

Diagnosta Laboratoryjny

Rok 6, numer 1 (16)
kwiecień / maj 2008

GAZETA KRAJOWEJ IZBY
DIAGNOSTÓW LABORATORYJNYCH

GAZETA
BEZPŁATNA

Na trakcie do samorządu i uznania zawodu diagnosty i badań laboratoryjnych za fundament w procedurach medycznego postępowania są wśród nas od początku Pionierzy i Nestorki polskiej diagnostyki laboratoryjnej. Wkład w uznanie laboratoryjnych badań diagnostycznych za ważne dla współczesnej, naukowej medycyny mają Panie:

Prof. Wanda Dobryszczycka

Prof. Mieczysława Zofia Merkel





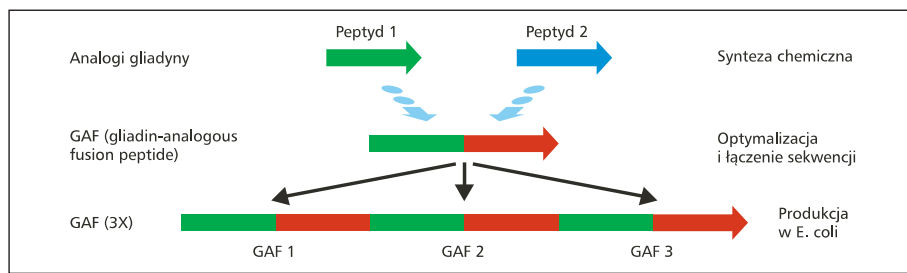
Przeciwciała przeciwko deamidowanym peptydom gliadyny jako istotny biomarker celiakii

C. Prause¹, C. Probst², C. Dähnrich², W. Schlumberger², W. Stöcker², T. Richter³,
A. C. Hauer⁴, M. Stern⁵, H. Uhlig⁶, M. Laas⁷, K.-P. Zimmer⁸, and T. Mothes¹

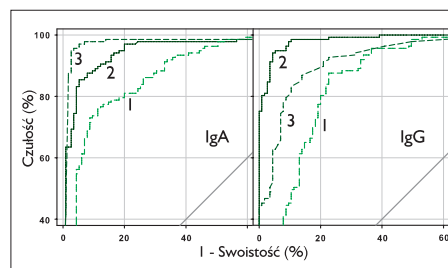
¹Institute for Laboratory Medicine at the University clinic of Leipzig, Germany

²Institute of Experimental Immunology, filia EUROIMMUN, Lübeck, Germany

Children's clinics at the Municipal clinic of Leipzig³, the University clinics of Graz⁴, Austria, Tübingen⁵, Leipzig⁶, Dresden⁷, Giessen-Marburg⁸, Germany



Schemat powstania GAF(3X)



Krzywe ROC dla sześciu testów
1 = anti-Gli, 2 = anti-GAF(3X), 3 = anti-tTG

Wstęp

Przeciwciałami charakterystycznymi dla celiakii są przeciwciała klasy IgA oraz IgG przeciwko natywnej gliadynie (**anti-Gli**) oraz przeciwciała przeciwko transglutaminazie tkankowej (**anti-tTG**). Zwykle przeciwciała anti-Gli mają niższą czułość i swoistość niż anti-tTG. Ostatnio opisano swoiste przeciwciała przeciwko syntetycznym peptydom, które są pochodnymi częściowo deamidowanej gamma-gliadyny (Schwertz et al. 2004). Poniżej przedstawiamy prosty do wykonania test **ELISA** do pomiaru przeciwciał przeciwko **analogowi gliadyny** - peptydowi powstałemu na skutek **fuzji sekwencji DNA kodujących napeptydy gliadyny** (anti-GAF(3X)), który wykazuje bardzo wysoką trafność diagnostyczną dla pacjentów z chorobą trzewną.

Metody

DNA kodujący GAF(3X) zawierający 3 powtarzające się zmodyfikowane kopie uprzednio opisywanych peptydów, PLQPEQFPF i PEQLPQFEE, w których podstawiono glutaminę w miejsce kwasu glutaminowego (Schwertz et al. 2004) został sklonowany w prokariotycznym wektorze, a następnie uległ ekspresji w E.coli. Płyty mikrotitracyjne opłaszczono peptydem **GAF (3X)**. Związane przeciwciała są wykrywane dzięki anty-ludzkim przeciwciałom klasy IgA oraz IgG znakowanym peroksydazą chrzanową (POD). Jako

referencję wykonano badania za pomocą testu ELISA (EUROIMMUN) do oceny przeciwciał klasy IgA i IgG anti-Gli i anti-tTG. Przebadano 137 surowic (56 mężczyzn, 81 kobiet, średnia wieku 8 lat) pochodzących od pacjentów z celiakią potwierdzoną biopsją jelita (uszkodzenia wg skali Marsh'a II i III stopnia), którzy w momencie badania byli na normalnej diecie zawierającej gluten oraz 115 surowic kontrolnych, pochodzących od pacjentów, u których na podstawie biopsji jelita nie potwierdzono celiakii (60 mężczyzn, 55 kobiet, średnia wieku 9 lat). **Wiarygodność diagnostyczna testów** była obliczona na podstawie analizy ROC (receiver-operating characteristic) i AUC (area under the curve). **Trafność diagnostyczną** wyrażono w procentach jako sumę wyników prawdziwie pozytywnych oraz prawdziwie negatywnych podzieloną przez całkowitą liczbę pacjentów (pacjenci z celiakią plus pacjenci kontrolni).

Wyniki

Wartość AUC była znacząco większa ($p < 0.0001$) dla anti-GAF(3X) niż dla anti-Gli: IgG anti-GAF(3X) - 99%, natomiast IgG anti-Gli - 86% i dla IgA anti-GAF(3X) - 95%, a dla IgA anti-Gli - 89%. Nie było znaczących różnic ($p < 0.05$) wartości AUC pomiędzy anti-GAF(3X) i IgA anti-tTG (98%). **Trafność diagnostyczna przeciwciał IgG Anti-GAF(3X) wynosiła 95%, zaś prze-**

Anti-GAF(3X)		Anti-tTG	liczba pacjentów z CD
IgA	IgG	IgA	(razem: 137)
+	+	+	117
-	+	+	10
-	-	+	3
-	+	-	2
-	-	-	5

Anti-GAF(3X)		Anti-tTG	liczba pacjentów kontrolnych
IgA	IgG	IgA	(razem: 115)
+	+	+	2
-	+	+	1
+	+	-	2
+	-	-	4
-	-	-	106

ciwciał IgA anti-tTG - 96%. Jeden pacjent z celiakią wykazywał niedobór IgA: dał on negatywny wynik przeciwciał anti-tTG IgA, ale pozytywny w klasie IgG anti-GAF(3X).

Dyskusja

Nowatorski test Anti-GAF(3X) ELISA, w którym użyto wybiórczo deamidowanych peptydów gliadyny stanowi cenne narzędzie w diagnostyce celiakii. W teście tym **uniknięto nieswoistości**, uznawanej za nieodłączny element w wykrywaniu przeciwciał przeciwko natywnej niezmodyfikowanej gliadynie. **Trafność diagnostyczna testu ELISA Anti-gliadyna (GAF-3X) dla przeciwciał klasy IgG jest wyższa niż dla przeciwciał klasy IgA i porównywalna z testem Anti-tTG IgA.**

Nowy test Anti-GAF(3X) ELISA może być stosowany do screeningu populacji, do wczesnej diagnostyki celiakii, monitorowania diety bezglutenowej oraz do identyfikacji pacjentów z chorobą trzewną z niedoborem IgA.

	Anti-Gli		Anti-GAF (3X)		Anti-tTG	
	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG
AUC (%)	88.9	85.9	95.4	98.7	97.6	92.8
Czułość (%) przy 95% swoistości	56.2	X	83.2	94.2	95.6	62.8
Na podstawie cut-off wyliczonego dla maksymalnej sumy czułości i swoistości						
Czułość (%)	75.9	87.6	85.4	94.2	94.9	86.9
Swoistość (%)	88.7	77.4	94.8	95.7	97.4	86.1
Ilość fałszywie negatywnych	33	17	20	8	7	18
Ilość fałszywie pozytywnych	13	26	8	5	3	16
Trafność diagnostyczna	81.8	82.9	88.9	94.8	96.0	86.5

X - wyliczenie niemożliwe, ponieważ najwyższa swoistość przeciwciał anti-Gli IgG wynosi 94,8%



Zdrowia Publicznego CMKP dostrzega taką drogę. Oto w Jej wskazaniach jest potrzeba dyskusji merytorycznej na temat ubezpieczenia ryzyka choroby.

**Prezes KRDL
Henryk Owczarek**

Anna Wilmowska

Ubezpieczenie ryzyka choroby

Aktualnie toczące się w naszym kraju dyskusje na temat ubezpieczenia ryzyka choroby ograniczają się głównie do ustalenia okresu w którym płatnikiem zasiłku chorobowego z tytułu czasowej niezdolności do pracy ma być pracodawca lub Zakład Ubezpieczeń Społecznych. Natomiast nie ma dyskusji merytorycznej na temat ubezpieczenia ryzyka choroby w jednym ubezpieczeniu czyli połączenia ryzyka zdrowia (NFZ) z ryzykiem choroby (ZUS, KRUS).

W Kasie Chorych w Polsce przed wojną z tytułu ubezpieczenia ryzyka choroby ubezpieczeni otrzymywali pomoc lekarską, położniczą, szpitalną i świadczenia pieniężne zasiłek chorobowy z tytułu czasowej niezdolności do pracy, zasiłek pogrzebowy. Podobnie jest w krajach gdzie ryzyko choroby jest ubezpieczane w ubezpieczeniu chorobowym (Niemcy, Francja itp.), które gwarantuje pokrycie ściśle określonych świadczeń rzeczowych i świadczeń pieniężnych.

Należy więc stosować zasadę jedno ryzyko podlega jednemu ubezpieczeniu z którego powinny być finansowane

- świadczenia rzeczowe (obecnie świadczenia zdrowotne) oraz:

- świadczenia pieniężne (zasiłek chorobowy jako rekompensata zarobków utraconych z powodu choroby, świadczenia rehabilitacyjne i inne).

Wynika to z faktu, że od prawidłowości i sprawności procesu diagnozowania, leczenia i rehabilitacji, w większości przypadków zależy długość okresu czasowej niezdolności do pracy, a więc okresu pobierania zasiłku chorobowego.

A więc sytuacja, w której diagnozowanie, leczenie, rehabilitacja oraz wypłata świadczeń pieniężnych z tytułu czasowej niezdolności do pracy spowodowanej chorobą jest finansowana

i kontrolowana przez tą samą instytucję która ubezpiecza w całości ryzyko choroby jest merytorycznie uzasadniona.

Rozdzielenie ryzyka choroby i płatności składek na ten cel do 2 funduszy (NFZ i ZUS) ogranicza możliwości dalszego zmniejszenia wypłat z tytułu czasowej niezdolności do pracy. Uzyskano zmniejszenie tych wypłat o 40 % po wprowadzeniu kontroli zwolnień lekarskich w 1999 r. - ale tylko w zakresie stwierdzenia czy osoba ubezpieczona jest czy nie jest czasowo niezdolna do pracy w dniu badania przeprowadzonego przez lekarza orzecznika dokonującego tej kontroli.

Natomiast mimo tego, że to właśnie lekarze leczący pacjenta orzekają o czasowej niezdolności do pracy dla wypłaty zasiłków chorobowych nie funkcjonują w systemie ochrony zdrowia instrumenty połączonej kontroli jakości, celowości udzielanych przez lekarza świadczeń zdrowotnych czyli prawidłowości, szybkości, skuteczności postępowania diagnostyczno-leczniczego oraz zależnego od tych działań okresu czasowej niezdolności do pracy spowodowanej chorobą.

Brak należytej sprawności w funkcjonowaniu systemu ochrony zdrowia o różnorodnym uwarunkowaniu sprzyja przedłużaniu okresu zasiłkowego, a więc zwiększa nakłady finansowe na wypłatę zasiłków chorobowych i demotywyje pracowników do powrotu do pracy.

Dlatego też wydaje się koniecznym połączenie tych dwóch funduszy w jedno ubezpieczenie chorobowe (podobnie jak przed wojną w Polsce oraz aktualnie w innych krajach), które zapewniłoby dostępność, fachowość i skuteczność niezbędnych świadczeń służących:

- pomocy w zachowaniu zdrowia,
 - zapobieganiu chorobom,
 - Wczesnemu prawidłowemu rozpoznawaniu choroby,
 - szybkiemu i skutecznemu wdrożeniu postępowania leczniczego,
 - kompleksowej rehabilitacji medycznej
- Takie jednolite ubezpieczenie chorobowe zapewniałoby także wypłatę świadczeń pieniężnych z tytułu:
- czasowej niezdolności do pracy (zasiłki chorobowe, świadczenia rehabilitacyjne),
 - opieki nad chorym członkiem rodziny (zasiłki opiekuńcze),
 - zgonu (zasiłki pogrzebowe)

Długość okresu pobierania zasiłku chorobowego i świadczenia rehabilitacyjnego jest nierozdzielnie związana z jakością świadczeń medycznych w razie choroby czyli w większości przypadkach jest uzależniona od prawidłowości postępowania diagnostyczno-terapeutycznego. Obecny system nie motywuje lekarzy do zachowań mających na celu racjonalizację wydatków związanych z procesem leczenia w skład którego wchodzi: diagnostyka, leczenie, rehabilitacja i orzekanie o potrzebie powstrzymywania się osoby ubezpieczonej od wykonywania pracy. W wielu przypadkach zasiłek chorobowy staje się

W NUMERZE

Ubezpieczenie ryzyka choroby	3 - 4
Validacja metod badawczych	4
CZYNNIKI LABORATORYJNE I POZA LABORATORYJNE WPLYWAJĄCE NA WARTOŚĆ POMIARU ANALITYCZNEGO	5 - 10
Znaczenie badań mikrobiologicznych u pacjentów z ranami przewlekłymi	10-12
Diagnostyka wagi bakteryjnej i atypowych zakażeń przenoszonych drogą płciową.	13-17
Powstawanie biofilmu bakteryjnego i jego konsekwencje nowym wyzwaniem współczesnej medycyny	18-20
Związek adiponektyny z zespołem metabolicznym	20-23

W biuletynie:

- Uchwały piątego posiedzenia II kadencji KRDL

- Uchwały szóstego posiedzenia II kadencji KRDL

- Uchwały Prezydium KRDL II Kadencji

WYDAWCA

Krajowa Rada
Diagnostów Laboratoryjnych

Redakcja:

Henryk Owczarek - Prezes KRDL
Czesław Główniak - Sekretarz KRDL
Stanisław Kreżel - Red. Naczelny
Marcin Ruszkiewicz - Red. Techniczny
Grzegorz Szych - Konsultacja Tech.
 Nakład 12000 + 500 egz.

Druk: Drukarnia A-Z

Andrzej Zieliński

03-741 Warszawa ul. Białostocka 42

Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych
 03-428 Warszawa; ul. Konopacka 4
 tel. (022) 741-21-55; (022) 741-21-57 (022) 741-11-60;
 faks: (022) 741-21-56

Nazwa Odbiorcy: Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych.
 03-428 Warszawa; ul. Konopacka 4
 Numer rachunku: 72102010420000880200105692
 Bank PKO BP. IV Oddział Warszawa

świadczeniem zastępczym procesu diagnostyczno-leczniczego czasem prowadzącym do opóźnienia leczenia mogącego skutkować długotrwałą niezdolnością do pracy (rentą). W razie takiego postępowania lekarz chcąc „złagodzić” jego skutki znajduje dla siebie usprawiedliwienie dla dalszych działań mających na celu uzyskanie przez pacjenta prawa do renty.

Błędnie postawione rozpoznanie, nieodpowiednie leczenie oraz brak kompleksowej rehabilitacji od początku choroby może prowadzić do niepełnosprawności, a nawet niesamodzielności i związanych z tym olbrzymich kosztów społecznych i ekonomicznych.

W połączonych funduszach: zdrowotnym, chorobowym należałoby wprowadzić standaryzację świadczeń medycznych i kontrolę ich jakości co może doprowadzić do skrócenia okresu niezdolności do pracy a tym samym, do zmniejszenia wypłat zasiłków chorobowych z tytułu czasowej niezdolności do pracy. Dzięki temu więcej środków pieniężnych można byłoby przeznaczyć na poprawę jakości diagnostyki, leczenia i rehabilitacji. Przyjęcie tego rozwiązania zapewniłoby także możliwość kontroli jakości i prawidłowości całego procesu diagnostyczno-leczniczorehabilitacyjno-orzeczniczego przez służby medyczne ubezpieczenia chorobowego. Służby te powinny dokonywać kontroli i oceny celowości, kompletności i kosztów badań diagnostycznych koniecznych dla postawienia prawidłowej i wczesnej diagnozy, zasadności zastosowanego leczenia (standaryzacja?), procesu kompleksowej rehabilitacji (nie tylko medycznej) mającej na celu zapobieganie niepełnosprawności i niesamodzielności, dokumentowania procesów diagnostyczno-leczniczorehabilitacyjnych oraz prawidłowości orzekania o czasowej niezdolności do pracy. Orzekanie o czasowej niezdolności do pracy powinno być dokonywane przez lekarzy mających kontrakt z proponowanym połączonym funduszem chorobowym.

Obecna sytuacja, w której o prawie do świadczeń spowodowanych czasową niezdolnością do pracy z powodu choroby orzekają wszyscy lekarze leczący pacjentów (nie tylko mający kontrakty z NFZ), a ZUS zbiera składki i ponosi wydatki związane z wypłatą zasiłków chorobowych nie jest merytorycznie ani logicznie zasadna.

Obecne rozwiązania organizacyjne (ubezpieczenie ryzyka choroby przez 2 niezależne instytucje) nie dają również gwarancji ochrony danych osobowych osoby ubezpieczonej dotyczących stanu jej zdrowia i stosowanych procedur diagnostyczno-leczniczorehabilitacyjnych.

Połączenie funduszu zdrowotnego z funduszem chorobowym w jeden fundusz ubezpieczający ryzyko choroby, zapewniłoby realizację zaleceń Komitetu Ministrów dla Państw Członkowskich Rady Europy z 18.1.1989 r. w sprawie ochrony danych dotyczących stanu zdrowia pracownika wykorzystywanych w związku z zatrudnieniem pracownika.

Zapewniałoby też odpowiednie środki zabezpieczające dostęp do tych danych wyłącznie dla służb medycznych instytucji ubezpieczenia chorobowego.

Kumulacja tych danych (przy zapewnieniu zachowania tajemnicy zawodowej i służbowej) umożliwiłaby dysponowanie w systemie ochrony zdrowia bardzo istotnymi dla prowadzenia polityki zdrowotnej państwa informacjami o stanie zdrowia ludności, zachorowalności, stosowanych procedurach diagnostyczno-leczniczorehabilitacyjnych, a także przyczynach absencji chorobowej i długości okresów czasowej niezdolności do pracy w poszczególnych jednostkach chorobowych.

Należy więc dążyć do połączenia i ujednolicenia składek na ubezpieczenie chorobowe i zdrowotne i wprowadzenia kompleksowej kontroli jakości świadczeń rzeczowych i pieniężnych udzielanych z tego ubezpieczenia.

Doprowadzi to do racjonalizacji wydatków publicznych przeznaczonych na pokrycie świadczeń związanych z wystąpieniem choroby, a więc optymalizacji wydatków na zasiłki chorobowe w wyniku integracji świadczeń rzeczowych i pieniężnych w jednym ubezpieczeniu. Może się również przyczynić do zwiększenia dostępności ubezpieczonych do świadczeń rzeczowych z powodu zmniejszenia wydatków na świadczenia pieniężne.

Pozwoli to także na:

- przetwarzanie i dostęp do danych dotyczących stanu zdrowia osób ubezpieczonych przez służby medyczne jednej instytucji ubezpieczającej ryzyko choroby, a więc do zachowania tajemnicy lekarskiej i służbowej w tej dziedzinie.

WALIDACJA METOD BADAWCZYCH

Bogumiła Hajdrowska

Norma ISO 9000 definiuje walidację jako „potwierdzenie oparte na wynikach przeprowadzonych badań i udokumentowaniu (informacji, której prawdziwość można udowodnić i która opiera się na faktach uzyskanych w drodze obserwacji, pomiaru, badania albo innych metod), że szczególne wymagania związane z przewidywanym ściśle określonym użytkowaniem zostały spełnione”. Taki opis walidacji mówi nam w sferze badań, że metodę badawczą należy przebadać pod tym kątem, czy nadaje się ona do prawidłowego rozwiązania zadania zleconego laboratorium. Badanie to określenia dla wszystkich czynności, które mogą wywierać wpływ na wynik, szczególnie niepewność badania, jak np. pobieranie próbek, ich transport, przygotowanie próbek do badania, właściwe stwierdzenie wartości cech próbki, obliczenie wyniku końcowego.

Postępowanie walidacyjne można przedstawić w następujący sposób:

I. Warunek wstępny na przeprowadzenie postępowania walidacyjnego

Zanim przystąpimy do walidacji należy ustalić zadanie lub problem do rozwiązania lub wymaganie, które ma być spełnione oraz warunki brzegowe. Na tej podstawie można będzie określić niezbędne właściwości/cechy metody badawczej oraz wymagania wobec niej.

