

GAZETA BEZPŁATNA

GAZETA KRAJOWEJ IZBY DIAGNOSTÓW LABORATORYJNYCH



bioMérieux Polska, ul. Żeromskiego 17, 01-882 Warszawa
tel. (22) 569 85 00, fax (22) 569 85 54, www.biomerieux.pl



Minał półmetek wakacji i lata gorącego. Przed nami wrzesień, kolejny rok szkolny; miesiąc konferencji i Zjazdów Naukowych, także dla Diagnostów. Bo, oto, przed nami Zjazd Mikrobiologów w Szczecinie. Stąd też i bieżący numer naszej Gazety Diagnostów, już 17, jest głównie o

diagnostyce mikrobiologicznej, tej Królowej wśród prób dotarcia do przyczyn choroby i spraw ratowania życia. Poszczególne artykuły, uważam, że bardzo aktualne, będą odpowiedzią na oczekiwania odbiorców Gazety. W tę tematykę wpisuje się polskie tłumaczenie znakomitego opracowania, wręcz podręcznika, autorów W.G.Gudera, S. Narayanana, H. Wissera i B. Zawty "Samples: From the Patient to the Laboratory". Będzie moim zamiarem, by każde laboratorium otrzymało tę pozycję, wydaną staraniem Izby i Współwydawców. Ta publikacja będzie, bardzo ważną w pół roku przed wprowadzeniem obligatoryjnie standardów jakości do MLD. Z teje też przyczyny, tj. wydania tej pozycji, dotarcia do niej, dzięki życzliwości środowiska wrocławskiego, w II połowie października chcę zorganizować konferencję na temat "Czynniki przedanalityczne w badaniach laboratoryjnych"

Informacje szczegółowe podawać będziemy na stronie internetowej KIDL. Z zapowiedzią kolejnej publikacji, bardzo fundamentalnej dla świadczeń medycznych, którą chciałbym się podzielić z Państwem, wiąże się nowa edycja na rynku amerykańskim z 2007 r. "Evidence Based Laboratory Medicine" - autorów: Christophera P. Price'a i Roberta H. Christensona. EBM - to naukowe podstawy badań laboratoryjnych stanowiąc będą o wszystkich procedurach postępowania medycznego w przypadku choroby i utrzymania zdrowia oraz wydłużenia sprawności i życia człowieka. Zamierzeniem KIDL i także zadaniem moim jest dostarczenie Państwu- praktykom diagnostyki laboratoryjnej -oryginalnych i nowoczesnych opracowań przede wszystkim z dziedziny diagnostyki laboratoryjnej, obok także ważnych spraw związanych z regulacją prawną i postępowania medycznego, których dotyczy w swym działaniu Diagnosta Laboratoryjny.

Zawód, którego wyboru dokonaliśmy przy wyborze studiów i członkostwie w korporacji współcześnie staje się tak ważny, że nie sposób jest mówić o działaniach medycznych i pracy zespołów medycznych przychodni, szpitali, klinik bez udziału Medycznego Laboratorium Diagnostycznego. Ten trend i dążenie wymogi i standard stają się powinnością i prawem w

Europie i Świecie w postępowaniu medycznym. Wydawało się niektórym wczoraj, że nie byliśmy, że nie będziemy potrzebni, a dziś okazało się, że i wczoraj i dziś a jutro będziemy, jeszcze bardziej niezbędni. Tyle od Redakcji, ode mnie dla diagnostów pośród lata z życzeniami i pozdrowieniami.

Prezes KRDL
Henryk Owczarek

ZADANIA I CELE DIAGNOSTYKI MIKROBIOLOGICZNEJ

Anna Przondo Mordarska
Katedra i Zakład Mikrobiologii
Akademia Medyczna
Ul.Chalubińskiego 4
50-368 Wrocław

Wprowadzenie

Diagnostyka laboratoryjna ma ścisły związek z dążnością ludzkiego umysłu do poznawania nowych nieznanych zjawisk. Dążność ta ma oczywiste także miejsce w obszarze poznawania ludzkiego organizmu i mechanizmów nim kierujących zarówno w zdrowiu jak i chorobie. Odnosnie chorób infekcyjnych niezwykle ważnym jest poznanie mechanizmów kierujących życiem czynnika etiologicznego wywołującego chorobę to jest bakterii, wirusa grzyba czy pierwotniaka.

Zapoczątkowana przez A. van Leeuwenhoek'a, Cohna, Kocha era odkrywania drobnoustrojów, badania ich właściwości, relacji z organizmem ludzkim jako miejscem ich pobytu nadal trwa. Wykrywane są nowe zarazki, odkrywają się nowe obszary badań.

Pojawiają się nowe czynniki etiologiczne chorób infekcyjnych jak:

- **Drobnoustroje oportunistyczne** (*Staphylococcus epidermidis*, *Enteropatogenne pałeczki Escherichia coli*)
- **Drobnoustroje ze środowiska** (*Legionella*, *Stenotrophomonas*)
- **Drobnoustroje zmienione genetycznie** (wirus grypy)
- **Szczepki o nieznanych dotychczas cechach chorobotwórczych** (*PVL*, *Staph.aureus*)
- **Wzrastająca oporność na chemioterapeutyki i antybiotyki i nowe jej mechanizmy.**

W historii mikrobiologii wyznaczyć można ważne momenty wpływające na jej rozwój i zmianę postępowania badawczego, diagnostycznego i leczniczego w chorobach infekcyjnych, były to: a/ konstrukcja mikroskopów najpierw świetlnych później elektronowych, konfokalnych i innych, b/wykrycie antybiotyków i rozwój nauki o terapii zakażeń, c/wprowadzenie technik molekularnych wraz z tym nowe spojrzenie na mikro

W NUMERZE

Półmetek wakacji	2
Zadania i cele diagnostyki mikrobiologicznej	2 - 4
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> wciąż Groźne	4 - 5
Chłoniaki złośliwe (<i>Lymphoma malignum</i>) aktualna klasyfikacja i charakterystyka diagnostyczna wybranych postaci chłoniaków, ważnych w praktyce diagnostyki laboratoryjnej	5 - 9
Metoda PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR) - wyzwania i perspektywy.	10-17
Apel do P.T. Diagnostów Laboratoryjnych	18
Diagnostyka grzybów	19-21
Ocena biocenozy pochwy, stopnie czystości pochwy.	21-24

W biuletynie:

- Uchwały siódmego posiedzenia II kadencji KRDL

- Uchwały Prezydium KRDL II Kadencji

- Korespondencja między KIDL a Ministerstwem Zdrowia

- Korespondencja między KIDL a NFZ

- Opinie Prawne Rady Prawnego KIDL

- Komunikaty i ogłoszenia

WYDAWCA

Krajowa Rada
Diagnostów Laboratoryjnych

Redakcja:
Henryk Owczarek - Prezes KRDL
Czesław Głowniak - 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

i makroorganizm, d/ rozwój immunologii i wprowadzenie szczepionek.

Uzyskana wiedza w zakresie charakteru drobnoustroju i ich relacji z organizmem zakażonym ma przeniesienie na płaszczyznę praktyczną, a więc diagnozowanie i leczenie chorób infekcyjnych.

Zadania laboratorium mikrobiologicznego

Zasadniczo diagnostyka mikrobiologiczna polega na izolacji i identyfikacji zarazka oraz ustaleniu jego wrażliwości, a często określeniu cech chorobotwórczych. Dla konkretnego pacjenta ten schemat zapewnia ustalenie przyczyny choroby oraz sposobu jej leczenia. Diagnostyka mikrobiologiczna ma także szerszy wymiar. Gromadzona i analizowana wiedza o drobnoustrojach w środowisku szpitalnym lub pozaszpitalnym pozwala kontrolować sytuację epidemiologiczną, prowadzić racjonalną politykę antybiotykową, wpływać na programy szczepień, a w szpitalach jest podstawą działania Komitetów Kontroli Zakażeń Szpitalnych. *Pracownia mikrobiologiczna rysuje obraz epidemiologiczny szpitala, a więc wskazuje zarówno rezerwuary drobnoustrojów - środowisko naturalne (woda, powietrze), personel szpitala, współpracownicy, a także źródła zakażeń, którymi są chorzy ludzie (pacjenci, personel szpitala), nosiciele (zdrowi, rekonwalescenci, skażone produkty spożywcze).*

Aby diagnostyka mikrobiologiczna była prawidłowo wykonywana laboratorium musi odpowiadać podstawowym wymaganiom: odpowiednia kwalifikacja personelu, dostateczna liczba pomieszczeń i prawidłowa architektura pracowni, standaryzacja badań, opracowane procedury, wewnętrzna i zewnętrzna kontrola jakości badań wprowadzony system jakości, certyfikacja lub akredytacja.

Przebieg badania mikrobiologicznego

Na pełne badanie mikrobiologiczne składa się:

1. Decyzja o doborze próbek
2. Pobranie materiału
3. Wypełnienie skierowania
4. Przechowywanie i transport próbek
5. Wykonanie badania
 - a. Izolacja drobnoustroju
 - b. Identyfikacja drobnoustroju poprzez oznaczenie drobnoustrojów co najmniej do poziomu gatunku na podstawie: cech fenotypowych, cech genotypowych (w razie trudności z identyfikacją szczepu metabolizmu specyfiki antygenowej)
 - c. Oznaczenie wrażliwości na antybiotyki, oznaczenie mechanizmu oporności, oznaczanie minimalnych stężeń hamujących (MIC)
6. Interpretacja wyniku
7. Konsultacja dotycząca antybiotykoterapii

Oznaczanie MIC zalecane w ciężkich zakażeniach, w sytuacji występowania wieloopornych szczepów. W zmianach lekooporności szczepów może być podstawą wyboru terapii na zasadzie oceny ilorazu wartości breakpoint / MIC jako najprostszego indeksu PK/PD. Ponadto oznaczanie MIC pozwala prognozować skuteczność terapii czyli odpowiedź kliniczną.

Badanie mikrobiologiczne może być badaniem konwencjonalnym to znaczy wyhodowanie drobnoustroju. Składowe badania to wykonanie preparatu bezpośredniego z materiału, posiew hodowla drobnoustroju, identyfikacja, oznaczanie oporności i mechanizmów oporności.

Badanie konwencjonalne jest na ogół długie zależne od czasu wzrostu drobnoustroju. Ważne jest aby laboratorium dysponowało testami, podłożami i sprzętem przyspieszającym wydanie wyniku. Najprostszą metodą przyspieszającą wstępne rozpoznanie zarazka jest preparat bezpośredni z hodowli. Dla przyspieszenia wzrostu i identyfikacji szczepów przydatne są podłoża różnicujące i wybiórcze jak Chrom ID MRSA, Chrom ID Strepto B, Candida ID2. Zastosowanie testów komercyjnych dla oznaczania cech fenotypowych to także metoda skrócenia czasu badania. Bardzo cenne w diagnostyce są E-testy dla oznaczania MIC dla szczepów z hodowli, a także E-testy przystosowane do badania wrażliwości szczepu bezpośrednio z materiałów od chorego.

Automatyczne, monitorujące systemy hodowli do posiewów krwi, płynów ustrojowych, materiałów w kierunku prątków (BACTEC, BactAlert) wydawnie skracają czas hodowli i poprawiają wyniki. Automatyzacja identyfikacji bakterii i oznaczania oporności (VITEK, PHENIX) obok przyspieszenia badania unifikuje wyniki. Zastosowanie systemu informatycznego to zestaw korzyści dla rejestrowania badania i tworzenia bazy danych.

Szybkie badanie mikrobiologiczne bez wyhodowania czynnika etiologicznego może polegać na:

1. Wykrywaniu antygenów i wykrywaniu przeciwciał w surowicy chorego, służą temu metody aglutynacyjne, immunoenzymatyczne, immunofluorescencyjne
2. Wykrywanie produktów metabolizmu lub składowych ścian komórkowej
3. Wykrywanie kwasów nukleinowych, oznaczanie specyficznego genu służyć może do identyfikacji szczepu, a także oznaczeniu oporności. *Techniki, które znalazły zastosowanie w badaniach molekularnych to sondy DNA, PCR (RT-PCR), LTR, bDNA, sekwencjonowanie, ogniskowanie izoelektryczne.*

Nowoczesne metody genetyczne są także wykorzystywane w dochodzeniach epidemiologicznych, których podstawą jest porównywanie odcinków kwasów nukleinowych i określanie pokrewieństw drobnoustrojów. Najbardziej popularnymi metodami to badanie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) i jej odmiana elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym (PFGE), metoda losowej amplifikacji polimorficznych fragmentów DNA (RAPD), MLST, sekwencjonowanie kw. nukleinowych, metoda micro-chipów. Technologia mikromacierzy DNA wraz z pozyskiwaniem pełnych sekwencji genomów poszczególnych gatunków bakterii znajduje coraz szersze zastosowanie w różnych działach mikrobiologii. Z klinicznego punktu widzenia mikromacierze mają zastosowanie do:

- Określenia i wykrywania czynników wirulencji patogenów,
- Badania profilu ekspresji genów bakteryjnych pod wpływem antybiotyków, inhibitorów czy substancji toksycznych
- Badania odpowiedzi immunologicznej gospodarza na patogen
- Badania ekspresji genów bakteryjnych i ekspresji genów komórki eukariotycznej w czasie infekcji.
- Dla oceny znaczenia i wykorzystania diagnostyki mikrobiologicznej w leczeniu ważne jest obok poziomu laboratoriów i jakości wykonywanych badań ilość wykonywanych badań diagnostycznych w stosunku do zachorowań i potrzeb epidemiologicznych.

Diagnostyka mikrobiologiczna w Polsce

Analiza dostępnych danych uzyskiwanych przez Zespół Specjalistów, z programu OPTY prowadzonego przez Zakład Profilaktyki Zakażeń Szpitalnych NIL, a także czynnej rejestracji zakażeń szpitalnych prowadzonej przez Towarzystwo Zakażeń Szpitalnych wskazuje, że liczba badań wykonywanych badań mikrobiologicznych w Polsce jest 3-5 razy mniejsza niż w takich krajach Europy jak Holandia, Niemcy. Z analiz przygotowanych przez sieć EARSS wynika, że największe różnice notuje się w przypadku posiewów krwi, których liczba w Polsce jest 5-6 krotnie niższa niż np. w Szwecji. Liczba badań mikrobiologicznych nie może być standaryzowana, chociaż Światowa Organizacja Zdrowia próbowała ustalić taki standard i zaproponowała jako normę przyjęcie 25 badań /łóżko /rok. Duże zróżnicowanie zakażeń, różny przebieg infekcji, różnie zorganizowane oddziały szpitalne generują zróżnicowaną liczbę badanych próbek. Wydaje się, że wprowadzenie prawidłowych procedur, w diagnozowaniu i leczeniu chorób infekcyjnych lub w podejrzanych o infekcyjne, i przestreganie tych procedur wyznaczy wykonywanie potrzebnej liczby mikrobiologicznych badań diagnostycznych.

Ważne jest także aby Narodowy Fundusz Zdrowia kontrolował przestrzeganie procedur odnośnie diagnostyki i aby były one refundowane. Bardzo niepokojącym zjawiskiem w Polsce jest spadek, sięgający nawet 50%, liczby diagnostycznych badań mikrobiologicznych w ostatnich trzech latach. Zjawisko to tłumaczone jest brakiem pieniędzy w Służbie Zdrowia lub brakiem dostępu do laboratorium. Drugim szkodliwym kierunkiem dla mikrobiologii klinicznej jest wyprzedawanie przez szpitale laboratoriów, laboratoria te działają niezależnie, „na odległość”, z nastawieniem merkantylnym i często nie spełniających zasad dobrej diagnostyki i nie współpracują z Komitetami Kontroli Zakażeń Szpitalnych. Sytuacja taka prowadzi do błędnej, niepotrzebnej antybiotykoterapii, wzrostu liczby szczepów wieloopornych, szczepów opornych o specyficznych cechach chorobotwórczych (*C. difficile*, *PVL*, *Staph. aureus*, oporne na penicylinę pneumokoki). Zdrowiu społeczeństwa zagrażają infekcje niebezpiecznymi wirusami, nowymi gatunkami grzybów, pasożytami w Polsce nieznanymi (efekt przemieszczania się ludzi). Ważnym problemem jest konieczność realizacji założeń powstałego Europejskiego Centrum Kontroli Zakażeń ECDC, którego celem jest wprowadzenie w państwach Unii nadzoru epidemiologicznego opartego o sieć laboratoriów referencyjnych i prawidłowo rozwiniętej mikrobiologii klinicznej.

Nadzorem epidemiologicznym w Polsce zajmuje się Główny Inspektorat Sanitarny, częściowo Państwowy Instytut Zdrowia Publicznego. Ośrodkiem referencyjnym skupiającym diagnostykę i rejestrację zakażeń inwazyjnych wywołanych *N.meningitidis*, *Str.pneumoniae*, *H.influenzae* jest Zakład Mikrobiologii klinicznej i Epidemiologii Państwowego Instytutu Leków. Ośrodek ten prowadzi także programy badań i rejestracji oporności wybranych grup szczepów na antybiotyki. Rejestracja zakażeń chorobotwórczych drobnoustrojów i oporności, aby była rzetelna musi opierać się na dobrze zorganizowanej i wykonywanej diagnostyce mikrobiologicznej. Aby to zapewnić, w Polsce, należy rozbudować sieć dużych wieloprofilowych laboratoriów np. wojewódzkich oraz ustanowić wystarczającą liczbę Laboratoriów referencyjnych z pracownikami o najwyższym poziomie bezpieczeństwa (Biohazard IV).

