

PRACA POGLĄDOWA

ZEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI METOD IMMUNOCHEMICZNYCH STOSOWANYCH W BADANIACH WIRUSOLOGICZNYCH

EXTERNAL QUALITY CONTROL OF IMMUNOLOGY ASSAYS USED IN VIROLOGICAL TESTS

✉ ELŻBIETA STEFANIUK

Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej Narodowego Instytutu Leków w Warszawie



Elżbieta Stefaniuk
Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej
Narodowy Instytut Leków,
ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa
Tel.: 22 331 15 62
elzbieta.stefaniuk@gmail.com

Wpłynęło: 07.08.2018
Zaakceptowano: 10.09.2018
Opublikowano on-line: 20.09.2018

Cytowanie: Stefaniuk E. Zewnętrzna kontrola jakości metod immunochemicznych stosowanych w badaniach wirusologicznych. Zakażenia XXI wieku 2018;1(4):197-202. doi: 10.31350/zakazenia/2018/4/Z2018031

Copyright by MAVIPURO Polska Sp. z o.o., Warszawa, 2018. Wszystkie prawa zastrzeżone. Żadna część niniejszej publikacji nie może być powielana i rozpowszechniana w jakiegokolwiek formie i w jakikolwiek sposób bez zgody wydawcy.

STRESZCZENIE:

W ciągu ostatnich dwóch dekad obserwuje się dynamiczny rozwój technologii diagnostycznych do wykrywania zakażeń bakteryjnych, wirusowych i pasożytniczych, monitorowania ich przebiegu, a także śledzenia/kontroli okresu rekonwalescencji. Złożoność metod diagnostycznych w immunodiagnostyce chorób wirusowych wynika z odpowiedzi immunologicznej pacjenta na zakażenie oraz z charakteru czynnika zakaźnego, a także z różnorodności technik stosowanych w laboratoriach. Wirusowe testy serologiczne wykorzystują standardowe i często manualne techniki, a przy większych seriach badań także zautomatyzowane metody. Zewnętrzna ocena jakości, obok poprawności analitycznej, na podstawie odpowiednich przypadków klinicznych, powinna określać umiejętność kompleksowego analizowania wyników badań immunochemicznych oraz jakość interpretacji klinicznej. Wewnętrzna kontrola jakości w laboratorium jest kluczowym elementem zewnętrznej kontroli jakości. Dlatego też podstawowym zadaniem każdego laboratorium jest realizacja procedur wewnętrznej kontroli jakości, w szczególności w zakresie krytycznych etapów procedur badawczych.

SŁOWA KLUCZOWE: zakażenia wirusowe, metody immunochemiczne, zewnętrzna kontrola jakości

ABSTRACT:

For the last two decades there has been a dynamic development of diagnostic technologies for the detection of bacterial, viral and parasitic diseases, for monitoring of their progress and recovery period. The complexity of immunodiagnostic assays is a result of patient's immune response to infection and the nature of the infectious agent, as well as the variety of techniques used in laboratories. Viral serological tests use standard and often simple but also automated methods. External quality assessment in addition to analytical accuracy, based on appropriate clinical cases, should determine the ability to comprehensively analyze the results of immunochemical tests and the quality of clinical interpretation. A key element of external quality control is regular internal quality control in the

laboratory. Therefore, the basic task of each laboratory is to implement internal quality control procedures, in particular in the critical stages of research procedures.

KEY WORDS: viral infections, immunochemical methods, external quality control

W ciągu ostatnich dwóch dekad obserwuje się dynamiczny rozwój technologii diagnostycznych do wykrywania zakażeń bakteryjnych, wirusowych i pasożytniczych, monitorowania ich przebiegu, jak również okresu rekonwalescencji. Pojawianie się na rynku diagnostycznym nowych testów immunochemicznych wiąże się nie tylko z koniecznością wykrywania „nowych” czynników zakaźnych, możliwym zagrożeniem terroryzmem mikrobiologicznym, ale również z potrzebą oceny skuteczności stosowanych przeciw nim szczepionek i koniecznością ich modyfikowania.