II. Walidacja.

1 etap walidacji: CHARAKTERYZACJA (ustalenia)

Ustalenie niezbędnych cech charakterystycznych metody badawczej oraz nadanie im wartości liczbowych, tzn. scharakteryzowanie metody. Oceny dokonuje się przez porównanie takich parametrów, jak np.: poprawność, specyficzność, czułość, precyzja, odporność na czynniki zewnętrzne itp. Parametry te ustalane są w drodze systematycznego badania przy założeniu określonych warunków brzegowych.

2 etap walidacji: PORÓWNANIE (weryfikacja)

Porównanie wartości cech charakterystycznych metody badawczej, ustalonych w czasie charakteryzacji z wartościami cech niezbędnych do rozwiązania istniejącego zadania, przy założonych warunkach brzegowych.

3 etap walidacji: POTWIERDZENIE (zakwalifikowanie)

Formalne potwierdzenie, że przewidziana metoda badawcza nadaje się do rozwiązania istniejącego zadania lub spełnienia wymagania przy założonych warunkach brzegowych.

Przy wszystkich metodach pierwszego etapu walidacji obowiązuje zasada, iż ustalone parametry mają zastosowanie tylko w odniesieniu do konkretnego zakresu badań i określonych warunków brzegowych. Oto różne metody ustalania charakterystycznych parametrów metody badawczej:

- systematyczne badanie czynników wpływających na wynik. Typowymi czynnikami mającymi wpływ na wynik są np.: wpływ czasu oznaczenia, temperatura.

- porównanie z wzorcami odniesienia, np.: badanie kontroli ujemnej i dodatniej w zestawie testu (np.:antygen Hbs), kontrola normalna i patologiczna.

- porównanie z innymi metodami-porównanie wyników badań przeprowadzonych na tym samym obiekcie innymi metodami

- porównawcze badania międzylaboratoryjne

- szacowanie „niepewności wyniku”. Metodę rozkłada się na poszczególne moduły, jak np.: pobieranie próbki, przygotowanie próbki i jej oznaczenie. Reguła ta wymaga oszacowania w procentach niepewności wyniku każdego etapu metody badawczej i jej wpływu na końcowy wynik badania.

Wiedza laboratorium na temat niepewności wyników różnych etapów metody badawczej bazuje w praktyce na różnych doświadczeniach. Często jest to niedostateczna wiedza, która napotyka na realne trudności, z którymi musi się borykać osoba walidująca. Często więc charakteryzacja metody badawczej składa się z kombinacji wymienionych metod.

Kierownik laboratorium jest odpowiedzialny za to, aby wszystkie metody były

„scharakteryzowane” i zatwierdzone. Charakterystykę metody oraz jej wyniki należy udokumentować i przechowywać tak, aby materiał ten był w każdej chwili dostępny dla użytkownika. W procesie akredytacyjnym dokumenty te stanowią dowód, że laboratorium oparło daną metodę badawczą i kwalifikuje się do akredytacji.

**„CZYNNIKI LABORATORYJNE I POZA
LABORATORYJNE WPŁYWAJĄCE NA WARTOŚĆ
POMIARU ANALITYCZNEGO”**

**Andrzej Dukwicz
Zakład Biofizyki;
CMKP Warszawa;**

Motto W. A. Shewhart'a: "Celem laboratorium jest ustanowienie ekonomicznych działań spełniających ludzkie potrzeby, a jednocześnie minimalizację czynności wymagających ludzkiego wysiłku. Co za tym idzie, istnieje potrzeba wyznaczenia granic, w których wyniki ludzkiego działania powinny się mieścić, aby były ekonomiczne. Przekroczenie tych granic wskazuje na pogorszenie się procedury (procesu) laboratoryjnego. Uszkodzona procedura będzie nieekonomiczna do momentu usunięcia uszkodzenia (tej procedury).

Przestrzeganie tych zasad pozwala na uzyskanie właściwej jakości satysfakcjonującej ludzkie potrzeby przy minimum kosztów (funkcja Montgomeryego).

Diagnosta laboratoryjny to specjalista obejmujący swoją wiedzą dwa nurty medycyny stosowanej: diagnostykę i analizę laboratoryjną. „Diagnosta” to specjalista podejmujący decyzje o stanie pacjenta na podstawie analitycznych przesłanek o pomiarze jakościowym lub/i ilościowym prób biologicznych pobranych od badanego. Diagnosta laboratoryjna, nazywana „komentarzem laboratoryjnym”, powinna być tak sformułowana, aby była przydatna lekarzowi prowadzącemu pacjenta podczas terapii.

Słowo „laboratoryjny” intuicyjnie wiążemy z działalnością analityczną diagnosty laboratoryjnego. Ta profesja jest treścią niniejszego referatu

W opracowaniu autor będzie się starał o utrzymaniu znormalizowanej nomenklatury w opisie problemów analityczno diagnostycznych.

W krajowej, fachowej literaturze pojęcie dwóch słów „próbka” i „próbka” merytorycznie nie jest zróżnicowane. Według standardów USA słowo „specimen” odpowiada słowu „próbka” i odnosi się do tej części materiału biologicznego, która została pobrana od pacjenta. „sample”- „próbka”, to ta część materiału biologicznego, która została pobrana z próby, w celu przeprowadzenia analizy. Procedura laboratoryjna (analiza) kończy się najczęściej odczytem wielkości mierzonej np. produktu reakcji wskaźnikowej, którym może być (A) absorbancja. Wynikiem tego działania jest pomiar. Schematycznie tę czynność można zapisać w następujący sposób”

$$\sum V = V_{doz} + V_{nix} + V_{dil} + V_{bio} + V_{ink} + V_{temp} + V_{czas} \dots + V_N$$

gdzie „V” oznacza wariancję. Częstym błędem popełnianym podczas opisu procedury analitycznej jest nazywanie jej „testem”, „oznaczeniem”, czy „badaniem”. Słowo „badanie” przypisywane jest analizie chemicznej lub cytologicznej, a słowo „test” jest jedynie zgodne nomenklaturowo z procedurą analizy jakościowej. To jest rzeczywiście czynność sprawdzenia obecności analitu w próbce z odpowiedzią w postaci słów „tak” lub „nie” lub znaków +++ albo ---. Zgodnie z teorią informacji ta klasa informatycznej postaci wyniku nazywana jest „binarną”. Kolejne synonimy informatyczne dotyczące opisu postaci wyniku to: forma „dyskretna” (liczbowa) wyrażana w jednostkach pomiarowych np. mg/dl. Do tej klasy wyników należą trzy jednakoowo brzmiące, posiadające identyczną wartość liczbową i wygląd, a jedynie różne pochodzeniem. Wyniki te nazywane są: ilościowymi, półilościowymi i skryningowymi. Interpretacja diagnostyczna z zastosowaniem tych wyników bez podania źródła pochodzenia (bez adresu informatycznego) może prowadzić do znacznych nieporozumień między lekarzem, laboratorium i pacjentem. Wg prof. J. Sznajda błąd w skrajnie niekorzystnych warunkach pomiaru (z powodu hematokrytu) może dochodzić do 20% wartości bezwzględnej stężenia glukozy, oznaczanej metodą rutynową w surowic lub osoczu, a wynikiem analizy glukozy w pełnej krwi np. glukometrem. Przyczyną pierwotną tego stanu rzeczy jest zawartość glukozy w erytrocytach, które wypierają pewną ilość surowicy z odmierzanej próbki o

stężeniu wyższym glukozy, co w efekcie końcowym powoduje zaniżanie zawartości glukozy na wyniku pomiaru w pełnej krwi. Pełna informacja o rodzaju próbki, metodzie oznaczania, rodzaju analizy podczas interpretacji ma dla lekarza kapitalne znaczenie zwłaszcza podczas działania intensywnego, czy wypadkowego (skryning).

Kolejnymi postaciami informatycznymi wyniku laboratoryjnego jest forma „ciągła” (wykres), „zbiorcza” to znaczy (wszystkie wynik z danego dnia zebrane na jednym formularzu), „przestrzenna” (wszystkie wyniki z danego czasokresu pobytu w szpitalu zebrane na jednym formularzu) oraz postać „zagęszczona” to flaga przy wyniku patologicznym, lub (komentarz analityczny, opis analityczny dawniej nazywany „diagnozą laboratoryjną).

Możliwość swobodnego posługiwania się pojęciem informacja wymaga wiedzy dodatkowej, dotyczącej jej cech takich jak:

1. Wartość informacji mierzona w jednostkach prawdopodobieństwa (% niewiedzy).
2. Miara informacji (ilość) mierzona w bitach.
3. Znaczenie informacji opis.
4. Subiektywność informacji adres odbiorcy@.

Wymienionym powyżej regułom propagacji informacji podlega także „kanał krytycznej informacji”, za którego utworzenie odpowiedzialny jest diagnosta laboratoryjny. Celem założenia kanału transmisji informacji krytycznej jest zbieranie wszystkich (prawdziwych i nieprawdziwych) informacji dotyczących wyniku pomiaru analitycznego. Krytyczna informacja jest konieczna dla zwiększania wiarygodności pomiarów analitycznych i niezbędna podczas szkoleń wewnątrz laboratoryjnych prowadzonych w ramach czynności akredytacyjnych.

Analitik diagnosta laboratoryjny powinien jednoznacznie odróżniać rodzaje definicji opisujących czynność nazywaną słowem „pomiar”. Z wielu definicji należy wyróżnić najprostszą, powiązaną z teorią błędów analitycznych: „pomiar analityczny to porównanie próbki badanej ze wzorcem, przy czym w czasie tej czynności popełniany jest „jakiś” błąd np. typu systematycznego. Błąd ten będzie klasyfikowany jako negatywny czynnik wpływający na wartość diagnostyczną analitu. Podczas procedury analitycznej diagnosta laboratoryjny ma do czynienia jedynie z dwoma rodzajami stanów próbki podlegającej analizie, to „analit” i „matryca”. Analit jest fazą rozproszoną będącą jednocześnie głównym celem zainteresowania diagnosty laboratoryjnego. Matryca to faza rozpraszająca, utrudniająca analizę, wymagająca szczególnej uwagi analityka.

Definicja słowa „pomiar” stosowana do opisu procesu kalibracji z zastosowaniem statystycznych teorii skali, ma następujące brzmienie:

Pomiarem nazywamy czynność przyporządkowania liczb przedmiotom, lub wydarzeniom zgodnie z pewnym zbiorem reguł, oraz z zastosowaniem następujących skal pomiarowych:

- 1) nominalna, jakościowa.
- 2) porządkowa, jakościowa.
- 3) równomierna, ilościowa.
- 4) ilorazowa, uniwersalna (ilościowo - jakościowa).

Każdy rodzaj pomiaru można opisać wzorem matematycznym. Pierwszym przykładem dla procedury referencyjnej będzie opis matematyczny uzależniony od naważki (x1), odczytu z analizatora (A) absorbancji (x2) oraz współczynnika proporcjonalności (k) wynikającego ze stechiometryczności reakcji wskaźnikowej:

$$P_1 = k \frac{x_2}{x_1}$$

Przykład drugi matematycznego opisu pomiaru przedstawia wzór z liniową, homoscedastyczną lub heteroscedastyczną zależnością regresji w modelu:

- 1 - stochastycznym (statystycznym) lub,
- 2 - deterministycznym (funkcjonalnym).

Modele te można opisać wspólnym wzorem dla regresji prostej:

$$\hat{y} = ax + b + \varepsilon$$

spełnionej, gdy $V_\varepsilon = 0$ „ V_ε ” to wariancja zmiennej ε . ε jest wartością błędu oceny wyznaczenia kalibracyjnej regresji prostej dla pojedynczego wzorca. Ten przykład pomiaru opisany jest wzorem w funkcji zmiennej x_2 (absorbancji):

$$P_2 = \frac{1}{x_1} f(x_2)$$

z uwzględnieniem charakteru probabilistycznego tej zależności. Trzeci przykład matematycznego opisu pomiaru, z dodatkowym kalibratorem (x_3) posiadającym doświadczalnie wyznaczone miano z dokładnością mas atomowych, powoduje, że dla metody definitywnej błąd systematyczny może przybierać wartość %BW = 0*.

* Patrz w dalszej części referatu, instrumentalny podział procedur na metody definitywne, metody absolutne, a także metody referencyjne i rutynowe.

Biorąc pod uwagę główne normy systemu jakości ISO 9000 do ISO 9004 i uwzględniając ich przystosowania dla potrzeb diagnostyki laboratoryjnej ISO 15189, pojęcie „pomiar” wg „Międzynarodowego słownika podstawowych i ogólnych terminów metrologicznych” („International Vocabulary of Basic and general Terms In Metrology”) brzmi w następujący sposób: - „pomiar to zbiór czynności mających na celu wyznaczenie wielkości mierzonej” - Z powyższą definicją wiążą się następujące terminy: „zasada pomiaru”, „metoda pomiaru”, „procedura pomiaru”, „wynik pomiaru”, „wynik surowy”, „wynik poprawiony”, a także inne pojęcia statystyczno-analityczne wymagające w przyszłości szczegółowego omówienia

W znormalizowanej nomenklaturze instrumentalnej „pomiar” to porównanie pewnej wielkości, z analogiczną wielkością przyjętą za jednostkę miary. Wartość tego porównania stanowi wynik pomiaru.

Zwykle wynik pomiaru jest tylko przybliżeniem - estymatorem rzeczywistej wartości mierzonej oznaczanej najczęściej jako (duża litera X). Otaczający go przedział ufności wg podanego wzoru

$$PU = \# \% \pm 1,96 \sqrt{\frac{\# \% * (100 - \# \%)}{n}}$$

oznaczać może niepewność pomiaru, gdzie #% to ilość procentu danego rodzaju komórek, a n= liczbie wszystkich przeliczonych komórek. 1.96 to współczynnik „k” poprawiający ciągłość funkcji statystycznej testu „t” Studenta, dla n = ? i n-1 stopni swobody. Fragment załączonej tabeli ilustruje tę zależność w następujący sposób. Podczas zliczania wzoru odsetkowego wykryto 5 bazofili podczas liczenia do 100 krwinek białych w rozmazie. Decyzja diagnostyczna powinna mieć następujące brzmienie: ...z 95% prawdopodobieństwem w analizowanej próbce znajduje się od 1 do 9 bazofili. Teoretyczna „prawda” jest osiągana dopiero wtedy, gdy wzór odsetkowy zliczymy do n=10000, bo poprawne zaokrąglenie prowadzi zawsze do #% = 5 (patrz kolumna 6), wiersz drugi (5 bazofili)

#% zliczonych komórek danego rodzaju	95% przedział ufności dla #%					
	n=100	n=200	n=400	n=800	n=4000	n=10 000
1	0,0-0,3	0,0-0,2	0,0-0,2	0,0-0,2	0,7-1,3	0,8-1,2
5	01, -09,	02, -08,	01, -09,	03, -07,	04, -06,	4,6-5,4
itd.						

Tak duży przedział niepewności wyniku zliczania bazofili we wzorze odsetkowym wynika wg dr Koepke ze znacznego błędu losowego tej procedury analitycznej. Wartość Wz wynosi 23% dla pomiarów wykonanych przez hematologów z długim stażem laboratoryjnym. Jak już wspomniano znormalizowany wynik pomiaru laboratoryjnego powinien składać się z dwóch liczb: wartości centralnej „x” reprezentującej wartość pomiaru najbardziej zbliżoną do wielkości „rzeczywistej”, którą może być $\bar{x}$ średnie. Dla wygody edytorskiej wartość średniej arytmetycznej zmiennej X w tym tekście będzie oznaczana dużą literą (M) moving. Drugą liczbą jest wartość przedziałowa bezpośrednio odpowiadająca „niepewności” liczby „x”. W zapisie znormalizowanym niepewność pomiarową oznacza się przypisując jej słownictwo: „nieokreśloność zakresu estymatora”, „uncertainty”. Ogólny wzór prezentacji wyniku pomiaru każdej wielkości pomiarowej „x” jest następujący:

$$X = x \pm u_{(x)}$$

Powyższy wzór wiąże się z następującą definicją:

Niepewność pomiaru, to parametr związany z wynikiem pomiaru, charakteryzujący rozrzut wartości, które można w uzasadniony sposób przypisać wartości mierzonej

Podczas prac akredytacyjnych należy stosować definicję znormalizowaną zgodną z normą ISO 10012-1 o następującym brzmieniu:

Niepewność pomiaru jest wynikiem postępowania mającego na celu oszacowanie przedziału wewnątrz którego znajduje się „prawdziwa” wielkość mierzona z wyznaczoną (arbitralnie) wiarygodnością.

Źródła niepewności pomiaru to czynniki wewnątrz i zewnątrz analityczne zniekształcające wartość pomiarową. Przykładem mogą tu służyć: błędy subiektywne, granice rozdzielczości, wykrywalności, oznaczalności, wartości nominalne kalibratorów i próbek kontrolnych, wynik pomiaru ze zbyt małą liczbą miejsc po przecinku, zmienność współczynników stałych w równaniach kalibracyjnych, czy wariancja powtórzeń. Tak skrótowe ujęcie zagadnienia jest niewystarczające w zastosowaniach instrumentalnych i w przyszłości wymaga rozszerzenia i unowocześnienia.

W teorii błędów pomiaru celem analityka jest przewidywanie źródła błędów i wykrywanie oraz jego opis np. „błąd grubo”, „błąd cząstkowy”, „błąd sumaryczny” itp. Niezbędną czynnością jest pomiar wielkości tego błędu oraz wyznaczenie kryterium dopuszczalnej granicy (TEA). Celem analityka jest zastosowanie właściwej techniki interpolacji. Podstawowa klasyfikacja rodzajów błędów zależy od liczby czynników zakłócających (n). W tym podziale występuje grupa błędów cząstkowych i grupa błędów całkowitych (sumarycznych).

W analizie instrumentalnej taki podział jest niewystarczający. Zgodnie z definicją instrumentu pomiar jest przekształcany przez instrument na wynik o cechach informatycznych. Błędy w tym przypadku można podzielić na takie, które są związane z elementem pomiaru (grupa I) oraz grupą błędów związanych z działaniami matematyczno-statystycznymi (grupa II). Znajomość przedstawionego poniżej podziału jest niezbędna do budowania programów naprawczych. Podział ten powinien być ciągle unowocześniany, aby sprostać wymogom nowoczesnej diagnostyki laboratoryjnej. Podział instrumentalny, przykłady grupa I:

I. Błędy zależne od elementu (czynnika) pomiaru:

1.- Narzędzie pomiarowe reakcja chemiczna:

- (a) - błąd wzorcowania aparatu (BW),
- (b) - tarcie elementów ruchomych waga, skala $\bar{e}$,
- (c) - luzy w częściach mechanicznych skala $\bar{e}$, wtyczka zasilania, podajnik,
- (d) - ciemny prąd, autofluorescencja, próba zerowa,

2 - Otoczenie, środowisko:

- (a) - temperatura - pH pomiaru,
- (b) - ciśnienie gazometria,
- (c) - pole magnetyczne elektrostatyczne, PIR (Państwowa Inspekcja Radiowa), liczniki hematologiczne.
- (d) - zakłócenia elektromagnetyczne siatka Faradaya, filtry,
- (e) - drgania kondygnacji (nieostry obraz w mikroskopie),
- (f) - pył, zawiesiny liczniki hematologiczne

3 - Sposób prowadzenia obliczeń:

- (a) - zaokrąglenie wyników na poziomie 0.5,
- (b) - nieprawidłowa kolejność wykonywania obliczeń algebraicznych,
- (c) - niewłaściwe zastosowanie notacji komputera: notacja arytmetyczna $\>$ notacja polska,
- (d) - błędne wartości w wykładniku potęgi (ex!)

4 - Operator (czynności wykonywane przez operatora):

- (a) - daltonizm,
- (b) - niedowzroczność, - mikroskop, galwanometr.
- (c) - błąd paralaksy,

5 - psychologiczny

- (a)- maksymalizacja, minimalizacja,
(b)- zaokrąglanie do wymyślonej wartości np. 44.

6 - Procedury metodyczne także dotyczące narzędzi,

- (a) - (I współczynnik absorpcji molowej),
(b) - zastosowanie nieprawidłowej metody pomiarowej np.: nefelometrycznej w miejsce turbidymetrycznej,
(c) - zastosowanie niewłaściwego narzędzia pomiarowego np.: spektrofotometr / kolorymetr (pomiar Hb).

II. Źródła błędów dające się opisać matematycznie

W drugiej grupie instrumentalnej sklasyfikowane zostały w podstawowych trzech kategoriach źródła błędów dające się opisać równaniami matematycznymi:

- - systematyczny
- - losowy
- - grubo

Błąd systematyczny może przybierać kształt liniowy, stały, jednostronnie rosnący lub malejący, logarytmiczny i wykładniczy. Błąd ten jest łatwy do wyeliminowania przez zastosowanie np.: metody pomiaru dubletów lub trypletów, ponieważ istnieje bardzo małe prawdopodobieństwo, że w dwóch analizatorach wystąpią błędy z tego samego powodu. Dość często wstępują błędy systematyczne podczas wymiany personelu przy stanowisku pracy, ponieważ istnieje bardzo duże prawdopodobieństwo powstania błędu spowodowanego przez personel. W niektórych sytuacjach błąd systematyczny daje się wyeliminować wprowadzając algebraiczną poprawkę lub współczynnik korelacji „r”. Graficzna korekta na wykresie kalibracyjnym, kompensacja optyczna i potencjometryczna to dopełnienie środków i metod mających na celu wyeliminowania błędu systematycznego. Dalsze uwagi dotyczące błędów systematycznych i losowych występujących w procesie instrumentalizacji będą omówione w dalszych referatach.

