NEWS SPADIA

10. číslo | Diagnostická laboratoř | 12/2011

Vaše jistota v laboratoři

Úvodní slovo

Vážení kolegové,

po delší době vám opět přinášíme naše noviny. Není to tím, že bychom rezignovali na tištěnou formu předávání informací, ale vydání našeho občasníku jsme prostě nestihli. Důvod je prostý – připravovali jsme naši laboratorní příručku. Toto kolektivní dílo má rozsah skoro 700 stran a naší ambicí je, aby se stala vašim každodenním průvodcem laboratoří.

Elektronizace stále více proniká do zdravotnictví a nejedná se jen o využívání počítačů pro vlastní práci. Laboratoře produkují obrovské množství dat a bez počítačů si naši práci nedokážeme představit. Je již samozřejmostí šifrované přeposílání výsledků z laboratoře do zdravotnických zařízení. Opačný tok dat, tj. ze zdravotnického zařízení do laboratoře – **elektronická žádanka** – je v ambulantním sektoru zcela výjimečný.

Elektronická žádanka, která je součástí našeho software Virtual Lab, je jedním z prvních produktů tohoto typu na zdravotnickém elektronickém trhu. Elektronická žádanka pracuje nezávisle na vašem lékařském programu, ale dokáže s ním spolupracovat tak, aby se práce s žádankou co nejvíc zjednodušila. Využitím tohoto produktu budete mít kompletně pod kontrolou vaši indukovanou péči, protože veškeré požadavky se automaticky ukládají.

Aplikace Virtual Lab poskytujeme pro lékaře a zdravotnická zařízení, která s námi spolupracují, zdarma a to včetně poradenství a technické podpory. Další přidanou hodnotou této aplikace je to, že obsahuje kompletní laboratorní příručku.

Další velkou novinkou, kterou nabízíme našim spolupracujícím lékařům, je spolupráce s dodavatelem zdravotnického materiálu – DISTRIMED. Tato společnost poskytne významnou slevu všem zdravotnickým zařízením, která spolupracují s naší laboratoří.

Vážení kolegové, za celý kolektiv laboratoře SPADIA LAB vám přejeme krásné prožití vánočních svátků, pevné zdraví a hodně úspěchů v práci i v soukromém životě v roce 2012.

Za celý kolektiv SPADIA LAB

Martin Radina

Molekulárně genetická diagnostika HBV a HCV

Zagorová H., laboratoř molekulární biologie

Oddělení molekulární biologie rozšířilo nová vyšetření z oblasti extrahumánního genomu. K současným vyšetřením na přítomnost genomu *Chlamydia trachomatis* a *HPV HR* přibydou virové hepatitidy B a C. Nově zaváděné metody přispějí k zlepšení diagnostiky virových hepatitid a možnosti sledování účinnosti protivirové léčby. HBV a HCV jsou nemoci nevyléčitelné, ale lze je kontrolovat a dosáhnout tak suprese replikace viru.

Virus hepatitidy B (HBV)

HBV je řazen do čeledi *Hepadnaviridae* do rodu *Orthohepadnavirus*. Jde o DNA virus, který má výrazný tropismus k jaterním buňkám a tendenci perzistovat v organismu a navozovat vznik chronické hepatitidy, nemocí z imunokomplexů, jaterní cirhózy a hetocelulárního karcinomu.

Hlavním zdrojem nákazy je krev a sekrety (mateřské mléko, sliny, sperma). I přes preventivní opatření, mezi které patří i zavedení plošného očkování, je stále onemocnění HBV celospolečenským problémem. Infekce se v současné době šíří hlavně heterosexuálním a homosexuálním stykem, kontaminovanými jehlami mezi osobami závislými na intravenózně aplikovaných drogách a perinatálním, vzácně i transplacentárním přenosem z matky na plod. Profesionální infekce ohrožuje zdravotníky, zaměstnance laboratoří a hemodialyzačních jednotek.

Pro laboratorní průkaz HBV infekce je stěžejní sérologická vyšetření, kdy jsou v séru zjišťovány HBV-asociované antigeny HBs a HBe a protilátky proti HBs, HBe a HBc, které provádí oddělení imunologie naší laboratoře.

