

A Laboratóriumi Medicina Intézet hírlevele

2016. december

Tisztelt kollégák!

Decemberi hírlevelünkben a mikrobiológiai laboratóriumban bevezetett új molekuláris vizsgálatokról értesítő körlevelet teszünk közzé. Emellett a hemoglobinopathiákról, a trombin generációs vizsgálatokról és a Quantiferon tesztről olvashatnak összefoglalót. Áldott békés ünnepeket kívánunk minden kedves olvasónknak!

dr Papp Enikő szerkesztő

Tisztelt Klinika Igazgató! Tisztelt Kollégák!

Tájékoztatjuk Önöket, hogy laboratóriumunkban bővítettük a mikrobák valósídejű PCR-rel történő (szemikvantitív) kimutatásának körét.

Valamennyi vizsgálat a MedSol MIBLMIKR kéréslapján rendelhető meg.

Eredmény: a vizsgálatokat hetente/ sürgősséggel naponta végezzük

	Kód	Pont	Minta
Pneumonocystis carinii (jirovecii) kimutatás PCR	28935, 28935, 29950	9225	légúti minta
Chlamydomphila pneumoniae kimutatás PCR	28935, 28935, 29950	9225	légúti minta
Mycoplasma pneumoniae kimutatás PCR	28935, 28935, 29950	9225	légúti minta
Legionella pneumophila kimutatás PCR	28935, 28935, 29950	9225	légúti minta
Légúti multiplex PCR	28935, 28935, 28935, 29950	11875	légúti minta

STI multiplex PCR	28935, 28935, 28935, 28935, 28935, 28935, 28935, 28935, 29950	25125	genitális minta, elsősugaras vizelet
HPV28 molekuláris vizsgálat	28935, 28935, 28935, 28935, 28935, 28935, 28935, 28935, 29950	25125	genitális minta
Cytomegalovírus kimutatás PCR	28935, 28935, 29950	9225	EDTA-s vér, liquor, hólyagbennék, váladékok (légúti, szem, ivarszervi), vizelet
HSV (HSV I, II) kimutatás PCR	28935, 28935, 29950	9225	EDTA-s vér, liquor, hólyagalapról vett törlet fiziológias sóoldatban
Pozitív hemokultúrából kórokozó azonosítás molekuláris vizsgálattal (FilmArray)*	29950 + 21 X 28935	59575	pozitív jelzést adó hemokultúra
Liquor multiplex PCR vizsgálata (FilmArray)*	29950 + 25 X 28935	70175	liquor

*vizsgálati idő: 1 óra!

Újronnan bevezetett vizsgálatok:

Légúti multiplex PCR: *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bordatella pertussis*, *Bordatella parapertussis* kimutatása

Minta: bronchusmosó folyadék (BAL), trachea-váladék, köpet, nasopharyngeális, esetleg torokváladék (törlet) fiziológias sóoldatban vagy vírus transzport-közegben (VTM), folyékony közegű transzport közeg

STI multiplex PCR genitális mintából: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* kimutatása

Mintavételi eszköz: cervix-, hüvelyváladék, ejakulátum, prosztatamasszáta folyékony közegű transzport közegben, tamponos minta steril fiziológias sóoldattal nedvesítve, elsősugaras vizelet

HPV28 molekuláris vizsgálat : 28 (19 High risk 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73, 82 és 9 low risk: 6,11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70) Human papillomavírus kimutatása

Minta: cervix, citológiai vizsgálatra vett minta (pl. ThinPrep®, SurePath™)

A minta transzportja és tárolása

A minták 2 és 25 °C között szállíthatóak. Ha a minták laboratóriumba való érkezése aznap nem biztosított (hétvége), kérjük hűtőbe tenni.