Literatura

1. EARSS Annual Report 2005, EARSS Management Team, members of the Advisory Board, and national representatives of EARSS, Bilthoven, The Netherlands, October 2006
2. Heczko P.B., Bulanda M. I wsp., „Ocena pierwszego ogólnopolskiego programu nadzoru nad zakażeniami szpitalnymi”, Zakażenia 2001;3;3-6
3. A.Przondo-Mordarska, B.Maczyńska, „Diagnostyka mikrobiologiczna zakażeń uogólnionych”, SEPSIS 2008, 2, 73-81
4. J. Wójkowska-Mach i wsp., „Epidemiologia zakażeń krwi w polskich szpitalach”, Przegl. Epidemiol. 2004; 58; 253-64
5. Raport dla szpitali sieci OPTY program prowadzony przez Zespół Mikrobiologii Klinicznej i Profilaktyki Zakażeń Narodowego Instytutu Leków, 2006
6. A. Przondo-Mordarska i wsp.; „Czy w polskich szpitalach prawidłowo rozpoznaje się zakażenia?”, 2008;1.

CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE WCIĄŻ GROŹNE

Dr n. med. Aleksandra Anna Zasada
Prof. dr hab.. Marek Jagielski
Zakład Bakteriologii
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego Państwowy Zakład Higieny
ul. Chocimska 24
00-791 Warszawa
Kontakt: e-mail: azasada@pzh.gov.pl, tel. 0-22 5421246

Corynebacterium diphtheriae maczugowiec błonicy jest Gram dodatnią pałeczką, często o maczugowato zgrubiałych

biegunach, układającą się w preparatach mikroskopowych w postaci pisma klinowego i palisad. Wśród szczepów *C. diphtheriae* wyróżnia się szczepy toksynotwórcze, tj. szczepy wytwarzające egzotoksynę błoniczą, oraz szczepy nietoksynotwórcze. Szczepy toksynotwórcze stanowią czynnik etiologiczny błonicy ciężkiej choroby zakaźnej. Oprócz *C. diphtheriae* błonicę mogą powodować również toksynotwórcze szczepy *C. ulcerans*. Izolowano także szczepy *C. pseudotuberculosis* wytwarzające egzotoksynę błoniczą. Zachorowania powodowane przez *C. ulcerans* odnotowano ostatnio w Wielkiej Brytanii, Francji, Niemczech, Kanadzie, USA i Japonii. Błonica w znacznej liczbie przypadków wciąż występuje w krajach Europy Wschodniej, Azji i niektórych rejonach Afryki, skąd następują zawleczenia do krajów Europy Zachodniej oraz krajów skandynawskich.

Corynebacterium diphtheriae jest odpowiedzialny za wywołanie ostrej choroby zakaźnej, której objawy zależne są od wydzielanej egzotoksyny i wywołanych przez nią zmian w mięśniu sercowym i układzie nerwowym oraz martwiczych zmian miejscowych. Oprócz podstawowej postaci, którą jest błonica górnych dróg oddechowych tj. gardła i krtani może także wystąpić błonica nosa, skóry, oka, ucha, pępka oraz narządów płciowych.

Nietoksynotwórcze szczepy *C. diphtheriae* mogą wywoływać zapalenie gardła. Jednakże w ostatnich latach coraz częściej odnotowywane są także i w naszym kraju zakażenia inwazyjne wywołane przez tego typu szczepy *C. diphtheriae*.

Monitorowaniem zakażeń wywołanych przez toksynotwórcze i nietoksynotwórcze szczepy *C. diphtheriae* i *C. ulcerans* na terenie Europy zajmuje się utworzona w 2006 roku sieć DIPNET (Diphtheria Surveillance Network), w której skład wchodzi przedstawiciele wszystkich krajów należących do Unii Europejskiej oraz kraje z nimi związane, w szczególności państwa byłego Związku Radzieckiego. Polskę reprezentuje w tej sieci Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego- Państwowy Zakład Higieny.

Diagnostyka zakażeń wywołanych przez C. diphtheriae

Laboratoryjna diagnostyka zakażeń wywołanych przez *C. diphtheriae* opiera się na stwierdzeniu obecności tych drobnoustrojów w preparatach bezpośrednich i/lub wyhodowanych na odpowiednich podłożach namnażających i wybiórczo - różnicujących oraz na wykazaniu ich toksynotwórczości. Materiałem do badań od ludzi chorych są: naloty z migdałków, podniebienia, wydzielina z chorobowo zmienionych śluzówek gardzieli i nosa, wydzielina z owrzodzeń spojówek oka, przewodów usznych, ran itp.

Wartość diagnostyczna preparatów bezpośrednich barwionych metodą Grama, Neissera i Giemzy jest ograniczona ze względu na zmienność morfologii maczugowca i występowanie nietypowych morfologicznie cech tego drobnoustroju. Do posiewu badanego materiału i hodowli maczugowców błonicy najczęściej stosowanymi podłożami są: podłoże namnażające agar Columbia z krwią lub rzadziej, ze względu na trudną dostępność, podłoże Loefflera oraz podłoża wybiórczo-różnicujące takie jak agar tellurynowy z krwią (podłoże Hoyle'a lub podłoże Clauberga) oraz agar Tinsdale'a (również zawierający telluryn potasu). Dodatek tellurynu potasu w podłożu hamuje wzrost flory towarzyszącej w przypadku materiałów pochodzących z miejsc normalnie niejadalnych. Podłoża Hoyle'a i Clauberga pozwalają na zaobserwowanie różnic w morfologii kolonii związanej z biotypem szczepu *C. diphtheriae*. Natomiast podłoże Tinsdale'a wykorzystywane jest do wykrywania cystynazy. Szczepy *Corynebacterium* należące do gatunków potencjalnie toksynotwórczych (*C. diphtheriae*, *C. ulcerans* i *C. pseudotuberculosis*) wytwarzają ten enzym. Rosną w postaci brązowoczarnych kolonii otoczonych brązowym halo.

Zaleca się, aby pobrany do badań materiał był posiewany równolegle na agar Columbia z krwią, agar tellurynowy oraz agar Tinsdale'a. Hodowle inkubuje się w warunkach tlenowych w temperaturze 37°C- posiewy na podłożu Columbia z krwią przez 18-24 h, posiewy na podłożach wybiórczo-różnicujących przez 24 - 48 h. Podejrzone kolonie przesiewa się na wszystkie trzy podłoża, a po namnożeniu wykonuje testy biochemiczne umożliwiające identyfikację do gatunku.

Podstawowy zestaw testów biochemicznych

umożliwiających identyfikację potencjalnie patogennych szczepów *Corynebacterium sp.* obejmuje:

- wytwarzanie cystynazy, pyrazynamidazy, ureazy i katalazy
- fermentację glukozy, maltozy, sacharozy i skrobi
- redukcję azotanów

Na polskim rynku dostępne są różnego rodzaju testy komercyjne przeznaczone do identyfikacji drobnoustrojów z rodzaju *Corynebacterium*. Pełną identyfikację do gatunku zapewniają testy ApiCoryne oraz niektóre automatyczne zestawy firmy BioMerieux. Do badań skriningowych mają zastosowanie testy Coryne-ID firmy MAST Diagnostica. Zestaw zawiera trzy testy biochemiczne pozwalające na wykrycie cystynazy, pyrazynamidazy i ureazy, co pozwala stwierdzić czy badany szczep *Corynebacterium sp.* należy do gatunku potencjalnie toksynotwórczego.

Możliwe jest również wykorzystanie tabletek diagnostycznych firmy Rosco Diagnostica. Obecnie dostępne są tabletki umożliwiające wykrycie pyrazynamidazy, ureazy, redukcji azotanów oraz fermentacji glukozy, maltozy i sacharozy. Testy firmy MAST Diagnostica i Rosco Diagnostica umożliwiają odczyt wyniku po 4 h inkubacji, przy zastosowaniu odpowiednio gęstej zawiesiny bakteryjnej.

Jeżeli zidentyfikowany szczep należy do gatunku potencjalnie toksynotwórczego (*C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis*) konieczne jest wykonanie testu toksynotwórczości. Obecnie nie zaleca się wykonywania testów na zwierzętach. Wśród testów *in vitro* zalecanych w rutynowej diagnostyce wymienić należy tradycyjny i zmodyfikowany test Eleka oraz metodę pasków immunochromatograficznych. Niestety paski takie nie są dostępne na naszym rynku. Test Eleka wykonuje się na agarze Eleka z surowicą nowonarodzonego cielęcia. W tradycyjnym teście badane szczepy posiewa się równoległymi liniami na płycie Petriego z podłożem, a następnie prostopadłe do linii posiewu nakłada się pasek bibuły nasączonej antytoksyną błoniczą. W teście zmodyfikowanym na środku płytki Petriego z podłożem układa się krążek z antytoksyną błoniczą a wokół punktowo nanosi się masę bakteryjną badanych szczepów. Płytki z posiewami inkubuje się w temperaturze 37°C w warunkach tlenowych. Wynik odczytuje się w teście tradycyjnym po 24, 48 i 72 h, natomiast w teście zmodyfikowanym po 18, 24 i 48 h. Wynikiem dodatnim są linie precypitacyjne tworzące się na skutek reakcji antygeny jakim jest egzotoksyna błonicza z przeciwciałami obecnymi w antytoksynie błoniczej.

Możliwe jest również wykrywanie obecności genu egzotoksyny błoniczej przy użyciu techniki PCR. Wynik uzyskuje się w ciągu kilku godzin, jednakże musi on być potwierdzany testem fenotypowym.

Obecnie identyfikacja szczepów z rodzaju *Corynebacterium* wraz z oznaczeniem toksynotwórczości wykonywana jest nieodpłatnie w Zakładzie Bakteriologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie.

Podsumowanie

Pomimo, iż ostatni pojedynczy przypadek błonicy w naszym kraju odnotowano w 2000 roku, szczepy *C. diphtheriae* wciąż stanowią zagrożenie. W ostatnich latach coraz częściej nietoksynotwórcze izolaty tego drobnoustroju są hodowane z próbek krwi lub wymazów z ran. Wskazuje to z jednej strony na skuteczność prowadzonych szczepień przeciwbłoniczych. Z drugiej pokazuje, że szczepy tego gatunku wciąż krążą w populacji.

Nieograniczona migracja ludności może również prowadzić do zawleczenia na teren Polski toksynotwórczych szczepów *C. diphtheriae*. Ostatnio odnotowane przypadki błonicy wystąpiły w Londynie (Wielka Brytania) w kwietniu oraz w Oslo (Norwegia) w maju tego roku zawleczone w pierwszym przypadku prawdopodobnie z Afryki, a w drugim z Łotwy.

Piśmiennictwo

1. Diphtheria Surveillance Network. www.dipnet.org
2. Efstratiou A., George RC. Laboratory guidelines for the diagnosis of infections caused by *Corynebacterium diphtheriae* and *C. ulcerans*. Commun. Dis. Public. Health. 1999; 2:250-257.
3. Efstratiou A., Maple PAC. WHO manual for the laboratory diagnosis of diphtheria. WHO Regional Office for Europe, ICP/EPI 038(C), 1994.
4. Neal S., Efstratiou A. DIPNET establishment of a dedicated

surveillance network for diphtheria in Europe. Euro Surveill. 2007; 12:E9-E10.

5. Wagner K. News from the EU networks DIPNET. Launch of the diphtheria surveillance network. V&I News ECDC Newsletter on Vaccines and Immunization 2007; 24:1.

CHŁONIAKI ZŁOŚLIWE (LYMPHOMA MALIGNUM); AKTUALNA KLASYFIKACJA I CHARAKTERYSTYKA DIAGNOSTYCZNA WYBRANYCH POSTACI CHŁONIAKÓW, WAŻNYCH W PRAKTYCE DIAGNOSTY LABORATORYJNEGO.

Dr hab. n. med. Jadwiga Nowicka

Katedra i Zakład Analityki Medycznej, d. Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku, Akademii Medycznej we Wrocławiu

Chłoniaki złośliwe są nowotworami wywodzącymi się z komórek linii limfoidalnej, których diagnostyka poczyniła duże postępy w związku z rozwojem immunofenotypowania, pozwalającego na ustalenie na jakim poziomie dojrzewania i różnicowania tych komórek dochodzi do proliferacji nowotworowej. Dotychczasowe klasyfikacje (kilkanaście na przestrzeni ostatnich 40 lat), były oparte o różne, wybrane cechy budowy histologicznej, cytologicznej oraz cechy złośliwości danych nowotworów. Od kilku lat obowiązuje klasyfikacja REAL/WHO, a ostatecznie klasyfikacja WHO, uwzględniająca cechy kliniczne, histopatologiczne, cytomorfologiczne, cytochemiczne, immunofenotypowe oraz cytogenetyczne rozrostu nowotworowego. Tak więc w kontekście poprzednich klasyfikacji jest ona prawie doskonała. Mimo iż diagnostyka chłoniaków złośliwych jest głównie domeną klinicystów i anatomopatologów, diagnozy laboratoryjnej są często pierwszymi osobami zwracającymi uwagę na patologię w zakresie tego układu. Dotyczy to białaczek należących do zespołów limfoproliferacyjnych oraz chłoniaków z białaczkowym obrazem krwi, który jest charakterystyczny dla niektórych rozrostów tego typu, jak również zmian w obrazie szpiku w przypadku uogólnienia choroby i naciekania nowotworowego szpiku kostnego. Ważne dla diagnostów laboratoryjnych są nowotwory z dużych limfocytów B w chłoniakach pierwotnie wysiękowych (primary effusion lymphoma-PEL), w których nowotworowe limfocyty występują wyłącznie w płynie pobieranym do badań diagnostycznych z jam ciała.

Chłoniaki złośliwe dzieli się na chłoniaki ziarnicze (ziarnica złośliwa= Hodgkin lymphoma), stanowiące 30% i chłoniaki niezziarnicze (non Hodgkin lymphoma), stanowiące 70% chłoniaków złośliwych. Proporcje te ulegają zmianie na przestrzeni lat.

Podstawą rozpoznania chłoniaków złośliwych jest badanie histopatologiczne powiększonego, pobranego w całości węzła chłonnego. Stadium zaawansowania klinicznego choroby zależy od stopnia zajętych węzłów i narządów. Jako stadium I określa się zmiany w jednej grupie węzłów chłonnych, stadium II- to zajęcie co najmniej 2 grup węzłów po tej samej stronie przepony, III- zajęcie węzłów po obu stronach przepony, IV- zajęcie narządów jak szpik i wątroba. Niekiedy zmiany nowotworowe mogą obejmować pierwotnie narząd pozalimfatyczny, wówczas nieco inna jest klasyfikacja kliniczna choroby. Do objawów ogólnych choroby (B) zalicza się gorączkę, poty nocne, spadek wagi ciała >10% w czasie 6 miesięcy. Chorzy bez tych objawów należą do korzystniejszego stadium klinicznego A.

Ustalenie stadium klinicznego choroby następuje w oparciu o badanie fizyczne chorego, rtg klatki piersiowej, usg jamy brzusznej, tomografii komputerowej lub rezonansu magnetycznego (w zależności od wskazań), badanie szpiku kostnego. W ocenie zaawansowania zmian nowotworowych przydatną metodą jest pozytronowa tomografia emisyjna (PET) z zastosowaniem 18 fluoro-2-deoksyglukozy (FDG). Właściwość, że wiele komórek nowotworowych metabolizuje glukozę intensywniej niż komórki zdrowe, wykorzystuje metoda badania FDG- PET. Służy ona do diagnostyki chłoniaków ziarniczych i niezziarniczych, zarówno w celu określenia rozległości zmian na początku choroby, jak określenia całkowitej remisji (CR) i ewentualnej wznowy procesu chorobowego. CR to całkowite ustąpienie zmian węzłowych,

narządowych i ogólnych choroby.

Ziarnica złośliwa (Chłoniak Hodgkina, choroba Hodgkina, łac.Lymphogranulomatosis maligna, ang. **Hodgkin lymphoma**)

Jest nowotworem układu chłonnego charakteryzującym się powiększeniem węzłów chłonnych z obecnością w nich dużych, patologicznych komórek Reed- Sternberg'a (R-S- o fenotypie CD 30 i CD 15, bez ekspresji CD 45) i komórek Hodgkina (H), które są prekursorami komórek R-S.

Zachorowalność wynosi 2-3 przyp. na 100000 mieszkańców na rok. Występuje zarówno u dzieci w wieku 5-15 l jak u dorosłych o szczytzie zachorowań 20-35 l i po 50 r. życia, nieco częściej u mężczyzn.

Objawy kliniczne to powiększenie węzłów chłonnych, naciekanie śródpiersia, śledziony, wątroby. Zmiany szerzą się drogami chłonnymi. W zaawansowanych przypadkach do objawów ogólnych podobnych jak w innych chłoniakach dochodzi świąd skóry (nasilający się po alkoholu) i związane z nim zmiany skórne - przeczasy (czasem leczone bezskutecznie przez dermatologa). Podstawą rozpoznania jest badanie hist-pat. węzła chłonnego.

