

Szanowni Państwo,

W przededniu XV Zjazdu Polskiego
Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej
POLMEDLAB 2004 oddajemy w Państwa
ręce drugi numer Przeglądu Medycyny
Laboratoryjnej IN VITRO EXPLORER.
Kontynuujemy w ten sposób
podjętą w styczniu br. działalność na rzecz
rozwoju diagnostyki in vitro w Polsce.
Jednocześnie zapraszam wszystkich,
którzy poszukują najwyższej klasy
aparatów i odczynników do badań
hematologicznych i biochemicznych
na naszą stronę www.abx.com.pl



Marek Hendzel
Prezes
ABX Diagnostics Polska Sp. z o.o.

wrzesień 2004

SPIS TREŚCI

- 3 Związki pomiędzy zapaleniem a miażdżycą:
implikacje dla oceny zagrożenia chorobą
niedokrwioną serca i jej powikłaniami
The relationship between inflammatory processes
and atherosclerosis: implications for the assessment
of the risk of a cardiovascular disease
and its complications
Dariusz Sitkiewicz
- 11 Zespół uogólnionej odpowiedzi zapalnej (SIRS)
- problem kliniczny i laboratoryjny
Systemic inflammatory response syndrom (SIRS)
as clinical and laboratory problem
Marek Paradowski, Mariusz Szablewski***
- 19 Micros CRP - ocena pierwszego analizatora
wykonującego oznaczenia morfologii krwi z różnicowaniem
na 3 populacje leukocytów oraz stężenia CRP
Performance evaluation of the ABX Micros CRP:
The first instrument reporting a complete blood count,
3-part leukocyte differential, and C-reactive protein
quantitation
Bruce H. Davis, Nancy C. Bigelow

ZWIĄZKI POMIĘDZY ZAPALENIEM A MIAŻDŻYCĄ: IMPLIKACJE DLA OCENY ZAGROŻENIA CHOROBA NIEDOKRWIENNĄ SERCA I JEJ POWIKŁANIAM

THE RELATIONSHIP BETWEEN INFLAMMATORY PROCESSES
AND ATHEROSCLEROSIS: IMPLICATIONS FOR THE ASSESSMENT OF THE RISK
OF A CARDIOVASCULAR DISEASE AND ITS COMPLICATIONS

Dariusz Sitkiewicz

Streszczenie

Ostatnia dekada przyniosła niezbite dowody, że miażdżycę a także jej powikłania w postaci ostrych zespołów wieńcowych są procesem zapalnym. Niniejszy artykuł opisuje mechanizmy aterogenezy oraz wpływ zapalenia na destabilizację blaszki miażdżycowej. Implikacją tych odkryć jest zainteresowanie białkiem C-reaktywnym (CRP) jako markerem stanu zapalnego, a także jego rolą w mechanizmie powikłań zakrzepowych miażdżycy. Przedyskutowano również możliwość zastosowania oznaczeń hs-CRP w ocenie ryzyka zagrożenia chorobą niedokrwienną serca (prewencja pierwotna), a także w przewidywaniu wystąpienia powikłań po zabiegach angioplastyki oraz ewentualnych incydentów wieńcowych u pacjentów po zawale mięśnia serca (prewencja wtórna).

Słowa kluczowe miażdżycę, proces zapalny, białko C-reaktywne, markery stanu zapalnego.

Summary

Recent findings provide evidence for the importance of inflammatory processes in the pathogenesis of atherosclerosis either as a cause or as a consequence. How inflammation contributes to the development of atherosclerosis is unclear, but the oxidation of low-density lipoprotein (LDL), the major carrier of cholesterol in blood, is thought to play an important role in the process. These modified lipoproteins elicit immune-like reaction in the vessel wall, including stimulation of inflammatory cytokines and expression of vascular cell adhesion molecules. C-reactive protein (CRP), a sensitive marker of systemic inflammation, has emerged as a powerful predictor of cardiovascular diseases, in particular of coronary heart disease. This paper discusses the algorithm for cardiovascular risk assessment using hs-CRP concentration together with the total cholesterol: HDL-cholesterol ratio proposed by Rifai and Ridker.

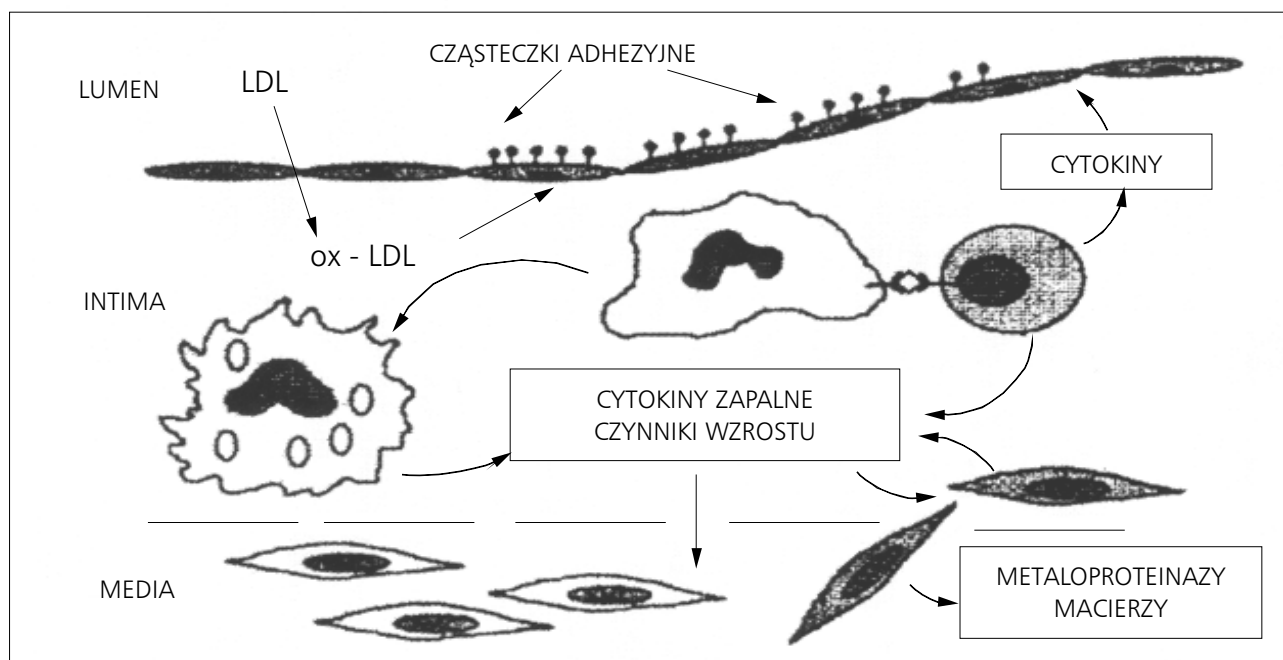
Key words atherosclerosis, inflammatory process, C-reactive protein, markers of inflammation.

Patogeneza miażdżycy

W ostatniej dekadzie ubiegłego wieku stało się oczywiste, że aterogeneza jest procesem zapalnym. Wiele publikacji potwierdziło wyraźną zależność pomiędzy stanem zapalnym a miażdżycą i jej powikłaniami w postaci ostrych zespołów wieńcowych (1). W patogenetycznym łańcuchu zdarzeń niezaprzeczalny jest także udział lipidów, stresu oksydacyjnego, mechanicznego oraz czynników prozakrzepowych i - prawdopodobnie - infekcji.

Zjawiskiem inicjującym aterogenezę jest oksydacyjna modyfikacja LDL w przestrzeni subintymalnej. Utlenione LDL stanowią bodziec zapalny wywołujący

w ścianie naczynia odpowiedź immunologiczną, polegającą na stymulacji syntezy cytokin, a także ekspresji na powierzchni komórek śródbłonna cząsteczek adhezyjnych, takich jak międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna typu 1 (ICAM-1), naczyniowa cząsteczka adhezyjna typu 1 (VCAM-1) a także białko chemotaktyczne monocytów typu 1 (MCP-1). Powoduje to, że śródbłonek staje się „lepki” i przyciąga lub wyłapuje krążące monocyty i inne komórki zapalne (2). Monocyty zatrzymane na powierzchni śródbłonna przesuwają się między dwiema komórkami i stają się makrofagami tkankowymi,



Rys. 1. Rola zapalenia w indukcji aterogenezy.

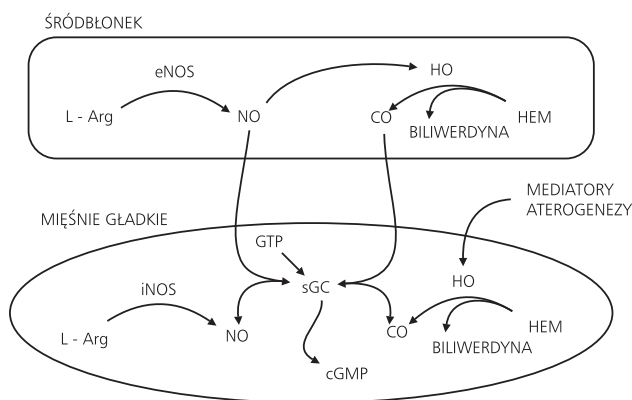
które mogą pochłaniać złoży lipidowe, tworząc komórki piankowe (rys. 1).

W miarę napływu monocytów do ściany tętnicy uszkodzenie z wyjściowego nacieczenia tłuszczowego (ang. fatty streak) przekształca się w zaawansowaną blaszkę włóknistą. Fascynujące jest pytanie, dlaczego lipoproteiny, które wnikają do intymy, wywołują odpowiedź immunologiczną? Interesującym faktem jest także to, że antygenowe białka wielu mikroorganizmów są lipoproteinami. Wykazano, że lipoproteina o ciężarze cząsteczkowym 19 kD wydzielana przez *Mycobacterium tuberculosis* stymuluje syntezę zapalnej cytokiny IL-12 w ludzkich monocytach przez aktywację receptora Toll. Receptor ten jest obecny w wielu organizmach, w tym u *Drosophila*, co sugeruje, że jest to fundamentalny mechanizm obronny, wykorzystywany od milionów lat zarówno przez kręgowce, jak i bezkręgowce. Tezę tę zdaje się potwierdzać obserwacja, że iniekcja białka szoku cieplnego z *Mycobacterium tuberculosis* myszom przyspiesza u nich rozwój miażdżycy.

Wydaje się więc uprawniona spekulacja, że stan zapalny w miażdżycy jest podstawową immunologiczną reakcją obronną przewidzianą przez naturę jako odpowiedź na inwazję mikroorganizmów. Należy dodać, że utlenienie lipoprotein można traktować jako swoisty mechanizm adaptacyjny. Niezmodyfikowane, natywne lipoproteiny są transportowane do makrofagów i innych komórek przez receptor specyficzny dla LDL. Receptor ten ulega jednak szybkiej inaktywacji (ang. down-regulation) w obecności nadmiaru LDL. Natomiast utlenione LDL są wychwytywane przez inny receptor zw. zmiatającym (ang. scavenger receptor), który nie podlega zjawisku inaktywacji. Paradoksalnie więc utlenienie LDL umożliwia makrofagom usuwanie nadmiaru lipidów z przestrzeni subintymalnej, ale zarazem indukuje proces aterogenezy, co przynosi w konsekwencji więcej szkody niż pożytku.

Częścią odpowiedzi zapalnej jest również dysfunkcja śródbłonna naczyniowego, której efektem jest upośledzenie syntezy tlenu azotu (NO). Jednym

z mechanizmów prowadzących do zmniejszonej ilości tlenu azotu jest zjawisko hamowania syntezy mRNA, kodującego enzym syntazę NO, przez lokalnie uwalniane cytokiny, jak i utlenione LDL. Innym mechanizmem jest oksydacyjna inaktywacja przez anion ponadtlenkowy powstający w nadmiarze w wielu stanach patologicznych. Niedostateczna synteza tlenu azotu, który poza silnym działaniem rozkurczającym naczynia wykazuje także właściwości antyoksydacyjne i przeciwzapalne, stwarza warunki do rozprzestrzenienia się stanu zapalnego w obrębie naczyń krwionośnych. Natura nie pozostawiła nas jednak całkowicie bezbronniymi (3). W komórkach śródbłonna, a także w komórkach mięśni gładkich znajduje się system enzymatyczny oksygenazy hemowej. System ten katalizuje reakcję utleniania hemu, w wyniku której powstaje biliwerdyna i tlenek węgla (CO). Tlenek węgla wykazuje zdolność do aktywacji rozpuszczalnej cykazy guanylowej. W wyniku tego procesu wzrasta wewnątrzkomórkowe stężenie cGMP, które powoduje relaksację mięśniówki gładkiej naczyń. Istotą tego zjawiska jest fakt, że oksygenaza hemowa jest enzymem indukowanym przez mediatory aterogenezy: utlenione LDL i cytokiny, głównie IL-1 β . Z drugiej strony biliwerdyna, jak i powstająca z niej bilirubina wykazują silne działanie przeciwutleniające (rys. 2).



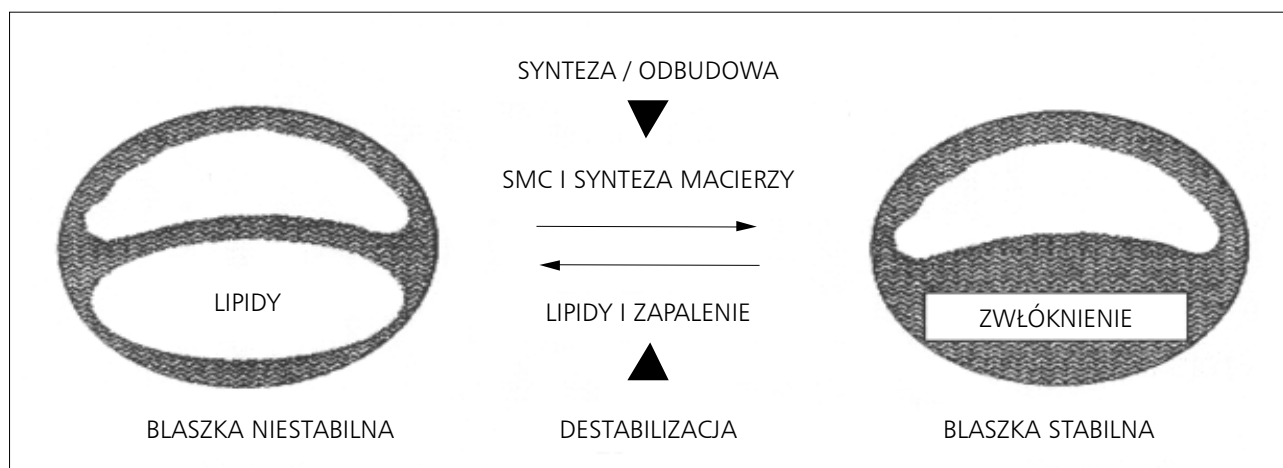
Rys. 2. Znaczenie systemów syntazy NO i oksygenazy hemowej w aterogenezie.