Pozitív hemokultúrából kórokozó azonosítás molekuláris vizsgálattal (FilmArray):

A laboratóriumban pozitív jelzést adó hemokultúrák palackokból az alábbi (27!) kórokozók kimutatására van lehetőség **1 órán belül**:

Enterococcus, Listeria monocytogenes, Staphylococcus, Staphylococcus aureus, Streptococcus, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacteriaceae, Enterobacter cloacae complex, Escherichia coli, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae, Proteus, Serratia marcescens, Candida albicans, Candida glabrata, Candida krusei, Candida parapsilosis, Candida tropicalis
Valamint: mecA - meticillin rezisztencia, vanA/B - vancomycin rezisztencia, KPC - karbapenem rezisztencia génjeinek detektálása

Liquor multiplex PCR vizsgálata (FilmArray):

A laboratóriumba érkezett liquormintából az alábbi (14!) kórokozók kimutatására van lehetőség **1 órán belül**:

Escherichia coli K1, Haemophilus influenzae, Listeria monocytogenes, Neisseria meningitidis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae, Cytomegalovirus (CMV), Enterovirus, Herpes simplex virus 1 (HSV-1), Herpes simplex virus 2 (HSV-2), Human herpes virus 6 (HHV-6), Human parechovirus, Varicella zoster virus (VZV), Cryptococcus neoformans/gattii

dr. Szalay Balázs

Szaklektor: dr. Fehér Adrienne

Kóros hemoglobinok és kimutatásuk

A hemoglobin (Hb) a vörösvértestekben megtalálható 4 globin alegységből álló metalloprotein. Mind a 4 globin lánchoz kapcsolódik 1-1 vas tartalmú hem csoport, mely az oxigén megkötéséért felel. Többféle globin alegység ismert (α , β , γ , δ , ϵ , ζ), melyek kombinációjából jönnek létre a Hb tetramerek. A globin láncoktól függ, hogy milyen lesz a végső Hb molekula szerkezete, ami az oxigén disszociációját is befolyásolja. Az élet különböző szakaszaiban ugyanis eltérő affinitással kell megkötni az oxigént, ennek megfelelően a Hb is folyamatosan

változik. A kezdeti, embrionális Hb-okat ($\zeta_2\varepsilon_2$, $\alpha_2\varepsilon_2$, $\zeta_2\gamma_2$, $\zeta_2\beta_2$) a magzati fejlődés 8. hetétől a foetalis Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) váltja fel. A születést követően a Hb F fokozatosan lecsökken és helyette a felnőttekre jellemző Hb A ($\alpha_2\beta_2$) és Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) szállítja a későbbiekben az oxigént. 1 éves korra ez az átalakulás befejeződik és fiziológias körülmények között nem változnak az arányok (Hb F < 2 %, Hb A₂<3,5 %, Hb A >96,5%).

A globin lánc aminosav sorrendjének megváltozása befolyásolja a hemoglobin szerkezetét, ami a defektus típusától függő mértékű hemoglobinopathiát eredményez. A Hb géndefektusok igen heterogének, összesen több mint 400 Hb variánst írtak le. A Hb variánsok elkülönítése legtöbbször eltérő elektroforetikus mobilitásuk alapján történik és az ABC betűivel jelöljük őket. Ha ugyanis egy (vagy több) aminosav eltér a globin láncban, megváltozik az egész fehérje viselkedése a gélelektroforézis során. Azokat a variánsokat, melyek szerkezete eltérő, de az elektroforetikus mobilitásuk hasonló, a felfedezésük helyéről nevezték el (HbS Memphis, Hb C Harlem, stb.) A hemoglobinopathiák lehetnek kvalitatív (Hb S, Hb C, Hb E) vagy kvantitatív (alfa és béta thalassémia) eltérések.

A Hb S (sarlósejtes anémia) esetén a β lánc 6. aminosav helyén glutaminsav (savas aminosav) helyett valin (semleges aminosav) található, így a Hb A átalakul Hb S-é. A deoxigenált Hb S azonban kevésbé lesz vízdékony, és hosszú fibrillumokká polimerizálódik a vörösvérsejtben, ami miatt az sarló alakúvá deformálódik. A deformált, rugalmatlan vörösvérsejtek a kis arteriolákban, kapillárisokban elzáródásokat okoznak, ami vérellátási zavart, a különböző szervekben infarktushoz vezethet. A mechanikai hatásoknak kevésbé ellenálló vörösvérsejtek hemolizálnak, így anémia alakul ki. A deformált vörösvérsejt előnye azonban az, hogy részlegesen védetté teszi a beteget a maláriát okozó plazmódium fertőzéssel szemben. A klinikai kép attól függ, hogy mekkora arányban érintettek a Hb A molekulák. Ha az összes átalakult Hb S-é, akkor súlyos hemolitikus anémia fog kialakulni visszatérő krízisekkel. Ha azonban az átalakulás csak részleges, akkor sarlósejtes jellegről beszélhetünk. Ebben az esetben nincs anémia, a vörösvérsejt morfológia normális lesz és csak súlyos stressz vagy fertőzés tud anémiás krízist kiváltani.