Badania laboratoryjne w ziarnicy złośliwej. Charakterystyczną cechą aktywnego procesu chorobowego jest przyspieszony odczyn Biernackiego(OB). W zaawansowanych postaciach choroby występuje niedokrwistość normocytowa i normochromiczna, rzadko niedokrwistość autoimmunohemolityczna z dodatnim testem antyglobulinowym. Liczba krwinek białych jest nieznacznie podwyższona, z granulocytozą obojętnochłonną, eozynofilią względną i bezwzględną, limfopenią. W zaawansowanych postaciach stwierdza się wzrost odsetka monocytów, leukopenię, małopłytkowość (wynik hipersplenizmu lub nacieczenia szpiku).

Występowanie w mielogramie komórek Sternberga- Reed w biopsji lub trepanobiopsji wskazuje na zajęcie szpiku procesem chorobowym i IV okres kliniczny choroby.

Ponadto stwierdza się obniżenie całkowitej zdolności wiązania Fe i stężenia Fe transferyny

Występują zmiany w białkach surowicy: obniżenie stężenia albumin, zwiększenie stężenia α_2 , β , γ globulin. Charakterystyczny jest wzrost stężenia haptoglobiny (do 300 mg%), co sprawia, że mimo współistnienia procesu hemolitycznego stężenie Hp może być prawidłowe. Może występować hiperkalcemia, w niektórych przypadkach białkomocz. W zaawansowanej chorobie dochodzi do upośledzenia odporności komórkowej.

Nieziarnicze chłoniaki złośliwe (non Hodgkin lymphoma: nHLy)

Powstają w wyniku nowotworowego, klonalnego rozrostu komórek linii limfoidalnej na różnych stadiach zróżnicowania limfocytów B, limfocytów T lub komórek naturalnej cytotoxyczności (NK). Chłoniaki z limfocytów B stanowią 86% chłoniaków złośliwych, z limfocytów T- 12%, z komórek NK- 2%.

Częstość występowania dotyczy 2-18przyp./100000 mężczyzn i 1-11 przyp./100000 kobiet, w 2,3 oraz 6 i 7 dekadzie życia.

Zmiany nowotworowe są zlokalizowane w węzłach chłonnych, pozawęzłowej tkance limfatycznej (np. przewodu pokarmowego, układu oddechowego), mogą występować a priori w narządzie poza limfatycznym np. tarczycy, centralnym układzie nerwowym i innych.

Tabela 1. Klasyfikacja WHO chłoniaków nieziarniczych

Z limfocytów B	Z limfocytów T
z komórek prekursorowych	
Ostra białaczka/chłoniak limfoblast. linii B	Ostra białaczka/chłoniak limfoblastyczny linii T
z komórek dojrzałych (obwodowych)	
Przewlekła białaczka limfocytowa/ chłoniak limfocytowy B komórkowy Białaczka prolimfocytowa B komórkowa Chłoniak limfoplazmocytozy/ makroglobulinemia Waldenströma Chłoniak strefy brzożnej śledziony Białaczka włochatokomórkowa Choroby z kręgu szpiczaka Pozawęzłowy chłoniak strefy brzożnej Węzłowy chłoniak strefy brzożnej Chłoniak grudkowy Chłoniak z komórek płaszczka Chłoniak wielkomórkowy rozlany z komórkami B Wielkomórkowy chłoniak śródpiersia Wielkomórkowy chłoniak wewnątrzprzeczynowy, Chłoniak pierwotnie wysiękowy Chłoniak Burkitta	białaczkowe/rozlane: Białaczka prolimfocytowa T komórkowa Białaczka z dużych ziarnistych limfocytów: podtyp z komórką T podtyp z komórką NK Chłoniak/białaczka T komórkowa dorosłych skórne: Ziarniak grzybiasty Zespół Sézary'ego Pierwotny skórny chłoniak wielkomórkowy inne pozawęzłowe: Chłoniak T/NK komórkowy nosowy Enteropatyczny chłoniak T- komórkowy Chłoniak T-kom. wątrobowo- śledzionowy Chłoniak T komórkowy tkanki podskórnej węzłowe: Angioimmunoblastyczny chłoniak T kom. Anaplastyczny chłoniak T komórkowy Chłoniak z obwodowych komórek T nieokreślony

Lokalizacja w wątrobie oraz w szpiku kostnym przemawiają za uogólnieniem choroby.

W odróżnieniu od choroby Hodgkina, gdzie zmiany szerzą się drogą naczyń limfatycznych w nHLy szerzą się drogą hematogenną, co daje zmiany w odległych węzłach lub narządach.

Ostre białaczki B i T komórkowe omówiono poprzednio (Diagnosta Laboratoryjny 2007,5,16-21.)

Przewlekłe białaczki należące do zespołów limfoproliferacyjnych

Przewlekłe białaczki limfocytowe najczęściej pochodzą

Z limfocytów B -90% białacek. Należą do nich:

Przewlekłe białaczki limfocytowe (chronic lymphocytic leukaemia CLL)

Białaczki limfocytowe/prolimfocytowe CLL/PLL

Białaczki prolimfocytowe (B cell prolymphocytic leukemia: B-PLL)

Włochatokomórkowa białaczka (hairy cell leukaemia-HCL)

Zespoły leukaemia/lymphoma (Lc/Ly)

Z limfocytów T wywodzi się 10% białacek:

Białaczka limfocytowa T (T- CLL)

Białaczka prolimfocytowa T (T- PLL)

Białaczka z limfocytów ziarnistych (large granular lymphocytic leukaemia (LGL): podtyp z komórek T(T-LGL) i komórek NK (NK-LGL)

Chłoniak/ białaczka T komórkowa dorosłych (adult T-cell leukemia/lymphoma: ATLL)

Zespół Sezarego (Sézary syndrome:SS)

Chłoniaki złośliwe z limfocytów B

Przewlekła białaczka limfocytowa (chronic lymphocytic leukemia: CLL).

Najczęstsza w Europie Zachodniej spośród białacek i najwcześniej opisana w znaczeniu historycznym, jest chorobą związaną z nagromadzeniem limfocytów B w fazie G0/G1 cyklu komórkowego, co związane jest ze zwiększoną ekspresją anty-apoptotycznej onkoproteiny bcl-2 .W odróżnieniu od innych nowotworów postępowanie terapeutyczne polega na wdrażaniu leczenia dopiero przy określonych wskazaniach. Bardzo często zostaje rozpoznana laboratoryjnie w czasie badań kontrolnych morfologii krwi, jeszcze przed wystąpieniem powiększenia węzłów chłonnych, gdy limfocytoza bezwzględna wynosi $>10G/l$, lub wcześniej gdy we krwi obwodowej stwierdza się $>5G/l$ limfocytów o fenotypie typowym dla CLL, przy obecności w szpiku co najmniej 30% limfocytów. Szpik wykazuje redukcję erytropoezy w czasie trwania choroby; przy współistnieniu anemii autoimmunohemolitycznej erytropoeza może być prawidłowa lub zwiększona i wówczas przyjmuje się, że limfocyty winny stanowić $>50\%$ innych komórek niż erytroblasty. W przypadku redukcji układu erytroblastycznego dochodzi do makrocytarnej niedokrwistości z retikulocytopenią, zwiększeniem stężenia Fe w surowicy wtórną niedokrwistością czysto czerwono krwinkową (PRCA), co wiąże się ze złą prognozą. Układ granulocytowy o prawidłowych morfologicznie komórkach jest w znacznie zmniejszonym odsetku, najczęściej również dochodzi do redukcji megakariocytów.

W CLL limfocyty stanowią $>90\%$ komórek jednojądrzastych, prolimfocyty i limfoblasty nie przekraczają 10%. Limfocyty są małe, okrągłe, o zbitej chromatynie jądra bez widocznych jąder, otoczone wąskim (lub niewidocznym) rąbkim niebieskiej cytoplazmy. Oprócz małych limfocytów w niektórych przypadkach występują duże limfocyty o chromatynie mniej zbitej (podobne do odczynowych limfocytów), co wiąże się z gorszą prognozą. W obrazie krwi mogą zdarzyć się komórki z trójplątowym jądrem, zawierające ziarnistości - są to limfocyty T w przeszłości zwane komórkami Rieder'a. Charakterystyczne są występujące w obrazie mikroskopowym cienie rozpadłych komórek (cienie Gumprechta). W trepanobiopsji stwierdza się 4 formy naciekania szpiku: guzkowe, śródmiażdżowe, mieszane i rozlane.

Immunofenotypowo stwierdza się w B CLL klonalny rozrost limfocytów B o fenotypie CD5CD19+ lub CD5CD23+, CD 79a+, CD43+, które wykazują obecność powierzchniowych Ig IgM lub IgM i IgD

Met. FISH stwierdzić można nieprawidłowości chromosomów 11,12,13,17 pary.

Kliniczne zaawansowanie zmian chorobowych określa się odmiennie od innych chłoniaków na 5 okresów wg. Rai'a i wsp.:

Okres 0: limfocytoza we krwi obwodowej $\geq 5\text{G/l}$, w szpiku limfocytoza $<40\%$

I: limfocytoza + powiększenie węzłów chłonnych

II: limfocytoza + powiększenie śledziony

III: limfocytoza + niedokrwistość (Hb $<10\text{g\%}$, inni $<11\text{g\%}$)

IV: limfocytoza + małopłytkowość ($<100\text{G/l}$)

Lub wg Binnetta na okres

A- w którym stwierdza się <3 grupy powiększonych węzłów chłonnych

B- ≥ 3 grupami węzłów chłonnych

C- z niedokrwistością $<10\text{g\%}$ Hb i/lub małopłytkowością $<100\text{G/l}$

W chorobie tej dochodzi do wtórnego zespołu niedoboru przeciwciał, cechującego się zwiększoną podatnością na infekcje i jest następstwem gorszej produkcji prawidłowych immunoglobulin. W badaniach laboratoryjnych stwierdza się: obniżenie stężenia γ globulin, obniżenie stężenia podstawowych klas immunoglobulin. Około 1/3 przypadków może ulec transformacji, przy czym częstsza jest transformacja prolimfocytowa (10-20% przypadków). Natomiast 3,5% przypadków transformuje w tzw. zespół Richtera-chłoniaka immunoblastycznego o wysokim stopniu złośliwości, w którym komórki blastyczne naciekają węzły chłonne, narządy bądź choroba ma postać białaczkową. Następuje utrata antygenu CD5, na komórkach pozostają powierzchniowe immunoglobuliny i lekkie łańcuchy. Bardzo rzadko (1-2% przypadków) kończy się ostrą białaczką limfoblastyczną, z obecnością małych limfoblastów, z nie wciętym jądrem.

Przewlekła białaczka limfocytowa/prolimfocytowa (CLL/PLL)

Jest bardziej agresywną postacią choroby.

Ta mieszana postać charakteryzuje się polimorfizmem komórkowym z obecnością małych limfocytów oraz 10-55% średniej wielkości komórek- prolimfocytów, posiadających charakterystyczne 1 jąderko w środku jądra i dużych limfoblastów (najczęściej z 2 jądrami). Prolimfocyty są mniej charakterystyczne niż prolimfocyty w PLL- mają mniej wyraźne jąderko i różną ilość cytoplazmy.

B komórkowa przewlekła białaczka prolimfocytowa

(B- cell prolymphocytic leukemia: PLL)

Jest rzadką chorobą, stanowi bowiem 1% przewlekłych białaczek limfocytowych, przebiega z szybko zwiększającą się leukocytozą, powyżej 100G/l, z najczęściej towarzyszącą niedokrwistością i małopłytkowością. We krwi obwodowej stwierdza się $> 55\%$ prolimfocytów, komórek średniej wielkości (zwykle średnicy 2 limfocytów) z okrągłym jądrem o umiarkowanie zbitej chromatynie i położonym centralnie wydatnym, pęcherzykowatym jądrem, słabo zasadochłonna cytoplazma na obwodzie komórek.

Cytochemicznie : występuje słabo dodatnia aktywność ANAE i słaba aktywność kwaśnej fosfatazy.

Immunofenotypowo komórki są: CD19+, CD20+, CD22+, CD79a+, CD79b+, u 1/3 osób występuje CD5+, natomiast antygen CD23 nie jest obecny.

Białaczka włochatokomórkowa (Hairy cell leukemia: HCL)

Stanowi 2% białaczek limfocytowych, we krwi obwodowej towarzyszy jej leukopenia, czasem pancytopenia. Klinicznie w jej przebiegu występuje skłonność do stanów zapalnych żył kończyn dolnych. Cechą charakterystyczną jest występowanie we krwi obwodowej (najczęściej do 20%) i w szpiku komórek włochatych- większych od limfocytu, z okrągłym lub owalnym jądrem, jasną obfitą cytoplazmą z wypustkami. Szpik wykazuje różny odsetek komórek włochatych, występujących od początku choroby, może być ubogo komórkowy, zwłókniały, w połowie przypadków nie udaje się go pobrać drogą biopsji aspiracyjnej. Rozstrzygające znaczenie ma typowy obraz w trepanobiopsji.

Limfocyty włochate są limfocytami B o fenotypie CD19+, CD22+, CD25+, CD79a+, (nie CD79b), CD103+, CD11c+, FMC7+.

Komórki włochate wykazują obecność fosfatazy kwaśnej odpornej na winian (TRAP).

Nie opisano typowych dla HCL aberracji chromosomalnych.

Białaczka włochatokomórkowa-wariant (Hairy cell leukemia wariant: HCLv)

Jest rzadką chorobą, w której występują komórki włochate przypominające prolimfocyty, z pojedynczym jądrem w środku jądra.

Cytoplazma jest bardziej obfita niż w HCL i bardziej zasadochłonna, z wypustkami.

Leukocytoza w odróżnieniu od klasycznej postaci HCL Jest podwyższona $>10\text{G/l}$, nawet do 0-110G/l. Komórki wykazują fenotyp limfocytów B, CD19+, CD20+, CD22+, FMC7+, często posiadają błonowe IgG lecz brak im typowych antygenów charakterystycznych dla HCL jak CD25, CD103, podczas gdy antygen CD11c może być dodatni.

Reakcja TRAP jest słabsza, może być ujemna.

Non HLv t. B w fazie białaczkowej (Lc/Ly B).

Do obrazu należy powiększenie węzłów chłonnych i śledziony, chociaż niektóre przypadki są diagnozowane z krwi obwodowej, bez zmian węzłowych i narządowych. O fazie białaczkowej w przebiegu chłoniaków mówimy, gdy naciekanie szpiku przez komórki chłoniaka wynosi $> 25\%$ oraz gdy komórki chłoniaka we krwi obwodowej stanowią $> 5\text{G/l}$.

Częściej faza białaczkowa dotyczy chłoniaków z małych komórek B np. z chłoniaków grudkowych lub pośredniej wielkości komórek (chłoniaków z komórek płaszcza). Rzadziej białaczkowa faza występuje w chłoniakach wielkomórkowych. Faza białaczkowa chłoniaka Burkita jest analogiczna do ostrej białaczki L3 wg FAB.

Chłoniak śledzionowy strefy brzeżnej (Splenie marginal zone lymphoma: SMZL)

Cechuje się powiększeniem śledziony i ew. węzłów wneki śledziony, węzły chłonne obwodowe nie są powiększone. Leukocytoza wynosi 10-30G/l, u 10% chorych może współistnieć niedokrwistość autoimmunohemolityczna lub/i immunologiczna małopłytkowość. U 75% chorych występują łańcuchy lekkie w moczu. We krwi stwierdza się monoklonalne białko w ilości $<2\text{g/l}$. Mediana wieku to 70lat.

Cechy diagnostyczne: Komórki kosmate we krwi obwodowej (limfocyty nieco większe z delikatnymi wypustkami zlokalizowanymi na jednym lub na przeciwległych biegunach komórek, chromatyna jądra gładka, zbita, jąderka są niewidoczne), naciekają śledzionę i w 50-75% szpik kostny. W różnych ilościach stwierdza się również limfoplazmocyty.

Imunofenotypowo limfocyty B są CD19+, CD20+, FMC7+, CD29+, CD79a+, CD5-, CD10-, CD23-, CD43-, CD103-. Z reguły nie wykrywa się fosfatazy kwaśnej odpornej na winian (TRAP), która jednak sporadycznie może być dodatnia. U 40% chorych występują aberracje chromosomu 7.

Chłoniak grudkowy (follicular lymphoma: FL) charakteryzuje się występowaniem bardziej pleomorficznych limfocytów niż w CLL, wśród których w różnym odsetku komórek w jądrze występują głębokie szczeliny (wcięcia). Chromatyna jąder jest jednorodnie zągęszczona a cytoplazma skąpa, czasem widoczna tylko na tle szczeliny jądra. W większych komórkach chromatyna jądra jest mniej zbita i mogą być widoczne jąderka a cytoplazma jest bardziej obfita.

Leukocytoza jest umiarkowanie podwyższona, z białaczkowym obrazem krwi u 15-30% i naciekaniem szpiku u 35-50% nowo zdiagnozowanych przypadków, w którym mogą występować guzki złożone z małych, wciętych komórek. W odróżnieniu od CLL nie stwierdza się cieni komórkowych.

