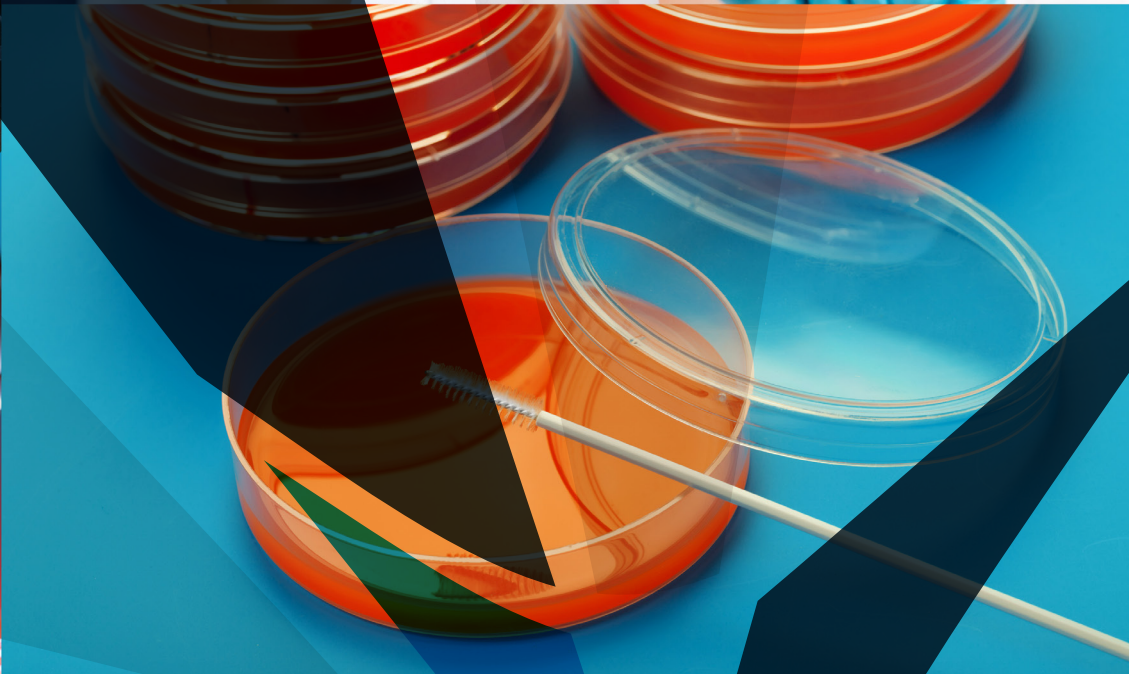


#68
czerwiec 2014

aktualności bioMérieux



VITEK 2™ — technology



Etest®

w tym numerze:

Redakcja

wydawca: bioMérieux Polska Sp. z o.o.

Osoba odpowiedzialna: Ireneusz Popławski

Osoby biorące udział w przygotowaniu nr 68:

Marcin Iszkuło
Alicja Rusinek
Piotr Szczegłowski
Joanna Świdorska – Kiec
Konrad Klimek
Marta Warowny
Miroslaw Kachalik
Aneta Lesiuk (korekta)

Adres redakcji i wydawcy:

bioMérieux Polska
01-518 Warszawa, ul. Gen. Józefa Zajęczka 9
tel. (22) 569 85 00 • fax (22) 569 85 54
www.biomerieux.pl

opracowanie graficzne:

Mariusz Glejzer
www.glejzer.com

Piśmiennictwo dostępne w redakcji

3-6

Mikrobiologia.
Rekomendacje EUCAST

6-8

Chemia Kliniczna.
Kontrola jakości certyfikatem jakości wyników badań

9-12

Immunologia.
Borelioza z Lyme

13-14

Nowości
Nowe podłoże do oznaczania bakterii
niewymagających: Mueller-Hinton E

15-21

Biologia molekularna.
Znaczenie badań molekularnych
w diagnostyce zakażeń parwowirusem B19

22

RAL STAINER – automatyzacja procesu barwienia

23

Nowe informacje
na stronie www.biomerieux.pl

Rekomendacje EUCAST

– doświadczenia pierwszych lat stosowania w Polsce

dr n. med. Dorota Żabicka
Zakład Mikrobiologii i Epidemiologii Klinicznej,
Krajowy Ośrodek Referencyjny
ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD),
Narodowy Instytut Leków, Warszawa

Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości EUCAST (ang. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) został utworzony wspólnie przez ESCMID (ang. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases), ECDC (ang. European Centre for Disease Prevention and Control) oraz komitety narodowe z kilku krajów europejskich, które stosowały własne wartości graniczne do oznaczania lekowrażliwości. Jego zadaniem jest ustalanie klinicznych wartości granicznych dla leków przeciwdrobnoustrojowych oraz proponowanie metod oznaczania i interpretacji wyników oznaczania lekowrażliwości drobnoustrojów. EUCAST współpracuje z Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) w Stanach Zjednoczonych w zakresie prac nad harmonizacją klinicznych wartości granicznych proponowanych przez obie instytucje. Działalnością EUCAST kieruje Steering Committee, którego przewodniczącym jest Rafael Canton, wspierany merytorycznie przez Komitet Generalny, utworzony przez reprezentantów 33 krajów europejskich, Rosji i Australii. Liczba krajów wchodzących w skład Komitetu Generalnego ciągle rośnie, chęć przystąpienia do EUCAST deklarują kolejne państwa, między innymi Japonia, Brazylia i Stany Zjednoczone. Niemal wszystkie kraje reprezentowane w Komitecie Generalnym EUCAST utworzyły Narodowe Komitety ds. Oznaczania Lekowrażliwości, których głównym zadaniem jest nadzór merytoryczny nad prawidłowym stosowaniem metod oznaczania i interpretacji wyników oznaczania lekowrażliwości drobnoustrojów w poszczególnych krajach. W Polsce funkcje te pełni „Zespół ds. oznaczania lekowrażliwości zgodnie z zaleceniami EUCAST” powołany wiosną 2010 roku z inicjatywy Konsultanta Krajowego w dziedzinie mikrobiologii lekarskiej prof. dr hab. n. med. Walerii Hryniewicz.

Pierwsze tabele prezentujące rekomendacje EUCAST zawierały kliniczne wartości graniczne wyrażane jedynie jako wartości minimalnych hamujących stężeń leku (MIC), co ograniczało możliwość ich stosowania w diagnostyce mikrobiologicznej. Duże znaczenie dla rozpropagowania rekomendacji EUCAST i wprowadzenia ich do rutynowego stosowania w medycznych laboratoriach mikrobiologicznych miało opublikowanie w grudniu 2009 roku na stronie internetowej EUCAST www.eucast.org opracowania „European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 1.0, 2009-12-22”.

Była to pierwsza publikacja prezentująca kliniczne wartości graniczne antybiotyków wyrażane jako wartości MIC oraz wielkości stref zahamowania wzrostu w metodzie dyfuzyjno-krążkowej. W styczniu 2013 roku zalecenia EUCAST stosowane były już w ponad 50% laboratoriów w 18 krajach (Polska, Norwegia, Szwecja, Finlandia, Dania, Estonia, Czechy, Słowacja, Bułgaria, Włochy, Chorwacja, Austria, Szwajcaria, Francja, Wielka Brytania, Irlandia, Islandia, Malta) oraz w 10-50% laboratoriów w następujących 8 krajach (Litwa, Niemcy, Węgry, Rumunia, Belgia, Luksemburg, Hiszpania, Australia). Stosowanie zaleceń EUCAST deklarują również Łotwa, Turcja, Grecja, Słowenia, Izrael i Rosja (do 10% ogólnej liczby laboratoriów).

W Polsce przygotowania do wprowadzenia zaleceń EUCAST rozpoczęto w 2010 roku, obejmowały one opracowanie niezbędnej dokumentacji i przeprowadzenie szkoleń dla mikrobiologów. Wartości graniczne EUCAST, zastępujące stosowane wcześniej wartości graniczne CLSI, wprowadzono do rutynowej pracy laboratoriów mikrobiologicznych wiosną 2011 roku, a od stycznia 2012 roku zalecenia EUCAST są powszechnie stosowane do interpretacji wyników oznaczania lekowrażliwości drobnoustrojów izolowanych w medycznych laboratoriach mikrobiologicznych w Polsce.

Tabele z klinicznymi wartościami granicznymi i inne dokumenty EUCAST

Biblioteka dokumentów opracowanych przez EUCAST obejmuje wiele różnego typu opracowań, udostępniowanych na stronie internetowej www.eucast.org w poszczególnych zakładkach tematycznych. Podstawowym dokumentem opracowywanym corocznie przez EUCAST są tabele klinicznych wartości granicznych, stosowanych do interpretacji wyników oznaczania lekowrażliwości drobnoustrojów. Najnowsze dokumenty tego typu to:

- Tabele z wartościami granicznymi dla bakterii: „European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, valid from 2014-01-01.” (tłumaczenie na język polski w przygotowaniu);
- Tabele z wartościami granicznymi dla grzybów *Candida* spp. i *Aspergillus* spp.: „European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antifungal Agents. Breakpoints tables for interpretation of MICs. Version 6.1, valid from 2013-03-11.”

Wartości graniczne zawarte w ww. dokumentach można podzielić na dwie grupy. Pierwszą grupę stanowią wartości graniczne niezwiązane z określonym rodzajem lub gatunkiem drobnoustrojów, które zostały opracowane dla określonej dawki i postaci leku (parenteralna lub doustna), z uwzględnieniem danych o farmakokinetyce i farmakodynamice leku. Drugą grupę stanowią wartości graniczne dla poszczególnych rodzajów lub gatunków drobnoustrojów. Opracowano je biorąc jako podstawę wartości graniczne niezwiązane z określonym rodzajem lub gatunkiem drobnoustrojów i modyfikując je w oparciu o dane kliniczne oraz epidemiologiczne wartości graniczne ECOFF, oddzielające populację szczepów dzikich danej grupy drobnoustrojów od populacji szczepów z nabytymi mechanizmami oporności. W związku z powiązaniem wartości granicznych z określonym dawkowaniem leku przyjęto następujące definicje:

- **Wrażliwość kliniczna** – wrażliwość drobnoustroju na standardowe dawki leku – wysokie prawdopodobieństwo sukcesu terapeutycznego;
- **Średnia wrażliwość kliniczna** – szczep w zakresie wartości MIC pomiędzy wrażliwym a opornym, efekt terapeutyczny niepewny, ale może zostać osiągnięty, jeśli zakażenie przebiega w takiej lokalizacji, gdzie lek jest fizycznie zagęszczany (np. drogi moczowe) lub jest możliwość podania wysokich dawek leku;
- **Oporność kliniczna** – szczep oporny, duże prawdopodobieństwo niepowodzenia terapeutycznego, nawet w przypadku zastosowania wysokich dawek leku.

W tabelach z klinicznymi wartościami granicznymi, oprócz symboli stosowanych do zakwalifikowania szczepu do odpowiedniej kategorii (S-wrażliwy, R-oporny), używane są również inne oznaczenia, umożliwiające prawidłową interpretację wyniku oznaczania lekowrażliwości. Są to następujące oznaczenia:

- „-” oznacza, iż nie zaleca się oznaczania lekowrażliwości, gdyż lek wykazuje słabą aktywność wobec tej grupy drobnoustrojów; izolaty mogą być raportowane jako odporne bez wykonania oznaczenia lekowrażliwości;
- IE oznacza, że istnieje zbyt mało dowodów potwierdzających, że lek wykazuje aktywność wobec tej grupy drobnoustrojów; wynik oznaczania lekowrażliwości może zawierać wartości MIC bez interpretacji jako wrażliwy, średnio wrażliwy lub oporny.

W tabelach z klinicznymi wartościami granicznymi dla bakterii, obowiązującymi w roku 2014 (wersja 4.0) opublikowane są wartości graniczne dla następujących drobnoustrojów: pałeczki Gram-ujemne z rodziny Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. grupy A, B, C i G, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* spp. grupa viridans, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, beztlenowe bakterie Gram-dodatnie, *Clostridium difficile*, beztlenowe bakterie Gram-ujemne, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Pasteurella multocida*, *Campylobacter jejuni* i *coli*, ponadto po raz pierwszy w tabelach w 2014 roku *Corynebacterium* spp. oraz PK/PD – wartości

graniczne niezwiązane z określonym gatunkiem drobnoustrojów. Tabele zawierają również odnośniki do innych dokumentów EUCAST, mających zastosowanie w prawidłowej interpretacji wyników oznaczania lekowrażliwości oraz dla celów monitorowania lekowrażliwości bakterii, takich jak :

- „EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing” R. Leclercq, R. Canton, D.F.J. Brown, C.G. Giske, P. Heisig, A.P. MacGowan, J.W. Mouton, P. Nordmann, A.C. Rudloff, G.M. Rossolini, C.J. Soussy, M. Steinbakk, T.G. Winstanley, G. Kahlmeter. Clin Microbiol Infect 2013; 19: 141–160. (Polskie tłumaczenie „Eksperckie zasady interpretacji wyników oznaczania lekowrażliwości drobnoustrojów – zalecenia EUCAST; wersja 2.0” dostępne na stronie internetowej KORLD www.korld.edu.pl).
- EUCAST guidance document „Antimicrobial susceptibility testing of *Burkholderia cepacia* complex (BCC)
- EUCAST guidance document “*Stenotrophomonas maltophilia*”
- EUCAST guidelines for detection of resistance mechanism and specific resistance of clinical and/or epidemiological importance. Version 1.0, December 2013.

Na stronie internetowej EUCAST publikowane są również inne dokumenty, takie jak charakterystyki leków zawarte w tzw. dokumentach RD (ang. rational documents) oraz opracowania na temat metodyki, kontroli jakości i walidacji metody dyfuzyjno-krążkowej. Wymienione dokumenty EUCAST mogą być stosowane bezpośrednio w laboratoriach mikrobiologicznych do opracowania własnych instrukcji i procedur. Stanowią one także podstawę opracowania zaleceń i rekomendacji, wydawanych przez Zespół ds. oznaczania lekowrażliwości zgodnie z zaleceniami EUCAST oraz Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów KORLD, zawierających dodatkowe wyjaśnienia zasad interpretacji wyników oznaczania lekowrażliwości oraz wskazówki metodyczne dotyczące oznaczania mechanizmów oporności (dostępne na stronie internetowej KORLD www.korld.edu.pl).

Stosowanie rekomendacji EUCAST

- wady i zalety

Wprowadzenie rekomendacji EUCAST do rutynowego stosowania w medycznych laboratoriach mikrobiologicznych stanowiło rewolucję w interpretacji wyników oznaczania lekowrażliwości drobnoustrojów i było ogromnym wyzwaniem dla medycznych laboratoriów mikrobiologicznych. W Polsce do 2011 roku do oznaczania i interpretacji wyników lekowrażliwości drobnoustrojów stosowano „Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki”, publikowane przez Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów oraz Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej, opracowane w oparciu o wartości graniczne CLSI. Przygotowanie do stosowania nowych rekomendacji i metodyki zgodnej z zaleceniami EUCAST wymagało przeszkolenia mikrobiologów pracujących w medycznych laboratoriach diagnostycznych.