Trzeci rodzaj błędów w analizie instrumentalnej ze względu na jego wielkość nazywany jest „grubym”. Przyczyny powstawania tego typu błędów są następujące:

- - nieuwaga operatora,
- - nieznanie procedury analitycznej,
- - nie swoistość analityczna metodyki
- - niedoskonałość i nieznanie narzędzi pomiarowych.

Np. bardzo wysokie transaminazy analizowane w automatycznych enzymometrach wykazują bardzo małe aktywności tego enzymu. Przyczyną takiego błędu jest brak w oprogramowaniu analizatora możliwości

wykrywania stężenia substratu już na etapie „lag fazy” i uruchomienie alarmu nakazującego wykonanie rozcieńczenia próby.

Eliminacja błędów grubego winno być poprzedzone procesem poszukiwawczym przyczyn i szacunkiem jego wielkości. Do tego zadania stosowane są następujące techniki pomiarowe (metrologiczne):

1. obciążenie lub bramkowanie na arbitralnie przyjętych poziomach odrzucenia np.: M (średnia arytmetyczna) $\pm 2S$ [$M \pm 2S$] lub $3S$ [$M \pm 3S$], a także ewentualnie w procentach, uchyłki.
2. zastosowanie wartości wystandaryzowanych oznaczanych literą „u” lub/i „z” gdzie

$$u = \frac{x_i - M}{S}$$

, a „M” to średnia arytmetyczna z próby losowej, o odchyleniu standardowym „S”.

3. zastosowanie procedur bez „autsajderów” tzn. procesów analitycznych, których wyniki pomiarów nie przekraczają wielokrotnie wymaganej wiarygodności diagnostycznej.
4. zastosowanie statystycznych testów Dixon'a dla prób uporządkowanych.

Analitik ma dostęp do 8 różnych rodzajów funkcji Dixon'a, trzech technologicznych modyfikacji wd. W. Volk'a oraz wersji przedziałowej w odniesieniu do teoretycznego, wystandaryzowanego rozkładu normalnego. Zastosowanie funkcji Dixon'a opisane jest szczegółowo w podręczniku: „TABLICE STATYSTYCZNE PWN” 1972; Ryszard Zieliński. Tak liczne funkcje Dixon'a umożliwiają właściwe dopasowanie wzoru do

danych empirycznych. Szczególne zastosowanie znalazły funkcje B4 z modyfikacją wg Prosta oraz B6 wg Reed'a. Część funkcji wymaga parametrów populacji generalnej. Są nimi:

$$B_1 = \frac{x_{(n)} - \mu}{\sigma} \quad B_2 = \frac{x_{(n)} - M}{\sigma} \quad B_3 = \frac{x_{(n)} - x_{(n-1)}}{\sigma}$$

Wersje od B4 do B8 przystosowane są do prób o małej liczebności, a wersja B5 dodatkowo może być wzmocniona serią pomocniczą dla wyliczenia wspomagającego S_v

$$B_5 = \frac{x_{(n)} - M}{S_v}$$

Funkcjami dopasowującymi się do stanu danych są:

$$B_4 = \frac{x_{(n)} - M}{S} \quad B_6 = \frac{x_{(n)} - x_{(n-1)}}{R}$$

gdzie R to rozstępowi, a B6 to modyfikacja Reed'a.

$$B_7 = \frac{x_{(n)} - x_{(n-1)}}{x_{(n)} - x_{(2)}} \quad B_8 = \frac{x_{(n)} - x_{(n-2)}}{x_{(n)} - x_{(1)}}$$

Modyfikacje wg W. Volk'a uwzględniają małą liczebność próby losowej. Można stosować 8 elementową próbę losową, w przedziale 8 15 i powyżej 15 elementów opisanych odpowiednimi funkcjami:

$$B_{(n < 8)} = \frac{x_{(2)} - x_{(1)}}{R} \quad ; \quad B_{(8 < n < 15)} = \frac{x_{(3)} - x_{(1)}}{x_{(n-1)} - x_{(1)}} \quad ; \quad B_{(n \geq 15)} = \frac{x_{(3)} - x_{(1)}}{x_{(n-2)} - x_{(1)}}$$

Każda z wymienionych powyżej funkcji testowych posiada teoretyczną tablicę rozkładu. Uniwersalna ilościowa metoda w modyfikacji K. R. Nair'a, z zastosowaniem wystandaryzowanego rozkładu normalnego posiada, następującą funkcję testową:

$$U_N = \frac{|x_m - M_b|}{S \int_s}$$

Wzór jest zgodny dla konfiguracji umożliwiającej zastosowanie dodatkowej pomocniczej serii losowej pochodzącej z innego źródła, w celu wyliczenia „S_r” (f to liczba swobody n_r - 1 serii pomocniczej). Odrzucenie (błąd grubo) następuje z ryzykiem mniejszym, od 10% ale większym, niż 5% co w jednostkach wystandaryzowanych można następująco zapisać: 1,97 < 2,000 < 2,27 dla n = 5 (n = liczebności serii ocenianej) i φ = 19.

III Źródła błędów wg rodzaju pomiaru analitycznego

Podział źródeł błędów wg rodzaju analitycznego pomiaru bezpośredniego i pośredniego wymaga szczególnej uwagi analityka: W tej grupie podziału głównych czynników wpływających na ostateczną postać wyniku analizy laboratoryjnej znajdują się następujące dwie podgrupy zależne od sposobu wykonywanego pomiaru analitycznego:

1. Pomiar bezpośredni to np. pomiar temperatury termometrem, objętości cylindrem miarowym, ciśnienia manometrem rtęciowym. Błędy związane z tego rodzaju działaniem nazywane są „błędami subiektywnymi”, z przyczyn operatora. Błędy związane z tego rodzaju pomiarem są trudne do wykrycia i usunięcia.
2. Pomiar pośredni to np.: pierwsza pochodna zmian absorpcji w jednostce czasu stosowany w analizie aktywności enzymów.

$$\frac{dA}{dt}, \frac{dA}{d\lambda}$$

1. Drugi przykład to pierwsza pochodna zmian absorbancji względem długości fali światła monochromatycznego, stosowana podczas analizy widmowej. Błędy tego rodzaju pomiaru nazywane są „błędami obiektywnymi” z przyczyn instrumentalnych. Błędy tego rodzaju można całkowicie usunąć lub znacznie zredukować.

Ad 1. Podczas pomiaru bezpośredniego błąd losowy ma postać rozkładu Gauss'a. Wykres gęstości prawdopodobieństwa pozwala na postawienie dwóch następujących tez:

- a), że liczba błędów dodatnich zawsze się równa liczbie błędów ujemnych.
- b), że liczba błędów grubych wykładniczo maleje wraz ze wzrostem ich liczbowej wartości.

Pewność wyniku wzrasta po zastosowaniu odpowiedniej korekcyjnej metody np. dubletów, trypletów itd. Należy dążyć do logicznie optymalnej liczby powtórzeń w serii pomiarowej. Wartość tę można wyliczyć stosując estymacyjną teorię przedziałów ufności dla arbitralnie dobranej wartości poziomu istotności, liczbie stopni swobody i rodzaju teoretycznego testu statystycznego. Dokładność szacunku (d) jest przyjmowana arbitralnie stosując odpowiednio dobrany do rodzaju danych analitycznych następujący wzór uwzględniający granicę półokresu przedziału ufności:

$$n = \frac{Z^2 S_x^2}{d^2}$$

gdzie (Z) to wartość funkcji testowej rozkładu normalnego; (S) to odchylenie standardowe empirycznej próby losowej, a (d) to żądana precyzja szacunku estymacji.

Ad 2 Podczas pomiarów pośrednich suma błędów losowych może równać się sumie maksymalnych błędów pośrednich, co powoduje zawyżanie błędu sumarycznego, gdyż już dla dwóch równoległych pomiarów prawdopodobieństwo występowania maksymalnego błędu pośredniego wynosi $P=0.001$, a dla większej liczby powtórzeń jest jeszcze mniejsze. W tym miejscu należy postawić kolejną tezę „błędy maksymalne nie są reprezentatywne dla błędu sumarycznego”. Fakt ten można opisać równaniem wyznaczającym maksymalny błąd cząstkowy:

$$MAX = \delta_z = \left| \frac{\delta_z}{\delta_x} d_x \right| + \left| \frac{\delta_z}{\delta_y} d_y \right| \Leftrightarrow \bullet \text{gdzie} \bullet z = \sqrt{x^2 + y^2}$$

Właściwe wyznaczenie błędu całkowitego może być wyliczone przy pomocy sumy geometrycznej błędów cząstkowych, co daje się zapisać następującym równaniem:

$$Bc = \sqrt{B_1^2 + B_2^2 + \dots + B_n^2}$$

Podczas klasyfikacji błędów cząstkowych należy dodatkowo uwzględnić ich „WAGĘ”.

Składniki niepewność pomiaru

Po scharakteryzowaniu podstawowych czynników zakłócających pomiar analitu należy powrócić do czynności wymaganych podczas wyznaczania parametru niepewności. Pewnym problemem jest tu przyjęcie wystandaryzowanego pojęcia miary centralnej, nominalnej, nadziei matematycznej. Do niedawna stosowano powszechnie dla opisu miary centralnej następujące sformułowania: „wartość prawdziwa”, „wartość rzeczywista wielkości mierzonej”. Obecne tendencje standaryzacyjne skłaniają się do stwierdzeń bardziej łagodnych jak np.: „najlepsze przybliżenie”, „najlepsze oszacowanie”, „niepewność pomiaru wielkości oszacowywanych”. W metrologicznych pojęciach dotyczących opisu miary centralnej nie przewiduje się słów „błąd” i „pomyłka”!

W standardach opisujących wymagania dotyczące niepewności, pomiarowej wyniku jakości, zawartych w normach ISO 9004 „zarządzanie przez jakość” przewiduje się trzy rodzaje równań opisujących te parametry:

1. Niepewność standardowa - mierzonej prostej, zmiennej wejściowej „xi” opisywana jest następującym wzorem: $U(x_i)$.
2. Niepewność złożona - wynikowa wielkości wyjściowej „Y”, opisywana jest wzorem: $U_c(y)$. Może być ona przykładowo reprezentowana przez „S”.

3. Niepewność rozszerzona całkowita, opisywana jest wzorem:

$$U = k \cdot u_{c(y)}$$

Metody wyliczania składowych niepewności ze względu na uproszczenie procedury ich wyznaczania podzielono na dwie grupy. Pierwsza grupa została oznaczona jako typ metod A, drugą grupę oznaczono jako typ metod B. Procedury typu A umożliwiają wyznaczenie składowych niepewności standardowych metodami statystycznymi, jak M średnia arytmetyczna, SN standardowy błąd średniej, S i S2. Dotyczą one „n” powtarzalnych, niezależnych i losowych obserwacji pojedynczej, prostej wielkości wejściowej $X_{i,k}$ gdzie $k=1, 2, 3, \dots, n$, pozwalających na identyfikację ich rozkładu częstości.

Niepewność standardowa

$$u_{(x_i)}$$

(prostej) wielkości mierzonej X_i

Najczęściej wykorzystywanym do wyznaczania pierwszej składowej niepewności, będącym jednocześnie najlepszym przybliżeniem - estymatorem μx (μx reprezentuje wartość centralną populacji generalnej) wielkości X_i jest w warunkach powtarzalności (z „k”= 1,2, 3,..., „n” obserwacji) średnia arytmetyczna „M” wyznaczana wzorem:

$$M_i = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n X_{i,k}$$

Najlepszym parametrem szacunku wartości centralnej jest standardowy błąd średniej opisany następującym wzorem:

$$S_{(M_i)}^2 = \frac{S_{(X_{i,k})}^2}{n}$$

Drugim parametrem najczęściej stosowanym w opisie niepewność jest wariancja i jej pochodne:

$$S_{(x_{i,k})}^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (x_{ik} - M_i)^2$$

oraz bezwzględna wartość odchylenia standardowego :

$$S_{(X_{i,k})} = \sqrt{S_{(X_{i,k})}^2}$$

W efekcie końcowy wzór pozwalający wyznaczyć drugą składową niepewności standardowej metodami typu A, można zapisać następująco:

$$u_{(x_i)} = S_{(M_i)} = \sqrt{S_{(M_i)}^2}$$

W przypadku braku możliwości wyznaczenia parametrów niepewności prostej metodami typu A należy zastosować metody typu B. Podstawą metod typu B, są teoretyczne rozkłady zmienności powstających a priori wspomaganych następującymi dodatkowymi źródłami informacji:

1. retrospektywnymi danymi zebranymi a priori,
2. posiadanego doświadczenia wraz z ogólną znajomością zjawisk instrumentalnych i właściwości materiałów odniesienia oraz mierników (patrz wyżej podział czynników, źródeł błędów),
3. ze specyfikacji, instrukcji, dokumentacji technicznej, informacji pochodzących od producentów,
4. informacji uzyskanych po wzorcowaniu instrumentów (kalibracji certyfikacji czy ewaluacji cząstkowej lub/i całkowitej),
5. uzyskanych z literatury specjalistycznej, monografii, podręczników, poradników, norm, sprawozdań oraz publikacji naukowych.

Estymatorami dla metod typu B mogą być

$$x_i, \dots, u_{(x_i)}^2, \dots, u_{(x_i)}$$

:

wielkości wejściowej „Xi” której nie zastosowano procedur probabilistycznych, ocenia się je na drodze analizy naukowej bez powtórzeń.

W procesie wyznaczania składników niepewności metodami typu B najczęściej stosowanymi rozkładami teoretycznymi są:

1. normalny,
2. normalny wystandaryzowany,
3. t-Studenta,
4. prostokątny,
5. trapezowy,
6. trójkątny.

Dla danych pochodzących z głównego źródła informacji (np.: populacji generalnej) o kurtycznym rozkładzie, normalnym, rozkładzie normalnym wystandaryzowanym lub t-Studenta wprowadzane informacje dotyczą na ogół pewnej wielkości odchylenia standardowego lub wielokrotności przedziału mającego wyznaczony poziom ufności najczęściej w granicach 95%. Dlatego też łatwo je sprowadzić do wielkości „S”, stanowiącego miarę poszukiwanej niepewności standardowej wyliczanej metodą typu B.

Dla niesymetrycznych rozkładów podawane są wartości graniczne np.: a_- - dolna granica, a_+ - górna granica. Dla takiego układu granic wartość szerokości połówkowej wynosi

$$a = \frac{(a_- + a_+)}{2}$$

Dla danych a priori uzyskanych wyjściowo, bez powtórzeń (metoda typu B) opracowano wzory umożliwiające wyliczenie niepewności standardowej, prostej dla prawidłowo dopasowanego rozkładu teoretycznego:

1. **Normalny**, $u_{(x_i)} = S$

2. **normalny wystandaryzowany**, $u_{(x_i)} = \frac{a}{\sqrt{2}}$

3. **T-Studenta**,

4. **Prostokątny**, $u_{(x_i)} = \frac{a}{\sqrt{3}}$

5. **trapezowy**, $u_{(x_i)} = \frac{a * \sqrt{1 + \beta^2}}{\sqrt{6}} \otimes \otimes \text{gdzie} \otimes \otimes \beta = \frac{b}{a} \otimes \otimes$

natomiast „b, a” odpowiednio opisują szerokości połówkowe górnej i dolnej podstawy trapezu.,

6. **Trójkątny**. $u_{(x_i)} = \frac{a}{\sqrt{6}}$

W procesie typu B najlepszym przybliżeniem parametru centralnego dla powyższych rozkładów jest wielkość wyznaczona następującym wzorem:

$$x_i = X_i = \frac{(a_+ - a_-)}{2}$$

Złożona niepewność $u_{c(y)}$ **wynikowej wielkości (Y)**

Złożona niepewność ($u_{c(y)}$) powinna być wyznaczana w jednostkach odchylenia standardowego „S”. Złożoną, wynikową niepewność pomiaru wyznacza się stosując:

- modele matematyczne analitycznej procedury pomiarowej,

- prawa propagacji przenoszenia niepewności analitycznej.

Najlepszym przybliżeniem estymatora „y” wyjściowej wielkości mierzonej „Y” jest wartość obliczona z zależności funkcjonalnej „f” jej wartości dla argumentów, którymi są estymatory wielkości wejściowych.

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_i, \dots, x_N) = f(\bar{X}_1, \bar{X}_2, \dots, \bar{X}_i, \dots, \bar{X}_N)$$

Podczas wyznaczania złożonej niepewności standardowej, dane wejściowe mogą posiadać dwojaki charakter:

- a) nie są skorelowane (nie powiązane),
- b) są skorelowane (powiązane).

Ad (a) Dla pierwszego rodzaju danych złożoną niepewność standardową

$$(u_{c(y)})$$

można wyliczyć przy pomocy następującego wzoru wariancyjnego

$$u_{c(y)}^2 = \sum_{i=1}^N \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 u_{(x_i)}^2 = \sum_{i=1}^N c_i^2 u_{(x_i)}^2 = \sum_{i=1}^N u_i^2 (y_i) \otimes \otimes \text{gdzie} \otimes \otimes u_{(x_i)}$$

To odpowiednie niepewności standardowe wielkości wejściowych obliczone metodą typu A lub typu B lub ich połączeniem A+B, „c, „to współczynnik wrażliwości - odpowiednik pochodnych cząstkowych.

$$\frac{\partial f}{\partial x_i}$$

Współczynnik wrażliwości można wyznaczyć numerycznie lub empirycznie przez wyznaczenie zmian wielkości wyjściowej „Y” wraz ze zmianą dowolnej i-tej wielkości wejściowej „X_i „ przy stałych wartościach dla pozostałych wielkości wejściowych.

Ad (b) Dla danych wejściowych skorelowanych, wyrażenie opisujące złożoną wariancję wyniku pomiaru ma następującą matematyczną postać

$$u_{c(y)}^2 = \sum_{i=1}^N \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 u_{(x_i)}^2 + 2 \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N \frac{\partial f}{\partial x_i} \frac{\partial f}{\partial x_j} u_{(x_i, x_j)}$$

gdzie x_i, x_j są estymatorami zmiennych X_i i X_j , a niepewności wariancyjnie są zgodne i są estymatorami kowariancji związanej z x_i, x_j . Stopień powiązania zmiennych x_i, x_j ilustruje estymator współczynnika korelacji „r” możliwy do wyliczenia ze wzoru:

$$r_{(x_i, x_j)} = \frac{u_{(x_i, x_j)}}{u_{(x_i)} u_{(x_j)}}$$

z pozostałymi warunkami zależności regresyjnej oraz weryfikującym hipotezę zerową testem statystycznym t-Studenta dla „r”.

$$t = r \sqrt{\frac{n-2}{1-r^2}} \otimes \otimes \text{dla} \otimes \otimes \varphi = n-2$$

który powinien wskazywać na istotność różnic H_0 od zera. Po spełnieniu powyższych warunków można z pewnością 95% ostatecznie orzec o związku między zbiorem (X_i) i (X_j), co w rezultacie zezwala na zastosowanie właściwego wzoru dla danych skorelowanych, wyliczającego „niepewność złożoną wynikowej wielkości wyjściowej (Y). Niepewnością złożoną pomiaru jest dodatni pierwiastek kwadratowy z wariancji, co można zapisać następująco:

$$u_{c(y)}^2 \otimes \otimes; \otimes \otimes u_{c(y)} = \left| \sqrt{u_{c(y)}^2} \right|$$

Niepewność rozszerzona (U)

„Niepewność rozszerzona” jest często używana w specjalnych zastosowaniach medycznych w celu zmniejszenia ryzyka choroby, a nawet śmierci. Niepewność rozszerzoną można zapisać następującym wzorem:

$$U = k * u_{c(y)}$$

gdzie „k” to współczynnik rozszerzenia wyrażony w jednostkach wystandaryzowanych w odniesieniu do procentowego (%) poziomu ufności. Niepewność rozszerzoną „U” wprowadzono w celu wyznaczenia wokół wyniku pomiaru przedziału, od którego oczekuje się, że obejmie znaczną część rozkładu wartości, które można w uzasadniony sposób przyporządkować wielkości mierzonej. Wybór wartości współczynnika „k”, jest zależny od przyjętego arbitralnie prawdopodobieństwa poziomu ufności. Współczynnik „k” jest tabelaryzowany w tablicach rozkładu testu t-Studenta. Dla $n = \infty$

Przykłady zapisu wyniku z przedziałem niepewności

Po wyliczeniu dwóch podstawowych parametrów niepewności wyniku laboratoryjnego muszą być one właściwie oznakowane i zapisane na formularzu analitycznym.

Przykłady czterech sposobów zapisu wyniku z uwzględnieniem szacunku niepewności umieszczono poniżej.

Wielkością, której wartość zostanie zastosowana do przykładowego zapisu będzie objętość „V” wyrażona w ml. o nominalnie 100ml:

$V_1 = 100,021\ 47\ \text{ml}$, ze złożoną niepewnością standardową $u_{c(y)} = 0,35\ \mu\text{l}$,

W przykładzie V_1 , do wyniku liczbowego musi być dołączony pełny opis zamknięty w cudzysłowie i podkreślony;

$V_2 = 100,021\ 47(35)\text{ml}$, [liczba w nawiasach jest wartością złożonej niepewności standardowej $u_{c(y)}$] odniesionej do ostatniej cyfry znaczącej wyniku;

$V_3 = 100,021\ 47(0,000\ 35)\ \text{ml}$ [gdzie liczba w nawiasach jest wartością złożonej niepewności standardowej $u_{c(y)}$ wyrażonej w tych samych jednostkach, co wynik];

$V_4 = (100,021\ 47 \pm 0,000\ 35)\ \text{ml}$, [gdzie liczba zapisana symbolem $\pm$ jest wartością złożonej niepewności standardowej $u_{c(y)}$ a nie jest przedziałem ufności]

W miarę możliwości należy unikać zapisu z symbolem $\pm$, ponieważ był on tradycyjnie stosowany do zapisywania przedziału wysokiego poziomu ufności i stąd może być mylony z niepewnością rozszerzoną „U”.