Fenotyp limfocytów B: CD5-, CD19+, CD20+, CD24+, CD10+

Cytogenetycznie występuje charakterystyczna translokacja t(14;18)(q32;q21).

Dobrze zróżnicowany chłoniak B komórkowy (small lymphocytic lymphoma) - podobny do CLL. W przypadku gdy od początku występuje naciekanie szpiku i leukocytoza- klasyfikuje się jako CLL.

Chłoniak z komórek płaszcza (Mantle cell lymphoma: MCL)

Stanowi 5-6% nHLy, zwykle u mężczyzn w podeszłym wieku. Faza białaczkowa występuje u 20-30% chorych, lecz leukocytoza nie jest wysoka. Komórki charakteryzuje polimorfizm.

Przeważają komórki różnej wielkości, podobne do prolimfocytów. Błona jądrowa wykazuje wgłębienie, które różni się od wcięć w chłoniakach grudkowych, bo rzadko jest głębokie. Inne komórki mają jądro wielokątne, z jąderkami, małe. Istnieją postaci z komórkami podobnymi do limfoblastów.

Immunofenotyp: CD19+, CD20+, CD24+, CD5+, silna ekspresja SmIg, zwykle CD43+, CD10(-), CD23(-).

Cytogenetyka: 70-75% chorych wykazuje obecność t(11;14)(q13;32)

Badania molekularne- obecność mRNA cytokiny D1.

Chłoniak węzłowy strefy brzeżnej (nodal marginal zone B-cell lymphoma)

Stanowi 1,8% nHLy. Występuje jako postać węzłowa lub towarzyszący błonom śluzowym (mucosa-associated lymphoid tissue- MALT). Zajęcie szpiku i krwi występuje w 5-10% przypadków. Komórki są pleomorficzne: małe limfocyty, limfoplazmocyty i komórki przypominające komórki włochate.

Immunofenotyp: CD19+, CD20+, CD22+, CD79a+, CD5-, CD10-, CD25- lecz CD11c czasem+, w szpiku w odróżnieniu od HCL- nie stwierdza się zwłóknienia.

Chłoniak limfoplazmacytowy (Lymphoplasmacytic lymphoma)

Rzadka choroba, stanowi 1,5% chłoniaków węzłowych. We krwi obwodowej występują limfoplazmocyty, często naciekają szpik lecz liczba krwinek białych rzadko >10G/l. Składają się z komórek produkujących immunoglobuliny lub ich fragmenty. Komórki mniej regularne niż w CLL, cytoplazma obfita, w niektórych komórkach ciążka PAS dodatnie- ciążka Russela. Ciążka PAS dodatnie i pironinofilne w jądrach komórkowych- ciążka Dutchera

W szpiku; limfoplazmocyty i wzrost komórek tucznych.

Immunofenotypowo występują markery panB: CD19, CD20, CD22, CD79a oraz FMC7, cytoplazmatyczne immunoglobuliny i obecne są markery CD38, CD25, CD71- charakterystyczne dla komórek plazmatycznych. Brak CD5.

Do tego typu chłoniaków należy makroglobulinemia Waldenströma.

Choroby z kręgu szpiczaka grupa chorób należących do gammapatii monoklonalnych; wymagają oddzielnego przedstawienia.

Chłoniaki o wysokim stopniu złośliwości

1. limfoblastyczne- zajęcie szpiku i krwi obwodowej w >50% przypadków i morfologia komórek blastycznych jak L1, L2 z linii B i T
2. z małych nie wciętych komórek Burkita- zajęcie szpiku i krwi obwodowej w 15% przypadków, charakterystyczne limfoblasty z wodniczками w cytoplazmie- jak w L3
3. z dużych immunoblastów (komórki duże, z obfitą cytoplazmą i ze zwiniętym lub regularnym jądrem, luźną chromatyną i widocznymi jąderkami) - przy rozpoznaniu w 10% przypadków jest zajęty szpik, w niektórych przypadkach komórki krążą we krwi obwodowej.

Chłoniaki pierwotnie wysiękowe(primary effusion lymphoma: PEL), których występowanie jest związane z zakażeniem wirusem opryszczki (HHV-8) lub mięsaka Kaposi'ego (KSHV) u osób z niedoborem odporności HIV/AIDS.

Występujące w płynie z jamy surowiczej komórki chłoniaka mają różną wielkość, okrągłe jądro o nieregularnej błonie jądrowej z widocznymi lub niewidocznymi jąderkami. W zasadochłonnej cytoplazmie występują wodniczki. Nie stwierdza się zmian węzłowych ani innych guzów o charakterze chłoniaka.

Komórki nie mają typowego fenotypu dla limfocytów B lecz są: CD45+, CD30+, CD38+, CD138+.

Chłoniaki z limfocytów T i z komórek NK

Przewlekła białaczka limfocytowa T komórkowa (T-cell lymphocytic leukemia: T-CLL)

Stanowi 5% przewlekłych białaczek limfocytowych. Charakteryzuje się uogólnionym powiększeniem węzłów chłonnych, wątroby i śledziony, naciekami skóry oraz obecnością we krwi obwodowej, szpiku małych limfocytów o dojrzałym wyglądzie i fenotypie CD7+, CD2+, CD3+, CD5+, CD4+/CD8-. Występuje najczęściej u chorych z zespołem ataxia/teleangiectasia.

Przebieg kliniczny bardziej agresywny niż CLL-B.

[T-CLL wymieniana jest w klasyfikacji REAL/WHO.]

Białaczka prolimfocytowa T komórkowa

(T- cell prolymphocytic leukemia : T-PLL)

Prolifercja prolimfocytów T we krwi, szpiku, węzłach, wątrobie, śledzionie, skórze.

Agresywny przebieg kliniczny, okres przeżycia ok. 12 mies., leczenie mało skuteczne (ostatnio lepsze wyniki po zastosowaniu przeciwciał monoklonalnych anty CD52).

Prolimfocyty T cechują się mniej obfitą zasadochłonną cytoplazmą w porównaniu z prolimfocytami B, czasem wykazującą pęcherzykowate wypustki. Jądro jest okrągłe lub owalne, z dobrze widocznym jąderkiem. Chromatyna jądra pofałdowana lub zwinięta. Antygeny typowe dla limfocytów T: CD2+, CD3+, CD5+, CD7+, TCRα lub TCRβ.

Ponadto fenotyp CD4+/CD8- występuje u 60% chorych, CD4+/CD8+ - u 25% chorych, u pozostałych fenotyp CD4-/CD8+. Ujemna TdT i brak CD11a.

Białaczka z dużych ziarnistych limfocytów podtyp T (T- cell large granular lymphocytic leukemia: T-LGL)

Charakteryzuje się obecnością we krwi obwodowej dużych ziarnistych limfocytów, które zazwyczaj stanowią >4G/l; do rozpoznania koniecznych jest >1,5G/l tych komórek. W odróżnieniu od reakcji w przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów, w rozrostach nowotworowych powstają bez innej uchwytnej przyczyny. Są to limfocyty z obfitą jasną, słabo zasadochłonną cytoplazmą z licznymi azurochłonnymi lub czerwono- fioletowymi ziarnistościami. Jądro jest okrągłe lub owalne, położone mimośrodkowo o skondensowanej chromatynie, wyjątkowo zawierające jąderka.

Duże ziarniste limfocyty (LGL) występują we krwi obwodowej, szpiku, wątrobie i śledzionie.

Charakterystyczną cechą jest neutropenia, ze skłonnością do infekcji, czasem niedokrwistość PRCA. Szpik wykazuje cechy hipoplazji z zahamowaniem linii granulocytów i erytoblastów.

Fenotyp CD3+, TCRαβ+, CD4-, CD8+ występuje u 80% chorych, rzadziej stwierdza się fenotyp CD3+, TCRαβ+, CD4+, CD8- lub CD3+, TCRαβ+, CD4+, CD8+ lub CD3+, TCRγδ+.

Choroba występuje w wieku starszym, ma łagodny przebieg, lecz istnieje wariant agresywny T-LGL, z gorączką, hepatosplenomegalią i szybko doprowadza do śmierci.

Białaczka z dużych ziarnistych limfocytów podtyp NK (NK-Large granular lymphocytic leukemia: NK-LGL).

Komórki są większe od LGL, z obfitą bladą lub szaro-niebieską cytoplazmą, zawierającą ziarnistości azurochłonne. Jądro jest okrągłe lub owalne, czasem nieregularne. Szpik jest nacieczony przez komórki ziarniste z wyparciem prawidłowych układów, często obecne są w szpiku reaktywne histocyty oraz zjawisko hemofagocytozy.

Fenotyp komórek NK: CD3-, TCRαβ-, CD7+, CD16+, CD56+. Choroba ma agresywny przebieg kliniczny z objawami ogólnymi, dotyczy osób młodszych (ok. 40 r. życia).

Leukemia/lymphoma (Lc/Ly) typu T

-są to chłoniaki z białaczkowym obrazem krwi. Typowymi przykładami tych chorób jest białaczka/chłoniak T komórkowy dorosłych (ATLL), zespół Sezary'ego (SS) i ziarniniak grzybiasty (MF).

Białaczka/chłoniak T komórkowy dorosłych (Adult T-cell leukemia/lymphoma: ATLL)

Choroba rozpoczyna się zajęciem skóry i powiększeniem węzłów chłonnych. Wywołana jest przez retrowirus: human T-cell virus type 1 (HTLV-1), stąd wykazanie genomu badaniami molekularnymi lub stwierdzenie wysokiego miana przeciwciał anty HTLV-1 jest niezbędnym kryterium diagnostycznym ATLL. Występuje w Japonii, na Karaibach, centralnej Afryce.

Charakteryzuje się białaczkowym obrazem krwi, zajęciem węzłów chłonnych, wątroby, śledziony, skóry, obecnością zmian litycznych w kościach.

Charakterystyczną cechą jest występowanie we krwi pleomorficznych limfocytów: małych, średnich i dużych o różnym kształcie jądra (flower-like).

Przebieg kliniczny jest różny: w 65% przypadków ma postać ostrej białaczki ze znaczną limfocytozą, uogólnionym naciekaniem narządów, osteolizą i hiperkalcemią. W 5% ma postać przewlekłej białaczki ze zmianami w krwi obwodowej i „tłącej się”, w której

występuje <5% nieprawidłowych limfocytów. Inne cechy to : wzrost LDH, hiperkalcemia.

Zespół Sézary'ego (Sézary syndrome:SS) i Ziarniniak grzybiasty (Mycosis fungoides:MF).

To T komórkowe chłoniaki skóry, z których SS jest uważany za fazę białaczkową MF. W skórze występują początkowo zmiany plamiste, następnie guzowate, a w pobranym wycinku stwierdza się charakterystyczne nagromadzenia patologicznych komórek w postaci mikroropni Pautrier'a -klasycznych zmian histopatologicznych dla rozpoznania MF. W przypadku SS występuje uogólniona erythrodermia z naciekami limfocytów T we krwi obwodowej.

Morfologia komórek jest zróżnicowana. Można wyróżnić komórki małe, wielkości limfocytu z ubogą cytoplazmą, które noszą nazwę komórek mikotycznych (Lutznera); mają zasadochłoną cytoplazmę, zawierającą czasami wodniczki i pofałdowane jądro, bez jąderki, z wgłębieniami(przypominają rękawicę bokserką). Duże komórki (Sézary'ego) średnicy 15-20 µm mają niewielki rąbek słabo zasadochłonnej, bezziańskiej cytoplazmy, duże jądro z wydatnymi pofałdowaniami podobnymi do kory mózgowej (cerebriformis) oraz możliwość widocznych jąderki.

Fenotyp komórek CD2+, CD3+, CD5+, antygen CD7 oraz CD26 na ogół nie występują.

Ocena odsetka limfocytów T4 pozbawionych antygenu CD26 w odsetku wyższym niż 30% przemawia za SS lub MF, natomiast < 30% limfocytów CD4+/CD26- występuje u osób zdrowych z zapalną erythrodermią (EISD).

Szpik zajęty jest u 20% chorych, jest wyrazem uogólnienia choroby i pogarsza rokowanie.

W skórze występują limfocyty T o sfałdowanym jądrze (cerebriformis) kom. Lütznera lub/i immunoblasty T.

Chłoniak T komórkowy wątrobowo-śledzionowy (hepatosplenic T-cell lymphoma), jest bardzo rzadkim chłoniakiem, występuje u młodych mężczyzn. Cechuje się pancytopenią krwi obwodowej i naciekaniem szpiku przez limfocyty Tγδ.

Chłoniak T komórkowy tkanki podskórnej (subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma), bardzo rzadki chłoniak charakteryzuje się naciekami z limfocytów T zwykle CD8+ i fagocytyzujących makrofagów w tkance podskórnej i w szpiku, z występującą często pancytopenią krwi obwodowej.

Angioimmunoblastyczny chłoniak T komórkowy (Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: AIL), jest rzadkim chłoniakiem w wieku starszym z objawami ogólnymi i zmianami skórными, z częstym zajęciem szpiku i przewodu pokarmowego. We krwi występuje często niedokrwistość autoimmunohemolityczna, eozynofilia i limfopenia, w szpiku polimorficzne nacieki z limfocytów i komórek dendrytycznych.

Immunofenotyp limf. T: CD3+, CD4+, rzadziej CD8+

Cytogenetycznie stwierdza się trisomię chromosomów:3,5, dodatkowy chromosom X.

Chłoniak z obwodowych komórek T, nieokreślony (peripheral T-cell lymphoma, unspecified: PTL, unspecified) jest to grupa chłoniaków ze zmianami węzłowymi i narządowymi, z naciekami w szpiku i zmianami we krwi obwodowej. Komórkami nowotworowymi są różnej wielkości limfocyty T z dużym odsetkiem komórek odczynowych jak makrofagi, eozynofile, komórki nabłonkowe.

Fenotyp limfocytów T: CD2+, CD3+, CD4+, CD5+, CD7+.

Podsumowanie. Ciągła, na przestrzeni ostatnich dziesięć lat, ewolucja klasyfikacji chłoniaków złośliwych jest wyrazem złożoności problemów, które stwarza ta grupa chorób. Proces diagnostyczny chłoniaków jest bardzo złożony, wymaga współpracy wielu specjalistów. Jak zwykle, by rozpoczął się on wcześniej (w początkowym okresie) w wielu przedstawionych wyżej jednostkach chorobowych, wymaga zwrócenia uwagi na patologię w najczęściej wykonywanym badaniu diagnostycznym jakim jest morfologia krwi wraz z oceną obrazu krwinek białych.

Piśmiennictwo:

1 Banks P.M.: Warnike R.A.: Primary effusion lymphoma. In: "WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics, Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues". Eds.: E.S. Jaffe, N.L. Harris, H. Stein, J.W.Vardiman.IARC Press, Lyon, 2001,179-180.

2. Berger F., Isaacson P.G., Piris M.A., Harris N.L., Müller- Hermelink H.K., Nathwani B.N., Swerdlow S.H.: Lymphoplasmocytic lymphoma/Waldenström macroglobulinemia.Ibidem, 132-134.

3. Brunning R.D., Borowitz M., Matutes E., Head D., Flandrin G., Swerdlow S.H., Bennett J.M.: Precursor B lymphoblastic leukemia/lymphoblastic lymphoma (Precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia). Ibidem, 111-114.

4. Brunning R.D., Borowitz M., Matutes E., Head D., Flandrin G., Swerdlow S.H., Bennett J.M.: Precursor T lymphoblastic leukemia/lymphoblastic lymphoma (Precursor T-cell acute lymphoblastic leukaemia). Ibidem, 115-117.

5. Catovsky D., Montserrat E., Müller- Hermelink H.K., Harris N.L.: B-cell prolymphocytic leukaemia. Ibidem, 131-132

6. Diebold J., Jaffe E.S., Raphael M., Warnke R.A.:Burkitt Lymphoma. Ibidem, 181-184.

7. Dmoszyńska A.:Chłoniak Hodgkina. W: Podstawy Hematologii. Red.: A.Dmoszyńska, T. Robak, Czelej. Lublin, 2003,363-372.

8. Foucar K., Catovsky D.: Hairly cell leukaemia. In: "WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics, Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues". Eds.: E.S. Jaffe, N.L. Harris, H. Stein, J.W.Vardiman.IARC Press, Lyon, 2001, 138-141.

9. Frydecka I., Nowicka J., Slesak B., Radomska W.: Unusual case of granular lymphocytes (GL) proliferation: Simultaneous reactive and neoplastic proliferation. Acta Haemat. Pol., 1992, 23, 117-121.

10. Gatter K.C., Warnke R.A.: Diffuse large B-cell lymphoma. . In: "WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics, Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues". Eds.: E.S. Jaffe, N.L. Harris, H. Stein, J.W.Vardiman.IARC Press, Lyon, 2001, 171-174.

11. Harris N.L.: Mature B cell neoplasms: Introduction. Ibidem, 121-126.

12. Isaacson P.G., Piris M.A., Catovsky D., Swerdlow S.H., Monserrat E., Berger F., Müller-Hermelink H.K., Nathwani B.N., Harris N.L.: Splenic marginal zone lymphoma. Ibidem, 135-137.

