

Spadia News



Úvodní slovo

Vážené kolegyně a kolegové,



otevíráte další vydání našich laboratorních novin SPADIA News. Kromě novinek z naší laboratoře vám přinášíme i praktické informace, které vám pomohou se lépe orientovat v laboratorní diagnostice.

V minulých dvou měsících proběhly na osmi místech v našem kraji semináře, které jsme připravili zejména pro sestry. Mě i mé kolegy, kteří se na celém programu podíleli, hodně potěšilo, že Pracovní den SPADIA LAB přilákal několik stovek účastníků. Věřím, že i pro vaše sestry byl tento seminář přínosný a že se nám podařilo předat informace, které ještě více prohloubí naši vzájemnou spolupráci a hlavně pomohou zlepšit péči o naše společné pacienty.

Do rutinní praxe uvádíme praktickou novinku - automatické hlášení kritických hodnot. Pro všechny z vás, kteří využíváte náš komunikační modul, je připravená aplikace, která automaticky zasílá informaci o kritické hodnotě laboratorního vyšetření. Pokud budete mít o takovou službu zájem, obraťte se na naše IT oddělení.

Do aktuálního čísla SPADIA News jsme zařadili i praktické návody k vyšetřování serologických markerů a informaci o zajímavých, speciálních analytech - dihydrotestosteronu (DHT) a karbohydrát deficientnímu transferinu (CDT).

Rád bych vás informoval, že naše společnost rozšiřuje své aktivity v oblasti lékařské genetiky ve Frýdku Místku. Do Centra lékařské genetiky je možné objednávat klienty k jakémukoli genetickému vyšetření. Více informací na www.genetikafm.cz

Vážené kolegyně, vážení kolegové, blíží se prázdniny, kdy se většina z nás těší na pěkné slunečné dny a na zasloužených pár dní volna. Přeji vám za celý kolektiv SPADIA LAB příjemné prožití letních měsíců a hlavně krásnou dovolenou podle vašich představ.

Martin Radina
ředitel

DHT – dihydrotestosteron

Ing. Jakub Minář, laboratoř biochemie

Dihydrotestosteron je steroidní hormon, vlastní aktivní forma testosteronu. Vzniká redukcí testosteronu na uhlíku č. 5 v cílových orgánech.

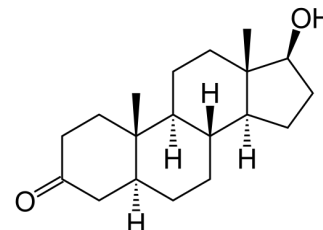
Klinické informace:

Dihydrotestosteron (DHT) je androgenní hormon syntetizovaný primárně v prostatě, varlatech a vlasových folikulech pomocí 5 α -reduktázy. U mužů se přibližně 5% testosteronu redukuje na jeho účinnou formu DHT. Během embryogeneze hraje primární úlohu při formování mužských genitálií a v dospělosti působí jako primární androgen v prostatě a vlasových folikulech.

Laboratorní vyšetření:

Vyšetření se provádí jednou za 14 dnů ze séra. Referenční hodnoty u mužů jsou 0,86 – 3,4 nmol/l, u žen 0,08 – 1,27 nmol/l, u posmenopauzálních žen pak 0,03 – 0,62 nmol/l. DHT je stabilní v séru 4 týdny po zamražení vzorku na -20°C. Zvýšené hodnoty nalézáme u benigní hyperplazie prostaty a alopecie (vypadávání vlasů).

