwistości spowodowanej zakażeniem B19V wystarczającym postępowaniem jest jedna – dwie transfuze dopłodowe. Istotnym czynnikiem rokowniczym wydaje się być liczba erytroblastów we krwi obwodowej, ponieważ wysoka erytroblastozę wskazuje na możliwość samoistnej regeneracji układu czerwono krwinkowego. U płodów z ciężkim obrzękiem uogólnionym, kardiomegalią oraz z objawami niewydolności serca można dodatkowo rozważyć leczenie wspomagające digoksyną.

Tabela III. Zasady interpretacji wyników badania markerów serologicznych zakażenia B19V u kobiet w ciąży oraz dalsze postępowanie diagnostyczne w przypadku braku dostępu do badania DNA B19V

IgM	IgG	Wstępna interpretacja wyniku	Dalsze postępowanie diagnostyczne w przypadku braku dostępu do badania DNA B19V (sytuacja szczególna)
-	-	Brak zakażenia, pacjentka nie przechodziła zakażenia lub wczesny etap zakażenia (okienko serologiczne)	Wykluczenie/potwierdzenie zakażenia - powtórzenie za 2 tygodnie badania swoistych IgM i IgG
+	-	Wczesny etap zakażenia	Potwierdzenie zakażenia - powtórzenie za miesiąc badania swoistych IgM i IgG (powinny pojawić się IgG)
+	+	Wczesny etap zakażenia	Potwierdzenie zakażenia - powtórzenie za miesiąc badania swoistych IgM i IgG w celu obserwacji serokonwersji (zanik IgM przy wzroście stężenia IgG)
-	+	Aktualne zakażenie lub zakażenie przebyte w przeszłości	Brak możliwości wykluczenia/potwierdzenia zakażenia bez wykonania badania DNA B19V

2.9.3. Kobiety ciężarne leczone z powodu poważnych następstw parwowirusy u płodu powinny znajdować się pod ścisłym nadzorem lekarskim, ponieważ obrzęk uogólniony płodu może stanowić zagrożenie dla kobiety w ciąży w mechanizmie rozwoju tzw. zespołu lustrzanego („mirror syndrome”).⁴⁷ Wystąpienie objawów tego zespołu u kobiety ciężarnej przy utrzymywaniu się objawów u płodu (obrzęki uogólnione, w krańcowym stadium niewydolność oddechowo-kръżeniowa) stanowi zagrożenie życia i jest uważane za wskazanie do zakończenia ciąży niezależnie od okresu ciąży.

3. PODSUMOWANIE

Parwovirus B19 jest patogenem, który u osób immunokompetentnych rzadko wywołuje groźne powikłania poinfekcyjne. Kobiety w ciąży są narażone na ryzyko wystąpienia powikłań, które stanowią istotne zagrożenie dla płodu. Prawidłowa diagnostyka zakażenia parwowirusem B19V (metodami serologicznymi i molekularnymi) polega na badaniu swoistych przeciwciał oraz na ilościowej ocenie DNA wirusa we krwi. W sytuacji braku dostępu do metod biologii molekularnej potwierdzenie ostrego zakażenia w przypadku wyniku dodatniego w klasie IgM wymaga kolejnego oznaczenia metodami immunoenzymatycznymi oraz udokumentowania serokonwersji. Potwierdzenie przeniesienia zakażenia u płodu winno być oparte na badaniu DNA parwowirusa B19. Również ważne jest monitorowanie zakażenia B19V metodą RT PCR przy wskazaniach do kontrolowania obrazu klinicznego czy skuteczności leczenia płodu.

Ze względu na ryzyko poważnych powikłań, włącznie z zagrożeniem dla życia płodu, ostateczny wynik potwierdzający zakażenie zawsze powinien zawierać komentarz wskazujący na konieczność wykonania dalszej specjalistycznej diagnostyki i objęcia kobiety w ciąży odpowiednią opieką medyczną.

Piśmiennictwo dostępne w redakcji

Kiła – powracający problem

Agnieszka Kotnis-Gąska¹, Bernadetta Jakubowicz¹, Iwona Martyka¹, Maciej Pastuszczyk²,
Jolanta Kędzierska¹

Zespół autorów:

1. Zakład Mikrobiologii
Szpitala Uniwersyteckiego
w Krakowie, Pracownia
Diagnostyki Molekularnej
i Immunodiagnostyki
Kierownik: Dr n. biol. Jolanta
Kędzierska
2. Oddział Kliniczny
Dermatologii Szpitala
Uniwersyteckiego w Krakowie
Kierownik: Prof. dr hab. med.
Anna Wojas-Pelc

WSTĘP

Kiła to choroba przenoszona głównie drogą płciową, którą wywołuje krętek błądy (*Treponema pallidum*) wykryty w 1905 r. przez Schaudinna i Hoffmanna. *Treponema pallidum* jest Gram-ujemną spiralną bakterią o niezwykle ubogim metabolizmie i czasie replikacji wynoszącym od 23 do 33 godzin. Patogen jest wrażliwy na wysoką temperaturę, wysuszenie oraz środki antyseptyczne np. mydło. Tym samym poza organizmem gospodarza szybko ginie. Diagnostykę zakażenia komplikuje fakt, że dotychczas nie opracowano metody hodowli *Treponema pallidum*, a jedynym naturalnym gospodarzem bakterii jest człowiek.¹