13. Isaacson P.G., Müller- Hermelink H.K., Piris M.A., Berger F., Nathwani B.N Swerdlow S.H, Harris N.L.: Extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue(MALT lymphoma).Ibidem, 157- 160.

14. Isaacson P.G., Nathwani B.N., Piris M.A., Berger F., Harris N.L., Müller-Hermelink H.K., Swerdlow S.H.: Nodal marginal zone B-cell lymphoma. Ibidem, 161.

15. Matutes E.S.: T-cell lymphoproliferative disorders. In: Postgraduate Haematology.Eds.: A.V.Hoffbrand, D.Catovsky, E.G.D.Tuddenham. Blackwell Publishing Ltd, Hong-Kong, Ljubljana 2005, 644-662.

16. Müller- Hermelink H.K., Catovsky D., Montserrat E., Harris N.L.: Chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma. . In: "WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics. Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues". Eds.: E.S. Jaffe, N.L. Harris, H. Stein, J.W.Vardiman.IARC Press, Lyon, 2001, 127-130.

17. Nathwani B.N., Harris N.L., Weisenburger D., Isaacson P.G., Piris M.A., Berger F., Müller- Hermelink H.K., Swerdlow S.H.: Follicular lymphoma. Ibidem, 162-167.

18. D'Onofrio G., Zini G., Bain B.J.: Morphology of the Blood.Verdici Publisher, London, Roma, 1998, 256-315.

19. Robak T., Kasznicki M.: Przewlekłe białaczki limfocytowe. W: Podstawy Hematologii. Red.: A.Dmoszyńska, T. Robak, Czelej. Lublin, 2003, 269-285.

20.Robak T., Warzocha K., Mader J., Dmoszyńska A.:Zespoły limfoproliferacyjne .W: Choroby Wewnętrzne. Red. A.Szczeklik. Kraków 2006, 1513-1544.

21. Ralfkiaer E., Jaffe E.S.: Mycosis fungoides and Sezary syndrome. . In: "WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues". Eds.: E.S. Jaffe, N.L. Harris, H. Stein, J.W.Vardiman.IARC Press, Lyon, 2001, 216-220.

22. Russell-Jones R.: Immunophenotyping of Sezary cells. Br.J.Dermat.2001,144,1-3.

23. Stein H.:Hodgkin Lymphoma. Introduction. In: "WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues". Eds.: E.S. Jaffe, N.L. Harris, H. Stein, J.W.Vardiman.IARC Press, Lyon, 2001, 239.

24. Stein H., Delsol G., Pileri S., Said J., Mann R., Poppema S., Swerdlow S.H., Jaffe E.S.: Nodular lymphocyte predominant Hodgkin Lymphoma. Ibidem, 240-243.

25. Stein H., Delsol G., Pileri S., Said J., Mann R., Poppema S., Jaffe E.S., Swerdlow S.H: Classical Hodgkin lymphoma. Ibidem, 244-253.

26. Swerdlow S.H., Berger F., Isaacson P.G., Müller- Hermelink H.K., Nathwani B.N., Piris M.A., Harris N.L.: Mantle cell lymphoma.Ibidem,168-170.

27. Warzocha K., Robak T.: Nieziarnnicze chłoniaki złośliwe. W: Podstawy Hematologii. Red.: A.Dmoszyńska, T. Robak, Czelej. Lublin, 2003,349-363.

METODA PCR W CZASIE RZECZYWISTYM (REAL-TIME PCR) - WYZWANIA I PERSPEKTYWY.

Monika Radwan^a, Dagmara Jonszta^a, Magdalena Kosz Vnenchak^{ab}

^a Pracownia Genetyki Molekularnej i Wirusologii, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków.

^b Zakład Wirusologii, Katedra Mikrobiologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, ul. Czysa 18, 31-121 Kraków.

1. Wprowadzenie

Reakcja PCR (ang. polymerase chain reaction, pol. łańcuchowa reakcja polimerazy) opiera się na metodzie powielenia specyficznych fragmentów DNA, odkrytej przez Kary'ego Mullis'a w 1980 roku. (31,32,44). Odmianą tego, nagrodzonego w 1993 roku nagrodą Nobla odkrycia, jest technika PCR w czasie rzeczywistym (ang. real-time PCR). W biologii molekularnej łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. real-time polymerase chain reaction) jest także nazywana ilościową (ang. quantitative real-time polymerase chain reaction) lub kinetyczną reakcją real-time PCR (ang. kinetic real-time PCR) (36). Technika ta dzięki niezwyklej czułości staje się obecnie jedną z najpopularniejszych metod używanych do jednoczesnego namnażania i monitorowania ilości powstającego produktu DNA. Podczas reakcji powstające cząsteczki DNA są oznaczane ilościowo po każdym cyklu namnażania, czyli w czasie rzeczywistym.

Na początku lat dziewięćdziesiątych Higuchi wraz ze współpracownikami z firmy Roche Molecular Systems and Chiron po raz pierwszy zademonstrowali metodę real-time PCR (16). Jako cząsteczki detekcyjnej użyli wówczas bromku etydyny (EtBr), fluorescencyjnego barwnika, który po naświetleniu ultrafioletem wykazuje fluorescencję, umożliwiając obserwację amplifikowanego produktu (amplikonu). Dalsze prace dowiodły, że im mniejsza ilość cykli niezbędna do detekcji fluorescencji, tym większa ilość sekwencji namnażanej (17).

Obecnie na rynku światowym istnieje wiele firm, oferujących aparaturę i odczynniki niezbędne do przeprowadzenia reakcji real-time PCR, wśród nich znajdują się: Applied Biosystems (jedna z pierwszych firm produkujących termocyklery real-time PCR), BioGene, Bioneer, Bio-Rad, Cepheid, Corbett Research, Idaho Technology, MJ Research, Roche Applied Science oraz Stratagene. (55). Rosnące zainteresowanie jednostek akademickich i diagnostycznych metodą real-time PCR, związane jest z ogromem zalet, jakie posiada ta technika m.in.: ogromna czułość i szybkość reakcji (59), brak procedury detekcji po reakcji PCR, użycie cząsteczek fluorochromów i czułych metod detekcji sygnału (60). Omawiana metoda stosowana jest w różnych gałęziach mikrobiologii, badań ekspresji genów i chorób genetycznych (28).

Ostatnio technika PCR w czasie rzeczywistym została połączona z metodą łańcuchowej reakcji polimerazy przy użyciu odwrotnej transkryptazy (ang. reverse transcription polymerase chain reaction RT-PCR) (38). Metoda ta polega na oznaczeniu ilości mRNA, umożliwiając tym samym określenie ekspresji genów w danym czasie lub miejscu. Rozwój technik PCR wykorzystujących fluorochromy do pomiaru powielanego DNA w czasie rzeczywistym pozwolił na ominięcie żmudnej optymalizacji związanej z metodą RT-PCR (6).

Pomimo wielu zalet metoda ta, wiąże się z koniecznością zachowania wysokiej sterylności, ponieważ wszelkie zanieczyszczenia mogą dramatycznie zaburzyć ostateczny wynik doświadczenia.

2. Real-time PCR jako metoda wywodząca się z reakcji PCR

Reakcja PCR służy do skopiowania i powielenia matrycowej cząsteczki DNA. Aby reakcja przebiegała prawidłowo niezbędna jest obecność: matrycy, enzymu prowadzącego reakcję, którym jest termostabilna polimeraza DNA - Taq z termofilnych bakterii *Thermus aquaticus* lub wierniejsza polimeraza Pfu z *Pyrococcus furiosus*, odpowiednio zaprojektowanych oligonukleotydowych starterów, nukleotydów, będących substratami reakcji, buforu, zapewniającego odpowiednie środowisko i jonów magnezu, niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania

polimerazy. Reakcja składa się z kilku powtarzających się w kolejnych cyklach, etapów: denaturacji podwójnych nici, przyłączaniu starterów oraz syntezy nowych, komplementarnych nici (41). Teoretycznie, jeśli reakcja zachodzi z pełną wydajnością, powstaje dwukrotnie więcej specyficznego produktu po każdym cyklu PCR. Rzeczywisty przebieg reakcji obrazuje wykres ilości namnożonego DNA w czasie, charakteryzujący się stałą fazą początkową, po której następuje faza eksponentyjna, zakończona fazą „plateau”. W rzeczywistości, reakcja nie zachodzi z pełną wydajnością, ponieważ dochodzi do stopniowego zużywania reagentów i osiągania fazy „plateau” (Rys. 1). Dodatkowo, łączenie się starterów z powielanym produktem, może nasilać efekt „plateau” (60).

Rys. 1 na następnej stronie

Wiele cech reakcji PCR czyni technikę real-time PCR niezbędną we współczesnych badaniach ilościowych. Wydajne powielenie DNA jest możliwe jedynie do pewnej granicznej ilości DNA, przed efektem „plateau”. Natomiast wiarygodny pomiar początkowej ilości DNA, przez określenie ilości produktu po reakcji, jest praktycznie niemożliwe. Rozwiązaniem problemu jest metoda real-time PCR, która zakłada, że amplifikacja DNA zachodzi wydajnie we wczesnych etapach reakcji, stąd pomiar tworzenia produktu wykonuje się podczas fazy eksponentyjnej (55).

2.1 Pomiar ilościowy wykorzystujący metodę real-time PCR

Tradycyjne metody detekcji powielonego DNA polegają na elektroforezie kwasów nukleinowych w obecności bromku etydyny. Pomiar polega na wizualnej lub densymetrycznej analizie prążków, widocznych po naświetleniu żelu światłem ultrafioletowym. Alternatywne metody takie jak Southern blot czy PCR-ELISA są bardziej precyzyjne ale bardzo czasochłonne. Metoda real-time pozwala na ilościowy pomiar DNA, który może być wartością względną lub bezwzględną. Względny pomiar ilościowy wymaga użycia próbki referencyjnej. Przykładowo, ilościowe badanie poziomu ekspresji danego genu, wymaga użycia genu referencyjnego, o stałej ekspresji w większości próbek tzw. „housekeeping gene”. Względne stężenie DNA podczas fazy eksponentyjnej jest definiowane jako wykres intensywności fluorescencji od numeru cyklu w skali logarytmicznej (tak, aby eksponentyjny wzrost ilości produktu przedstawiał linię prostą). Najprostsze szacowanie ilości produktu polega na założeniu, że ilość DNA ulega podwojeniu w każdym cyklu, podczas fazy eksponentyjnej. Np. próbka, której Ct (ang. threshold cycle) jest osiągnięte 3 cykle wcześniej od innej, posiada $2^3 = 8$ razy więcej matrycy. Natomiast bezwzględny pomiar ilościowy jest możliwy po wcześniejszym sporządzeniu krzywej standardowej dla danego genu. Taką krzywą sporządza się przy użyciu znanej liczby cząsteczek DNA, wykonując seryjne rozcieńczenia, które służą jako matryce do przeprowadzenia ilościowej reakcji real-time PCR (26).

Istotnym parametrem reakcji real-time PCR jest wartość graniczna (ang. threshold), która określa cykl, po którym możliwa jest detekcja sygnału (ang. threshold cycle C_t), a więc intensywność fluorescencji przekraczająca wartość tła. Dla prawidłowego przeprowadzenia reakcji real-time PCR, wartość graniczną należy wyznaczyć dla indywidualnego pomiaru, tak, aby przecinała się ona z krzywymi doświadczalnymi w fazie eksponentyjnej. Wysoka wartość C_t i niska wartość R_n (określająca intensywność sygnału fluorescencyjnego) jest związana z niską liczbą kopii matrycy. Podobne wyniki mogą świadczyć, również o złym określeniu fazy eksponentyjnej na wykresie (6). Rozwiązaniem może być zmiana wartości granicznej (ang. multiple thresholds), będąca często jedyną możliwością zarejestrowania sygnału pochodzących z próbek pozytywnych. Wartość C_t jest proporcjonalna do ilości kopii sekwencji badanej, obecnych w próbce (13). Interpretacja wyników jest jednym z najistotniejszych kroków podczas wykonywania ilościowych pomiarów real-time PCR.

3. Metody detekcji produktu reakcji (amplikonu)

Monitorowanie ilości powstającego produktu reakcji (amplikonu), w czasie rzeczywistym, jest możliwe dzięki różnorodnym metodom: znakowania starterów, sond bądź amplikonów, cząsteczkami fluorescencyjnymi (28). Ze względu na specyficzność tych znaczników metody detekcji można podzielić na:

a) Niespecyficzne, wykorzystujące barwniki łączące się z DNA na zasadzie interkalacji. Przykładem jest najpopularniejszy tego typu barwnik - SYBR Green I.

b) Specyficzne. W tych metodach barwniki są specyficzne w stosunku do amplifikowanej sekwencji, wymagają odpowiedniego zaprojektowania i syntezy. Większość tych barwników wykorzystuje rezonansowy transfer energii fluorescencji (FRET) pomiędzy donorem, a cząsteczką wygaszacza (ang. non-fluorescent quencher NFQ lub ang. black-hole quencher - BHQ), który rozprasza energię fluorescencji w postaci ciepła. Zjawisko FRET zachodzi pomiędzy cząsteczkami, znajdującymi się w odległości 10-100 Å, ponieważ wydajność transferu energii jest odwrotnie proporcjonalna do szóstej potęgi odległości pomiędzy donorem, a akceptorem ($1/R^6$) (45). Przykładem cząsteczek będących fluorochromami mogą być: fluoresceina, rodamina, barwniki cyjaninowe i ich pochodne (6). Typowe wygaszacze to TAMRA, DABCYL, BHP (55).

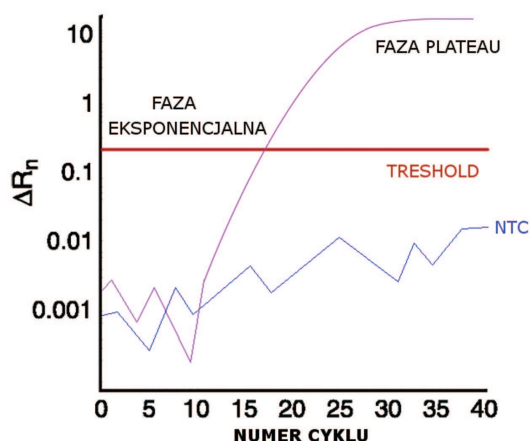
Większość mechanizmów detekcji w real-time PCR polega na hybrydyzacji oligonukleotydowej sondy z sekwencją komplementarną na nici amplikonu, stąd użycie większych ilości starterów, powoduje wzrost sygnału fluorescencji (14).

3.1 Mechanizmy fluorescencji

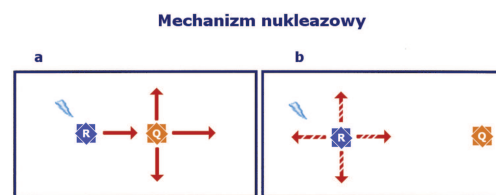
Pomiar i obserwacja fluorescencji, w metodzie real-time PCR, nierozdzielnie wiąże się ze zjawiskiem FRET. Przykładowe mechanizmy tego procesu przedstawiono na poniższych rysunkach:

1. Sonda posiada cząsteczkę reporterową (R) i znajdujący się w pobliżu wygaszcz (Q), który wychwytuje emitowaną przez reporter fluorescencję i zamienia ją w energię cieplną (Rys. 2 A). Gdy obie cząsteczki są znacznie od siebie oddalone, przykładowo po hydrolizie sondy przez polimerazę DNA, dochodzi do swobodnej emisji fluorescencji przez cząsteczkę reporterową, która może być wykryta i zmierzona (Rys. 2 B).

Rys. 1. Typowy wykres reakcji real-time PCR. Wykres ukazuje wzrost sygnału fluorescencji (oś y w skali logarytmicznej) w kolejnych cyklach PCR (oś x). Jednostki osi y (R_n) odzwierciedlają znormalizowany sygnał fluorochromu w stosunku do barwnika referencyjnego w buforze reakcyjnym. Linia NTC (ang. no-template control) nie zawiera matrycy DNA, kontrola pokazuje, że startery nie generują sygnału, a reagenty nie zawierają zanieczyszczeń obcym DNA.



Rys. 2. Mechanizm fluorescencji sond wykorzystujących aktywność 5' nukleazową polimerazy DNA. Opis w tekście.



2. W procesie odwrotnym (Rys. 3 A) używając sąsiednich sond oligonukleotydowych, sygnał z akceptora obserwuje się tylko podczas zbliżenia z donorem, co jest wynikiem sąsiedniej hybrydyzacji sond na powstającym amplikonie (Rys. 3 B).

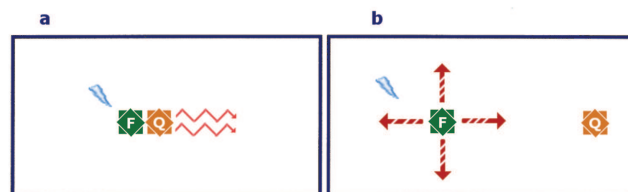
Rys. 3. Mechanizmy fluorescencji sąsiadujących sond oligonukleotydowych. Opis w tekście.