Zapalenie a powikłania miażdżycy

Obecnie powszechny jest pogląd, że przyczyną klinicznych powikłań miażdżycy, a zwłaszcza niestabilnej choroby wieńcowej i zawału serca jest zakrzepica poprzedzona przerwaniami ciągłości ochronnej pokrywy włóknistej blaszki miażdżycowej. Wiele danych wskazuje, że pokrywa włóknista nie jest strukturą statyczną, lecz ulega stałej dynamicznej przebudowie oraz wykazuje znaczną aktywność metaboliczną (4, 5). Równowaga pomiędzy procesami syntezy i degradacji podlega ścisłej kontroli przez mediatory stanu zapalnego, które regulują zawartość kolagenu w tych strukturach (rys. 3).

Wykazano, że limfokina interferon γ (IFN- γ) hamuje syntezę de novo śródmiaższowego kolagenu przez komórki mięśni gładkich. Cytokiny prozapalne stymulują także ekspresję enzymów: metaloproteinaz macierzy oraz śródmiaższowych kolagenaz i żelatynazy, które trawią włókna kolagenowe, odpowiadające za wytrzymałość mechaniczną pokrywy włóknistej blaszki miażdżycowej. Bodźce zapalne, takie jak cytokiny i ligandy *fas*, które wykazują nadmierną ekspresję w obrębie zmian miażdżycowych, mogą indukować złożone procesy apoptozy komórek mięśni gładkich i komórek śródbłonna naczyniowego. Utrata komórek śródbłonna może odsłonić trobogeniczną macierz podśródbłonną i być przyczyną miejscowej zakrzepicy. Niezależnie od destabilizacji blaszki miażdżycowej, mediatory zapalne mogą zmieniać szlak fibrynolizy poprzez modulację ekspresji inhibitora aktywatora plazminogenu (PAI-1), a także prozakrzepowego czynnika tkankowego.

Na przestrzeni ostatnich lat w poglądach na temat miażdżycy nastąpiła prawdziwa rewolucja - od poznania zasadniczego znaczenia hipercholesterolemii jako czynnika ryzyka miażdżycy i roli LDL w inicjacji aterogenezy, poprzez hipotezę „odpowiedzi na uszkodzenie”,



Rys. 3. Dwie podstawowe siły determinujące przebudowę blaszki miażdżycowej. SMC - komórki mięśni gładkich.

aż do obecnie formułowanego nowego paradygmatu: hipotezy zapalnej. Współczesne rozumienie miażdżycy umożliwiły badania ostatniej dekady, udawadniające kluczową rolę wnikania do ściany tętnicy komórek zapalnych, takich jak monocyty. Od kiedy zaczęto uznawać, że proces zapalny odgrywa główną rolę w patogenezie choroby niedokrwiennej serca, kardiolodzy zaczęli zadawać pytanie, czy markery zapalenia mogą być przydatne w przewidywaniu klinicznego przebiegu choroby. Już ponad dwadzieścia lat temu (w roku 1982) de Beer i wsp. po raz pierwszy wykazali, że u osób z zawałem serca dochodzi do zwiększenia stężeń białka C-reaktywnego (CRP) i że istnieje znamienna korelacja pomiędzy wartościami CRP a aktywnością kinazy kreatynowej (CKMB). Te pierwsze badania wskazały na rolę CRP jako składnika reakcji chemicznych ostrej fazy, jednak tylko nieznacznie wpłynęły na prowadzenie chorych z zawałem (6).

Białko C-reaktywne: synteza, struktura i działanie

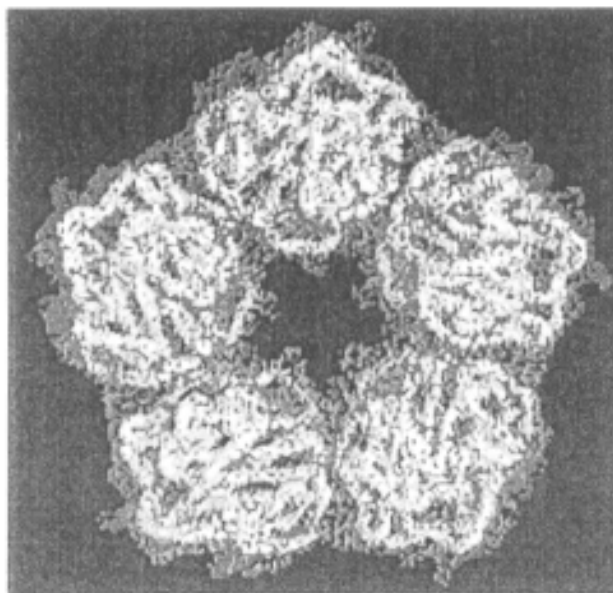
CRP wyizolowano po raz pierwszy jako białko wiążące się z polisacharydem C ściany komórkowej

pneumokoków. Składa się ono z 5 jednakowych podjednostek, rozmieszczonych na kształt pierścienia (rys. 4), z których każda zawiera 206 reszt aminokwasowych i ma masę cząsteczkową 24 kDa. Na każdej podjednostce znajdują się dwa miejsca wiążące wapń, które są jednocześnie odpowiedzialne za interakcję z podstawowym ligandem, jakim jest fosfocholina. Miejsca te są również istotne w indukowaniu przekształceń konformacyjnych, ponieważ przyłączenie jonów wapnia prowadzi do zmian powinowactwa do fosfocholiny, a także odgrywa rolę w aktywacji komplementu. Przez wiele lat CRP znano jako białko ostrej fazy, którego stężenie mogło się zwiększać 100-krotnie w ciągu 24-48 godzin trwania zapalenia. CRP powstaje głównie w komórkach wątroby i jest przez nie wydzielane w odpowiedzi na cytokiny, takie jak interleukina 6; jego okres półtrwania w osoczu wynosi 19 godzin. Badania ostatnich lat wykazały, że CRP jest nie tylko markerem ostrego stanu zapalnego, ale może uczestniczyć we wzmacnianiu odpowiedzi immunologicznej, powodując dalsze uszkodzenie tkanek (7). Obecnie wiadomo, że CRP wiąże się z uszkodzonymi tkankami, antygenami jądrowymi, lipoproteinami oraz fragmentami komórek, które uległy apoptozie.

Interesujące jest, że CRP występuje w blaszce miażdżycowej, podczas gdy nie ma go w prawidłowej ścianie naczyń. Gromadzenie CRP w blaszkach miażdżycowych wyprzedza prawdopodobnie pojawienie się monocytów. Ostatnio udowodniono, że CRP może wzbudzać ekspresję cząsteczek adhezyjnych i chemokin w komórkach ludzkiego śródbłona. Dane te wskazują jednoznacznie, że CRP jest nie tylko znacznikiem, ale również wzmacniaczem zapalenia i odgrywa prawdopodobnie znaczącą rolę w patogenetycznym łańcuchu zdarzeń prowadzących do ostrych stanów wieńcowych (8).

Kliniczne znaczenie CRP

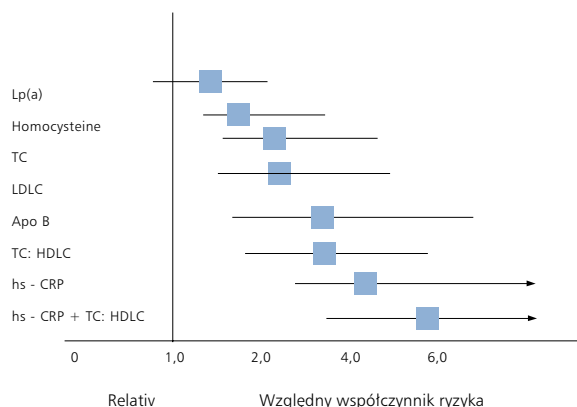
Kliniczne zastosowanie oznaczeń stężeń CRP sprowadzało się w przeszłości do diagnostyki, monitorowania i rokowania w wielu chorobach o ostrym przebiegu i było traktowane jako „chemiczny” odpowiednik szybkości opadania krwinek czerwonych (OB). Wynikało to z powszechnego poglądu, że stężenia CRP poniżej 10 mg/l nie mają istotnego znaczenia klinicznego. Ponadto większość dostępnych wówczas testów diagnostycznych nie pozwalała oznaczyć CRP poniżej tego stężenia. Dopiero opracowanie czułych testów wykorzystujących technikę immunonefelometryczną ze wzmocnieniem lateksowym (hs-CRP) pozwoliło na precyzyjne oznaczanie bardzo niskich stężeń tego białka rzędu 0,05-0,1 mg/l. Spowodowało to ogromne zainteresowanie CRP jako wskaźnikiem niewielkiego, miejscowego, długotrwałego stanu zapalnego, a więc procesu, który toczy się w ścianie naczyniowej i prowadzi do miażdżycy i jej powikłań. Fakty te legły u podstaw wielu dużych prospektywnych badań epidemiologicznych nad związkiem pomiędzy CRP a ryzykiem rozwoju choroby niedokrwiennej serca (prewencja pierwotna) oraz rokowaniem u pacjentów po przebytym zawale



Rys. 4. Struktura cząsteczki białka C-reaktywnego

mięśnia sercowego (prewencja wtórna) (9,10). Wyniki tych badań potwierdziły jednoznacznie prognostyczną wartość CRP w odniesieniu do chorób sercowo-naczyniowych. Dowiodły one, że podwyższone stężenia CRP są niezależnym czynnikiem ryzyka zawału serca, udaru mózgu, miażdżycy tętnic obwodowych oraz zgonów sercowych u osób bez klinicznych objawów chorób układu krążenia. Okazało się także, że CRP zwiększa wartość prognostyczną innych klasycznych czynników ryzyka, w tym przede wszystkim lipidowych (rys. 5).

Dane uzyskane w badaniach Physician's Health Study (PHS) wskazują, że mężczyźni bez objawów choroby niedokrwiennej serca, u których stężenie CRP znajduje się w najwyższym kwartyle, są narażeni na dwu-, trzy- a nawet czterokrotnie większe ryzyko wystąpienia udaru, zawału i chorób naczyń obwodowych niż mężczyźni ze stężeniem CRP w najniższym kwartyle. Podobne rezultaty uzyskano również w badaniach Women's Health Study, (WHS). Wyniki obu tych badań stały się podstawą zaproponowanego przez Rafai i Ridkera algorytmu oceny ryzyka wieńcowego uwzględniającego stężenie CRP



Rys. 5. Względny współczynnik ryzyka przyszłych incydentów wieńcowych w zależności od podstawowego stężenia różnych czynników ryzyka.

i stosunek cholesterolu całkowitego (TC) do cholesterolu HDL (HDL) (11). Na podstawie badań PHS i WHS utworzono pięć przedziałów (kwintyli) zarówno dla hs-CRP, jak i stosunku TC/HDL (tabela I).

Algorytm zakłada przyporządkowanie uzyskanych od indywidualnego pacjenta wyników do odpowiedniego kwintyla i następnie ocenienie względnego ryzyka wystąpienia choroby niedokrwiennej serca (tabela II). W prewencji pierwotnej proponowany poziom decyzyjny dla CRP wynosi 2,1 mg/l. Powstają jednak pytania: 1) jak często oznaczać poziom CRP i 2) jak wykluczyć wpływ niewielkich infekcji i stanów

zapalnych. Na podstawie dotychczasowych doświadczeń rekomendowane jest następujące postępowanie: jeżeli otrzymany wynik oznaczenia znajduje się poniżej poziomu decyzyjnego, może on być akceptowany i służyć do oceny ryzyka. W przypadku otrzymania wyniku przekraczającego poziom decyzyjny, badanie powinno być powtórzone po okresie 3 do 6 tygodni. Sugeruje się również, że CRP ma wartość prognostyczną we wtórnej prewencji u pacjentów z niestabilną chorobą wieńcową (12). Okazało się, że łączne oznaczenie CRP i troponiny (cTnT lub cTnI) dostarcza wielu istotnych informacji dotyczących zarówno aktywności toczącego się procesu zapalnego, jak i rozległości martwicy miokardium. Oznaczenie stężenia CRP wydaje się szczególnie istotne u pacjentów z prawidłowym poziomem troponiny. Z klinicznego punktu widzenia wydaje się, że wykluczenie wysokiego ryzyka jest bardziej istotne niż identyfikacja pacjentów obarczonych takim ryzykiem. Z dotychczasowych badań wynika bowiem, że u 100% pacjentów zarówno CRP-negatywnych (stężenie CRP < 5 mg/l) jak i troponino-negatywnych (cTnI < 0,4 µg/l) nie wystąpiły żadne incydenty wieńcowe w okresie 6 miesięcy

Tabela I. Rozkład stężeń hs-CRP i stosunku TC/HDL.

KWINTYL	hs-CRP	TC/HDL (KOBIECY)	TC/HDL (MĘŻCZYŹNI)
1	0,1 - 0,7	< 3,4	< 3,4
2	0,7 - 1,1	3,4 - 4,1	3,4 - 4,0
3	1,2 - 1,9	4,1 - 4,7	4,0 - 4,7
4	2,0 - 3,8	4,7 - 5,8	4,7 - 5,5
5	3,9 - 15,0	> 5,8	> 5,5

Tabela II. Względne ryzyko wystąpienia incydentów wieńcowych.