Strukturní vzorec DHT:



Sérologická diagnostika infekčních a autoimunitních onemocnění

RNDr. Ivo Lochman, Csc., laboratoř imunologie a sérologie

Je řada definic sérologie. Pro naše účely si ji definujeme jako analýzu obsahu a vlastností krevního séra, popř. plazmy, využívající protilátek. Protilátky reagují v této analýze s antigeny, resp. s vazebnými místy pro protilátky na antigenech. Tato vazebná místa na antigenech nazýváme epitopy. Metody založené na reakci antigenů s protilátkami nazýváme obvykle imunoanalytickými metodami. Imunoanalytické metody se mohou používat k analýze i jiných tělních tekutin, jako jsou např. moč, mozkomíšní mok nebo extrakty různých tkání a exkrementů. Detekce a stanovování protilátek přítomných v séru, plazmě nebo jiných tělních tekutinách se využívá k nepřímé diagnostice infekčních a autoimunitních onemocnění. Využívá se toho, že imunitní systém reaguje na zvýšenou koncentraci antigenů v dané tkáni nebo orgánu mj. také zvýšenou tvorbou protilátek. Abychom dokázali správně aplikovat sérologické metody a interpretovat jejich výsledky, musíme si nejprve uvědomit několik skutečností:

1. Protilátky jsou nástroje imunitního systému, které se vyvinuly během fylogeneze u jedné vývojové větve organismů, do které patří i člověk. Pomáhají mu plnit jeho homeostatickou funkci nejen jako obranné faktory, ale také jako informační molekuly zvyšující specifčnost a efektivitu imunitní odpovědi.
2. Funkce imunitního systému ani jeho nástrojů, včetně protilátek, není založena na přísné specifčnosti.
3. Protilátky jsou tvořeny plasmatickými buňkami, které se vyvíjejí z B-lymfocytů v rámci imunitní odpovědi jako reakce na signály, které dostává imunitní systém jak z vnitřního, tak i z vnějšího prostředí. Imunitní systém musí rozpoznávat a vyhodnocovat všechny signály, které dostává, tedy i na antigeny, které jsou organismu, jehož homeostázu zajišťuje, vlastní. Musí rozpoznávat zda je daný antigen v daném prostoru přítomen. A je-li přítomen v tomto prostoru pro danou vývojovou fázi organismu, i v odpovídajícím množství (koncentraci) a jak dlouho. V rámci adaptivní imunitní odpovědi jsou postupně selektovány klonny B-lymfocytů, které tvoří protilátky s větší specifčností a vyšší aviditou, tj. vyšší afinitou jejich vazebných míst, k epitopům daných antigenů. Tyto jsou rozpoznávány pro daný prostor (orgán, tkáň) a danou fázi ontogenetického a fylogenetického vývoje organismu jako cizí nebo se nacházejí ve větším množství, než je očekáváno. Protilátková odpověď je za normální situace realizována řadou klonů lymfocytů, z nichž každý tvoří pro daný klon specifickou (monoklonální) protilátku. Fyziologická protilátková imunitní odpověď je tedy polyklonální.
4. U lidí jsou protilátky tvořeny v pěti imunoglobulino-

vých třídách (IgA, IgD, IgE, IgG a IgM), z nichž IgG má ještě čtyři (IgG1, IgG2, IgG3 a IgG4) a IgA dvě (IgA1 a IgA2) podtřídy. Každá ze tříd i podtříd imunoglobulinů má své specifické vlastnosti a funkci. Tak např.:

- IgA protilátky jsou tvořeny především B-lymfocyty sliznic
 - IgD protilátky se realizují zřejmě především během časné ontogeneze lymfocytů v komplexu jejich receptorových struktur
 - IgE protilátky jsou protilátky, které se vytvářejí jako první, ještě ve fázi intrauterinního vývoje, podobně jako IgD. Hrají významnou úlohu nejen v obraně proti parazitárním onemocněním, ale geneticky podmíněná je zvýšená odpověď organismu na signály v této imunoglobulinové třídě (atopie), predisponuje organismus k alergiím
 - IgG jsou hlavními imunoglobuliny séra. Tvoří se postupně po tzv. switchingu (přepnutí) proti všem antigenům, s nimiž se organismus setkává a na něž odpovídá primárně v ostatních imunoglobulinových třídách. Při dlouho trvající imunitní odpovědi se selektují klonny plasmatických buněk, které produkují IgG se stále vyšší aviditou. IgG1 protilátky jsou tvořeny hlavně proti proteinovým antigenům, IgG2 proti antigenům polysacharidovým.
 - IgM jsou protilátky, které se tvoří u zralého organismu jako první v primární systémové imunitní odpovědi, mají však většinou nízkou aviditu a specifčnost.
5. Existuje řada technik nepřímé sérologické diagnostiky, z nichž každá má své přednosti a nedostatky. Obecně se však musíme smířit se skutečností, že dnes ještě není možná jejich standardizace. Proto při aplikaci těchto metod je nezbytné znát přesně techniku a diagnostiku, která byla použita. V případě, že výsledky se standardně používanými diagnostikami neodpovídají u daného vzorku předpokládané anamnéze, je nutné ověřit si výsledek pomocí jiných diagnostik, popř. i jiné techniky. Neznamená to však, že v laboratoři standardně používaná diagnostika musí být po takovémto nálezu nevhodná. Specifčnost a senzitivita, výtěžnost, pozitivní a negativní prediktivní hodnota diagnostik udávaná výrobci jsou dány vždy soubory testovaných jedinců, na nichž byly tyto jejich diagnostické vlastnosti definovány a měly by být laboratořemi ověřovány. Obecně se dá říci, že vyšší senzitivita testu jde proti jeho specifčnosti a naopak.

.. pokračování na str. 3

.. pokračování ze str. 2

Screeningové testy by měly mít vyšší senzitivitu a pozitivitu nalezené těmito testy by měly být ověřovány testy s vyšší specifíčností.

Sérologické metody jsme zvyklí dělit na kvalitativní a kvantitativní. Podle normy ISO EN 15189, kterou se řídí práce v klinických laboratořích, by měly být jako kvalitativní označovány ty metody, jejichž výsledky jsou vyjadřovány v kategoriích, kvantitativní pak ty, jejichž výsledky jsou měřeny a udávány číselnou hodnotou v kontinuální stupnici s různou přesností. V praxi to znamená, že jako kvalitativní by měly být správně označovány jen metody, které odečítáme pomocí našich smyslů (např. mikroskopické metody nebo metody klasické sérologie). Metody, které odečítáme pomocí přístrojů, jsou v podstatě vždy kvantitativní. Vžilo se však, že metody vyhodnocované pomocí přístrojů označujeme jako kvalitativní, je-li jako vztažná hodnota pro vyhodnocení použita hodnota tzv. cut-off standardy (kalibrátoru). Metody, kde je používána řada standard (kalibrátorů), z nichž je konstruována kalibrační křivka, jako kvantitativní. Kvalitativní pak můžeme a často také děláme z kvantitativních metod tím, že naměřené výsledky zařazujeme podle určitých kritérií do kategorií. Rozsah těchto kategorií nemusí být vždy stejný a liší se podle typu a účelu používané metody (např. RAST třídy používané v diagnostice alergen-specifických IgE). Nejjednodušší je u kvalitativních metod dělení na dvě kategorie – pozitivní a negativní, založené na tom, že pomocí souboru jedinců postižených daným onemocněním a kontrolní skupiny se vybere taková hodnota koncentrace analytu v testu (např. protilátky), která tyto dvě skupiny co nejlépe rozlišuje (cut off – hraniční hodnota). Výsledky nižší než cut-off jsou pak označovány jako negativní, výsledky vyšší než cut-off jako pozitivní. V reálu však nebývají nikdy hranice mezi kategoriemi ostré, je proto racionální a objektivní zařazovat do kvalitativních hodnocení minimálně ještě jednu kategorii,

kategorii hraničních, neprůkazných hodnot (šedou zónu). Vzhledem k tomu, že koncentrace protilátek nebo analytů stanovovaných imunoanalytickými metodami má často význam pro posuzování intenzity a průběhu onemocnění, je i v kategorii pozitivních hodnot rozumné dělení na několik dalších kategorií. Příklad takového hodnocení je uveden v tab. 1. Definice rozmezí kategorií kvantitativních metod udávané v indexech positivity (IP), což je poměr naměřené hodnoty vzorku a hodnoty cut-off, se mohou u konkrétních metod lišit a také často liší.

