



ISSN 1644-8448
nakład: 1500 egz.

LabForum



cobas[®]
Life needs answers



Akredytacja Fetal Medicine Foundation

Szanowni Państwo!

Z przyjemnością pragniemy poinformować, że testy Elecsys PAPP-A oraz Elecsys free β -HCG uzyskały akredytację *Fetal Medicine Foundation (FMF)* z siedzibą w Londynie do zastosowania w diagnostyce prenatalnej w I trymestrze ciąży.

Dzięki tym testom możliwe jest m.in. oszacowanie ryzyka wystąpienia trisomii 21 (zespołu Downa) u płodu już we wczesnym okresie (11–13 tydzień ciąży) poprzez pomiar stężenia tych dwóch markerów we krwi matki oraz uzupełniającą ocenę ryzyka danymi biometrycznymi uzyskanymi z badania USG. Testy Elecsys PAPP-A i Elecsys free β -HCG oznaczać można przy pomocy analizatorów Elecsys 2010, Modular E oraz **cobas e 411** i **cobas e 601**. Lekarze, którzy ukończyli kurs FMF mogą już dokonać uaktualnienia oprogramowania FMF i użycia go do oceny ryzyka wad chromosomalnych na podstawie wyników uzyskanych z ww. analizatorów.

Należy zaznaczyć, że algorytm postępowania wg. FMF zalecany jest przez Polskie Towarzystwo Ginekologiczne i ujęty został w aktualnych Rekomendacjach Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego dotyczących postępowania w zakresie diagnostyki prenatalnej (2009 r.). Także programy profilaktyki prenatalnej Narodowego Funduszu Zdrowia zawierają wymogi prowadzenia diagnostyki prenatalnej wg zaleceń *Fetal Medicine Foundation*, z wykorzystaniem analizatorów i testów posiadających akredytację FMF.

Dodatkową korzyścią dla laboratoriów i lekarzy zajmujących się opieką nad kobietą w ciąży jest możliwość oznaczania markerów preeklampsji przy pomocy testów Elecsys PLGF oraz Elecsys sFlt-1, czyli prowadzenie wczesnej i przedobjawowej diagnostyki stanu przedrzucawkowego u ciężarnych.

W tym numerze polecamy również lekturę artykułów na temat interpretacji stężeń wysoce czułej sercowej troponiny T (hs-cTnT), metod zwiększenia wydajności laboratorium immunohistochemicznego oraz diagnostyce antykoagulantu tarczniczego.

Z poważaniem,

Andrzej Banaszkiewicz
wraz z zespołem RDP

Spis treści:

Aktualności	2
Interpretacja stężeń wysoce czułej sercowej troponiny T (hs-cTnT)	3–8
Aktualizacja wytycznych dotyczących wykrywania antykoagulantu tarczniczego	9–12
Maksymalizacja wydajności laboratorium immunohistochemicznego – cz. 1	13–16

Aktualizacja kart charakterystyk 2010 r.

Interpretacja stężeń wysoce czułej sercowej troponiny T (hs-cTnT)

Wiesław Piechota, Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej Wojskowego Instytutu Medycznego w Warszawie

WSTĘP

Minęło 10 lat od kiedy uznano obecność troponin we krwi jako nieodzowne kryterium rozpoznania zawału mięśnia serca w sytuacji ostrego jego niedokrwienia.¹ Ważność tego kryterium potwierdzono w roku 2007 przedstawiając uniwersalną definicję zawału mięśnia sercowego.² Według tej definicji zawał serca rozpoznaje się, gdy stężenie troponin wzrasta powyżej 99-tego percentyla normalnej populacji referencyjnej w sytuacji ostrego niedokrwienia mięśnia serca o czym świadczą objawy (ostry, przedłużający się ból w klatce piersiowej) i/lub zmiany EKG świadczące o niedokrwieniu albo wykrycie w badaniach obrazowych nowej utraty żywotnego miokardium lub nowego regionalnego zaburzenia kurczliwości. Dodatkowym wymogiem jest wysoka precyzja oznaczeń niskich stężeń troponin odpowiadających 99-temu percentylowi, określana współczynnikiem zmienności $\leq 10\%$. Do niedawna dostępne testy troponinowe nie spełniały tych wymogów, głównie z powodu dość niskiej czułości analitycznej. W ostatnim czasie opracowano kilka bardzo czułych i precyzyjnych testów do oznaczania troponin, które całkowicie spełniają wymogi powyższej definicji. Proóg wykrywalności troponin za pomocą tych testów jest o rząd wielkości niższy w porównaniu z poprzednią generacją tych testów. Testy te nazywa się wysoce czułymi (*high sensitive*). Czułość analityczna nowych testów troponinowych może być wyrażana jako pg/ml (obecnie raczej w ng/ml).³ Tak czułe testy pozwalają na dość dokładny pomiar stężenia troponiny u większości zdrowych ludzi, co do niedawna nie było możliwe oraz wyznaczenie górnej granicy wartości referencyjnych pozwalającej odróżniać stężenia nieprawidłowe. Jako przyczynę obecności troponin u osób zdrowych podaje się fizjologiczną odnowę mięśnia serca.

W związku z pojawieniem się tych testów powstaje wiele pytań dotyczących ich diagnostycznej czułości i swoistości w odniesieniu do zawału serca, wartości prognostycznej oraz przydatności w wyborze terapii. Pojawia się także obawa, że wykrywanie miernie podwyższonych stężeń troponin będzie skutkowało częstszym niż dotychczas i może nie zawsze poprawnym rozpoznawaniem zawału serca. Trudności interpretacyjne wyniku oznaczenia troponin mogą się nasilać wobec spodziewanego zwiększenia częstości ich wykrywania w innych stanach niż ostre zespoły wieńcowe. Najwcześniej opracowanym i najczulszym analitycznie z komercyjnych testów troponinowych jest wysoce czuła troponina T (*high sensitivity troponin T, hs-TnT*). Dlatego głównie na przykładzie tego testu najlepiej przedstawić problematykę dotyczącą głównego zastosowania wysoce czułych testów troponinowych, tj. w diagnostyce zawału mięśnia sercowego, na podstawie wiadomości dostępnych w najnowszym piśmiennictwie.

BIOCHEMICZNA DIAGNOSTYKA OSTRYCH ZESPOŁÓW WIEŃCOWYCH Z WYKORZYSTANIEM WYSOCE CZUŁYCH TESTÓW TROPONINOWYCH

Jednym z niedostatków obecnie stosowanych standardowych testów troponinowych jest ich dość niska czułość diagnostyczna w odniesieniu do zawału mięśnia sercowego, nie przekraczająca 50–60% w chwili przyjęcia do szpitala. Dlatego też w bardzo dużym odsetku przypadków należy czekać 6–12 godzin i niekiedy dłużej do dokładnego biochemicznego rozpoznania zawału. Zakładano, że zwiększeniu czułości analitycznej towarzyszyć będzie wzrost wczesnej czułości diagnostycznej testów troponinowych.

Wieloośrodkowe badanie przeprowadzone przez Reichlina i wsp.⁴ dotyczące zastosowania czułych testów troponinowych do diagnostyki zawału mięśnia sercowego potwierdziło to przekonanie. Do badania włączono 718 pacjentów z objawami sugerującymi zawał serca, trwającymi poniżej 12 godzin. U chorych tych oznaczano troponiny w czasie przyjęcia