KWINTYLE TC/HDL	KWINTYLE hs-CRP				
	1	2	3	4	5
1	1	1,2	1,4	1,7	2,2
2	1,4	1,7	2,1	2,5	3,0
3	2,0	2,5	2,9	3,5	4,2
4	2,9	3,5	4,2	5,1	6,0
5	4,2	5,0	6,0	7,2	8,7

obserwacji po przebytych zawale mięśnia serca.

Ukazują się również doniesienia, że wyjściowe stężenie CRP pozwala przewidzieć wystąpienie powikłań po zabiegu angioplastyki wieńcowej (13). Zwiększone wyjściowe stężenie CRP jest zwiastunem podwyższonego ryzyka wystąpieniu zgonu lub zawału serca w ciągu 30 dni po przezskórnej interwencji wieńcowej.

Mimo licznych dowodów na udział CRP w patogenezie miażdżycy, wielu badaczy kwestionuje użyteczność tego białka jako markera w ocenie ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Podnoszone są dwie podstawowe kwestie: 1) brak jednoznacznych wartości referencyjnych oraz 2) zdolność testu do różnicowania osób zdrowych od pacjentów z chorobą niedokrwienną. Poziom CRP jest zależny od bardzo wielu czynników, takich jak: wiek, płeć, otyłość, palenie papierosów, a także ulega znacznemu podwyższeniu u kobiet poddawanych hormonalnej terapii zastępczej. Fakty te są powodem stosowania w ocenie ryzyka kwintyli, a nie stężenia CRP, co znacznie ogranicza wartość diagnostyczną tego testu.

Coraz więcej uwagi zwraca się więc na zależność pomiędzy stanem zapalnym a zdolnością do utleniania lipoprotein o niskiej gęstości (LDL).

Szczegółowy mechanizm prowadzący do przemiany LDL w ich aterogenną postać nie jest do końca poznany. Zakwestionowano nawet „oksydacyjną hipotezę”, ponieważ w wielu badaniach klinicznych nie stwierdzono efektywności α - tokoferolu (wit. E) w ograniczaniu procesu utleniania LDL (14). Jednocześnie badacze skierowali swoje zainteresowanie na inne reakcje, które mogłyby być odpowiedzialne za oksydacyjną modyfikację LDL, na przykład na leukocytarną mieloperoksydazę (MPO). Katalizowana przez MPO reakcja jest podstawowym składnikiem odpowiedzi na stan zapalny; jest to generacja reaktywnych form tlenu, których funkcją jest silne działanie antybakteryjne. Coraz liczniejsze doniesienia wskazują, że reakcja katalizowana przez MPO jest także podstawowym mechanizmem utleniania LDL, niezależnym od potencjału antyoksydacyjnego, co tłumaczy brak efektu suplementacji wit. E (15). Wykazano ponadto zależność pomiędzy aktywnością mieloperoksydazy zarówno w leukocytach, jak i w pełnej krwi, a występowaniem choroby wieńcowej (16). Tak, więc wydaje się, że MPO może obrazować narażenie na chorobę niedokrwienną serca niezależnie od innych markerów zapalnych, takich jak CRP, liczba leukocytów czy fibrynogen.

Prof. dr hab. Dariusz Sitkiewicz

Zakład Biochemii Klinicznej

Instytut Kardiologii

Im. Prymasa Tysiąclecia Stefana Kardynała Wyszyńskiego

Warszawa

e-mail: dsitkiewicz@ikard.waw.pl

Piśmiennictwo:

1. Epstein F.H., Atherosclerosis - an inflammatory disease. N. Engl. J. Med., 1999, 340, 115 - 126.
2. van der Wal A.C., Becker A.E., Atherosclerotic plaque rupture - pathologic basis of plaque stability and instability. Cardiovasc. Res., 1999, 41, 334 - 344.
3. Siow R.C.M., Sato H., Mann G.E., Heme oxygenase-carbon monoxide signaling pathway in atherosclerosis: anti-atherogenic actions of bilirubine and carbon monoxide? Cardiovasc. Res., 1999, 41, 385 - 394.
4. Libby P., Molecular bases of the acute coronary syndromes., Circulation, 1995, 91, 2844 - 2850.
5. Davies M.J., Stability and instability: Two faces of coronary atherosclerosis. Circulation, 1996, 94, 2013 - 2020.
6. de Berr F.C., Hind C.R., Fox K.M. et al., Measurement of serum C-reactive protein concentration in myocardial ischemia and infarction., Br. Heart J., 1982, 47, 239 - 243.
7. Sladen H.F.H., C-reactive protein, inflammation and atherosclerosis: do we really understand it yet? Eur. Heart J., 2000, 21, 958 - 960.
8. Pascari V., Willerson J.E., Yeh E.T., Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. Circulation, 2000, 102, 2165 - 2168.
9. Tataru M.C., Heinrich J., Junker R. et al., C-reactive protein and the severity of atherosclerosis in myocardial infarction patients with stable angina pectoris. Eur. Heart J., 2000, 21, 1000 - 1008.
10. Azar R.R., Waters D.D., PRINCE's prospects: Statins, inflammation, and coronary risk. Am. Heart J., 2001, 141, 881 - 883.
11. Rafii N., Ridker P.M., Proposed cardiovascular risk assessment algorithm using high-sensitivity C-reactive protein and lipid screening. Clin. Chem., 2001, 47, 28 - 30.
12. Lindahl B., Toss H., Siegbahn A. et al., Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. N. Engl. J. Med. 2000, 343, 1139 - 1147.
13. Chew D.P., Bhatt D.L., Robbins M.A. et al., Incremental prognostic value of elevated baseline C-reactive protein among established marker of risk in percutaneous coronary intervention. Circulation, 2001, 104, 992 - 997.
14. Heinecke J.W., Is the emperor wearing clothes? Clinical trials of vitamin E and the LDL oxidation hypothesis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2001, 21, 1261 - 1264.
15. Carr A.C., McCall M.R., Frei B., Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species. Reaction pathways and antioxidant protection. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2000, 20, 1716 - 1723.
16. Zhang R., Brennan M.L., Fu X. et al. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. JAMA, 2001, 286, 2136 - 2142.

ZESPÓŁ UOGÓLNIONEJ ODPOWIEDZI ZAPALNEJ (SIRS) - PROBLEM KLINICZNY I LABORATORYJNY

SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE SYNDROM (SIRS) AS CLINICAL AND LABORATORY PROBLEM

Marek Paradowski*, Mariusz Szablewski**

Streszczenie

Wobec mało charakterystycznych w początkowej fazie objawów klinicznych w przebiegu SIRS (zmiana temperatury ciała, częstości tętna, oddechów, miejscowe objawy zakażenia), omówiono zastosowanie badań laboratoryjnych określających aktualny stan odpowiedzi immunologicznej organizmu, w tym między innymi cytokiny, białka ostrej fazy, a także nowy marker, jakim jest prokalcytonina (PCT).

Aktualnie najszerzej stosowane i oznaczane rutynowo parametry laboratoryjne stanu zapalnego to liczba krwinek białych, OB i CRP. Są one jednak mało swoiste. Podobnie najnowsze markery reakcji zapalnej, jak interleukiny, białka układu dopełniacza, SAA, TNF- alfa czy neopteryna, pomimo udowodnionej przydatności klinicznej również należą do nieswoistych. Ze względu na ograniczoną dostępność aparatury i wysoki koszt oznaczenia nie znajdują zastosowania w rutynowych procedurach medycznych. Dlatego też stale podejmowane są próby znalezienia nowych, bardziej swoistych parametrów, które ułatwiłyby diagnostykę i monitorowanie uogólnionych odpowiedzi zapalnych.

Nowym parametrem, budzącym duże nadzieje jako marker układowej odpowiedzi zapalnej jest PCT. Omówiono strukturę molekularną, miejsce, mechanizmy indukcji biosyntezy, oraz kluczowe właściwości PCT. Analiza dostępnego piśmiennictwa ukazuje PCT jako parametr nie do końca poznany. Nie zostało precyzyjnie określone miejsce, ani mechanizm indukcji jej syntezy. Nieznana jest również rola PCT w patofizjologii odczynu zapalnego. W praktyce PCT znalazła już uznanie jako marker o dużej wartości we wczesnej diagnostyce, jak i w monitorowaniu przebiegu i leczenia ostrych układowych infekcji bakteryjnych u chorych manifestujących objawy SIRS.

Słowa kluczowe SIRS, odpowiedź ostrej fazy, posocznica, cytokiny prozapalne, prokalcytonina.

Summary

As the clinical symptoms of SIRS (changes in body temperature, heart rate, local inflammatory response) are not very typical especially at the developing stage, the possibility of using the laboratory markers like acute phase reactants, cytokines and also a new marker - serum procalcitonin to assess the immunological state is presented. Actually used and generally accepted laboratory parameters WBC, ESR and CRP are not specific ones. The other, new inflammatory markers like interleukins, SAA, complement, TNF-alfa, neopterin were proved to be useful, but also show lack of specificity and besides of it their measurements are expensive and not suitable for routine medical procedures. Therefore the attention is focused on finding new markers helpful in diagnosis and monitoring generalized inflammatory response. Preliminary studies show that procalcitonin (PCT) seems to be a good candidate. In spite of not knowing in details either the way of its synthesis induction or pathomechanism in inflammatory response there are several evidence of its role in early diagnosis and monitoring acute systemic inflammatory bacterial infection in patients with SIRS.

Key words SIRS, acute phase response proinflammatory cytokines, sepsis, procalcitonin.

Zespół uogólnionej odpowiedzi zapalnej (Systemic Inflammatory Response Syndrom - SIRS) jest określany zgodnie z zaleceniami ACCP/SCCM (American College Chest Physicians i Society of Critical Care Medicine) jako odpowiedź kliniczna na działanie bodźców zewnętrznych, charakteryzująca się minimum dwiema spośród następujących cech (1, 7, 20, 27):

- gorączka lub hipotermia (temperatura ciała $> 38,4^{\circ}\text{C}$ lub $< 36^{\circ}\text{C}$).
- tachykardia (akcja serca > 90 uderzeń/min.)

- tachypnoe (częstość oddechów/praca respiratora powyżej 20/min) lub hiperwentylacja ($\text{Pa CO}_2 < 32 \text{ mmHg}$)
- leukocytoza $> 12,0 \text{ G/L}$ lub leukopenia $< 4 \text{ G/L}$ z obecnością 10% niedojrzałych komórek.

SIRS u pacjentów oddziałów intensywnej terapii (OIOM) jest zjawiskiem częstym. Pomimo tego, że wśród chorych manifestujących objawy SIRS zakażenie potwierdza się tylko u 25-50%, infekcje stanowią poważny problem tak kliniczny, jak i epidemiologiczny chorych w stanie krytycznym.

Jak wynika z dostępnych w piśmiennictwie danych, zakażenia bakteryjne dotyczą około 40-50 % pacjentów OIOM (2, 18, 19, 23, 24, 26). Ocena zagrożeń infekcyjnych w OIOM, przeprowadzona na początku lat 90 XX wieku jednocześnie w 1417 oddziałach 17 krajów Europy Zachodniej (European Prevalence of Infection in Intensive Care - EPIC), wykazała, iż 44,8% hospitalizowanych stanowili chorzy, u których stwierdzono infekcję, w tym 20,6% chorych z cechami infekcji oddziałowej (24).

Tak wysoki odsetek zakażeń w OIOM związany jest ściśle ze specyfiką tych placówek, gdzie z założenia hospitalizowani są chorzy w stanach ciężkich, krytycznych. Główne elementy zagrożenia epidemiologicznego w OIOM to:

- pierwotnie ciężki stan hospitalizowanych
- stosowane sposoby leczenia i monitorowania chorego
- szczególne cechy oddziałowej flory bakteryjnej (wysoka oporność na leki przeciwbakteryjne)
- długi czas pobytu chorych w OIOM - kolonizacja górnych odcinków dróg oddechowych i przewodu pokarmowego przez potencjalnie chorobotwórcze szczepy bakteryjne (26).

Ze względu na szczególnie wysoki stopień zagrożenia epidemiologicznego, pojawienie się objawów uogólnionej odpowiedzi zapalnej u chorych oddziałów intensywnej opieki medycznej jest niejednokrotnie pierwszym zwiastunem rozwijającej się posocznicy (*septicaemia*), określanej jako choroba układowa, spowodowana rozprzestrzenianiem się mikroorganizmów i ich toksyn drogą krwi, lub zespołu septycznego (*septic syndrome*), charakteryzującego się dodatkowo upośledzoną perfuzją narządów, prowadzącą do zaburzeń ich czynności (18, 23, 26).

Potwierdzenie etiologii infekcyjnej SIRS wymaga przestrzegania precyzyjnie określonych definicji jako kryteriów diagnostycznych zakażeń (definicje klinicznych postaci zakażeń wg CDC - Centre Disease Control, definicje zakażenia szpitalnego wg WHO, definicje zakażeń krwi wg American College Chest Physicians) (1, 7, 18, 20).

Posocznica z towarzyszącymi zaburzeniami funkcji jednego lub więcej narządów lub układów, oraz z objawami hipoperfuzji narządowej definiowana jest jako ciężka posocznica. Przyczyną tych zaburzeń jest rozległa uogólniona reakcja zapalna, przeważająca nad fizjologicznymi mechanizmami obronnymi organizmu.