Serologia od dawna odgrywała i do dzisiaj odgrywa ważną rolę w diagnozowaniu m.in. infekcji wirusowych lub potwierdzania bezobjawowo przebiegających ekspozycji na wiele czynników wirusowych. Reakcja serologiczna polega na łączeniu się przeciwciał i antygenów. Testy pozwalające wykryć obecność lub poziom swoistych przeciwciał klasy IgM są stosowane do potwierdzenia obecności występującej infekcji, podczas gdy testy wykrywające swoiste przeciwciała klasy IgG lub całkowity ich poziom służą zarówno do dokumentowania aktualnego zakażenia, jak i do oceny stanu odporności pacjenta. Przeciwciała klasy IgM nie zawsze są wytwarzane podczas ostrego zakażenia, szczególnie w przypadkach reaktywacji latentnego wirusa, a także u pacjentów z niedoborami odporności. Pozytywne wyniki oznaczania IgG i całkowitego poziomu przeciwciał nie tylko wskazują na wcześniejsze zakażenie lub ekspozycję pacjenta na czynnik zakaźny, ale również mogą wskazywać na niedawno przebyte zakażenie [1]. Materiały kliniczne pobierane do badań diagnostycznych podczas fazy ostrej i fazy zdrowienia (rekonwalescencyjnej) są pomocne do różnicowania opisanych stanów. Niestety, w praktyce nie zawsze wyniki tych badań są ze sobą łączone, a interpretacja wyników nie zawsze jest oczywista i jednoznaczna, i w tym momencie należy wskazać ważną rolę laboratorium klinicznego, które ma kompleksową wiedzę z zakresu możliwości i ograniczeń poszczególnych testów. Jako przykład rozwiniętych technologii diagnostycznych może posłużyć immunochemiczna ocena zakażenia wirusem HIV z wykorzystaniem testów czwartej i piątej generacji. Testy pierwszej generacji, wprowadzone do diagnostyki w 1985 roku, wykorzystywały antygeny uzyskane z lizatów wirusa, które opłaszczano bezpośrednio na kulkach lub płytkach mikrotitracyjnych używanych w testach ELISA lub chemiluminescencyjnych. Wykrywały one przeciwciała IgG tylko dla HIV-1, a problemem diagnostycznym przy ich zastosowaniu we wczesnej fazie zakażenia HIV było stosunkowo długo utrzymujące się (od 6 do 10 tygodni) tzw. okienko serologiczne, czyli okres

potrzebny do wytworzenia markerów (przeciwciał lub antygeny p24 HIV), które wykrywałyby stosowany test diagnostyczny. Testy pierwszej generacji zostały zaprojektowane głównie w celu zapewnienia bezpieczeństwa krwi do przetoczeń niż do celów diagnostycznych. Zatem ich czułość była wysoka, z towarzyszącą niższą swoistością. W celu stworzenia algorytmu standardowego postępowania diagnostycznego niższą specyficzność testów „poprawiono” poprzez badanie próbek w powtórzeniach i obligatoryjne weryfikowanie wyników dodatnich testami potwierdzenia, tj. testem Western Blot lub testem immunofluorescencji. Druga generacja testów charakteryzowała się zwiększoną swoistością poprzez dodanie rekombinowanych białek HIV do preparatu antygenowego, a także zdolnością do wykrywania przeciwciał przeciwko HIV-1 grupy O i HIV-2. Trzecia generacja testów wykrywa przeciwciała w obu klasach (IgG i IgM) przeciwko różnym grupom HIV, bez różnicowania podtypów. Pozwoliło to zmniejszyć „okienko serologiczne” do około 3 tygodni [2]. Testy czwartej generacji w kierunku HIV stanowią kombinacje testów trzeciej generacji z testem wykrywającym antygen p24. Ma to wpływ na skrócenie czasu „okienka serologicznego” do około 2 tygodni. Większość testów czwartej generacji zapewnia wyniki dodatnie bez rozróżnienia, czy są one rezultatem obecności przeciwciał, czy też antygeny p24. Piąta generacja testów, wprowadzana od 2015 roku, wykrywa przeciwciała anti-HIV-1 lub anti-HIV-2 oraz antygen p24 HIV-1 i pozwala uzyskać osobne wyniki dla każdego oznaczanego składnika (przeciwciał i antygeny), jakkolwiek nie odróżnia swoistości przeciwciał anti-HIV-1 od anti-HIV-2. Zdolność rozróżnienia przeciwciał anti-HIV-1 od anti-HIV-2 wraz z oddzielnym wynikiem dla antygeny p24 wirusa HIV-1 posiada test Bio-Rad HIV Bioplex 2200, tak więc ten test jest prawdziwie testem piątej generacji. Testy ELISA są obecnie stosowane w diagnostyce w wersji jakościowej do wykrywania ekspozycji na HIV, a w przyszłości poprzez pomiar ochronnej odpowiedzi immunologicznej na HIV mogą być kluczowym narzędziem oceniającym skuteczność szczepionki [2, 3]. Nowe technologie immunochemiczne dotyczą także wykrywania serologicznego innych powszechnie występujących patogenów wirusowych, takich jak: wirus opryszczki, cytomegalowirus, wirusy zapalenia wątroby, RSV itd. [4, 5, 6].