Hemoglobin C betegségről akkor van szó, ha β lánc 6. aminosav pozíciójában glutaminsav helyett lizin (bázikus aminosav) található. A Hb C rombusz alakú kristályokat hoz létre a vörösvérsejtben, így a sejtek is rombusz alakúak lesznek. A deformált vörösvérsejtek ebben az esetben is gyorsabban hemolizálnak, ami szintén anémiához vezet. Az anémia mértéke ez esetben is a normál és kóros Hb arányától függ. A Hb C betegség egyéb laboratóriumi jelei: céltábla sejtek, spherocytosis, emelkedett retikulocita szám és emelkedett szérumbilirubin szintek. A Hemoglobin S-C betegség az előző kettő kombinációja, általában enyhe anémiával jár.

Hemoglobin E esetében a β lánc 26. aminosav pozíciójában glutaminsav helyett lizin található. Tünetet ritkán okoz, elsősorban Délkelet Ázsiában fordul elő. Laboratóriumi jelei: hypochrom, microcyter anémia, kifejezett céltábla sejt képződéssel.

Thalassémiáról beszélünk, ha normális szerkezetű globin lánc szintetizálódik, de valamelyikből részleges vagy teljes hiány mutatkozik. Ha az α -lánc szintézise elégtelen, akkor α -thalassémiáról, ha a β -láncé, akkor β -thalassémiáról beszélünk. Hiány esetén az egyéb láncok túlsúlyba kerülnek, ami olyan Hb tetramereket eredményez, amelyek normál esetben nincsenek jelen (Hb Bart = 4γ , Hb H = 4β).

Az α -thalassemia 4 csoportra osztható az érintett gének számától függően. Tünetmentes hordozó esetén 3 működő α -gén van, aminek köszönhetően még nincsenek klinikai tünetek és a hematológiai paraméterek is normálisak. Két működő α -gén esetén α -thalassemia minor a diagnózis, mely általában tünetmentes. Enyhe microcyter anémiával azonban jelentkezhet, így könnyen összetéveszthető vashiányos anémiával. Ha már csak 1 működő α -gén van, akkor α -thalassemia intermediáról beszélünk. Ebben az esetben már súlyos anémia jelentkezik vörösvérsejt deformitásokkal, splenomegáliával és sárgasággal. Előfordulhatnak csontdeformitások (főleg az arc és a homlok területén), a vérkenetre pedig jellemzőek a fragmentocyták, a hypochromia, a microcytosis, a céltáblasejtek és a poikilocytosis. Brillant-kretil-kék festéssel "golflabda sejtek" (precipitálódó β -globin lánc aggregátumok) láthatóak. Végül α -thalassemia major esetében egyetlen működő α -gén sincs, ami általában halálos kimenetelű hydrops fetalis képében jelentkezik. Ha élve megszületik az érintett magzat, súlyos mértékű anémia mellett jelentős oedema és súlyos hepatosplenomegália is jelen van. A vérkenetben erythroblastok, céltáblasejtek és súlyos hemolízis jelei láthatóak.