Wykładniki ciężkiej posocznicy, stosownie do kryteriów ACCP/SCCM (1, 7, 18, 20, 27):

- objawy dysfunkcji narządowej:
 - hipoksemia tętnicza - $\text{PaO}_2 < / = 70 \text{ mmHg}$ lub $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 < 280$
 - oliguria $< 0,5 \text{ ml/kg/h}$ lub 700 ml/24 h
 - kwasica - podwyższone stężenie mleczanów lub niewyjaśniona kwasica metaboliczna z $\text{pH} < 7,3$ lub $\text{BE} > / = -5 \text{ mEq/l}$
 - hipotensja - ciśnienie tętnicze skurczowe $< 90 \text{ mmHg}$ lub spadek ciśnienia skurczowego o 40 mmHg od wartości wyjściowej
 - koagulopatia - wzrost PT $> / = 20\%$ lub spadek liczby płytek krwi $< 100 \times 10^9/\text{l}$

Dysfunkcja wielonarządowa najczęściej pogłębia się i przechodzi w niewydolność wielonarządową (multiple organ failure, MOF). Niewydolność najczęściej dotyczy następujących narządów i układów:

- płuca - zespół ostrej niewydolności oddechowej
- nerki - ostra martwica cewek nerkowych
- ośrodkowy układ nerwowy - encefalopatia metaboliczna
- układ krzepnięcia - zespół rozsianego krzepnięcia wewnątrznaczyniowego - DIC
- układ krążenia - hiperdynamiczny spadek ciśnienia krwi
- przewód pokarmowy - porażenie żołądka, niedrożność jelit
- wątroba - ostre niezakaźne zapalenie wątroby
- nadnercza - ostra niewydolność nadnerczy
- mięśnie szkieletowe - rhabdomyoliza

Pojawienie się w przebiegu posocznicy lub ciężkiej posocznicy głębokich zaburzeń hemodynamicznych

(hipotensji tętniczej) opornych na przetaczanie płynów, i wymagających zastosowania wazopresorów, pozwala na rozpoznanie wstrząsu septycznego (1, 7, 18, 19, 20, 23).

Do najczęstszych źródeł uogólnionych zakażeń można zaliczyć następujące stany kliniczne:

- Infekcje dróg oddechowych, prowadzące w konsekwencji do zapalenia płuc. Zakażenie ma najczęściej charakter bakteryjny. Zaburzenia odporności mogą powodować również pojawienie się drożdżaków *Candida sp.* oraz infekcji wirusowych. Główny problem w tego typu zakażeniach stanowi jego rozpoznanie i identyfikacja patogenu.
- Zakażenia układu moczowego stanowią 30 do 40% infekcji szpitalnych. Cewnikowanie pęcherza moczowego uznawane jest za główny czynnik sprzyjający. Ustalenie rozpoznania u tych pacjentów jest stosunkowo trudne. Ropomocz lub bakteriomocz w przypadkach, gdy cewnik jest założony na okres powyżej 4 tygodni, jest objawem stałym, co zmniejsza w sposób zasadniczy znaczenie diagnostyczne posiewu i badania mikroskopowego moczu (23, 24).
- Infekcje krwi; ich częstość występowania oceniana jest na 8 - 10% wszystkich zakażeń szpitalnych. W OIOM infekcje krwi występują 5-7 razy częściej niż w innych oddziałach, przy czym ocenia się, że około 30-50% przypadków jest wynikiem zakażenia przedszpitalnego. Za główne czynniki sprzyjające uważa się ciężką chorobę zasadniczą, wiek powyżej 65 lat i poniżej 1 roku, cewnikowanie naczyń, przedłużoną hospitalizację, kontaminację leków, preparatów krwiopochodnych i płynów infuzyjnych. Śmiertelność z powodu zakażeń krwi waha się w granicach 10-50%. Trudności diagnostyczne wynikają z faktu, iż ponad 50% przypadków posiewów krwi daje wynik ujemny lub niemiarodajny (25).
- Infekcje wywodzące się z przewodu pokarmowego. Przewód pokarmowy stanowi poważne potencjalne źródło zakażeń u chorych w stanie ciężkim. Leczenie preparatami obniżającymi kwasowość soku

żołądkowego oraz przewlekła antybiotykoterapia prowadzą do namnożenia się patogennych drobnoustrojów w świetle górnego i dolnego odcinka przewodu pokarmowego. Zapalenie okrężnicy, zapalenie otrzewnej, ropnie w obrębie jamy brzusznej, niekamicze zapalenie pęcherzyka żółciowego czy septyczna martwica trzustki są stosunkowo częstymi postaciami klinicznymi zakażeń, wywołanych przez patogenną florę bakteryjną, kolonizującą przewód pokarmowy i w konsekwencji wnikającymi proces leczenia choroby zasadniczej. Diagnostyka infekcji wywodzących się z przewodu pokarmowego jest szczególnie trudna u pacjentów po urazach wielonarządowych czy po zabiegach chirurgicznych w obrębie jamy brzusznej, gdyż chorzy ci manifestują objawy uogólnionej reakcji zapalnej SIRS od momentu zadziałania fizycznego czynnika uszkadzającego (25).

Złożony obraz kliniczny SIRS, często połączony z zaburzeniami wielonarządowymi, utrudnia wczesne rozpoznanie infekcji i identyfikację odpowiedzialnego za nią mikroorganizmu. Większość chorych OIOM prezentuje objawy SIRS, którego przyczynę stanowić mogą zarówno urazy, choroba nowotworowa, poważne zaburzenia krążenia i oddychania, jak i zakażenia bakteryjne. Tylko wczesne rozpoznanie rozwijającego się zakażenia pozwala na szybkie wdrożenie odpowiedniego postępowania terapeutycznego. W takich stanach klinicznych, jak zespół niewydolności oddechowej u dorosłych, zapalenie trzustki, zespół niewydolności wielonarządowej, czy wstrząs septyczny - tylko jednoznaczne potwierdzenie bakteryjnej etiologii pozwala na podjęcie decyzji o włączeniu złożonej antybiotykoterapii lub wczesnej interwencji chirurgicznej (18, 24, 27).

Wobec mało charakterystycznych objawów klinicznych SIRS szczególnie w początkowej fazie (zmiana temperatury ciała, częstości tętna, oddechów, miejscowe objawy zakażenia), istotne znaczenie dla jego rozpoznania przypisuje się badaniom laboratoryjnym, określającym aktualny stan odpowiedzi

immunologicznej organizmu, do których można zaliczyć w tym między innymi cytokiny, białka ostrej fazy, a także nowy marker, jakim jest prokalcytonina.

Cytokiny prozapalne:

Neopteryna jest związkami należącym do pteryn, wyizolowanym po raz pierwszy w 1963 r. z larw pszczoł, dorosłych pszczoł oraz meduzy królewskiej. Syntetyzowana jest z trójfosforanu guanozyny (GTP), produkowana przez monocyty/makrofagi, komórki endotelium. W diagnostyce laboratoryjnej wykorzystuje się jej oznaczanie w surowicy i w moczu. Możliwe jest także oznaczanie neopteryny w płynie mózgowo-rdzeniowym, otrzewnowym, opłucnowym i wydzielinie z pochwy. Wzrost poziomu neopteryny obserwuje się w infekcjach bakteryjnych G(+) i G(-), wirusowych i pierwotniakowych (4, 21).

Kachektyna (TNF- α), czynnik martwicy nowotworów jest polipeptydem uwalnianym przez makrofagi i granulocyty w reakcji na różne bodźce, zarówno infekcyjne, jak i inne prozapalne. W przebiegu zakażeń głównym czynnikiem indukującym TNF- α są toksyny: endotoksyna, enterotoksyna, mykotoksyny. Biologiczne efekty infuzji TNF- α i endotoksyny są identyczne. TNF- α stymuluje syntezę interleukin IL-1 i IL-6, czyli dwóch innych ważnych mediatorów reakcji zapalnej. TNF- α nasila adhezję granulocytów obojętnochłonnych do śródbłonna naczyniowego przez uwrażliwienie receptorów neutrofilowych na fragment C3 dopełniacza oraz przez aktywację molekuł adhezyjnych (VCAM-1, ICAM-1) (3).

Interleukiny; w praktyce klinicznej najczęstsze zastosowanie znajduje oznaczanie stężeń IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10. Interleukiny produkowane są pod wpływem licznych mediatorów (TNF- α , LPS, egzotoksyny) przez makrofagi i granulocyty. IL-6 i IL-1 indukują syntezę białek ostrej fazy. Obie interleukiny i TNF- α wywierają ujemny efekt inotropowy na myokardium.

W badaniach doświadczalnych IL-6 indukowana endotoksyną osiąga maksymalne stężenie we krwi już po 3 godzinach. Jej stężenie powraca do wartości wyjściowych po około 8 godzinach (13).

Białka ostrej fazy

Reakcja ostrej fazy (rys.1) jest wczesnym, nieswoistym odczynem organizmu na bodźce szkodliwe (uraz mechaniczny, termiczny, martwicę tkanek, zakażenie), w wyniku którego pod wpływem IL-6 indukowanej przez IL-1 i TNF- α , następuje wzrost stężeń białek ostrej fazy (13). Główną rolą tych białek jest umożliwienie organizmowi szybkiego odzyskania zachwianej hemostazy poprzez:

- stymulację procesów naprawczych i odtwórczych,
 - oddziaływanie immunosupresyjne na limfocyty T i B
 - hamowanie aktywności enzymów proteolitycznych.
- Oznaczenia białek ostrej fazy znalazły zastosowanie do:
- oceny rozwoju i aktywności zapalenia i infekcji bakteryjnej
 - monitorowania przebiegu uogólnionych zapażeń i infekcji bakteryjnych
 - różnicowania infekcji bakteryjnych i wirusowych
 - kontroli odpowiedzi organizmu na leczenie
 - prognozowania przebiegu choroby.

Białka ostrej fazy można podzielić na grupy w zależności od intensywności zmian (wzrostu lub spadku) ich stężeń.

Grupa A - bardzo silne (spektakularne) białka ostrej fazy: białko C-reaktywne, białko amyloidowe A, których stężenie wzrasta 20-100 razy i więcej w porównaniu z wartościami w stanie zdrowia, charakteryzuje je krótki okres półtrwania około 20 h.

- Białko C-reaktywne (CRP) to glikoproteina, która wykazuje zdolność unieczynniania polisacharydu C pneumokoków. Znaczny wzrost jego stężenia obserwowany jest już w pierwszej dobie uszkodzenia tkanek. CRP bierze udział w klasycznej drodze aktywacji układu dopełniacza (procesy opsonizacji, fagocytozy,

lizy obcych komórek) (12). CRP jest uznanym parametrem laboratoryjnym wykorzystywanym rutynowo we wstępnej diagnostyce odczynów zapalnych, jak również w monitorowaniu ich przebiegu (5, 11, 13, 15). Zwiększone stężenie CRP we krwi pojawia się znacznie wcześniej niż tradycyjny parametr: szybkość opadania krwinek, czyli odczyn Biernackiego (OB). Test CRP jest bardziej czuły i powraca do wartości uznanych za prawidłowe szybciej niż OB. Na wartość stężenia CRP we krwi nie mają wpływu takie czynniki, jak hematokryt, zmiany w stężeniach białek surowicy, choroby wątroby, anomalie w zakresie budowy erytrocytów, wiek czy płeć. CRP jest jednak - podobnie jak pozostałe białka ostrej fazy - parametrem o niedostatecznej swoistości, reagującym zarówno na czynniki infekcyjne, jak i inne prozapalne (5, 11, 16).

W praktyce znalazły zastosowanie zbiory wyników kilku białek ostrej fazy dla wyznaczenia różnicującej, bardziej użytecznej klinicznie wartości odcinającej (17).

- Białko amyloidowe A (SAA) wykazuje duże podobieństwo do CRP w dynamice narastania stężeń w wyniku reakcji ostrej fazy. SAA jest równie czułym markerem reakcji zapalnej jak CRP. Jest nie tylko markerem reakcji ostrej fazy, ale również apolipoproteiną (apoSAA), której funkcja jest związana z metabolizmem HDL. SAA odgrywa także rolę chemoatraktanta, powodując migrację monocytów do blaszki miażdżycowej, co sugeruje możliwą rolę apoSAA w patogenezie miażdżycy. SAA ma zdolność hamowania agregacji płytek oraz indukcji adhezji leukocytów i płytek krwi.

Grupa B - silne białka ostrej fazy, których stężenie wzrasta 2-5 razy: α_1 -kwaśna glikoproteina (AAG), α_1 -antytrypsyna (AAT), fibrynogen (FBG), haptoglobina (HPT). Okres półtrwania jest dłuższy niż dla białek z grupy A i wynosi 2-3 dni.

- α_1 -kwaśna glikoproteina (orozomukoid, AAG) - białko kwaśne o dużej zawartości reszt glikozydowych,

odpowiedzialne za wiązanie i transport reszt progesteronu. W stanach zapalnych stężenie orozomukoidu wzrasta powoli - około 5 dni. Na ogół obserwuje się maksymalnie 2-3-krotny wzrost.