Jako materiały do szkoleń wykorzystywano ogólnodostępne dokumenty przygotowywane przez EUCAST, które są publikowane na stronie internetowej EUCAST www.eucast.org. Dzięki takiemu dostępowi do dokumentów EUCAST możliwe było również opracowanie tłumaczeń na język polski tabel z wartościami granicznymi EUCAST oraz eksperckich zasad interpretacji wyników. Równolegle ze szkoleniami prowadzono szereg działań organizacyjnych, takich jak przegląd odczynników i zaplanowanie dostaw, opracowanie procedur i instrukcji laboratoryjnych, opracowanie nowych formularzy wyników, przygotowanie informacji dla lekarzy o wprowadzeniu nowych zasad interpretacji wyników oznaczania lekowrażliwości. Wprowadzenie nowych rekomendacji poprzedziło opracowanie z inicjatywy Konsultanta Krajowego w dziedzinie mikrobiologii lekarskiej prof. dr hab. n. med. Walerii Hryniewicz i opublikowanie na stronie internetowej KORLD www.korld.edu.pl, zaleceń przygotowanych przez Zespół ds. oznaczania lekowrażliwości zgodnie z zaleceniami EUCAST.

Kliniczne wartości graniczne EUCAST opracowano w oparciu o farmakokinetykę i farmakodynamikę leku podawanego w określonej postaci i dawce, rozkład wartości MIC dla populacji danego gatunku bakterii oraz dane kliniczne. Takie podejście spowodowało, że w 2010 i 2011 roku kliniczne wartości graniczne EUCAST były w większości przypadków niższe o jedno do trzech rzędów w stosunku do zaleceń CLSI. Skutkiem tego część szczepów z kategorii „wrażliwy”, zgodnie z wartościami granicznymi CLSI, przechodziła do kategorii „średniowrażliwy” lub „oporny”, zgodnie z interpretacją EUCAST. Do najbardziej jaskrawych przykładów tego typu należą wartości graniczne gentamycyny dla *S. aureus* (wrażliwy EUCAST ≤ 1 mg/L, CLSI ≤ 4 mg/L, oporny EUCAST > 1 mg/L, CLSI > 16 mg/L) czy też wartości graniczne piperacyliny/tazobaktam dla pałeczek z rodziny Enterobacteriaceae (wrażliwy EUCAST ≤ 8 mg/L, CLSI ≤ 16 mg/L, oporny EUCAST > 16 mg/L, CLSI > 64 mg/L). W niektórych przypadkach EUCAST proponuje kilka klinicznych wartości granicznych dla szczepów wrażliwych w zależności od rodzaju zakażenia, postaci i dawki leku (np. penicylina benzylowa dla *S. pneumoniae*), ale takich przypadków jest niewiele i są one zawsze dobrze udokumentowane badaniami klinicznymi. Różnice klinicznych wartości granicznych pomiędzy EUCAST i CLSI powodowały, że przed wprowadzeniem wartości granicznych EUCAST niezbędne było przeprowadzenie w poszczególnych szpitalach analizy danych z monitorowania lekowrażliwości. Analiza taka miała na celu sprawdzenie, czy po wprowadzeniu wartości granicznych EUCAST nie nastąpi istotna zmiana odsetka szczepów opornych na leki stosowane w terapii empirycznej, a co za tym idzie, nie zajdzie konieczność weryfikacji polityki antybiotykowej i zaleceń terapeutycznych.

Pewne nieporozumienia i wiele pytań wzbudził brak w tabelach EUCAST kolumny z wartościami granicznymi umożliwiającymi zakwalifikowania izolatu do kategorii „średniowrażliwy”. Dla części odbiorców oznaczało to brak tej kategorii wrażliwości w rekomendacjach

EUCAST i wątpliwości co do sposobu interpretacji wyniku dla izolatów o wartościach MIC lub wielkości strefy zahamowania wzrostu w metodzie dyfuzyjno-krążkowej w przypadku otrzymania wyników o wartościach pomiędzy wartościami dla szczepów wrażliwych i opornych. Najnowsza wersja 4.0 tabel z wartościami granicznymi dla bakterii zawiera bardzo prosty opis sposobu odczytywania danych zawartych w tabelach, co w dużej mierze wyjaśni nieporozumienia z tym związane.

Zagadnieniem, które, jak się wydaje, od początku wzbudzało najwięcej kontrowersji, było interpretowanie wyniku oznaczania wrażliwości pałeczek Enterobacteriaceae na antybiotyki beta-laktamowe zgodnie z używanymi wartościami MIC lub wielkością strefy w metodzie dyfuzyjno-krążkowej, bez względu na zdolność szczepu do wytwarzania nabytych beta-laktamaz ESBL i AmpC lub karbapenemaz MBL, KPC i OXA. Przyjęta przez EUCAST interpretacja wynika z faktu, że kliniczne wartości graniczne cefalosporyn III generacji i karbapenemów dla pałeczek z rodziny Enterobacteriaceae dobrano tak, aby do kategorii „wrażliwy” nie były klasyfikowane szczepy zdolne do produkcji beta-laktamaz o szerokim spektrum substratowym. Taka interpretacja wyniku oznaczania lekowrażliwości stawia pytanie o możliwość zastosowania cefalosporyn III i IV generacji lub karbapenemów w terapii zakażeń inwazyjnych wywoływanych przez szczepy wytwarzające ESBL lub karbapenemazy, u których zachowana jest wrażliwość na te antybiotyki. Ostatnie publikacje wskazują, że terapia taka może być skuteczna, zwłaszcza jeśli stosuje się terapię skojarzoną leku beta-laktamowego z innym lekiem aktywnym wobec danego izolatu, jednakże nadal obowiązuje zasada ostrożnego stosowania tych leków. W każdej takiej sytuacji niezbędne jest oznaczenia minimalnego stężenia hamującego (MIC) leku i monitorowanie postępów leczenia pacjenta. Należy również pamiętać, że laboratoria są zobligowane do wykrywania ESBL i karbapenemaz ze względów epidemiologicznych dla potrzeb kontroli zakażeń.

Rekomendacje EUCAST podlegają ciągłym zmianom i uzupełnieniom, nowe opracowania pojawiają się co pewien czas na stronie internetowej EUCAST. Zmiany wprowadzane w tabelach najczęściej dotyczą metody dyfuzyjno-krążkowej, rzadziej wartości MIC. Kliniczne wartości graniczne proponowane przez EUCAST będą niewątpliwie podlegać ciągłym zmianom, wynikającym z pojawiania się nowych danych z badań klinicznych wskazujących na potrzebę zmiany dawkowania lub sposobu podawania leków. Zmienność wartości granicznych w tabelach jest często krytykowana jako powodująca niepotrzebne zamieszanie i niemożliwa do wprowadzenia w krótkim czasie od publikacji nowych rekomendacji. Dotyczy to zwłaszcza systemów automatycznych, gdzie wprowadzenie niezbędnych zmian wartości granicznych i nowych zasad interpretacji wymaga uaktualnienia oprogramowania. Z danych publikowanych na stronie internetowej EUCAST wynika, że z każdym rokiem producenci odczynników i systemów do oznaczania lekowrażliwości radzą sobie coraz lepiej z wypełnianiem wymagań EUCAST i wprowadzają produkty zgodne z tymi wymaganiami w coraz krótszym czasie od opublikowania nowych zaleceń.

Niewątpliwie wadą i największym problemem w stosowaniu zaleceń EUCAST jest brak klinicznych wartości granicznych EUCAST dla wielu rzadziej izolowanych gatunków drobnoustrojów. W planach na lata 2013-2014 znajduje się opracowanie zaleceń EUCAST dotyczących wykonania oznaczeń i interpretacji wyników oznaczania lekowrażliwości dla *Yersinia* spp., *Legionella* spp. i *Pseudomonas* spp. reprezentujących inne gatunki niż *P. aeruginosa*, a także opracowanie nowych wartości granicznych dla kolistyny oraz zaproponowanie wartości granicznych dla leków stosowanych miejscowo. W późniejszym okresie należy się spodziewać wartości granicznych dla innych rodzajów drobnoustrojów takich jak np. *Actinomyces* spp., *Nocardia* spp., *Streptomyces* spp., grupa HACEK, *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp. czy *Pediococcus* spp. Warto przypomnieć, że w Polsce dla bakterii, dla których brak jest wartości granicznych EUCAST, należy oznaczyć MIC i podać jego wartość bez interpretacji, a jako wartości graniczne podając wartości graniczne niezwiązane z określonym gatunkiem drobnoustrojów.

Alternatywnie można również stosować aktualne wartości graniczne CLSI i na wyniku oznaczenia lekowrażliwości zaznaczyć, że do interpretacji stosowano zalecenia CLSI.

Podsumowując doświadczenia z niemal trzech lat od wprowadzenia rekomendacji EUCAST można stwierdzić, że laboratoria w Polsce coraz lepiej sobie radzą z ich stosowaniem. Tak jak w przypadku używanych wcześniej zaleceń CLSI, interpretacja wyników oznaczania lekowrażliwości zgodnie z zaleceniami EUCAST budzi ciągle wiele pytań i wątpliwości. Na stronie internetowej Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów www.korld.edu.pl publikowane są tłumaczenia na język polski najważniejszych dokumentów EUCAST oraz wszystkie zalecenia i rekomendacje, wydawane przez Zespół ds. oznaczania lekowrażliwości zgodnie z zaleceniami EUCAST oraz Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów KORLD, w których, mam nadzieję, czytelnik znajdzie informacje pomagające w rozwiązywaniu bieżących problemów z interpretacją wyników oznaczania lekowrażliwości.

Mikrobiologia. Kontrola jakości certyfikatem jakości wyników badań

Kontrola jakości certyfikatem jakości wyników badań

mgr Krystyna Jasińska
Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej
Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego
im. Jana Mikulicza-Radeckiego, Wrocław

Podstawą wyższego standardu opieki nad pacjentami jest podnoszenie jakości badań laboratoryjnych. Poprawne wyniki analiz próbek pacjentów wymagają codziennej kontroli jakości. Nie można mieć zaufania do wyników analiz próbek pacjentów, jeśli nie stosuje się kontroli jakości. Dostarczane przez laboratorium wyniki analiz próbek pacjentów pozwalają lekarzom na podejmowanie istotnych decyzji diagnostycznych i terapeutycznych. Regularne prowadzenie kontroli jakości w celu potwierdzenia precyzji oraz poprawności metod jest głównym sposobem zwiększenia zaufania do prawidłowości uzyskiwanych wyników analiz próbek pacjentów. Wdrożenie codziennej kontroli jakości w laboratorium jest uzasadnioną inwestycją z myślą o lepszej opiece nad pacjentami. Prosty, ale skuteczny system kontroli jakości może pomóc zapewnić wiarygodność wyników analiz próbek pacjentów.

Projektowanie codziennej kontroli jakości w laboratorium.

Zaleca się bardzo staranne projektowanie procedur kontrolnych dla każdego parametru. Planowanie składa się z kilku etapów:

- Krok 1:** Określenie wymagań jakościowych w formie wielkości całkowitego dopuszczalnego błędu (TE_A);
- Krok 2:** Zachowanie wszystkich wskazówek producenta w procesie przygotowania materiału kontrolnego w celu uzyskania stabilnego materiału kontrolnego;
- Krok 3:** Przeprowadzenie wstępnej oceny układu pomiarowego, która dotyczy informacji o nieprecyzyjności i obciążeniu wyników pomiarów;
- Krok 4:** Obliczenie wartości krytycznych błędów przypadkowych i systematycznych;

Krok 5: Wybranie odpowiedniej reguły kontrolnej z określoną liczbą pomiarów w serii oraz optymalnym położeniem granic kontrolnych na karcie Levey'a – Jenningsa;

Kontrola jakości nie zapewnia jakości w sposób automatyczny. Stosunkowo często w laboratoriach kontrolę jakości prowadzi się bez należytego zrozumienia. Przewodząc kontrolę jakości mamy poprawić jakość poprzez wykrywanie błędów, co zmniejszy odsetek fałszywych wyników. Pożądaną jakość analityczną wyników badań, wyrażoną w formie dopuszczalnego błędu całkowitego, a co za tym idzie błędu precyzji i poprawności, określa laboratorium, w którym wykonuje się badania. Ustalając całkowity dopuszczalny błąd można korzystać z różnych źródeł informacji. Najczęściej posługujemy się błędami pochodzącymi z programu zewnętrznej oceny jakości Centralnego Ośrodka Badań Jakości w Diagnostyce Laboratoryjnej. Po ustaleniu wielkości błędów pomiarowych poddajemy materiał kontrolny wstępnym pomiarom i na tej podstawie obliczamy wartość średnią oraz odchylenie standardowe. Odchylenie standardowe dostarcza nam informacji o błędach przypadkowych, natomiast wartość średnia porównana do wartości odniesienia informuje o błędzie systematycznym. Wykorzystując średnią i odchylenie standardowe laboratorium może ustalić limity decyzyjne, które będą określać dopuszczalne wyniki kontroli. Odchylenie standardowe odniesione do wartości średniej informuje nas o zmienności badań i jest miarą błędu przypadkowego. W pracy rutynowej błąd systematyczny obliczamy posiłkując się wartością odniesienia podaną w metryczce materiału kontrolnego. Sposób ten jest najprostszy, lecz w przypadku zwłaszcza nowych serii mianowanego materiału kontrolnego mogą pojawić się błędy. Wprowadzając nowe serie materiału kontrolnego musimy sprawdzić, czy wartości podane w metryczce odpowiadają metodom stosowanym w laboratorium. W przypadku innych metod wartości odniesienia podane w metryczce materiału kontrolnego nie mogą być użyte do obliczeń obciążenia metody w okresie wstępnym. Ograniczony dostęp do wiarygodnych wartości odniesienia rozwiązuje nam uczestnictwo w niezależnym programie porównań międzylaboratoryjnych Standlab. Wartość średnia uzyskana z dużej liczby wyników dla danej partii materiału kontrolnego i dla danej metody wydaje się wiarygodną wartością odniesienia.

W praktyce otrzymane w okresie wstępnym wielkości błędów pomiarowych są przybliżone. Trudne jest oszacowanie w krótkim okresie dokładnie błędu przypadkowego oraz błędu systematycznego. Ustalając odrębne dopuszczalne granice błędu przypadkowego i systematycznego nie uwzględniamy możliwości nakładania się obu rodzajów błędów na wynik pomiaru. Całkowity dopuszczalny błąd określa wspólną granicę dla różnych kombinacji obu rodzajów błędów.

W laboratorium medycznym, gdzie badania wykonywane są w pojedynczych próbkach, każdy pomiar może być obciążony zarówno błędem przypadkowym, jak i systematycznym.