3. Gaszenie fluorescencji zachodzi w przygotowanej sondzie o strukturze spinki do włosów (ang. molecular beacon, ang. sunrise, ang. skorpion). Fluorochrom i wygaszcz oddziałują bardziej na zasadzie kolizji, niż zjawiska FRET, powodując rozproszenie energii w postaci ciepła (strzałki zygzakowate) (Rys. 4 A). Rozdzielenie cząsteczek w wyniku zniszczenia struktury spinki do włosów powoduje wyzwolenie fluorescencji (Rys. 4 B).

Rys. 4. Mechanizmy fluorescencji sond o strukturze spinki do włosów. Opis w tekście

Mechanizm sond typu hairpin



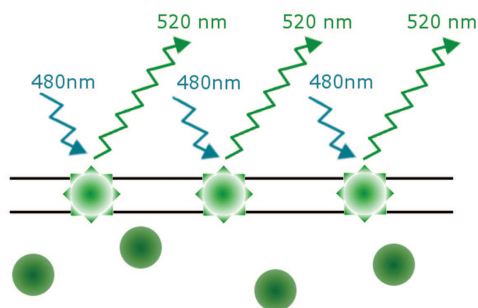
3.2 Metody wykorzystujące fluorescencyjne sondy reporterowe

Obecnie istnieje kilka podstawowych mechanizmów chemicznych, używanych do ilościowego pomiaru produktów reakcji, które mogą być zaklasyfikowane do metody specyficznej lub niespecyficznej detekcji amplikonu (57). Przykładami mogą być: związki łączące się z DNA (bromek etydy, SYBR Green I), sondy wykorzystujące zjawisko hydrolizy (aktywności 5' nukleazy) lub hybrydyzacji, sondy molecular beacons, startery sunrise oraz scorpion, czy sondy PNA omówione kolejno w niniejszej pracy. Każda sonda ma swoją unikalną charakterystykę, ale zasada działania jest stosunkowo prosta - polega na połączeniu zmian w sygnale fluorescencji z amplifikacją DNA (55). Choć te metody są stosowane do detekcji produktów reakcji real-time PCR, to mogą służyć także w detekcji amplikonu po zakończeniu typowej reakcji PCR. (28). Czułość i powtarzalność wspomnianych wyżej metod jest porównywalna (15).

3.2.1 Fluorochromy związane z dwuniciowym DNA

Są to jedne z najstarszych związków chemicznych wykorzystywanych do detekcji amplikonu, zarówno po reakcji PCR jak i w jej trakcie. Podstawą tej niespecyficznej i prostej metody detekcji, jest zdolność wiązania się fluorochromu z dwuniciową cząsteczką DNA (dsDNA), niezależnie od jej sekwencji. W wyniku akumulacji produktu PCR, obserwowany jest wzrost sygnału fluorescencji. Do licznej grupy tych związków należą m.in.: bromek etydy (17), YO-PRO-1 (51), pochodne oksazolu (21) oraz SYBR® Green I (30). Związki te wykazują widoczną fluorescencję po związaniu do dwuniciowego DNA i naświetleniu wiązką światła o odpowiedniej długości fali (Rys. 5). Ten sposób detekcji amplikonu nie wymaga specjalnego projektowania fluorescencyjnych sond oligonukleotydowych, co wiąże się z niższymi kosztami całego procesu. Kolejną zaletą jest również niezależność całego systemu detekcji od hybrydyzacji ze specyficzną sekwencją, co jest konieczne w przypadku sond specyficznych dla danej sekwencji (28).

Rys. 5. Długości fali wzbudzenia (480nm) i emisji (520nm) fluorescencji barwnika SYBR Green I po związaniu z dsDNA. Opis w tekście.



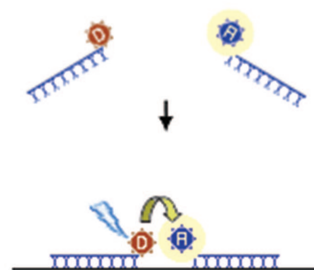
Istotną wadą związków wiążących się do dwuniciowych cząsteczek DNA jest łączenie się z niespecyficznymi produktami reakcji takimi jak: utworzonymi podczas dimeryzacji starterów (ang. primer-dimer) lub w wyniku błędnego przyłączenia starterów do matrycy (9). Takie niespecyficzne produkty zaburzają poprawną interpretację wyników, przyczyniając się do wzrostu intensywności sygnału fluorescencji. Rozwiązaniem może być krótka inkubacja, w wysokiej temperaturze, po każdym etapie wydłużania lub zastosowanie oprogramowania analizującego krzywą topnienia fluorescencji (denaturacja dwuniciowego amplikonu wiąże się z zanikiem sygnału fluorescencji) (28). Dla pojedynczych reakcji PCR z dobrze zaprojektowanymi starterami, SYBR Green I może być dobrym elementem detekcji, a fałszywe, niespecyficzne tło pojawia się najczęściej dopiero w późnych cyklach reakcji.

3.2.2 Liniowe sondy oligonukleotydowe (ang. dual hybridisation probes/adjacent probes)

Użycie pary przylegających do siebie, fluoryzujących sond oligonukleotydowych, łączących się z DNA poprzez hybryzację z określoną sekwencją, zostały po raz pierwszy opisane w latach 1980 i są znane pod nazwą „HybProbes” lub „adjacent probes” (7). Ten rodzaj sond wykorzystywany jest najczęściej z aparatem LightCycler™ (firmy Roche Molecular Biochemicals), który jest połączeniem termocyklera (z szybką kontrolą temperatury) oraz fluorymetru (mikroilościowego, działającego na zasadzie kapilary) (60, 61). Sonda „upstream” (poprzedzająca) wyznakowana jest na 3' końcu grupą fluorochromową (FITC - izotiocyanian fluoresceiny) - donor fluorescencji, natomiast sonda „downstream” zawiera na 5' końcu akceptorowy fluorochrom LightCycler Red 640 lub 705. Gdy obie sondy ulegają hybrydyzacji z amplikonem, obydwa fluorochromy znajdują się w odległości około 10 nukleotydów, tworząc kompleks emitujący sygnał fluorescencji, w wyniku rezonansowego transferu energii fluorescencji (FRET) (Rys. 6) (28). Energia wzbudzenia donora na 3' końcu, zostaje przekazana na cząsteczkę akceptorową na 5' końcu sąsiedniej sondy, która emituje światło o innej długości

fali. Pomiar ilościowy jest możliwy dzięki założeniu, że intensywność zmierzonej fluorescencji jest proporcjonalna do ilości amplikonu w próbówce (2).

Rys. 6. Sondy sąsiadujące ze sobą (ang. adjacent probes). Hybrydyzacja obydwu sond wyzwała zjawisko FRET, w wyniku oddziaływania między fluoryzującym donorem i akceptorem, D donor fluorescencji, R akceptor.



Wysoka specyficzność tej metody jest rezultatem jednoczesnego przyłączenia dwóch różnych sond, generującego sygnał fluorescencji. Modyfikacją tej metody może być użycie wygaszacza absorbującego emitowany, przez znajdujący się w pobliżu fluorochrom, sygnał fluorescencji (tzw. black hole quencher-BHQ)(2).

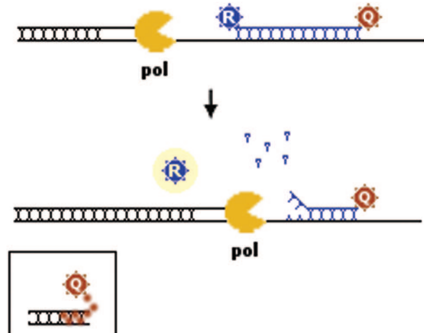
3.2.3 Sondy wykorzystujące aktywność 5' nukleazową polimerazy DNA (ang. 5' Nuclease oligoprobes/ hydrolysis probes)

Rozwój różnych modyfikacji sond, wykorzystujących zjawisko hybrydyzacji do matrycy i emisji fluorescencji, został stopniowo zastąpiony przez nową generację sond, wykorzystujących aktywność 5' nukleazową polimerazy DNA. Sondy te pozwoliły na rozwój metody homogenicznej reakcji PCR z użyciem fluorescencyjnych sond oligonukleotydowych. Detekcja amplikonu polega na monitorowaniu aktywności endonukleazy 5' 3' polimerazy DNA dzięki specyficznej sondzie lub duplesie badanego DNA. Sonda posiada na 5' końcu fluorochrom lub inną etykietkę, umożliwiającą detekcję. Koniec 3' uniemożliwia wydłużanie nici, a sekwencja sondy jest komplementarna do badanej nici DNA. Podczas amplifikacji 5' 3' egzonukleaza polimerazy Taq degraduje sondę, na mniejsze fragmenty, które różnią się od nieodegradowanej sondy (18).

W 1993 sondy, ulegające reakcji hydrolizy, zostały po raz pierwszy wykorzystane w reakcji real-time PCR (17). Obecnie jest to jedna z najpowszechniejszych metod detekcji przy zastosowaniu fluoryzujących sond oligonukleotydowych (27). Przykładem są popularne fluorescencyjne sondy oligonukleotydowe tzw. sondy TaqMan®, podwójnie znakowane, wysoko specyficzne. W roztworze, cząsteczka reporterowa i wygaszacz, znajdują się blisko siebie, co umożliwia absorpcję fluorescencji przez wygaszacz. Podczas amplifikacji, sygnał fluorescencji jest uwalniany w wyniku hydrolizy sondy przez polimerazę (jej aktywność 5' nukleazową) i rozdzielania cząsteczki reporterowej od wygaszacza (Rys. 7). Wzrost ilości amplikonu wiąże się ze wzrostem sygnału fluorescencji.

Przykładowe cząsteczki wygaszacza to: TAMRA (karbohydroksy-tetrametylo-rodamina), DABCYL, BHP, natomiast cząsteczki reporterowe wykazują większe zróżnicowanie to: FAM, VIC, NED, pochodne fluoresceiny (np. izotiocyanian fluoresceiny, 6-karboksylfluoresceina) itd. Sondy, wykorzystujące aktywność 5' nukleazową, posiadają podobną do SYBR Green I dokładność, ale dają większą pewność, co do specyficzności, ponieważ mierzony jest jedynie amplikon, o specyficznej sekwencji (55).

Rys. 7. Sondy wykorzystujące aktywność 5' nukleazową polimerazy DNA. Podczas gdy polimeraza DNA (pol) przesuwając się wzdłuż nici matrycowej usuwa i hydrolizuje sondę w wyniku aktywności endonukleazy 5'-3'. Częsteczka reporterowa fluorochromu zostaje uwolniona spod działania wygaszacza, powodując wyzwolenie energii wzbudzenia o długości fali, która może być zmierzona przez przyrząd pomiarowy, ponieważ różni się od długości fali emitowanej przez wygaszacza. Wstawka pokazuje cząsteczkę MGB (sondę wiążącą się do małego rowka DNA), R - cząsteczka reporterowa (fluorochrom), Q - wygaszcz.



Podstawowymi cechami sond oligonukleotydowych tego typu są: łatwość przyłączenia do DNA etykiety umożliwiającej detekcję, możliwość detekcji w niskich stężeniach przy użyciu prostej aparatury, produkcja charakterystycznego sygnału po specyficznej hybrydyzacji, stabilność w wysokich temperaturach i brak interferencji z aktywnością polimerazy (18). Sondy ulegające reakcji hydrolizy, posiadają określone cechy: długość między 20 a 40 nukleotydów, zawartość GC między 40 a 60 %, brak powtarzających się motywów i jednorodnych sekwencji, zwłaszcza składających się z tandemowych powtórzeń guaniny, brak hybrydyzacji oraz zachodzenia ze starterami forward i reverse, temperatura topnienia musi być co najmniej 5°C wyższa, niż temperatura topnienia starterów, aby mieć pewność, że sonda wiąże się z matrycą przed rozpoczęciem wydłużania starterów (25).

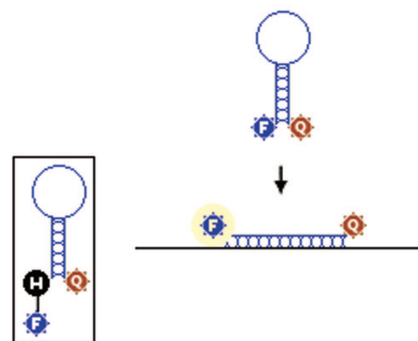
Modyfikacją sond, opartych na aktywności 5' nukleazowej, są sondy, wiążące się do małego rowka helisy DNA - (MGB, ang. minor groove binding oligoprobes). (Rys. 7 - wstawka). W tej metodzie standardowy wygaszcz TAMRA zastąpiono NFQ i wprowadzono cząsteczkę, która stabilizuje dupleks oligosonda - sekwencja docelowa, poprzez związanie się w małym rowku dwuniciowego DNA (24). Taka modyfikacja pozwoliła na skrócenie oligosondy do 14 nukleotydów, pozwalając na detekcję SNPs (ang. single nucleotide polymorphisms) oraz rozwój metody DNAzy-PCR, w której cząsteczka reporterowa i wygaszcz są rozdzielane przez cięcie sondy cząsteczką DNAzymu. DNAzym powstaje podczas reakcji PCR jako dopełnienie antysensownej sekwencji DNAzymu (znajdującej się na 5' końcu startera). Po cięciu, podwójnie wyznakowany substrat uwalnia fluorochrom i emituje sygnał fluorescencji analogicznie do sond, wykorzystujących aktywność 5' nukleazy (50).

3.2.4 Sondy typu spinki do włosów (ang. hairpin oligoprobes)

Do tej grupy sond należą wszystkie cząsteczki, których przestrzenna struktura drugorzędowa tworzy tzw. spinkę do włosów (hairpin), dzięki wewnętrznym sekwencjom komplementarnym do siebie (Rys. 8). „Molecular beacons” (markery molekularne) to pierwsza tego typu sonda oligonukleotydowa, stanowiąca modyfikację sond oligonukleotydowych, podwójnie znakowanych, wykorzystujących aktywność nukleazową polimerazy. W tym rodzaju sond fluorochrom i wygaszcz znajdują się na przeciwnych końcach i są utrzymywane blisko siebie, dzięki komplementarnym odcinkom, zaprojektowanym tak, aby całość tworzyła strukturę spinki do włosów. Ta bliskość powoduje wygaszenie fluorescencji na zasadzie, opisanego wcześniej, zjawiska kolizji (rys. 4) (52). W obecności komplementarnej sekwencji, zazwyczaj jest nią sekwencja przyłączania starterów, sonda hybryduje z matrycą i zmienia się w konfigurację otwartą. Fluorochrom jest oddzielony przestrzennie od cząsteczki wygaszacza, co umożliwia detekcję fluorescencji, podczas każdego

cyklu (53). Sondy te są projektowane tak, aby pozostały nienaruszone podczas całej reakcji PCR. Muszą przyłączać się do sekwencji docelowej w każdym cyklu, umożliwiając tym samym detekcję sygnału. Pojawienie się złego dopasowania między sondą a sekwencją docelową, powoduje silniejszą destabilizację kompleksu, niż w przypadku liniowych sond oligonukleotydowych, ponieważ struktura spinki do włosów posiada wysoce stabilną, naprzemienną konformację. Sondy o strukturze spinki do włosów są także bardziej specyficzne, niż sondy liniowe (52). W przeciwieństwie do poprzedniej metody, wygaszczem najczęściej jest 4-(4'-dimetyloamino-fenyl)-benzen (DABCYL), a nie NFQ.

Rys. 8. Sondy typu spinki do włosów. Hybrydyzacja sondy z sekwencją docelową oddziela fluorochrom (F) od niefluoryzującego wygaszacza (Q), umożliwiając pomiar emisji wzbudzonego fluorochromu. Wstawka pokazuje sondę typu spinki do włosów o przesuniętej długości fali emisji, zawierającą dołączoną cząsteczkę zbierającą sygnał (ang. harvester-H).



Modyfikacją tej metody jest wprowadzenie drugiego fluorochromu, który zbiera sygnał fluorescencji (ang. harvester), powodując efekt przesunięcia długości fali, emitującej fluorescencję. Przykładowo cząsteczka zbierająca sygnał (harvester), pochłania energię wzbudzenia, pochodzącą z niebieskiego światła i uwalnia ją jako energię fluorescencji w postaci fali z zakresu dalekiej czerwieni. Ten rodzaj energii, zostaje z kolei wykorzystany przez drugi fluorochrom, do produkcji światła o charakterystycznej długości fali. Dzięki tej modyfikacji możliwy był rozwój reakcji multiplex real-time PCR, umożliwiającej detekcję kilku produktów jednocześnie, znajdujących się w jednej próbce, pod warunkiem zastosowania fluorochromów o różnym widmie emisji (54). Sondy „molecular beacon” są, podobnie jak sondy TaqMan, bardzo kosztowne, ponieważ funkcja takiej sondy zależy od jej poprawnej hybrydyzacji ze specyficzną sekwencją matrycy, a więc odpowiedniego zaprojektowania i syntezy takiej sondy (4).