Do zakażenia dochodzi prawie wyłącznie przez kontakt seksualny z osobą chorą na kiłę. Rzadziej zakażenie może nastąpić wewnątrzmacicznie (zakażenie dziecka przez chorą matkę) lub poprzez kontakt z zakażonym materiałem biologicznym w czasie transfuzji, przy przeszczepieniu organów. Znane są też przypadki zakażenia w czasie kontaktu powłok ciała z zakażonym materiałem biologicznym, np. osób pracujących w laboratorium, lekarzy badających chorych ze zmianami.²

Zakażenie krętkiem błądym dzieli się na wczesne (do 2 lat od zakażenia), głównie manifestujące się zmianami skórnymi i śluzówkowymi oraz późne (powyżej 2 lat od zakażenia), na obraz którego, obok zmian skórnych składają się między innymi objawy ze strony układu nerwowego i krążenia. W kiłę wczesnej wyróżnia się kiłę I okresu, kiedy można stwierdzić tzw. objaw pierwotny, czyli owrzodzenie będące miejscem wniknięcia krętków do organizmu, występujący najczęściej na narządach płciowych i kiłę II okresu objawiającą się osutkami na skórze, stanowiącymi przejaw obecności krętków w krwioobiegu. Warto podkreślić, że w przebiegu zakażenia między okresami, w których pacjent prezentuje objawy występują okresy bezobjawowe (nawrotowość przebiegu), co oznacza, że chory może mieć kiłę późną i nie manifestować objawów klinicznych (tzw. kiła utajona późna). Co najbardziej interesujące, choroba nieleczona może ulec samowyleczeniu bez konsekwencji dla pacjenta, ale może też postępować skrycie lub skąpoobjawowo prowadząc do poważnych i zwykle nieodwracalnych zmian narządowych.²

EPIDEMIOLOGIA

Kiła nadal stanowi istotny problem epidemiologiczny. Światowa Organizacja Zdrowia szacuje, że rocznie na świecie dochodzi do około 11 milionów nowych zachorowań. Od 2000 roku odnotowano istotny wzrost zachorowań na kiłę zarówno w krajach europejskich jak i Ameryce Północnej, gdzie choroba ta szerzy się głównie w środowiskach homoseksualnych oraz wśród osób zakażonych ludzkim wirusem niedoboru odporności (HIV).³

Pod koniec lat 60-tych współczynnik zapadalności na kiłę w Polsce wynosił 52 zachorowania na 100 tys. ludności, co uznano za epidemię choroby. W latach 90-tych współczynnik ten zmniejszył się niemal 15-krotnie. W Polsce od 2006 roku współczynnik zapadalności na kiłę utrzymuje się na względnie stałym poziomie i wynosi ok. 2-3 przypadki na 100 tys. ludności. Biorąc jednak pod uwagę, że wzrasta liczba przypadków kiły wrodzonej (w 2012 roku aż 36 osób), liczba chorych z kiłą nabytą może być niedoszacowana.²

POLSKA SYFILIDOLOGIA

W dzisiejszych czasach badania diagnostyczne w kierunku kiły można wykonać w Polsce

w każdym województwie, a leczeniem zajmują się zwykle ośrodki dermatologiczne. Najważniejszy jednak wkład w obecną organizację diagnostyki i leczenia chorób przenoszonych drogą płciową, w tym kiły, ma Państwowy Instytut Wenerologiczny w Warszawie (obecnie Katedra Dermatologii i Wenerologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego). Instytut został powołany w 1949 r. i pełnił rolę krajowego ośrodka referencyjnego w dziedzinie wenerologii. Zadaniem tej jednostki było między innymi opracowywanie metod zwalczania chorób wenerycznych, ze szczególnym uwzględnieniem działań edukacyjnych.⁴

Duże zasługi na polu diagnostyki przyniosła działalność Ośrodka Diagnostyczno-Badawczego Chorób Przenoszonych Drogą Płciową w Białymstoku założonego w 1959 roku, gdzie prowadzono badania naukowe nad patogenезą, diagnostyką i leczeniem zakażenia krętkiem bladym, oparte także na modelu kiły doświadczalnej. W latach sześćdziesiątych powstała w tym ośrodku pierwsza w Polsce pracownia odczynu immobilizacji krętków białych, czyli tzw. odczyn Nelsona-Mayera (TPI – *Treponema pallidum immobilization*), która istnieje do chwili obecnej. W ośrodku opracowano także technologię produkcji odczynników do odczynu FTA i FTA-ABS: antygen krętkowy (*Treponema pallidum* szczep Nicholasa), ultrasonat krętków niepatogennych (*Treponema phagedenis* szczep Reitera) oraz surowica przeciw ludzkim gamma-globulinom znakowana fluoresceiną. W 1977 roku Ministerstwo Zdrowia i Opieki Społecznej wydało pozwolenie na produkcję odczynników na potrzeby placówek diagnostycznych w całym kraju. Wytwarzane do chwili obecnej odczynniki posiadają deklaracje zgodności i oznakowane są znakiem CE. Produkcja ich jest zgodna z Dyrektywą 98/79/WE w sprawie wyrobów medycznych używanych do diagnozy *in vitro*.⁵