Analizator cobas e 601

· system
immunochemiczny
przeznaczony
dla średnich i dużych
laboratoriów



cobas® 6000

· zintegrowany system
biochemiczno-
immunochemiczny



Analizator cobas e 411

· system
immunochemiczny
przeznaczony
dla średnich i dużych
laboratoriów

do szpitala wysoce czułym testem na troponinę T (hs-TnT) oraz trzema czułymi testami oznaczającymi troponinę I. Definitywne rozpoznanie zawału ustalono u 123 chorych. Dokładność diagnostyczna pomiarów stężeń troponin za pomocą tych testów (punkt odcięcia 99. percentyl), wyrażona polem pod krzywą ROC (AUC) była zbliżona dla wszystkich metod – wartości średnie od 0,95 do 0,98 i znacząco większa niż metody standardowej 0,90 (Troponin T, IV generacja). Dla podgrupy pacjentów, którzy trafili do szpitala w ciągu 3 godzin od początku bólu w klatce piersiowej dokładność diagnostyczna była nieznacznie tylko mniejsza w porównaniu z całą grupą i wynosiła (jako AUC, wartości średnie dla czułych testów) od 0,92 do 0,94 a metody standardowej tylko 0,76. Wynika stąd, iż przewaga dokładności diagnostycznej czułych testów troponinowych nad standardowymi jest najbardziej widoczna w przypadku pacjentów ze świeżym bólem w klatce piersiowej. W tym wczesnym okresie dokładność diagnostyczna czułych troponin była także wyższa od dokładności CK-MB i mioglobiny. Dodanie tych dwóch markerów do testu troponinowego nie zwiększało dokładności diagnostycznej w porównaniu z samą troponiną. Czułe testy troponinowe cechuje wczesna wysoka negatywna wartość predykcyjna (97–99%) w chwili przyjęcia do szpitala, co stwarza możliwość wcześniejszego wykluczenia zawału mięśnia sercowego w porównaniu z testami stosowanymi dotychczas. Omawiana praca wykazała po raz pierwszy w dużej grupie chorych, że czułe testy troponinowe istotnie poprawiają wczesną diagnostykę zawału mięśnia sercowego, szczególnie u pacjentów z niedawnym (do 3 godzin) początkiem bólu w klatce piersiowej.

Dzięki wysoce czułym testom troponinowym możliwe jest skrócenie definitywnej biochemicznej diagnostyki zawału dla praktycznie wszystkich pacjentów z bólem w klatce piersiowej o ponad połowę w stosunku do testów standardowych. Giannitsis i wsp.⁵ oszacowali dokładnie średni czas do postawienia diagnozy zawału bez uniesienia odcinka ST przy wykorzystaniu wysoce czułego testu dla troponiny T (71,5 minut) oraz standardowego testu dla troponiny T (246,9 minut) – różnica była zatem ponad trzykrotna.

Zwiększenie wczesnej czułości diagnostycznej nowych testów (o około 30–40%) odbyło się kosztem niedużego obniżenia wczesnej swoistości diagnostycznej dla zawału mięśnia sercowego. Miernie lub umiarkowanie podwyższone stężenia troponin występują bowiem w przebiegu innych niż ostre niedokrwienie stanach i chorobach dotyczących bezpośrednio lub pośrednio mięśnia sercowego.

Jedną z konsekwencji stosowania wysoce czułych testów troponinowych i diagnostycznego punktu odcięcia dla zawału odpowiadającego 99. percentylowi jest wzrost częstości występowania miernie lub umiarkowanie podwyższonych stężeń troponin u pacjentów z objawami ostrych zespołów wieńcowych (OZW), co wymaga analizy (dalszego wyjaśniania) przyczyn tego zjawiska.⁶ Wzrost liczby wyników dodatnich nowych testów troponinowych u pacjentów z objawami OZW można w części tłumaczyć wykrywaniem mierzalnych stężeń troponiny u pewnego odsetka chorych z niestabilną chorobą wieńcową. Do niedawna u chorych tych nie można było wykazać obecności troponin standardowymi testami. Stężenie troponin oznaczanych w momencie przyjęcia wysoce czułymi metodami jest znacznie niższe u pacjentów z ostatecznym rozpoznaniem niestabilnej choroby wieńcowej niż u pacjentów z zawałem mięśnia serca.⁵ Nie jest jednak wykluczone, iż pewna liczba przypadków dotychczas rozpoznawanych jako niestabilna choroba wieńcowa będzie reklasyfikowana jako zawał mięśnia sercowego bez uniesienia odcinka ST gdy stężenie troponiny przekroczy 99. percentyl i zaobserwuje się odpowiednią dynamikę jej stężenia w ciągu kilku godzin. Brakuje w tej chwili wyczerpujących badań dotyczących możliwej skali takiej reklasyfikacji. Giannitsis i wsp.⁶ badając niewielką grupę pacjentów z OZW bez uniesienia ST (n=77) wykazali, że stosując standardowy test troponinowy (cTnT)

ostatecznym rozpoznaniem było w 46 przypadkach zawał (NSTEMI) i w 31 przypadkach niestabilna choroba wieńcowa (UAP); gdy zastosowano test o wysokiej czułości (hs-cTnT) liczby te wyniosły odpowiednio 53 (NSTEMI) i 22 (UAP). Innymi słowy – liczba rozpoznanych niestabilnej choroby wieńcowej zmniejszyła się o 9 z takim samym zwiększeniem rozpoznanych zawałów bez uniesienia odcinka ST (około 11% badanych). Odsetek ten może być zależny od rodzaju stosowanych testów troponinowych i populacji badanych pacjentów.

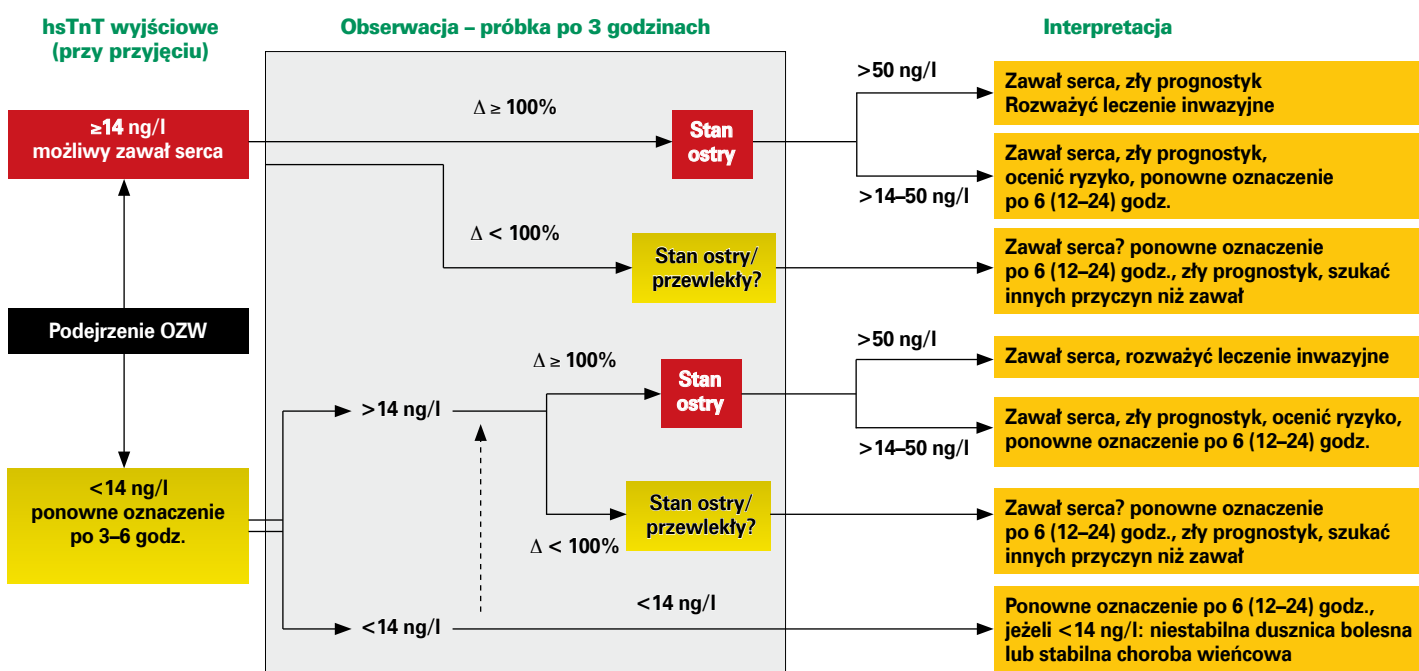
W interpretacji stężenia wysoce czułych testów dla troponin ważną rolę przypisuje się dynamice zmian ich stężenia, szczególnie gdy ich wyjściowe stężenia są niskie lub umiarkowanie podwyższone.⁷ Stwierdzenie istotnej dynamiki jest dodatkowym wymogiem uniwersalnej definicji zawału mięśnia sercowego. Seryjne pomiary nie wydają się jednak konieczne jeśli już pierwszy wynik jest wysoki (np. 10-krotnie przewyższający punkt odcięcia dla zawału). Nie ma jednak powszechnie przyjętej wartości dla istotnych zmian stężenia troponin w czasie ewolucji zawału mięśnia sercowego. Narodowa Akademia Chemii Klinicznej w USA (NACB) za istotną zmianę świadczącą o martwicy mięśnia serca w przebiegu ostrego niedokrwienia przyjęła różnicę 20% w seryjnych oznaczeniach (w ciągu 6–9 godzin od przyjęcia)⁸, przy założeniu, że błąd przypadkowy oznaczenia może nawet 3-krotnie przekraczać wartość średnią. Było to jednak przed pojawieniem się wysoce czułych testów troponinowych. Wu i wsp.⁹ określając zmienność analityczną i wewnątrzosobniczą zmienność biologiczną stężenia troponiny I u zdrowych ludzi za pomocą wysoce czułych testów wykazali, iż różnica ta powinna być co najmniej 1,5–2 razy większa niż zalecana przez NACB. Vasile i wsp.¹⁰ określili ostatnio krótkookresową zmienność stężenia wysoce czułej troponiny T u zdrowych ludzi na 85%. Giannitis i Katus¹¹ uważają, iż do wczesnego rozpoznania zawału serca (NSTEMI) na podstawie stężenia hs-TnT niezbędne jest zarówno przekroczenie poziomu 99. percentyla wartości referencyjnych (14 ng/L) jak i stwierdzenie 100% dynamiki stężenia w ciągu 3 godzin od przyjęcia pacjenta z objawami OZW do szpitala. Stosując taki algorytm (patrz rycina) uzyskuje się pozytywną wartość predykcyjną 100% oraz negatywną wartość predykcyjną