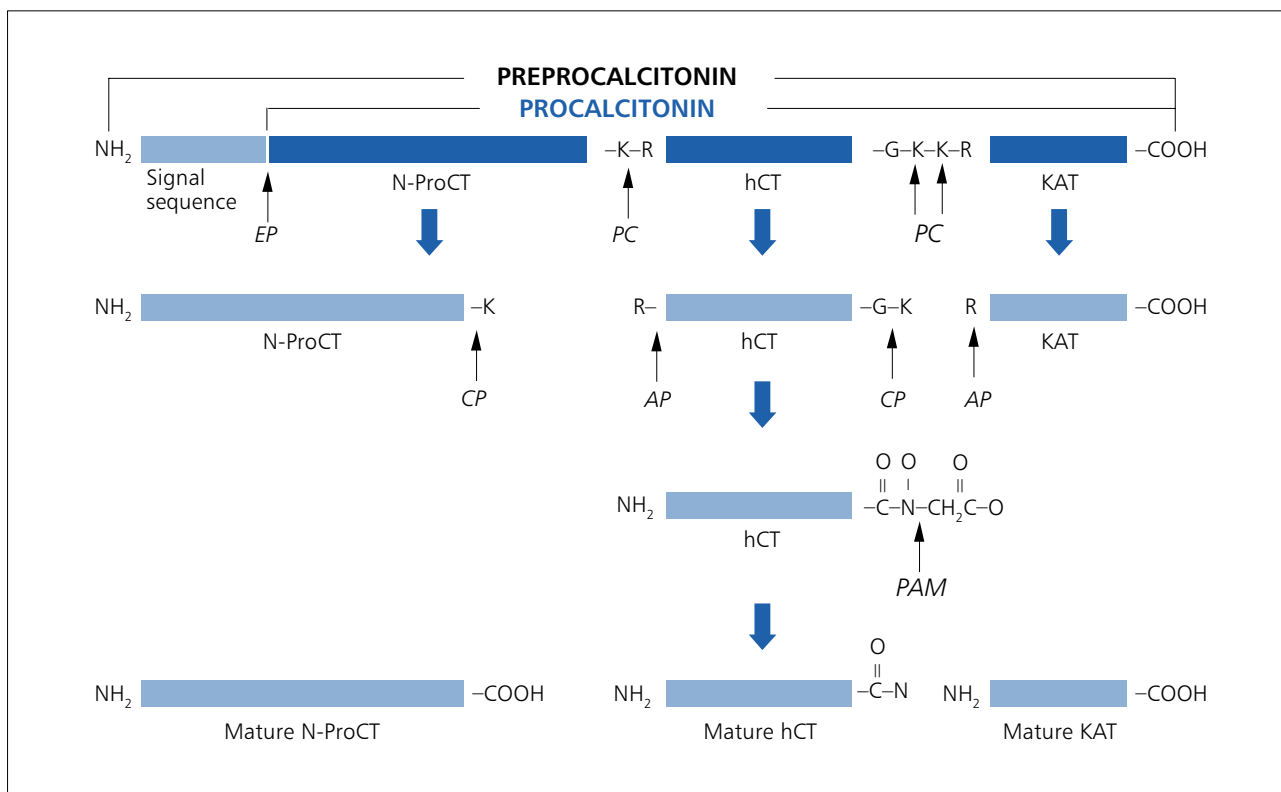
- α_1 -antytrypsyna (AAT) - białko ostrej fazy o właściwościach inhibitora proteaz. Wykazuje 90% całkowitej aktywności antytrypsynowej osocza. W stanach zapalnych poziom AAT wzrasta max. 4-krotnie powyżej górnego zakresu wartości prawidłowych między 2-4 dniem. α_1 -antytrypsyna hamuje destrukcję tkanek przez unieczynnianie substancji uwalnianych z aktywowanych granulocytów wielojądrzastych. Hamuje destrukcję kolagenu, aktywację krzepnięcia i fibrylizacji, aktywację kinin i komplementu. Wykazuje uwarunkowane genetycznie, zróżnicowanie fenotypowe. Najsilniej wyrażoną aktywność antyproteazową wykazuje fenotyp MM występujący u 95% populacji.

Grupa C - słabe białka ostrej fazy, których wzrost podczas procesu zapalnego nie przekracza dwukrotnie wartości stężeń przyjętych za prawidłowe; okres półtrwania wynosi 48-72 h: ceruloplazmina, składnik C3 i C4 dopełniacza, α_2 -antyplazmina.

Grupa D - obojętne białka ostrej fazy, których stężenie nie zmienia się istotnie w początkowej fazie procesu zapalnego: α_2 -makroglobulina, immunoglobuliny.

Grupa E - ujemne białka ostrej fazy, których stężenie spada w wyniku procesu zapalnego: albuminy, transferyna, prealbumina.

Aktualnie najszerzej stosowane i oznaczane rutynowo parametry laboratoryjne stanu zapalnego to liczba krwinek białych, OB i CRP. Są one jednak mało swoiste. Podobnie najnowsze markery reakcji zapalnej, jak interleukiny, białka układu dopełniacza, SAA, TNF- α czy neopteryna, pomimo udowodnionej przydatności klinicznej również należą do nieswoistych. Ze względu na ograniczoną dostępność aparatury i wysoki koszt oznaczenia nie znajdują zastosowania w rutynowych procedurach medycznych.



EP - endopeptydaza
 PC - konwertaza prohormonu
 CP - karboksypeptydaza

AP - aminopeptydaza
 PAM - amidowana mono-oxygenaza peptydu glicynowego,
 G - glicyna, K - lizyna, R - arginina, CT - kalcytonina,
 KAT - katakalcytna

Rys. 1. Schemat rozpadu łańcucha preprokalcytoniny (25).

Dlatego też stale podejmowane są próby znalezienia nowych, bardziej swoistych parametrów, które ułatwiłyby diagnostykę i monitorowanie uogólnionych odpowiedzi zapalnych, a tym samym poprawiły efektywność procesu postępowania terapeutycznego, w konsekwencji przynosząc wymierne korzyści ekonomiczne i społeczne.

Nowym parametrem, budzącym duże nadzieje jako marker układowej odpowiedzi zapalnej jest prokalcytonina (PCT). Jest to polipeptyd zbudowany z 116 aminokwasów, o masie cząsteczkowej 13 kDa z optymalnym z punktu widzenia dynamiki stężeń w stanach ostrych czasem półtrwania *in vivo* wynoszącym od 18 do 30 godzin. Sekwencja aminokwasów prokalcytoniny jest identyczna jak prohormonu kal-

cytoniny. Zawiera sekwencje kalcytoniny przy pozycji od 60 do 91 aminokwasu. Odcinek I do 57 aminokwasu łańcucha PCT to tzw. N-prokalcytonina (N-Proct), zaczynająca się grupą aminową NH_2 , od 96 do 116 aminokwasu znajduje się sekwencja C-prokalcytoniny (C-Proct) zwanej także katakalcyną, kończąca się grupą karboksylową COOH . Ostatnie badania wykazały, że PCT uzyskana od chorych na posocznicę zbudowana jest ze 114 aminokwasów, brak jest N - końcowego dwupeptydu (25) (Rys. 1). U zdrowych osób prokalcytonina wytwarzana jest przez komórki C tarczycy po procesie swoistej, wewnątrzkomórkowej proteolizy jako prohormon kalcytoniny. Sama prokalcytonina nie wykazuje aktywności hormonalnej, jej stężenie w surowicy krwi

jest niezależne od zapotrzebowania i zawartości kalcytoniny. W zapaleniach bakteryjnych i w posocznicach znajdowane są także inne peptydy prekursorowe kalcytoniny (25). Tarczyca nie jest jedynym miejscem syntezy PCT. Dowodzi tego wzrost stężenia PCT, związany z zakażeniem bakteryjnym u pacjentów po tyreidektomii. Obecnie uważa się że „prokalcytonina zapalna” syntetyzowana jest najprawdopodobniej w komórkach neuroendokrynnych, w płucach, jelicie, trzustce, w komórkach krwi obwodowej - monocytach, granulocytach i limfocytach (2, 6). Miejsce wytwarzania PCT uwalnianej w trakcie reakcji zapalnej nie jest jak na razie precyzyjnie określone.

W warunkach doświadczalnych udowodniono, że uwalnianie PCT jest indukowane przez toksyny bakteryjne. Po podaniu dożylnym zdrowym ochotnikom endotoksyny bakterii *Escherichia coli* 0113 : H10 : k w dawce 4 ng/kg m.c. po 3-4 h od wstrzyknięcia stwierdzono wzrost stężenia PCT w surowicy. PCT osiąga wysokie stężenia po około 6-8 h, a podwyższone jej stężenie utrzymuje się przez co najmniej 24 godziny. Przy stosowaniu powtórnych dawek toksyny bakteryjnej obserwowano znacznie mniejsze wzrosty stężenia TNF- α . Zjawisko to, zwane „down regulation”, dotyczy również PCT. Pomimo tego, że mechanizmy wzbudzania syntezy PCT, jak i jej funkcja w przebiegu procesu zapalnego wymagają dalszych badań to wiadomo, że kluczową właściwością PCT jest wzrost jej stężeń we krwi pod wpływem toksemii bakteryjnej. Udokumentowano znamienny wzrost stężeń PCT zarówno u ludzi jak i w doświadczalnych modelach posocznicy wywołanej żywymi szczepami *Escherichia coli* u zwierząt. Choroby wirusowe, autoimmunologiczne (9), zabiegi operacyjne nie powikłane zakażeniem bakteryjnym nie powodują wzrostu jej stężenia lub wzrost ten jest tylko nieznaczny. Szczególnie wysokie wartości PCT obserwowane były u pacjentów z ciężkimi uogólnionymi zakażeniami bakteryjnymi, ciężkiej posocznicy, we wstrząsie septycznym obserwowano wartości

stężeń PCT rzędu kilkudziesięciu do kilkuset ng/ml. U zdrowych ludzi w zależności od źródła oraz stosowanej metody oznaczeń górna granica wartości prawidłowej nie przekracza 0,5-0,7 ng/ml (9). Obwodowa kolonizacja lub lekka infekcja bakteryjna nie powodują wzrostu PCT albo przebiegają z umiarkowanym podwyższeniem stężenia PCT w surowicy. Stężenia PCT wykazują ścisłą korelację z ciężkością i stopniem uogólnienia infekcji bakteryjnej oraz ze stanem klinicznym pacjenta. Wahanie stężenia PCT w przebiegu uogólnionego zakażenia z reguły korelują ze stanem klinicznym chorego. Włączenie do terapii właściwego antybiotyku lub zakończona powodzeniem chirurgiczna eliminacja ogniska zapalnego powodują spadek stężeń PCT już w drugiej dobie, co jest pierwszym, wczesnym potwierdzeniem skuteczności leczenia (5, 8, 12).

Wzrost poziomu PCT w surowicy stwierdzono m.in. w ciężkich oparzeniach (13), oparzeniach tkanki płucnej, malarii, infekcji grzybiczej. Podwyższone stężenie PCT stwierdzono także u chorych z nowotworami neuroendokrynnymi. Znacząco mniejsze stężenia PCT zaobserwowano u chorych z leukopenią oraz po leczeniu immunosupresyjnym.

PCT pozostaje parametrem nie do końca poznany. Dalsze badania powinny wykazać nie tylko rolę prokalcytoniny w patofizjologii odczynu zapalnego, ale również dynamikę jej zmian w odniesieniu do innych laboratoryjnych markerów stosowanych we wczesnej diagnostyce, jak i w monitorowaniu przebiegu i leczenia ostrych układowych infekcji bakteryjnych u chorych manifestujących objawy SIRS (5, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 22).

*** Marek Paradowski**

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Biochemii Klinicznej
Katedry Diagnostyki Laboratoryjnej UM w Łodzi
e-mail: paradowski@skwam.lodz.pl

**** Mariusz Szablewski**

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej,
4 Wojskowy Szpital Kliniczny SPZOZ we Wrocławiu.
e-mail: masz.lab@poczta.fm

Piśmiennictwo:

1. Abraham E, Matthay MA.: Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: time for a reevaluation. *Crit Care Med* 2000, 28, 1, 232-235.
2. Alberti C., Brun-Buisson C.: Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med* 2002, 28, 2, 108 - 121.
3. Arras M., Strasser R.: Tumor necrosis factor-alpha is expressed by monocytes/macrophages following cardiac microembolization and is antagonized by cyclosporine. *Basic Res Cardiol* 1998, 93, 2, 97 - 107.
4. Atmaca M., Tezcan E.: Neopterin production in posttraumatic stress disorder before and after pharmacotherapy. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2003, 253, 1, 34 - 36.
5. Balci C., Sungurtekin H.: Usefulness of procalcitonin for diagnosis of sepsis in the intensive care unit. *Critical Care* 2003, 7, 1, 85-90.
6. Balog A., Ocsosvski I., Mandi Y.: Flow cytometric analysis of procalcitonin expression in human monocytes and granulocytes. *Immunol Lett* 2002, 84, 3, 199-203.
7. Bone RC., Fiser C J.: American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992, 20, 864 - 874.
8. Brunkhorst FM., Al-Nawas B.: Procalcitonin, C-reactive protein and APACHE II score for risk evaluation in patients with severe pneumonia. *Clin Microbiol Infect* 2002, 8, 2, 93-100.
9. Brunkhorst R., Eberhardt O K.: Procalcitonin for discrimination between activity of systemic autoimmune disease and systemic bacterial infection. *Intensive Care Med* 2000, 26, 15, 199 - 201.
10. Carrol ED., Thomson AP.: Procalcitonin as a marker of sepsis. *Int J Antimicrob Agents* 2002, 20, 1, 1-9.
11. Chirouze C., Schuhmacher H.: Low serum procalcitonin level accurately predicts the absence of bacteremia in adult patients with acute fever. *Clin Infect Dis* 2002, 15, 35, 156-61.
12. Claeys R., Vinken S.: Plasma procalcitonin and C-reactive protein in acute septic shock: clinical and biological correlates. *Critical Care Med* 2002, 30, 4, 757-762
13. Dehne MG., Sablotzki A.: Alterations of acute phase reaction and cytokine production in patients following severe burn injury. *Burns* 2002, 28 (6), 535-542.
14. Giamarellos-Bourboulis E J., Mega A.: Procalcitonin: a marker to clearly differentiate systemic inflammatory response syndrome and sepsis in the critically ill patient? *Intensive Care Med* 2002, 28, 9, 1351 - 1356.
15. Guven H., Altintop L.: Diagnostic value of procalcitonin levels as an early indicator of sepsis. *Am J Emerg Med* 2002, 20, 3, 202 - 206.
16. Hambach L., Eder M.: Diagnostic value of procalcitonin serum levels in comparison with C-reactive protein in allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2002, 87, 6, 643-51.
17. Majda J., Paradowski M., Łobos M.: Ocena zmian stężeń wybranych białek ostrej fazy w ostrym zapaleniu trzustki. *Diagn Lab* 1993, 29, 189 - 194.
18. Matot I., Sprung CL.: Definition of sepsis. *Intensive Care Med.* 2001, 27, 1, 3 - 9.
19. Moro M L., Jepsen O B.: Infection control practices in intensive care units of 14 European countries. *Intensive Care Med* 2002, 22, 9, 108 - 121.
20. Muckart DJ., Bhagwanjee S.: American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definition of the systemic inflammatory response syndrome and allied disorders in relation to critically injured patients. *Crit Care Med* 1997, 25, 1789-1795.
21. Ruokonen E., Ilkka L.: Procalcitonin and neopterin as indicators of infection in critically ill patients. *Acta Anaesthesiol Scand* 2002, 46, 4, 398-404.
22. Smolkin V, Koren A.: Procalcitonin as a marker of acute pyelonephritis in infants and children. *Pediatr Nephrol* 2002, 17, 6, 409 - 412.
23. Spencer R C.: Epidemiology of infection in ICUs. *Intensive Care Med.* 1994, 20, 2 - 6.
24. Vincent J L., Bihari.: The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA* 1995, 274, 639 - 644.
25. Weglohner W., Struck J.: Isolation and characterization of serum procalcitonin from patients with sepsis. *Peptides*. 2001, 22, 12, 2099-103.
26. Widemar A F., Infection control and prevention strategies in the ICU. *Intensive Care Med.* 1994, 20, 7 - 11.
27. Zahorec R.: Definition for septic syndrome should be re-evaluated. *Intensive Care Med.* 2000, 26, 12, 1870.