Jeśli nie dochodzi do poważnych zaburzeń w funkcjonowaniu metody, a uzyskane wyniki mieszczą się w granicach błędu mówimy, że metoda funkcjonuje w sposób stabilny. Niespodziewany wzrost odchylenia standardowego lub obciążenia może świadczyć o pojawieniu się błędu, który prowadzi do destabilizacji funkcjonowania metody. Z praktycznego punktu widzenia ważne jest ustalenie granicy dzielącej metodę pod kontrolą od metody poza kontrolą. Konieczny jest wskaźnik świadczący o istotnych zaburzeniach w funkcjonowaniu metody pomiarowej. Wyznaczony w okresie wstępnym podstawowy błąd przypadkowy 1% i podstawowy błąd systematyczny B% oraz określenie założeń jakościowych w postaci całkowitego dopuszczalnego błędu TEA pozwolą obliczyć wartość krytycznego błędu przypadkowego REC i krytycznego błędu systematycznego SEC. Wielkość błędu krytycznego zarówno przypadkowego, jak i systematycznego, informuje o najmniejszym błędzie świadczącym o istotnym zaburzeniu metody pomiarowej. Wzory służące do obliczania wielkości błędów krytycznych są wielokrotnością współczynnika zmienności, który opisuje podstawową precyzję metody wyznaczoną w okresie wstępnym.

Znając wielkość krytycznego błędu przypadkowego i krytycznego błędu systematycznego możemy sprawdzić zdolność reguł interpretacyjnych do wykrycia tych błędów oraz dokonać wyboru reguł interpretacyjnych. W praktyce dla uproszczenia procedury zaleca się dokonanie wyboru reguły interpretacyjnej kierując się jej efektywnością w stosunku do krytycznego błędu systematycznego. Wybór polega na znalezieniu takiej reguły, która zapewni największe prawdopodobieństwo wykrycia błędu PED przy najmniejszej liczbie fałszywych odrzuceń PFR oraz przy użyciu najmniejszej liczby materiałów kontrolnych. Metody z $SEC > 3$ możemy kontrolować za pomocą łagodnych reguł, ponieważ reguły te zapewniają dla tych metod wysokie prawdopodobieństwo wykrycia błędu przy niewielkim odsetku fałszywych odrzuceń z dwoma materiałami kontrolnymi w serii.

Przeciwieństwem są metody o $SEC < 2$, które będą wymagać stosowania restrykcyjnych reguł interpretacyjnych. Z trudem uzyskuje się prawdopodobieństwo wykrycia błędu większe niż 90% przy małej liczbie fałszywych odrzuceń. Przy takim błędzie tylko metody o dużej stabilności możemy kontrolować za pomocą dwóch materiałów kontrolnych.

W przypadku pośrednich metod wybór optymalnych reguł będzie zależeć od stabilności tych metod.

Z **tabeli 1.** (strona 8) z przypadkowymi parametrami i opracowaniami pochodzącymi z raportów walidacyjnych możemy wnioskować, jak ważne jest staranne przeprowadzenie wstępnej oceny metody. Wybór reguły interpretacyjnej oraz liczby materiałów kontrolnych jest konsekwencją wielkości odchylenia standardowego oraz wartości średniej. Przykładem może być cholesterol, gdzie przy tych samych założeniach jakościowych na jednym aparacie i dla tych samych serii materiału kontrolnego uzyskano zupełnie inne wartości

nieprecyzyjności i obciążenia, co diametralnie zmieniło ocenę danej metody, wpłynęło na krytyczny błąd systematyczny oraz wybór reguły kontrolnej z ilością materiałów kontrolnych w serii. Przy prowadzeniu kontroli jakości można popełnić wiele błędów zaczynając od złych założeń co do jakości metody, przez złe postępowanie z materiałem kontrolnym, do złego oszacowania podstawowego błędu precyzji i poprawności. Chcąc uniknąć wielu pułapek przy prowadzeniu kontroli jakości należy dokonywać pełnej oceny za pomocą wskaźników liczbowych i opracowań graficznych.

Nie można zakładać, że proces analityczny będzie zawsze stabilny, że będzie działał bez zakłóceń, że nie pojawią się dodatkowe błędy i to błędy o wartościach krytycznych, czyli błędy, które powinny być wykryte przez procedury kontrolne. Gdyby tak było, kontrola nie byłaby potrzebna. Uzasadnieniem dla prowadzenia stałej kontroli jakości jest właśnie możliwość pojawienia się błędów krytycznych w każdym trudnym do przewidzenia momencie.

Zasadniczą rolę w zapewnieniu wysokiej jakości pracy laboratoriów odgrywają programy kontroli zewnątrzlaboratoryjnej, czyli zewnętrzne programy oceny jakości (EQA), które wspierając codzienną kontrolę jakości same w sobie nie są wystarczające. Programy EQA obejmują oznaczanie nieznanymi próbek co miesiąc lub raz na dwa tygodnie i mogą dostarczać informacji o badaniach wykonanych dla określonej analizy w danym dniu.

Stosowane w połączeniu z codzienną kontrolą mogą dać laboratorium pełniejszy obraz jakości wykonywanych badań.

Dużą pomocą w podniesieniu jakości wyników badań laboratoryjnych jest uczestnictwo w programie porównań międzylaboratoryjnych Standlab. Porównywanie uzyskanych wyników kontroli jakości z wynikami innych laboratoriów przy użyciu tego samego analizatora i tej samej metody (jednorodna grupa laboratoriów) może zwiększyć pewność uzyskiwanych wyników analiz próbek pacjentów. Udział w międzylaboratoryjnym programie Standlab, dostarczającym danych z jednorodnej grupy laboratoriów do codziennej kontroli jakości, pozwala wykryć na wczesnym etapie stopniowe lub nagłe zmiany w procesie pomiarowym. Raporty i wykresy przekazywane w dobrze funkcjonującym programie Standlab mogą ułatwić zadanie monitorowania i zarządzania danymi kontroli jakości.

Laboratoria medyczne pracują pod dużą presją. Zwiększają się wymagania co do jakości wyników przy jednoczesnej redukcji kosztów, co powoduje oszczędzanie na kontroli i stosowaniu mniejszej liczby prób kontrolnych. Dla odbiorcy nie ma znaczenia, czy błędny wynik, jaki otrzymuje, został spowodowany względami ekonomicznymi. Tylko dobrze zaplanowany i rutynowo stosowany program kontroli jakości podnosi jakości badań laboratoryjnych i jest fundamentem wyższego standardu opieki nad pacjentami.

Parametr	TE _A %	I%	B%	RE _c	SE _c	Utrata wiarygodności metody (wzrost błędów)		Reguła kontrolna
						% Przypadkowy	% Systematyczny	
ALAT	15	2,55	2,33	3,33	3,84	8,49	9,79	3S;N=2
		1,58	2,55	5,04	6,64	7,96	10,49	
Albumina	8	1,96	0,68	2,11	1,83	4,14	3,59	3 S / 2 _{2s} / 14S;N=3
		1,85	0,41	2,46	2,42	4,55	4,48	
Cholesterol	9	1,06	0,41	4,47	5,72	4,74	6,06	3,5S;N=2
		1,19	0,33	4,41	5,62	5,25	6,69	
		2,5	1,83	1,51	0,84	3,77	2,1	3 S / 2 _{2s} / 14S;N=3
		2,36	2,42	2,26	2,07	5,33	4,89	

» Tabela 1.

TE_A% - całkowity dopuszczalny błąd;
I% - nieprecyzyjność metody;
B% - obciążenie metody;
RE_c - krytyczny błąd przypadkowy;
SE_c - krytyczny błąd systematyczny;

Borelioza z Lyme - pytania i odpowiedzi

dr n. med. Tomasz Chmielewski
 prof. dr hab. n. med. Stanisława Tylewska-Wierzbanowska
 Samodzielna Pracownia Riketsji, Chlamydii i Krętków Odzwierzęcych
 Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny
 Warszawa

Borelioza z Lyme jest najczęściej występującą na półkuli północnej chorobą przenoszoną przez kleszcze. Wg danych pochodzących ze wszystkich krajów europejskich, na naszym kontynencie rejestruje się około 85 000 zachorowań rocznie. Znaczna ich część, bo aż 75% potwierdzona jest badaniami laboratoryjnymi. Wiąże się to z oczekiwaniami klinicystów na wiarygodny wynik, na podstawie którego można zastosować odpowiednie leczenie. Szczególnym wyzwaniem zarówno dla klinicysty, jak i diagnosty, jest tzw. „seronegatywna” borelioza z Lyme, zespół po boreliozie z Lyme czy przewlekła borelioza z Lyme. Mimo 20-30 lat historii stosowania testów diagnostycznych (głównie serologicznych), nadal występuje szereg wątpliwości, dotyczących głównie prawidłowej ich interpretacji.

Dotychczasowe zasady postępowania diagnostycznego w przypadkach podejrzenia boreliozy z Lyme opierają się na rekomendacjach opracowanych przez Ośrodek Referencyjny WHO ds. boreliozy z Lyme w Monachium w 2000 roku (www.dghm.org/red/index.html?cname=MIQ) z późniejszymi uzupełnieniami (Wilske i wps. 2007) oraz definicji przypadku ustaloną przez European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis (EUCALB) rozszerzoną w 2011 roku (Stanek i wsp. 2011). W Polsce zalecane są rekomendacje Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych (Flisiak i wsp. 2008).

Grupa ekspertów ECDC ds. diagnostyki laboratoryjnej boreliozy z Lyme na spotkaniu w październiku 2013 r. w Amsterdamie potwierdziła, że zalecenia Ośrodka w Monachium, wprowadzające dwuetapową diagnostykę boreliozy z Lyme są w pełni uzasadnione i nadal powinny być stosowane. Ponadto wszyscy uczestnicy spotkania zgodzili się z zalecaną interpretacją testu Western blot, potwierdzającego wynik dodatni lub graniczny oznaczenia poziomu przeciwciał metodą ELISA.

Przyczyny wyników fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych

Czynnikiem etiologicznym boreliozy z Lyme są krętki *Borrelia burgdorferi* sensu lato. W obrębie tego gatunku wyróżnia się kilkanaście genogatunków, z których tylko niektóre są chorobotwórcze i mogą powodować zachorowania u ludzi. Dobrze poznane są trzy genogatunki chorobotwórcze dla człowieka: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garini*, *B. afzeli*, oraz ostatnio zidentyfikowane *B. lusitaniae*, *B. valaisiana*,



B. spielmani, *B. bissettii*. W Ameryce występują tylko *B. burgdorferi* sensu stricto oraz ostatnio rozpoznana *B. bissettii*.

Zróżnicowanie gatunku *B. burgdorferi* sensu lato prowadzi w konsekwencji do zajęcia różnych układów i wystąpienia zróżnicowanych objawów klinicznych; ma także wpływ na diagnostykę.

Najczęściej występującymi genogatunkami w Europie są *B. afzeli* i *B. garini*. Szczepy *B. burgdorferi* sensu stricto występują rzadko i były izolowane głównie w Europie Wschodniej. W obrębie genogatunków wyróżniono ponadto szereg podtypów opartych na budowie biochemicznej białek OspA i OspC. Są to białka powierzchniowe *B. burgdorferi* sensu lato charakteryzują się dużą zmiennością. Na podstawie sekwencji aminokwasów białka OspA wyróżniono dotychczas szereg serotypów występujących na terenie Europy i Ameryki Płn. Odpowiadają one podziałowi na genogatunki. Na podstawie podobnych różnic w przypadku białka OspC pierwotnie wyodrębniono 4 serotypy krętków, jednak na podstawie

badania przy użyciu techniki polimorfizmu konformacji pojedynczych nici DNA genu *OspC* wyróżniono sześćdziesiąt dziewięć grup *OspC* wśród genogatunków *B. burgdorferi* sensu lato izolowanych w Europie i Stanach Zjednoczonych.

Różnorodność genogatunków wywołujących zakażenie i ich immunogenność ma wpływ na wyniki badań w diagnostyce boreliozy z Lyme. Dostępne na rynku testy ELISA różnią się między sobą głównie antygenem diagnostycznym. Może nim być cała komórka bakteryjna w formie sonikatu, sonikat krętka wzbogacony o wybrane antygeny (np. *VlsE* lub *DbpA*) albo antygeny uzyskane na drodze rekombinacji genetycznej.

Obecnie w badaniach przesiewowych stosowane są głównie testy ELISA charakteryzujące się udoskonaloną swoistością, w których w dużym stopniu ograniczono reakcje krzyżowe. Do tej grupy należą testy, w których antygenem diagnostycznym są izolowane frakcje białek albo stosowana jest wstępna absorpcja krętkami Reitera. W najnowszej, trzeciej generacji testów jako antygeny diagnostyczne stosowane są białka rekombinowane. Dotychczas otrzymano i sprawdzono pod względem przydatności w diagnostyce boreliozy z Lyme, białka p83/100 (wskaźnik późnej fazy choroby), p41int wewnętrzna część cząsteczki flageliny o masie 14 kDa, niereagująca krzyżowo z flageliną innych gatunków bakteryjnych, białko błony zewnętrznej *OspC* i p39.

Ostatnie badania wskazują, że uzupełnienie antygeny diagnostycznego o rekombinowane białka *VlsE*, p17 (*DbpA*) i p58, a także p14, p30, p43 znacząco podnosi czułość testów i ogranicza liczbę wyników fałszywie ujemnych.

Nadal problemem diagnostycznym jest wczesne stadium boreliozy z Lyme. Produkcja przeciwciał rozpoczyna się tuż po zakażeniu, ale ich wykrywalne stężenie uzyskuje się pomiędzy 1 a 4 tygodniem po pojawieniu się objawów klinicznych.

Powody różnic w wynikach testów różnych producentów

Analizy wyników uzyskiwanych w diagnostyce dwuetapowej, w której stosuje się testy ELISA-Western-blot z różnymi antygenami, wykazują znaczne różnice.

W badaniach (Ang i wsp. 2011) porównano czułość i swoistość ośmiu komercyjnych testów ELISA oraz ich kombinację z pięcioma testami Western-blot. W zależności od zastosowanego testu, zakażenie wykrywano u 34 do 61% chorych. Rodzaj antygeny diagnostycznego użytego w testach (sonikat, sonikat wzbogacony o izolowane frakcje, antygeny rekombinowane) nie miał wpływu na odsetek wyników dodatnich. Odsetek wyników fałszywie dodatnich w kierunku boreliozy z Lyme u chorych z kiłą lub zakażeniem *Mycoplasma pneumoniae* (reakcje krzyżowe) wahał się od 0% do 38%.

Dodatkowe analizy wyników uzyskane testem potwierdzającym Western-blot, wykazały, że duże rozbieżności zależały od producenta testu, a nie od rodzaju zastosowanego antygeny.

Obserwowane są również różnice w wynikach uzyskanych tym samym testem w poszczególnych laboratoriach,

co może wynikać z niewłaściwego doboru grupy do wyznaczenia wartości granicznej testu. Nie jest więc możliwe, porównywanie wyników uzyskanych tym samym testem w różnych rejonach geograficznych, ze względu na heterogenność genogatunków występujących w Europie i wywołujących zakażenie. Z przeglądów serologicznych wynika, że testami o najwyższej czułości i swoistości są tzw. testy *in-house*. Wynika to zwykle z dużego doświadczenia personelu przygotowującego takie testy, wiedzy o szczepach *B. burgdorferi* sensu lato występujących na danym terenie, często posiadania takich izolatów, a przez to odpowiedniego doboru antygeny używanego w testach stosowanych do badań populacji z danego terenu. Testy te jednak zwykle nie są zwalidowane przez niezależne laboratoria, przez co nie powinny być stosowane w rutynowe diagnostyce.