Niepewność rozszerzoną „U” zaleca się zapisywać wartością liczbową następująco: $V = (100,021\ 47 \pm 0,000\ 79)\ \text{ml}$, gdzie liczba za symbolem $\pm$ jest wartością niepewności rozszerzonej „U” obliczoną dla

$$u_{c(y)} = 0,35\ \mu\text{l}$$

i współczynnika rozszerzenia $k=2,26$ wynikającego z rozkładu t-Studenta i liczbie swobody $\varphi=9$ oraz dla poziomu ufności 95%

Podsumowanie

W tej części referatu nieprzypadkowo opuszczono szczegółowy opis postępowania związanego z kontrolą jakości, która dość często jest omawiana na forum diagnostyki laboratoryjnej przez licznych autorów. Opracowanie niniejsze porusza odwieczne problemy związane z umiejętnością diagnostycznej interpretacji wyniku analizy laboratoryjnej z uwzględnieniem jego zmienności spowodowanej różnymi czynnikami wewnątrz i poza laboratoryjnymi. Uwzględnienie zmienności procedury laboratoryjnej podczas interpretacji diagnostycznej wyniku laboratoryjnego, biorąc pod uwagę jego przedział niepewności, może przyczynić się do zmniejszenia nieporozumień na linii kanału krytycznych uwag między oddziałem szpitalnym, a laboratorium.

Literatura dostępna u autora.

Uwaga P.T. Diagnostów Laboratoryjni!!!

Obligatoryjna składka z tytułu członkostwa w KIDL wynosi

od 1 kwietnia 2008 r. - 20,00 zł (słownie: dwadzieścia złotych) miesięcznie

(podstawa prawna : uchwała nr 48/II/2008 KRDL z dnia 29 lutego 2008 r.

„Znaczenie badań mikrobiologicznych u pacjentów z ranami przewlekłymi”.

Dr Beata Kowalska Krochmal
Katedra i zakład Mikrobiologii
AM we Wrocławiu

Rany przewlekłe takie jak odleżyny, zmiany oparzeniowe, owrzodzenia na tle niewydolności żylniej, rany w stopie cukrzycowej, czy też inne jak zmiany nowotworowe, powikłania pooperacyjne stanowią z natury duży problem terapeutyczny. Z uwagi na zaburzenia przepływu krwi, niedotlenienie tkanek i zmiany martwicze oraz obserwowaną u niektórych pacjentów immunosupresję stają się łatwym celem dla różnych drobnoustrojów szczególnie bakterii, które w znacznym stopniu mogą utrudnić i tak niełatwy proces gojenia [2, 10]. Stąd też właściwa diagnostyka mikrobiologiczna ran jest niezwykle pomocna w ocenie wpływu drobnoustrojów na ranę oraz w trafnym wyborze kierunku leczenia. Izolowane z rany drobnoustroje mogą być bowiem przejawem [1,2,7,9,12]:

- 1) kontaminacji endogenną florą chorego (z otaczającej skóry, błon śluzowych przewodu pokarmowego, jamy ustnej czy też układu moczowo-płciowego) lub też zanieczyszczenia ze środowiska zewnętrznego;
- 2) kolonizacji organizmami wykazującymi powinowactwo do łożyska rany, ale bez destrukcyjnego wpływu na komórki i tkanki gospodarza
- 3) krytycznej kolonizacji, kiedy to dochodzi do znacznego wzrostu masy bakterii w ranie prowadzącej do zahamowania procesu gojenia, chociaż bez objawów infekcji
- 4) lokalnej infekcji z klasycznymi, klinicznymi objawami zakażenia łącznie z zajęciem otaczającej tkanki łącznej
- 5) uogólnionej infekcji szerzącej się na otaczające tkanki i szybko mogącej prowadzić do sepsy.

Biorąc pod uwagę fakt, że praktycznie wszystkie rany przewlekłe ulegają zasiedleniu przez drobnoustroje [1, 9, 10], które w wielu przypadkach pozostają bez wpływu na proces gojenia, ważnym staje się pytanie kiedy diagnostyka mikrobiologiczna powinna być podjęta i jak przeprowadzona, aby uzyskany wynik badania był przydatny w leczeniu pacjenta?

Wskazaniami do badań mikrobiologicznych są [2, 7, 10]:

- rany otwarte z objawami infekcji (zaczerwienienie, obrzęk lub stwardnienie, wysięk ropny, tkliwość uciskowa, ból, miejscowo odczuwane ciepło, cuchnący zapach rany, nieprawidłowe ziarninowanie tkanek, miejscowe krwawienia, odchodzenie nabłonka, zakażenie uogólnione bez innych niż rana prawdopodobnych źródeł zakażenia)
- szerzenie się zmian na otaczające tkanki, w tym na tkankę łączną i pogorszenie obrazu rany
- brak efektów podjętego leczenia
- zahamowanie procesu gojenia rany.

Materiałem do badań mogą być [2, 6, 7, 8, 10, 12]:

- wymazy z ran,
- aspiraty ropne,
- próbki uzyskane w wyniku biopsji,
- fragmenty tkanek pobrane przez lyżeczki rany, lub też w procesie dermabrazji
- krew na posiew przy podejrzeniu zakażenia uogólnionego.

Wybór metody pobrania materiału jest zależny zarówno od rodzaju i umiejscowienia rany, możliwości szybkiego transportu do laboratorium jak i metod badawczych stosowanych w danej pracowni mikrobiologicznej. Wartość diagnostyczna uzyskanych próbek klinicznych zależy również od odpowiedniego przygotowania rany przed pobraniem. Miejsce zmienione chorobowo powinno być przemyte dokładnie jałową solą fizjologiczną i oczyszczone z obumarłych resztek. W przypadku zmian pokrytych zaschniętą wydzieliną, powierzchnię należy przemyć antyseptykiem, a po jego wyschnięciu za pomocą jałowego skalpela ściąć wierzchnią warstwę i z odsłoniętych miejsc pobrać próbki [2,4].

Pobieranie próbek metodą wymazów [2, 5, 6, 7, 10, 11, 12].

Metoda ta jest najczęściej stosowana z uwagi na nieinwazyjność i łatwość wykonania, możliwość pobrania zarówno ze zmian powierzchniowych jak i głębokich, zabezpieczenie wzrostu zarówno bakterii tlenowych jak i beztlenowych, transport w czasie dłuższym niż 2 h od pobrania (podłoża transportowe) a także z uwagi na niski koszt badania. Wymazy z ran służą głównie do oceny jakościowej i ilościowej, nie nadają się jednak do badań ilościowych co stanowi istotną wadę próbek pobranych tą metodą. W celu pobrania materiału wymazówkę należy zwilżyć jałową solą i przenieść próbkę na wacik obracając ruchem rotacyjnym dosięgającym brzegów i łożyska rany szczególnie bez zmianach głębokich. Według niektórych autorów polecaną metodą jest pobieranie wymazu ruchem zygzakowym od brzegu do brzegu rany. Należy również pamiętać, że przy podejrzeniu infekcji beztlenowcami wymazy wykonuje się z użyciem dwóch wymazówek, w tym jednej transportowanej w podłożu dla beztlenowych bakterii.

Badania metodą wymazów są w pełni wiarygodne pod warunkiem przestrzegania zasad przygotowania rany do pobrania jak i samej techniki wykonania wymazu. Brak wcześniejszego oczyszczenia miejsca zmienionego przyczynia się często do izolacji flory kontaminującej a nie prawdziwego patogenu, a co za tym idzie uzyskany wynik pozostaje bez wartości klinicznej.

Pobieranie wydzieliny ropnej metodą aspiracji [2, 6]

Sposób pobierania zalecany szczególnie przy ranach z obfitą wydzielina ropną lub też przy dużych ropniach zamkniętych oraz w przypadkach podejrzenia infekcji beztlenowcami. Aspirację przeprowadza się przy użyciu jałowej strzykawki z igłą, którą nakłuwają się przemyty antyseptykiem ropień. Pierwszą partię ropy należy odrzucić i dopiero następną przesłać do badania bezpośrednio w strzykawce zamkniętej jałowym korkiem (czas transportu do 0,5h). W sytuacjach, gdy niemożliwe jest dostarczenie próbki w półgodzinnym okresie czasu, pobrana ropę należy przenieść na wymazówkę z podłożem transportowym.

Alternatywną metodą pobrania jest aspiracja treści ropnej po wcześniejszym naprzemiennym przepłukiwaniu ropnia 0,85% NaCl i masażem obrzeża rany. Początkowo poprzez nakłucie wprowadza się 1 ml NaCl do ropnia, następnie przeprowadza się masaż i ponownie wprowadza się 1 ml jałowej NaCl i jeszcze raz wykonuje się masaż aby na końcu pobrać powstały płyn i natychmiast przesłać do pracowni mikrobiologicznej. Tego typu sposób pobrania wpływa na odrywanie drobnoustrojów od łożyska rany i tym samym zwiększa szansę na ich wyhodowanie.

Pobieranie tkanek i próbek metodą biopsji [2,3,5,12].

Fragmenty tkanek i materiał biopsyjny uznawane są za najbardziej wartościowe próbki do badań przy podejrzeniu infekcji ran. Tego typu materiały kliniczne redukują możliwość wyhodowania flory kontaminującej lub kolonizującej, pozwalają więc na izolację prawdziwych patogenów. Biopaty są też najlepszym materiałem do diagnostyki w kierunku grzybów i badań ilościowych tak ważnych dla oceny wpływu wysołbionych szczepów bakteryjnych na ranę. W celu zwiększenia wartości diagnostycznej ważne jest:

- pobranie wycinków z pogranicz żywych i martwych tkanek
- pobranie kilku próbek tkanek z różnych miejsc rany, z uwagi na nierównomierne rozmieszczenie drobnoustrojów; badanie jednego wycinka może dać wynik fałszywie ujemny
- natychmiastowy transport do laboratorium w jałowym pojemniku z niewielką ilością soli fizjologicznej bez środka bakteriostatycznego. Mimo wielu zalet i niepodważalnej wartości próbek pobranych w trakcie biopsji metoda ta jest rzadko stosowana do oceny ran. Wynika to przede wszystkim z inwazyjnej techniki, z bardzo kosztownej diagnostyki mikrobiologicznej, czasochłonnej i wymagającej dodatkowej aparatury i osób do pracy a czasami również z klinicznych przeciwwskazań do pobrania tkanek.

Ilościowa ocena drobnoustrojów w ranie [2, 3, 8].

W celu określenia liczby kolonii bakterii i grzybów wymagane są wycinki tkanek lub materiał pobrany poprzez biopsję. Wycinki o wadze około 500 mg powinny zostać pobrane z z

pogranicza tkanki zdrowej i martwej. Możliwe jest też pobranie próbek poprzez 3 mm trepanobiopsję pozwalającą na uzyskanie materiału o wadze od 0,02-0,05 g. Uzyskane tkanki są następnie dokładnie ważone i homogenizowane w 1 ml 1% Tween 80, którego zadaniem jest rozproszenie bakterii i neutralizacja miejscowo stosowanych środków antyseptycznych. W trakcie homogenizacji należy mechanicznie rozdrobnić tkanki. Tkanki w płynie należy inkubować dobę w 4 0C. Po tym czasie wykonuje się wysiew za pomocą ez kalibrowanych o objętości 0, 1 i 0,01 ml na podłoża hodowlane z krwią baranią i agar MacConcey'a. Wyniki podaje się w przeliczeniu na 1 g tkanki. Znamienna ilość świadcząca o patogennym oddziaływaniu drobnoustroju na ranę i ryzyku zakażenia uogólnionego to 105 CFU / g tkanki i powyżej tej wartości. Półilościowa metoda oparta na pobieraniu wymazów z zainfekowanych ran [2, 10, 11].

Należy do częściej stosowanych z uwagi na łatwość pobrania materiału i prostsze wykonanie badania. Warunkiem przeprowadzenia oceny jest pobranie wymazu z określonej powierzchni rany i wprowadzenia wymazu do próbki z bulionem. Zaleca się aby wymaz był wykonany na powierzchni 4 cm² i wprowadzony do 4 ml podłoża płynnego. Może być również wykonany na mniejszej powierzchni, ale nie poniżej 1 cm². Następnie wykonuje się posiew na agar z krwią i podłoże MacConcey'a za pomocą ez kalibrowanych, a wynik podawany jest w CFU / cm².

Jest też możliwa szacunkowa ocena liczby bakterii na podstawie standardowo pobranych i wysianych wymazów poprzez odniesienie masywności wzrostu kolonii na podłożach stałych (wartości wyrażone w plusach) do liczby CFU / g tkanki. Wzrost na 1+ (do 10 kolonii) odpowiada 102 CFU / g tkanki, na 2+ (do 100 kolonii) 103 CFU / g, na 3+ (powyżej 100 kolonii ale policzalna liczba) 104 CFU / g oraz na 4+ (wzrost zlewny) 105 CFU / g i powyżej.

Niezależnie od liczności drobnoustrojów w ranie zawsze za patogenne i wymagające podjęcia antybiotykoterapii uznawane są [1, 2, 10]:

- *Streptococcus pyogenes*

- *Pseudomonas aeruginosa*.

Do tej grupy niektórzy autorzy zaliczają również *Staphylococcus aureus* jakkolwiek zdania nt ich negatywnego oddziaływania na ranę przy małej liczbie CFU / g są podzielone [7].

Diagnostyka ran w stopie cukrzycowej [2,4,10]

W zakażeniach ran najczęściej bierze udział *Staphylococcus aureus*, nieco rzadziej *Streptococcus* szczepy beta hemolizujące, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus spp.* pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* i bakterie beztlenowe. Udział beztlenowców w infekcjach mieszanych z tlenowymi stwierdzany jest nawet w ponad 80% ran w stopie cukrzycowej. Flora rany ulega zmianie i jak wykazali francuscy naukowcy [4] może być to związane zarówno z czasem gojenia rany jak i stosowanymi antybiotykami (Tab 1 [cyt z 4]).

Tab1. [cyt. z 4]

Korelacja pomiędzy różnymi typami ran i drobnoustrojami z nich izolowanymi

TYP RANY W STOPIE CUKRZYCOWEJ	PATOGENY
Świeża rana powierzchniowa, brak antybiotykoterapii	S. aureus, Streptococcus B-hem
Rana przewlekła (> 1 miesiąca), wcześniejsza antybiotykoterapia	S. aureus, Streptococcus B-hem, Enterobacteriaceae
Rany leczone cefalosporynami	Enterococcus spp.
Zmiany o charakterze maceracji	Pseudomonas spp. w infekcjach mieszanych z innymi patogenami
Rany przewlekłe (> 6 miesięcy), Antybiotykoterapia o szerokim spektrum	Infekcje mieszane Gram(+) ziarniaki, Corynebacteria, Enterobacteriaceae, pałeczki niefermentujące, beztlenowce +/- grzyby,

Pobieranie materiałów do badań mikrobiologicznych jest wskazane u wszystkich chorych z objawami zakażenia począwszy od II stopnia klasyfikacji gdzie zmiany są wielkości od 0,5-2 cm do stopnia 4 manifestującego się klinicznymi objawami zakażenia rany jak i uogólnioną reakcją zapalną. Najbardziej polecane jest pobieranie ropy przez aspirację i zeszkrobiny z dna rany.

Diagnostyka ran oparzeniowych [2,3,8, 10, 12]

Zmiany powstałe w wyniku oparzeń stanowią bardzo dobre środowisko do namnażania drobnoustrojów. Ich źródłem są zarówno flora własna pacjenta (we wczesnej fazie po urazie) a następnie flora szpitalna (po 4-5 dniach hospitalizacji). Wśród bakterii najczęściej odpowiedzialnych za zakażenia wyróżnia się *Pseudomonas aeruginosa*, a w dalszej kolejności *S. aureus*, *Klebsiella spp.*, *Enterococcus spp.*, *Candida spp.* Rzadko izolowane są beztlenowce, częściej przy objawach sepsy. W celu identyfikacji patogenu najbardziej wartościową diagnostycznie próbką jest bioptat. W przypadku braku możliwości pobrania wycinka wskazany jest wymaz i dodatkowo krew na posiew przy podejrzeniu zakażenia uogólnionego.

Diagnostyka ran odleżynowych [2, 6, 7, 10, 11]

Przyczyną zakażeń odleżyn jest najczęściej mieszaną florą tlenową i beztlenową. Szczególną rolę ze względu na umiejscowienie ran odgrywają pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*, *S. aureus*, *Enterococcus spp.*, *P. aeruginosa*. Z uwagi na słabo wyrażone objawy kliniczne zakażenia poleca się okresowe przesiewowe badania mikrobiologiczne w celu oceny rany. Próbkami pobieranymi do diagnostyki mogą być zarówno wymazy głębokie, aspiraty ropy czy też wycinki. Ważna jest również krew na posiew, z powodu łatwego rozsiewu drobnoustrojów z rany.

Podsumowując, badania mikrobiologiczne mogą w dużym stopniu przyczynić się do podejmowania właściwych decyzji terapeutycznych i zwiększać szansę na wyleczenie ran przewlekłych. Aby tak jednak się stało ważny jest odpowiedni dobór próbek klinicznych do badań, właściwie pobranych i transportowanych do laboratorium oraz stosowanie metod półilościowych i ilościowych w celu określenia czy wyhodowany drobnoustrój jest na pewno przyczyną zakażenia. Dla ostatecznego sukcesu terapeutycznego niezbędna jest również ścisła współpraca mikrobiologów i klinicystów, szczególnie przy interpretacji wyników badań mikrobiologicznych i ich odniesieniu do stanu klinicznego pacjenta.

Spis publikacji

1. Bowler P.G.: Feature: Bacterial Growth Guideline: Reassessing its clinical relevance in wound healing. *Ostomy Wound Manage.*, 2003, 49, 44-53
2. Bowler P.G., Duerden B.I., Armstrong D.G.: Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2001, 14, 244-269.
3. Church D., Elsayed S., Reid O., Winston B., Lindsay R.: Burn wound infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006, 19, 403-434.
4. Bernard L., et al. Management of diabetic foot infections. *Clinical practice guidelines. Medecine et maladies infectieuses.* 2007, 37, 14-25
5. Davies Ch.E., Hill K.E., Newcombe R.G., Stephens P., Wilson M.J., Harding K.G., Thomas D.W.: A prospective study of the microbiology of chronic venous leg ulcers to reevaluate the clinical predictive value of tissue biopsies and swabs. *Wound. Rep. Reg.*, 2007, 15, 17-22.
6. Dow G., Feature: Bacterial swabs and the chronic wound: When, How and What do they mean. *Ostomy Wound Manage.*, 2003, 49, 8-13.
7. Healy B., Friedman A.: ABC of wound healing: Infections. *BMJ*, 2006, April, 332 (7544) 842-843.
8. Ganatra M.A., Ganatra H.A.: Method of quantitative bacterial count in burn wound. *Pak. J. Med. Sci.*, 2007, 23, 3, 415-419.
9. Keast D.H.: Current chronic wound management. *Us Dermatology Review*, 2006, 1-3
10. Oszkiniś G., Gabriel., Pukacki., Majewski. Leczenie ran trudno gojących się Blackhorse, Warszawa 2006, wydanie pierwsze.

11. Sibbald R.G., Williamson D., Orsted H.L., Campbell K., Keast D., Krasner D., Sibbald D: Preparing the wound bed debridement, bacterial balance and moisture balance. *Ostomy Wound Manage.*, 2000, 46, 11, 14-35.

12. Stear J.A., Papini R.P.G., Wilson A.P.R., McGrouther D.A., Parkhouse N.: Quantitative microbiology in the management of burn patients. Relationship between bacterial counts obtained by burn wound biopsy culture and surface alginate swab culture, with clinical outcome following burn surgery and change of dressings. *Burns*, 1996, 22, 177-181.

WAŻNA INFORMACJA DOTYCZĄCA WYDAWANIA PRAWA WYKONYWANIA ZAWODU DIAGNOSTY LABORATORYJNEGO

Biuro Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych uprzejmie informuje, że dokument "Prawo Wykonywania Zawodu Diagnosty Laboratoryjnego" jest wydawany sukcesywnie wszystkim tym osobom, które posiadają kompletne dokumenty i uregulowane zobowiązania finansowe wobec Izby,

PRZYPOMNIENIE:

Chcąc otrzymać dokument "Prawo Wykonywania Zawodu Diagnosty Laboratoryjnego" (PWZDL) należy:

- wpłacić 100 zł. na konto KIDL zgodnie z uchwałą nr 60/2004 KRDL z dnia 17 grudnia 2004 r., tytułem "Wpłata na rzecz KIDL na działalność statutową",
- przesłać do biura KIDL kserokopię dowodu wpłaty z dołączoną czytelną informacją zawierającą w/w tytuł wpłaty, imię i nazwisko oraz numer wpisu na listę diagnostów laboratoryjnych,
- przesłać także zaświadczenie lekarskie o stanie zdrowia stwierdzające zdolność do wykonywania czynności diagnosty laboratoryjnej zgodnie z art 9 ust. 1 pkt 4 ustawy o diagnostyce laboratoryjnej.