β -thalassemia szintén attól függ a klinikai kép, hogy milyen mértékben érintett a β -lánc. β -thalassemia minor esetén csak kis mértékben csökken a β -lánc szintézise, ennek megfelelően az anémia is enyhe. Az alacsony MCV és alacsony MCH mellett emelkedett a Hb A₂ aránya. β -thalassemia intermédiában a β -lánc mennyisége a normális 50%-a alá csökken, ami változó mértékű anémiát és microcitózist eredményez. A csontvelő expanzió és az extramedulláris vérképzés lehet látványos (hepatosplenomegália, mellkasi és gerinc eltérések). β -thalassemia majorban teljesen hiányzik a β -lánc szintézise, ennek megfelelően közel 100%-ban Hb F van jelen. Az anémia rendkívül súlyos, a Hb 30-40 g/l alá csökken. A kenetben hypochrom, microcyter vörösvérsejtek látszanak. Jelen vannak céltáblasejtek, könnyecsepp sejtek, elliptocyták, microspherocyták, vörösvérsejt fragmentumok és magvas vörösvérsejtek. A csontvelőre jellemző az erythroid hyperplasia. Klinikai képét uralja a hepatosplenomegália, a sárgaság, csont deformitások, törések, valamint a testi és a szellemi fejlődésbeli elmaradás.

A thalassemiák laboratóriumi diagnosztikája:

1. Vérvizsgálat, kenet
2. Mentzer index: $MCV/RBC < 13$
2. Retikulocita meghatározás
3. Csontvelő kenet
4. Ozmotikus fragilitás teszt
5. Elektroforézis
6. Kromatográfia
7. Acid elúciós teszt HbF eloszlás kimutatására
8. Globin lánc szintézis vizsgálata
9. DNS analízis

Mikor kell gondolni hemoglobinopátiára?

- Microcyter, hypochrom anémia esetén, ha a vashiány kizárható
- Krónikus hemolitikus anémia
- Olyan érelzáródással járó kríziseknél, melyek etiológiája ismeretlen és a beteg endémiás területről származik
- Gyógyszer indukálta anémiában
- Hematológiai faktorok által okozott erythrocytosis és/vagy cyanosis esetén
- Ismeretlen eredetű hydrops fetalisnál

dr. Tóth Balázs

Szaklektor: dr. Várnai Katalin

Trombingenerációs vizsgálatok

A trombin a véralvadási kaszkád egyik kulcsenzime, pro- és antikoaguláns funkcióval rendelkezik. A trombin képződése a trombingenerációs vizsgálattal jellemezhető. Ez olyan globális véralvadási teszt, amely átfogó képet ad a hemosztázis állapotáról.

A trombin keletkezésének vizsgálatára szolgáló tesztek két fő csoportra lehet osztani. Az egyik fő csoport az *in vivo* keletkező trombin mennyiségének vizsgálatán alapul. A plazmában lévő F1+2 fragmens (aktivált X. faktor általi aktiválás hasítási termékei) és a trombin-antitrombin komplex immunoassay-vel történő meghatározása esetén az emelkedett szintek fokozott *in vivo* trombinképződést jeleznek. Az eredmények megbízhatóságát rontja az F1+2 fragmens és a trombin-antitrombin komplex rövid életideje, valamint az, hogy a plazmakoncentrációjuk függ a vesefunkciótól.

A másik vizsgálati módszer az *ex vivo* keletkező trombin mennyiségét vizsgálja úgy, hogy a plazmához kis mennyiségű triggert (általában tromboplasztint) adva alvadást provokálnak, és meghatározzák a plazma saját (belső) trombin potenciálját. Ez az úgynevezett trombin generációs (TG-) teszt a trombin aktiválódás kinetikájának jellemzésére szolgál, így a pro- és antikoaguláns rendszerek funkcionalitásáról, nem pedig a valós, *in vivo* megvalósuló trombin-aktiválódásról ad információt. A TG-mérések során a trombin aktivitását határozzák meg az idő függvényében, aminek grafikus ábrázolása az úgynevezett trombogram. A trombogram kezdőpontja a trigger hozzáadása, amely után megindul az alvadási folyamat a késleltetési idő (lag time) elteltével. Az első (iniciációs) szakasz során kis mennyiségű trombin keletkezik, amely aktiválja az V., VIII. és a XI. véralvadási faktorokat és a trombocytákat, ezáltal előkészíti a rendszert, hogy a következő (propagációs) szakaszban gyorsan, nagy mennyiségű trombin szabadulhasson fel. A trombin keletkezésével egy időben megindul annak