Podsumowując, rozbieżności w wynikach uzyskiwanych różnymi testami mogą zostać wyeliminowane poprzez porównywanie między sobą testów tej samej generacji, z tym zestawem antygenów i przy użyciu próbek surowic od chorych spełniających kryteria definicji EUCALB.

Najczęstsze reakcje krzyżowe przeciwciał

Podstawowym problemem w serologicznej diagnostyce boreliozy z Lyme są reakcje krzyżowe, zwłaszcza w testach, w których antygen stanowi sonikat krętków. Najbardziej immunogennym, a jednocześnie najmniej swoistym antygenem jest białko p60, tzw. antygen wspólny, białko występujące u wszystkich bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich. W związku z tym odpornościowe surowice uzyskane w wyniku immunizacji zwierząt sonikatami komórek szczepów *Treponema pallidum*, *Leptospira grippotyphosa*, *Borrelia hermsii*, a także *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* reagują krzyżowo z antygenem wspólnym *Borrelia burgdorferi*. Innymi białkami dającymi reakcje krzyżowe są białka p50 i p70 oraz tzw. białko szoku cieplnego p75, a także flagelina. To ostatnie białko charakteryzuje się szeregiem reakcji krzyżowych, lecz ze względu na silną immunogenność, a tym samym wysoką czułość, jest białkiem najczęściej wykorzystywanym jako antygen diagnostyczny. Swoisty gatunkowo fragment flageliny pomiędzy 129 a 251 aminokwasem (wewnętrzna część flageliny), wykorzystywany jest obecnie w diagnostyce (p41int.).

Białko p83 jako jedyne nie reaguje z przeciwciałami dla innych bakterii (w tym również z przeciwciałami dla antygenów *Treponema pallidum*), wykazuje jedynie słabe reakcje z przeciwciałami dla *Borrelia hermsii*. Białko *OspC* wykazuje słabe reakcje z przeciwciałami występującymi u chorych zakażonych wirusami Epstein-a Barr lub cytomegalii, co stwarza trudności w prawidłowej interpretacji wyniku Western-blot zwłaszcza w klasie IgM.

Liczne badania wykazały, że najmniejsze prawdopodobieństwo wystąpienia reakcji krzyżowych, a tym samym największe znaczenie w diagnostyce boreliozy z Lyme mają białka *VlsE*, p83, p41int., p58, p43, p39, p30, *OspC*, p21 i p17. Większość z nich uzyskano na drodze rekombinacji genetycznej, a łańcuchy polipeptydowe zawierają epitopy swoiste tylko dla przeciwciał przeciwko *B. burgdorferi*.

Obecnie trwają prace nad wyprodukowaniem kolejnych swoistych białek:

- CRASP (*complement regulator-acquiring surface protein*),
- ACGal (*glycolipid antigens = 6-O-acylated cholesterol β -D-galactopyranoside*),
- DbpA (Osp17),
- BBK32 (*borrelial fibronectin - binding surface protein*),
- RevA (*outer surface protein - adhesion to fibronectin*),
- OspE,
- OspC (swoista część),
- Hybryd protein VlsE+OspC (VOVO).

Wymagać one jednak będą jeszcze oceny klinicznej przed włączeniem ich do panelu antygenów stosowanych w rutynowej diagnostyce boreliozy z Lyme.

Dlaczego testy Western-blot nie mogą być stosowane jako testy przesiewowe?

Testy Western-blot są immunoenzymatycznymi testami jakościowymi wskazującymi, jakie przeciwciała dla swoistych antygenów *Borrelia burgdorferi* sensu lato wykrywamy w badaniu. Nie określają one poziomu przeciwciał we krwi w przeciwieństwie do testów ilościowych lub półilościowych ELISA. Określenie stężenia przeciwciał pozwala na porównanie z wartością progową (wartość graniczna, ang. *cut off*) wyznaczoną w badaniach chorych i zdrowych ludzi, powyżej której wynik można uznać za dodatni tj. świadczący o zakażeniu. Z założenia testy ELISA są testami przesiewowymi charakteryzującymi się czułością blisko 100%. Test Western-blot jest natomiast testem swoistym, którego zastosowanie w pierwszym etapie może się wiązać z otrzymaniem wyników fałszywie ujemnych, ale w niektórych przypadkach także z otrzymaniem wyników fałszywie dodatnich (Wormser i wsp. 2000).

Dlaczego obecność przeciwciał IgM w PMR jest mało przydatna w diagnostyce neuroboreliozy?

W ostatnich latach ukazały się rekomendacje dotyczące diagnostyki i leczenia neuroboreliozy. (EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. Mygland et al. 2010). Wg przedstawionych tam kryteriów podstawą rozpoznania jest stwierdzenie obecności przeciwciał metodą ELISA w surowicy krwi i w płynie mózgowo-rdzeniowym i metodą Western-blot w surowicy. Należy jednak pamiętać o mniejszej czułości tych metod wynoszących nie więcej niż 70-90% u chorych, u których objawy trwają krócej niż 6 tygodni. Z tego powodu wyniki badań serologicznych powinny być interpretowane z uwzględnieniem objawów klinicznych, a wykonywanie takich badań powinno być zlecane jedynie u chorych. Podstawą rozpoznania neuroboreliozy jest stwierdzenie określonych objawów klinicznych i potwierdzenie badaniem laboratoryjnym. Zlecając badanie serologiczne w neuroboreliozy należy zawsze uwzględniać fakt, że przeciwciała dla *B. burgdorferi* są wykrywane u 5-20% osób zdrowych, szczególnie

na terenach endemicznych. Należy także uwzględnić utrzymywanie się przeciwciał u części zakażonych przez wiele lat po wyleczeniu.

Do rozpoznania neuroboreliozy potrzebne jest stwierdzenie wewnątrzoponowej produkcji przeciwciał. Przeciwciała klasy IgM są wykrywane w wysokim mianie w płynie mózgowo-rdzeniowym w neuroboreliozy wczesnej głównie u dzieci. Obserwowane są jednak także wyniki fałszywie dodatnie (reakcje krzyżowe) w klasie IgM u chorych z zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych, którego czynnikiem etiologicznym był wirus Epstein-Barr. Wynik fałszywie dodatni może być również skutkiem produkcji przeciwciał oligoklonalnych w chorobach autoimmunologicznych (np. SM). Dotychczas nie opracowano testów Western-blot mogących zweryfikować swoistość takich wyników, dlatego wykrycie przeciwciał klasy IgM w płynie mózgowo-rdzeniowym ma ograniczoną wartość diagnostyczną.

Problemy diagnostyki boreliozy z Lyme

Proponowane przez niektóre ośrodki diagnostyczne w Polsce badania diagnostyczne, reklamowane jako „bardzo czułe i pozwalające monitorować przebieg leczenia” nie tylko nie są zalecane przez Europejski Ośrodek Referencyjny WHO ds. boreliozy z Lyme w Monachium i ECDC (European Center for Diseases Control) w Sztokholmie, ale ich wiarygodność jest kwestionowana. Nie istnieje problem „mało czułych” metod diagnostycznych stosowanych w rozpoznawaniu boreliozy z Lyme, a jedynie problem właściwej diagnostyki zgodnej z powyższymi zaleceniami oraz prawidłowa interpretacja otrzymanych wyników przy uwzględnieniu kryteriów klinicznych wynikających z definicji przypadku.

Obecnie nie istnieje potrzeba podejmowania działań w celu uzupełnienia diagnostyki boreliozy z Lyme o nowe (niezwalidowane w niezależnych laboratoriach) metody, ponieważ zgodnie z zaleceniami Europejskiego Ośrodka Referencyjnego WHO ds. boreliozy z Lyme w Monachium oraz ECDC w Sztokholmie, przyjęte zostały w całej UE określone zasady postępowania diagnostycznego, tj. serologiczna diagnostyka dwustopniowa polegająca na oznaczeniu w pierwszym etapie - poziomu przeciwciał testami serologicznymi o wysokiej czułości (test ELISA), a następnie weryfikacja wyników dodatnich lub wątpliwie dodatnich jakościową metodą Western-blot. Interpretacja wyniku badania metodą Western-blot musi uwzględniać kryteria ustalone na podstawie wielośrodkowych badań, przeprowadzonych w różnych rejonach Europy. Należy precyzyjnie wskazać swoiste tylko dla *Borrelia burgdorferi* antygeny (niebędące reakcjami krzyżowymi z innymi drobnoustrojami), z którymi reagują wykryte u chorego przeciwciała.

Czy są podjęte działania w celu poprawy diagnostyki tej choroby w Polsce?

Nie istnieje potrzeba usprawnienia diagnostyki boreliozy z Lyme. Istnieje jedynie potrzeba ujednoczenia postępowania diagnostycznego przyjętego w UE. Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych w porozumieniu

z Ministerstwem Zdrowia opracowuje obecnie „Rekomendacje Diagnostyki Laboratoryjnej” dotyczące chorób przenoszonych przez kleszcze, w tym boreliozy z Lyme. Należy te procedury upowszechnić, tak żeby wyniki uzyskane w różnych laboratoriach były porównywalne i jednocześnie wiarygodne.

Czy potrzebne jest podjęcie działań w celu poprawy jakości leczenia boreliozy z Lyme?

W przypadku boreliozy z Lyme doświadczenia lekarzy chorób zakaźnych zarówno w Europie jak i Stanach Zjednoczonych wskazują, że leczenie przez 3-4 tygodnie odpowiednimi antybiotykami, podawanymi właściwą drogą, skutecznie likwiduje zakażenie. W przypadku neuroboreliozy stosuje się leczenie dożylnie np. ceftriaxonem, natomiast boreliozę stawową podając doustnie np. doksycylinę. Nie należy przedłużać czasu leczenia. W USA w stosunku do lekarzy przedłużających stosowanie antybiotyków do kilku miesięcy w boreliozy z Lyme wprowadzono ograniczenia w leczeniu chorych.

Zgodnie z naszą wiedzą, a także zaleceniami programu European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis (EUCALB), borelioza z Lyme jest chorobą wyleczalną, przy czym znaczenie ma wczesne rozpoznanie choroby i wczesne zastosowanie odpowiedniej antybiotykoterapii.

Występujące u niektórych pacjentów po wyleczeniu objawy, podobne w przebiegu do boreliozy z Lyme, określane są jako tzw. „Post Lyme syndrom”. Spowodowane one są nieodwracalnymi zmianami (uszkodzeniami) nerwów, chrząstek stawowych, które nastąpiły podczas zakażenia. Pacjentom tym zaleca się wyłącznie leczenie objawowe. Przyczyną tych uszkodzeń jest białko A błony zewnętrznej krętków *Borrelia burgdorferi* sensu lato wykazujące podobieństwo do pewnych epitopów tkanki stawowej lub nerwowej człowieka. Wytworzone przeciw temu białku przeciwciała mogą reagować z określonymi tkankami ludzkimi, niszcząc je. Przedłużanie antybiotykoterapii jest całkowicie nieskuteczne.



Vidas Lyme IgM
Lyme IgG

Dwa markery – pełen profil serologiczny

Jednoznaczny profil serologiczny

- Ułatwia klasyfikację boreliozy z Lyme: wczesnej/ późnej, przewlekłej/ aktywnej
- Zapewnia pacjentom szybkie, zoptymalizowane leczenie w zależności od stadium zakażenia.

Wysoka specyficzność i czułość

- Innowacyjne rekombinowane białka chimeryczne** (VlsE, DbpA, OspC) umożliwiające detekcję wszystkich głównych patogenów szczepów *Borrelia* (*sensu stricto*, *afzelii*, *garinii*)
- Zredukowana liczba powtórných oznaczeń oraz dodatkowych testów potwierdzających
- Niski poziom reakcji krzyżowych (kila, inne choroby zakaźne)
- Pozwala uniknąć niepotrzebnego leczenia

Łatwa interpretacja wyniku

- Brak niejednoznacznych wyników w teście VIDAS® Lyme IgG (brak szarej strefy)
- Możliwość uniknięcia dalszej, niepotrzebnej diagnostyki

Diagnostyka neuroboreliozy

Wykrywanie przeciwciał IgG *Borrelia burgdorferi* w próbkach płynu mózgowo – rdzeniowego (PMR)

Użytkowanie i efektywność kosztowa

- Szybkie wyniki w zaledwie 27 minut
- Kalibracja raz na 28 dni
- Łatwość użycia
- System monotestów
- Kompatybilność protokołów obu testów

Nowe podłoże do oznaczania lekowrażliwości bakterii niewymagających: Mueller-Hinton E

dr n. med. Alicja Rusinek
bioMérieux Polska Sp. z o.o.
Warszawa

Firma bioMérieux oferuje szeroki zakres wystandaryzowanych, wysokiej jakości podłoża do oznaczania lekowrażliwości drobnoustrojów. Nowe podłoże dla bakterii niewymagających (pałeczek jelitowych, niefermentujących pałeczek Gram-ujemnych, gronkowców i enterokoków) zostało opracowane zgodnie z zaleceniami zarówno EUCAST® (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) jak i CLSI® (Clinical and Laboratory Standards Institute Inc.).

Mueller Hinton E (MHE) zapewnia doskonałe warunki do wzrostu bakterii, jednocześnie minimalizując wpływ na wyniki testu lekowrażliwości. Odpowiednie stężenie jonów dwuwartościowych gwarantuje uzyskanie prawidłowych wyników dla antybiotyków o aktywności zależnej od kationów. Niskie stężenie tyminy - tymidyny (inhibitory sulfonamidów) ogranicza podrosty wokół krążka, pozwalając na dokładniejszy pomiar strefy zahamowania wzrostu.

Podłoże można stosować zarówno w metodzie dyfuzyjno-krążkowej, jak i przy oznaczaniu wrażliwości paskami z gradientem stężeń antybiotyków. Kompatybilność MHE z paskami Etest® została potwierdzona specjalnym certyfikatem.

Podłoża MHE są konfekcjonowane w różny sposób w zależności od potrzeb laboratorium:

Mueller-Hinton E Nr kat. 413822
- 20 płytek o średnicy 90 mm,

Mueller-Hinton E Nr kat. 413823
- 20 płytek o średnicy 145 mm,

Mueller-Hinton E Nr kat. 413824
- 100 płytek o średnicy 90 mm,

Mueller-Hinton E Nr kat. 413825
- 20 płytek 120x120 mm.

W ofercie firmy znajdują się również inne podłoża do oznaczania lekowrażliwości:

Mueller Hinton + 5% krwi końskiej + NAD (MHF)

podłoże do oznaczania lekowrażliwości bakterii wymagających (pneumokoki i inne paciorkowce, *Haemophilus*, *Moraxella*)

- Zgodność z zaleceniami EUCAST
- Kompatybilność z paskami Etest

Nr kat. 43901 - 20 płytek o średnicy 90 mm,
Nr kat. 43904 - 20 płytek 120x120 mm,
Nr kat. 43909 - 100 płytek o średnicy 90 mm.