Analizator cobas e 601

· system
immunochemiczny
przeznaczony
dla średnich i dużych
laboratoriów

Algorytm interpretacji wyników hs-TnT w praktyce klinicznej; źródło: Current recommendations for the highly sensitive Troponin T assay for diagnostic, therapeutic and prognostic purposes in patients with NSTEMI acute coronary syndrome; Giannitis E. & Katus H. European Cardiology, 2009, 5: 44–48



88%.¹² Oznacza to, iż diagnoza NSTEMI jest możliwa praktycznie w 100% przypadków w czasie do 3 godzin i wydaje się, że kolejne oznaczenia hs-TnT nie przynoszą dodatkowych korzyści jeśli u pacjenta nie występują nawracające epizody niedokrwienne, dynamiczne zmiany EKG itp. W przypadku pacjentów z wyjściowym (w czasie przyjęcia) stężeniem hs-TnT poniżej 99.percentyla, u których ostatecznie rozpoznano NSTEMI, przekroczenie krytycznych wartości może wystąpić nieco później – w czasie 3–6 godzin od przyjęcia do szpitala. Pewne wykluczenie NSTEMI wymaga jednak dłuższego czasu. Według ostatnich zaleceń NICE* okienko wykluczające zawał serca wynosi dla troponin 12 godzin.¹³ Zalecenia te przyznają, iż wysoce czułe testy troponinowe mogą skrócić wymagany czas lecz wymaga to badań. Ponieważ ogromna większość przypadków zawału serca będzie rozpoznawana wcześniej to tym samym liczba oczekujących dłużej na wykluczenie zmniejszy się.

Algorytm przedstawiony powyżej wymaga dodatkowego komentarza. Po pierwsze jest to propozycja wynikająca z całokształtu doświadczeń jego autorów oraz badań wstępnych z udziałem ograniczonej liczby pacjentów. Algorytm ten nie przeszedł walidyzacji tj. nie został potwierdzony przez obszerne badania prospektywne (ze względu na to, iż hs-TnT jest nowym testem).** Wydaje się jednak, że obecnie jest to jedyna całościowa i racjonalna propozycja wykorzystania hs-TnT, głównie jako pomoc w diagnostyce zawału serca bez uniesienia odcinka ST (NSTEMI). W określeniu przedziału > 14–50 ng/L wkraśla się ze strony autorów pewna nieścisłość, gdyż 100% zmiana od wartości wyjściowej przekracza podwójnie początek tego przedziału. Po wymianie korespondencji z pierwszym autorem uznał on, że ryzyko wyraźnie rośnie od 0,03 µg/L, czyli 30 ng/L (potwierdzone obszernymi badaniami z poprzednim testem troponinowym IV generacji); zatem wzmiankowany przedział powinien zaczynać się od tej wartości. Algorytm ten może być stosowany rozważnie z uwzględnieniem aspektów wymienionych poniżej. Stanowić on może także punkt wyjścia do gromadzenia własnych doświadczeń w celu jego ewentualnej weryfikacji i/lub doprecyzowania. Dynamika zmian troponin w krótkim czasie odgrywa szczególnie ważną bardzo ważną rolę, gdy stężenia wyjściowe oscylują w pobliżu diagnostycznego punktu odcięcia dla zawału serca. Określanie dynamiki jest właściwie obligatoryjne i zgodne z uniwersalną definicją zawału serca. Zalecana jest jednak pewna ostrożność w przywiązywaniu decydującej wagi do dynamiki stężeń troponin w diagnostyce zawału mięśnia serca ponieważ istnieją inne możliwości znaczącej dynamiki jak ostre uszkodzenie mięśnia sercowego w wyniku tępego urazu serca lub krwotocznego udaru mózgowego.¹⁴ Seryjne pomiary stężenia troponin powinny być interpretowane w połączeniu z objawami klinicznymi i innymi badaniami pracownianymi. Stwierdzenie odosobnionego zwiększenia stężenia troponiny nie wystarcza do postawienia rozpoznania ostrego zawału serca, gdyż wymagana jest pogłębiona ocena objawów klinicznych w celu ustalenia przyczyny i ciężkości uszkodzenia miokardium.

INNE NIŻ OSTRE ZESPOŁY WIĘCOWE PRZYCZYNY ZWIĘKSZENIA STĘŻENIA TROPONIN

Skoro można wysoce czułym testem wykazać obecność troponin u ludzi zdrowych nie budzi zdziwienia fakt, iż wykrywa się je we krwi, w dodatku dość często w zwiększonym (choć na ogół miernie) stężeniu, u osób z przewlekłymi chorobami dotyczącymi bezpośrednio lub pośrednio układu sercowo-naczyniowego.¹⁵ Odnosi się to do zarówno do chorób o podłożu miażdżycowym jak i o innych etiologiach (tabela). Nie ma jeszcze pełnego obrazu tego zagadnienia po wprowadzeniu wysoce czułych testów. Ze wstępnych danych można jednak zasadnie wnioskować, iż częstość występowania podwyższonych stężeń troponin w tych stanach wzrosła. Ma to istotne znaczenie, gdyż nawet nieznaczne podwyższenie stężenia troponin oznaczać może gorsze rokowanie.

* National Institute for Health and Clinical Excellence, Wielka Brytania

** Algorytm ten nie stanowi formalnego zalecenia żadnego towarzystwa naukowego ani firmy

Przewlekła niewydolność serca			
Ostra niewydolność serca lub zaostrzenie przewlekłej niewydolności serca			
Zatorowość płucna			
Przewlekłe nadciśnienie płucne			
Zapalenie mięśnia sercowego			
Zapalenie osierdzia z płaszczowym uszkodzeniem warstwy ponadwierszowej serca			
Przełom nadciśnieniowy			
Elektryczne uszkodzenie mięśnia sercowego			
porażenie prądem	kardiowersja zewnętrzna *	kardiowersja wewnętrzna np. wyladowania ICD	
Mechaniczne uszkodzenie mięśnia sercowego			
resuscytacja krążeniowo-oddechowa	tępy uraz np. przedniej ściany klatki piersiowej	ablacja, biopsja endokardialna	operacje kardiokirurgiczne
Znaczny przerost mięśnia lewej komory			
Chemioterapia (np. stosowanie adriamycyny)			
Przewlekła niewydolność nerek (szczególnie w schyłkowym stadium)			
Ostre choroby neurologiczne (np. udar mózgowy, krwotok podpajęczynówkowy)			
Posocznica			
Cukrzyca (szczególnie ostre powikłania cukrzycy)			
Chorzy w stanie krytycznym, chorzy z hipotonią, niewydolnością oddechową, masywnym krwawieniem z przewodu pokarmowego			
Rozległe oparzenia (ponad 30% powierzchni ciała)			

* Dane z piśmiennictwa niejednoznaczne (niewielki wzrost lub brak wzrostu stężenia troponiny).