DIAGNOSTYKA KIŁY

Jak wspomniano, dotychczas nie opracowano metod hodowli krętka bladego. Stąd diagnostyka kiły opiera się przede wszystkim na wykrywaniu przeciwciał produkowanych w przebiegu zakażenia. Dotychczas w diagnostyce zakażenia krętkiem bladym nie dowiedziono przewagi innych metod diagnostycznych (tj. głównie metod biologii molekularnej) nad badaniami serologicznymi. W kile pierwszego okresu, związanej z występowaniem objawu pierwotnego (owrzodzenia) wyniki badań serologicznych mogą być ujemne. Rekomendowaną metodą diagnostyczną są wówczas tzw. badania bezpośrednie (patrz niżej).⁶

W DIAGNOSTYCE KIŁY WYKORZYSTUJE SIĘ NASTĘPUJĄCE BADANIA:

Badania bezpośrednie (wykrywanie obecności krętków białych):

1. Metoda ciemnego pola widzenia- poszukiwanie krętków białych w zmianach skórnych i śluzowych (metoda zasadniczo mająca zastosowanie w kile I okresu)
2. Metoda immunofluorescencji bezpośredniej – barwienie rozmazu ze zmian skórnych na szkiełku przeciwciałami przeciwkrętkowymi z fluoresceiną
3. Preparaty histologiczne wycinków zmienionych chorobowo tkanek- impregnacja krętków srebrem, immunofluorescencyjnie lub immunohistochemicznie.
4. RIT (*rabbit infectivity testing*) – badanie zakaźności materiału pobranego od chorego na królikach doświadczalnych
5. PCR (*polymerase chain reaction*) – amplifikacja krętkowego DNA, w próbkach

pochodzących ze zmian skórnych, śluzówkowych, krwi, płynu mózgowo-rdzeniowego, płynu owodniowego oraz narządów (metoda o wysokiej czułości w przypadku kiły I okresu i niewystarczającej diagnostycznie czułości w przypadku późniejszych okresów kiły i materiału innego niż wymaz ze zmian skórnych lub śluzówkowych)

Badania pośrednie –serologiczne (wykrywanie przeciwciał przeciwkrętkowych):

1. Odczyny niekrętkowe (klasyczne, nieswoiste, kardiolipinowe)
 - RPR (*rapid plasma reagin*)
 - VDRL (*Veneral Disease Resarch Laboratory*)
 - USR (*unheated serum reagin*)
2. Odczyny krętkowe (swoiste)
 - FTA (*fluorescent treponemal antibody test*)
 - FTA-ABS (*fluorescent treponemal antibody absorption test*)
(IgM FTA-ABS, 19S-IgM FTA-ABS)
 - TPHA (*Treponema pallidum haemagglutination assay*)
 - TPI (*Treponema pallidum immobilization test*), odczyn Nelsona i Mayera
 - TPPA (*Treponema pallidum particle agglutination test*)
 - EIA (*enzyme immunoassay*)
 - CIA (*chemiluminescence Immunoassay*)
 - Immunobloting (Western-blott lub Immunoblot)

Aktualnie postępowanie diagnostyczne (ale też lecznicze) regulują wytyczne przygotowane przez europejską IUSTI (*International Union Against Sexually Transmitted Infections*) i amerykańską CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) – organizacje zajmujące się problematyką chorób przenoszonych drogą płciową.

Zgodnie z wytycznymi IUSTI i CDC standardem diagnostycznym w kile są obok obrazu klinicznego badania serologiczne krwi. Do rozpoznania kiły niezbędne jest stwierdzenie pozytywnego wyniku co najmniej jednego odczynu niekrętkowego i pozytywnego wyniku co najmniej jednego odczynu krętkowego w surowicy krwi chorego.⁶

Jako odczyny niekrętkowe zaleca się testy: RPR lub VDRL, których wyniki należy podać ilościowo, tzn. w postaci miana stwierdzanych przeciwciał, np. 1:16, 1:32 itd. Testów RPR i VDRL, ze względu na odmienną metodykę nie należy porównywać pomiędzy sobą. Miano odczynu RPR lub VDRL sprzed rozpoczęcia leczenia jest szczególnie ważnym wynikiem diagnostycznym, ponieważ skuteczność zastosowanej terapii ocenia się w oparciu o obniżenie miana odczynu RPR lub VDRL w porównaniu do wartości sprzed rozpoczęcia leczenia. Rekomenduje się, aby badania RPR i VDRL w procesie diagnostycznym i monitorowaniu efektów leczenia wykonywać w tym samym laboratorium.