Mueller Hinton + 5% krwi baraniej (MHS)

podłoże do oznaczania lekowrażliwości bakterii wymagających do wzrostu dodatku krwi (pneumokoki i inne paciorkowce)

- Zgodność z zaleceniami CLSI
- Kompatybilność z paskami Etest

Nr kat. 43321 - 20 płytek o średnicy 90 mm,
Nr kat. 43324 - 20 płytek 120x120 mm,
Nr kat. 43329 - 100 płytek o średnicy 90 mm.

RPMI

podłoże do oznaczania lekowrażliwości drożdżaków i pleśni przy użyciu pasków Etest

Nr kat. AEB122180 - 10 płytek o średnicy 90 mm,
Nr kat. AEB122182 - 10 płytek o średnicy 140 mm.

Brucella 5% krwi baraniej

podłoże do oznaczania lekowrażliwości bakterii beztlenowych przy użyciu pasków Etest

Nr kat. 411968 - 20 płytek o średnicy 90 mm.

Mueller Hinton z kloksacyliną

podłoże do potwierdzania wytwarzania ESBL w metodzie krążkowej i Etest

Nr kat. AEB120290 - 10 płytek o średnicy 90 mm,
Nr kat. AEB120291 - 10 płytek 120x120 mm.

» ACINETOBACT-
19606-MHE



Mueller Hinton + 2% NaCl

podłoże do oznaczania metycylinooporności gronkowców przy użyciu Etest

Nr kat. AEB521800E - 20 płytek o średnicy 90 mm.

BHI

podłoże do potwierdzania oporności gronkowców na glikopeptydy przy użyciu Etest

Nr kat. AEB520410 - 20 płytek o średnicy 90 mm.

Bulion Mueller Hintona

podłoże do sporządzania zawiesiny wyjściowej do Etest (beztlenowce, paciorkowce, Haemophilus) lub do oznaczania MIC metodą rozcieńczeń w bulionie

Nr kat. AEB110699 - 100 probówek po 10 ml.



» STAPH-43300-MHE



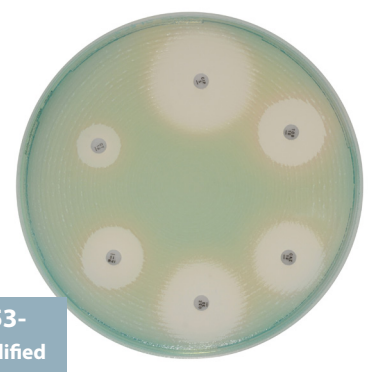
» STAPH-12493-MHE



» PSEUDO-27853-MHE



» STAPH-1207049-MHE



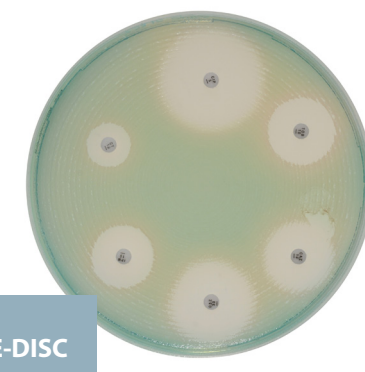
» PSEUDO-27853-MHE-DISC modified



» PSEUDO-27853-MHE-BML



» STAPH-25923-MHE-DISC



» PSEUDO-27853-MHE-DISC

Znaczenie badań molekularnych w diagnostyce zakażeń parwowirusem B19

mgr Aleksandra Kalińska
Instytut Hematologii i Transfuzjologii
 Zakład Wirusologii
 Pracownia Biologii Molekularnej Wirusów, Warszawa

BIOLOGIA

Parwovirus B19 (B19V) został odkryty przez wirusolog Yvonne Cossart w trakcie badań HBsAg w 1974 roku. Należy on do rodziny Parvoviridae, rodzaju Erythrovirus. Jego replikacja zachodzi w erytroidalnych komórkach prekursorowych. Receptorem jest antygen P (globozyd) erytrocytów. Wirus wykazuje powinowactwo również do innych komórek, np. megakariocytów, fibroblastów, miocytów mięśnia sercowego, hepatocytów, endothelium czy błony maziowej stawów. Osoby nieposiadające antygenu P (1/200 000) są naturalnie odporne na zakażenie B19V i nie stwierdza się u nich swoistych przeciwciał. Parwovirus B19 to jeden z najmniejszych wirusów wywołujących infekcje wyłącznie u człowieka. Kapsyd wirusa (ok. 25 nm) o symetrii kubicznej jest pozbawiony otoczki lipidowej, co powoduje jego oporność na termiczne i chemiczne metody inaktywacji stosowane przy produkcji preparatów krwi. Metodą stosowaną w transfuzjologii do eliminacji tego patogenu jest nanofiltracja.

Genom parwowirusa B19 stanowi jednoniciowy DNA (ssDNA, ok. 5,6 kb) kodujący białka kapsydu – VP1 i VP2 oraz niestrukturalne NS1. Białko VP1 odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi immunologicznej, tropizm wirusa determinuje białko VP2, natomiast białko NS1 jest odpowiedzialne za śmierć zainfekowanej komórki.

Do chwili obecnej wyróżniono trzy główne formy polimorficzne parwowirusa B19 – genotypy 1, 2, 3. Zróżnicowanie na poziomie molekularnym wynosi około 10%. Najbardziej powszechny jest genotyp 1, który występuje na całym świecie, w tym w Polsce. Genotyp 2 wykrywany jest w mniejszości na terenie Europy, np. w Danii, Niemczech, Francji czy Anglii. Dwa przypadki zakażeń genotypem 2 B19V stwierdzone w Polsce u pacjentów z obniżoną odpornością wskazują na krążenie tej formy polimorficznej na terenie Europy Wschodniej. Genotyp 2 występuje również na terenie Ameryki (USA, Brazylia), Azji (Wietnam) czy Afryki Południowej. Afrykę Zachodnią uważa się za miejsce endemicznego występowania genotypu 3. Był on sporadycznie wykrywany na terenie Europy (Grecja, Bułgaria, Anglia) czy w Brazylii.

DROGI PRZENIESIENIA ZAKAŻENIA, EPIDEMIOLOGIA

Najbardziej powszechną drogą przeniesienia infekcji parwowirusem B19 jest droga kropelkowa przez drogi



oddechowe. Do transmisji wirusa może również dojść przez łożysko od matki do płodu, wraz z przeszczepianymi narządami, tkankami oraz przez przetoczenie krwi i jej składników, produktów krwiopochodnych.

Zakażenie parwowirusem B19 jest powszechne na całym świecie, dotyczy głównie dzieci oraz młodzieży. Częstość występowania swoistych przeciwciał klasy IgG wynosi od 2% do 15% u dzieci w wieku 1-5 lat, 15-60% wśród osób 6-19 lat, od 30% do 60% u dorosłych i powyżej 85% wśród osób starszych. Infekcja B19V ma charakter sezonowy. Zwiększona liczbę zachorowań, głównie wśród dzieci i młodzieży szkolnej, obserwuje się późną zimą lub wczesną wiosną. Uważa się, iż co 3-4 lata częstość infekcji B19V może osiągać poziom epidemiczny. Epidemię parwowirusa B19 stwierdzono w Polsce w 1999 roku. Częstość DNA-emii wśród dawców krwi szacuje się na 0,6-0,003%. Badania DNA B19V wśród polskich krwiodawców w latach 2004-2010 wykazały występowanie tego markera w 0,1% donacji przeznaczonych do frakcjonowania.

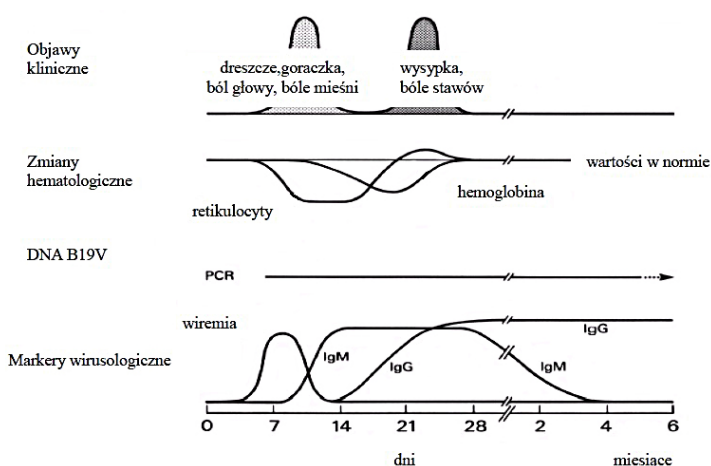
Szacuje się, iż około 40% kobiet w wieku rozrodczym w Polsce jest narażona na zakażenie parwowirusem B19, a u 1,5% dochodzi do infekcji. U 30-50% zakażonych kobiet ciężarnych następuje transmisja wirusa od matki do płodu, a u blisko 10% z nich obserwuje się poważne powikłania, np. poronienie, nieimmunologiczny obrzęk płodu czy niedokrwistość. Trudna jest do oszacowania liczba powikłań mających wpływ na zdrowie i rozwój dzieci urodzonych z zakażeniem B19V.

Częstość wykrywania markerów serologicznych B19V jest wyższa w niektórych grupach chorych, np. wśród chorych na hemofilię, może przekraczać nawet 90% i jest związana z leczeniem krwią i produktami krwiopochodnymi.

PRZEBIEG ZAKAŻENIA U OSÓB Z PRAWIDŁOWĄ ODPORNOŚCIĄ

U osób immunokompetentnych zakażenie parwowirusem B19 przebiega zazwyczaj bezobjawowo lub z mało swoistymi objawami grypopodobnymi. Model przebiegu infekcji został opisany na podstawie analizy eksperymentalnej infekcji patogenem u zdrowych ochotników (Rycina 1).

Rycina 1. Przebieg zakażenia parwowirusem B19 u osób immunokompetentnych (wg Heegaard E., 2002)



W pierwszej fazie zakażenia ma miejsce najwyższy poziom wiremii DNA B19V osiagający nawet do 10^{14} IU/ml we krwi obwodowej. Mogą mu towarzyszyć niespecyficzne objawy kliniczne, np. dreszcze, gorączka, ból głowy czy niewielki spadek parametrów hematologicznych. Jest to okres okienka serologicznego, kiedy przeciwciała anty-B19V nie są jeszcze wykrywane. Po około 2 tygodniach od wnikięcia wirusa do organizmu następuje druga faza infekcji i zaczynają być produkowane przeciwciała klasy IgM. Ich pojawienie się koreluje z redukcją DNA-emii B19V we krwi obwodowej, czemu towarzyszy kolejny rzut objawów chorobowych - wysypka, świąd czy bóle stawów z nieistotnym klinicznie spadkiem hemoglobiny. Około tydzień po pojawieniu się przeciwciał anty-B19V klasy IgM następuje serokonwersja i przeciwciała anty-B19V klasy IgG redukują poziom wirusa aż do całkowitego zaniku DNA. Są one wykrywane przez resztę życia, stanowiąc ochronę przed kolejnymi infekcjami B19V. Powyższy schemat przebiegu zakażenia u osób

z prawidłową odpornością zakłada zanik DNA-emii B19V w kilka tygodni od rozpoczęcia infekcji. Jednakże obecne badania z zastosowaniem bardzo czułych metod molekularnych wykazały, że wirus może utrzymywać się w organizmie nawet przez kilka lat. W tej sytuacji należy twierdzić o przewlekłym zakażeniu parwowirusem B19.

ZNACZENIE KLINICZNE

Znaczenie kliniczne zakażenia parwowirusem B19 jest ściśle związane ze statusem immunologicznym osoby zainfekowanej. W Tabeli 1 przedstawiono najczęstsze objawy kliniczne towarzyszące zakażeniu.

Tabela 1. Najczęstsze objawy kliniczne w przebiegu zakażenia parwowirusem B19 (wg Young N., 2004)

Objawy kliniczne	Przebieg zakażenia	Kategoria osoby zakażonej
brak	ostry lub przewlekły	osoby immunokompetentne
rumień zakaźny	ostry	immunokompetent-niedzieci
reumatoidalne zapalenie stawów	ostry lub przewlekły	immunokompetentni dorośli
prześciowy przełom aplastyczny	ostry	chorzy z nasiloną erytropoezą
przewlekła anemia	przewlekły	chorzy z osłabioną odpornością
nieimmunologiczny obrzęk płodu, wrodzona niedokrwistość	ostry lub przewlekły	płód

U osób z prawidłową odpornością zakażenie B19V często przebiega bezobjawowo. U immunokompetentnych dzieci może wystąpić rumień zakaźny, natomiast u dorosłych (zwłaszcza u kobiet) reumatoidalne zapalenie stawów.

Szczególną grupę stanowią kobiety w ciąży, które wcześniej nie przechodziły infekcji i nie posiadają przeciwciał anty-B19V. U tych ciężarnych zakażenie parwowirusem B19 może spowodować poważne powikłania. Wirus niesie ze sobą ryzyko wystąpienia poronienia czy nieimmunologicznego obrzęku płodu (szczególnie w I i II trymestrze ciąży), niedokrwistości płodowej czy wrodzonej anemii u dziecka. Przeniesienie zakażenia B19V do płodu może sporadycznie być przyczyną, m.in. wady serca, zapalenia wątroby czy mięśnia sercowego, zaburzeń neurologicznych.

Istotne problemy kliniczne w przebiegu zakażenia parwowirusem B19 mogą pojawić się u osób z niedoborem odporności – zakażonych wirusem HIV czy chorych otrzymujących chemioterapię, leki immunosupresyjne. U tych pacjentów w wyniku reaktywacji B19V bądź infekcji *de novo* może dojść do poważnych powikłań, np. przewlekłej niedokrwistości. Również pacjenci z pobudzonym układem czerwonych krwinek w szpiku kostnym są narażeni na wystąpienie przejściowego przełomu aplastycznego.

DIAGNOSTYKA ZAKAŻENIA

- **Badania diagnostyczne metodami serologicznymi**

Diagnostyka zakażenia parwowirusem B19 metodami serologicznymi oparta jest na badaniu przeciwciał

anty-B19V klasy IgM oraz IgG, ich stężenia i typów konformacyjnych. Dzięki testom różnicującym odpowiedź immunologiczną wobec białek wirusa możliwa jest ocena fazy zakażenia (ostre/przewlekłe/reinfekcja). Również testy oceniające awidność przeciwciał anty-B19V klasy IgG pomocne są w oszacowaniu czasu trwania infekcji, gdy w surowicy chorego nie są obecne przeciwciała anty-B19V klasy IgM. W niektórych przypadkach badanie przeciwciał anty-B19V pozwala ocenić dynamikę zmian i dostrzec serokonwersję.

Badania serologiczne są przydatne u osób z prawidłową odpornością. Jednakże należy pamiętać, iż przeciwciała anty-B19V nie są wykrywane w okienku serologicznym. Wykrycie przeciwciał anty-B19V klasy IgM najczęściej świadczy o aktualnej infekcji, ale ta klasa przeciwciał może być wykrywana w surowicy osób immunokompetentnych nawet powyżej roku (Tabela 2). Stwierdzenie serokonwersji pozwala wnioskować o aktualnym zakażeniu B19V. Wykrycie wyłącznie przeciwciał anty-B19V klasy IgG nie zawsze różnicuje aktualnie występującą bądź przebytą infekcję.