Wartość predykcyjną wysoce czułego testu dla troponiny T wśród 3593 pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową wykazał Omland i wsp.¹⁶ w ciągu około 5 lat obserwacji w odniesieniu do częstości zgonów z powodów sercowo-naczyniowych oraz częstości występowania niewydolności serca (iloraz ryzyka (HR) powyżej 2,0).

Jedną z najczęstszych, poza OZW, sercowych przyczyn występowania podwyższonych stężeń troponin jest przewlekła niewydolność serca. Zastosowanie testów troponinowych o wysokiej czułości sprawiło wyraźny wzrost częstości wykrywania podwyższonych stężeń. Latini i wsp.¹⁷ badając zbiorowość 4053 pacjentów ze stabilną przewlekłą niewydolnością serca wykryli troponinę T standardowym testem u 10,4% badanych oraz testem o wysokiej czułości (hs-TnT) u 92%. Pacjenci ze stężeniami hs-TnT powyżej mediany (12 ng/L) częściej odznaczali się większym zaawansowaniem niewydolności (klasa NYHA III i IV). Stężenia hs-TnT wykazywały silny związek z umieralnością ogólną – wynosiła ona 7,8% w najniższym kwartylu i 35,6% w najwyższym ($p < 0.001$) w ciągu 24 miesięcy obserwacji.

Do jednej z częstszych poza sercowych przyczyn wzrostu stężenia troponin należy niewydolność nerek. Jacobs i wsp.¹⁸ oznaczają wielokrotnie stężenie troponiny T wysoce czułym testem (hs-TnT) u pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek bez objawów chorób serca wykazali jej podwyższenie u wszystkich badanych. Troponina mierzona tym testem była o 20% częściej wykrywana niż za pomocą testu standardowego. Wyższe stężenia wykazano w podgrupie pacjentów z przebytymi zdarzeniami sercowo-naczyniowymi. Okresowe monitorowanie stężenia hs-TnT może przyczynić się do wczesnej identyfikacji pacjentów z wysokim ryzykiem takich zdarzeń. W innym badaniu wykazano, iż oznaczanie wysoko czułym testem stężenia troponiny T lepiej określa ryzyko sercowo-naczyniowe u chorych na przewlekłą niewydolność nerek niż podobny test dla troponiny I.¹⁹ Ostatnio McGill i wsp. udowodnili, iż wysoce czuły test dla troponiny T jest najsilniejszym długookresowym predykatorem umieralności ogólnej wśród pacjentów z przewlekłą

Tabela. Inne niż ostre zespoły wieńcowe choroby i stany, w których mogą występować zwiększone stężenia troponin



cobas® 6000
· zintegrowany system
biochemiczno-
immunochemiczny



Analizator cobas e 411
· system
immunochemiczny
przeznaczony
dla średnich i dużych
laboratoriów

niewydolnością nerek poddawanych dializoterapii (w ciągu 3,5 letniej obserwacji).²⁰ Po wprowadzeniu czułych testów na troponinę I okazało się, że marker ten jest także często podwyższony w niewydolności nerek (50% pacjentów) co dawniej uważano za unikalną cechę troponiny T.⁷

PODSUMOWANIE

Stworzenie testów troponinowych o wysokiej czułości analitycznej spełniło wszystkie wymagania uniwersalnej i jednoznacznej definicji zawału mięśnia sercowego dotyczące biomarkerów sercowych. Zastosowanie testów troponinowych o wysokiej czułości umożliwia znaczące przyspieszenie diagnostyki zawału serca, gdyż ich wczesna czułość diagnostyczna wynosi około 90% w chwili przyjęcia do szpitala. W ciągu następnych 3–6 godzin czułość wzrasta praktycznie do 100%. Oznacza to skrócenie czasu definitywnej biochemicznej diagnostyki zawału serca u większości chorych z OZW o co najmniej połowę. W wymienionym przedziale czasu istnieje także możliwość wykluczenia zawału serca u ogromnej większości pacjentów (ujemna wartość predykcyjna 88–99%, w zależności od testu). Obecne zalecenia i przezorność wskazują jednak na razie na potrzebę nieco dłuższego czasu do pełnego wykluczenia (do 12 godzin) nielicznych przypadków. Wyraźny wzrost wczesnej czułości diagnostycznej nowych testów troponinowych okupiono niedużym zmniejszeniem swoistości w odniesieniu do zawału mięśnia sercowego. Wynika to z występowania podwyższonych (zwykle miernie) stężeń troponin w innych chorobach serca lub z powodu innych chorób nie dotyczących bezpośrednio mięśnia serca. Wysoce czułe testy troponinowe częściej niż dotychczas stosowane wykrywają także obecność troponiny w innych stanach niż ostre zespoły wieńcowe. W celu różnicowania tych stanów z zawałem serca zaleca się seryjne pomiary troponin i ocenę dynamiki zmian ich stężenia. Wydaje się, że podwojenie stężenia troponiny T mierzonej wysoce czułym testem w czasie do 3 godzin jest rozsądnym równoważeniem czułości i swoistości. Jedną z konsekwencji wprowadzenia wysoce czułych troponin i stosowania niskiego punktu odcięcia (99. percentyl) będzie wzrost częstości rozpoznawania zawału serca. Na wzrost ten w pewnej mierze składać się będzie reklasyfikacja części przypadków niestabilnej choroby wieńcowej do zawału (NSTEMI). Podwyższenie stężenia troponin, niezależnie od mechanizmu, oznacza zwiększone ryzyko zdarzeń sercowo-naczyniowych i zgonu. Dla wysoce czułych testów troponinowych wykazano ten związek w ostrych zespołach wieńcowych, stabilnej chorobie wieńcowej, zastoinowej niewydolności serca i przewlekłej niewydolności nerek. Wysoce czułe testy troponinowe są przede wszystkim udoskonalonym narzędziem w diagnostyce zawału mięśnia sercowego. Właściwa interpretacja ich seryjnych wyników powinna odbywać się z uwzględnieniem objawów klinicznych, badań elektrokardiograficznych i innych. Wówczas prawdopodobieństwo postawienia niewłaściwej diagnozy jest znikome.

Piśmiennictwo dostępne w redakcji.

Elecsys hs Troponin T

- Sprawdzony i wiarygodny biomarker uszkodzenia kardiomiocytów
- Bardzo wysoka czułość analityczna: 0,003 ng/ml
- Znakomita precyzja oznaczeń: CV <10% dla 99 percentyla wartości u osób zdrowych
- Ultrakrótki czas uzyskania wyniku: 9 minut
- Test spełnia zalecenia i wymogi PTK, ESC, ACC, AHA, WHF, IFCC i NACB

Aktualizacja wytycznych dotyczących wykrywania antykoagulantu toczenia

V. Pengo, A. Tripodi, G. Reber, J.H. Rand, T.L. Ortel, M. Galli, P.G. De Groot

NAJWAŻNIEJSZE KWESTIE

Jednym z wniosków ze spotkania podkomisji ds. antykoagulantu toczenia / przeciwciał zależnych od fosfolipidów, które odbyło się w Genewie w 2007 r. była potrzeba uaktualnienia wytycznych dotyczących wykrywania antykoagulantu toczenia (LA¹). Szczególny nacisk położono na kwestie, które omówiono w niniejszym artykule. Dodano akapit o selekcji pacjentów, która ma na celu zminimalizowanie liczby niepotrzebnych zleceń oznaczeń w kierunku obecności LA. Szczegółowo omówiono sposoby pobierania krwi, a stosowane testy ograniczono do dRVVT² i czułego aPTT³. Klarownie wyjaśniono sposób obliczania wartości odcięcia na każdym etapie diagnostyki. W ostatnim akapicie omówiono sposób interpretacji wyników w sytuacjach ogólnych i w szczególnych przypadkach.

Omówione w niniejszym artykule zalecenia uaktualniają kryteria dotyczące oznaczeń w kierunku obecności antykoagulantu toczenia (LA) zaproponowane w 1995 r. przez Brandta i wsp. [1]. Podkomisja ds. antykoagulantu toczenia / przeciwciał zależnych od fosfolipidów przyznaje, że wytyczne te były niezwykle przydatne przez ostatnie 13 lat, lecz obecnie wydaje się zasadne podanie dodatkowych danych i określeń, które uwzględniają wiedzę i doświadczenie, jakie zgromadzono od czasu ich opublikowania.