Vzhledem k tomu, že imunoanalytické metody dnes ještě nelze standardizovat, musíme se smířit s tím, že výsledky stanovování analytů včetně protilátek získané různými diagnostiky nebudou totožné, i když bude použita stejná technika a že budou vyjadřovány v různých jednotkách. Aby mohly být výsledky získané různými diagnostiky lépe srovnatelné, je výhodné používat pro vyjadřování výsledků a hodnocení metod již výše zmíněné indexy positivity (viz tab. 1). Poněvadž závislost naměřeného signálu na koncentraci analytů včetně protilátek nemusí být lineární, je nutno počítat s tím, že indexy positivity budou odpovídat reálné koncentraci analytu nejlépe v blízkosti cut-off a čím více se koncentrace budou od cut-off vzdalovat, ať nahoru nebo dolů, tím více se od reálné koncentrace mohou lišit. Z hlediska klinické interpretace výsledků to však již není ve většině případů příliš podstatné. Klinickým pracovníkům používání IP v každém případě zjednoduší interpretaci výsledků při srovnávání různých metod a při přechodu z jedné metody na jinou.

Zásadami uvedenými výše se řídí i laboratoře Spadia Lab., a.s., které z nich vycházejí při výběru nabízených metod a interpretaci jejich výsledků.

Literatura u autora.



kvalitativní hodnocení		odpovídající obraz u fluorescenčních mikroskopických metod (IFA)	kvantitativní hodnocení (IP)
popis	křížky		
negativní	-	není pozorována fluorescence očekávaných struktur	< 0.9
hraniční	+/-	nevýrazná, ale zřetelná fluorescence očekávaných struktur	0.9 – 1.1
slabě pozitivní	+	zřetelná, ale slabá fluorescence očekávaných struktur	≥1.1 - 2
pozitivní	++	jasná fluorescence očekávaných struktur	≥2 - 5
silně pozitivní	+++	velmi silná fluorescence, která může způsobovat slévání očekávaných struktur	≥5

Tab. 1. Interpretace výsledků imunoanalytických metod

Karbohydrát-deficientní transferin (CDT) – 1.část

Bc. Luboš Geryk, Laboratoř klinické biochemie - oddělení instrumentálních metod

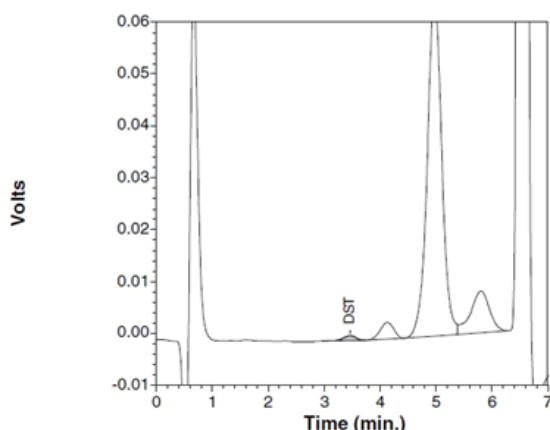
Chronický abúzus etanolu je etiologickým faktorem řady interních, neurologických a psychiatrických onemocnění. Může modifikovat průběh a prognózu některých patologických stavů, bývá také zdrojem významných lékových interakcí. %CDT (karbohydrát-deficientní transferin) je v současné době nejvíce specifický biochemický marker pro detekci nadměrné a dlouhodobé konzumace alkoholu a pro monitorování abstinence během léčby. Přesnou diferenciální diagnostiku poskytne současné stanovení CDT+GMT+MCV.