Złożoność metod diagnostycznych w immunodiagnostyce chorób wirusowych wynika z odpowiedzi immunologicznej pacjenta na zakażenie oraz z charakteru czynnika zakaźnego, a także z różnorodności technik i stosowanych testów w laboratoriach (tab. 1 i 2).

Testy	Generacja/test uzupełniający
Abbott Architect, HIV-1, HIV-2, p24	Czwarta generacja
Alere Determine HIV-1, HIV-2, p24 test łączony	Czwarta generacja
Bio-Rad GS HIV-1, HIV-2, p24, ELISA	Czwarta generacja
Bio-Rad BioPlex 2200 HIV ag, Ab	Piąta generacja
Bio-Rad Multispot HIV-1 i HIV-2	Test uzupełniający
Bio-Rad Geenius HIV-1, HIV-2	Test uzupełniający
Gen Probe APTIMA HIV-1, HIV-2, p24	Test uzupełniający
Siemens Centaur HIV-1, HIV-2 i p24 antigen combination	Czwarta generacja

Tab. 1. Zatwierdzone przez FDA (październik, 2015) testy czwartej i piątej generacji do diagnostyki HIV oraz testy uzupełniające.

Nazwa testu	Producent
Elecsys HSV-2 IgG immunoassay	Roche Diagnostics
Elecsys HSV-1 IgG immunoassay	Roche Diagnostics
Bioplex 2200 HSV-1 and HSV-2 IgG kit	Bio-Rad Laboratories
Zeus ELISA HSV GC-1 IgG test system	Zeus Scientific Inc.
Zeus ELISA HSV GC-2 IgG test system	Zeus Scientific Inc.
Liaison HSV-2 type-specific IgG assay	Diasorin Inc.
Liaison HSV-1 type-specific IgG assay	Diasorin Inc.
Euroimmun anti-HSV-2 ELISA (IgG) and anti-HSV-1 ELISA (IgG) kit	Euroimmun US LLC
Captia HSV 2 IgG type-specific ELISA kit	Trinity Biotech USA
Captia HSV 1 IgG type-specific ELISA kit	Trinity Biotech USA
HerpeSelect 2 ELISA IgG	Focus Technologies Inc.
HerpeSelect 1 ELISA IgG	Focus Technologies Inc.
Diamedix IS-HSV 1&2 IgM test system	Diamedix Corp.

Tab. 2. Testy do diagnostyki HSV zatwierdzone przez FDA.

Tab. 3. Korelacja klinicznego stanu pacjenta i odpowiedzi serologicznej na zakażenie EBV [1, 13].