SELEKCJA PACJENTÓW

Oznaczenia w kierunku obecności antykoagulantu toczenia należy ograniczyć do pacjentów, u których istnieje znaczne prawdopodobieństwo występowania zespołu antyfosfolipidowego (APS⁴) lub u których stwierdzono wydłużony czas aPTT (częściowej tromboplastyny po aktywacji) o nieustalonej przyczynie. Wskazania do wykonania oznaczenia w kierunku obecności LA podzielono według kryteriów klinicznych na ryzyko małe, umiarkowane i duże. Ryzyko *małe* to: żylna choroba zakrzepowo-zatorowa (ŻChZZ) lub zakrzepica tętnicza o nieustalonej przyczynie u pacjentów w podeszłym wieku; ryzyko *umiarkowane*: przypadkowo stwierdzone wydłużenie czasu aPTT u pacjentów bez objawów, nawykowe, samoistne utraty ciąży u kobiet we wczesnym jej okresie, u pacjentów w młodym wieku wywołana czynnikami zewnętrznymi żylna choroba zakrzepowo-zatorowa (ŻChZZ); ryzyko *duże* to: idiopatyczna żylna choroba zakrzepowo-zatorowa (ŻChZZ) i zakrzepica tętnicza (o nieustalonej przyczynie) u pacjentów w młodym wieku (poniżej 50. r.ż.), zakrzepica o nietypowej lokalizacji, u kobiet utrata ciąży w późnym jej okresie, zakrzepica wszelkiego rodzaju lub powikłania położnicze u kobiet z chorobami autoimmunologicznymi (układowym toczeniem rumieniowatym (SLE⁵), reumatoidalnym zapaleniem stawów (RZS), małopłytkowością autoimmunologiczną, niedokrwistością autoimmunohemolityczną) [2]. Zdecydowanie odradza się wykonywanie oznaczeń w próbkach krwi pobranych od osób, u których objawy nie występują lub w grupach pacjentów innych niż tu wyszczególnione, aby zapobiec uzyskaniu wyników fałszywie dodatnich, które otrzymuje się stosunkowo często wskutek małej swoistości testów. Jeśli w jednokrotnym oznaczeniu próbki uzyska się dodatni wynik LA, badanie należy powtórzyć po upływie ponad 12 tygodni po pierwszym oznaczeniu. Zaleca się pobieranie próbek przed włączeniem terapii przeciwkrzepliwej lub w okresie jej niestosowania, ponieważ przyjmowane antykoagulanty mogą wpływać na wynik oznaczenia. Zalecenia podkomisji podsumowano w Tabeli 1. Sposób obliczania i interpretowania wartości odcięcia opisano w Tabeli 2.

OMÓWIENIE I OBJAŚNIENIE ZALECEŃ PODANYCH W TABELI 1

Na wynik testów wykrywających antykoagulant toczenia (LA) wpływa wiele zmiennych, m.in. zawartość i rodzaj fosfolipidów w mieszaninie reakcyjnej, aktywator, sposób przygotowania

Słowa kluczowe: antykoagulanty, zespół antyfosfolipidowy, rozpoznanie, antykoagulant toczenia, zakrzepica.



STA Compact
· automatyczny analizator
do badań rutynowych
i specjalistycznych

¹ LA – z ang. lupus anticoagulant.

² dRVVT – z ang. diluted Russell's viper venom time.

³ aPTT – z ang. activated partial thromboplastin time.

⁴ APS – z ang. antiphospholipid syndrome.

⁵ SLE – z ang. systemic lupus erythematosus.

osocza, sposób wyrażenia wyników i wartości odcięcia. Ponadto, zważywszy na znaczne różnice między typami przeciwciał i swoistością ich epitopów, duży problem stanowi materiał referencyjny. Z podanych powodów w ostatnim czasie zgłaszano przypadki dużej zmienności w zakresie czułości i swoistości testów do wykrywania LA używanych w laboratoriach klinicznych [3–7]. Współczynnik wyników fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych pozostaje stosunkowo wysoki. Problem stanowią zwłaszcza wyniki fałszywie dodatnie, ponieważ na ich podstawie pacjent kwalifikowany jest do długotrwałej i niepotrzebnej doustnej terapii przeciwkrzepliwej [7].

(A) Pobieranie krwi

A3: Próbkę należy dwukrotnie odwirować, aby uzyskać możliwie najmniejszą liczbę płytek krwi. Można to zrobić, przenosząc osocze po pierwszym odwirowaniu (2000 g, 1 min., w temperaturze pokojowej) do plastikowej probówki wirowniczej przy użyciu plastikowej pipety, a następnie ponownie odwirowując osocze przez 10 min. przy większej prędkości (> 2500 g). Podczas przenoszenia do probówki wtórnej należy uważać, aby nie przenieść pozostałych płytek, które mogły zgromadzić się na dnie probówki [8]. Filtrowania osocza nie zaleca się, ponieważ wiąże się ono z wprowadzeniem kolejnych zmiennych (rodzaj filtra, objętość osocza, jakie ma być filtrowane, spadek zawartości czynnika von Willebranda) oraz wiąże się z dodatkowymi kosztami [9]. Ponadto należy wziąć pod uwagę problem dostępności filtrów oraz wielkość dodatkowych kosztów.

A4: Próbkę należy zamrażać możliwie najszybciej po pobraniu krwi z żyły, aby zapobiec spadkowi poziomu czynników krzepnięcia. Dobrym rozwiązaniem jest zamrożenie osocza w temperaturze –70 °C lub niższej.

A5: Przed wykonaniem oznaczenia zamrożone osocze należy rozmrozić poprzez całkowite zanurzenie próbki w łaźni wodnej o temperaturze 37 °C na 5 minut, aby zapobiec tworzeniu się krioprecypitatu, a następnie dokładnie wymieszać przed oznaczeniem.

(B) Wybór testu przesiewowego

B1: Ryzyko otrzymania wyników fałszywie dodatnich wzrasta nadmiernie, jeśli wykonuje się więcej niż 2 testy przesiewowe.

B2: Dowody wskazują, że żaden test nie jest czuły wobec wszystkich typów LA. Zaleca się wykonywanie 2 różnych testów, z których każdy oparty jest na innej zasadzie. Czas reptilazowy (dRVVT) wykonywany jest w laboratoriach powszechnie i uważany jest za swoisty w oznaczaniu LA u pacjentów, u których występuje wysokie ryzyko zakrzepicy [10]. W Międzynarodowym Programie Zewnątrzlaboratoryjnej Oceny Jakości w laboratoriach wykonujących oznaczenia stosowane w diagnostyce zakrzepicy wykazano, że test dRVVT wykrywa LA najlepiej.

B3: Test aPTT o niskim stężeniu fosfolipidów i z krzemionką jako aktywatorem wykonuje się jako drugi ze względu na jego czułość na obecność LA [3, 6]. Odradza się stosowanie kaolinu jako aktywatora ze względu na jego nie do końca poznane działanie w automatycznych koagulometrach. Jako aktywatora nie zaleca się kwasu elagowego, ponieważ jest on nieczuły na obecność LA. Nie zaleca się wykonywania następujących testów: dPT⁶ (czas protrombinowy ze znacznym rozcieńczeniem tromboplastyny) – ze względu na zmienność pomiędzy odczynnikami tromboplastynowymi; testów opartych na jądzie węży, takich jak czas ekarynowy (ECT⁷) czy tekstarynowy⁸ – ze względu na brak wystandaryzowanych metod opartych na tej zasadzie dostępnych na rynku, a także testu czasu kaolinowego (KCT⁹) – ze względu na jego małą powtarzalność w porównaniu z innymi dostępnymi testami [11].

⁶ dPT – z ang. dilute prothrombin time.

⁷ ECT – z ang. Ecarin clotting time, ekarynowy czas krzepnięcia.

⁸ Z ang. Textarin time.

⁹ KCT – z ang. kaolin clotting time.