Jako odczyny krętkowe zaleca się testy: TPHA, FTA-ABS oraz testy EIA i inne immunochemiczne, które wykrywają zarówno przeciwciała klasy IgM jak i IgG, skierowane przeciwko *Treponema pallidum*. Co istotne, zarówno IUSTI i CDC nie rekomendują już testu FTA w diagnostyce kiły. Odczyny krętkowe wykrywające przeciwciała w klasie IgM są szczególnie zalecane do diagnostyki kiły wrodzonej (tj. kiły u dziecka z matek chorych na kiłę) i bardzo wczesnych zakażeń, w przypadku których pozostałe odczyny mogą być jeszcze ujemne.⁶

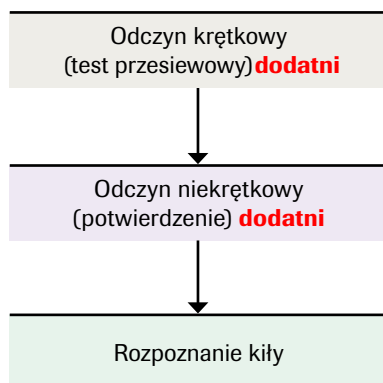
Obecne standardy zalecają aby do badań przesiewowych użyć testów krętkowych, co umożliwi identyfikację zarówno osób chorych, jak i tych wcześniej leczonych z powodu kiły

lub leczonych niewystarczająco. Należy pamiętać, że odczyny krętkowe mogą być dodatnie przez wiele lat, po skutecznym leczeniu.⁶

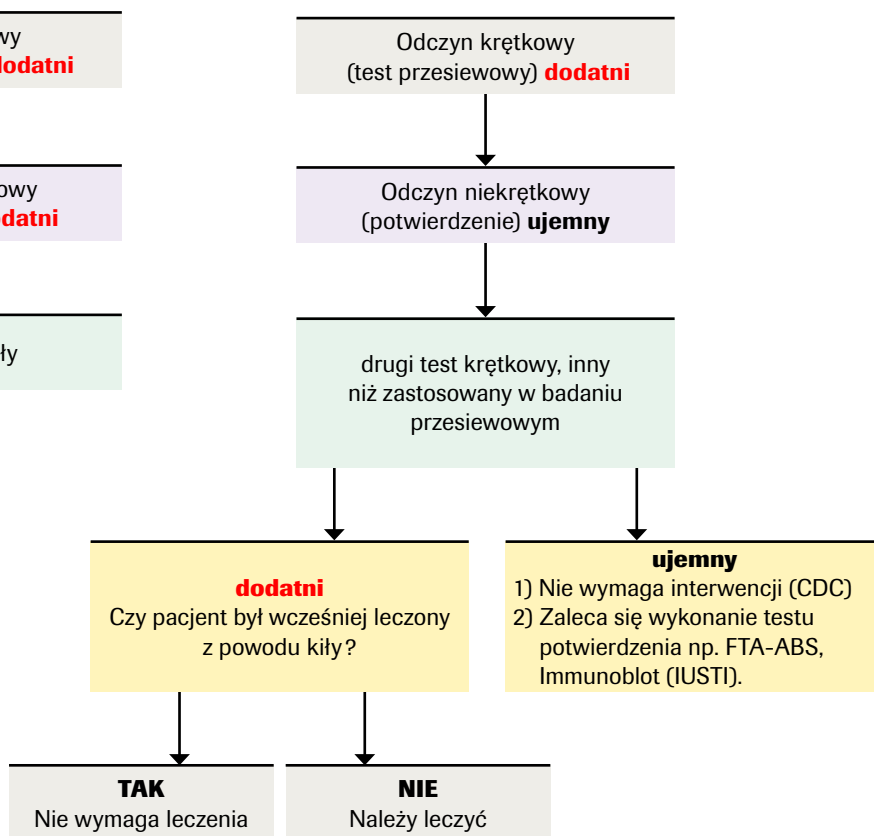
Na rycinie poniżej przedstawiono schemat postępowania diagnostycznego:

SCHEMAT POSTĘPOWANIA DIAGNOSTYCZNEGO – NOWE WYTYCZNE

Przypadek pierwszy:



Przypadek drugi:



DIAGNOSTYKA KIŁY W SZPITALU UNIWERSYTECKIM W KRAKOWIE

Pracownia Serologii Kiły Szpitala Uniwersyteckiego (SU) w Krakowie rozpoczęła działalność w 1999 r. Obecnie badania z zakresu serologii kiły są wykonywane w Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Immunodiagnostyki Zakładu Mikrobiologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie.