Badanie markerów serologicznych może nie być informatywne u osób z obniżoną odpornością, leczonych immunosupresyjnie czy chemioterapią, jak również w diagnostowaniu zakażenia parwowirusem B19 u płodu.

• Badania diagnostyczne metodami biologii molekularnej

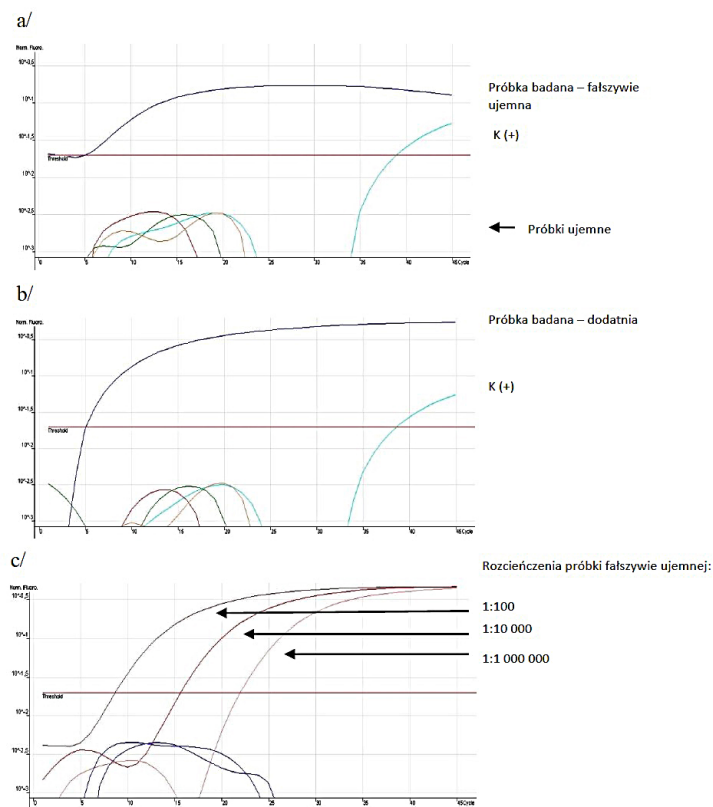
Metody molekularne stanowią nowoczesne i czułe narzędzie wykorzystywane do diagnozowania zakażenia B19V. Stosowana dawniej technika hybrydyzacji została obecnie zastąpiona testami jakościowymi lub ilościowymi opartymi na amplifikacji kwasów nukleinowych. Nowoczesną metodą, współcześnie najczęściej używaną, jest reakcja łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-time PCR, ang. *Real-time Polymerase Chain Reaction*), która wykrywa pojedyncze kopie wirusa w różnym materiale, np. osoczu, surowicy, płynie owodniowym czy tkankach. Metoda ta pozwala na ilościową analizę wirerii DNA B19V z wysoką czułością oraz monitorowanie przebiegu zakażenia w czasie, co ma duże znaczenie w rozgraniczeniu infekcji istotnej bądź nieistotnej klinicznie oraz umożliwia ocenę zastosowanego postępowania przeciwwirusowego.

Ważne jest, aby w diagnostyce molekularnej zakażenia B19V stosować testy pozwalające na wykrycie wszystkich poznanych genotypów z podobną czułością. Są bowiem takie, które nie wykrywają poziomu detekcji niektórych form polimorficznych, w szczególności genotypu 2 i 3 lub go zaniżają.

Stosując metody molekularne w diagnozowaniu infekcji B19V należy pamiętać o ryzyku otrzymania wyników fałszywie ujemnych w próbkach z bardzo wysoką wiracją DNA B19V, szczególnie u osób we wczesnej fazie zakażenia bądź u osób z niedoborem odporności, gdzie DNA-emia może osiągnąć poziom nawet 10^{14} IU/ml. Na Rycinie 2 przedstawiono wynik fałszywie ujemny otrzymany w próbce z wysoką DNA-emią B19V w trakcie automatycznej analizy reakcji real-time PCR z powodu przekroczenia górnego progu liniowości (a). W takich sytuacjach zaleca się wykonanie manualnej analizy zmian

fluorescencji sondy FAM w trakcie amplifikacji (b) oraz przeprowadzenie ponownej reakcji real-time PCR, tym razem w rozcieńczeniach (tak, jak pokazano na Rycinie 2, c). W tym przypadku wykazano skrajnie wysoką DNA-emię B19V w próbce wynoszącą 10^{11} IU/ml.

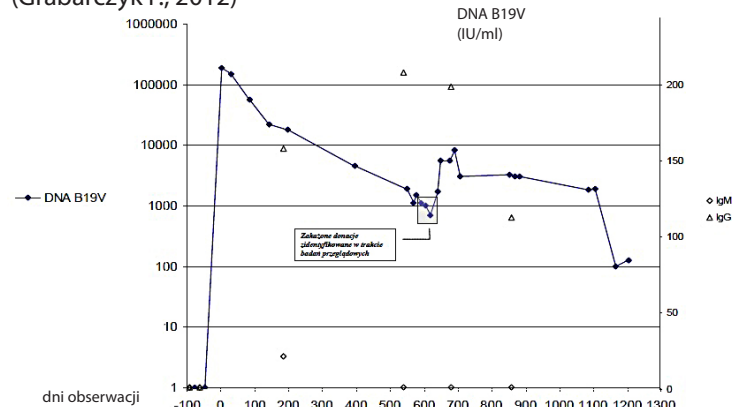
Rycina 2. Wykresy fluorescencji sondy FAM (real-time PCR, wg Candotti D., 2004) w próbce fałszywie ujemnej: a/ analiza automatyczna, b/ analiza manualna, c/ rozcieńczenia próbki fałszywie ujemnej (Grabarczyk P., 2010)



Ze względu na możliwość diagnozowania próbek z wysoką wiracją DNA B19V należy zachować procedury ograniczające możliwość kontaminacji.

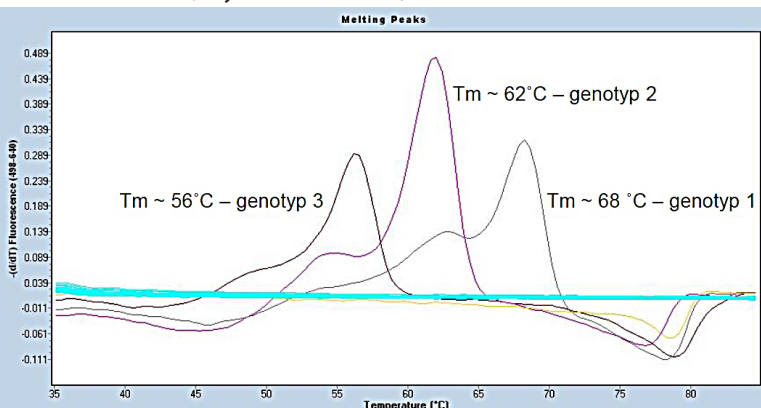
Wysoka czułość testów molekularnych sprawia, iż wykryte DNA wirusa nie zawsze wskazuje na ostrą infekcję. Niska wiramia DNA B19V może utrzymywać się miesiącami czy latami. Taki przewlekły charakter zakażenia B19V możemy obserwować nie tylko u pacjentów z obniżoną odpornością, ale także u osób immunokompetentnych. Na Rycinie 3 przedstawiono przewlekły przebieg zakażenia parwowirusem B19 u polskiego dawcy krwi, u którego DNA wykrywano ponad 3 lata.

Rycina 3. Przewlekłe zakażenie B19V u dawcy krwi (Grabarczyk P., 2012)



Ważną rolę poznawczą w diagnostyce zakażenia B19V pełni badanie polimorfizmu. Obok metod sekwencjonowania genomu wirusa łatwym narzędziem do wykrycia form polimorficznych B19V jest metoda analizy temperatury topnienia (T_m) produktu amplifikacji przy użyciu sond hybrydacyjnych. Na Rycinie 4 przedstawiono zróżnicowanie genotypów 1, 2, 3 wirusa B19 na podstawie analizy temperatury topnienia produktów PCR.

Rycina 4. Identyfikacja genotypów 1-3 B19V metodą analizy temperatury topnienia (T_m) z użyciem sond typu HybProbes w próbkach DNA B19V (+) (wg Schalasta G., 2004; wyniki - IHiT 2013)



ZNACZENIE BADAŃ METODAMI BIOLOGII MOLEKULARNEJ

• Znaczenie badań DNA B19V w krwiodawstwie

Stosowanie badań molekularnych parwowirusa B19 w krwiodawstwie regulują przepisy zawarte w Farmakopei Europejskiej (European Pharmacopoeia 2004), zgodnie z którymi stężenie DNA B19V w puli osocza do produkcji immunoglobuliny anti-D nie może przekroczyć poziomu 10^4 IU/ml. W Polsce badania przeglądowe DNA B19V u dawców wykonuje się dodatkowo w pulach osocza do produkcji immunoglobuliny anti-HBs od 2004 roku. Testy wykorzystywane w krwiodawstwie oparte są na metodach real-time PCR oraz TMA (TMA, ang. *Transcription-Mediated Amplification*).

W obecnej chwili nie ma regulacji prawnych określających wykonywanie badań DNA B19V u dawców krwi i jej składników przeznaczonych do transfuzji. Uważa się, iż zakażenie B19V, ze względu na powszechność występowania oraz niewielkie prawdopodobieństwo wystąpienia istotnych klinicznie powikłań poinfekcyjnych, w większości przypadków nie stanowi zagrożenia dla biorców krwi i jej składników. Jednak istnieje grupa biorców krwi - osoby z obniżoną odpornością, chorzy na immunosupresji czy kobiety w ciąży, u których przeniesienie zakażenia B19V może spowodować poważne powikłania zdrowotne.

Wykazano przeniesienie B19V genotyp 1 z przetoczonymi składnikami krwi u chorych z osłabionym układem immunologicznym, u których obserwowano powikłania kliniczne, jak retikulocytopenię czy wybiórczą aplazję czerwonych krwinek.

Przeprowadzona analiza markerów serologicznych i molekularnych B19V u 43 polskich dawców osocza

przeznaczonego do frakcjonowania wykazała przewlekły charakter infekcji z niską DNA-emią utrzymującą się nawet powyżej 2 lat (Tabela 2).

Tabela 2. Charakterystyka zakażenia B19V zidentyfikowanego u dawców osocza przeznaczonego do frakcjonowania (wyniki – IHiT 2014)

Okres między badaniem indeksowym i ostatnim	Liczba dawców	Markery zakażenia B19V w ostatniej badanej próbce osocza dawcy			
		IgG (n)	IgM (n)	Stężenie DNA B19V (IU/ml)	
				Minimum	Maksimum
< 1 roku	24	24 (100%)	14* (58,3%)	$4,10 \times 10^2$	$3,73 \times 10^4$
1-2 lat	14	14 (100%)	1** (7,1%)	$3,90 \times 10^1$	$4,24 \times 10^3$
> 2 lat	5	5 (100%)	0 (0%)	$2,16 \times 10^1$	$1,24 \times 10^2$

* anti-B19V IgM wykrywane w osoczu dawców od 2 do 10 miesięcy

** anti-B19V IgM wykrywane w osoczu dawcy przez 14 miesięcy

Obecnie w Polsce zalecono dwunastomiesięczną dyskwalifikację krwiodawcy, u którego w badaniach przeglądowych B19V w osoczu przeznaczonym do frakcjonowania wykryto parwowirusa B19, ma to na celu maksymalne bezpieczeństwo biorcy krwi i jej składników. Przywrócenie dawcy do oddawania krwi może nastąpić po uzyskaniu wyniku ujemnego DNA B19V metodą real-time PCR o czułości nie niższej niż 100 IU/ml.

• Znaczenie badań DNA B19V u kobiet w ciąży

Immunokompetentne kobiety w ciąży należą do grupy ryzyka wystąpienia poważnych powikłań w przebiegu zakażenia parwowirusem B19. Blisko 40% ciężarnych jest podatnych na infekcję B19V wobec braku przeciwciał anti-B19V klasy IgG świadczących o przebytych w przeszłości zakażeniu, z czego 1,5% jest w grupie ryzyka zakażenia B19V. Przyjmując, że w Polsce 400 000 kobiet w roku jest w ciąży, można założyć, iż 6 000/rok przejdzie zakażenie parwowirusem B19, a wśród nich u około 240/rok płodów mogą wystąpić groźne powikłania z powodu przeniesienia B19V od matki. Ważne jest, aby stosować odpowiednie narzędzia diagnostyczne do celu właściwego i szybkiego rozpoznania infekcji tym patogenem u kobiety ciężarnej i płodu. Wcześniejsze podejście diagnostyczne oparte przede wszystkim na badaniach przeciwciał anti-B19V u kobiet ciężarnych wydaje się być niewystarczające. Przedstawiona poniżej analiza wyników badań markerów B19V u kobiet ciężarnych, płodów i dzieci urodzonych z infekcją B19V wskazuje, iż diagnostyka zakażenia w tej grupie osób powinna jednak opierać się na badaniu NAT (NAT, ang. *Nucleic Acid Tests*).

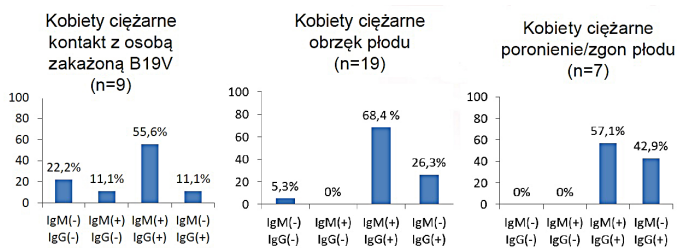
Przeanalizowano wyniki badań serologicznych i molekularnych u kobiet ciężarnych (13-37 hbd) w wieku 21-37 lat oraz płodów i dzieci, u których stwierdzono infekcję B19V, skierowanych do Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w latach 2005-2013. Analizy dokonano w trzech grupach kobiet w zależności od pierwotnej przyczyny skierowania na diagnostykę B19V: 1 – kobiety mające kontakt z osobą zakażoną B19V (n=9), 2 – kobiety z nieimmunologicznym obrzękiem płodu (n=19), 3 – kobiety po poronieniu (n=7)

Tabela 3. Porównanie markerów zakażenia B19V u kobiet ciężarnych (wyniki – IHIT 2014)

Ekspozycja na zakażenie B19V		Nieimmunologiczny obrzęk płodu		Poronienie/zgon płodu	
Markery serologiczne (n)	Średnie stężenie DNA B19V (IU/ml)	Markery serologiczne (n)	Średnie stężenie DNA B19V (IU/ml)	Markery serologiczne (n)	Średnie stężenie DNA B19V (IU/ml)
IgM(-) IgG(-)	2 7,23x10 ⁸	IgM(-) IgG(-)	1 1,55x10 ⁸	IgM(-) IgG(-)	0 -
IgM(+) IgG(-)	1 5,80x10 ⁷	IgM(+) IgG(-)	0 -	IgM(+) IgG(-)	0 -
IgM(+) IgG(+)	5 4,45x10 ⁴	IgM(+) IgG(+)	13 1,21x10 ⁶	IgM(+) IgG(+)	4 3,49x10 ⁴
IgM(-) IgG(+)	1 9,58x10 ³	IgM(-) IgG(+)	5 4,81x10 ⁶	IgM(-) IgG(+)	3 6,15x10 ⁵

Najwyższe stężenie DNA B19V (>10⁸ IU/ml) obserwowano u kobiet ciężarnych ekspozowanych na zakażenie B19V oraz z nieimmunologicznym obrzękiem płodu, u których równocześnie nie wykryto przeciwciał anti-B19V (okienko serologiczne), natomiast najniższą DNA-emię (10³-10⁶ IU/ml) wśród kobiet z obecnymi tylko przeciwciałami anti-B19V klasy IgG.