inaktiválódása is, amelynek sebessége a trombin koncentrációjával arányosan növekszik. A propagációs szakaszban a trombin keletkezési sebessége meghaladja az inaktiválódás sebességét, a trombogramon a felszálló ág látható, amelynek meredeksége a sebességindex paraméter. Ahol a keletkezés és inaktiválódás sebessége megegyezik, ott a trombogramon csúcsot kapunk (maximális trombinaktivitás – peak thrombin). Ezt követően a görbe leszálló szakaszában az inaktiválódás sebessége haladja meg a keletkezés sebességét, a trombinképződés folyamatosan csökken, végül megszűnik. A trombogramon a görbe alatti terület az endogén trombinpotenciál (ETP). A fokozott TG (emelkedett ETP, peak thrombin, sebességindex, csökkent lag time) fokozott trombóliskésztségre, míg a csökkent TG (csökkent ETP, peak thrombin, sebességindex, emelkedett lag time) vérzékenységre utal.

A trombin-generációs mérésekkel következtethetünk a vénás trombólis kockázatára trombogén körülmények (műtét, tumor) esetén. A VTE prevenciójában és terápiájában használt K-vitamin antagonisták, heparinkészítmények vagy az új típusú orális antikoaguláns szerek (direkt és reverzibilis trombin és aktivált X. faktor inhibitorok) esetén a trombóliskésztség csökkenése együtt jár a TG csökkenésével, így a TG jelzi az antikoaguláció mértékét, alkalmas e szerek hatékonyságának monitorozására.

A trombingenerációs tesztek alkalmazhatóak a fokozott vérzéshajlammal járó betegségek vizsgálatára. Öröklött alvadási faktor hiányok esetén az alvadási szűrőtesztek eredményei, a plazmafaktorszintek, a vérzéses események gyakorisága és súlyossága közötti kapcsolat függ a betegség típusától. Bár ez egyénenként is változó lehet, emiatt a vérzékenység súlyossága és a mért faktorszintek között gyakran nincs kapcsolat, míg a TG-paraméterek nemcsak a véralvadási faktorok koncentrációjával, hanem a klinikai képpel is szorosan összefüggnek, így alkalmasak a VIII. faktor és IX. faktor készítményekkel történő terápia monitorozására és a szükséges dózis meghatározására. Vizsgálható az inhibitor-képződés esetén alkalmazott speciális, úgynevezett inhibitor bypassing terápia hatásossága is. Alkalmas fokozott vérzéskockázat esetén a betegek perioperatív monitorozására.

Összefoglalva, a trombin generációs vizsgálatok alkalmasak mind a fokozott trombóliskésztség, mind a vérzékenység súlyosságának kimutatására, az alkalmazott terápia hatékonyságának monitorozására.

A trombin generációs tesztek egyelőre nem OEP-támogatottak, csak kísérleti jellegűek. Az eredményeket klinikai döntéshozatalra nem lehet használni.

dr. Szabó Tamás

Szaklektor: dr. Kristóf Katalin

Quantiferon teszt jelentősége a tuberkulózis diagnosztikájában

A *M. tuberculosis* antigénjei jelenlétében termelt interferon- γ kibocsátásának mérésén alapuló eljárások a celluláris immunrendszer reaktivitását mérik és igen specifikusak a tuberkulózis kórokozójára. A teszt nem ad álpozitív eredményt BCG oltással vakcinált egyéneknél és a környezeti *Mycobacterium* fajok által kiváltott immunválasz sem befolyásolja az eredményeket (a *M. marinum* és a *M. kansasii* kivételével). Emiatt a korábban elterjedt Mantoux-próbához képest számos előnye van. Azon túl, hogy az oltási anamnézis ismerete nélkül is értékelni lehet a vizsgálat eredményét, előnye, hogy nem okoz további szenzitizációt (ellentétben a bőrteszttel, aminek értékelését a korábban elvégzett bőrteszt is zavarhatta).