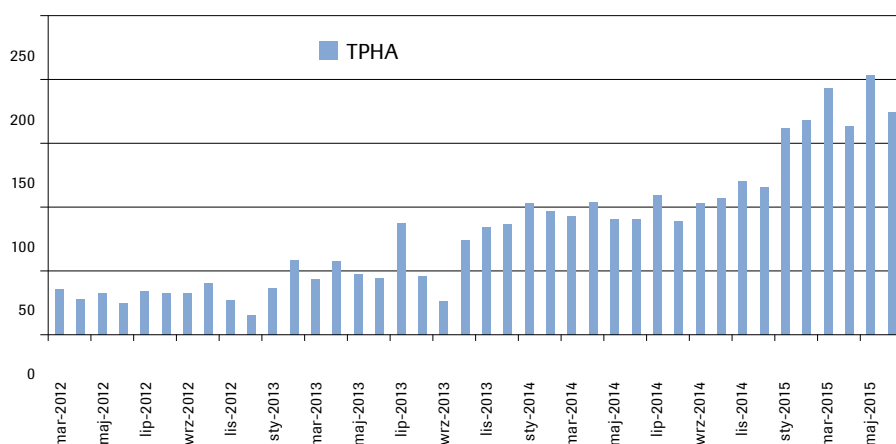
Panel wykonywanych testów diagnostycznych w kierunku kiły został na przestrzeni lat znacznie poszerzony. Aktualnie w pracowni są wykonywane odczyny RPR, VDRL (w płynie mózgowo-rdzeniowym), oraz odczyn ELISA wykrywający przeciwciała klasy IgM i IgG anty-*Treponema pallidum*. W najbliższym czasie planowane jest wprowadzenie badania techniką Immunoblottu. Testy diagnostyczne wykonywane są na zlecenie lekarzy z oddziałów klinicznych szpitala, w tym głównie dermatologii, chorób zakaźnych, położnictwa

1 Wykaz badań

w Pracowni Biologii Molekularnej i Immunodiagnostyki za okres marzec 2012 do czerwiec 2015r. Przedstawiono ilość wykonanych badań w kierunku *Treponema pallidum* przy zastosowaniu odczynu krętkowego (swoistego) TPHA (*Treponema pallidum* haemagglutination assay).

i neonatologii. Systematycznie zwiększa się też liczba badań odpłatnych.

Także w ostatnich latach znacząco wzrosła liczba badań diagnostycznych w kierunku kiły wykonywanych w Zakładzie Mikrobiologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie (ryc. 2). Stwierdzono np. czterokrotny wzrost liczby wykonanych w 2015 roku odczynów TPHA w porównaniu do roku 2012.



PRZYPADKI KLINICZNE

Przykład nr 1.

W styczniu 2014 roku do Zakładu Mikrobiologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie zgłosił się 22-letni pacjent, który badania w kierunku kiły wykonał odpłatnie (wyniki jak w tabeli 1). Następnie pacjent zgłosił się pod koniec lutego 2014 roku do poradni przyklinicznej Oddziału Klinicznego Dermatologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie w związku z owrzodzeniem w rowku zażołodnym. Wywiad ujawnił przygodny, bez zabezpieczenia kontakt seksualny w grudniu 2013 roku. Wyniki badań serologicznych przedstawiono w tabeli 1. U chorego rozpoznano kiłę I okresu i rozpoczęto leczenie penicyliną prokainową. Pacjenta poddano następnie kontroli klinicznej i serologicznej (wyniki kolejnych badań w tabeli 1).

Tab.1. Wyniki badań laboratoryjnych pacjenta nr 1

Odczyn	Styczeń 2014	Luty 2014	Maj 2014	Maj 2015
RPR	Ujemny	Dodatni 1/32	Dodatni 1/4	Ujemny
VDRL	Słabo dodatni (+)	-	-	-
TPHA	Ujemny	Dodatni	Dodatni	Dodatni
ELISA IgG	Ujemny 14,70 U/ml	Dodatni 106,25 U/ml	Dodatni 53,41 U/ml	Dodatni 60,24 RU/ml
ELISA IgM	Słabo Dodatni	Dodatni	Ujemny	Ujemny

Komentarz do przypadku nr 1: W styczniu 2014 roku pacjent wykonał badania bez konsultacji lekarskiej, przypuszczalnie w związku z przygodnym kontaktem seksualnym w grudniu 2013 roku. W bardzo wczesnych stadiach zakażenia w pierwszej kolejności wykrywa się przeciwciała anti-*T.pallidum* w klasie IgM. W pełnoobjawowych przypadkach pozytywne są już zwykle wszystkie odczyny, tj. zarówno niekrętkowe jak i krętkowe. Po skutecznym leczeniu miano odczynu niekrętkowego powinno ulec obniżeniu, a po odpowiednio długim okresie czasu odczyn ten ulega negatywizacji. Odczyny krętkowe, za wyjątkiem przeciwciała anti-*T.pallidum* w klasie IgM po leczeniu kiły pozostają dodatnie do końca życia.

Przykład nr 2.

W marcu 2014 roku do poradni przyklinicznej Oddziału Klinicznego Dermatologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie zgłosił się 28-letni pacjent z powodu osutki występującej od 2 tygodni na ciele, wyraźniej zaznaczonej na bocznych powierzchniach tułowia. Obraz kliniczny budził podejrzenie kiły, co potwierdziły wykonane badania diagnostyczne (tabela 2). U pacjenta rozpoczęto leczenie penicyliną, a następnie chorego poddano badaniom kontrolnym. W grudniu pacjent ponownie zgłosił się do poradni bez terminu, podając ponowny przygodny, bez zabezpieczenia kontakt seksualny. W wykonanych badaniach stwierdzono wzrost miana odczynu RPR z wartości $\frac{1}{4}$ (wrzesień 2014) do wartości $\frac{1}{16}$ (grudzień 2014) i $\frac{1}{64}$ (styczeń 2015). U pacjenta rozpoznano reinfekcję (ponowne zakażenia) i ponownie włączono leczenie penicyliną, a następnie poddano okresowym kontrolom.