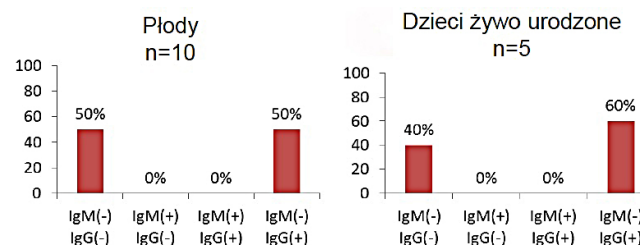
Na **Rycinie 5** przedstawiono rozkład markerów serologicznych u kobiet z wykrytym DNA parwowirusa B19. Rycina 5. Markery serologiczne u kobiet ciężarnych DNA B19V (+) (wyniki – IHIT 2014)



U około 22% kobiet ekspozowanych na zakażenie oraz blisko 5% kobiet z obrzękiem płodu zakażenie zostało stwierdzone jedynie metodami molekularnymi. Wśród kobiet, które poroniły, wykryto anti-B19V IgG (ok. 43%) bądź IgM i IgG (ok. 57%). U tych pacjentek badanie metodą real-time PCR potwierdziło obecność wirusa w surowicy. Poziom wirerii DNA B19V wskazał, czy mamy do czynienia z zakażeniem przewlekłym. Możliwość monitorowania DNA-emii oraz ocena jej ograniczenia w czasie u kobiet po poronieniu mogą być pomocne w podjęciu decyzji o kolejnej ciąży.

Obserwacje dotyczące diagnostyki B19V u płodów i dzieci urodzonych z infekcją B19V wskazują, iż metody serologiczne nie są wystarczające do potwierdzenia przeniesienia zakażenia w tej grupie osób (Rycina 6). Badanie real-time PCR nie tylko umożliwia identyfikację zakażenia, ale również monitorowanie przebiegu infekcji u płodów i dzieci.

Rycina 6. Markery serologiczne u płodów i dzieci urodzonych z DNA B19V (+) (wyniki – IHIT 2014)



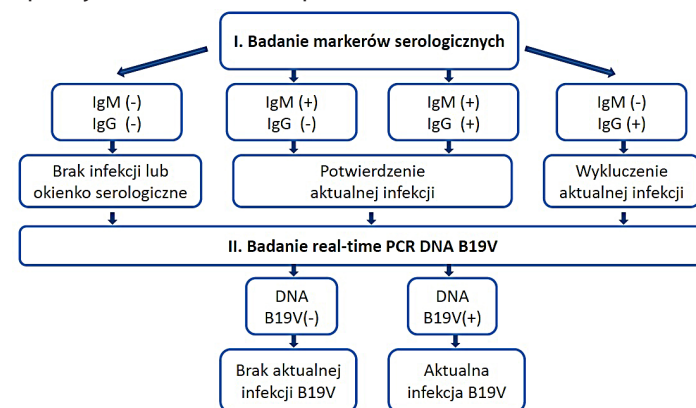
*średnia wirremia DNA B19V – 10⁸ IU/ml (w obu grupach)

* średnia wirremia DNA B19V:

10⁸ IU/ml (bez anti-B19V); 10³ IU/ml (IgG+)

Wobec poczynionych obserwacji, mając na względzie ryzyko wystąpienia powikłań u kobiet w ciąży w przebiegu zakażenia parwowirusem B19 (m.in. poronienie, nieimmunologiczny obrzęk, niedokrwistość płodu i noworodka), w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii stosuje się poniższy algorytm postępowania diagnostycznego u kobiet w ciąży (Rycina 7).

Rycina 7. Algorytm postępowania u kobiet ciężarnych z podejrzeniem zakażenia parwowirusem B19 (IHIT 2014)



Diagnostyka zakażenia parwowirusem B19 u kobiet w ciąży winna łączyć badania serologiczne i molekularne. W sytuacji, kiedy przeciwciała anti-B19V nie są wykrywane w surowicy kobiety ciężarnej, jedynym instrumentem diagnostycznym potwierdzającym infekcję może być badanie molekularne. Ma to szczególne znaczenie u kobiet krótko po ekspozycji na zakażenie, w okienku serologicznym. Wydaje się, że badanie przeciwciał anti-B19V jest sens wykonać nie wcześniej niż 2 tygodnie po kontakcie z osobą zakażoną, np. z rumieniem zakaźnym.

W przypadku wykrycia przeciwciał anti-B19V klasy IgM bądź jednocześnie IgM i IgG, badanie real-time PCR pozwoli na potwierdzenie lub wykluczenie aktualnej infekcji i pomoże w dalszym postępowaniu terapeutycznym. Wobec wykrytych przeciwciał anti-B19V klasy IgG u kobiety ciężarnej jedynie badanie molekularne wyklucza aktualną infekcję. W przypadku potwierdzenia obecności DNA B19V, badanie ilościowe wskazuje, czy mamy do czynienia z zakażeniem przewlekłym.

Postępowanie diagnostyczne u płodów z podejrzeniem zakażenia parwowirusem B19 powinno opierać się na badaniu real-time PCR. Ze względu na niedojrzałość układu immunologicznego u płodu, a co za tym idzie brak produkcji przeciwciał neutralizujących, diagnostyka B19V opierająca się na badaniach serologicznych może nie potwierdzić przeniesienia infekcji od matki do dziecka.

W sytuacji wystąpienia powikłań u płodu, monitorowanie DNA-emii B19V może być pomocne w podjęciu decyzji o postępowaniu ograniczającym zakażenie (podanie transfuzji dopłodowej czy immunoglobulin).

• Znaczenie badań DNA B19V u osób z obniżoną odpornością

Osoby z niedoborem odporności znajdują się w grupie szczególnie narażonej na wystąpienie powikłań w wyniku infekcji de novo bądź reaktywacji przebytego

zakażenia parwowirusem B19. Stąd ważny jest wybór odpowiednich metod w celu prawidłowej diagnostyki infekcji tym patogenem.

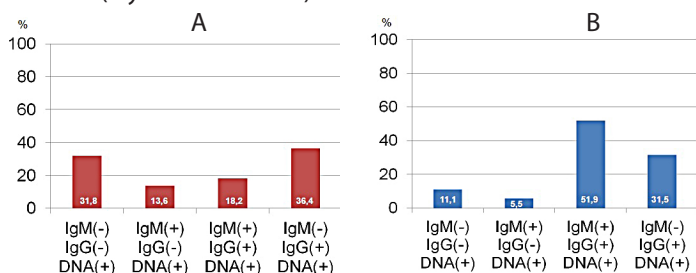
Diagnostyka metodami biologii molekularnej odgrywa ważną rolę w identyfikacji zakażenia B19V u osób z niedoborem odporności. U tych pacjentów na skutek leczenia immunosupresyjnego czy chemioterapii dochodzi do osłabienia przeciwwirusowej odpowiedzi immunologicznej typu humoralnego i w konsekwencji do braku produkcji przeciwciał odpornościowych.

Przeanalizowano markery zakażenia parwowirusem B19 u 76 chorych pochodzących z klinik hematologicznych i onkologicznych, których próbki skierowano do Instytutu Hematologii i Transfuzjologii. Wśród nich było 54 pacjentów z chorobami hematologicznymi, u których nie stosowano leczenia immunosupresyjnego oraz 22 chorych na immunosupresji (Tabela 4 oraz Rycina 8).

Tabela 4. Charakterystyka markerów B19V w momencie identyfikacji zakażenia (wyniki - IHiT 2013)

Markery serologiczne	Liczba przypadków (n)	Średnie stężenie DNA B19V (IU/ml)	Immunosupresja
IgM(-) IgG(-)	7	1,46x10 ¹⁰	TAK
IgM(+) IgG(-)	3	1,73x10 ⁹	
IgM(+) IgG(+)	4	2,69x10 ¹⁰	
IgM(-) IgG(+)	8	7,72x10 ³	
IgM(-) IgG(-)	6	1,20x10 ⁶	NIE
IgM(+) IgG(-)	3	1,06x10 ⁷	
IgM(+) IgG(+)	28	1,20x10 ⁶	
IgM(-) IgG(+)	17	2,48x10 ⁴	

Rycina 8. Markery serologiczne w dwóch grupach pacjentów zakażonych B19V (z DNA B19V): (A) – z obniżoną odpornością n=22; (B) – z prawidłową odpornością n=54 (wyniki - IHiT 2013)



Analiza wyników wykazała brak markerów serologicznych aż u około 32% pacjentów z obniżoną odpornością przy równocześnie bardzo wysokiej DNA-emii B19V – średnio 10¹⁰ IU/ml. Wśród chorych z prawidłową odpornością u blisko 11% również metody serologiczne nie były wystarczające do zdiagnozowania zakażenia. W tym przypadku badanie real-time PCR pozwoliło potwierdzić obecność DNA wirusa w surowicy chorych na poziomie 10⁶ IU/ml.

Ilościowe badania DNA B19V umożliwiają monitorowanie zakażenia, co w przypadku osób z niedoborem odporności ma szczególne znaczenie. Pozwalają ocenić skuteczność postępowania przeciwwirusowego (np. zmiana leczenia immunosupresyjnego, podanie immunoglobulin) oraz czas ograniczania infekcji. Wyniki przedstawione w Tabeli 5 potwierdzają występowanie przewlekłej infek-

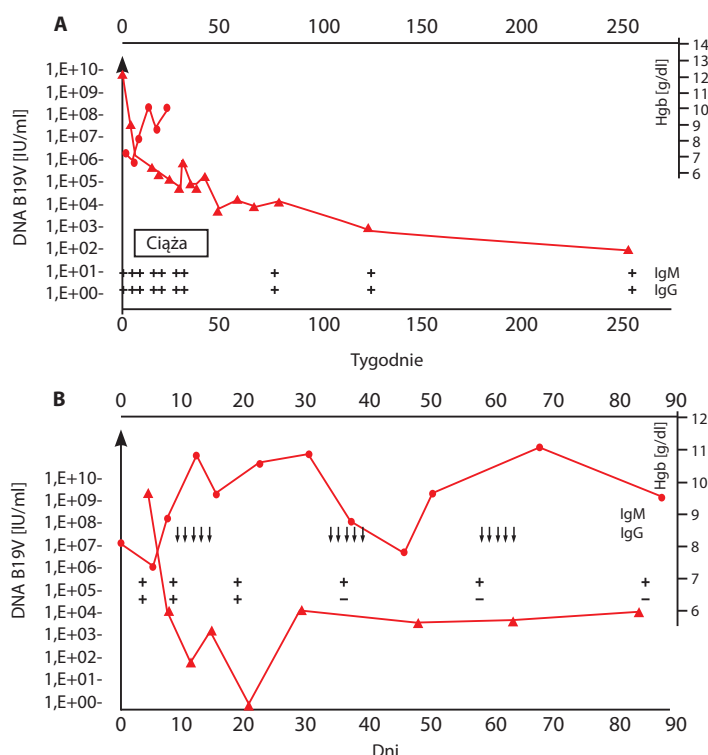
cji B19V u osób z zaburzonym układem immunologicznym. U tych pacjentów często utrzymującym się zakażeniu towarzyszą ostre objawy kliniczne. Obecność DNA B19V w surowicy obserwowano nawet przez 58 miesięcy.

Tabela 5. Przebieg zakażenia u pacjentów z obniżoną odpornością, u których przebadano więcej niż jedną próbkę (wyniki – IHiT 2013)

L.p. pacjenta	Markery B19V w próbce początkowej		Czas obserwacji	Stężenie DNA B19V (IU/ml)	
	anty-B19V IgM, IgG	DNA B19V (IU/ml)		Max.	Min.
1	M(-) G(-)	9,6x10 ³	8 m-cy	9,6x10 ³	8,5x10 ¹
2	M(-) G(-)	1,2x10 ⁹	20 m-cy	1,2x10 ⁹	0
3	M(-) G(-)	1,3x10 ⁷	5 m-cy	1,3x10 ⁷	1,3x10 ²
4	M(-) G(-)	5,5x10 ⁸	1 m-c	5,5x10 ⁸	2,5x10 ⁴
5	M(-) G(-)	2,9x10 ⁸	13 m-cy	7,5x10 ¹⁰	1,1x10 ³
6	M(-) G(-)	1,0x10 ¹¹	3 m-ce	1,0x10 ¹¹	9,6x10 ²
7	M(+) G(-)	6,9x10 ¹⁰	3 m-ce	6,9x10 ¹⁰	2,5x10 ⁴
8	M(+) G(-)	2,2x10 ⁹	2 m-ce	2,2x10 ⁹	5,5x10 ⁴
9	M(+) G(-)	9,6x10 ⁹	26 m-cy	3,6x10 ¹¹	0
10	M(+) G(+)	4,1x10 ³	2 m-ce	4,3x10 ³	2,3x10 ³
11	M(+) G(+)	1,5x10 ⁶	58 m-cy	1,5x10 ⁶	8,3x10 ¹
12	M(+) G(+)	3,8x10 ⁴	13 m-cy	4,6x10 ⁴	9,2x10 ¹
13	M(+) G(+)	4,6x10 ⁹	3 m-ce	4,2x10 ¹¹	0

Stosując techniki biologii molekularnej w diagnostyce zakażenia B19V u osób z obniżoną odpornością należy pamiętać o używaniu testów wykrywających wszystkie poznane genotypy. Zdiagnozowane dotychczas dwa przypadki zakażenia genotypem 2 u osób leczonych immunosupresyjnie w Polsce wskazują, iż genotyp ten może być odpowiedzialny za ostre, objawowe zakażenia u osób z obniżoną odpornością (Rycina 9). Obserwowano taki sam przebieg zakażenia, jak w przypadku infekcji genotypem 1.

Rycina 9. Przebieg zakażenia genotypem 2 B19V u dwóch pacjentek leczonych immunosupresyjnie (Grabarczyk P., 2011)



Diagnostyka B19V u chorych z obniżoną odpornością powinna być oparta przede wszystkim na badaniu DNA wirusa. Wykryte przypadki genotypu 2 B19V wskazują na konieczność stosowania testów diagnostycznych wykrywających wszystkie poznane formy polimorficzne (nie tylko genotyp 1) z podobną czułością.