Laboratóriumunkban a tuberkulózis kimutatására a Quantiferon-TB Gold Plusz tesztet használjuk, mely az IGRA vizsgálatok legújabb generációját képviseli. Az eljárás kivitelezéséhez négy vérvételi csőre van szükség, melyek a vizsgálati készletben találhatóak. A heparinos csövekben az ESAT-6 és CFP-10 fehérjékből (melyek nem találhatóak meg más, nem tuberculosis *Mycobacterium* fajokban) származó peptid antigének vannak. Az egyik csőben elsősorban a CD4+ T-sejteket stimuláló peptidok találhatóak, míg a másik csőben található antigének elsősorban a CD8+ T-sejteket aktiválják. A további csövek közül az egyik egy mitogéneket tartalmazó pozitív kontroll, míg a másik egy csak heparint tartalmazó negatív kontroll. A vérvételi csőbe levett teljes vérben található limfociták a peptid antigének hatására aktiválódnak abban az esetben, ha képesek a *M. tuberculosis* antigénjeivel reagálni (azaz a betegben zajlik immunválasz a fertőzéssel szemben) és Interferon- γ citokint bocsátanak ki. A kibocsátott citokin mennyiségét ELISA módszerrel mérjük. Mivel a vizsgálat a vérvételi csőben lejátszódó sejtes reakción alapul, fontos, hogy a vérvételi csöveket megfelelően tároljuk és a lehető leghamarabb 37 °C-ra helyezzük.

A teszt elsősorban a TBC fertőzés kimutatására alkalmas és ebben felülmúlja a Mantoux-próbát. A CDC kifejezetten ajánlja minden olyan helyzetben az IGRA elvégzését, amikor korábban Mantoux-próbát végeztek volna. A Magyarországra is érvényes szakmai ajánlások alapján elsősorban a látens TBC fertőzés kimutatása során merül fel az IGRA tesztek elvégzésének szükségessége. Ebből a szempontból is kiemelt jelentősége van a többletkockázattal rendelkező betegcsoportok esetében elvégzett szűrővizsgálatnak. Ezek közül a betegcsoportok közül az autoimmun betegségekben szenvedő betegeken a biológiai terápia megkezdése előtt elvégzett IGRA tesztek jelentősége egyértelműen igazolt.

A látens és az aktív fertőzés közötti különbségtételre azonban nem alkalmasak az IGRA tesztek és az Európai Járványügyi Központ (ECDC) nem ajánlja tuberkulózis diagnosztikájára kizárólagosként használni ezt a módszert. A tuberkulózis diagnosztikájában tehát a Mantoux-próbát helyettesítheti, de a többi, kiegészítő jellegű vizsgálatot (mint a mellkasröntgen, a tenyésztés és a genetikai vizsgálatok) nem. Pozitív eredmény esetén ezeket feltétlenül el kell végezni a végleges diagnózis felállításához.

Fontos azt is észben tartani, hogy a negatív eredmény nem zárja ki teljesen a TBC fertőzés lehetőségét, mivel immunszupprimált egyéneknél vagy a fertőzés „ablakperiódusa” alatt nem

várhatunk reakciót. Nem ajánlja továbbá az ECDC azokban az országokban az IGRA tesztek rutinszerű bevezetését, ahol nagy a TBC előfordulási aránya. Alacsony tbc prevalenciájú országokban, egészséges immunstátuszú betegek esetében azonban lehet létjogosultsága az IGRA vizsgálatnak egyszerű szűrőműszerként. Külön kiemelkedő az IGRA tesztek jelentősége végül a nem tuberculosis *Mycobacterium* fajok által okozott fertőzések és a tuberkulózis differenciáldiagnosztikájában, hiszen néhány kivételtől eltekintve ezekkel a fajokkal nem ad keresztreakciót a vizsgálat.

http://www.tudogyogyasz.hu/upload/tudogyogyasz/document/mtt_protokoll_TBC.pdf

A Quantiferon-TB Gold IT teszt német pont értéke 9524. A vizsgálathoz szükséges 4 db speciális vérvételi cső a laboratóriumtól kérhető. A vizsgálat ára ezeket tartalmazza. A vizsgálatot hetente végezzük. A járóbeteg szakellátás és a fekvőbeteg gyógyintézet szakorvosa járóbeteg szakellátási tevékenység körében rendelheti.