Tab.2. Wyniki badań laboratoryjnych pacjenta nr 2.

Odczyn	Marzec 2014	Czerwiec 2014	Wrzesień 2014	Grudzień 2014	Styczeń 2015	Kwiecień 2015
RPR	Dodatni 1/32	Dodatni 1/8	Dodatni 1/4	Dodatni 1/16	Dodatni 1/64	Dodatni 1/4
TPHA	Słabo dodatni (+)	Dodatni	Dodatni	Dodatni	Dodatni	Dodatni
ELISA IgG	Dodatni >200RU/ml	Dodatni >200RU/ml	Dodatni 143,80RU/ml	Dodatni 60,24RU/ml	Dodatni >200RU/ml	Dodatni >200RU/ml
ELISA IgM	Dodatni	Dodatni	Ujemny	Ujemny	Ujemny	Ujemny

Komentarz do przypadku nr 2: W przypadku reinfekcji większość pacjentów nie rozwija objawów klinicznych. Wzrasta natomiast miano odczynów niekrętkowych. Odczyny krętkowe nie mają znaczenia w diagnozowaniu reinfekcji.

PODSUMOWANIE

Kiła stanowi nadal istotny problem epidemiologiczny. Mimo ogromnego postępu wiedzy medycznej, diagnostyka tej choroby nieustannie opiera się na badaniach serologicznych. Laboratoria oferujące takie badania powinny dysponować możliwością wykonania co najmniej jednego odczynu niekrętkowego i co najmniej dwóch odczynów krętkowych. W wielu przypadkach diagnostyka kiły jest dużym wyzwaniem, stąd niezmiernie ważna jest współpraca między laboratorium, a lekarzem zlecającym badania diagnostyczne.

*Piśmiennictwo dostępne
w redakcji*

Oznaczenia wykonywane poza laboratorium (POCT) – rola diagnostyki laboratoryjnego

Krystyna Sztefko Prof. dr hab. n.med. Zakład Biochemii Klinicznej Instytutu Pediatrii Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

W opiece medycznej nad pacjentem wykorzystuje się oznaczenia laboratoryjne wykonywane w laboratoriach działających według obowiązujących przepisów. W ostatnich latach obserwuje się ogromny wzrost liczby wykonywanych badań i związanych z nimi wydatków. Wzrost kosztów dotyczy nie tylko podstawowych badań biochemicznych czy hematologicznych, ale również stale wprowadzanych do algorytmów klinicznych nowych biomarkerów i badań z zakresu biologii molekularnej czy genetyki. Zapotrzebowanie rynku usług medycznych na badania laboratoryjne to nie tylko zapotrzebowanie na różnorodne oznaczenia. Coraz częściej czas oczekiwania na wyniki nie satysfakcjonuje odbiorców wyników – lekarzy i pacjentów. Dla lekarza opiekującego się pacjentem krytycznie chorym podejmowanie decyzji klinicznych w oparciu o wyniki laboratoryjne wykonywane w czasie rzeczywistym to jeden z ważniejszych elementów opieki. Z kolei dla pacjentów możliwość uzyskania wyniku w trakcie wizyty u lekarza lub możliwość oznaczenia danego parametru w domu i konsultacja tego wyniku z lekarzem drogą elektroniczną czy telefoniczną to nie tylko ogromny komfort ale także poczucie lepszej opieki medycznej i bezpieczeństwa. Trudno się dziwić, że wraz z postępem technologii coraz więcej badań laboratoryjnych wykonuje się poza laboratorium, które określane są jako badania wykonywane w miejscu opieki nad pacjentem (POCT, *point of care testing*).