PT Diagnosty Laboratoryjni nie posiadający do tej pory PWZDL proszeni są o dokonywanie w/w wpłaty, przysyłania jej kserokopii oraz uzupełnianie ewentualnych braków w dokumentacji.

PT Diagnosta Laboratoryjny we własnym interesie - w trybie pilnym - jest zobowiązany skontaktować się z Działem Diagnostów KIDL (022 741-21-57) w celu uzyskania informacji o ewentualnych brakach w dokumentach i/lub zobowiązaniach finansowych względem Izby.

UWAGA:

Dokument "Prawo Wykonywania Zawodu Diagnosty Laboratoryjnego" jest wysyłany, listem poleconym z załączonym potwierdzeniem odbioru, na adres do korespondencji znajdujący się w dokumentacji KIDL. Posiadane "Zaświadczenia" o wpisie na listę diagnostów laboratoryjnych są ważne do końca 2006 roku".

PROSIMY O PILNE AKTUALIZOWANIE ZMIENIONYCH ADRESÓW DO KORESPONDENCJI.

W przypadku nieodebrania listu poleconego i zwrotu przesyłki przez pocztę do biura KIDL - powtórne przesłanie dokumentu będzie możliwe na pisemną prośbę za dodatkową opłatą poniesionych kosztów ponownego wysłania dotychczas z Państwa, których dotyczyć będzie nie doręczenie w/w przesyłki.

Zwracamy również uwagę, że dokument "Prawo Wykonywania Zawodu Diagnosty Laboratoryjnego" nie zostanie wystawiony i nie będzie wysłany tym diagnostom laboratoryjnym, którzy:

- posiadają braki w dokumentacji,
- zalegają z płatnością obowiązkowych składek członkowskich,
- dotąd przesłali swoje zdjęcia w innym formacie niż 3,5 cm na 4,5 cm, gdyż po zmniejszeniu tych zdjęć do wymaganego formatu okazuje się, że twarz na zdjęciu jest nieczytelna.

W przypadku dostarczenia wraz z dokumentami nieaktualnych zdjęć (np. sprzed kilkunastu lat), KIDL nie będzie ponosił odpowiedzialności za wynikłe z tego powodu problemy lub konsekwencje.

WYDANIE NOWEGO DOKUMENTU (Z POWODU ZNISZCZENIA, ZGUBIENIA, NIEAKTUALNOŚCI ZDJĘCIA) BĘDZIE MOŻLIWE NA PISEMNĄ PROŚBĘ I DODATKOWY KOSZT OSOBY ZAINTERESOWANEJ.

Biuro KIDL
17.10.2006

Diagnostyka waginozy bakteryjnej i atypowych zakażeń przenoszonych drogą płciową.

Beata Mączyńska
Katedra i Zakład Mikrobiologii
Akademii Medycznej we Wrocławiu

Zakażenia dróg płciowych są wbrew pozorom jednymi z najtrudniejszych do leczenia i diagnozowania. Dzieje się tak ze względu na możliwość występowania w cewce moczowej i pochwie bardzo różnorodnej flory bakteryjnej bez objawów klinicznych zakażenia. Jednocześnie z uwagi na fakt, że infekcje te najczęściej przenoszone są drogą płciową, konieczne jest jednocześnie leczenie wszystkich partnerów seksualnych. Bywa to czasem problematyczne w sytuacji, kiedy u osób zakażonych nie występują objawy kliniczne. Mężczyźni częściej chorują bezobjawowo, co związane jest z uboższym w substancje odżywcze wykorzystywane przez drobnoustroje, środowiskiem cewki moczowej. Powoduje to zahamowanie namnażania się niektórych patogenów, które z kolei przeniesione do bogatego w glikogen i inne substancje środowiska pochwy kobiety, znajdują świetne warunki do obfitego wzrostu, prowadzącego niestety do pojawienia się dokuczliwych objawów klinicznych (1).

W tak zwanych chorobach wenerycznych jak kiła czy rzeżączka, przy charakterystycznych, zwykle właściwie rozpoznawanych przez lekarza ginekologa objawach, określone są opcje terapeutyczne i leczenie jest na ogół skuteczne. Gorzej z infekcjami wywołanymi przez patogeny atypowe: chlamydia i mykoplazmy czy inne bakterie jak: paciorkowce, gronkowce, pałeczki Gram-ujemne. Wszystkie one w niewielkiej ilości mogą kolonizować drogi płciowe nie dając objawów zakażenia (2). Bardzo więc trudno określić, co w danym przypadku jest prawdziwą przyczyną niepokojących stanów takich jak: upławy, swędzenie, pieczenie, zaczerwienienie, częstomocz lub skąpomocz czy zaburzenia erekcji. Jeśli w cewce moczowej występują paciorkowce, gronkowce czy *Escherichia coli* w niewielkiej ilości, na ogół nie wymaga to leczenia. Do podjęcia decyzji o leczeniu, konieczna jest ocena ilościowa, która w większości laboratoriów niestety nie jest wykonywana. Prowadzi to do wydawania niemiarodajnych wyników, które są przyczyną błędów terapeutycznych. Przypadkowo zastosowany antybiotyk niszczy naturalną florę fizjologiczną i zamiast do wyleczenia może prowadzić do zaostrzenia objawów klinicznych lub pojawienia się nadkażenia grzybami (3).

Występowanie lub nie objawów klinicznych, może być związane z naturalną odpornością osobniczą i liczebnością zakażającego inokulum. Rozwój mikroflory pochwy jest stymulowany przez hormony, a więc często zależny u kobiety od fazy cyklu miesięczkowego i wieku (4,5). W prawidłowej florze pochwy powinny dominować pałeczki z rodzaju *Lactobacillus*, które utrzymują prawidłowe pH (3,8-4,2). Niskie pH w naturalny sposób chroni przed zakażeniem z zewnątrz (przeniesionym drogą płciową) oraz ogranicza namnażanie się bakterii i grzybów, które w niewielkiej ilości zwykle są obecne w dolnych drogach płciowych. Ten stan subtelnej równowagi pomiędzy pH a jakością i ilością fizjologicznej flory cewki moczowej i pochwy, łatwo jednak zaburzyć. Ciąża, antykoncepcja hormonalna, antybiotykoterapia, irygacje, stosowane środki higieny intymnej, częste zmiany partnerów seksualnych, mogą prowadzić do eliminacji właściwej flory, podwyższenia pH i jednocześnie nadmiernego namnożenia niektórych bakterii z pojawieniem się dokuczliwych objawów klinicznych (2,5,6).

Waginoza bakteryjna BV (*ang. bacterial vaginosis*)

Typowym przykładem zakażenia wynikającego z zaburzenia naturalnego ekosystemu pochwy jest tzw. waginoza bakteryjna. Jest najpowszechniejszą dolegliwością u kobiet w wieku rozrodczym. Szacuje się, że stanowi 60 % wszystkich infekcji w obrębie pochwy i sromu. Jednocześnie nawet u 50 % kobiet może przebiegać bezobjawowo. BV nie jest uważana za chorobę przenoszoną drogą płciową (7). Jest to wielobakteryjne zakażenie charakteryzujące się znacznym zwiększeniem liczby bakterii beztlenowych i mikroaerofilnych, które normalnie bytują w pochwie w bardzo niewielkich ilościach. Stosunek bakterii tlenowych do beztlenowych

zwiększa się z 1:5 (stan normalny) na ok. 1:1000. U ponad 90% pacjentek izoluje się mikroaerofilne pałeczki *Gardnerella vaginalis*. Jednocześnie wyizolowanie *Gardnerella vaginalis* nie stanowi kryterium diagnostycznego bakteryjnej waginozy, ponieważ bakterie te można wyhodować z wydzieliny pochwowej u ponad 50% zdrowych kobiet. Badania kliniczne wskazują jednak na związek wysokiego miana *Gardnerella vaginalis* z występowaniem BV (izoluje się ten drobnoustroj u ponad 90 % kobiet z bakteryjną waginozą) (8, 9).

Charakterystycznym objawem klinicznym BV jest występowanie szarych, homogennych upławów o charakterystycznym „rybim” zapachu (zwiększona produkcja amin stymulowana przez wydzielane przez bakterie beztlenowe różne dekarboksylazy). *Gardnerella vaginalis*, która ma zdolność do przyczepiania się do złuszczonych komórek nabłonka powoduje powstawanie tzw. „clue cells”, charakterystycznych dla BV zmienionych nabłoneków o ziarnistym wyglądzie (5).

Diagnostyka

W praktyce rozpoznanie BV jest ustalane na podstawie kryteriów klinicznych wg. Amsela (10) lub kryteriów mikrobiologicznych wg Haya i Isona (2) lub wg. Nugenta (11).

Kryteria Amsela opierają się na stwierdzeniu przynajmniej trzech z czterech objawów BV.

- 1) rzadka, szarawo-biała, jednorodna wydzielina z pochwy,
- 2) komórki typu *clue cells* w obrazie mikroskopowym >20%
- 3) pH wydzieliny pochwowej >4,5,
- 4) rybi zapach po dodaniu roztworu zasady (10% KOH) do próbki wydzieliny z pochwy.

Alternatywna metoda diagnostyczna polega na barwieniu wymazu z pochwy metodą Grama i ocenie materiału w skali Haya i Isona lub skali Nugenta.

W skali Haya i Isona wyróżnia się następujące stopnie:

- stopień 1 (stan prawidłowy): dominacja pałeczek *Lactobacillus*;
- stopień 2 (stan pośredni): flora mieszana, obecne pałeczki *Lactobacillus* z domieszką bakterii z rodzaju *Gardnerella* lub *Mobiluncus*;
- stopień 3 (BW): w obrazie rozmazu dominują bakterie *Gardnerella* i (lub) *Mobiluncus*; pałeczki *Lactobacillus* nieliczne lub nie występują.

W skali Nugenta ocena opiera się na oszacowaniu proporcjonalnego udziału poszczególnych rodzajów bakterii w preparacie i jego ocenie liczbowej (0-10 punktów). Końcowy wynik <4 punktów wskazuje na stan prawidłowy, 4-6 oznacza stan pośredni, a >6 świadczy o BV. Tabela 1, Zdjęcia 1, 2 i 3

Tabela 1. Ocena rozmazu z pochwy barwionego metodą Grama w kierunku bakteryjnej waginozy (wg. Nugenta)

Obecność morfotypów	liczba bakterii	liczba punktów
<i>Lactobacillus</i> sp.	>30	0
	5-30	1
	1-4	2
	<1	3
	0	4
<i>Gardnerella vaginalis</i> <i>Bacteroides</i> sp. inne pałeczki Gram-	>5	2
	<1-4	1
	0	0
Skrzywione pałeczki Gram zmienne <i>Mobiluncus</i> sp.	>30	4
	5-30	3
	1-4	2
	<1	1
	0	0

Bakterie są punktowane według średniej liczby komórek widocznych w polu widzenia mikroskopu pod powiększeniem 1000x. Całkowitą liczbę punktów obliczamy dodając poszczególne punkty:

Lactobacillus + G.vaginalis i Bacteroides + skrzywione pałeczki Metoda Nugenta jest tania i łatwa do wykonania i wykazuje najwyższą przydatność diagnostyczną w korelacji z odpowiednim rozpoznaniem klinicznym. Szczególne znaczenia ma ona w monitorowaniu efektów leczenia BV, gdyż poprawa kliniczna nie musi korelować z normalizacją biocenozy pochwy, co może być punktem wyjścia nawrotów BV(8). Całkowicie nieprzydatny jest w diagnostyce BV klasyczny posiew na podłoża, szczególnie w kierunku bakterii tlenowych. Izoluje się często różnorodną florę Gram+ i Gram-, ale wszystkie te drobnoustroje mogą występować w prawidłowej wydzielinie pochwy i ich eliminacja nie przyczynia się do poprawy stanu klinicznego.

Leczenie BV

Wykonanie antybiogramów i leczenie antybiotykami, zwłaszcza tymi, które swoim spektrum nie obejmują bakterii beztlenowych, może przyczynić się do pogorszenia stanu pacjentki, powodując jeszcze silniejsze przesunięcie naturalnej równowagi w biocenozie pochwy w kierunku beztlenowców i eliminując resztki wrażliwych Gram+ pałeczek Lactobacillus. W leczeniu stosuje się antybiotyki lub chemioterapeutyki obniżające poziom bakterii beztlenowych i mikroaerofilnych jak klindamycyna i metronidazol. Zalecane jest także stosowanie preparatów probiotycznych odbudowujących naturalną florę pochwy jak Lactovaginal lub stosowany doustnie LaciBios-femina. Leczenie wskazane jest u kobiet, u których występują objawy chorobowe i w przypadku pacjentek poddawanych niektórym inwazyjnym zabiegom ginekologicznym (13, 14, 15).

Zalecany schemat leczenia (wg. CDC) to:

- metronidazol 400-500 mg doustnie 2 razy na dobę przez 5-7 dni
- metronidazol żelu dopochwowym (0,75%) raz na dobę przez 5 dni
- klindamycyna w kremie dopochwowym (2%) raz na dobę przez 7 dni

Leczenie alternatywne

- metronidazol 2 g w jednorazowej dawce lub
- klindamycyna doustnie 300 mg 2 razy na dobę przez 7 dni lub
- klindamycyna czopki/globulki dopochwowo 100mg raz na dobę

Zalecany schemat leczenia (wg. CDC) to:

- metronidazol 400-500 mg doustnie 2 razy na dobę przez 5-7 dni
- metronidazol żelu dopochwowym (0,75%) raz na dobę przez 5 dni
- klindamycyna w kremie dopochwowym (2%) raz na dobę przez 7 dni

Leczenie alternatywne

- metronidazol 2 g w jednorazowej dawce lub
- klindamycyna doustnie 300 mg 2 razy na dobę przez 7 dni lub
- klindamycyna czopki/globulki dopochwowo 100mg raz na dobę

Atypowe zakażenia przenoszone drogą płciową

Innymi, trudnymi do leczenia i diagnostyki schorzeniami są zakażenia atypowe dróg płciowych, wywołane przez chlamydia, mykoplazmy i ureaplazmy. Bakterie te mają specyficzne właściwości fizjologiczne i bardzo małe rozmiary komórek (300 nm do 1 mm w zależności od fazy rozwojowej), przez co ich oznaczanie nie jest łatwe i powinno być wykonywane w specjalistycznych placówkach. Konieczne jest tutaj wykonanie testu polegającego na oznaczaniu antygenu czyli rzeczywistej obecności patogenu. Badania polegające na oznaczaniu przeciwciał wykonywane w niektórych laboratoriach, często prowadzą do błędnej interpretacji, ponieważ przeciwciała te występują także u zdrowych ludzi i nie świadczą o aktualnym zakażeniu.

Chlamydia trachomatis

Chlamydia są wewnątrzkomórkowymi patogenami, które utraciły zdolność syntezy własnego ATP przez co niemożliwe jest ich wyhodowanie na sztucznych podłożach. Bardzo małe rozmiary nie

pozwalają na obserwacje ich komórek w standardowych powiększeniach w mikroskopie świetlnym, jak w przypadku typowych patogennych drobnoustrojów. Gatunek *Chlamydia trachomatis* uważa się za przyczynę ok. 40-50% tzw. nierzęzączkowych zapaleń cewki moczowej (NGU- *nongonococcal urethritis*). Objawy infekcji są zwykle mało charakterystyczne. U mężczyzn jest to surowiczy, śluzowy, rzadziej ropny wyciek z cewki moczowej i dolegliwości dysuryczne, u kobiet śluzowe lub śluzowo-ropne zapalenie szyjki macicy, w którym upławom mogą towarzyszyć bóle w podbrzuszu. U obojga płci w skutek autoinfekcji możliwe jest zakażenie worka spojówkowego (szczypty okulo-genitalne), występują także zakażenia bezobjawowe (16, 17). Gatunek ten jest zresztą bardzo zróżnicowany. Na podstawie antygenów typowo swoistych wyróżnia się 17 serotypów, które są odpowiedzialne za różne jednostki kliniczne (18):

- jaglica (serotypy A, B, Ba, C) wtętowe zapalenie spojówek, ze zmianami na rogówce i bliznowaceniem, mogącym prowadzić do ślepoty (choroba nie występuje w Polsce, głównie w Afryce, Azji i USA)
- ziarnica weneryczna (LGV *lymphogranuloma venerum* serotypy L1, L2, L3) choroba weneryczna, cechująca się ropnym zapaleniem pachwinowych węzłów chłonnych (występuje głównie w klimacie tropikalnym), obecnie notowane są przypadki zapalenia odbytu i jelita grubego u homoseksualistów.
- zakażenia przenoszone drogą płciową (serotypy D K)
 - nierzęzączkowe zapalenie cewki moczowej (NGU)
 - zapalenie pęcherza moczowego
 - zapalenia szyjki macicy, jajników
 - zapalenie jajowodów i błony śluzowej macicy (z bliznowaceniem mogącym prowadzić do niepłodności, poronień, ciąży pozamacicznej)
 - zapalenia błon płodowych
 - poporodowe zapalenie narządów miednicy małej (PID)
 - zapalenie najądrzy
 - zapalenie odbytnicy (najczęściej u homoseksualistów)
 - zapalenia spojówek (najczęściej u noworodków)
 - zakażenia dróg oddechowych i CUN u noworodków
 - Zespół SARA (*sexually acquired reactive arthritis*) w tym zespół Reitera
 - zespół Fitz-Hugh-Curtisa (*perihepatitis*)

Diagnostyka zakażeń *C.trachomatis*

Cechy morfologiczne i niespotykana fizjologia chlamydii mają bezpośredni wpływ na wybór stosowanych metod diagnostycznych. Opierają się na wykrywaniu ciałek wtętowych *C. trachomatis* hodowlach komórkowych lub wykrywaniu antygenów w bezpośrednich wymazach z dróg płciowych lub spojówek, a także na wykrywaniu kwasów nukleinowych. Pobieranie i sposób przesłania materiału zależy od stosowanego testu (19,20):

Diagnostyka zakażeń *C.trachomatis*

Cechy morfologiczne i niespotykana fizjologia chlamydii mają bezpośredni wpływ na wybór stosowanych metod diagnostycznych. Opierają się na wykrywaniu ciałek wtętowych *C. trachomatis* hodowlach komórkowych lub wykrywaniu antygenów w bezpośrednich wymazach z dróg płciowych lub spojówek, a także na wykrywaniu kwasów nukleinowych. Pobieranie i sposób przesłania materiału zależy od stosowanego testu (19,20):

- metoda hodowlana - w identyfikacji *C. trachomatis* używane są najczęściej linie komórkowe fibroblastów mysich (komórki McCoy'a). Po wybarwieniu jodyną Jonesa, w dodatniej hodowli, na tle prawidłowych, wrzecionowatych komórek McCoy'a, widoczne są kuliste komórki wypełnione zabarwionymi na ciemny brąz wtętami (Zdjecie 4).
- metody immunofluorescencyjne- test DIF (Zdjecie 5)
- metody immunoenzymatyczne
- metody genetyczne (hybrydyzacja, PCR, LCR)

Obecnie w Polsce jak i wielu innych krajach jedną z najczęściej stosowanych metod diagnostycznych tych zakażeń jest immunofluorescencja bezpośrednia z użyciem przeciwciał monoklinalnych skierowanym przeciwko antygenom białkowym wszystkich stadiów rozwojowych *C. trachomatis*. Jej zaletą jest wysoka czułość i swoistość, krótki czas badania, stosunkowo niskie koszty i proste wykonanie. Metody genetyczne wykazują oczywiście wyższą czułość i mogą być stosowane w diagnostyce, jednakże wymagają specjalistycznego sprzętu, złożonej techniki wykonania i zwykle większych nakładów finansowych. Nie polecane są natomiast testy immunoenzymatyczne (oparte o wykrywanie LPS chlamydii) ze względu na niską swoistość i „szybkie testy” immunodifuzyjne (kontaminacja próbki krwią bardzo obniża czułość). Oznaczanie przeciwciał w zakażeniach dróg płciowych wywoływanych przez *C. trachomatis* także nie ma wartości diagnostycznej.