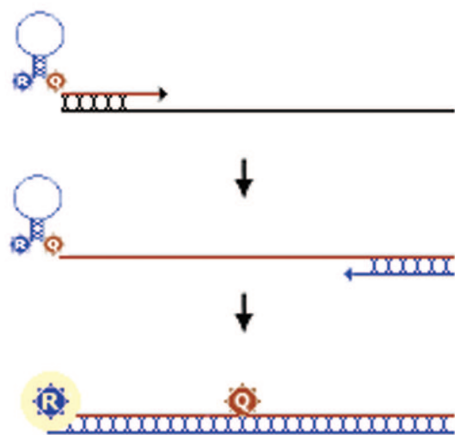
3.2.5 Modyfikacje sond oligonukleotydowych

Istnieje wiele różnych modyfikacji stosowanych sond, znakowanych parą cząsteczek reporter - wygaszcz, wśród nich najważniejsze to sondy „molecular beacons”, startery „sunrise” i „scorpion”. Mechanizm każdej z nich polega na utrzymaniu razem cząsteczki reporterowej i wygaszacza przed amplifikacją, a następnie ich rozdzieleniu i wytworzeniu sygnału fluorescencyjnego podczas amplifikacji (55).

Startery „sunrise” są modyfikacją sond molecular beacons, ale ulegają wbudowaniu do amplikonu podczas jego wydłużania, emitując sygnał fluorescencji (34). Startery na 5' - końcu mają przyłączony fluorochrom, w pobliżu 3' - końca - wygaszcz typu NFQ - DABCYL, które są rozdzielone komplementarną rozciągniętą sekwencją, tworzącą pętlę w stanie wolnym. Na 3' końcu znajduje się sekwencja startera, komplementarna do specyficznego odcinka DNA na amplikonie (Rys. 9). Sekwencja startera zostaje powielona przez powstającą, komplementarną nić, co destabilizuje pętlę, rozdzielając fluorochrom i wygaszcz i umożliwiając detekcję emitowanej fluorescencji (34). Wadą tego systemu jest powstawanie niespecyficznego sygnału fluorescencji, który jest wynikiem duplikacji sekwencji starterów typu „sunrise” podczas tworzenia dimerów starter-starter (28). Co więcej wysoką specyficzność starterów uzyskuje się, dzięki sekwencji nukleotydowej, która musi być każdorazowo odpowiednio

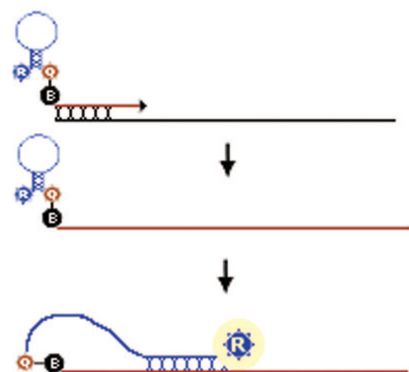
zaprojektowana i zsyntetyzowana, a to wiąże się z wysokimi kosztami całego systemu detekcji (2).

Rys. 9. Startery typu sunrise (wschodzącego słońca). W trakcie syntezy komplementarnej nici struktura spinki do włosów zostaje zniszczona, powodując rozdzielenie wygaszacza i fluorochromu, podobnie jak w przypadku sond o strukturze spinki do włosów, R - cząsteczka reporterowa (fluorochrom), Q - wygaszacz.



Ostatnim osiągnięciem w badaniach nad sondami oligonukleotydowymi są startery typu „scorpion”. Startery te łączą w sobie strukturę spinki do włosów (pętli) z wygaszczem w pobliżu 3'- końca i fluorochromem na 5' - końcu, tworząc niefluoryzujący kompleks, który zostaje wbudowany do amplikonu podczas wydłużania nici. Pętla jest połączona z 5' - końcem specyficznego startera poprzez monomer nieulegający amplifikacji (Rys. 10). Często monomerem jest glikol heksetylenowy, który blokuje duplikację części sondy scorpion, odpowiadającej za emisję fluorescencji. Cząsteczka blokera uniemożliwia otwarcie struktury spinki do włosów, pod nieobecność specyficznej sekwencji amplikonu (5). Po wydłużeniu startera, specyficzna sekwencja, znajdująca się w pętli sondy, może związać się do komplementarnej sekwencji w powstałym amplikonie, powodując otwarcie struktury spinki do włosów. Zmiany konformacji, podczas wydłużania amplikonu, generują gwałtowny i silny sygnał fluorescencji, w wyniku przestrzennego rozdzielania fluorochromu i wygaszacza (57).

Rys. 10. Startery typu skorpion. Starter nie wymaga wydłużania komplementarnej nici, a wręcz zaburza cały proces, w celu zapewnienia, że zniszczenie struktury spinki do włosów zachodzi tylko w wyniku specyficznej hybrydyzacji z komplementarną sekwencją zaprojektowaną tak, aby miał miejsce proces downstream natywnej nici, R - cząsteczka reporterowa (fluorochrom), Q - wygaszacz, B monomer; czerwona strzałka - starter scorpion.



Z kolei sondy „scorpion” można podzielić na dwa rodzaje (Rys. 11). Pierwsze z nich posiadają strukturę spinki do włosów, utrzymywaną dzięki sekwencji komplementarnej do powstającego produktu i są nazywane uni-sondami. Modyfikacją

uni-sond są bi-sondy, posiadające fluorochrom i wygaszacz na dwóch różnych niciach oligonukleotydowych. Specyficzny starter, bloker i fluorochrom znajdują się na jednej nici, natomiast wygaszacz jest przyłączony do 3'- końca drugiej nici oligonukleotydowej, w pełni komplementarnej do sekwencji sondy.

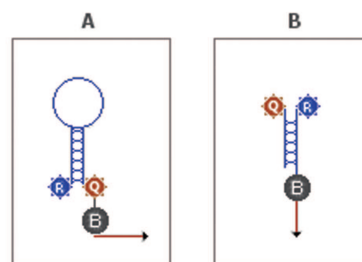
Mechanizm molekularny bi-sondy jest analogiczny do typowych starterów „scorpion”, jednak powyższa modyfikacja pozwala na uzyskanie wyższej intensywności sygnału. Porównując stosunek sygnału do wartości tła, bi-sondy przewyższają sondy TaqMan (gdzie wysoki sygnał wiąże się z wysokim tłem) oraz sondy typu „molecular beacons”, (dające niski sygnał i niskie tło). Kolejną istotną zaletą bi-sond jest łatwość ich zaprojektowania i syntezy, dzięki nieobecności struktury spinki do włosów. Jednak podczas projektowania bi-sondy również należy wziąć pod uwagę możliwość tworzenia struktury drugorzędowej (5).

Kolejną klasą sond są analogi DNA, tak zwane PNA - (ang. peptide nucleic acids) Są to oligomery zbudowane analogicznie jak nie DNA, w których szkielet fosforanowy został zastąpiony jednostkami N-(2-aminoetylo)-glicyny, połączonymi wiązaniami peptydowymi (35). Sondy te nie mogą służyć jako startery dla polimerazy DNA (39). Szkielet PNA jest pozbawiony reszt fosforanowych, a więc także ładunku elektrycznego i nie wymaga siły jonowej, aby utworzyć dupleksy z DNA lub RNA. Temperatura topnienia dupleksów PNA/DNA jest wyższa niż DNA/DNA i praktycznie niezależna od siły jonowej, tak, więc w roztworach o niskiej sile jonowej, PNA wiąże się efektywnie z nicią DNA, nawet w obecności komplementarnej do badanej sekwencji nici DNA (12). Niskie stężenia soli destabilizują także oddziaływania z RNA, faworyzując wiązanie DNA z PNA. Cząsteczki PNA połączone z fluorochromami, na przykład z oranżem tiazolowym, są nazywane świecącymi sondami, ponieważ emitują silny sygnał po związaniu się z DNA (47). Sygnał fluorescencji sond PNA wzrasta, gdy są one związane z DNA. Nie wymagają one zmiany konformacji do emisji fluorescencji, są wrażliwe na jednonukleotydowe zmiany w sekwencji DNA. Ponieważ sondy PNA wykorzystują jeden rodzaj cząsteczki reporterowej, możliwy jest bezpośredni pomiar fluorescencji, zamiast pomiaru zmian fluorescencji, zachodzących między dwoma fluorochromami (20). Jednak w późniejszych cyklach pojawia się niespecyficzny sygnał fluorescencji (46).

Powyższe przykłady nie wyczerpują pełnej listy, dostępnych sond, wykorzystywanych do detekcji sygnału podczas reakcji real-time PCR. Wciąż trwają próby ulepszania czułości i specyficzności sond oraz redukcji ich kosztów produkcji.

Rys. 11. Rodzaje sond Scorpion. A) - uni-sonda posiada na jednej nici oligonukleotydowej cząsteczkę reporterową (R), wygaszacz (Q), cząsteczkę blokującą wydłużanie startera, odpowiadającego za emisję fluorescencji (B), starter (czerwona linia) oraz sekwencję komplementarną, tworzącą strukturę spinki do włosów.

B) bi-sonda na jednej nici znajduje się wygaszacz, a na drugiej cząsteczka reporterowa (R), bloker (B) oraz starter; nici są do siebie komplementarne.



4. Urządzenia wykorzystywane do detekcji sygnału w real-time PCR

Fluorymetria jest bardzo czułą i wszechstronną techniką, mającą wiele zastosowań w biologii molekularnej. Wykorzystując zjawisko FRET i szeroką gamę fluorochromów, uzyskano potężne narzędzie do analizy struktur makrocząstek. Jedynym, napotykanym często, ograniczeniem tej metody jest objętość próbek, wymagana dla konwencjonalnych roztworów do pomiaru fluorymetrycznego. Objętość próbki staje się problemem dla drogich próbek lub w przypadku, gdy oddziaływania składników ujawniają się tylko w wysokich stężeniach. W powyższych przypadkach fluorymetr o pojemności mikro- zamiast mililitrów staje się niezbędnym urządzeniem do analizy ilościowej (61).

4.1 Zasada działania typowego urządzenia pomiarowego - termocyklera

Zadaniem urządzenia pomiarowego jest utrzymywanie określonych warunków reakcji, standaryzacja i monitorowanie sygnału fluorescencji podczas reakcji real-time PCR. Urządzenie mierzy sygnał fluorescencji i wartość graniczną (Ct) po przekroczeniu sygnału tła, a przed osiągnięciem fazy plateau, podczas reakcji (55). Typowy aparat do przeprowadzania reakcji real-time PCR składa się ze składowych zebranych w tabeli I.

Tabela I. Podstawowe elementy składowe urządzenia do prowadzenia reakcji real-time PCR. (5, 61)

Układ	Funkcja	Elementy składowe
Źródło światła	Wzbudzenie cząsteczki reporterowej (fluorochromu)	Diody LED Lampy halogenowe lub lasery Filtry interferencyjne
Optyczny układ detekcji fluorescencji	Detekcja sygnału fluorescencji	Filtry dichroiczne Soczewki Fotodiody (lub fotopowielacze)
Komora pomiarowa	Umożliwia jednoczesny pomiar nawet kilkuset próbek	Tarcza z próbkami Wirówka
Układ kontroli temperatury	Zapewnia odpowiedni system grzania/chłodzenia bez skoków temperatur	Źródło ciepłego i zimnego powietrza, wiatrak Termostos lub moduł Peltier'a

Temperatura w termocyklerze musi być dokładnie kontrolowana, dzięki zastosowaniu urządzenia grzewczego i chłodzącego, które w zależności od warunków regulują temperaturę w komorze pomiarowej. Przepływ powietrza wymuszany jest przez wiatrak, który zapewnia homogenność temperatury pośród próbek. W zależności od użytego źródła światła stosuje się filtry interferencyjne, ponieważ różne cząsteczki fluorochromów posiadają charakterystyczne długości fali wzbudzenia i emisji fluorescencji. Filtry przepuszczają jedynie określone długości wiązki świetlnej. Przykładowo do wzbudzenia fluorescencji barwnika SYBR Green I stosuje się filtr przepuszczający światło o długości 520-580 nm. Po wzbudzeniu cząsteczki reporterowej światło jest zbierane za pomocą soczewek, przechodzi przez filtr dichroiczny, który przepuszcza tylko wiązkę i danej długości fali, odcinając zbędne tło. Pomiar sygnału odbywa się dzięki fotodiodom (61).

Urządzenia, wykorzystujące wąską wiązkę świetlną laserów (488-514 nm) do wzbudzania cząsteczek fluorochromów, są nieefektywne w stosunku do szerokiej gamy obecnie stosowanych fluorochromów. Chociaż wzbudzenie światłem lampy halogenowej jest mniej intensywne, niż laserem, powoduje równomierne wzbudzenie w znacznie szerszym zakresie długości fal. Dobór odpowiedniego źródła światła jest szczególnie istotny w metodzie „multiplex real-time PCR”, która wymaga zastosowania takich fluorochromów, których widma emisji nie będą na siebie zachodziły.

Z drugiej strony laser odznacza się wysoką jasnością spektralną i czułością, korzystną dla efektywnego wzbudzenia fluorochromów (5).

Wykonanie około trzydziestu cykli amplifikacji specyficznej sekwencji DNA trwa zaledwie 10-15 minut, dzięki zastosowaniu małej objętości próbek w szklanych kapilarach i ogrzewania za pomocą cyrkulującego powietrza. Poprzez ograniczenie czasu trwania etapu denaturacji i wydłużania (ang. annealing) uzyskuje się wyższą specyficzność oraz zysk (60).

4.2 Przegląd popularnych aparatów do pomiaru fluorescencji podczas reakcji real-time PCR

Obecnie, jest dostępnych wiele aparatów oraz ich najnowszych modyfikacji do przeprowadzania reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Jednym z nich jest np. **LightCycler™** i jego nowe odmiany (niemieckiej firmy Roche Molecular Biochemicals), który stanowi połączenie termocyklera (z szybką kontrolą temperatury) z mikroilościowym fluorymetrem (pomiar próbek o objętości 5-10 μ l). Posiada niewielkie wymiary (24 cm x 28 cm x 45 cm), pozwalając na analizę nawet do 96 próbek jednocześnie (61). Przepuszczając wiązkę świetlną, plastikowe i szklane kapilary, stanowią swoiste kuwety do pomiaru fluorescencji i ułatwiają szybką wymianę ciepła. Objętość próbki niezbędna do wykonania pomiaru, to zaledwie 5 μ l, która znajduje się w kapilarze o przekroju 0.8 mm (61). Niestety kapilary są bardzo kruche i wymagają doświadczonego operatora. Pomiar fluorescencji polega na pochłonięciu przez badany roztwór niebieskiego światła (450-190 nm), emitowanego przez diodę i emisji fluorescencji, która zostaje wychwycona przez szereg silikonowych fotodetektorów (fotodiod) z filtrami, absorbującymi wiązki świetlne o różnej długości fali (61). Zmiany temperatury są kontrolowane przez chłodne i ciepłe powietrze oraz wiatrak, które potrafią zmieniać temperaturę w tempie 20°C/s. Dodatkowo system pomiarowy umożliwia analizę fluorescencyjnych krzywych topnienia, dzięki monitorowaniu zmian emisji fluorescencji, dostarczając informacji o sekwencji, do której wiąże się dana sonda. Dzięki tym własnościom LightCycler'a ulepszono i przyspieszono możliwość diagnozowania chorób genetycznych oraz detekcję pokrewnych patogenów wirusowych, metodą „multiplex real-time PCR” (28).

Duża konkurencja na rynku produkującym aparaturę do real-time PCR, sprawiła, że wybór odpowiedniego urządzenia jest dosyć skomplikowany. Wśród najbardziej znanych przedstawicieli wyróżniamy: wspomniany wcześniej LightCycler firmy Roche, Cycler firmy Biorad, Mx4000 firmy Stratagene, Smartcycler, Rotor Gene 2000 firmy Corbett oraz najnowsze, laserowe urządzenia, analizujące większe ilości próbek: 7900HT (384 próbki, z laserową wiązką wzbudzającą) czy nowe modele firmy Applied Biosystems (np. typu ABI Prism 96 próbek, z halogenową wiązką światła), Chimaera Quantitative PCR Systems firmy Thermo Scientific i DNA Engine Opticon Continuous Fluorescence Detection System firmy MJ Research (61).

Cycler firmy Biorad - wykorzystuje halogenową lampę wolframową, która przy użyciu odpowiednich filtrów pozwala na wzbudzenie fluorochromów z zakresu 400-700 nm. Może jednocześnie analizować od 96 do 384 próbek (5).

Rotor Gene 2000 posiada cztery niezależne diody LED jako źródła światła o długościach 470, 530, 585 i 625 nm. Energia wzbudzenia jest wykrywana przez 6 filtrów i powielaczy o długościach fali z zakresu 510-660 nm. Charakterystyczną cechą tego urządzenia jest prowadzenie reakcji real-time w standardowych probówkach wirówkowych, które znajdują się w 36- lub 72-studzienkowej wirówce, obrót próbek zapobiega nierównomiernemu rozkładowi temperatury podczas reakcji (5).

Urządzenie **Mx4000** firmy Stratagene posiada halogenową lampę wolframową, z zakresem wzbudzenia fluorochromów od 350 do 750 nm, detekcją 350-830 nm, 4 fotopowielacze, 4 niezależne głowice, pozwalające na wzbudzenie i detekcję 4 różnych barwników w jednej studzience oraz zintegrowany komputer osobisty, który zapobiega utracie danych.