Transferin je glykoprotein vázající železo, skládající se ze dvou polysacharidových řetězců větvených na variabilní množství negativně nabitých konců zbytků kyseliny sialové. Počet zbytků kyseliny sialové určuje jednotlivé izoformy transferinu. Rozlišujeme α -, mono-, di-, tri-, tetra- a pentasialotransferin. U zdravého jedince převažuje izoforma se čtyřmi zbytky kyseliny sialové (okolo 80%), zatímco u pacientů s chronickým abúzem alkoholu se vyskytují převážně asialo-, monosialo- a disialo-izoformy. Historicky byl součet α -, mono- a disialo-transferinu chápán jako CDT. V současnosti předsta-

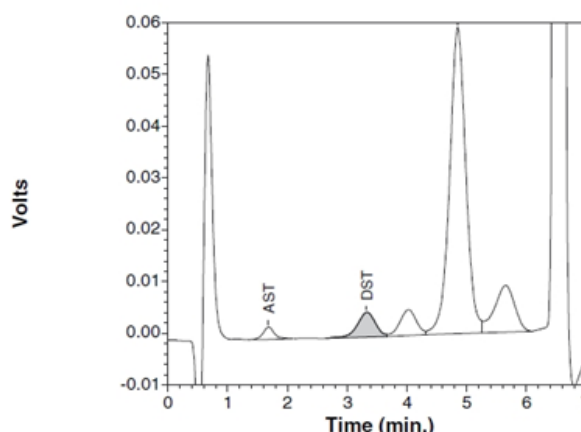
vuje disialotransferin (DST) cílovou sloučeninu pro stanovení CDT. Relativní množství DST roste po nadměrném pití (50 – 80 g etanolu/den) v období dvou nebo více týdnů. U abstinujících pacientů dochází zpět k navození fyziologického poměru mezi jednotlivými izoformami během 2-4 týdnů. Hodnota CDT je závislá na množství železa v organismu, při nízké hodnotě železa stoupá hodnota CDT.

V naší laboratoři stanovujeme hladinu CDT s použitím HPLC firmy Bio-Rad s UV/VIS detekcí. Tato metoda je ve srovnání s dřívějším imunochemickým stanovením rychlejší a citlivější, zároveň nám umožňuje identifikovat různé genetické varianty transferinu. Hodnota %CDT je vypočítána jako procento plochy píku DST (disialotransferin) z celkové plochy píků izoform transferinu. Stanovení %CDT eliminuje vliv změn koncentrace transferinu. Hodnoty %CDT do 1,9 jsou považovány za negativní výsledek, tzn. **cut-off = 1,9 %**.

Vyšetření hladiny CDT se provádí ze séra, a to dvakrát týdně (středa, pátek).



Obr. č. 1: Chromatogram vzorku s normálním %CDT (DST koncentrace = 1.01%).



Obr. č. 2: Chromatogram vzorku se zvýšeným %CDT (DST koncentrace = 6.35%).



CENTRUM LÉKAŘSKÉ GENETIKY
FRÝDEK - MÍSTEK

TELEFON: +420 558 900 315
WEB: WWW.GENETIKAFM.CZ

SPADIA
DIAGNOSTICKÁ LABORÁTOR

„Poskytujeme komplexní poradenství
týkající se dědičných chorob.“

Neinvazivní prenatalní testování – nová metoda screeningu M. Down u plodu

MUDr. Kateřina Kyselová, Centrum lékařské genetiky, Frýdek-Místek

V současné době je k dispozici nový vysoce citlivý test na Downův syndrom využívající volnou fetální DNA.

V roce 1997 prokázal profesor Dennis Lo v periferní krvi matky přítomnost volné DNA plodu. Tyto fragmenty DNA se uvolňují z placenty při apoptóze buněk trofoblastu a poté se dostávají do krevního oběhu matky. Tyto fragmenty DNA jsou kratší než mateřské a liší se také metylací. Fetální DNA není na rozdíl od mateřské metylována. Objem volné fetální DNA v periferní krvi je přibližně kolem 10% a stoupá s délkou těhotenství. V krvi matky přetrvává do 24 hodin po porodu.