W miejscu opieki nad pacjentem (POC, *point of care*) oznaczane są różnorodne parametry biochemiczne w oparciu o proste metody laboratoryjne (np. wizualny odczyt paska przy analizie ogólnej moczu), testy kasetkowe (np. test ciążowy) czy proste urządzenia (np. oznaczanie stężenia glukozy na glukometrach). Wykorzystywane są także całkowicie zautomatyzowane analizatory np. do oznaczania parametrów równowagi kwasowo-zasadowej, elektrolitów czy oksymetrii. Urządzenia dla POCT są coraz łatwiejsze w obsłudze lub wręcz bezobsługowe, mają coraz mniejsze rozmiary i są odporne na pracę w różnych warunkach. Postęp technologiczny POCT jest tak ogromny, że parametry niemożliwe do oznaczenia dziś nawet w specjalistycznych laboratoriach jutro mogą być mierzone przy łóżku pacjenta i będą torować drogę dla nowych opcji terapeutycznych lub nowych modeli opieki nad pacjentem. Perspektywy POCT wzbudzają entuzjazm lekarzy i pacjentów. Prostota wykonania analizy powoduje, że pojawia się pokusa swobodnego zamieniania oznaczeń laboratoryjnych wykonywanych w centralnych laboratoriach na POCT. Podejmowanie takich działań w sposób bezkrytyczny nie powinno mieć miejsca, bowiem coraz częściej w literaturze fachowej pojawiają się pytania o jakość oznaczeń POCT. Zadawane są pytania o porównywalność wyników badań POCT z wynikami uzyskiwanymi w laboratorium o uznanej wiarygodności. W piśmiennictwie podkreśla się brak nadzoru merytorycznego ze strony laboratorium w zakresie kalibracji urządzeń POC, wykonywanie badań bez kontroli jakości i niezbędnych procedur koniecznych do utrzymania aparatury w ciągłej gotowości do pracy. Brakuje też odpowiednich procedur dla POCT. W Polsce nie ma w tym zakresie uregulowań prawnych. Nie ma procedur dotyczących postępowania przedanalizy, analitycznego i poanalizy w systemie POCT. Z powodu nieprecyzyjnych regulacji prawnych duże zastrzeżenia budzi także prowadzenie dokumentacji oznaczeń wykonywanych w miejscu opieki nad pacjentem i praktycznie brak archiwizacji wyników. Brakuje również odpowiednich szkoleń dla personelu wykonującego oznaczenia POCT.

Ogromny postęp w zakresie możliwości wykonywania analiz w miejscu opieki nad pacjentem, zwiększenie efektywności klinicznej i polepszenie opieki nad pacjentem musi przebiegać równoległe z zapewnieniem odpowiedniej jakości i wiarygodności wyników oznaczeń. Każda metoda analityczna, bez względu na rodzaj urządzenia, w którym jest wykorzystywana, powinna być we właściwy sposób kalibrowana i powinna mieć zapewniony system kontroli jakości. Większość urządzeń działających obecnie w systemie POC ma wbudowany system

wewnętrznej kalibracji lub też wykorzystywane są różnorodne paski kalibracyjne. We współczesnym elektronicznym świecie prawie wszyscy zdają sobie sprawę, że każde urządzenie pomiarowe wymaga kalibracji, wymaga punktu „odniesienia”. Nie wszyscy jednak są świadomi, że jednorazowo ustawione urządzenie czy metoda nie daje gwarancji wiarygodności pomiaru i zawsze niezbędna jest kontrola jakości, bowiem błędy mogą pojawiać się w każdej fazie procesu diagnostycznego, również w przypadku POCT. W ostatnich dwóch dekadach świadomość lekarzy i pielęgniarek dotycząca znaczenia POCT wzrasta i na podstawie własnych doświadczeń widzą potrzebę prowadzenia kontroli jakości. Obserwuje się nawet coraz większe zaangażowanie w zapobieganie błędom przedanalizycznym.

Prowadzenie kontroli urządzeń pracujących w systemie POC według rygorystycznych wytycznych obowiązujących dla laboratoriów jest praktycznie niemożliwe. Podstawową trudnością jest rozproszenie urządzeń i ogromna liczba operatorów wykonujących oznaczenia, którzy najczęściej nie mają żadnego doświadczenia w prowadzeniu kontroli jakości i nie rozumieją potrzeby jej prowadzenia. Personel medyczny skoncentrowany jest na pacjencie a nie na utrzymywaniu urządzeń w należytej gotowości do pracy. Większość oznaczeń POC wykonywanych jest przy użyciu jednorazowych kaset czy pasków lub urządzeń z wymiennymi pojemnikami zawierającymi odczynniki, czyli *de facto* stale użytkownik ma do czynienia z nowymi seriami odczynników. W takim układzie klasyczna kontrola jakości, taka jaka jest wykonywana w laboratorium dla serii odczynników, nie może być zastosowana. Poza tym, w przypadku wykonywania niewielkiej liczby oznaczeń np. równowagi kwasowo-zasadowej, większość odczynnika w pojemniku byłaby zużyta na próbki kontrolne co drastycznie zwiększałoby koszty pojedynczego oznaczenia. W przypadku testów wykonywanych przy użyciu pasków lub kasetek stosowane są kontrole wewnętrzne (np. kontrolny kolor na pasku) lub kontrole potwierdzające (np. linia kontrolna w kasetkach gdzie wykorzystuje się reakcję antygen-przeciwciała). Ta ostatnia kontrola ma na celu sprawdzenie czy na kasetkę nałożono wystarczającą objętość próbki i czy przemieszczanie się próbki w kasetce jest prawidłowe. Chociaż producenci aparatów dla POCT ciągle rozwijają i stosują nowe procedury kontroli jakości zgodnie z rekomendacjami *National Committee for Clinical And Laboratory Standards* (NCCLS) dodając do urządzeń wewnętrzne odczynniki kontrolne i automatyczne monitorowanie (np. sprawdzanie funkcjonowania aparatury lub sprawdzanie przedlaboratoryjnych warunków przechowywania odczynników) to jednak nie rozwiązuje rzeczywistego problemu kontroli jakości uzyskiwanych wyników. Elektroniczne sprawdzanie urządzenia jest bardzo użyteczną składową kontroli jakości dla aparatów POCT ponieważ nie zużywa pojemników odczynnikowych czy kaset, jest szybkie i łatwe do wykonania, ale nie wystarcza do oceny całego procesu analitycznego i nie zastępuje kontroli wewnątrzlaboratoryjnej i zewnątrzlaboratoryjnej. Niestety nie ma jednej procedury kontroli jakości, która mogłaby być wykorzystana dla wszystkich metod POCT, ponieważ technologia, funkcja i potencjalne ich zastosowania mogą być całkowicie odmienne.