Stan kliniczny	Przeciwciała heterofilne (test ilościowy)	IgM anty-VCA	IgG anty-VCA	anty-EA-D	anty-EA-R	anty-EBNA
Stan zdrowia, brak objawów	-	-	-	-	-	-
Ostre pierwotne zakażenie (IM)	+	+	+	+	-	- *
Świeże pierwotne zakażenie (IM)	+/-	+/-	+	+	-	niskie +
Przebyta infekcja	-	-	+	-	+/-	+
Reaktywacja zakażenia u pacjenta z obniżoną odpornością	-	-	+	-	+	+/-
Chłoniak Burkitta	-	-	+	-	+	+
Rak nosogardła	-	-	+	+	-	+

VCA – antygen apsydowy wirusa (ang. viruscapsid antigen); białko strukturalne kapsydu; EA – wczesny antygen (ang. early antigen); EA – antygeny wytwarzane podczas początkowych etapów replikacji wirusa: EA-D – antygen rozproszony w jądrze i cytoplazmie; EA-R – antygen rozproszony w cytoplazmie; EBNA – antygen jądrowy EBV, pojawia się w fazie latentnej zakażenia, testy serologiczne głównie wykrywają przeciwciała anty EBNA-1 i EBNA-2; IM (ang. infectious mononucleosis) – mononukleozą zakaźną; „+” – wynik dodatni; „-” – wynik ujemny; „+/-” – wynik dodatni lub ujemny; miano dla wyniku ujemnego: IgM anty-VCA (<1:8); IgG anty-VCA (<1:10); anty-EA-D (<1:10); anty-EA-R (<1:10); anty-EBNA (<1:2,5); * anty-EBNA pojawiają się między 3. a 6. miesiącem od zakażenia.

Dodatkowo obraz odpowiedzi immunologicznej ze strony organizmu człowieka jest związany ściśle z występującą jednostką chorobową. Jako potwierdzenie trudnej sztuki interpretacji odpowiedzi immunologicznej pacjenta może posłużyć korelacja stanu klinicznego pacjenta i charakterystyka odpowiedzi serologicznej na zakażenie wirusem Epstein-Barr (EBV) (tab. 3).

Diagnostyka zakażenia to proces złożony, obejmuje fazę przedlaboratoryjną, fazę analityczną wraz z interpretacją

uzyskiwanych wyników badań, jak również etap polaboratoryjny, podczas którego najważniejsza wydaje się poprawność odczytania wyniku laboratoryjnego przez lekarza klinicystę i jego przełożenie na dalsze postępowanie terapeutyczne. Nie jest istotą niniejszej pracy przedstawianie wymagań kompetencyjnych dla personelu medycznego laboratorium diagnostycznego/mikrobiologicznego, w szczególności w zakresie interpretacji wyników badań immunochemicznych. Niemniej należy podkreślić, że immunodiagnostyka chorób

zakaźnych wymaga szerokiej wiedzy z zakresu epidemiologii, etiologii i diagnostyki czynników etiologicznych zakażeń, aktywnej współpracy i wymiany obserwacji oraz doświadczeń pomiędzy personelem medycznym bezpośrednio zaangażowanym w proces diagnostyczno-terapeutyczny (lekarz – diagnosta laboratoryjny – pielęgniarka). Wydaje się więc zasadne, aby interpretacja wyników z tego obszaru leżała w gestii diagnosty laboratoryjnego specjalisty w dziedzinie mikrobiologii/mikrobiologii medycznej/mikrobiologii lekarskiej, mimo że proces diagnostyczny często przebiega w tzw. laboratoriach ogólnych, ze względu na wykorzystywanie w tym celu wieloprofilowych systemów diagnostycznych będących na wyposażeniu tych laboratoriów. To z kolei wymaga ustalenia zasad ścisłej współpracy pomiędzy pracownikami w laboratorium lub różnymi laboratoriami.