Od roku 2000 se molekulární analýza volné DNA plodu začala využívat ke stanovení Rh faktoru u plodu (genotypizaci RHD) u Rh negativních matek a poté i na stanovení pohlaví plodu pro účely volby pohlaví plodu u onemocněních vázaných na pohlavní chromozomy. Od roku 2011 se využívá jako screeningový test k určení rizika M. Down. V současnosti je k dispozici neinvazivní testování pro trizomie chromozomů 21, 18 a 13 (M. Down, Edwards a Patau) a pro změny v počtu pohlavních chromozomů X a Y. U plodu lze také touto metodou vyšetřit i přítomnost mikrolečných syndromů a ve fázích výzkumu je již detekce monogenních chorob.

Existuje více metod molekulární genetiky, které se využívají v analýze volné fetální DNA. Patří sem například masivní paralelní sekvenování (MPS), přímá analýza a analýza pomocí SNP technologie (jednoduché nukleotidové polymorfizmy). Jednotlivé metody se mezi sebou liší v citlivosti záchytu.

Všechny tyto testy udávají citlivost záchytu M. Down větší než 99%, při falešné pozitivitě 0,1%. Citlivost záchytu dalších trizomií (18 a 13) se již u jednotlivých testů liší, je udávána od 80 až 99%. Většina testů umí také s vysokou citlivostí detekovat pohlavní chromozomy. Jako nadstandardní je potom i možnost vyšetření triploidie a mikrolečných syndromů (syndrom kočičího křiku, Di Georgův syndrom či Prader-Willi/Angelman syndrom).

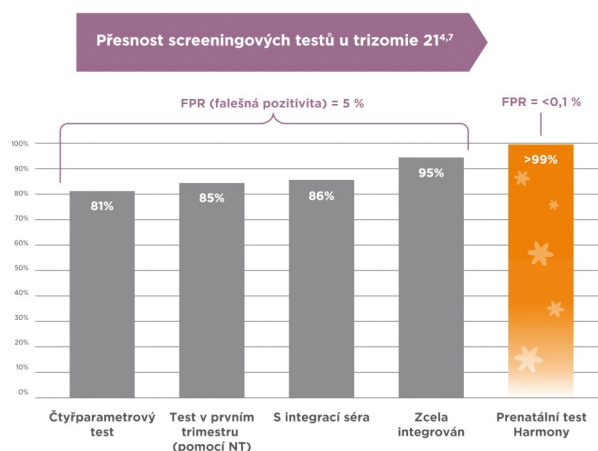
Na analýzu se využívá periferní krev matky, která se odebírá nejdříve kolem 10. týdne gravidity. Odběru krve předchází genetické vyšetření, kde je vysvětlen postup, přínos a limitace prenatalního neinvazivního testování. Odběr lze provést i v případě, že se jedná o dvojčete těhotenství či těhotenství po technikách IVF. Krev matky se odesílá na zpracování do laboratoře. Naše společnost spolupracuje s americkými firmami Ariosa diagnostics (Harmony test, který používá metodu přímé analýzy) a Natera (Panorama test, využívající analýzu pomocí SNP). Jednotlivé testy se od sebe lehce odlišují, proto je jejich výběr na klinickém genetickovi, který matce doporučí pro její těhotenství ten výhodnější. Vý-

sledky neinvazivního prenatalního testování jsou známy většinou do 14 dní po odběru. Tento test lze nabídnout všem těhotným ženám s výjimkou těch, které měly transfuzi krve či jsou po transplantaci kostní dřeně. Většinou se ale nabízí ženám ve zvýšeném riziku M. Down – věk nad 35 let, pozitivní triple test, atypický test I. trimestru, nebo ženám s obavami o osud gravidity – těhotenství po asistované reprodukci či s profesionální zátěží.

Jedná se o screeningovou metodu, tudíž zatím nemůže zcela nahradit invazivní metody jako je CVS či amniocentéza. NIPT se proto neindikuje u pozitivního screeningu I. trimestru, při NT nad 3,0-3,5mm a prokázaném defektu plodu při ultrazukovém vyšetření. V těchto případech se vždy indikují metody invazivní. V případě pozitivního výsledku NIPT je nutno tento výsledek ověřit invazivní diagnostikou.