Jak zatem rozwiązać problem kontroli jakości metod wykorzystywanych w urządzeniach POC? Rekomenduje się, aby kontrola jakości była nie tylko zgodna ze standardowymi procedurami ale także była prowadzona przez diagnostów laboratoryjnych. Każda nowa decyzja czy każda zmiana wywołuje gorące dyskusje i wśród diagnostów laboratoryjnych zdania są podzielone. Diagnosty pracujący w dużych szpitalach czy ośrodkach akademickich systematycznie przejmują kontrolę nad urządzeniami działającymi w trybie POCT. Osoby pracujące w małych ośrodkach obawiają się, że wprowadzanie POCT będzie wiązało się z likwidacją laboratoriów i utratą pracy, ale równocześnie nie chcą się włączyć do zespołu odpowiadającego za badania



cobas b 123

· Bezobsługowy, wieloparametrowy analizator do oznaczania gazometrii, elektrolitów i metabolitów



cobas b 221

· Wieloparametrowy analizator do gazometrii, oznaczania poziomu elektrolitów i metabolitów.

wykonywane w trybie POCT. Generalnie diagności laboratoryjni obawiają się, że wykonywanie POCT przez personel nielaboratoryjny wiąże się z większym prawdopodobieństwem pojawienia się błędów, pomimo odpowiedniej kontroli jakości, w porównaniu do błędów pojawiających się w laboratorium. Ryzyko błędu jest tym większe im więcej operacji manualnych wymaga oznaczenie lub gdy ocena wyniku jest wizualna.

Urządzenia stosowane w systemie POC mogą oczywiście ulec awarii lub nie działać poprawnie nawet w prawidłowych warunkach bo żaden test czy urządzenie nie są całkowicie odporne na nieprzewidywalne działania użytkownika. Nie oznacza to jednak, że nie należy podejmować wyzwań i nie podjąć kontroli nad oznaczeniami wykonywanymi poza laboratorium. Nie ma idealnego testu POCT – gdyby był wszyscy by z niego z pewnością korzystali. Diagności laboratoryjni mogą przyczynić się do uzyskiwania bardziej wiarygodnych wyników POCT. Szkoda, że wielu diagnostów nie wyczuwa znakomitej okazji aby dołączyć do zespołu medycznego, być bliżej pacjenta i służyć swoją wiedzą laboratoryjną. To możliwość poznania sposobu myślenia lekarza, jego klinicznego podejścia do pacjenta i oczekiwań od laboratorium. Ale włączenie się do zespołu to nie tylko nadzór nad aparaturą, jej kalibracja i prowadzenie kontroli jakości. To także opracowywanie i napisanie odpowiednich procedur postępowania przedanalizy i poanalizy oraz wielokrotne prowadzenie szkoleń dla operatorów aparatów. Szkolenia nie tylko w zakresie działania i obsługi aparatury stosowanej w miejscu opieki, ale także pobierania materiału biologicznego, postępowania z próbką i odczynnikami, wykonywania poszczególnych oznaczeń jak również prowadzenia kontroli jakości i walidacji wyników oraz ich archiwizacji. Pierwszy krok mający na celu uporządkowanie POCT w Polsce został już zrobiony. Wydane zostały „Wytyczne dotyczące organizacji i zarządzania badaniami w miejscu opieki nad pacjentem (POCT)” rekomendowane przez grupę roboczą w skład której wchodziła przedstawiciel KIDL, PTDL, Polskiego Towarzystwa Medycyny Ratunkowej i Krajowy Konsultant ds. Medycyny Ratunkowej. Teraz należy oczekiwać opracowania przez ośrodki akademickie odpowiednich programów edukacyjnych dla diagnostów, którzy będą kierować zespołami ds. POCT

Ogromne zapotrzebowanie na tanią diagnostykę laboratoryjną, na szybkie uzyskanie „surowej informacji” powoduje, że POCT to bardzo dynamicznie rozwijająca się dziedzina diagnostyki laboratoryjnej. POCT ma na celu przyspieszenie procesu diagnostycznego i polepszenie opieki nad pacjentem. Nie jest ono zagrożeniem, a raczej możliwością dla diagnostów laboratoryjnych, dzięki którym wyniki POCT będą bardziej wiarygodne. A szczegółowa diagnostyka laboratoryjna pacjenta nadal będzie wykonywana w laboratorium, gdzie wiedza i umiejętności diagnostów są bezcenne.



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

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

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