Złożony proces diagnostyki wirusologicznej metodami immunochemicznymi stanowi zasadniczy problem dla organizacji i wdrożenia zewnętrznej kontroli jakości (ang. External Quality Control – EQC) w postaci badań biegłości i porównań międzylaboratoryjnych. Podstawowe założenia dla organizatorów badań biegłości wskazane są w normie europejskiej, mającej także statut normy polskiej PN-EN ISO/IEC 17043 „Ocena zgodności. Wymagania ogólne dotyczące badań biegłości” [7]. Opracowanie zasad programu, ustalenie rodzajów obiektów badań i zapewnienie ich jednorodności oraz stabilności, standaryzacja procesu transportu i sposobu postępowania z materiałem klinicznym w laboratorium poddającym się zewnętrznej kontroli jakości zależą między innymi od stosowanych testów i wyposażenia pomiarowo-badawczego w laboratoriach medycznych. Zapewnienie przejrzystości oceny wymaga zatem od organizatora porównań międzylaboratoryjnych znajomości rynku diagnostycznego. W Polsce immunodiagnostykę chorób zakaźnych świadczą zarówno ogólne laboratoria diagnostyczne, jak i laboratoria mikrobiologiczne szerokoprofilowe lub laboratoria specjalistyczne, np. wyłącznie wirusologiczne. Znajomość stosowanych metod i technik diagnostycznych pozwoli na ocenę wyników badań kontrolnych w tzw. grupach aparaturowych czy też odczynnikowych (patrz: rodzaje testów). Istotna jest także liczebność poszczególnych grup. W Polsce Minister Zdrowia powołał w 1997 r. dwa centralne ośrodki, których głównym zadaniem statutowym jest organizacja i prowadzenie zewnętrznych kontroli jakości w medycznych laboratoriach diagnostycznych, w tym także mikrobiologicznych. Są to: Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej w Warszawie [8] oraz bliźniaczy ośrodek w Łodzi – Centralny Ośrodek badań Jakości w Diagnostyce Laboratoryjnej. Niestety do chwili obecnej żaden z tych ośrodków nie organizował sprawdzianów z zakresu immunodiagnostyki chorób zakaźnych, w tym zakażeń wirusowych. Na przełomie 2016 i 2017 roku pracował powołany przez Ministra Zdrowia

Zespół do spraw opracowania koncepcji zmiany funkcjonowania wspomnianych jednostek [9]. Wśród wypracowanych przez Zespół propozycji przedstawionych Ministrowi Zdrowia pojawiła się koncepcja poszerzenia działalności ośrodka mikrobiologicznego o organizację nowych rodzajów porównań międzylaboratoryjnych, m.in. w obszarze immunodiagnostyki chorób zakaźnych. Zadanie to, jeśli uzyska „zielone światło” od resortu zdrowia, będzie stanowić niewątpliwie bardzo duże wyzwanie dla Centralnego Ośrodka Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej. Dotychczas w organizowanym przez ten Ośrodek Ogólnopolskim Sprawdzianie Wiarygodności Badań Mikrobiologicznych, tzw. Programie POLMICRO, uczestniczy blisko 500 laboratoriów mikrobiologicznych. Wprowadzie badania z zakresu immunodiagnostyki chorób zakaźnych wykonuje tylko część laboratoriów mikrobiologicznych, jednak drugą, zdecydowanie bardziej liczebną grupę, stanowią laboratoria diagnostyczne z tzw. grupy ogólnych. To oznacza, że do sprawdzianu wirusologicznego może przystąpić co najmniej 1500 laboratoriów. Wymaga to od jednostki kontrolnej stworzenia nowego zespołu ekspertów, który swoją wiedzą i doświadczeniem sprosta nowemu wyzwaniu. Poniżej przedstawiono różnorodność metod immunodiagnostycznych mających zastosowanie między innymi w diagnostyce zakażeń wirusowych [10, 11].

Wirusowe testy serologiczne wykorzystują standardowe i często manualne lub też zautomatyzowane metody. Najprostsze, tzw. szybkie, przyłóżkowe lub POCT (ang. point of care test), to testy lateksowe lub testy immunochromatograficzne do wykrywania antygenów wirusów lub przeciwciał. Materiałem klinicznym, w zależności od miejsca zakażenia i podejrzewanej etiologii zakażenia, najczęściej jest surowica lub osocze krwi, kał, mocz, ślina lub wydzielina dróg oddechowych, ewentualnie płyn mózgowo-rdzeniowy. Testy te znajdują zastosowanie w wykrywaniu m.in. zakażenia wirusem grypy A/B, RSV, CMV, EBV, Rota- i Adenowirusami. Testy immunoenzymatyczne lub immunoenzymosorpcyjne – ELISA (ang. enzyme-linked immunosorbent assay) to obecnie najpowszechniej stosowane testy w badaniach medycznych, naukowych, jak też diagnostycznych. Służą do wykrywania określonych białek w badanym materiale z użyciem poliklonalnych lub monoklonalnych przeciwciał skoniugowanych z odpowiednim enzymem. Materiał kliniczny stanowi surowica lub osocze krwi oraz inne płyny z jam ciała (np. wydzielina z dolnych dróg oddechowych w kierunku wykrywania RSV). Każdy test immunoenzymatyczny wymaga opłaszczenia fazy stałej przeciwciałem lub antygenem. Fazę stałą na ogół stanowią studzienki 96-dołkowych płytek polistyrenowych lub pleksiglasowych, do których dodaje się odpowiedni antygen lub przeciwciało. Całość następnie jest inkubowana w określonym czasie i określonej temperaturze. Temperatura inkubacji jest jednym z najważniejszych czynników, nie może