V současné době se jedná o nejcitlivější screeningovou metodu s nejnižší falešnou pozitivitou. Bohužel tento test není hrazený z veřejného zdravotního pojištění. Další dvě screeningové metody na detekci M. Down jsou méně citlivé, jedná se o screening I. trimestru a II. trimestru (triple test). Prvotrimestrální screening má záchytnost 90 až 95% při 5% falešné pozitivitě, triplet test má záchyt pouze kolem 65% při stejné falešné pozitivitě. A právě proto je zde prostor pro neinvazivní prenatalní testování se svou vysokou citlivostí.

V případě zájmu o další informace či informační brožury pro pacienty se obraťte na Centrum lékařské genetiky ve Frýdku-Místku: telefon 558 900 315 nebo e-mail: info@genetikafm.cz.



Diagnostika urogenitálních mykoplazmat

Mgr. Magdaléna Martinková, laboratoř lékařské genetiky

Mykoplazmata jsou nejmenší prokaryotické buňky trvale postrádající

buněčnou stěnu a jsou proto přirozeně odolné vůči působení beta-laktamových antibiotik. Mají extrémně malý genom.

Základní habitat představují slizniční povrchy zejména respiračního a urogenitálního ústrojí a jsou přenášeny přímým kontaktem pohlavním stykem, vertikálně z matky na plod nebo porodem.

Klinický obraz

- ***Ureaplasma spp.*** - uretritida mužů, močové kameny infekčního typu, bakteriální vaginóza a komplikace během gravidity (potrat, předčasný porod), postpartální endometritida.

- ***Mycoplasma genitalium***- uretritida mužů, konjunktivitida sdružená s uretritidou, nechlamydiová, negonokoková akutní epididymoorchitida, neplodnost, cervicitida, endometritida.

- ***Mycoplasma hominis***- uretrální syndrom žen, akutní pyelonefritida, bakteriální vaginóza a komplikace během gravidity, neplodnost.

- často jen asymptomaticky průběh

V laboratoři SPADIA na oddělení lékařské genetiky budeme od července nabízet vyšetření těchto druhů

patogenních mykoplazmat:

Mycoplasma hominis, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma parvum* a *Ureaplasma urealyticum* (V rutinní praxi určujeme rod *Ureaplasma spp.* Diagnostika do druhu není klinicky významná.)

Průkaz těchto mikroorganismů je založena na real-time polymerázové řetězové reakci (PCR) DNA *Ureaplasma spp.*, *M.hominis* a *M.genitalium*, která umožňuje včasné zachycení přítomnosti DNA infekčních agens a následné zahájení léčby.

Materiál

- moč – první porce moče , 5 – 10 ml do sterilní zkumavky
- stěry - urologické , gynekologické (děložní čípek , uretra, spojivkový vak, prostatický sekret)
- odběrové soupravy (Remel, eSwab) na vyžádání dodá laboratoř

Transport

- dopravit do laboratoře nejlépe do 12 h od odběru při 4-8°C

Výsledek – kvalitativní hodnocení POZITIVNÍ/negativní

Doba odezvy- 1 týden



Kontakty	Příjem materiálu:	+420 599 524 800, 802 +420 739 342 298
	Odběrová místnost:	+420 599 524 801
	Laboratoř biochemie:	+420 599 524 803 +420 739 342 300
	Laboratoř hematologie:	+420 599 524 804 +420 739 342 299
	Laboratoř imunologie a sérologie:	+420 599 524 805 +420 599 524 815 +420 599 524 816 +420 739 342 301
	Laboratoř biochemie OIM:	+420 599 524 806
	Laboratoř mikrobiologie:	+420 599 524 809 +420 599 524 819 +420 599 524 820 +420 739 342 302
	Lab. molekulární biologie	+420 595 530 232 - 234
	Cytogenetická laboratoř:	+420 595 530 235 - 236
	IT oddělení:	+420 556 794 120
	Další kontakty:	http://www.spadia.cz