Leczenie

W leczeniu stosuje się przede wszystkim: **tetracykliny, makrolidy i chinoliny. Schemat leczenia zależy od postaci zakażenia, oraz ewentualnych nawrotów. Należy leczyć wszystkich partnerów seksualnych (21).**

- Ziarnica weneryczna pachwin (serotypy L1-L3)
doksycyklina doustnie 100 mg 2x/dobę
erytromycyna - doustnie 500 mg 4x/dobę } przez 3 tygodnie
- NGU (niepowikłane) (serotypy D-K)
doksycyklina doustnie 100 mg 2x/dobę
erytromycyna - doustnie 500 mg 4x/dobę
azytromycyna doustnie 1000 mg jednorazowo
klarytromycyna - doustnie 500 mg 1x/dobę
roksytromycyna doustnie 150 mg 2x/dobę
ofloksacyna - doustnie 400 mg 1x/dobę } przez 7 dni
- Zakażenia powikłane (zapalenie najądrzy i gruczołu krokowego, zespół Reitera, zapalenie odbytnicy i narządów miednicy mniejszej.
doksycyklina doustnie 100 mg 2x/dobę
erytromycyna - doustnie 500 mg 4x/dobę
klarytromycyna - doustnie 500 mg 1x/dobę
roksytromycyna doustnie 150 mg 2x/dobę
ofloksacyna - doustnie 400 mg 1x/dobę
azytromycyna doustnie 500 mg 1x/dobę } przez 10-14 dni
przez 3 dni po 10 dniach kurację powtórzyć

Mykoplazmy płciowe

Cechą charakterystyczną mykoplazm jest brak sztywności, typowej dla innych bakterii ściany komórkowej oraz bardzo małe rozmiary komórek (100-300nm), zbliżone wielkością do dużych cząstek wirusowych. Z tego względu niemożliwa jest obserwacja komórek mykoplazm w mikroskopie świetlnym, przy standardowych powiększeniach. Najważniejszymi gatunkami występującymi w drogach płciowych ze względu na potencjalną patogenność u ludzi są: *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* i *Mycoplasma genitalium*. Jednakże wszystkie trzy gatunki mogą występować w drogach płciowych aktywnych seksualnie mężczyzn i kobiet bez objawów zakażenia. Szczególnie dotyczy to gatunku *U. urealyticum* (kolonizacja ponad 60% zdrowych kobiet). Poważnym problemem są jednak powikłania wynikające z kolonizacji lub zakażenia cewki moczowej. Bezobjawowa kolonizacja i przewlekłe zakażenia cewki moczowej mogą się rozprzestrzeniać na górne odcinki układu moczowego i być przyczyną zapalenia pęcherza moczowego, nerek i kłębuszków nerkowych. *U. Urealyticum* może też wywołać zapalenie pochwy, szyjki macicy i może prowadzić do bezpłodności. Stwierdzono też obecność *U. urealyticum* wraz z *M. genitalium* u kobiet z PID, u których wykluczono inne tło infekcji. Obecnie uważa się, że *M. hominis* i *U. urealyticum* mogą być przyczyną zapalenia narządów miednicy mniejszej i wraz z *Mycoplasma genitalium* odpowiadają za około 10-15% przypadków zachorowań (22-25)

Zakażenia wywołane przez *M. hominis*, *U. urealyticum*, *M. genitalium*

- nierzeżączkowe zapalenie cewki moczowej (NGU)
- zapalenia jąder, najądrzy szyjki macicy, jajników, jajowodów, macicy (powikłaniem stanów zapalnych może być niepłodność)
- zapalenie śluzówki macicy (najczęściej jako powikłanie inwazyjnych zabiegów ginekologicznych)
- zakażenia dróg oddechowych i CUN u noworodków
- zapalenie gruczołu krokowego
- zapalenia pęcherza moczowego i kłębuszków nerkowych
- zapalenia stawów

Diagnostyka

Ze względu na szczególne zapotrzebowania odżywcze, mykoplazmy wymagają specjalnych podłoży i atmosfery bogatej w CO₂. Ich powolny wzrost, wrażliwość na czynniki środowiska, trudności w przechowywaniu i pasażowaniu szczepów powodują, że diagnostyka zakażeń wywoływanych przez te drobnoustroje jest trudna i powinna być prowadzona w specjalistycznych pracowniach. W przeciwieństwie do chlamydii, *M. hominis* i *U. urealyticum* można hodować na sztucznych pożywkach wzbogaconych surowicą końską i wyciągiem drożdżowym. Natomiast w przypadku *M. genitalium* hodowla jest praktycznie niemożliwa i metoda ta nie ma wartości diagnostycznej. Przy izolacji tych drobnoustrojów od pacjentów z infekcją dróg moczowo-płciowych pojawia się często problem w interpretacji wyniku badania. Uznanie mykoplazm za czynnik etiologiczny zakażenia, powinno się wiązać z izolacją w znamiennej ilości >10⁴ komórek na ml pobieranej wydzieliny. Wyniki uzyskane bardzo czułymi i swoistymi metodami genetycznymi (PCR), często wykrywają bardzo niewielką ilość drobnoustroju. Należałoby wtedy uznać wykrycie mykoplazm jedynie za kolonizację, a nie czynnik etiologiczny zakażenia, ale ocena tego faktu jest niezwykle trudna, zwłaszcza przy wcześniejszym leczeniu i występowaniu charakterystycznych objawów klinicznych i zależy w dużej mierze od miejsca izolacji. Istotnym elementem w diagnostyce, warunkującym uzyskanie prawidłowego wyniku, jest właściwe pobranie materiału do badań zależne od użytej metody (22,26).

Do stosowanych metod diagnostycznych należą:

- metoda hodowlana ogląda się charakterystyczne kolonie mykoplazm o wyglądzie „jaja sadzonego” z wrastającym środkiem, widoczne w mikroskopie pod powiększeniem 50-100x. W przypadku *U. urealyticum* kolonie nie mają charakterystycznej obwódki, natomiast przybierają brązowo-czarne zabarwienie związane z metabolizmem zawartych w pożywce soli manganu. Dodatni wynik hodowli świadczy o obecności mykoplazm lub ureaplazm w materiale. (Zdjęcie 6)
- metoda biochemiczna (testy Mycoplasma IST, Mycoplasma DUO, Mycofast) Obecność drobnoustroju wykrywa się przez zmianę zabarwienia z żółtego na **czerwoną** na pasku identyfikacyjnym, powodowaną przez zmianę pH na skutek rozkładu substratu (mocznika lub argininy). Test daje możliwość oceny ilościowej, co w przypadku ilości powyżej 10⁴ komórek mykoplazm, pozwala na uznanie ich z dużym prawdopodobieństwem za czynnik etiologiczny zakażenia. W teście tym, na podstawie wykonanego jednocześnie antybiogramu, można także ocenić wrażliwość szczepów na stosowane w zakażeniach mykoplazmowych antybiotyki.
- metoda genetyczna PCR zastosowanie swoistych primerów pozwala rozróżnić wszystkie gatunki mykoplazm płciowych w tym uznany niedawno za odrębny gatunek biotyp *Ureaplasma parvum* (27).
Pomimo, że dostępne są komercyjne testy oznaczające poziom swoistych przeciwciał, nie mają one wartości diagnostycznej w zakażeniach w obrębie dróg płciowych, ze względu na powszechną kolonizację (23).

Leczenie

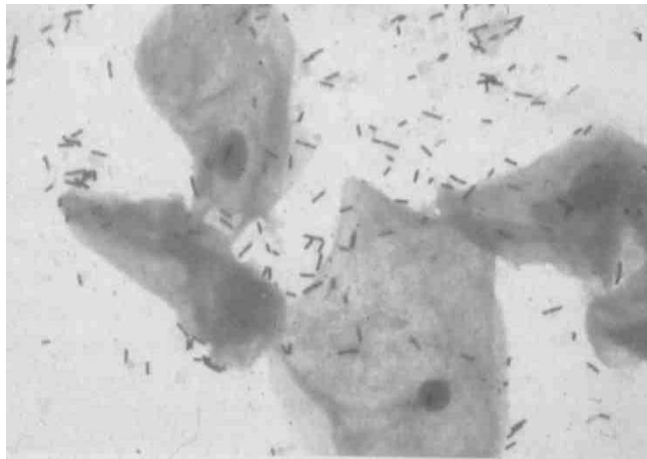
Powinno się leczyć zakażenia objawowe i kobiety ciężarne ze względu na niebezpieczeństwo zakażeń noworodków. Wykonywanie badań w tym kierunku i ewentualna eradykacja zalecana jest także przy leczeniu niepłodności. Skuteczne są antybiotyki z grupy makrolitów, chinologów i tetracyklin (28, 29). W przypadku *M. hominis* ponad 90% szczepów jest jednak opornych na erytromycynę (30). Stosunkowo najwyższą skuteczność wykazuje doksycyklina (31).

NGU (niepowikłane)

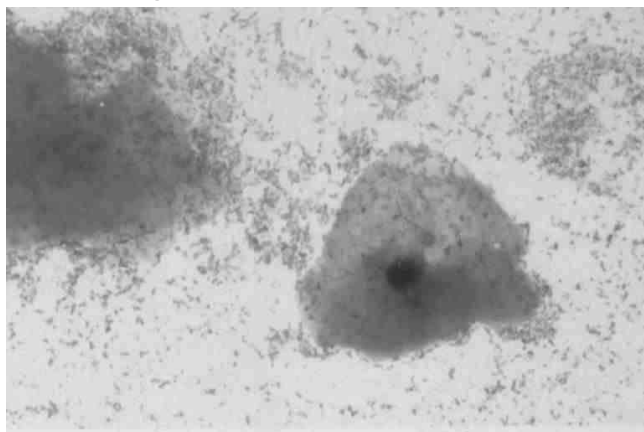
- *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*
doksycyklina doustnie 100 mg 2x/dobę
ofloksacyna - doustnie 400 mg 1x/dobę } przez 10-14 dni
- *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*
azytromycyna doustnie 500 mg 1x/dobę przez 3 dni
po 10 dniach kurację powtórzyć
erytromycyna - doustnie 500 mg 4x/dobę
klarytromycyna - doustnie 500 mg 1x/dobę } przez 10-14 dni
roksytromycyna doustnie 150 mg 2x/dobę }

Podsumowując przedstawione dane dotyczące diagnostyki i leczenia bakteryjnej waginozy oraz zakażeń dróg płciowych wywołanych przez chlamydia i mykoplazmy, należy podkreślić, że w wielu laboratoriach popełnia się błędy wynikające z niewłaściwego doboru metod stosowanych w tej diagnostyce. Powoduje to niską wykrywalność zakażeń, wyniki fałszywie dodatnie lub niewłaściwą interpretację badania. Natomiast tylko prawidłowa diagnoza oparta na kompleksowych badaniach z użyciem wiarygodnych testów jest gwarancją skutecznego leczenia.

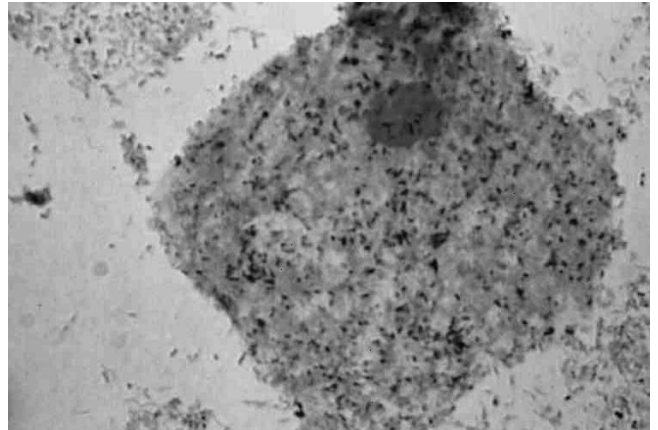
Zdjęcie 1. Stan normalny *Lactobacillus*, prawidłowe nabłonki, brak lub niewielka ilość innej flory



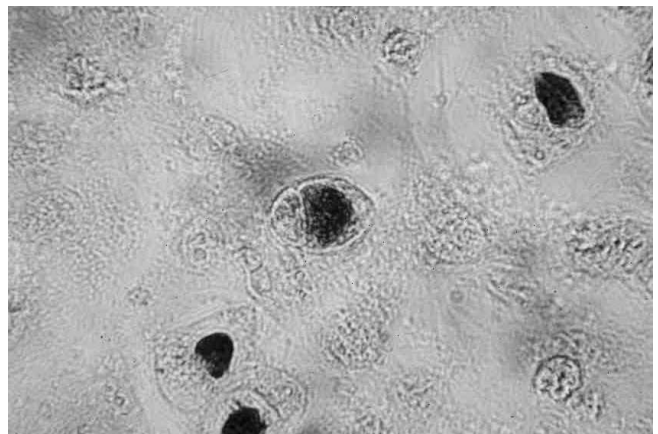
Zdjęcie 2 - Stan nieprawidłowy-bakteryjna waginoza BV
brak *Lactobacillus*, duża ilość flory mikroaerofilnej
Gardnerella vaginalis, *Mobiluncus*



Zdjęcie 3 -Typowa dla BV tzw. „clue cell”- zniszczony, upakowany bakteriami nabłonek



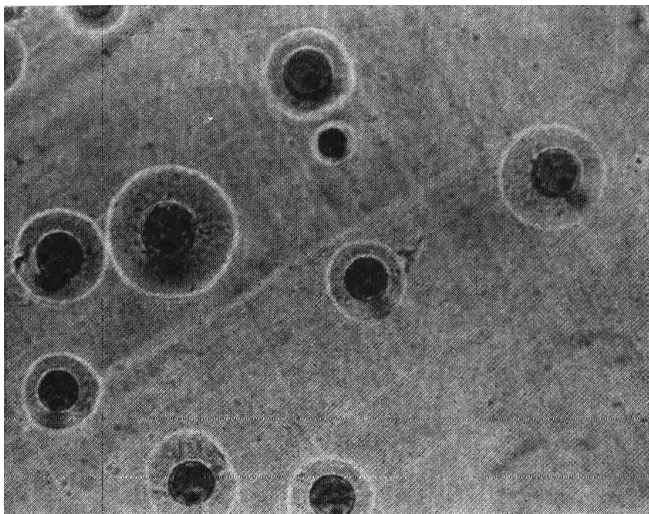
Zdjęcie 4. Ciała wtrętowe *C.trachomatis* w hodowli komórek McCoy'a barwione jodyną Jonesa



Zdjęcie 5. Ciała wtrętowe *C.trachomatis* w komórkach nabłonkowych dróg płciowych w metodzie immunofluorescencji bezpośredniej



Zdjęcie 6. Charakterystyczne kolonie *Mycoplasma pneumoniae* na pożywce stałej, widoczne w mikroskopie świetlnym przy powiększeniu 100x



Piśmiennictwo

- Friedek D., Ekiel A., Romanik M., Chełmicki Z., Wiechuła B., Wilk I., Józwiak J., Martirosian G.: Co-occurrence of urogenital mycoplasmas and group B Streptococci with chlamydial cervicitis. *Pol. J. Microb.*, 2005; 54(3): 253-255.
- Mardh P.A.: The vaginal ekosystem. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1991, 165: 1163-1168
- Sheary B., Dayan L.: Recurrent vulvovaginal candidiasis. *Aust. Fam. Physician* 2005; 34:147-50.
- Hay P.E., Lamont R.F., Taylor-Robinson D., Morgan D.J., Ison C., Pearson J.: Abnormal bacterial colonisation of the genital tract and subsequent preterm delivery and late miscarriage. *Brit. Med. J.*, 1994; 308: 295-298
- Kochan.P : Wybrane schorzenia dróg moczowo płciowych kobiety i leczenie wg CDC. Kryteria WHO/FAO dla probiotyków i ich zastosowanie w ginekologii w świetle najnowszych badań. *Gin. Prakt.*, 2005; 87, 6:11-18.
- Leitich H., Bodner-Adler B., Brunbauer M. i wsp.: Bacterial vaginosis as a risk factor for preterm delivery: A meta-analysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2003; 189: 139-147.
- Peterek J.: Występowanie, rozpoznawanie i leczenie zakażenia Bacterial Vaginosis. *Nowa Medycyna-Ginekologia.*, 1999;7,6.
- Soper D.E.: Bacterial vaginosis and postoperative infections. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1993; 169: t-9.
- McDonald H.M., O'Loughlin J.A., Vigneswaran R., et al.: Impact of metronidazole therapy on preterm birth in women with bacterial vaginosis flora (*Gardnerella vaginalis*): a randomised, placebo controlled trial [see comments]. *Brit. J. Obstet. Gynaecol.*, 1997; 104: 1391-1397
- Amsel R., Totten P.A., Spiegel C.A., Chen K.C., Eschenbach D., Holmes K.K.: Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am. J. Med.*, 1983; 74: 14-22
- Nugent R.P., Krohn M.A., Hillier S.L.: Reliability of diagnosing of bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, 29: 297-301.
- Hay P.E.: Therapy of bacterial vaginosis. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1998; 41: 6-9
- Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for treatment of sexually transmitted diseases. *MMWR*, 2002; 51: 42-5.
- Reid G., Charbonneau D., Erb J. i wsp.: Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2003, 35: 131-134.
- Dajek Z. *Chlamydia trachomatis* w zakażeniach cewki moczowej i narządu rodnego. *Mikrobiologia Medycyna* 2000; 2 (23): 6-9.
- Zdrodowska-Stefanow B., Ostaszewska I. *Chlamydia trachomatis* zakażenia u ludzi. Volumes, Wrocław 2000.
- Batteiger B.E., Lin P.M., Jones R.B., van der Pol B.J.: Species-, serogroup-, and serovar-specific epitopes are juxtaposed in variable sequence region 4 of the major outer membrane proteins of some *Chlamydia trachomatis* serovars. *Infect. Immun.*, 1996; 64(7):2839-41.
- Choroszy-Król I. Chorobotwórczość, metody identyfikacji i leczenie zakażeń wywołanych przez *Chlamydia trachomatis*. *Urologia Polska* 1999; 52, 2: 125-35.
- Rabenau HF, Köhler, Peters M, Doerr HW, Weber B. Low correlation of serology with detection of *Chlamydia trachomatis* by ligase chain reaction and antigen EIA. *Infection* 2000; 2: 97-102.
- Centers for Disease Control Guidelines for treatment of sexually transmitted diseases. *MMWR*, 1998; 47: 1-116.
- Biernat- Sudolska M. Zakażenia chlamydiowe i mykoplazmatyczne dróg moczowo- płciowych ludzi. *Mikrobiol Med.* 1998;4(17):19-23
- Grzeško Joanna. Częstość wykrywania *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* *Ureaplasma urealyticum* metodą biochemiczną i genetyczną u kobiet z niepłodnością: Praca doktorska. Akademia Medyczna im. Piastów śląskich we Wrocławiu, Klinika Ginekologii II Katedry Ginekologii i Położnictwa. 2006
- Bjornelius E, Lidbrink P, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium* in non-gonococcal urethritis--a study in Swedish male STD patients. *Int J STD AIDS*. 2000 May;11(5):292-6.
- Elias M, Grzeško J, Siejkowski R, Nowicka J, Mączyńska B, Goluda M, Gabrys MS Obecność *Mycoplasma hominis* i *Ureaplasma urealyticum* w kanale szyjki macicy kobiet. *Ginekol Pol.* 2005 Jan;76(1):28-32.
- Jensen JS, Uldum SA, Søndergård-Andersen J, Vuust J, Lind K. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. *J Clin. Microbiol.* 1991 Jan; 29 (1): 4650
- Kong F, Ma Z, James G, Gordon S, Gilbert GL. Species identification and subtyping of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* using PCR-based assays. *J Clin Microbiol.* 2000 Mar;38(3):1175-9.
- Johannisson G, Enstrom Y, Lowhagen GB, Nagy V, Ryberg K, Seeberg S, Welinder- Olsson C. Occurrence and treatment of *Mycoplasma genitalium* in patients visiting STD clinics in Sweden. *Int J STD AIDS*. 2000 May;11(5):324-6
- Bartoszewicz M, Mączyńska B. Chorobotwórczość *Mycoplasma hominis* i *Ureaplasma urealyticum* ze szczególnym uwzględnieniem noworodkowego. *Adv Clin Exp Med* 2004 Sep;13(4) Suppl.1:139-144.
- Baseman JB, Tully JG. *Mycoplasmas* : sophisticated, reemerging and burdened by their notoriety. *Emerg Infect Dis.* 1997 Jan-Mar;3(1):21-32.
- Kilic D, Basar MM, Kaygusuz S, Yilmaz E, Basar H, Batislam E. Prevalence and treatment of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, and *Mycoplasma hominis* in patients with non-gonococcal urethritis. *Jpn J Infect Dis*. 2004.

UWAGA !!!

W związku z podjętą w dniu 29 lutego 2008 roku uchwałą nr 48/II/2008 Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych o wysokości składki członkowskiej na poziomie 20,00 zł miesięcznie, która ma obowiązywać od 1 kwietnia 2008 r., Prezydium KRDL uprzejmie wyjaśnia.

P.T. Diagnostów Laboratoryjni, którzy dokonali opłaty składki „z góry” za okres następujący po 1 kwietnia 2008 r., są zobowiązani do uzupełnienia należności za ten czas według nowej, obowiązującej stawki, tzn. 20,00 zł miesięcznie.

Skarbnik KRDL
(-) Włodzimierz Drejski
17 marca 2008 r.

**Powstawanie biofilmu bakteryjnego i jego konsekwencje
nowym wyzwaniem współczesnej medycyny**

Dr nauk med. Marzenna Bartoszewicz
Katedra Mikrobiologii A.M. Wrocław
Ul. Chałubińskiego 4
e-mail: marzbp@mbio.am.wroc.pl
+4871 7841301

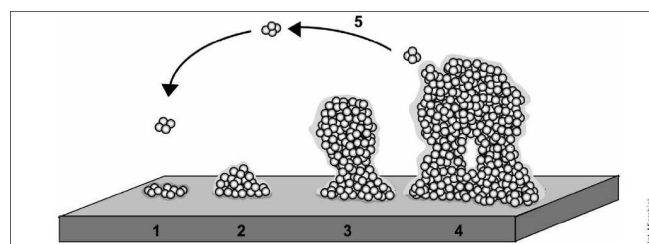
Pod koniec lat 70 tych XX wieku została stworzona przez zespół profesora J. W. Costertona podstawa teorii wyjaśniającej, jakie mechanizmy umożliwiają drobnoustrojom adhezję do żywych i nieożywionych powierzchni oraz jakie korzyści wynikają z tworzenia struktury biofilmu, jako swoistej niszy ekologicznej [1]. Ogromny postęp w dziedzinie mikroskopii przede wszystkim użycie skaningowego mikroskopu laserowego i mikroskopu konfokalnego pozwala na coraz dokładniejsze poznanie struktury biofilmu [2]. Biofilm występuje powszechnie w środowisku naturalnym (rury kanalizacyjne, zbiorniki wodne), a także powstaje na ogromnej ilości różnych powierzchni, włączając żywe tkanki, powierzchnie cewników i implantów [2]. Badania nad biofilmem skupiają badaczy z różnych dyscyplin wiedzy, wspólne wysiłki mikrobiologów, biologów, biotechnologów, chemików, matematyków pozwalają odpowiedzieć na kolejne pytania dotyczące natury tak powszechnie tworzonej przez drobnoustroje struktury [5, 14]. Bakterie w skupisku dostosowują procesy metaboliczne w zależności od dostępności składników odżywczych oraz zapewniają sobie ochronę przed szkodliwymi warunkami [13]. Fenotypowe zróżnicowanie komórek w biofilmie wskazuje na wyspecjalizowanie i podział funkcji. Ponadto bakterie wydzielają substancje, które wpływają na ekspresję genów i pozwalają na komunikację między sobą w obrębie skupiska [10]. Bliskość komórek w biofilmie tworzy idealne warunki dla horyzontalnej wymiany materiału genetycznego przez plazmidy i bakteriofagi [10]. Plazmidy przenoszą między innymi geny oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, umożliwiając szybkie rozprzestrzenianie się bakterii opornych [8].