jednak przekroczyć 56°C, gdyż w przypadku białek może dojść do ich denaturacji. Istotne znaczenie może mieć także bufor, w którym zawieszony jest czynnik opłaszczający fazę stałą. Te dwa parametry muszą być bezwzględnie poddawane wnikliwej kontroli wewnętrznej podczas wykonywania testu. Istnieją różne odmiany metody ELISA. Bezpośredni test ELISA wykrywa antygen za pomocą jednego tylko przeciwciała związanego ze znacznikiem. W przypadku pośredniego testu ELISA przeciwciało monoklonalne rozpoznające swoiście antygen (przeciwciało pierwszorzędowe, ang. primary antibody) nie jest znakowane. Znakowane jest natomiast przeciwciało drugorzędowe (ang. secondary antibody) przyłączające się do przeciwciała pierwszorzędowego. Ten rodzaj testu nosi nazwę testu podwójnego wiązania. W kompetycyjnych testach ELISA (c-ELISA, z ang. competitive ELISA) wykorzystuje się mieszanę znakowanego antygeny lub przeciwciała, które są dodawane do badanego materiału. Podstawą kontroli jakości wykonywanych testów są próbki kontrolne dodatnie i ujemne.

W teście EIA do wykrywania przeciwciał dodatnie próbki powinny być zawsze określane przez porównanie z kontrolą ujemną; przyjęte jest, że wartości absorbancji 2–3-krotnie wyższe od średniej absorbancji grupy kontroli ujemnych są uważane za pozytywne. Niektóre zestawy mogą zawierać kontrole dodatnie i kalibratory o niskim i wysokim mianie. Do podstawowych ograniczeń metody należą: 1. surowice uzyskane w trakcie ostrej fazy zakażenia mogą zawierać tylko przeciwciała klasy IgM i swoiste IgG nie będą identyfikowane; możliwa jest również sytuacja odwrotna; 2. skażone, żółtaczkowe, lipemiczne, dezaktywowane termicznie lub zhemolizowane surowice mogą dawać błędne wyniki; 3. jakiegokolwiek odstępstwa od określonej procedury mogą mieć wpływ na wynik testu. Zestawy EIA są dostępne do wykrywania przeciwciał dla szerokiej gamy czynników zakaźnych, w tym wirusów (m.in. HIV-1, CMV, wirusa różyczki, HSV, wirusa odry, wirusa świnki, HIV-1/2).

W testach EIA wyniki dodatnie mogą być określane wizualnie na podstawie barwnego punktu końcowego. Można tego również dokonać za pomocą spektrofotometru, co w systemach automatycznych jest dokonywane bez udziału diagnosty laboratoryjnego. Wyniki półilościowe można określić za pomocą standardowych krzywych z wartościami granicznymi określonymi przez kontrole negatywne i analizę regresji standardów. Podstawowe ograniczenia metody to: 1. testy muszą być wykonane zgodnie z instrukcją producenta; 2. niskie poziomy antygeny mogą zostać niewykryte; 3. antygeny obecne w próbkach surowicy w postaci kompleksów antygen-przeciwciało nie zostaną wykryte, chyba że najpierw kompleksy immunologiczne zostaną zdysocjowane. Metoda znajduje zastosowanie m.in. w wykrywaniu RSV i wirusa grypy A w próbkach materiałów klinicznych z dróg oddechowych oraz wykrywaniu antygeny p24 HIV w surowicy.