(C) Test mieszania osocza pacjenta z osoczem prawidłowym

C1: Pulę osocza prawidłowego należy przygotować *ad hoc* poprzez dwukrotne odwirowanie osocza w celu uzyskania możliwie najmniejszej liczby płytek krwi ($<10^7 \text{ mL}^{-1}$) oraz zapewnienia ok. 100% aktywności wszystkich czynników krzepnięcia. Tak przygotowany materiał należy rozdzielić na próbki o mniejszej objętości i przechowywać w postaci zamrożonej w temperaturze -70°C . Dozwolone jest stosowanie dostępnych na rynku osoczy liofilizowanych lub prawidłowego osocza mrożonego, jeśli osocza te spełniają powyższe warunki lub jeśli zostały poddane walidacji w odniesieniu do LA. Przy wykonywaniu oznaczeń w kierunku obecności LA u kobiet w ciąży należy wziąć pod uwagę zakresy prawidłowe dla czasu krzepnięcia ustalone dla zdrowych kobiet w ciąży (czas aPTT jest na ogół krótszy wskutek podwyższonej zawartości czynnika VIII w czasie ciąży; z niewyjaśnionych przyczyn zmienić się może także wynik czasu reptilazowego (dRVVT). Brak jest dostępnego osocza referencyjnego. Z tego względu jako kontroli do walidacji testu należy użyć mianowanych osoczy dodatnich i ujemnych.

C3: Czas krzepnięcia oznaczony w teście mieszania może także być wydłużony wskutek obecności heparyny lub inhibitorów czynników krzepnięcia. W przypadku stwierdzenia obecności heparyny pomocne jest wykonanie pomiaru czasu trombinowego badanego osocza; do stwierdzenia obecności inhibitorów pomocny jest z kolei dodatni wywiad kliniczny (krwawienia) oraz pomiar aktywności czynników krzepnięcia. Badanie przesiewowe w kierunku obecności LA nie jest możliwe, jeśli badane osocze nie krzepnie lub jeśli zawartość heparyny w badanym osoczu przekracza zdolność odczynnika do jej neutralizacji. Na rynku dostępne są testy dRVVT i aPTT ze środkami neutralizującymi heparynę w stężeniu nieprzekraczającym $0,8 \text{ U mL}^{-1}$. Choć wiedza o działaniu heparyny drobnocząsteczkowej (HDCz, LMWH¹⁰) jest ograniczona, stosowanie preparatów HDCz nie jest przeciwwskazaniem do wykonania badania przesiewowego w kierunku obecności LA. Należy jednak zauważyć, że wpływ na testy do oznaczeń LA może się różnić w zależności od stosunku między aktywnością czynnika Xa a aktywnością czynnika IIa każdego preparatu HDCz. Wpływ bezpośrednich inhibitorów trombiny oraz inhibitorów czynnika Xa na testy do wykrywania LA nie jest znany. Podczas gdy hydroksychlorokina może w niewielkim stopniu zaburzać oznaczenia w kierunku obecności LA, bezpośrednio wpływając na tworzenie się kompleksów IgG- β 2GPI na fosfolipidach w postaci dwuwarstwowej [12], aspiryna i kłopidogrel nie wywołują interferencji.

(D) Test potwierdzający

D2: Jako źródła fosfolipidów do testu potwierdzającego nie zaleca się używania mrożonych / rozmrożonych płytek krwi ze względu na dużą zmienność między seriami pomiarowymi.

(F) Przekazywanie wyników

F1: Wynik oznaczenia LA należy przedstawić jako wynik ilościowy wraz z komentarzem słownym informującym czy stwierdzono obecność czy brak LA. Jest to istotne, ponieważ wielu klinicystów może nie mieć wiedzy o wszystkich złożonych procedurach oznaczeń wykonywanych w laboratorium. Zdecydowanie odradza się stosowanie komentarzy typu „wynik graniczny” czy „wynik wątpliwy”; w takich przypadkach komentarz powinno się ograniczyć do stwierdzenia „oznaczenie należy powtórzyć po upływie tygodnia”.

INTERPRETACJA WYNIKÓW

Badania zintegrowane

badania zintegrowane obejmują wykonanie testu przesiewowego i potwierdzającego w ramach jednej procedury. Na testy takie składa się dwukrotne, równoległe oznaczenie

¹⁰ LMWH – z ang. low molecular weight heparin.



STA Compact

· automatyczny analizator
do badań rutynowych
i specjalistycznych



Coasys Plus C

· automatyczny
analizator
do rutynowych oznaczeń
koagulologicznych

badanych osoczy za pomocą czasu reptialzowego (dRVVT) [13] lub aPTT [13, 14] przy niskim (testy przesiewowe) i wysokim (testy potwierdzające) stężeniu fosfolipidów. W zasadzie testy te nie wymagają wykonania testu mieszania, a ich wyniki można interpretować według określonych wartości odcięcia, które ustala się albo obliczając procent korekcji $[(\text{wynik testu przesiewowego} - \text{wynik testu potwierdzającego}) / \text{wynik testu przesiewowego} \times 100]$ [13], albo podając tzw. współczynnik LA (*LA ratio*) $(\text{wynik testu przesiewowego} / \text{wynik testu potwierdzającego})$ [15]. Zarówno dla procentu korekcji, jak i dla współczynnika LA korzystne może być znormalizowanie wyników wobec puli osocza prawidłowego oznaczonej równolegle z osoczami badanymi $[(\text{wynik testu przesiewowego} / \text{wynik testu potwierdzającego}) \text{ pacjenta} / (\text{wynik testu przesiewowego} / \text{wynik testu potwierdzającego}) \text{ dla puli osocza prawidłowego}]$. Niektóre spośród powyższych testów służą do pomiaru czasu krzepnięcia mieszaniny osocza pacjenta i puli osocza prawidłowego [14].

Wykrywanie LA w czasie ostrego epizodu zakrzepowo-zatorowego

Należy zachować ostrożność przy interpretacji wyników oznaczeń LA wykonywanych u pacjentów w okresie epizodu zakrzepowo-zatorowego, ponieważ pacjenci ci mogą być leczeni pełnymi dawkami heparyny niefrakcjonowanej i / lub antagonistami witaminy K. Co więcej, w fazie ostrej stężenie białek ostrej fazy, w tym czynnika VIII, może być zwiększone.

Wykrywanie LA u pacjentów poddawanych długoterminowemu leczeniu antagonistami witaminy K

1. Interpretacja wyników jest trudna z powodu wydłużenia czasu krzepnięcia. Aby uniknąć błędnej interpretacji wyników, oznaczenie zaleca się wykonać na 1 tydzień – 2 tygodnie po odstawieniu doustnej terapii przeciwkrzepliwej lub wtedy, gdy współczynnik INR wyniesie poniżej 1,5. W czasie odstawienia leczenia antagonistami witaminy K zaleca się przyjmowanie heparyny drobnocząsteczkowej (HDCz), przy czym ostatnią jej dawkę należy przyjąć na ponad 12 godzin przed pobraniem krwi do oznaczenia LA.
2. Jeśli współczynnik INR mieści się w przedziale od 1,5 do 3,0, można rozważyć rozcieńczenie osocza pacjenta i puli osocza prawidłowego w stosunku 1 do 1. Należy jednak pamiętać, że ze względu na rozcieńczenie badanego osocza oznaczone miano LA będzie dwukrotnie niższe i że interpretacja wyniku może być trudna.
3. Odradza się wykonywanie oznaczeń czasu tekstarynowego i ekarynowego (ECT) [17, 18] oraz testów zintegrowanych (tzn. % korekcji dla aPTT, SCT¹¹ i dRVVT przy niskim i wysokim stężeniu fosfolipidów) [13], ponieważ konieczna jest ich dalsza ocena.

¹¹ SCT – z ang. silica clotting time.

Profile przeciwciał antyfosfolipidowych

Wyniki oznaczeń w kierunku obecności LA należy zawsze interpretować łącznie z wynikami oznaczeń pozostałych przeciwciał antyfosfolipidowych (antykarđiolipina (aCL) i anty- β -glikoproteina-I (anty- β_2 -GPI)) wykonywanych metodami immunoenzymatycznymi. Obecność przeciwciał aCL i anty- β_2 -GPI w mianie średnim lub wysokim należących do tego samego izotopu (najczęściej klasy IgG) koreluje z obecnością LA i wskazuje na duże ryzyko zakrzepicy. Na temat związku z utratą płodu istnieje mniej danych. Pojedyncze przypadki dodatnich wyników oznaczeń LA spotyka się częściej u pacjentów bez objawów klinicznych [19]; wyniki te mogą być fałszywie dodatnie, zwłaszcza gdy objawy obecności LA są łagodne, u pacjentów w starszym wieku lub jeśli LA wykryty został po raz pierwszy [7].