PODSUMOWANIE

Parwovirus B19 jest przykładem patogenu, którego skutki infekcji są zależne od stanu klinicznego osoby zakażonej. U osób immunokompetentnych infekcja B19V często przebiega bezobjawowo, nie wywołując poważnych powikłań poinfekcyjnych. Jednakże u osób z obniżoną odpornością, pobudzoną erytropoezą bądź kobiet w ciąży, zakażenie parwowirusem B19 może spowodować groźne powikłania kliniczne. Metody molekularne winny stanowić główne narzędzie diagnostyczne u chorych z niedoborem odporności, poddanych terapii immunosupresyjnej czy chemioterapii, jak również u osób z pobudzonym układem czerwono-krwinkowym. Również u osób immunokompetentnych znajdujących się w początkowej fazie infekcji (okienko serologiczne), a szczególnie u kobiet ciężarnych krótko po ekspozycji na zakażenie B19V, testy molekularne potwierdzą infekcję. Diagnostowanie przeniesienia zakażenia u płodu winno być oparte przede wszystkim na badaniu DNA B19V. Metoda real-time PCR umożliwi monitorowanie DNA-emii u kobiety ciężarnej przy wskazaniach do kontrolowania obrazu klinicznego czy

skuteczności leczenia płodu i matki. Badanie materiału genetycznego B19V metodami ilościowymi pozwala również na różnicowanie zakażeń ostrych i przewlekłych, szczególnie przy wykrywanych jedynie przeciwciałach anti-B19V klasy IgG. Jest to istotne u osób z niedoborem odporności, gdzie długo utrzymuje się DNA-emia B19V.

Ważną rolę poznawczą pełni badanie polimorfizmu genomu parwowirusa B19 z zastosowaniem metod sekwencjonowania. Ma to szczególne znaczenie podczas analiz zagadnień epidemiologicznych, w ustalaniu dróg przenoszenia zakażenia czy modyfikacji istniejących testów diagnostycznych o nowo wykrywane warianty wirusa.

Reasumując, optymalna diagnostyka wirusa B19 winna wykorzystywać zarówno ilościowe techniki molekularne, jak i metody serologiczne. Właściwe zastosowanie testów diagnostycznych oraz analiza ich wyników umożliwi trafnie rozpoznać istotne klinicznie zakażenie parwowirusem B19.

REAL-TIME PCR

R-gene®

- CMV
- EBV
- Adenowirus
- HSV1
- HSV2
- VZV
- HHV7
- HHV8
- Enterowirus
- HHV6
- *Bordetella pertussis*

ZAWARTOŚĆ ZESTAWU:

Zestaw kompletny
Standardy ilościowe lub kontrola pozytywna
Kontrola ekstrakcji / inhibicji
Specyficzny premix do amplifikacji
Kontrola czułości (w przypadku oznaczeń ilościowych)
Kontrola ujemna

Parvovirus B19 R-gene®

Nr katalogowy
69-019/69-019B

ARGENE



RAL STAINER – automatyzacja procesu barwienia

dr n. med. Alicja Rusinek
bioMérieux Polska Sp. z o.o.
Warszawa

Diagnostyka gruźlicy stanowi duże wyzwanie dla laboratoriów mikrobiologicznych. Długi czas oczekiwania na wynik przy zastosowaniu rutynowych metod hodowlanych jest przyczyną dużej rangi preparatu bezpośredniego, wykonywanego z materiałów pobranych od pacjentów. Bakteriostopia, pomimo niezbyt wysokiej czułości, umożliwia klinicyście szybkie postawienie wstępnej diagnozy, co jest jej podstawowym atutem.

Barwienie preparatów w kierunku prątków gruźlicy ulegało różnym modyfikacjom od początku wprowadzenia tej metody diagnostycznej. Zawsze wiązało się jednak z dużym nakładem pracy, koniecznością dokładania wysokiej staranności w trakcie procesu barwienia oraz narażeniem na kontakt ze szkodliwymi odczynnikami. Rozwiązaniem większości problemów, z którymi borykały się laboratoria prętka gruźlicy w trakcie barwienia, jest automatyzacja tego etapu diagnostyki.

Firma bioMérieux w porozumieniu z producentem RAL Diagnostics wprowadziła do swojej oferty automatyczny system do barwienia prątków gruźlicy RAL STAINER. Prosty w obsłudze, niezawodny aparat, który umożliwia otrzymanie preparatów wybarwionych w sposób wystandaryzowany i bezpieczny. Wykorzystuje on metodę zanurzeniową. Zastosowane rozwiązanie z obrotowym ramieniem, na którym podwieszane są uchwyty ze szkiełkami, zapobiega kontaktowi części mechanicznych z odczynnikami. Jednocześnie do aparatu można włożyć do 20 szkiełek. Specjalny filtr neutralizuje szkodliwe opary i uniemożliwia wydostanie się ich poza urządzenie. Nie ma możliwości otwarcia aparatu w trakcie jego działania. Odpady gromadzone są w połączonym szczelnie z aparatem pojemniku. Posiada on czujnik przepełnienia. Dzięki takiej budowie system jest przyjazny dla środowiska i bezpieczny dla operatora.

Wyposażenie RAL Stainera w ekran dotykowy z graficznym oprogramowaniem sprawia, że jego obsługa jest bardzo prosta i nie wymaga długiego wdrażania. Elastyczny program pozwala na zastosowanie różnych metod barwienia, wprowadzanie własnych modyfikacji protokołów oraz zarządzanie użytkownikami za pomocą haseł dostępu.

Dostępne są odczynniki do barwienia dwoma metodami: z auraminą i Ziehl-Neelsena na zimno.

RAL Stainer FLUO-RAL nr kat. 414193

RAL Stainer Cold ZN nr kat. 414194

W barwieniu z auraminą jako odczynnik kontrastowy zastosowano czerwień tiazynową. Powoduje to powstanie głębokiego kontrastu i ułatwia interpretację preparatów – świecące żółtozielone prątki na czerwonym tle.

Łatwiejsze jest również ustawienie i utrzymanie ostrości obrazu podczas oglądania preparatu w mikroskopie fluorescencyjnym lub LED.

Odczynniki są wstawiane do stacji barwienia aparatu, bezpośrednio w oryginalnych pojemnikach, co ułatwia zachowanie odpowiedniej jakości oraz ogranicza do minimum kontakt ze szkodliwymi związkami. Na etykietach pojemników znajdują się specjalne czipy RFID, które mają zakodowany rodzaj

odczynnika, termin jego przydatności, a po zeskanowaniu, w aparacie umożliwiają pojawienie się informacji o czasie wstawienia odczynnika do aparatu i zarządzanie jego trwałością „na pokładzie”. Unikalny opatentowany roztwór utrwalający wzmacnia efekt utrwalania termicznego i ponad to przygotowuje ścianę komórkową prątków do barwienia. Zapobiega to krzyżowemu zanieczyszczeniu.

RAL Stainer może stanowić uzupełnienie wyposażenia laboratoriów prowadzących diagnostykę w kierunku gruźlicy. Dzięki zastosowaniu unikalnych rozwiązań zapewnia zautomatyzowanie kolejnego etapu diagnostyki przyczyniając się do standaryzacji i podniesienia powtarzalności oraz wiarygodności wyniku.

Dla laboratoriów wykonujących pojedyncze barwienia w ciągu dnia nadal bardziej ekonomiczne będzie manualne barwienie prątków gruźlicy. W ofercie bioMérieux znajdują się więc specjalne odczynniki, które dają taką możliwość.

PREVI Fluo TB nr kat. 411010

Kompletny zestaw odczynników do barwienia prątków kwasoodpornych z zastosowaniem auraminy. W skład zestawu PREVI Fluo TB wchodzi wszystkie odczynniki potrzebne do zabarwienia preparatu. Po utrwaleniu termicznym preparaty można wybarwić zarówno metodą zanurzeniową, jak i poprzez nanoszenie odczynników na szkiełka.

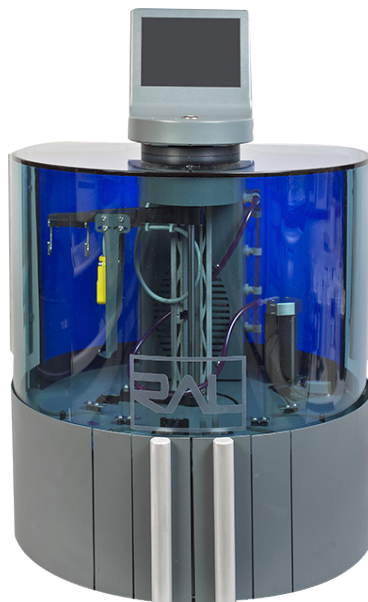
Dzięki zastosowaniu czerwonego tła, zabarwione na zielono-żółto, świecące prątki są bardzo dobrze widoczne.

Odczynniki do barwienia metodą Ziehl Neelsena na zimno:

Roztwór Kinyoun nr kat. 55521,

Roztwór Gabbet nr kat. 55531.

Fuksyna zasadowa, wchodząca w skład roztworu Kinyoun, barwi wszystkie bakterie, co jest wzmacniane przez obecność fenolu. Roztwór Gabbet zawiera kwas siarkowy działający jako odbarwiacz i błękit metylenowy – odczynnik kontrastowy wybarwiający tło. Prątki charakteryzują się odpornością na odbarwienie, dlatego w preparacie mają kolor czerwony, a tło niebieski.



www.biomerieux.pl

Search

Nowe informacje na stronie internetowej

mgr Marta Warowny
bioMérieux Polska Sp. z o.o.
Warszawa

Na stronie internetowej www.biomerieux.pl pojawiło się kilka nowych informacji. Najważniejszą z nich jest uruchomienie Klubu Rzadkich Organizmów (ROC – Rare Organism Club).

Klub Rzadkich Organizmów to baza, która została stworzona w celu śledzenia wykrywania nietypowych i rzadkich drobnoustrojów w butelkach BacT/ALERT. W bazie Klubu Rzadkich Organizmów dostępne są informacje o rodzajach podłoży oraz czasach detekcji charakterystycznych dla tych izolatów klinicznych. Baza Klubu Rzadkich Organizmów umożliwia uzyskanie pewności, że konkretny mikroorganizm został wyizolowany z próbki badanej przy użyciu podłoża BacT/ALERT. Dostępne są dane dotyczące czasu detekcji pochodzące z wielu ośrodków i wielu izolatów. Informacje o izolacji rzadkich mikroorganizmów trafiają do bioMérieux od tych z Państwa, którzy są użytkownikami systemu BacT/ALERT. Zgłoszenia są całkowicie dobrowolne. Jeżeli złożą Państwo dokumentację o wykryciu rzadkiego mikroorganizmu, zostanie on wprowadzony do naszej bazy danych. Następnie państwa laboratorium otrzyma certyfikat Klubu Rzadkich Organizmów wraz z aktualnym wykazem rzadkich organizmów oraz materiały szkoleniowe bioMérieux. Aby zgłosić mikroorganizm, uzyskać certyfikat oraz listę Klubu Rzadkich Organizmów należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem handlowym i poprosić o formularz zgłoszeniowy lub pobrać go ze strony www.biomerieux.pl. Następnie wypełniony formularz należy wysłać pocztą lub e-mailem na wskazany adres. Szczegółowe informacje wraz z formularzem dostępne są w „CENTRUM UWAGI”.

Ważną wiadomością dostępną w sekcji „CENTRUM UWAGI” jest informacja na temat diagnostyki boreliozy z Lyme. Zaprezentowane są testy VIDAS Lyme IgG i IgM. Umożliwiają one określenie statusu serologicznego pacjenta i prowadzenie diagnostyki różnicowej boreliozy (wywołanej przez szczepy *Borrelia* – sensu stricto, afzelii, garinii) w zaledwie 27 minut.

W zakładce „Z ostatniej chwili” dostępne są informacje na temat nowego podłoża chromogennego do badań przesiewowych w kierunku *Staphylococcus aureus* opornego na metycylinę (MRSA) - chromID MRSA SMART. Jest to kolejna wersja podłoża do badań przesiewowych w kierunku MRSA wprowadzona do oferty bioMérieux. Nowy, zmieniony skład podłoża, umożliwia uzyskanie wiarygodnego wyniku dodatniego już po 18 godzinach inkubacji. MRSA rośnie w postaci różowych do czerwonych kolonii. Dotyczy to również szczepów *S.aureus* wykazujących heterogeny typ oporności na metycylinę, jak i oporność uwarunkowaną genem *mecC*.

Specjalna mieszanina wybiórcza hamuje wzrost flory towarzyszącej, nieistotnej z punktu widzenia badania przesiewowego w kierunku MRSA, co ogranicza liczbę wyników fałszywie dodatnich. Dla uzyskania wyniku ujemnego wystarczy jednorazowy odczyt, bez konieczności przedłużania inkubacji. Materiałem do badań może być wymaz np. z nosa, gardła, ale również wymazy ze skóry, pachwiny, ran.

Kolejną nowością na naszej stronie www.biomerieux.pl to prezentacja automatycznego aparatu RAL STAINER, który służy do barwienia prątków kwasoodpornych. Jest to kompaktowy, wydajny i elastyczny system, wyposażony w oryginalne czipy RFID (radio-frequency identification), których obecność eliminuje potencjalne błędy.

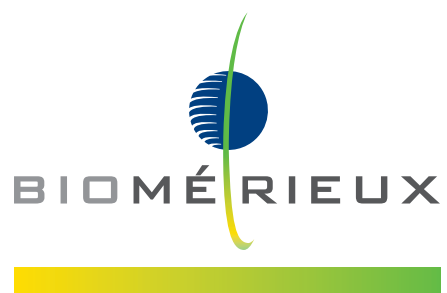
Od niedawna w naszej ofercie dostępny jest aparat Previ Color Gram V2. Jest to nowa wersja aparatu do barwienia metodą Grama. Umożliwia on w pełni automatyczne wybarwienie preparatów od utrwalenia do wysuszenia. Oprócz zmian walorów estetycznych związanych z nadaniem urządzeniu nowoczesnej linii, wyposażono je w graficzne oprogramowanie z ekranem dotykowym i czytnik kodów kreskowych dla prowadzenia nadzoru odczynników i preparatów. PREVI Color Gram ogranicza pracę manualną i zmniejsza prawdopodobieństwo popełnienia błędów, dając możliwość uzyskania preparatu barwionego metodą Grama w sposób wystandaryzowany i bezpieczny.

Na stronie głównej w zakładce „Kongresy” umieszczona jest aktualna lista kongresów i konferencji, w których firma bioMérieux będzie brała udział.

W nadchodzących tygodniach będziemy uczestniczyć w następujących wydarzeniach:

- Krajowej Konferencji Pulmonologów i Mikrobiologów, organizowanej przez Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc. Konferencja odbędzie się w dniach 11 – 13 czerwca 2014 roku w Zakopanem;
- Ogólnopolskiej Konferencji Naukowo-Szkoleniowej PTDL oddziałów: Opole, Szczecin, Wrocław „Nowe możliwości, nowe horyzonty diagnostyczne w Opiece Zdrowotnej – Laboratorium 2014”. Konferencja odbędzie się w dniach 13 – 14 czerwca 2014 roku w Szklarskiej Porębie.

Przypominamy również o funkcjonowaniu serwisu www.mybiomerieux.com. Za jego pośrednictwem mogą Państwo korzystać z dokumentacji bibliotecznej: ulotek technicznych, instrukcji i certyfikatów. Od początku roku 2014 bezpośrednio w Bibliotece Technicznej bioMérieux dostępna jest również dokumentacja techniczna produktów AES CHEMUNEX.



www.biomerieux.pl