Testy immunofluorescencyjne, IFA (ang. fluorescent immunassay) – w reakcji pośredniej za pomocą znakowanych fluoresceiną przeciwciał przeciwko ludzkim immunoglobulinom wykrywa się ludzkie przeciwciała związane z danym mikroorganizmem. W reakcji bezpośredniej antygen, reagując ze znakowanym przeciwciałem, daje znakowany kompleks antygen-przeciwciało. Testy te mogą służyć zarówno do wykrywania antygenów wirusowych obecnych w próbkach materiału klinicznego (metody bezpośrednie) lub po namnożeniu wirusa w hodowlach komórek zakażonych materiałem klinicznym do jego identyfikacji, jak też do określania miana swoistych przeciwciał w surowicy. Rozcieńczoną seryjnie surowicę pacjenta nakrapia się na kilka specjalnie przygotowanych pól na szkiełku mikroskopowym, na których zostały umieszczone i utrwalone komórki eksponujące białka wirusowe. Po etapie inkubacji w komorze wilgotnej i w temperaturze 37°C niezwiązane przeciwciała odpłukuje się buforem i następnie ponownie inkubuje ze znakowaną fluorochromem surowicą zwierzęcą zawierającą przeciwciała przeciw ludzkiej immunoglobulinie (IgG lub IgM). Po przemyciu buforem preparat zamyka się w odpowiednim podłożu montującym szkiełkiem nakrywkowym i ocenia w mikroskopie fluorescencyjnym. Najwyższe rozcieńczenie surowicy pacjenta, które wykazuje swoistą immunofluorescencję, nazywa się mianem. Miano można oznaczać zarówno dla IgG, jak i IgM w zależności od swoistości znakowanej fluorochromem surowicy zwierzęcej. Miano przeciwciał można oznaczać w pojedynczej surowicy, jednak aby udokumentować niedawną infekcję, potrzebne są dwie próbki, pobrane w fazie ostrej zakażenia (zebrane we wczesnym stadium choroby) i w fazie rekonwalescencji (zebrane 2–3 tygodnie później) w celu wykazania co najmniej 4-krotnego przyrostu miana przeciwciał przeciwko badanemu antygenowi. Podstawą kontroli jakości testu immunofluorescencji jest: 1. uwzględnianie przy każdym teście przeprowadzonym na próbkach od pacjentów surowic kontrolnych ujemnych, surowic dodatnich o niskim mianie i o wysokim mianie; 2. kontrola negatywna zwykle testowana przy mianach 4 i 16, podczas gdy kontrole pozytywne o niskim i wysokim mianie są prowadzone w 4 rozcieńczeniach, zwykle jedno 2-krotne rozcieńczenie poniżej i dwa 2-krotne rozcieńczenia powyżej spodziewanego miana (np. jeśli kontrola dodatnia ma miano 64, powinna być testowana przy rozcieńczeniu 32, 64, 128 i 256). Ograniczeniem metody jest obecność w surowicy pacjenta czynnika reumatoidalnego – możliwość uzyskania fałszywie dodatnich wyników dla obu klas przeciwciał: IgM i IgG. Testy IFA znajdują zastosowanie w wykrywaniu zakażeń różnymi czynnikami wirusowymi, np. CMV, HSV, HIV-1 [12].

Powyższe informacje przemawiają za wdrożeniem takiego programu zewnętrznej oceny jakości, EQA (ang. External Quality Assessment), który obok poprawności analitycznej, na podstawie odpowiednich przypadków klinicznych,