Oddělení molekulární biologie zavedlo metodu stanovení DNA (deoxynukleová kyselina) HBV pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Vyšetření je kvantitativní, čili umožňuje určit virovou nálož (úroveň replikace viru). Hodnoty jsou udávány v IU/ml. Materiálem je sérum, které se 1 den uchovává při 2-8℃, déle p ři -20° C. Účel vyšetření HBV DNA: konfirmace sérologických nálezů, rozlišení fáze onemocnění, určení rizika rozvoje jaterní cirhózy a HCC, účinnost terapie.

… pokračování na str. 2

… pokračování ze str. 1

Virus hepatitidy C (HCV)

HCV je obalený +RNA virus. Virus hepatitidy C se dělí do 1-6 typů. V Evropě jsou nejčastější tyto typy: 1a, 1b, 2a, 2b a 3a. Hlavními cestami šíření HCV infekce jsou: přenos krevními deriváty , intravenózní uživatelé drog, sexuální kontakt s osobou HCV pozitivní, perinatální přenos (velmi vzácný). Zvýšenému nebezpečí nákazy je vystaven zdravotnický personál, pracovníci laboratoře a hemodialyzovaní pacienti. Virus hepatitidy C nevytváří protektivní imunitu, možnost reinfekcí HCV. Tvorba virus-neutralizačních protilátek je slabá. Pasivní ani aktivní imunoprofylaxe není.

Klinické projevy infekce bývají mírné a často probíhá infekce inaparentně. U většiny infikovaných osob onemocnění progreduje jako chronická aktivní hepatitida po řadu let s častým vyústěním do jaterní cirhózy s vysokým rizikem vzniku HCC.

Laboratorní průkaz HCV se opírá o sérologickou detekci anti-HCV protilátek. Protilátky jsou markerem expozice, prokazatelné jsou nejdříve za 4-6 týdnů. (Zkrácení diagnostického okna lze dosáhnout stanovením virového antigenu HCV.)

V naší laboratoři stanovujeme molekulárně genetickou metodu HCV RNA. Principem testu je přepis RNA do DNA a následující amplifikace a detekce (PCR reakce). Vyšetření je kvantitativní, udávána jednotka je IU/ml. Materiálem je sérum, které se může uchovat 1 den při teplotě 2-8℃, v případě delšího skladování při -20℃. Standardní detekční limit je citlivost 50 IU/ml HCV RNA a méně. Indikace k vyšetření HCV RNA: osoby HCV pozitivní, osoby s nevysvětlitelnou jaterní chorobou, které jsou anti-HCV negativní a lze je považovat za imunokompromitované, stanovení virémie před zahájením protivirové léčby a sledování účinnosti terapie, zkrácení diagnostického okna. HCV RNA je možno detekovat již po 5-10 dnech od expozice.

U osob RNA HCV pozitivních je-li zvažována terapie, by měl být určen genotyp HCV, u jednotlivých genotypů je jiná délka terapie a pravděpodobnost vyléčení HCV infekce.

end

Vyšetření HPV HR z cervikálních stěrů metodou RT-PCR

Martinek J., Kutějová K., laboratoř imunologie a sérologie

ÚVOD

V laboratoři Imunologie a sérologie došlo k výměně testu pro posouzení schopnosti organismu fagocytovat.

Dřívější test fa Orpegen Pharma byl nahrazen testem české fa Exbio založeném na stejném principu měření a vyhodnocení fagocytózy.

FAGOCYTÓZA

Fagocytóza je schopnost specializovaných buněk imunitního systému vyhledat, pohltit, usmrtit a rozložit mikroorganismy, stárnoucí buňky a další endogenní materiál. Fagocytóza je součásti jak nespecifické tak i specifické imunity člověka. Základními buňkami tvořící efektorovou část fagocytosy jsou polymorfonukleární neutrofilní či eosinofilní leukocyty/ granulocyty/, makrofágy a dendritické buňky. Samotný proces fagocytózy má orientačně několik fázi. První fáze je adherence na endotel a aktivace fagocytů, kterou vyvolá například malignita, infekce či jiná imunopatologie a odehrává se v cévách. Druhou fází, která následuje, je prostup aktivovaných fagocytů endotelovou výstelkou a diapedesa do tkání. Následuje pohlceni částic větších než 0,5 mikrometrů fagocytem neboli ingesce. Poté dochází k rozkladu pohlcené částice uvnitř fagolysozomu za vniku silně kyselého prostředí hydrolasami, myeloperoxidasou, defenziny a serinovými proteinasami, lysozymem, laktoferinem, kolagenasou, gelatinasou, elastasami a dalšími.