MICROS CRP - OCENA PIERWSZEGO ANALIZATORA WYKONUJĄCEGO OZNACZENIA MORFOLOGII KRWI Z RÓŻNICOWANIEM NA TRZY POPULACJE LEUKOCYTÓW ORAZ STĘŻENIA CRP

PERFORMANCE EVALUATION OF THE ABX MICROS CRP: THE FIRST INSTRUMENT REPORTING A COMPLETE BLOOD COUNT, 3-PART LEUCOCYTE DIFFERENTIAL, AND C-REACTIVE PROTEIN QUANTITATION

Bruce H. Davis, Nancy C. Bigelow

Streszczenie

Firma ABX Diagnostics jest twórcą pierwszego analizatora, łączącego wykonywanie podstawowej morfologii krwi z rozdziałem leukocytów na 3 populacje oraz oznaczanie stężenia CRP w krwi pełnej. Do oznaczeń CRP wykorzystano metodę immunoturbidymetryczną z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych, opłaszczonych na lateksie. Oznaczenia liniowości, precyzji, czułości, kontaminacji, a także wartości diagnostycznej wykonano przed wprowadzeniem analizatora na rynek w USA. Precyzja oznaczeń CRP była oceniana na podstawie wyników uzyskanych w serii oznaczeń, wykonywanych w pełnej krwi pobranej na K₃EDTA. Zakres stężeń CRP wynosił od 0,4 mg/dl do 10 mg/dl. Liniowość była oceniana poprzez oznaczenia wykonywane w próbkach zlewkowych o prawidłowym CRP, wzbogaconych materiałem kontrolnym, zawierającym CRP. Trwałość badano przechowując próbki przez 72 godziny w temperaturze pokojowej i w temp. +4°C. Badania korelacji oparto na porównaniu wyników uzyskanych na analizatorze Micros CRP z wynikami otrzymanymi w oznaczeniach wykonywanych równolegle w 100 próbkach na analizatorze Cobas Integra (metoda turbidymetrii lateksowej). Precyzja zarówno w serii, jak i między seriami była bardzo dobra, a współczynnik zmienności nie przekraczał 10%. Stwierdzono również bardzo dobrą liniowość bez kontaminacji. Korelacja wyników z Cobas Integra była bardzo dobra: nachylenie (slope) 0,98, brak istotnych różnic, wartość $r^2 > 0,99$. Nie wykazano istotnych interferencji wpływających na wynik. Próbkę przechowywane w temp. +4°C lub 25°C były jednakowo trwałe. Czułość była wyższa niż deklarowana przez producenta (0,2 mg/dl). Badania potwierdziły praktyczną użyteczność analizatora ABX Micros CRP. Prostota obsługi, mała objętość próbki krwi (18 µl) oraz krótki czas uzyskania wyniku (< 5 minut dla morfologii i CRP) sprawiają, że analizator może być przydatny w badaniach zdecentralizowanych - przy łóżku chorego (point-of-care) zarówno w odniesieniu do dzieci, jak i osób dorosłych. Podkreśla się szczególne możliwości wykorzystania urządzenia przez specjalistów z zakresu pediatrii, reumatologii i chorób zakaźnych.

Praca w wersji oryginalnej ukazała się w Lab.Hematol. 2001, 7, 69-74.

Słowa kluczowe

proces zapalny, analizatory hematologiczne, badania zdecentralizowane (point-of-care), automatyzacja w laboratorium, czynnik ostrej fazy.

Summary

ABX Diagnostics has developed the ABX Micros CRP analyzer, the first instrument to provide both a complete blood count (CBC) with a 3-part differential and a quantitative C-reactive protein (CRP) determination. The CRP measurement is based on the whole-blood immunoturbidimetric method using latex beads coated with anti-CRP-specific-monoclonal antibody. The evaluation reported here of the linearity, sensitivity, precision, carryover and clinical performance of the ABX Micros CRP was performed prior to release of the instrument in the United States. Precision of CRP analysis was assessed by replicate determinations of K₃EDTA-anticoagulated whole-blood samples with CRP values in the range of < 0,4 mg/dl to 10 mg/dl. Linearity was evaluated by assaying pooled normal samples spiked with CRP control material. The stability of CRP was studied in blood samples held at both room temperature and refrigerated conditions over a 72-hour period. Correlation studies were performed by analyzing 100 blood samples on the ABX Micros CRP and comparing the results with those obtained using the Roche Cobas Integra CRP assay, which is based on latex nephelometry. Within-run and between-run precision of both CBC and CRP values had a coefficient of variation (CV) of <10%.

Excellent linearity was observed and there was no significant carryover. Correlation of CRP with the Roche Cobas Integra was excellent with a slope of approximately 0,98, no significant bias, and an r^2 value of $>0,99$. No interference was seen in the analysis of any of the samples from patients with clinical conditions associated with interfering substances. Samples held at either 25°C or 4°C were stable for 48 hours. The CRP sensitivity was greater than the manufacturer's claim of 0,2 mg/dl. The ABX Micros CRP demonstrated performance suitable for clinical practice. The ease of use, small sample volume (18 µL), and rapid turnaround time (<5 minutes for CBC and CRP) are features that will make this instrument useful in point-of-care testing areas including both adult and pediatric intensive care units and in office laboratories, particularly those of pediatricians, rheumatologists, and infectious disease specialist.

Lab. Hematol. 2001; 7; 69-74.

Key words

Inflammation, Hematology instrumentation, Point-of-care testing, Laboratory automation, Acute phase reactant.

WSTĘP

Jednym ze współczesnych trendów w medycynie laboratoryjnej jest połączenie oznaczeń z odrębnych dotychczas dziedzin: chemii klinicznej i hematologii; głównym jego celem są oszczędności (powstał nawet niezbyt fortunny termin „chematologia”). Jedną z dróg to stworzenie wspólnej zautomatyzowanej i zrobotyzowanej platformy dla badań hematologicznych i biochemicznych, co oczywiście wiąże się z koniecznością zapewnienia obsługi technicznej i informatycznej oraz wysokimi kosztami. Innego rodzaju działaniem jest skupienie się na konkretnych potrzebach klinicznych, których przykładem może być diagnozowanie pacjentów z podejrzeniem

chorób o tle zapalnym: reumatycznych lub zakaźnych. ABX Diagnostics (Montpellier, Francja) skonstruowała analizator, umożliwiający oznaczenie morfologii krwi obwodowej z różnicowaniem leukocytów na 3 populacje (3-diff), z jednoczesnym określeniem poziomu CRP, co odpowiada tym potrzebom. ABX Micros CRP (rys. 1) jest w pełni zautomatyzowanym analizatorem hematologicznym podobnym do ADVIA 60 amerykańskiej firmy Bayer (Bayer Diagnostics, Tarrytown NY), posiadającym atest FDA, który mierzy różne parametry morfologii krwi i wykonuje rozdział 3-diff. W skład tych parametrów wchodzi: hematokryt, hemoglobina, MCV, MCH, MCHC, liczba erytrocytów wraz z RDW, liczba płytek krwi, MPV i PDW. ABX zmodyfikowała analizator Micros poprzez integrację z oznaczeniem stężenia CRP w pełnej krwi z wykorzystaniem metody turbidymetrycznej ze wzmocnieniem lateksem, w której zastosowano przeciwciała monoklonaalne. CRP jest białkiem ostrej fazy, a jego stężenie dostarcza informacji podobnych do odczynu opadania krwinek OB i jest wskaźnikiem uszkodzenia tkanek lub nasilenia procesu zapalnego (1-7).

Celem badań była ocena pracy tego analizatora oraz korelacji wyników CRP z wynikami uzyskanymi metodą nefelometrii lateksowej, stosowaną na analizatorze Cobas Integra Roche, również posiadającym atest FDA.



Rys. 1. Micros CRP, analizator firmy ABX Diagnostics (Montpellier, Francja) wykonuje oznaczenia morfologii krwi z różnicowaniem na 3 populacje leukocytów oraz oznaczenia stężeń CRP w pełnej krwi.

MATERIAŁ I METODY

Trwałość

Każdą z 5 próbek pochodzących od osób zdrowych podzielono na 2 części, z których jedną umieszczono w temperaturze pokojowej, drugą w temp. +4°C. Oznaczenia CRP w dubletach wykonano na aparacie ABX Micros CRP bezpośrednio po pobraniu krwi uzyskując tzw. wartości wyjściowe, a następnie po dokładnym wymieszaniu w 24., 48. i 72. godzinie. Wyniki przedstawiono w tabeli II wyrażając je jako procentowe odchylenie od wartości wyjściowej.

Precyzja

W celu określenia precyzji w serii użyto próbek pochodzących od osób zdrowych wykonując wielokrotne oznaczenia (minimum 10). Do określenia precyzji między seriami oraz z dnia na dzień zastosowano materiały kontrolne (ABX Diagnostics) o wysokim (HC) i niskim (LC) stężeniu. Wszystkie oznaczenia zarówno w próbkach o stężeniu prawidłowym, jak i patologicznym wykonano podwójnie, do wyliczeń stosując metodę dubletów.

Liniowość

Próbki krwi dobrane pod względem grup z układu AB 0 i Rh z wysokim i niskim stężeniem CRP mieszano w takich proporcjach, aby końcowa zawartość krwi z wysokim i niskim stężeniem CRP w mieszaninach wynosiła w % kolejno: 100:0, 90:10, 80:20, 65:35, 50:50, 35:65, 20:80, 5:95, a następnie oznaczano w dubletach. Dodatkowo do 0,5 ml próbek krwi o prawidłowym stężeniu CRP dodawano takie objętości materiału kontrolnego, aby zwiększyć ilość CRP w próbce o 0,2 mg.

Kontaminacja

W celu oceny stopnia kontaminacji wykonano potrójne oznaczenia kolejno w materiale LC1-3 (o niskim stężeniu), HC1-3 (o wysokim stężeniu) i ponownie w tym samym materiale o niskim stężeniu - próbki LC4-6. Zakłada się, że nie występuje zjawisko kontaminacji wówczas, kiedy ostatnie wyniki oznaczeń

LC4-6 mieszczą się w 95% przedziale ufności, wyznaczonym przez pierwsze trzy oznaczenia LC.1-3. Jeśli wartości LC4 były wyższe niż górna granica przedziału ufności, zastosowano następujące równanie w celu wyliczenia kontaminacji: $LC4 - UL/CI) \div HC1 - 3 \div 3)$

gdzie LC4 jest wynikiem pierwszego oznaczenia, UL/CI oznacza górną wartość (95%) przedziału ufności, a HC1-3 : 3 jest średnią z trzech oznaczeń.

Korelacje

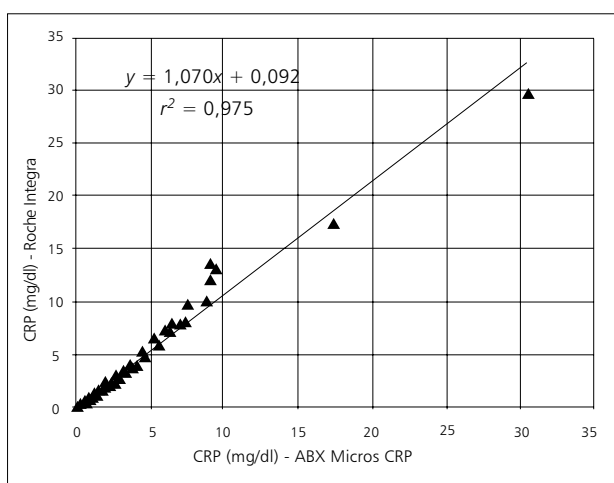
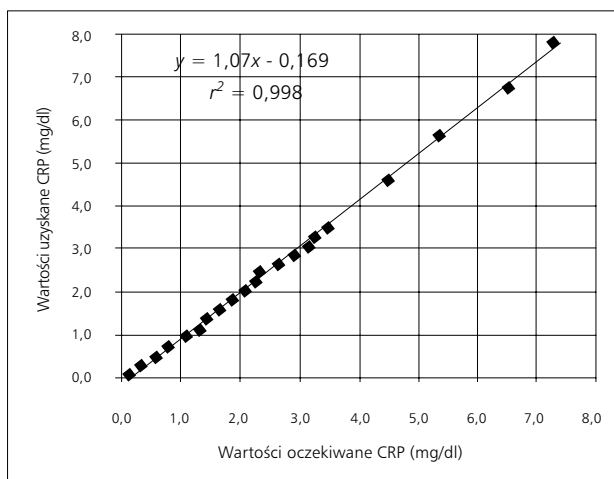
W 25 próbkach krwi od osób zdrowych i 75 próbkach od osób z chorobami, w których można oczekiwać podwyższenia stężenia CRP, wykonano oznaczenia w dubletach. Wartości uzyskane na analizatorze ABX Micros CRP były porównywalne z wynikami otrzymanymi na analizatorze Cobas Integra. Wszystkie próbki były przechowywane w temperaturze pokojowej, a oznaczenia wykonywane w ciągu 12 godzin od pobrania krwi, z wyjątkiem opisanych powyżej próbek przeznaczonych do oceny trwałości. Przyjęto, że czas pomiędzy oznaczeniami na obu analizatorach nie przekraczał jednej godziny. Czułość i swoistość diagnostyczna były oceniane przez porównanie z obrazem klinicznym i przebiegiem choroby opisanym w dokumentacji pacjentów.

Badania interferencji

W tym celu próbki były pobrane od pacjentów z ewidentną hiperbilirubinemią, hiperhemoglobinemią, hipergammaglobulinemią i hiperlipidemią. Wyniki były oceniane na podstawie precyzji oznaczanej metodą dubletów, jak również stanu klinicznego. Ocena ta jest tylko pobieżna, niemniej dostarcza informacji na temat oznaczeń, wykonywanych u pacjentów w stanie klinicznym sugerującym obecność substancji, które mogą interferować z metodami oznaczeń CRP.