sprawdzałyby umiejętność kompleksowego analizowania wyników badań immunochemicznych oraz jakość interpretacji klinicznej. Obecnie polskie laboratoria mają możliwość uczestniczenia w programach międzynarodowych organizowanych m.in. w Finlandii, Wielkiej Brytanii, Niemczech. Programy te są odpłatne, a stosunkowo wysoki koszt udziału w sprawdzianach sprawia, że tylko nieliczne polskie laboratoria medyczne poddają się tej kontroli. Kluczowym elementem zewnętrznej kontroli jakości jest regularna wewnętrzna kontrola jakości w laboratorium. I tak np. w Stanach Zjednoczonych laboratoria pozostające pod nadzorem CLIA, Clinical and Laboratory Improvement Amendment, zobowiązane są w procedurze diagnostyki zakażenia wirusem HIV do stosowania każdego dnia dodatkowo i negatywnej kontroli lub przedstawienia analizy wyników indywidualnego programu kontroli jakości przy każdym zastosowaniu testów, podczas gdy zgodnie z zaleceniami producentów testów, kontrole pozytywna i negatywna powinny być stosowane dla nowej serii testu lub przy nowej dostawie testu z serii już używanej. Nieprawidłowe wyniki kontroli wewnętrznej gwarantują niejako niepoprawny wynik kontroli zewnętrznej. Dlatego też podstawowym zadaniem każdego laboratorium jest realizacja procedur wewnętrznej kontroli jakości, w szczególności w zakresie krytycznych etapów procedur badawczych. Z pomocą przychodzi polskim laboratoriom firmy diagnostyczne oferujące użytkownikom produkowanych przez siebie testów i/lub aparatury materiały kontrolne o różnych poziomach wartości badanych parametrów. Pozwala to potwierdzić laboratoriom swoje kompetencje do wykonywania danych testów, jednakże badania zewnętrzne oparte na „uniwersalnych” próbkach kontrolnych pozwalają określić biegłość laboratoriów do wykonywania określonych badań na tle innych laboratoriów poddających się tej samej kontroli.

KONFLIKT INTERESÓW: nie zgłoszono.

PIŚMIENNICTWO

1. Jenson HB. Epstein-Barr virus, W: Detrick B, Hamilton R, Folds J (ed), *Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology*, 7th ed. ASM Press, Washington, DC, USA. 2006, 637–647.
2. Branson B, Mermin J. Establishing the diagnosis of HIV infection: new tests and a new algorithm for the United States. *J Clin Virol* 2011;52(Suppl. 1):S3–S4 [doi: 10.1016/j.jcv.2011.09.024].
3. Muthukumar A, Alatoon A, Burns A, i wsp. Comparison of 4th-generation HIV antigen/antibody combination assay with 3rd-generation HIV antibody assays for the occurrence of false-positive and false-negative results. *Lab Med* 2015;46(2):84–89 [doi: 10.1309/LMM3X37NSWUCMVR5].
4. Odumade OA, Hogquist KA, Balfour HH Jr. Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. *Clin Microbiol Rev* 2011;24:193–209 [doi: 10.1128/CMR.00044-10].
5. Steece RS, Talley MS, Skeels MR, Lanier GA. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, hemagglutination inhibition, and passive latex agglutination for determination of rubella immune status. *J Clin Microbiol* 1985;21(1):140–142.
6. Wald A, Ashley-Morrow R. Serological testing for herpes simplex virus (HSV)-1 and HSV-2 infection. *Clin Infect Dis* 2002;35(Suppl. 2):S173–S182 [doi: 10.1086/342104].
7. PN-EN ISO/IEC 17043:2011 Ocena zgodności. Wymagania ogólne dotyczące badań biegłości. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa, 2011.
8. Zarządzenie Ministra Zdrowia z 11 czerwca 2010 r. w sprawie Centralnego Ośrodka Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej (Dz. urz. Min. Zdrow. poz. 44 z późn. zm.).
9. Zarządzenie Ministra Zdrowia z 6 października 2016 r. w sprawie powołania Zespołu do spraw opracowania koncepcji zmian w zakresie funkcjonowania ośrodków badań jakości w diagnostyce laboratoryjnej i mikrobiologicznej.
10. Janda JM. Immunology, W: Isenberg HD (ed), *Essential Procedures for Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington, DC. 1998, 561–577.
11. Gartner BC. Epstein-Barr virus, W: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (ed), *Manual of Clinical Microbiology*, 10th ed. ASM Press, Washington, DC, USA. 2011, 1575–1584.
12. Singh A, Preiksaitis J, Ferenczy A, Romanowski B. The laboratory diagnosis of herpes simplex virus infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2005;16(2):92–98.
13. Miller LE. Epstein-Barr virus. W: Leber AL (ed), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 4th ed. ASM Press, Washington, DC, USA, 2016, 11.9.11–11.9.31.