Istnieją trzy składowe biofilmu, bez których niemożliwe jest jego powstanie, tj. drobnoustroje, macierz oraz powierzchnia [3].

Macierz składa się z pozakomórkowych polimerowych substancji (EPS, extracellular polymeric substances) jej skład jest charakterystyczny dla gatunku bakterii, ale może różnić się u przedstawicieli jednego gatunku żyjących w odmiennych warunkach środowiska [12]. Podstawowym i niezbędnym elementem macierzy są egzopolisacharydy nadające biofilmowi właściwości kationowe lub anionowe [3] i tworzące szkielet, w obrębie którego rozmieszczone są komórki bakterii, a dodatkowo w skład macierzy wchodzi substancje obce wchłonięte ze środowiska [2, 3]. Powierzchnia biofilmu może mieć właściwości hydrofilowe lub hydrofobowe, może też posiadać obie cechy jednocześnie [18].

Wyróżniono kilka etapów powstawania biofilmu (ryc. 1). Warunkiem rozpoczęcia tworzenia biofilmu, jest adhezja komórek bakteryjnych do powierzchni, która w dalszej kolejności umożliwia rozmnażanie oraz akumulację komórek w postaci wielu warstw i w konsekwencji utworzenie skupiska zamkniętego w polimerowej macierzy [1, 12, 14]. Zbliżenie się komórki bakteryjnej do powierzchni materiału polimerowego następuje, gdy spektrum działania sił van der Waalsa wynosi 20-50 nm, w odległości poniżej 20 nm następuje rywalizacja sił elektrostatycznego przyciągania i odpychania w wyniku czego dochodzi do zmniejszenia dystansu między komórką a powierzchnią biomateriału [6]. Nieodwracalny etap adhezji, faza unieruchomienia, wymaga specyficznych interakcji typu receptor-ligand. Na tym etapie adhezji biorą udział substancje i struktury wytwarzane pozakomórkowo, integralnie związane z komórką bakteryjną, takie jak adhezyjny białkowe i egzopolisacharydy [7]. Adhezyjny mają charakter lektyn łączących się specyficznie z receptorami na powierzchni materiału polimerowego. Wytwarzanie śluzu jest ważnym czynnikiem warunkującym zdolność bakterii do końcowego wykształcania się biofilmu poprzez bakteryjne przyleganie do polimerowych powierzchni i zlepianie pomiędzy komórkami, z następczym nagromadzeniem wielokomórkowego „grona” bakterii. Gdy dynamiczna równowaga zostanie osiągnięta, zewnętrzna warstwa bardziej rozrośnięta niż wewnętrzna, zaczyna tworzyć planktoniczne

organizmy [1, 12]. Dojrzały biofilm znajduje się w stanie dynamicznej równowagi. W czasie, gdy jedne komórki aktywnie namnażają się, inne ograniczają swoją aktywność i obumierają. Jednocześnie strukturę biofilmu opuszczają stale pojedyncze komórki lub agregaty komórek, które już jako organizmy planktonowe mogą zapoczątkować utworzenie biofilmu w innym miejscu [3]. Odłączanie się komórek od biofilmu może być spowodowane przez niekorzystne czynniki zewnętrzne, np. nasilony przepływ cieczy, ale ostatnie badania dowodzą, że może być to również proces aktywny, ściśle regulowany przez przytwierdzone komórki [14]. Bakterie prezentują kilka strategii rozsiewania. Proces aktywnego rozsiewania komórek jest prawdopodobnie sposobem poszukiwania nowych nieskolonizowanych powierzchni bogatych w składniki odżywcze [2]. Między komórkami drobnoustrojów w biofilmie istnieje system komunikacji nazwany Quorum sensing (QS) opierający się na wytwarzaniu małych cząsteczek sygnalizacyjnych autoinduktorów (AI) [11, 20] i pozwalający na chemotaksję w bakterii Gram + i Gram - do formowania się struktury biofilmu.



Ryc. 1. Etapy tworzenia biofilmu: 1. wstępna adhezja komórek do powierzchni, 2. produkcja śluzu, 3. rozwój architektury biofilmu, 4. dojrzwienie biofilmu, 5. uwalnianie pojedynczych komórek z biofilmu [12].

Dlaczego bakterie tworzą biofilm? Jest kilka teorii wzajemnie się uzupełniających

1. Tworzenie biofilmu jako strategia obronna komórek przed zmieniającymi się ostrymi warunkami środowiska, jak ekstremalne temperatury, pH, ekspozycja na promieniowanie UV [5].

Opisywane skupiska drobnoustrojów są znacznie lepiej niż komórki planktonowe chronione przed czynnikami fizycznymi i chemicznymi, włącznie ze środkami przeciwdrobnoustrojowymi i układem immunologicznym. [6, 10]

2. Tworzenie biofilmu jako sposób na skolonizowanie korzystnego miejsca pod względem panujących warunków, głównie dostępności składników odżywczych [3, 5, 14].

3. Życie w skupisku i płynące z niego korzyści przede wszystkim wymiana materiału genetycznego między komórkami, co umożliwia przekazywanie istotnych dla przeżycia cech, w tym oporności na antybiotyki [10]. Dodatkowo bezpośrednia bliskość komórek w skupisku umożliwia komunikację między nimi za pomocą wyspecjalizowanych systemów quorum sensing [7, 11]. Badania dowodzą, że ponad 60% zakażeń bakteryjnych jest związanych z tworzeniem biofilmu (tab. 1, tab. 2) [4].

*Tabela 1. Zakażenia związane z powstawaniem biofilmu na żywych tkankach organizmu.

Zakażenie lub choroba	Gatunek bakterii
Próchnica zębów	Kwasogenne Gram-dodatnie ziarniaki (rodzaj <i>Streptococcus</i>)
Zapalenie oębnej	Gram-ujemne beztlenowe bakterie jamy ustnej
Zapalenie ucha środkowego	Atypowe szczep <i>Haemophilus influenzae</i>
Chroniczne zapalenie migdałków	Różne gatunki
Mukowiscydoza	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Burkholderia cepacia</i>
Zapalenie wsierdzia	<i>Streptococci</i> , <i>staphylococci</i>
Zmartwiałe zapalenie powięzi	<i>Streptococci</i> grupy A
Zakażenia układu mięśniowo-szkieletowego	Gram-dodatnie ziarniaki
Zapalenie szpiku	Różne gatunki
Zakażenia dróg żółciowych	Bakterie jelitowe
Zakażenie kamienie nerkowe	Gram-ujemne pałeczki
Bakteryjne zapalenie gruczołu krokowego	<i>Escherichia coli</i> i inne Gram-ujemne bakterie

Tabela 2. Zakażenia związane z powstawaniem biofilmu na powierzchni ciał obcych.

Zakażenie lub choroba	Gatunek bakterii
Soczewki kontaktowe	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Gram-dodatnie ziarniaki
Szwy pooperacyjne	<i>Staphylococci</i>
Zapalenie płuc związane z wentylacją	Gram-ujemne pałeczki
Mechaniczna zastawka serca	<i>Staphylococci</i>
Przeszczepy naczyniowe	Gram-dodatnie ziarniaki
Sztuczna przetoka tętniczo-żylna	<i>Staphylococci</i>
Zakażenia cewników donaczyniowych	<i>Staphylococci</i>
Przetaczanie płynu mózgowo-rdzeniowego	<i>Staphylococci</i>
Dializa otrzewnowa	Różne gatunki
Zakażenia układu moczowego	<i>Escherichia coli</i> , Gram-ujemne pałeczki
Protezy prącia	<i>Staphylococci</i>
Protezy ortopedyczne	<i>Staphylococci</i>

Biofilm powstaje powoli, w jednym lub wielu miejscach, a zakażenia z nimi związane dają późno jawne objawy [1]. Są to infekcje szczególnie ciężkie do opanowania, ponieważ biofilm bakteryjny jest trudny do wykrycia w rutynowej diagnostyce i z natury jest odporny zarówno na siły obronne organizmu, jak i na stosowane antybiotyki [4].

Zaobserwowano, że najczęstszą przyczyną infekcji związanych z implantami wymienia się *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis* [9,16].

Spośród innych bakterii na uwagę zasługują Gram-ujemne: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz gatunki z rodzaju *Acinetobacter* i *Proteus*. Leczenie zakażeń związanych z wprowadzaniem ciał obcych stanowi duże wyzwanie, ponieważ wytworzony Biofilm na powierzchni biomateriału jest odporny na antybiotyki. Terapią z wyboru pozostaje usunięcie z organizmu ciała obcego, jako przyczyny zakażenia i, jeśli to konieczne, zastąpienie go nowym [17, 19].

Reżim sanitarny i przestrzeganie zasad aseptyki w znacznym stopniu redukuje liczbę bakterii w środowisku szpitalnym, zapobiegając kontaminacji biomateriałów [9].

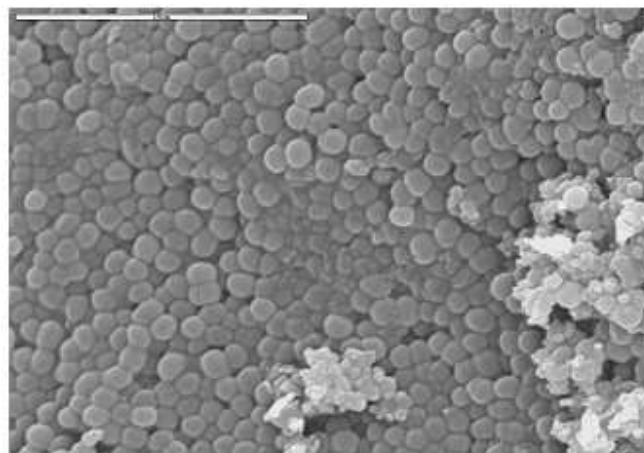
Badania ostatnich lat skupiają się na znalezieniu elementów struktury bakteryjnych i poznaniu procesów życiowych komórki bakteryjnej, które mogą okazać się atrakcyjnym punktem uchwytu dla związków o działaniu przeciwbakteryjnym. W odniesieniu do tworzenia przez bakterie biofilmu takim celem mogą być: adhezja oraz dalsze etapy powstawania biofilmu, a także komunikacja międzykomórkowa w obrębie skupiska [15].

Proces adhezji może zostać potencjalnie zahamowany za pomocą przeciwciał skierowanych przeciwko bakteryjnym adhezynom oraz do działania przeciwbakteryjnym. Celem może być również zablockowanie tworzenia macierzy oraz system quorum sensing. Rozważanych jest kilka potencjalnych sposobów przerywania komunikacji między komórkami, jak zahamowanie tworzenia sygnałów, zahamowanie ich sekrecji oraz niedopuszczenie do wiązania z receptorem [15].

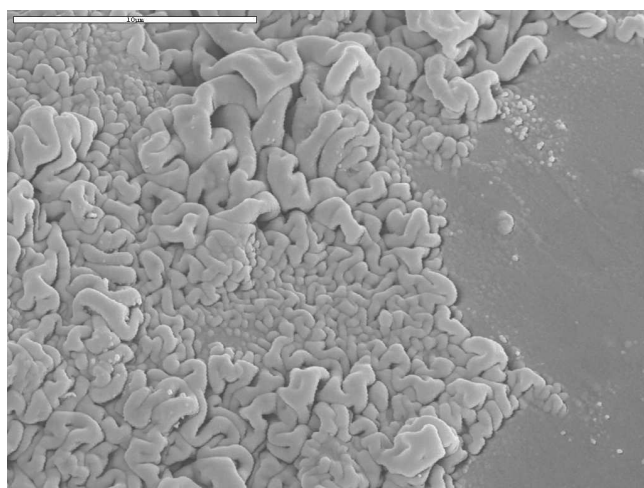
W odniesieniu do systemu quorum sensing gronkowców - *agr* poszukuje się takich elementów, które mogłyby stać się celem dla nowych leków.

Trwają intensywne poszukiwania środków przeciwdrobnoustrojowych o nowych punktach uchwytu w komórce bakteryjnej, które wykazywałyby skuteczność wobec biofilmu tworzonego powszechnie przez drobnoustroje [15].

Tworzenie biofilmu przez *Staphylococcus epidermidis* na powierzchni cewnika. Zdjęcie w mikroskopie elektronowym ze zbioru Katedry Mikrobiologii.



Tworzenie biofilmu przez *Enterobacter* na powierzchni implantu ortopedycznego. Zdjęcie w mikroskopie elektronowym ze zbioru Katedry Mikrobiologii.



PIŚMIENNICTWO

1. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* 1999; 284: 1318-1322
2. Donlan R.M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 2002; 8(9): 881-890
3. Dunne Jr. W.M.. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Clinical Microbiology Reviews* 2002; 15(2): 155-166
4. Fux C.A., Costerton J.W., Stewart P.S., Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology* 2005; 13(1): 34-40
5. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* 2004; 2:95-108
6. Hall-Stoodley L., Stoodley P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends in Microbiology* 2005; 13(1): 7-10
7. Harraghy N., Kerdudou S., Herrmann M. Quorum-sensing systems in *Staphylococci* as therapeutic targets. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007; 387: 437-444

Związek adiponektyny z zespołem metabolicznym

1. Harris L.G., Richards R.G.
Staphylococci and implant surfaces: a review.
Injury, International Journal of the Care of the Injured 2006; 37: S3-S14
2. Hetrick E.M., Schoenfisch M.H.
Reducing implant-related infections: active release strategies.
Chemical Society Reviews 2006; 35:780-789
3. Jefferson K.K.
What drives bacteria to produce a biofilm?
FEMS Microbiology Letters 2004; 236: 163-173
4. Kong K., Vuong C., Otto M.
Staphylococcus quorum sensing in biofilm formation and infection.
International Journal of Medical Microbiology 2006; 296: 133-139
5. Lasa I.
Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development.
International Microbiology 2006; 9: 21-28
6. Latasa C., Solano C., Penades J.R., Lasa I.
Biofilm-associated proteins.
Comptes Rendus Biologies 2006; 329: 849-857
7. Lindsay D., von Holy A.
Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know.
Journal of Hospital Infection 2006; 64: 313-325
8. Marra A.
Targeting Virulence for Antibacterial Chemotherapy.
Drugs 2006; 7(1): 1-16
9. Pascual A.
Pathogenesis of catheter-related infections: lessons for new designs.
Clin. Microbiol. Infect 2002; 8:256-264
10. Rice L.B.
Unmet medical needs in antibacterial therapy.
Biochemical Pharmacology 2006; 71: 991-995
11. Sutherland I.W.
Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework.
Microbiology 2001; 147:3-9
12. von Eiff C., Jansen B., Kohnen W., Becker K.
Infections Associated with Medical Devices. Pathogenesis, Management and Prophylaxis.
Drugs 2005; 65(2): 179-214
13. Xu L., Li H., Vuong C., Vadyvaloo V., Wang J., Yao Y., Otto M., Gao Q.
Role of the luxS Quorum-Sensing System in Biofilm Formation and Virulence of Staphylococcus epidermidis.
Infection and Immunity 2006; 74(1): 488-496

Daria Kupczyk

mgr analityki medycznej

Wojewódzki Ośrodek Medycyny Pracy w Bydgoszczy

Streszczenie

W pracy omówiono aktualną definicję i kryteria rozpoznawania zespołu metabolicznego (coraz częściej stawianego rozpoznania w społeczeństwach uprzemysłowionych) podane przez Grupę Konsultacyjną Międzynarodowej Federacji Cukrzycowej (International Diabetes Federation), uzgodnioną na I Międzynarodowym Kongresie poświęconym stanowi przedcukrzycowemu i zespołowi metabolicznemu (Prediabetes and the Metabolic Syndrome). Omówiono także rolę adiponektyny (jednej z aktywnych biologicznie substancji wydzielanych przez tkankę tłuszczową) w etiopatogenezie insulinooporności.

Słowa kluczowe: adiponektyna, zespół metaboliczny

Wstęp

Zespół metaboliczny jest rozpoznawany u ok. 25% populacji krajów uprzemysłowionych. Podłożem tego zespołu jest insulinooporność tkankowa. W jej rozwoju odgrywają rolę białka wytwarzane w tkance tłuszczowej. Jednym z nich jest adiponektyna, która jest obecna w surowicy w stężeniu 5-30 µg/ml. Obniżone stężenie adiponektyny ściśle wiąże się z insulinoopornością, co wykazano na modelach zwierzęcych oraz w badaniach z udziałem ludzi. Adiponektyna koreluje z typowymi elementami zespołu metabolicznego: BMI, WHR, stężeniem cholesterolu całkowitego, frakcji HDL, LDL, triglicerydów, glukozą, insuliną. Być może w przyszłości adiponektyna będzie wykorzystywana w leczeniu insulinooporności leżącej u podłoża wielu schorzeń.

1. Definicja zespołu metabolicznego

Zespół metaboliczny jest definiowany jako kompleks objawów występujących w różnej konstelacji oraz będących czynnikami ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego. I tak należą do nich:

- Otyłość brzuszna
- Insulinooporność
- Hiperinsulinemia
- Upośledzona tolerancja glukozy lub jawna cukrzyca
- Dyslipidemia
- Nadciśnienie tętnicze [7,11]

W 1998 r. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) sformułowała definicję zespołu metabolicznego. Kolejne definicje zostały opracowane w Europie w 1999 roku przez Europejską Grupę Badania Insulinooporności (EGIR, *European Group for the Study of Insulin Resistance*) oraz w USA w 2001 roku przez Narodowy Program Edukacji Cholesterolowej (NCEP:ATP III, *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III*).

POLECAMY!



Płynty z jam ciała. Badanie i interpretacja

aut. Maria Mantur, 2008 r., 120 stron, oprawa miękka

ISBN: 978-83-60466-53-7

Cena promocyjna 35,00 zł*

Atlas osadu moczu

Sabine Althof, Joachim Kindler, I wydanie polskie

red. M. Mantur, 150 stron, oprawa twarda

ISBN: 83-922570-0-6

Cena promocyjna 34,00 zł*

* Zryczałtowany koszt wysyłki wynosi 8,00 zł

MedPharm Polska

MedPharm Polska Sp. z o.o.

ul. Powstańców Śląskich 28-30

53-333 Wrocław

tel. 071/335-03-60,

faks 071/335-03-61

info@medpharm.pl

www.medpharm.pl

2. Zasady rozpoznawania zespołu metabolicznego

Tab.1. Algorytmy diagnostyczne rozpoznawania zespołu metabolicznego (ZM) według wyżej wymienionych definicji [7]

WHO (1998)	EGIR (1999)	NCEP:ATP III (2001)
Cukrzyca lub nieprawidłowa tolerancja glukozy, lub insulinooporność (glikemia na czczo ≥ 110 mg/dl lub glikemia ≥ 140 mg/dl w 2h po doustnym podaniu 75 g glukozy lub zużycie glukozy w warunkach klamry euglikemicznej-hiperinsulemicznej w najniższym kwartyle dla badanej populacji)	Insulinooporność-hiperinsulinemia (stężenia insuliny na czczo w górnym kwartyle właściwym dla badanej populacji)	
Plus 2 lub więcej z poniższych czynników ryzyka	Plus 2 lub więcej z poniższych czynników ryzyka	3 lub więcej z poniższych czynników ryzyka
Otyłość centralna-stosunek obwodu talia-biodro (WHR): u mężczyzn $>0,9$; u kobiet $>0,85$ i/lub BMI >30	Glikemia na czczo ≥ 110 mg/dl Otyłość centralna-obwód talii: u mężczyzn ≥ 94 cm u kobiet ≥ 80 cm	Glikemia na czczo ≥ 110 mg/dl Otyłość centralna-obwód talii: U mężczyzn >102 cm U kobiet >88 cm
nadciśnienie tętnicze $>140/90$ mmHg	nadciśnienie tętnicze $\geq 149/90$ mmHg i/lub jego leczenie	Nadciśnienie tętnicze $\geq 130/85$ mmHg
triglicerydy ≥ 150 mg/dl i/lub HDL-cholesterol ≤ 35 mg/dl u mężczyzn i ≤ 39 mg/dl u kobiet	triglicerydy ≥ 170 mg/dl lub HDL-cholesterol ≤ 35 mg/dl	triglicerydy ≥ 150 mg/dl; HDL-cholesterol < 40 mg/dl u mężczyzn i < 50 mg/dl u kobiet
mikroalbuminuria $\geq 20 \mu\text{g}/\text{min}$ lub współczynnik albuminy:kreatynina $\geq 30 \text{ mg}/\text{g}$		

Kolejna definicja ZM została przedstawiona w 2002 roku przez Amerykańskie Stowarzyszenie Endokrynologów Klinicznych (AACE, *American Association of Endocrinology*) i obejmowała powszechnie akceptowane składowe zespołu metabolicznego jak zwiększone stężenie glukozy na czczo lub w teście doustnego obciążenia glukozą (OGGT, *Oral Glucose Tolerance Test*), zwiększone stężenie TG, zmniejszone stężenie cholesterolu HDL oraz podwyższone ciśnienie tętnicze. Definicja ta nie uwzględniała jednak otyłości. Ekspert z Międzynarodowej Federacji Cukrzycowej (IDF, *International Diabetes Federation*) wyeksponowali ten czynnik w definicji ogłoszonej w 2005 roku podkreślając jego rolę jako ważnego czynnika ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego oraz cukrzycy typu 2.