*Piśmiennictwo dostępne w redakcji.
Tłumaczenie artykułu publikowanego
na łamach: Journal of Thrombosis and
Haemostasis, 2009; 7: 1737–1740.*

Maksymalizacja wydajności laboratorium immunohistochemicznego – cz. 1

Dr n. med. David G. Hicks, i Gloria Willis-Eppinger, HT (ASCP)

Katedra Anatomii Patologicznej, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, Ohio

STRESZCZENIE

Stale rosnące znaczenie barwień immunohistochemicznych (IHC) w diagnostyce patomorfologicznej stwarza laboratorium klinicznym coraz większe wyzwania. Personel laboratorium ma do czynienia z powiększającą się liczbą nowych markerów IHC w czasie, gdy jednocześnie narastają żądania redukcji kosztów ponoszonych przy ich zastosowaniu i równocześnie kładziony jest nacisk na większą dokładność, jakość i skrócenie czasu wykonania barwienia. Pełna automatyzacja procesu barwienia sprzyja uzyskaniu celów takich jak: lepsza skuteczność, wydajność i jakość. W czerwcu 2002 r. laboratorium IHC Cleveland Clinic Foundation otrzymało w pełni zautomatyzowane wyposażenie do przeprowadzania wszystkich rutynowych barwień diagnostycznych oraz prac badawczych. Poprzednio posiadaliśmy półautomatyczne urządzenie do barwienia preparatów. Po roku pracy przeprowadziliśmy analizę, jaki wpływ na nasze laboratorium wywarła automatyzacja. Możliwość w pełni zautomatyzowanej pracy polegająca na nieprzerwanym procesie przygotowywania próbek, deparafinizacji i odsłaniania antygenu, doprowadziła do skrócenia czasu przygotowania preparatów we wszystkich testach IHC, co spowodowało zwiększenie wydajności laboratorium. Przeciętny czas barwienia preparatu w aparacie półautomatycznym wynosił od 8 do 24 godzin, podczas gdy za pomocą urządzenia w pełni zautomatyzowanego można było osiągnąć średni czas 2–6 godzin. Przeciętna liczba barwień powtarzanych spadła z 242 do 74, czyli prawie o 70%. Laboratorium histopatologiczne z wprowadzenia takiego oprzyrządowania zyskało więc wymierne korzyści. Poprzez zastosowanie nowego systemu uzyskano wyniki barwień o lepszej jakości i poprawiono organizację pracy laboratorium. Znalazło to odbicie w zmniejszeniu liczby testów powtarzanych, za które nie pobiera się opłaty, jak i w skróceniu czasu barwienia IHC. Dzięki wyższemu poziomowi zautomatyzowania wstępne opracowanie testów z nowymi przeciwciałami stało się również łatwiejsze i skuteczniejsze. Zmiany te pomogły w pracy i produktywności laboratorium, ale również dzięki skróceniu czasu barwienia preparatu przyczyniły się do nadrzędnej korzyści, jaką jest polepszenie opieki nad pacjentem.

WSTĘP

Na tradycyjną ocenę diagnostyczną przeprowadzaną przez patomorfologa składa się wnikliwa ocena struktury morfologicznej w rutynowo przygotowanych preparatach histopatologicznych barwionych hematoxyliną i eozyną. Niemniej wygląd komórek i morfologia tkanki w obrębie wycinka przedstawia zaledwie część informacji zawartej w preparacie histologicznym. Rozwój immunohistochemii (IHC) dał patomorfologom nowe, potężne narzędzie, które pozwoliło na zlokalizowanie antygenów białkowych w wycinku tkanki, jednocześnie nie uszkadzając jej struktury morfologicznej, dostarczając w ten sposób możliwości głębszego poznania zmian manifestujących się podczas choroby. Takie narzędzia pozwoliły lekarzom na zaobserwowanie niezwykle ważnych różnic diagnostycznych pomiędzy komórkami i rodzajami nowotworów, pomogły potwierdzić ich morfologię oraz umożliwiły przeprowadzanie testów za pomocą nowych biomarkerów posiadających dużą wartość rokowniczą i diagnostyczną w niektórych chorobach nowotworowych. Rozszerzona rola IHC w diagnostyce patomorfologicznej stanowi znaczące wyzwanie dla laboratoriów klinicznych całego świata. Nowe odkrycia dotyczące biologii nowotworów doprowadziły do dalszego wzrostu liczby nowych markerów IHC, których oznaczanie pomaga w diagnostyce nowotworów, dostarcza dokładniejszej oceny rokowania oraz pozwala przewidzieć odpowiedź pacjenta na terapię. W następstwie, znacząco poprawiła się opieka nad pacjentem, ale jednocześnie zwiększyło się zapotrzebowanie na przeprowadzanie badań



Aparat BenchMark ULTRA

· system kolejnej generacji do automatycznego barwienia metodą IHC/ISH



Aparat BenchMark GX

· system do automatycznego barwienia metodą IHC/ISH

immunohistochemicznych. Niezwykle ważna rola, jaką IHC pełni w opiece nad pacjentem ujawniła konieczność kontroli jakości laboratoriów, ich standaryzację, analizę powtarzalności, dokładności i szybkości czasu przygotowania preparatu.

Aby zaspokoić potrzebę wykonywania większej liczby testów, laboratoria kliniczne musiały zatrudnić dodatkowy personel techniczny. Dodanie nowych testów wymagało zapewnienia dokładności ich wykonywania. Nastąpiło to w warunkach niedoboru wykwalifikowanego, doświadczonego personelu laboratoryjnego. Aby sprostać potrzebom i pozwolić na wzrost obciążenia ilością przeprowadzanych badań, w wielu przypadkach nowy i niedoświadczony personel musi przechodzić szkolenie dopiero w trakcie swojej pracy. Dodatkowo, kierownicy laboratoriów muszą stawiać czoła coraz większym wyzwaniom natury finansowej i podejmować działania redukujące koszty, które wymagają by wszystkie aspekty pracy laboratorium były na tyle efektywne w zakresie ponoszonych kosztów, na ile to jest możliwe.

Maksymalizacja wydajności w laboratorium immunohistochemicznym uzyskana poprzez pełną automatyzację.

Fundacja Kliniki w Cleveland jest jednym z największych na świecie centrów medycznych integrujących opiekę kliniczną i szpitalną z badaniami naukowymi oraz szkoleniem lekarzy.

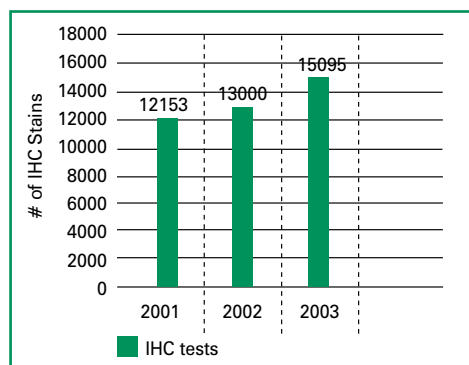
W ciągu ostatnich trzech lat w laboratorium histopatologicznym doszło do 25% wzrostu liczby rutynowo przeprowadzanych testów IHC (Rysunek 1). Równolegle, w tym samym czasie doszło do jeszcze większego zapotrzebowania na przeprowadzanie testów IHC, co było związane z projektami badawczymi przeprowadzanymi w Klinice. Dodatkowo, ilość dostępnych przeciwciał – zarówno do oznaczeń standardowych, jak i badawczych – wzrosła o ponad 50%. Laboratorium musiało zaadoptować się do warunków narastającego obciążenia i wzrostu skomplikowania pracy, bez zatrudnienia dodatkowego personelu technicznego.