Analizy statystyczne

Dane dotyczące liniowości i korelacji były oceniane przy zastosowaniu równania regresji liniowej. Do oceny danych porównawczych stosowano analizę wariancji. Wszystkie obliczenia statystyczne wykonano



Rys 2. Liniowość oznaczeń CRP wykonanych przy użyciu analizatora ABX Micros CRP

przy pomocy programu Statistica for Windows (StatSoft, Tulsa, OK) i Excel (Microsoft, Redmond, WA).

WYNIKI

Ocena precyzji

Kolejne dziesięciokrotne oznaczenia stężenia CRP we krwi osoby zdrowej dały wartość średnią $0,39 \pm 0,02$ mg/dl ze współczynnikiem zmienności 6%. Precyzja w serii wyliczona w oparciu o metodę dubletów w całym badanym materiale (próbki krwi od zdrowych dawców oraz od osób chorych) wynosiła $CV = 17,6\% \pm 37,3\%$ (zakres od 0 do 200%, $n = 100$).

Po wykluczeniu próbek ze stężeniem CRP poniżej zakresu liniowości (0,05 mg/dl) stwierdzono niską nieprecyzyjność (imprecision) ze średnim CV $6,5\% \pm 11,5\%$ (zakres od 0 do 72,7%, $n = 86$). Precyzję pomiędzy seriami określono przez wykonywanie oznaczeń próbek LC i HC cztery razy dziennie (w dwugodzinnych odstępach) przez 17 dni. Dla próbek LC ze średnim stężeniem $0,56 \pm 0,03$ mg/dl CV zawierał się w granicach od 1,4% do 11,6% (średnio $4,1\% \pm 2,8\%$), a dla HC ze średnim stężeniem $4,25 \pm 0,14$ mg/dl wynosił od 0,5% do 1,3% (średnio $1,8\% \pm 0,7\%$). Precyzja z dnia na dzień dla próbek LC i HC wynosiła odpowiednio $CV = 5,4\%$ i $3,3\%$.

Ocena liniowości

Liniowość metody stosowanej w ABX Micros CRP oceniano poprzez wykonanie w dubletach oznaczeń próbek krwi zgodnych w grupach A B 0 i Rh z wysokim i niskim stężeniem CRP, zmieszanych w różnych proporcjach.

Wykazano spadek liniowości w próbkach nie rozcieńczonych o stężeniu CRP pomiędzy 7 a 10 mg/dl (rys. 2). Probki ze stężeniem CRP powyżej 10 mg/dl były rozcieńczane przed oznaczeniem zgodnie z instrukcją i wykazywały dobrą liniowość. Badania liniowości w zakresie pomiędzy wartościami prawidłowymi a stężeniem około 7 mg/dl kontynuowano poprzez dodanie wzrastających objętości (5 do 230 μ l) próbek z wysokim poziomem CRP (21,3 mg/dl) do 0,5 ml próbek o prawidłowym stężeniu. Potwierdzono bardzo dobrą liniowość (rys. 2).

Korelacja

Probki pobierano od 25 osób zdrowych i od 75 ze znanym rozpoznaniem (44% kobiet), z których 42 osoby były starsze o 4 lata i 58, które były młodsze o rok (średni wiek 35,3). Probki oznaczano w dubletach równolegle na ABX Micros CRP i Roche Cobas Integra. Współczynnik korelacji pomiędzy dwiema metodami wynosił 0,975 dla wszystkich badanych próbek (rys. 3). Metoda zastosowana w ABX Micros CRP wykazywała większe odchylenia w zakresie stężeń

Tabela I. Kontaminacja oznaczeń wykonanych przy użyciu analizatora ABX Micros CRP.

Próbka	Materiał kontrolny o niskim stężeniu	Materiał kontrolny o wysokim stężeniu	Materiał kontrolny o niskim stężeniu
1	0,57	4,46	0,61
2	0,60	4,68	0,57
3	0,59	4,65	0,59
Średnia $\pm$ SD	$0,59 \pm 0,01$	$4,60 \pm 0,10$	$0,59 \pm 0,02$
UL/CL	0,603955		
Kontaminacja (%)†	0,13		

SD oznacza odchylenie standardowe; UL - górną wartość (95%) przedziału ufności; CL - przedział ufności

† $(0,61 - 0,603955) \div 4,60 \times 100$.

7-10 mg/dl, w którym zgodnie z instrukcją producenta próbki pełnej krwi nie były rozcieńczane. Biorąc pod uwagę tylko 25 próbek o prawidłowym stężeniu obie metody wykazywały praktycznie pełną korelację $r^2 = 0,996$, (rys. 4).

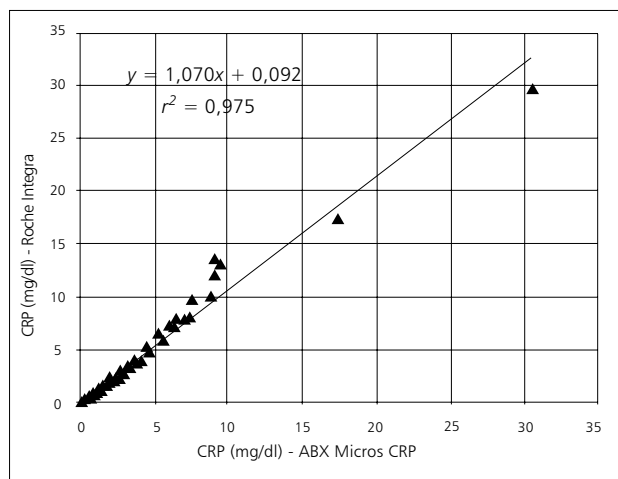
Kontaminacja

Jak wykazano w tabeli 1, wartość CRP dla próbki LC4, pierwszej z trzech próbek LC oznaczanych po próbkach HC, była nieco powyżej górnej granicy przedziału ufności, wyznaczonego dla trzech próbek LC badanych w pierwszej kolejności (0,610 versus 0,604). Oznacza to, że kontaminacja wynosiła 0,13%.

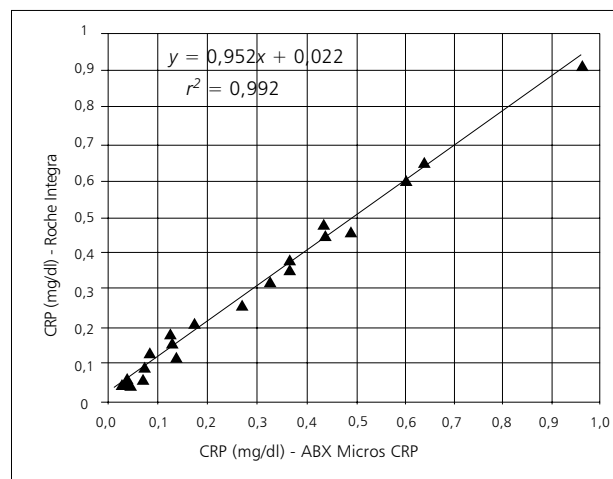
Trwałość próbek

Pięć prawidłowych i pięć nieprawidłowych próbek krwi badano bezpośrednio po pobraniu i po prze-

chowywaniu w temperaturze pokojowej i temperaturze $\pm 5^\circ\text{C}$ w 24., 48. i 72. godzinie od pobrania. Jak oczekiwano, procentowe odchylenia od wartości wyjściowych były nieco większe dla próbek z niskim poziomem CRP i wzrastały o 5 do 10% w 48. godzinie zarówno w próbkach przechowywanych w temperaturze pokojowej, jak i w niskiej temperaturze. Przeciwnie, zmiany, które zachodziły w próbkach z podwyższonym CRP, wykazywały tendencje do spadku o 1 do 3% (tabela II). W 72. godzinie po pobraniu odchylenia od wartości wyjściowych były bardziej widoczne, ale ciągle pozostawały w granicach mniej niż 11% od wartości w próbkach o prawidłowym i nieprawidłowym stężeniu, bez względu na temperaturę przechowywania.



Rys. 3. Korelacja wyników oznaczeń wykonanych w 100 próbkach krwi na analizatorze ABX Micros CRP i Roche Integra CRP (metoda z lateksem). CRP oznacza białko C-reaktywne.



Rys. 4. Korelacja wyników oznaczeń wykonanych na ABX Micros CRP i Roche Integra CRP (metoda z lateksem) w 25 próbkach pobranych od zdrowych osób wykazuje pełną zgodność. CRP oznacza białko C-reaktywne.

Badania interferencji

W trakcie oceny w dwóch próbkach stwierdzono obecność substancji potencjalnie interferujących z oznaczeniem CRP. W jednej próbce stwierdzono hiperhemoglobinemię wtórną do czynnej malarii, co dało wartości oznaczane w dubletach 6,61 mg/dl i 6,92 mg/dl - korelujące ze stanem klinicznym. Druga próbka pochodziła od pacjenta z hiperlipidemią (cholesterol powyżej 1000 mg/dl) i hipergammaglobulinemią (powyżej 3 g/dl), ale bez klinicznych objawów zapalenia. Aparat ABX Micros CRP daje prawidłowe wartości CRP zarówno w próbkach z hiperlipidemią, jak i hipergammaglobulinemią (0,18 mg/dl i 0,19 mg/dl). Obie próbki wykazywały współczynnik zmienności porównywalny do próbek o prawidłowym stężeniu lipidów i białka. Aczkolwiek hiperlipidemia, hipergammaglobulinemia i hiperhemoglobinemia nie stanowią bezwzględnego przeciwwskazania do oznaczeń na aparacie ABX Micros CRP, to użytkownik powinien pamiętać o możliwej interferencji ze strony obecnych w próbkach substancji.

Dyskusja

Przedstawione dane wykazują, że precyzja w serii, pomiędzy seriami i z dnia na dzień jest w pełni akceptowalna. Jest ona najlepsza dla próbek kontrolnych o niskim stężeniu (0,56 mg/dl) oznaczanych cztery razy dziennie przez 17 dni ($CV = 1,4\%$ do $11,6\%$). Zastosowana metoda oznaczeń CRP w pełnej krwi pobranej na antykoagulanty wykazuje liniowość do stężenia 7 mg/dl. Pomimo tego, że aparat ABX Micros CRP był zaprojektowany do oznaczeń stężeń CRP do 10 mg/dl w krwi nierozcieńczonej, przedstawiane badania wykazały pewne obniżenie liniowości w zakresie od 7 do 10 mg/dl. Można więc stwierdzić, że w celu otrzymania prawidłowych wyników próbki z CRP powyżej 7 mg/dl powinny być rozcieńczone i oznaczone powtórnie. Stwierdzono wysoką korelację z wynikami uzyskanymi na Roche Cobas Integra. Wykazano, że kontaminacja praktycznie może być pominięta, a stężenie CRP w próbkach przecho-

wywanych do 48 godzin zarówno w temperaturze pokojowej, jak i w lodówce nie ulega zmianie. Nie zaobserwowano również interferencji w próbkach uzyskanych od pacjentów, w których stwierdzono hiperhemoglobinemię, hiperlipidemię, hipergammaglobulinemię czy obecność czynnika reumatoidalnego. Jak wiadomo, wyżej wymienione czynniki często interferują w oznaczeniach wykonywanych innymi metodami (8). Nasze badania potwierdziły, że oznaczenia na analizatorze ABX Micros CRP zapewniają odpowiednią liniowość w zakresie od 0,05 do 7 mg/dl przy użyciu nierozcieńczonych próbek krwi pełnej pobranej na EDTA i powyżej 7 mg/dl z użyciem próbek rozcieńczonych. Ponadto łatwość obsługi, mała wymagana objętość próbki, jak również możliwość uzyskania jednocześnie wyniku morfologii i CRP w czasie krótszym niż 5 minut sprawia, że analizator ten może znaleźć zastosowanie w badaniach wykonywanych przy łóżku pacjenta (point-of-care).

Podwyższony poziom CRP jako wskaźnik chorób zapalnych ma większą wartość niż OB. Z drugiej strony prostota i dostępność oznaczeń OB powoduje, że znajdują one ciągle szersze zastosowanie niż immunologiczna metoda oznaczeń CRP. Nawet jeżeli metoda oznaczeń CRP jest dostępna, to oznaczenia te są wykonywane na ogół raz dziennie a nawet rzadziej, co wyklucza ich wykorzystanie w rzeczywistym monitorowaniu pacjenta. Jest oczywiste, że CRP ma dużą wartość kliniczną w postępowaniu w przypadkach sepsy noworodków (9-14), w różnicowaniu zapalenia wyrostka (1, 2, 15) i ostatnio również w uszkodzeniu mięśnia sercowego i udarów mózgowych (16-20). Te stany kliniczne zwykle są wskazaniem do objęcia pacjenta intensywną opieką medyczną, gdzie zastosowanie metod monitorowania point-of-care poprawia opiekę nad chorym i redukuje koszty. Wydaje się oczywiste, że aparaty takie jak ABX Micros CRP stanowią właściwą odpowiedź na rzeczywiste potrzeby kliniczne.

Pomiary CRP przy pomocy aparatu ABX Micros CRP

Tabela II. Trwałość próbek o prawidłowym i nieprawidłowym stężeniu CRP, oznaczanych na ABX Micros CRP (n = 10)*

Parametry	Czas w godzinach			
	0	24	48	72
Prawidłowa próbka RT				
Średnia	0,131	0,138	0,139	0,142
Odchylenie		0,007	0,008	0,011
Odchylenie w %		5,3	6,1	8,4
Nieprawidłowa próbka RT				
Średnia	4,054	3,981	4,002	3,730
Odchylenie		0,073	0,052	0,324
Odchylenie w %		-1,8	-1,3	-8,0
Prawidłowa próbka w 5°C				
Średnia	0,131	0,144	0,139	0,117
Odchylenie		0,013	0,008	0,014
Odchylenie w %		9,9	6,1	-10,7
Nieprawidłowa próbka w 5°C				
Średnia	4,054	3,935	3,995	3,816
Odchylenie		0,119	0,059	0,238
Odchylenie w %		-2,9	-1,5	-5,9

* średnia wartość CRP wyrażona w mg/dl. Odchylenie określane w stosunku do średniej wyjściowej próbki.