W kwietniu 2005 roku w Berlinie odbył się I Międzynarodowy Kongres poświęcony stanowi przedcukrzycowemu i zespołowi metabolicznemu (1st International Kongres on „Prediabetes” and the Metabolic Syndrome), w czasie którego IDF podała nową definicję oraz kryteria rozpoznawania ZM z uwzględnieniem różnic rasowych [10].

Zgodnie z aktualnym (2005) stanowiskiem IDF u osoby z zespołem metabolicznym muszą występować:

- Otyłość centralna (zdefiniowana jako obwód w talii ≥ 94 cm u Europejczyków i ≥ 80 cm u Europejki [dla innych grup etnicznych-odpowiednie wartości])
- Oraz 2 z 4 następujących czynników:
zwiększone stężenie triglicerydów: >150 mg/dl (1,7 mmol/l) lub leczenie tego zaburzenia lipidowego
zmniejszone stężenie cholesterolu HDL: < 40 mg/dl (1,0 mmol/l) u mężczyzn i < 50 mg/dl (1,3 mmol/l) u kobiet lub leczenie tego zaburzenia lipidowego
podwyższone ciśnienie tętnicze: skurczowe ≥ 130 mmHg lub

rozkurczowe ≥ 85 mmHg, lub leczenie rozpoznanego wcześniej nadciśnienia tętniczego

zwiększone stężenie glukozy na czczo (FPG, *Fasting Plasma Glucose*) ≥ 100 mg/dl (5,6 mmol/l) lub wcześniej rozpoznana cukrzyca typu 2

Jeśli stężenie glukozy na czczo wynosi $> 5,6$ mmol/l (100 mg/dl) zdecydowanie zaleca się wykonanie doustnego testu obciążenia glukozą, ale nie jest on konieczny do rozpoznania ZM [1].

Tab.2. Obwód w talii będący podstawą rozpoznania otyłości w różnych grupach etnicznych wg IDF (2005) [1].

Grupa etniczna lub państwo	Mężczyźni	Kobiety
Europejczycy	≥ 94 cm	≥ 80 cm
USA	≥ 102 cm	≥ 88 cm
Chińczycy	≥ 90 cm	≥ 80 cm
Południowi Azjaci	≥ 90 cm	≥ 80 cm
Japończycy	≥ 85 cm	≥ 90 cm
Ameryka Południowa i Środkowa	Jak dla południowych Azjatów do czasu uzyskania danych pochodzących z tych populacji	
Populacje wschodniej części regionu śródziemnomorskiego i Bliskiego Wschodu (Arabowie)	Jak dla Europejczyków do czasu uzyskania danych pochodzących z tych populacji	
Afrykańczycy regionu subsaharyjskiego	Jak dla Europejczyków do czasu uzyskania danych pochodzących z tych populacji	

Grupa uzgodnieniowa IDF wyróżniła także kilka innych parametrów związanych z zespołem metabolicznym, które powinny być brane pod uwagę w badaniach naukowych w celu oceny ich wartości predykcyjnej dla chorób sercowo-naczyniowych i(lub) cukrzycy. Obejmują one m.in. markery zaburzeń gospodarki węglowodanowej, lipidowej, nieprawidłowej lokalizacji tkanki tłuszczowej, insulinooporności, stanu prozakrzepowego i prozapalnego oraz czynniki hormonalne.

Uwzględnianie tych czynników w badaniach naukowych pozwoli także, jeśli zaistnieje taka konieczność, na modyfikację istniejącej definicji i weryfikację nowej definicji klinicznej w różnych grupach etnicznych.

Tab.3. Dodatkowe kryteria diagnostyczne ZM wg IDF 2005 [10].

Nieprawidłowa dystrybucja tkanki tłuszczowej	- Biomarkery tkanki tłuszczowej: leptyna, adiponektyna - Ogólna dystrybucja tkanki tłuszczowej (DXA) - Centralna dystrybucja tkanki tłuszczowej (TK lub MR) - Zawartość tłuszczu w wątrobie (MRS)
Dyslipidemia aterogenna (inne parametry niż zwiększone stężenie TG i małe stężenie HDL-C)	- Małe gęste LDL - ApoB (lub nie-HDL-C)
Nieprawidłowa glikemia	- Doustny test tolerancji glukozy (OGTT) - Stężenie insuliny lub proinsuliny na czczo
Oporność na insulinę (inne parametry niż zwiększone stężenie glukozy na czczo)	- Zwiększone stężenie wolnych kwasów tłuszczowych (na czczo lub w czasie OGTT) - Wartość M w teście klamry metabolicznej - HOMA-IR - Oporność na insulinę według modelu minimalnego Bergmana
Zaburzona regulacja naczyniowa (inne parametry niż podwyższone ciśnienie tętnicze)	- Pomiar dysfunkcji śródbłonna - mikroalbuminuria
Stan prozakrzepowy	- czynniki fibrynolityczne (PAI-1 itd.) - czynniki krzepnięcia (fibrinogen itd.)
Stan prozapalny	- zmniejszone stężenie adiponektyny w osoczu - zwiększone stężenie białka C-reaktywnego w teście o dużej czułości, SAA - zwiększone stężenia cytokin zapalnych (np. TNF-α, IL-6)
Czynniki hormonalne	oś przysadkowo-nadnerczowa

DXA-dwuwiązkowa absorpcjometria rentgenowska
HOMA-IR-wskaźnik insulinooporności (Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance)
MR-rezonans magnetyczny
MRS-scyntygrafia rezonansu magnetycznego
TK- tomografia komputerowa

3. Struktura i działanie adiponektyny

Po raz pierwszy cDNA kodujące białko Acrp 30 (*Adipocyte Complement- Related Protein of 30 kD*), znane obecnie pod nazwą adiponektyna, opisał Scherer w 1995 r. [4]. Z ludzkiego osocza wyizolowano ją rok później.

Adiponektyna (Acrp 30, APM1, AdipoQ) jest białkiem należącym do rodziny kolektyn. Gen kodujący adiponektynę, APM1 o masie 17 kb, zlokalizowany jest na chromosomie 3q27.

Ryc. Budowa adiponektyny
[chem.tufts.edu/faculty/lee/adiponectin-ribbon.jpg]



Ludzka adiponektyna jest białkiem składającym się z 244 aminokwasów, tworzących 20 pojedynczych podjednostek. W swojej budowie jest zbliżona do kolagenu typu VIII, Xa, a także do składowej dopełniacza C1q. Adiponektyna wiąże się z kolagenem typu I, III oraz V będącym główną składową ścian naczyń naczyniowych [4,5,8].

W strukturze adiponektyny wyróżnia się cztery główne domeny: na końcu aminowym domenę sygnalizacyjną, następnie rejon bez homologii do znanych białek, domenę kolagenową i na końcu karboksylowym domenę globularną [3].

Adiponektyna występuje w krążeniu w dwóch postaciach: niskocząsteczkowej składającej się z dwu- i trójcząsteczkowych kompleksów oraz wysokocząsteczkowej składającej się z ponad 6 cząsteczkowych kompleksów.

W 2003 roku zsyntetyzowano i opisano receptory dla adiponektyny: AdipoR1 i AdipoR2.

Receptor AdipoR1 występuje w mięśniach szkieletowych i wykazuje duże powinowactwo do globularnej formy adiponektyny, natomiast receptor AdipoR2 występuje w wątrobie i posiada duże powinowactwo zarówno do wysoko- jak i niskocząsteczkowych kompleksów, a także do formy globularnej. Obecność receptorów adiponektyny stwierdzono także w trzustce oraz monocytach i makrofagach pochodzących z blaszki miażdżycowej [9].

Stężenie adiponektyny w osoczu wynosi 5-30 µg/ml i stanowi około 0,01 % wszystkich białek osocza. Stężenie APM1 jest obniżone w otyłości, insulinooporności, cukrzycy typu 2 oraz w chorobie wieńcowej. Badania sugerują, że adiponektyna bierze udział w

procesach związanych z insulinoopornością i rozwojem miażdżycy [4].

W badaniach Arita i wsp. [2] za pomocą nowej metody Elisa po raz pierwszy wykazano, że stężenie adiponektyny nie wzrasta w otyłości, lecz ulega obniżeniu. U 57 otyłych osobników średnie stężenie adiponektyny wynosiło 3,7 µg/ml, zaś u 87 osób z prawidłowym wskaźnikiem masy ciała (BMI) 8,9 µg/ml. Po przeprowadzonych badaniach okazało się, że stężenia adiponektyny są niższe u osób z cukrzycą niż u osób z prawidłową przemianą węglowodanową. Niższe stężenia tego białka wykazano także u osób z nieprawidłową tolerancją glukozy. Kolejnym odkryciem było występowanie APM1 w niższym stężeniu u osób z niedokrwinną chorobą serca niż u osób zdrowych, w porównywalnym wieku i z podobnym BMI [2].

Wykazano także ujemne korelacje pomiędzy stężeniem APM1 a: BMI [2], WHR oraz procentową zawartością tkanki tłuszczowej w organizmie. Adiponektyna koreluje również z parametrami gospodarki lipidowej. Ujemne korelacje stwierdzono pomiędzy stężeniem tego białka a stężeniem cholesterolu całkowitego, frakcji LDL cholesterolu, triglicerydów, wolnych kwasów tłuszczowych. Dodatnią korelację stwierdzono pomiędzy APM1 i HDL-C [6]. Wykazano także zależność pomiędzy

stężeniem adiponektyny a parametrami gospodarki węglowodanowej. Na podstawie badań dowiedziano, że APM1 ujemnie koreluje ze stężeniem glukozy na czczo a także stężeniem glukozy w 2 godzinie testu doustnego obciążenia glukozą. W wielu pracach stwierdzono także ujemną korelację pomiędzy adiponektyną a insuliną na czczo

4. Adiponektyna-element w patogenezie insulinooporności

W rozwoju insulinooporności będącej czynnikiem ryzyka rozwoju cukrzycy i miażdżycy biorą udział białka produkowane przez adipocyty. Ich wydzielanie do krwiobiegu reguluje metabolizm tkanki tłuszczowej oraz innych narządów. Doniesienia naukowe podkreślają rolę adiponektyny w patogenezie insulinooporności. Jej stężenie jest obniżone w stanach insulinooporności i cukrzycy typu 2 [4]. Mechanizmy łączące APM1 z insulinoopornością są badane na modelach zwierzęcych. U małp rhesus (*Macaca mulatta*) dochodzi do spontanicznego rozwoju otyłości ze spadkiem insulinooporności tkanek i hiperinsulinemią, a następnie cukrzycą typu 2. Stężenie APM1 zaczyna się u nich obniżać już przy niewielkim wzroście masy ciała. Temu spadkowi towarzyszy wzrost insulinooporności i hiperinsulinemia. Zwierzęta zostały podzielone na dwie grupy: z niskim i wysokim stężeniem APM1. Małpy z hipoadiponektynią cechowały się większą insulinoopornością niż te z prawidłowym stężeniem [4]. Badania Weyer'a i wsp. ukazały ścisły związek pomiędzy APM1 a insulinoopornością tkankową u ludzi. Opisana przez zespół naukowców populacja Indian Pima, w porównaniu z dobraną pod względem BMI oraz stopniem zaburzeń gospodarki węglowodanowej populacją kaukaską, charakteryzowała się niższym stężeniem APM1. Indianie Pima są

szczególą grupą etniczną cechującą się otyłością, insulinoopornością, cukrzycą typu 2, ale prawidłowym ciśnieniem tętniczym i bez zaburzeń gospodarki lipidowej [5]. Badania Lindsay'a i wsp. potwierdziły, że w populacji Indian Pima u osób z niskim stężeniem APM1 istnieje znacznie większe prawdopodobieństwo rozwoju cukrzycy typu 2 niż u osób z wysokim stężeniem tego białka.

W badaniach Fruebis i wsp. [6] wykazano, że adiponektyna stymuluje zwiększony wychwyt wolnych kwasów tłuszczowych przez komórki mięśni szkieletowych i zwiększa ich spalanie w mitochondriach tych komórek niezależnie od insuliny. Molekularny mechanizm powyższego oddziaływania APM1 nie jest do końca poznany. Prawdopodobnie jest związany ze zwiększoną ekspresją genów dla enzymów biorących udział w fosforylacji oksydacyjnej. Adiponektyna reguluje

również homeostazę glukozy obniżając jej stężenia w osoczu niezależnie od insuliny. Prawdopodobnie jest to efektem wzmożonego spalania FFA. Wiadomo, iż wzmożona dostępność

FFA przyczynia się do hamowania przez acetyloCoA dehydrogenazy pirogronianowej oraz akumulacji pirogronianu i fruktozo-6-fosforanu w komórce w cyklu Randle'a, a to z kolei jest przyczyną upośledzenia przekazywania insuliny i rozwoju oporności insuliny. Adiponektyna korzystnie wpływa także na metabolizm glukozy poprzez hamowanie wątrobowej glukoneogenezy bez wpływu na glikolizę i glikogenogenezę. APM1 wykazuje takie działanie po odcięciu fragmentu cząsteczki: C-terminalnego peptydu [6], niewykluczone jest więc, że krążące w osoczu białko jest prohormonem wykazującym biologiczne działanie dopiero po proteolitycznej fragmentacji. W badaniach zwrócono także uwagę na wpływ APM1 na TNF, którego synteza zachodzi w tkance tłuszczowej. Molekularny mechanizm działania TNF polega na hamowaniu autofosforylacji wewnątrzkomórkowej domeny receptora dla insuliny i jest przyczyną zaburzeń aktywacji kolejnych etapów przekazywania sygnału. Adiponektyna hamuje wpływ TNF na adipocyty i w ten sposób przeciwdziała rozwojowi insulinooporności. Z kolei TNF, którego stężenie wzrasta w otyłości, może powodować supresję wydzielania APM1 z adipocytów. I tak obniżone stężenia adiponektyny w otyłości może z kolei pogłębiać insulinooporność spowodowaną przez TNF [4]. W ten sposób powstaje błędne koło napędzające mechanizm insulinooporności. Rolę adiponektyny w rozwoju insulinooporności potwierdzają także badania nad receptorem PPAR γ . Należy on do rodziny hormonalnych receptorów jądrowych. Pełni rolę czynnika aktywującego transkrypcję genów enzymów uczestniczących w procesie β -oksydacji, a także w procesach metabolizmu węglowodanów i lipidów oraz w procesach zapalnych. PPAR γ jest aktywowany przez wiele czynników stymulujących proliferację peroksisomów, m.in. przez prostanoidy, tiazolidinediony, kwasy tłuszczowe pochodzące z diety bogatotłuszczowej [4]. Badania wskazują na udział receptorów PPAR γ w złożonych wewnątrzkomórkowych mechanizmach wpływających na różnicowanie komórek tłuszczowych. Aktywność PPAR γ związana jest z obniżeniem masy ciała, zwiększeniem wrażliwości na insulinę i wzrostem stężenia cholesterolu frakcji HDL w surowicy.

Podsumowanie

Zespół metaboliczny jest coraz częściej stawianym rozpoznaniem w społeczeństwach uprzemysłowionych. Głównym punktem w jego rozwoju jest insulinooporność tkankowa. To zaburzenie metaboliczne związane jest z występowaniem czynników ryzyka sercowo-naczyniowego, m.in. trzewną dystrybucją tłuszczu w organizmie, aterogenną dyslipidemią, nadciśnieniem tętniczym, stanem prozakrzepowym oraz prozapalnym. Istnieje coraz więcej dowodów na obecność powiązań pomiędzy ww. zaburzeniami metabolicznymi i krążeniowymi a białkami wytwarzanymi przez tkankę tłuszczową tzw. adipocytokiny. Jedną z nich, adiponektyna, ma udowodnioną zarówno na modelach zwierzęcych, jak i w badaniach z udziałem ludzi ścisłą korelację ze stopniem insulinooporności tkankowej. Jej oznaczanie w osoczu umożliwiłoby ocenę ryzyka rozwoju insulinooporności, a w następstwie ocenę zagrożenia powikłaniami metabolicznymi.

Piśmiennictwo

- Alberti G., Aschner P., Grundy S.M. i wsp. : „Zespół metaboliczny nowa definicja i zasady leczenia.” Aktualne (2005) stanowisko International Diabetes Federation : Medycyna Praktyczna 2005; 5 :45-55
- Arita Y., Kihara S., Ouchi N. i wsp. : „Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity.” : Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999;257 : 79
- Bodzioch M., Dembińska-Kieć A., Kieć-Wilk B., Malczewska-Malec M., Szopa M., Trzos M.: „Adiponektyna-adipocytokina o szerokim spektrum klinicznym.”:Przegląd Lekarski 2004;61:109-114

- Bryl W., Miczek A., Pupek Musialik D. : „Adiponektyna nowy element w patogenezie insulinooporności i miażdżycy.” : Nacisn. Tętn. 2002; 6 : 229-234
- Bryl W., Miczek A., Pupek Musialik D. i wsp. : „Rola adiponektyny w patogenezie insulinooporności i zespołu metabolicznego.” : Pol. Merkuriusz Lek. 2005; 19 : 723-726
- Czernecka D., Kajdaniuk D., Kos Kudła B. i wsp. : „Adiponektyna ogniwo łączące otyłość, miażdżycę i cukrzycę.” : Pol. Arch. Med. Wew. 2002; 108 : 1245-1251
- Franek E., Roguski K. : „Zespół metaboliczny nowa definicja International Diabetes Federation.” : Lekarz 2005; 9 : 59-65
- Funahashi T., Maeda K., Matsubara K. i wsp.: „cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen like factor, apM1.” : Biochem. Res. Commun. 1996; 221 : 286-289
- Ito Y., Kamon J., Fisuhida A. i wsp. : „Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effect.” : Nature 2003; 423 : 762-769
- Janeczko D., Janeczko Sosnowska E. : „Aktualne zasady diagnostyki zespołu metabolicznego.” : Nowa klinika 2005; 12 (9/10) : 910-918
- Otto Buczkowska E. : „insulinooporność i hiperinsulinemia czynniki ryzyka zespołu metabolicznego w populacji rozwojowej.” : Endokrynologia, Diabetologia i Choroby Przemiany Materii Wieku Rozwojowego 2005; 11 : 109-114

Spis rozdziałów:

STRESZCZENIE

WSTĘP

- Definicja zespołu metabolicznego
- Zasady rozpoznawania zespołu metabolicznego
- Struktura i działanie adiponektyny
- Adiponektyna-element w patogenezie insulinooporności
- Podsumowanie
- Piśmiennictwo cytowane
- Spis tabel

Spis tabel

Tab.1. Algorytmy diagnostyczne rozpoznawania Zespołu metabolicznego (ZM) według wyżej wymienionych definicji

Tab.2. Obwód w talii będący podstawą rozpoznania otyłości w różnych grupach etnicznych wg IDF (2005)

Tab.3. Dodatkowe kryteria diagnostyczne ZM wg IDF 200

INFORMACJA

Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych w siedzibie, ul. Konopacka 4 w Warszawie dysponuje aktualnie 15 miejscami noclegowymi (bez pościeli) dla Diagnostów Laboratoryjnych na czas pobytu w Warszawie z okazji udziału w szkoleniach specjalizacyjnych i kursach. Nocleg bez zobowiązań finansowych. **Zgłaszający, posiadający uregulowane składki członkowskie, kontaktuje się telefonicznie z Panem Jarosławem Wrzosem (tel. kom.: 607 875 660).**

Kierownik Biura KIDL
Stanisław Krężel

INFORMACJA

UPRZEJMIIE INFORMUJEMY, ŻE WSZYSTKIE UCHWAŁY KRAJOWEJ RADY DIAGNOSTÓW LABORATORYJNYCH SĄ OGÓLNIENIE DOSTĘPNE NA NASZEJ STRONIE www.kidl.org.pl w zakładce: „PRAWO -> UCHWAŁY I KADECJI KRDL; UCHWAŁY II KADECJI KRDL”.

Czesław Głowniak

- Sekretarz KRDL



bioksel 6000

producent wysokiej jakości analizatorów
do laboratoriów medycznych

Firma jest członkiem-założycielem
Polskiej Izby Gospodarczej Zaawansowanych Technologii

koagulometry manualne



automat koagulologiczny



Bio-Ksel Sp. z o.o.
ul. Kaliowa 3, Grudziądz
tel. / fax (056) 462 24 24 / 462 33 33
www.bio-ksel.com.pl e-mail: bksel@bio-ksel.com.pl

Certyfikaty Jakości
ISO 9001:2000
ISO 13485:2005