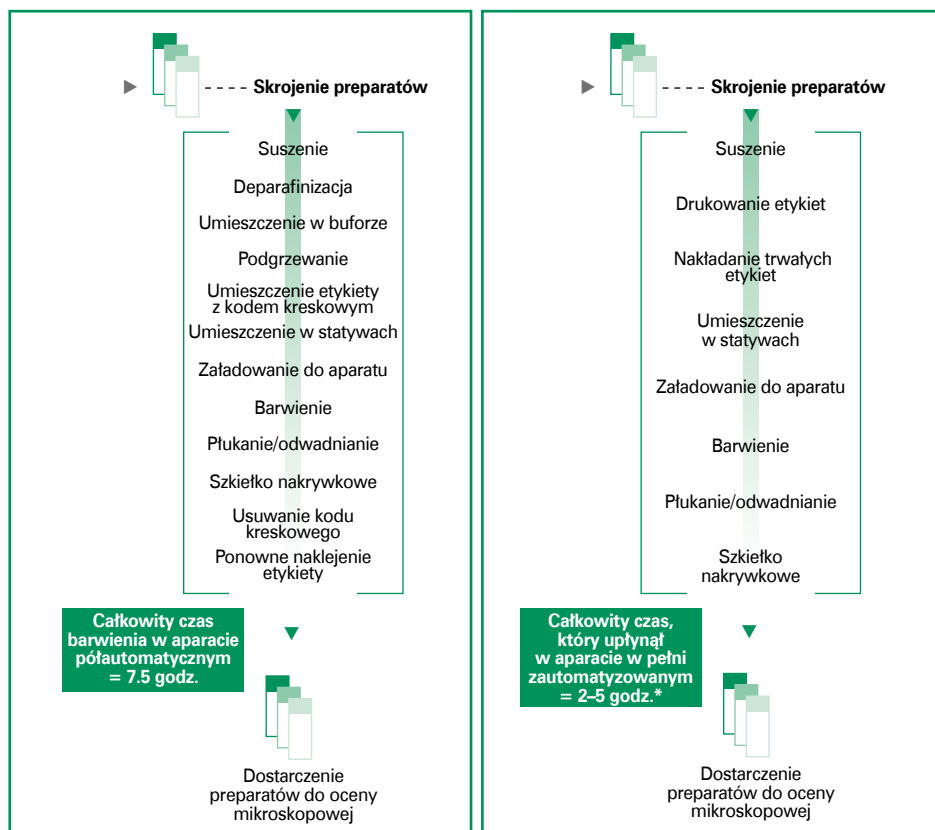
Laboratorium Histopatologiczne Fundacji Kliniki w Cleveland zapewniło aktywny udział personelu medycznego w wyborze, walidacji i dodawaniu nowych markerów IHC do ciągle rozszerzającego się zestawu testów, stworzyło program jednoczesnej edukacji pracowników technicznych i wdrożyło innowacyjne techniki prowadzące do pełnej automatyzacji barwień. Działania te zostały podjęte w celu zmaksymalizowania wydajności laboratorium, poprawienia skuteczności, spójności i jakości pracy.

W czerwcu 2002 r. laboratorium IHC przekształciło się w pełni zautomatyzowaną jednostkę w zakresie przeprowadzania wszystkich procedur barwień, zarówno rutynowych, jak i badawczych. Zanim to nastąpiło, w laboratorium używano półautomatycznego urządzenia do barwienia preparatów IHC. Nowe, w pełni zautomatyzowane urządzenie wykonuje wstępną obróbkę termiczną materiału, deparafinizację, odślanianie antygenów, barwienie właściwe;

pracuje w oparciu o zoptymalizowane protokoły barwień, z którymi łatwo się zapoznać oraz odczynniki o wystandaryzowanym stężeniu. Szkiełka z tkanką do barwienia IHC są opatrzone etykietą z kodem kreskowym określającym, który protokół ma być przeprowadzony, a preparaty są ładowane do urządzenia bez żadnych dodatkowych przygotowań. Staraliśmy się przeanalizować, jaki wpływ mają wprowadzone zmiany na jakość pracy laboratorium IHC.

Rysunek 1: Badania rutynowe IHC, Laboratorium Histopatologiczne Kliniki w Cleveland





* Czas barwienia zależy od rodzaju przeciwciała

Rysunek 2: Cykl pracy półautomatycznego aparatu IHC.

Rysunek 3: Cykl pracy całkowicie automatycznego aparatu IHC



Aparat BenchMark ULTRA

· system kolejnej generacji do automatycznego barwienia metodą IHC/ISH



Aparat BenchMark GX

· system do automatycznego barwienia metodą IHC/ISH

WYNIKI

Wydajność i bezpieczeństwo pracy

Przy użyciu półautomatycznego systemu procesy: deparafinizacji, odwadniania i odstawiania antygenu, niezbędne dla wykonania barwienia metodą IHC, przeprowadzano ręcznie i zazwyczaj nie w tym samym czasie. Podczas wykonywania wymienionych czynności dodatkowo personel był narażony na ekspozycję na ksylen. Przy systemie w pełni zautomatyzowanym przygotowane do barwienia preparaty można załadować bezpośrednio do urządzenia, eliminując konieczność ekspozycji personelu technicznego na działanie ksyleny i eliminując możliwość poparzenia przy wyjmowaniu bardzo gorącego, napełnionego buforem do deparafinizacji pojemnika na preparaty z kuchenki mikrofalowej. Do przeprowadzenia procesu barwienia w pełni zautomatyzowany aparat potrzebuje 2 do 5 godzin, w porównaniu z czasem do 7 godzin przy użyciu poprzedniego aparatu – powoduje to zaoszczędzenie od 2 do 5 godzin w trakcie cyklu pracy.

Cykl barwienia preparatów IHC

Jedną z najwcześniej uzyskanych korzyści było udoskonalenie pracy polegające na skróceniu czasu procedury barwienia. Pełna automatyzacja umożliwiająca wykonanie na pokładzie aparatu czynności od deparafinizacji do barwienia hematoksyliną znacznie skróciła czas niezbędny do ukończenia barwienia IHC i uczyniła preparaty dostępnymi do interpretacji przez patomorfologa o wiele wcześniej, niż było to poprzednio możliwe. Przeciętny czas cyklu pracy w odniesieniu do poprzednich aparatów obsługiwanych ręcznie wynosił ok. 24

godz., podczas gdy aparat w pełni zautomatyzowany przeprowadził procedurę w ciągu 2–6 godzin, umożliwiając przeprowadzenie tego samego dnia barwień IHC, które w większości wypadków zlecane są przed południem.

Wydajność i możliwości laboratorium

Poprzednio laboratorium pracowało z dwoma półautomatycznymi aparatami o wydajności do 40 preparatów każdy. Maksymalna wydajność dzienna oznaczała wykonanie dwóch cykli czyli zabarwienie 160 preparatów; dwa cykle w ciągu dnia pod warunkiem, że preparaty do barwienia przygotowano w dniu poprzednim lub podzielono pracę na cykl pracy w ciągu dnia i cykl pracy w ciągu nocy. Obecnie dysponujemy czterema w pełni zautomatyzowanymi aparatami o wydajności 20 preparatów każdy. Z powodu skrócenia czasu przygotowania i czasu cyklu pracy laboratorium rutynowo jest w stanie przeprowadzić w ciągu dnia 3 cykle pracy i czwarty cykl w ciągu nocy, z dzienną maksymalną wydajności 320 preparatów.

Eliminowanie ryzyka błędów

W poprzednim systemie barwienia dopiero po procesie barwienia następowało drukowanie końcowych etykiet, z zawartym na nich numerem pacjenta, a szczegóły dotyczące barwienia należało wpisać na etykiecie ręcznie. W nowym systemie etykiety przyklejone na początku cyklu już zawierają dane identyfikujące pacjenta i dane dotyczące barwienia. Eliminacja tego manualnego etapu w stosunku do poprzedniego procesu przedstawia dodatkowe oszczędności czasu personelu technicznego oraz również eliminuje potencjalne źródło błędów spowodowanego niewłaściwym umieszczeniem etykiety.



COBAS i LIFE NEEDS ANSWERS są
znakami towarowymi należącymi do Roche
©2010 Roche Diagnostics

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
call center: tel. 0-22/481 54 54
e-mail: dia.callcenterpl@roche.com

obsługa klienta: tel. 0-22/481 54 00-05
faks 0-22/481 55 96
e-mail: polska.diagnostics@roche.com
internet: www.roche.pl

Opracowanie techniczne: Elżbieta Czarnacka
DTP: Iwona Domagała-Pławny
Przygotowanie do druku i druk:
AR-W Arkadiusz Grzegorzczak, www.grzeg.com.pl