Granulocyty usmrcují mikroorganismy dvěma způsoby – *mechanismy na kyslíku závislé* - tvorba biologicky aktivních kyslíkových mediátorů, např. NADPH oxidasovy komplex katalyzující reakci za vzniku superoxidového aniontu, ze kterého se tvoří další kyslíkové produkty jako např. peroxid vodíku, ze kterého se uvolňuje pak za působení myeloperoxidasy kyselina chlorná, singletový kyslík a chloraminy, dále hydroxylový radikál jenž napadá všechny makromolekuly, včetně DNA. Tyto produkty kyslíkových radikálů se dostávají i mimo fagocyty a způsobují často destrukce vlastních tkání v místě zánětu. Tyto reakce jsou spojeny s prudkým vzestupem spotřeby kyslíku ve fagocytující buňce, což je nazýváno oxidativním vzplanutím

- *mechanismy na kyslíku nezávislé* – biologicky aktivní látky cytoplasmatických granulí. Patři sem např. baktericidní permeabilitu zvyšující protein = BPI, metaloproteinasy a serinové proteinasy a take defenziny, nazývané též živočišnými antibiotiky.

PORUCHY FAGOCYZÓZY

Fagocytosa je nejvýznamnější součást přirozené imunity proti mikroorganismům a její hlubší porucha je příčinou těžkých onemocnění, které neléčené vedou až ke smrti člověka. Nejčastějšími klinickými projevy jsou infekce kůže s abscesy, infekce sliznic, hepatomegalie a jaterní abscesy, osteomyelitis, bronchopneumonie, septikemie způsobené bakteriemi- zejména staphylokoky a G- bakteriemi, a mikromycety (plísně Aspergilus, kvasinky). Dialýza, léčba růstovými faktory, sepse, toxické látky také významně ovlivňují fagocytosu. Poruchy fagocytosy jsou nejčastěji **sekundární,** způsobené širokou škálou faktorů vnějšího prostředí, vlivem terapeutických zásahů a jiných chronických onemocnění zejména se snížením počtu či funkce leukocytů.

… pokračování na str. 3

Vrozené poruchy fagocytosy jsou sporadické s incidencí l:100 000 až 1:1 000 000 novorozenců. Jedná se však o velmi těžké poruchy s bakteriálními a mykotickými onemocněními, které ohrožují pacienty a bez léčby jsou smrtelné. Vrozené poruchy se dále dělí na poruchy počtu granulocytů a poruchy jejich funkce.

Poruchy počtu fagocytárních buněk:

- Nejtěžší je retikulární dysgenese s agranulocytosou,lymfopenii a hypoplasii thymu. Již první dny a týdny po narození se vyskytují těžké život ohrožující infekce.
- Těžká kongenitální neutropenie (*Kostmanův syndrom*) - zrání leukocytů je u těchto děti ukončeno maximálně na úrovni myelocytu, u některých dětí se pak vyvine až myeloidní leukemie. Léčba G-CSF bývá úspěšná.
- Cyklická neutropenie se projevuje jako cyklické snižování ve tvorbě a vyzrávání neutrofilů a v těchto fázích jsou děti ohroženy těžkými infekcemi. Objevuje se do 10 let života.

Poruchy funkce fagocytujících buněk:
Zasahuji různé fáze fagocytosy, od aktivace a adherence až po nitrobuněčný rozklad
ve fagolysozomech.

- Porucha adhese, když leukocyty nejsou schopny pevně přilnout k endotelu a pak prostupovat do tkání, je známa pod názvem *LAD 1 syndrom* (Leukocyte Adhesion Deficiency). Děti mají pyodermie, těžké bakteriální infekce i vysokou neutrofilii a většina umírá do 5ti let života.
- Poruchy chemotaxe jsou častější, avšak pro složitost chemotaxe diagnosticky velmi obtížně stanovitelne. Poruchy ingesce jsou způsobeny nedostatkem opsoninů
- Poruchy tvorby granulí – *Chediak – Higashi syndrom* - je způsoben mutací genu kódujícího protein regulující lysosomální transport, vznikají velká nefunkční granula. Je vzácný.
- Porucha myeloperoxidasy je relativně častá – l:4000, ale většina nemocných má jen časté kvasinkové či aspergilové infekce.
- Poruchy v komplexu NADPH oxidasy s nedostatečnou tvorbou superoxidového anionu– *chronická granulomatosní choroba* - s incidenci 1: 200 000 až 1: 450 000 dětí, nemocní jsou ohroženi infekcemi a akumulací leukocytů s tvorbou granulomů v orgánech. Nemocní jsou diagnostikováni často do dvou let po narozeni s lymfadenitididami, kožními abscesy i jaterními abscesy, hepatomegalií a pneumoniemi, sepsí, způsobené zvláště stafylokoky, gramnegativními enterobakteriemi a plísněmi, zejména aspergilem a candidou. Příčinou je genetická porucha, recesivní dědičnost vázaná na X chromosom.

LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ FAGOCYTÓZY:
Základním vyšetřením fagocytosy je vyšetření diferenciálního krevního obrazu s počtem neutrofilních granulocytů. Výrazné snížení jejich hodnot, opakovaně, často při jiných onemocněních, jednoznačně opravňuje k diagnose poruchy fagocytosy.

Princip testu:
Nový test firmy EXBIO je založen na měření respiračního (oxidačního) vzplanutí granulocytů po jejich stimulaci inaktivovanými bakteriemi *E. coli*. Po ingesci bakterií je ve fagocytech aktivována NADPH-oxidasa, která spustí respirační (oxidační) vzplanutí. Vznikající reaktivní meziprodukty uvnitř fagocytů oxidují dihydrorhodamin 123 (DHR123) na fluorescenční produkt rhodamin 123, který je detekován průtokovým cytometrem. Pozitivní kontrolu představuje vzorek, který je inkubován s PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), který spustí respirační vzplanutí i bez adheze a ingesce patogenu granulocytem.

Očekávané hodnoty:
Normální hodnoty fagocytární aktivity granulocytů byly stanoveny na čerstvých vzorcích periferní krve 50 zdravých jedinců.

Počet fagocytujících granulocytů: 80-100 %
Stimulační index granulocytů : > 30

Pozn.: JIŽ SE NEURČUJE % FAGOCYTUJÍCÍCH MONOCYTŮ !

end

Kvantitativní stanovení lidského epididymálního proteinu (HE4) v séru nebo plazmě

Minář J., laboratoř biochemie

Marker HE4 je důležitý pro časnou detekci zhoubných nádorů vaječníků s vysokou senzitivitou a specifičností. Imunochemické stanovení se používá jako pomůcka při monitorování návratu nebo progrese onemocnění pacientek s epiteliálním karcinomem ovarií.

• Jako samostatně použitý onkologický marker má nejvyšší senzitivitu (při specifičnosti 75 %) pro detekci nádorů vaječníků, zvláště pak v prvním, asymptomatickém stádiu onemocnění.

• Podle některých studií, HE4 dosahuje až o 17 % vyšší citlivosti v ranných fázích karcinomu ovarií v porovnání s CA125.

• Zvýšené hladiny HE4, doprovázené normálními hladinami CA125, mohou nasvědčovat přítomnosti tkáňové hyperplazie v oblasti vaječníků, což pomáhá odlišit ženy s karcinomem od žen zdravých, anebo s benigním onemocněním

• Kombinace stanovení HE4 spolu s CA125 slouží ke stanovení rizika výskytu epiteliálního karcinomu vaječníků u pacientek před i po menopauze (PI – prediktivní index, ROMA algoritmus). Monitoring průběhu choroby u pacientek s ovariálním karcinomem.

• Je vhodné použít HE4 ke sledování průběhu choroby u žen s ovariálním karcinomem, progrese onemocnění, sledování účinnosti terapie, či návratu onemocnění.

• Očekávané hodnoty u zdravých žen < 140 pmol/l pro stanovení metodou Roche

Více informací naleznete např. na www.roche-diagnostics.cz/prolekare/

end

Terapeutické monitorování hladin léčiv
Loučka P., oddělení instrumentálních metod