RT - temperatura pokojowa.

mają bardzo dobrą liniowość do 0,05 mg/dl, chociaż nie spełniają kryteriów stawianych oznaczeniom CRP o wysokiej czułości, które ma zastosowanie jako wskaźnik niezbędny przy ocenie ryzyka chorób układu krążenia. Wydaje się jednak, że pomiary CRP wykonywane za pomocą Micros CRP są nie tylko wystarczająco czułe do wykazania wzrostu stężenia występującego w sepsie noworodków lecz również mogą być wykorzystane jako prognostyczny czynnik ryzyka w zakresie wartości od 0,2 mg/dl do 0,4 mg/dl (16-18, 20). A zatem ABX Micros CRP może być wykorzystany w gabinetach lekarskich, szczególnie przez reumatologów, pediatrów czy internistów, lecz także na oddziałach intensywnego nadzoru noworodków, oddziałach intensywnej terapii albo w ambulatorium kardiologicznym. Użyteczność kliniczna CRP jako markera infekcji i sepsy została dowiedziona. Jego wartość może być podważona przez testy nowej generacji oceniające odpowiedź na infekcję, takie jak prokalcytonina, interleukina 6 i oznaczenia CD64 (11, 21-27). Jednak w chwili obecnej można stwierdzić, że wartość

jednoczesnych oznaczeń morfologii i CRP na jednym analizatorze, jakim jak ABX Micros CRP, jest cennym narzędziem diagnostycznym w przypadkach badań point-of-care osób z potwierdzonym albo podejrzanym stanem zapalnym. Połączenie morfologii krwi z innymi oznaczeniami laboratoryjnymi może być przykładem nowych trendów w hematologii laboratoryjnej.

Bruce H. Davis, Nancy C. Bigelow

Maine Medical Center Research Institute,
81 Drive Scarborough, Maine 04074

Praca sponsorowana przez ABX Diagnostics, Irvine, Kalifornia i wykonana jako część oceny klinicznej ABX Micros CRP dla potrzeb wydania atestu FDA. Bruce Davis i Nancy Bigelow są zatrudnieni jako konsultanci ABX Diagnostics, Montpellier, Francja.

Praca była przedstawiona na spotkaniu Towarzystwa Hematologicznego ISLH w Banff w Kanadzie (kwiecień 2000) oraz na spotkaniu Amerykańskiego Towarzystwa hematologicznego w San Francisco w USA (grudzień 2000).

Piśmiennictwo:

1. Clyne B., Olshaker J.: The C-reactive protein. *J. Emerg Med.* 1999, 17, 1019-1025.
2. Gronroos J., Gronroos P.: Leucocyte count and C-reactive protein in the diagnosis of acute appendicitis. *Br J Surg.* 1999, 86, 501-504.
3. Yeun J.: Clinical utility of C-reactive protein measurements. *Semin Dial.* 2000, 13, 56-57.
4. Szalai A., Agrawal A., Greenhough T., Volanakis J.: C-reactive protein: structural biology and host defense function. *Clin Chem Lab Med.* 1999, 37, 265-270.
5. Rodriguez-Sanjuan J., Martin-Parra J., Seco I., Garcia-Castrillo L., Naranjo A.: C-reactive protein and leukocyte count in the diagnosis of acute appendicitis in children. *Dis. Colon Rectum* 1999, 42, 1325-1329.
6. Posen R., de LR.: C-reactive protein levels in the extremely premature infant: case studies and literature review. *J. Perinatol.* 1998, 18, 138-141.
7. Pova A., Almeida E., Moreira P. et al.: C-reactive protein as an indicator of sepsis. *Intensive Care Med.* 1998, 24, 1052-1056.
8. Lelong M., Renard M., Giraudeau V.: Solid immunoassay and immunoephemetric methods for serum C reactive protein (CRP) determination: discrepancy in CRP value for a patient presenting a monoclonal immunoglobulin G. *Clin Chim Acta* 1999, 288, 147-152.
9. Benitz W., Han M., Madan A., Ramachandra P.: Serial serum C-reactive protein levels in the diagnosis of neonatal infection (abstract). *Pediatrics* 1998, 102, 965.
10. Bomela H., Ballot D., Cory B., Cooper P.: Use of C-reactive protein to guide duration of empiric antibiotic therapy in suspected early neonatal sepsis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2000, 19, 531-535.
11. Carlet J.: Rapid diagnostic methods in the detection of sepsis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 1999, 13, 483-494.
12. Chiu C., Lin T., Bullard M.: Identification of febrile neonates unlikely to have bacterial infections. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1997, 16, 59-63.
13. Gerdes J., Polin R.: Early diagnosis and treatment of neonatal sepsis. *Indian J. Pediatr.* 1998, 65, 63-78.
14. Kaftan H., Kinney J.: Early onset neonatal bacterial infections. *Semin. Perinatol.* 1998, 22, 15-24.
15. Asfar S., Safar H., Khoursheed M., Dashti H., al-Bader A.: Would measurement of C-reactive protein reduce the rate of negative exploration for acute appendicitis? *J. R. Coll. Surg. Edinb.* 2000, 45, 21-24.
16. Ford E., Giles W.: Serum C-reactive protein and self-reported stroke: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000, 20, 1052-1056.
17. Ridker P., Hennekens C., Buring J., Rafai N.: C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N. Engl. J. Med.* 2000, 342, 836-843.
18. Tommasi S., Carluccio E., Bentivoglio M. et al.: C-reactive protein as a marker for cardiac ischemic events in the year after a first, uncomplicated myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* 1999, 83, 1595-1599.
19. Gaspardone A., Crea F., Versaci F. et al.: Predictive value of C-reactive protein after successful coronary-artery stenting in patients with stable angina. *Am. J. Cardiol.* 1998, 82, 515-518.
20. Anderson J., Carlquist J., Muhlestein J., Horne B., Elmer S.: Evaluation of C-reactive protein, an inflammatory marker, and infectious serology as risk factors for coronary artery disease and myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1998, 32, 35-41.
21. Hatherill M., Tibby S., Sykes K., Turner C., Murdoch I.: Diagnostic markers of infection: comparison of procalcitonin with C reactive protein and leucocyte count. *Arch. Dis. Child.* 1999, 81, 417-421.
22. Hedlund J., Hansson L.: Procalcitonin and C-reactive protein levels in community-acquired pneumonia: correlation with etiology and prognosis. *Infection* 2000, 28, 68-73.
23. Somech R., Zakuth V., Assia A., Jurgenson U., Spier Z.: Procalcitonin correlates with C-reactive protein as an acute-phase reactant in pediatric patients. *Isr. Med. Assoc. J.* 2000, 2, 147-150.
24. Toikka P., Irjala K., Juven T. et al.: Serum procalcitonin, C-reactive protein and interleukin-6 for distinguishing bacterial and viral pneumonia in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2000, 19, 598-602.
25. Karzai W., Reinhart K.: Sepsis: definitions and diagnosis. *Int. J. Clin. Pract. Suppl.* 1998, 95, 44-48.
26. Davis B.H., Bigelow NC, Curnutte J.T., Ornvold K: Neutrophil CD64 expression: potential diagnostic indicator of acute inflammation and therapeutic monitor of interferon- γ therapy. *Lab. Hematol.* 1995, 3-12.
27. Fjaertoft G., Hakansson L., Ewald U., Foucard T., Venge P.: Neutrophils from term and preterm newborn infants express the high affinity Fc γ receptor I (CD64) during bacterial infections. *Pediatr. Res.* 1999, 45, 871-876.

OZNACZENIA INTERLEUKINY-8 I CRP ZMNIĘSZAJĄ NIEPOTRZEBNE STOSOWANIE ANTYBIOTYKÓW U NOWORODKÓW

(*Pediatrics* 2004, 114, 1-8)

Zakażenia bakteryjne stanowią jedną z głównych przyczyn zgonów noworodków. Ze względu na to, że są one trudne do zdiagnozowania z powodu nietypowych objawów, wielu pediatrów jako strategię postępowania przyjmuje stosowanie antybiotykoterapii u wszystkich dzieci nie tylko z objawami klinicznymi, ale również pochodzących z cięż podwyższonego ryzyka. 29 do 66% noworodków z niską wagą urodzeniową w Stanach Zjednoczonych otrzymywało dożylnie antybiotyki przez 5 dni pomimo ujemnych badań bakteriologicznych (*J.Ped.* lipiec 1996), a 39% lekarzy neonatologów podawałoby antybiotyki noworodkom bez objawów klinicznych, których matki przed urodzeniem otrzymały chociaż jedną dawkę antybiotyku z powodu podejrzenia zainfekowania wód płodowych. Na podstawie przeprowadzonych w wielu ośrodkach badań (1291 noworodków) stwierdzono, że można zmniejszyć liczbę dzieci otrzymujących antybiotyki przez stosowanie algorytmu, obejmującego oznaczenia stężenia IL-8 i CRP u dzieci do 72. godziny życia. Jako wartości graniczne przyjęto stężenie IL-8 70 pg/ml, a CRP 10mg/l. Wprowadzenie takiej strategii ograniczyłoby powstawanie szczepów opornych na oddziałach noworodkowych oraz zmniejszyło ilość powikłań, wynikających z dożylnego podawania antybiotyków.

Medscape Medical News

CRP JAKO CZYNNIK RYZYKA CHOROÓB UKŁADU KRAŻENIA U KOBIET Z ZESPOŁEM METABOLICZNYM

(*Circulation*, styczeń 2003)

Definicja zespołu metabolicznego, opisanego po raz pierwszy w 1988 r., związanego z podwyższonym ryzykiem chorób układu krążenia, obejmuje obecność przynajmniej 3 z 5 czynników:

- otyłość brzuszna
- hipertriglicydemia
- niskie stężenie cholesterolu HDL
- nadciśnienie tętnicze
- podwyższone stężenie glukozy.

Wyniki oparte na danych uzyskanych od 14719 kobiet z zespołem metabolicznym, obserwowanych przez okres 8 lat, potwierdziły, że stężenie CRP było czynnikiem różnicującym w odniesieniu do liczby zachorowań na choroby układu krążenia. W grupie ze stężeniem CRP powyżej 3mg/l wskaźnik zachorowań wynosił 5,0 na 1000 w ciągu roku, w grupie zaś z CRP poniżej 3mg/l - 3,4.

LabMedInt 2003 lipiec-sierpień

CRP JAKO CZYNNIK PREDYKCYJNY RAKA OKRĘŻNICY

(*JAMA* 2004, luty)

W danych uzyskanych z ponad 22000 historii chorób stwierdzono 131 osób z rakiem okrężnicy i 41 z rakiem odbytnicy. Wyższe wartości CRP obserwowano u chorych z rakiem okrężnicy w porównaniu do osób zdrowych (odpowiednio średnio 2,69 i 1,97mg/l). Podobnych różnic nie stwierdzono dla grupy chorych z rakiem odbytnicy.

Czy stężenie CRP jest czynnikiem ryzyka rozwoju kolejnej choroby?

LabMedInt 2004 maj-czerwiec

ATEROGENNY INDEKS OSOCZA (ATHEROGENIC INDEX OF PLASMA - AIP)

(*Clin.Chem.* 2004, lipiec)

Związek obniżonego stężenia cholesterolu HDL z ryzykiem rozwoju miażdżycy i choroby wieńcowej serca nie podlega żadnej wątpliwości, natomiast rola stężenia triglicerydów nadal nie jest w pełni doceniana. Najnowsze zalecenia Adult Treatment Panel III określają wprowadzenie podwyższonego stężenia TG i obniżonego CH-HDL jako aterogenną dyslipidemię, ale nadal są prowadzone badania nad możliwością wykorzystania tych parametrów do oceny zmian w profilu lipidowym i tym samym ryzyka miażdżycy. Ostatnio został zaproponowany nowy wskaźnik - AIP, wyliczany jako $\log TG/CH-HDL$, gdzie stężenia wyrażane są w mmol/l. Im wyższy AIP tym większe ryzyko miażdżycy. Wskaźnik ten wykazuje dodatnią korelację z frakcyjnym współczynnikiem estyfikacji cholesterolu (FERHDL), a ujemną z wielkością cząstek LDL. Jak wiadomo małe, gęste cząstki LDL są bardziej aterogenne. Wykazano również, że FER ma wysoką wartość predykcyjną w odniesieniu do choroby wieńcowej.

Zasady publikowania prac w IN VITRO EXPLORER

1. Przyjmujemy do druku prace oryginalne, dotychczas nie publikowane, o tematyce związanej z diagnostyką laboratoryjną.
2. Artykuły powinny mieć objętość nie większą niż 8 stron maszynopisu (1800 znaków na stronę).
3. Prosimy o dostarczanie prac wyłącznie w formie elektronicznej (na dyskietce lub pocztą internetową), jako dokumenty programu Microsoft Word (doc). Ilustracje, wykresy, tabele i opisy prosimy umieścić na końcu artykułu lub w osobnym pliku, a w tekście odwołać do nich.
4. Niezbędne elementy artykułu to:
 - imię i nazwisko autora wraz z tytułami naukowymi
 - tytuł, streszczenie oraz słowa kluczowe w języku polskim i angielskim
 - piśmiennictwo na końcu artykułu wg kolejności cytowania (poszczególne pozycje zestawione następująco: autor i tytuł artykułu, tytuł czasopisma, rok wydania, tom, zeszyt, strony).
5. Prosimy o podanie informacji dotyczących miejsca pracy, adresu i telefonu kontaktowego (e-mail mile widziany).
6. Redakcja zastrzega sobie prawo do redagowania nadesłanych materiałów.

Wydawca IN VITRO EXPLORER

ABX Diagnostics Polska Sp. z o.o.

Wał Miedzeszyński 598, 03-994 Warszawa,
+48 (22) 673 20 22, +48 (22) 673 20 26

Redaktor koordynujący:

dr Beata Olszewska,
e-mail: bolszewska@pl.abx.fr

Redakcja: Maria Domagała

Projekt graficzny: Aleksandra Król

Skład i łamanie: Zych Studio

ISSN 1732-9752

Nakład: 1500 egz.

wrzesień 2004