Uvedená tabulka obsahuje souhrn vyšetření hladin léčiv, která jsou prováděna v laboratoři biochemie na Oddělení instrumentálních metod (OIM). Tabulka obsahuje informace o referenčních mezích pro jednotlivá vyšetření, o jednotkách, metodách měření a frekvenci měření v rutinním provozu. Důležitou součástí celého analytického procesu je správně provedený odběr biologického materiálu (správné místo a čas odběru, správný typ odběrové zkumavky a správné zacházení se vzorkem při skladování a transportu). V tabulce jsou uvedeny informace o typu a minimálním množství biologického materiálu požadovaného pro jednotlivá vyšetření. V rámci terapeutického monitorování hladin léčiv (TDM) je obecně doporučováno provádět odběr před podáním ranní dávky léku, tzn. v bodě nejmenší variability sérové koncentrace. Specifické časy odběru jsou doporučovány pro monitorování hladin antibiotik. Pro účely TDM byla vytvořena zvláštní žádanka, do které je nutno vpisovat i další informace napomáhající správné interpretaci naměřených hladin léčiv (hmotnost a výšku pacienta, dávkování monitorovaného léčiva, přesný čas odběru, přesný čas podání poslední dávky, další užívané léky, atd.). Žádanka je ke stažení na http://spadia.cz/download/spadia-zadanka-stanoveni-hladin-leciv.pdf.
Podrobnější informace o vyšetřovaných parametrech jsou uvedeny v laboratorní příručce, která je dostupná v elektronické podobě na https://virtuallab.medivis.cz/.

end

Diagnostická laboratoř
SPADIA Lab, a. s.
Dr. Martínka 7
700 30 Ostrava

Telefony:

Příjem materiálu	+420 599 524 800
	+420 599 524 802
Odběrová místnost	+420 599 524 801
Laboratoř biochemie	+420 599 524 803
Laboratoř hematologie	+420 599 524 804
Laboratoř imunologie	+420 599 524 805
Laboratoř instrum. metod	+420 599 524 806
Laboratoř mikrobiologie	+420 599 524 809
Cytogenetická laboratoř	+420 599 526 275
Kancelář	+420 599 524 808
Kancelář 2	+420 599 524 807
Pobočka Nový Jičín	+420 556 794 200
	+420 556 794 201
Pobočka Hlučín	+420 595 041 061
Pobočka Frenštát p. R.	+420 556 801 558

e-mail: info@spadia.cz web: www.spadia.cz
www.spadia.pl

	Název vyšetření	Referenční meze	Jednotky	Biologický materiál	Minimální množství biolog. materiálu	Metoda	Frekvence v rutině
Antibiotika (Při první kontrole dop. standardně 2 odběry: 15 minut před aplikací a 30 minut po ukončení infuze/60 minut po i.m. aplikaci. Další kontroly podle výsledků a klin. stavu.)	**Gentamicin**	- před aplikací: 0,4 - 2 - po aplikaci: 8 - 15 - po aplik. 2-3x denně a při renál. insuf. 4 - 8	mg/l	sérum	200 µl	EMIT	denně
	Vankomycin	před aplikací: 10 – 15 po aplikaci: 20 – 40	mg/l	sérum	200 µl	EMIT	denně
Antiepileptika (odběr před užitím ranní dávky, popř. ještě 2 hodiny po užití)	**Primidon**	5 – 15	mg/l	sérum	200 µl	HPLC	denně
	Phenobarbital	15 - 35	mg/l	sérum	200 µl	HPLC	denně
	Fenytoin	5 – 20	mg/l	sérum	200 µl	HPLC	denně
	Etosuximid	40 - 100	mg/l	sérum	200 µl	HPLC	denně
	Kys.valproová	50 – 100	mg/l	sérum	200 µl	EIA	denně
	Karbamazepin	3 – 12	mg/l	sérum	200 µl	HPLC	denně
	Karbamazepin-epoxid	0,5 – 3,0	mg/l	sérum	200 µl	HPLC	denně
	Clonazepam	11 – 60	µg/l	sérum	1 ml	HPLC	do 2. dne
	Lamotrigin	2 - 10	mg/l	sérum	200 µl	HPLC	denně
	Levetiracetam 1 (před) **Levetiracetam 2** (po)	před aplikací: 3 - 34 po aplikaci: 10 - 63	mg/l	sérum	250 µl	HPLC	do 2. dne
Kardiofarmaka (odběr před užitím ranní dávky)	**Digoxin**	0,6 – 1,2	ng/ml	sérum	200 µl	EIA	denně
	Amiodaron	0,7 – 2,0	mg/l	sérum	200 µl	HPLC	denně
	Desethylamiodaron	0,7 – 2,0	mg/l	sérum	200 µl	HPLC	denně
Antiastmatika (odběr před užitím ranní dávky)	**Theophyllin**	10 – 20	mg/l	sérum	200 µl	HPLC	denně
Psychofarmaka	**Lithium**	0,5 – 1,2	nmol/l	sérum	150 µl	potenciometrie	denně