Zastosowanie filtrów wzbudzenia i emisji pozwala na wyeliminowanie sygnału tła, pochodzącego z nieprzyłączonych lub błędnie przyłączonych sond. Urządzenie jest połączeniem ogniwa Peltier'a, technologii przewodzących i izolujących, które utrzymują stałą temperaturę we wnętrzu urządzenia oraz zapobiegają nagłym skokom temperatur (5).

ABI Prism 7000 zawiera również 96-studzienkowy, termiczny blok oparty o efekt Peltier'a oraz lampę wolframowo-halogenową, stale naświetlającą wszystkie próbki. Detekcja emisji fluorescencji odbywa się bezpośrednio przez 4 filtry optyczne i matrycę CCD (Charge-Coupled Device). Oprogramowanie służące do obsługi urządzenia bazuje na systemie Microsoft Windows, co pozwala na łatwą analizę danych, na komputerze wyposażonym w ten system (5).

5. Wybrane przykłady modyfikacji metody real-time PCR

Choć technika real-time PCR jest stosunkowo młoda, to znalazła już szerokie zastosowania w diagnostyce i badaniach naukowych (28). W dziedzinie naukowej, technika ta jest źródłem wysokospecyficznych pomiarów ilościowych produktów transkrypcji genów. Dzięki temu możliwe są badania ekspresji genów i ich zmian w czasie, odpowiedzi tkanek i kultur komórkowych na podanie środka farmakologicznego, progresji różnicowania komórek oraz odpowiedzi na zmiany warunków środowiska (5).

5.1 Badanie ekspresji genów metodą real-time Reverse Transcriptase PCR

Podobnie jak w przypadku konwencjonalnej techniki PCR, także w real-time PCR można analizować RNA - mówimy wtedy o real-time RT-PCR (ang. real-time reverse transcriptase PCR), ponieważ pierwszym etapem jest przepisanie RNA na cDNA (ang. complementary DNA) przy pomocy odwrotnej transkryptazy. Aby przeprowadzić real-time RT-PCR należy najpierw wyizolować mRNA z określonej komórki, następnie przy użyciu odwrotnej transkryptazy uzyskać cDNA - odpowiadające dokładnie sekwencji kodowanego białka. Docelowy gen zostaje dalej powielany w mieszaninie cDNA oraz genu referencyjnego „housekeeping gene”, (którego poziom ekspresji jest praktycznie stały we wszystkich komórkach i tkankach), a następnie jego ilość jest mierzona dzięki zastosowaniu sond fluorescencyjnych.

Podstawowe założenie metody real-time PCR polega na tym, że im bardziej liczny jest dany cDNA (tym samym mRNA) w próbce, tym wcześniej zostanie wykryty podczas powtarzających się cykli powielania. Porównanie ilości zmierzonej próbki DNA lub RNA ze standardem, pozwala na określenie proporcji próbki w stosunku do standardu, umożliwiając szacunkowe określenie relacji pomiędzy różnymi tkankami lub warunkami doświadczalnymi. Aby uzyskać precyzyjną wartość pomiarów, niezbędna jest normalizacja ekspresji badanego genu, w stosunku do genu o stabilnej ekspresji (np. housekeeping gene). Aby uzyskać dokładną wartość poziomu ekspresji danego genu, zmierzona ilość RNA badanego genu dzieli się przez ilość RNA genu referencyjnego, której pomiar wykonuje się w tej samej próbce, w celu normalizacji całego pomiaru (wykluczenia możliwych odstępstw ilości i jakości RNA pomiędzy różnymi próbkami). Normalizacja pozwala na dokładne określenie ilości cząsteczek RNA, a tym samym porównanie ekspresji genu między różnymi próbkami, pod warunkiem, że ekspresja genu referencyjnego („housekeeping gene”) jest zbliżona we wszystkich próbkach. Dobór odpowiedniego genu referencyjnego jest bardzo istotny, ponieważ tylko nieliczne geny wykazują równy poziom ekspresji w różnych warunkach lub tkankach. (33, 37)

5.2 Multiplex real-time PCR

Inną modyfikacją real-time PCR jest metoda multiplex real-time PCR. W przypadku konwencjonalnej metody PCR przez "multiplex" rozumiemy użycie kilku odpowiednich starterów, o różnych widmach emisji

fluorescencji, dzięki czemu możliwa jest amplifikacja więcej niż jednego fragmentu DNA w pojedynczej reakcji (8). Jeśli chodzi o real-time PCR, termin „multiplex” odnosi się raczej do wielu rodzajów sond fluorescencyjnych, używanych w celu rozróżnienia różnych aplikonów powstałych w czasie reakcji. „Multipleksowy” real-time PCR spotyka się z wieloma trudnościami. Niezbędne jest użycie kilku fluorochromów oraz źródła światła, które wzbudza wszystkie użyte w reakcji fluorochromy (54). Jak dotąd możliwe jest prowadzenie zaledwie kilku (czterech) reakcji w jednej próbce. Nowe rozwiązania, takie jak udoskonalenia w projektach sond i starterów, nowatorskie kombinacje fluorochromów, zastosowanie cząsteczek wygaszających energię i przy tym nieemitujących światła oraz nowe rozwiązania w konstruowaniu aparatów do prowadzenia takich reakcji, pomagają rozwijać technikę multiplex real-time PCR (55).

6. Podsumowanie

Użycie fluorescencyjnej sondy reporterowej jest najdokładniejszą i najbardziej niezawodną metodą ilościowego pomiaru produktu PCR, jednak wiąże się z wysokimi kosztami. Najszybszą stosowaną metodą jest detekcja z wykorzystaniem sondy o aktywności 5' endonukleazy. Użycie sondy reporterowej znacząco zwiększa specyficzność i pozwala na oznaczenie ilości produktu nawet w obecności niespecyficznych cząsteczek DNA. Najnowsze modyfikacje, pozwalające na zastosowanie kilku sond, umożliwiają potencjalne zwielokrotnienie reakcji - badanie kilku genów w tej samej próbce, używając specyficzne sondy z przyłączonymi etykietkami o różnych kolorach, dzięki czemu produkty reakcji multiplex real-time PCR są namnażane z porównywalną wydajnością.

Najnowsza aparatura pomiarowa łączy w sobie cechy umożliwiające bardzo krótki czas trwania reakcji i pomiaru oraz możliwość detekcji kilku produktów reakcji jednocześnie. Urządzenia te są równocześnie przystosowane do użycia wszystkich sond opisanych w powyższej pracy, czyniąc real-time PCR metodą wszechstronną i wykorzystywaną zarówno w badaniach naukowych jak i w diagnostyce laboratoryjnej.

Praca finansowana z projektu badawczego MniSW NrN401 08232/1930

7. Piśmiennictwo

1. **Alberts B.**, Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., And Watson J.D. *Molecular Biology of the Cell*, 3rd ed., New York: Garland (1994)
2. **Bell A.S.**, Ranford-Cartwright L.C. *Real-time quantitative in parasitology*. Trends Parasitol. 18(8), 337-342 (2002)
3. **Bustin S.A.** *A-Z of Quantitative PCR*. IUL Biotechnol. Series, IUL Press, La Jolla, Ca, USA (2004)
4. **Bustin S.A.** *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. J. Mol. Endocrinol. 25, 169193 (2000)
5. **Bustin S.A.** *Quantitation of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems*. J. Mol. Endocrinol. 29, 2339 (2002)
6. **Bustin S.A. and Nolan T.** *Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction*. J. Biomol. Tech. 15, 155166 (2004)
7. **Cardullo R.A.**, Agrawai S., Flores C., Zamecnik P.C. and Wolf D.E. *Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 85, 87908794 (1988)
8. **Chamberlain J.S.**, Gibbs R.A., Ranier J.E., Nguyen P.N. and Caskey C.T. *Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification*. Nucleic Acids Res. 16, 1114111156 (1988)
9. **Chou Q., Russell M., Birch D.E., Raymond J. and Bloch W.** *Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications*. Nucleic Acids Res. 20, 17171723 (1992)
10. **Crockett A.O. and Wittwer C.T.** *Fluorescein-labelled oligonucleotides for real-time PCR: using the inherent quenching of deoxyguanosine nucleotides*. Anal. Biochem. 290, 8 9 9 7 (2001)

11. Eckert C., Landt O., Taube T., Seeger K., Beyersmann B., Proba J. and Henze G., *Potential of LightCycler technology for quantification of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia* 14, 316323 (2000)
12. Egholm M., Buchardt O., Christensen L., Behrens C., Freier S.M., Driver D.A., Berg R.H., Kim S.K., Norden B. and Nielsen P.E. *PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. Nature* 365, 566568 (1993)
13. Gibson U.E.M., Heid C.A. and Williams P.M. *A novel method for real time quantitative RT-PCR. Genome Res.* 6, 9951001 (1996)
14. Gyllensten U.B. and Erlich H.A. *Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 76527656 (1988)
15. Hein I., Lehner A., Rieck P., Klein K., Brandl E. and Wagner M. *Comparison of different approaches to quantify Staphylococcus aureus cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. Appl. Environment. Microbiol.* 67, 31223126 (2001)
16. Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S. and Griffith R. *Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology* 10, 413417 (1992)
17. Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., and Watson R. *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology* 11: 10261030. (1993)
18. Holland P.M., Abramson R.D., Watson R. and Gelfand D.H. *Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of Thermus aquaticus. Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 72767280 (1991)
19. Horn T., Chang C.A. and Urdea M.S. *Chemical synthesis and characterization of branched oligodeoxyribonucleotides (bDNA) for use as signal amplifiers in nucleic acid quantification assays. Nucleic Acids Res.* 25, 48424849 (1997)
20. Isacson J., Cao H., Ohlsson L., Nordgren S., Svanvik N., Westman G., Kubista M., Sjöback R. and Sehlstedt U. *Rapid and specific detection of PCR products using light-up probes. Mol. Cell. Probes* 14, 321328 (2000)
21. Ishiguro T., Saitoh J., Yawata H., Yamagishi H., Iwasaki S. and Mitoma Y. *Homogeneous quantitative assay of hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalator. Anal. Biochem.* 229, 207213 (1995)
22. Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A. et al. *The Real-Time Polymerase Chain Reaction. Molecular Aspects of Medicine* 27, 95-125 (2006)
23. Kurata S., Kanagawa T., Yamada K., Torimura M., Yokomaku T., Kamagata Y. and Kurane R. *Fluorescent quenching-based quantitative detection of specific DNA/RNA using a BODIPY^{FL}-labeled probe or primer. Nucleic Acids Res.* 29, e34. (2001)
24. Kutyavin I.V., Afonina I.A., Mills A., Gorn V.V., Lukhtanov E.A., Belousov E.S., Singer M.J., Walburger D.K., Likhov S.G., Gall A.A. et al. *3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. Nucleic Acids Res.* 28, 655661 (2000)
25. Landt O. In Meuer S., Wittwer C. and Nakagawara K. *Rapid Cycle Real-time PCR: Methods and Applications.* Springer Verlag, Germany, 3541 (2001)
26. Liss B. *Improved quantitative real-time RT-PCR for expression profiling of individual cells. Nucleic Acids Res.* 30 (17), e89 (2002)
27. Mackay I.M. *Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin Microbiol Infect* 10: 190212 (2004)
28. Mackay I.M., Arden K.E., and Nitsche A. *Real-time PCR in virology. Nucleic Acids Res* 30: 12921305 (2002)
29. McKie A., Samuel D., Cohen B. and Saunders N.A. *A quantitative immuno-PCR assay for the detection of mumps-specific IgG. Journal of Immunological Methods* 270, 135-141 (2002)
30. Morrison T.M., Weis J.J. and Wittwer C.T. *Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR green I monitoring during amplification. Biotechniques* 24, 954962 (1998)
31. Mullis K.B. *The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci. Am.* 262, 5661 (1990)
32. Mullis K.B. and Faloona F.A. *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol.* 155, 335350 (1987)
33. Nallis H., Coenye T., Van Nieuwerburgh F., Deforce D., Nelis H.J. *Development and evaluation of different normalization strategies for gene expression studies in Candida albicans biofilms by real-time PCR. BMC Mol Biol.* 7, 25 (2006)
34. Nazarenko I.A., Bhatnagar S.K. and Hohman R.J. *A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. Nucleic Acids Res.* 25, 25162521 (1997)
35. Nielsen P.E., Egholm M., Berg R.H. and Buchardt O. *Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. Science* 254, 14971500 (1991)
36. Nitsche A., Steuer N., Schmidt C.A., Landt O., Ellerbrok H., Pauli G. and Siegt W. *Detection of human cytomegalovirus DNA by real-time quantitative PCR. J. Clin. Microbiol.* 38, 27342737. (2000)
37. Nolan T., Hands R.E., Bustin S.A. *Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Nat. Protoc.* 1, 1559-1582 (2006)
38. Orlando C., Pinzani P. and Pazzagli M. *Developments in quantitative PCR. Clin. Chem. Lab. Med.* 36 255269 (1998)
39. Orum H., Nielsen P.E., Egholm M., Berg R.H., Buchardt O. and Stanley C. *Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping. Nucleic Acids Res.* 21, 53325336 (1993)
40. Pfaffl M.W. *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res.* 29: E45 (2001)
41. Powledge T.M. *The polymerase chain reaction. Adv Physiol Educ* 28: 4450 (2004)
42. Reischl U., Wittwer C.T., and Cockerill F. *Rapid Cycle Real-time PCR: Methods and Applications; Microbiology and Food Analysis.* New York: Springer-Verlag (2002)
43. Reynisson E., Josefsen M.H., Krause M. and Hoorfar J. *Evaluation of probe chemistries and platforms to improve the detection limit of real-time PCR. J. Microbiol. Meth.* 66, 206-216 (2006)
44. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. and Arnheim N. *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science* 230, 13501354 (1985)
45. Stryer L. and Haugland R.P. *Energy transfer: a spectroscopic ruler. Proc. Natl Acad. Sci. USA* 58, 719726 (1967)
46. Svanvik N., Sehlstedt U., Sjöback R. and Kubista M. *Detection of PCR products in real time using light-up probes. Anal. Biochem.* 287, 179182 (2000)
47. Svanvik N., Westman G., Wang D., and Kubista M. *Light-up probes: thiazole orange-conjugated peptide nucleic acid for detection of target nucleic acid in homogenous solution. Anal Biochem* 281, 2635 (2001)
48. Tan B.H., Lim E.A., Liaw J.C., Seah S.G., Yap E.P. *Diagnostic value of real-time capillary thermal cycler in virus detection. Expert Rev. Mol. Diagnost.* 4, (2), 219-230 (2004)
49. Thelwell N., Millington S., Solinas A., Booth J. and Brown T. *Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. Nucleic Acids Res.* 28, 37523761 (2000)
50. Todd A.V., Fuery C.J., Impey H.L., Applegate T.L. and Haughton M.A. *DzyNAPCR: use of DNAses to detect and quantify nucleic acid sequences in a real-time fluorescent format. Clin. Chem.* 46, 625630 (2000)
51. Tseng S.Y., Macool D., Elliott V., Tice G., Jackson R., Barbour M. and Amorese D. *An homogeneous fluorescence polymerase chain reaction assay to identify Salmonella. Anal. Biochem.* 245, 207212 (1997)
52. Tyagi S., Bratu D.P. and Kramer F.R. *Multicolor molecular beacons for allele discrimination. Nat. Biotechnol.* 16, 4953 (1998)
53. Tyagi S. and Kramer F.R. *Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. Nat. Biotechnol.* 14, 303308 (1996)
54. Tyagi S., Marras S.A.E. and Kramer F.R. *Wavelength-shifting molecular beacons. Nat. Biotechnol.* 18, 11911196 (2000)
55. Valasek M.A. and Repa J.J. *The power of real-time PCR. Advan Physiol Educ.* 29, 151-159 (2005)
56. Whalley S.A., Brown D., Gee Teo C., Dusheiko G.M., and Saunders N.A. *Monitoring the Emergence of Hepatitis B Virus Polymerase Gene Variants during Lamivudine Therapy Using the LightCycler. J Clin. Microbiol.* 39, 1456-1459 (2001)
57. Whitcombe D., Theaker J., Guy S.P., Brown T. and Little S. *Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. Nat. Biotechnol.* 17, 804807 (1999)
58. Wilhelm J., Pingoud A. and Hahn M. *Comparison between Taq DNA polymerase and its Stoffel fragment for quantitative real-time PCR with hybridization probes. Biotechniques* 30, 10521062 (2001)
59. Wittwer C.T., Fillmore G.C. and Garling D.J. *Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. Anal. Biochem.* 186, 328331 (1990)
60. Wittwer C.T., Herrmann M.G., Moss A.A., and Rasmussen R.P. *Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. Biotechniques* 22, 130138 (1997)
61. Wittwer C.T., Ririe K.M., Andrew R.V., David D.A., Gundry R.A. and Balis U.J. *The LightCyclerTM: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. Biotechniques* 22, 176181 (1997)

A P E L

DO P.T. DIAGNOSTÓW LABORATORYJNYCH KORESPONDUJĄCYCH Z BIUREM KIDL.

Przypominamy wszystkim Państwu, że kierowane do Izby pisma, wnioski, prośby itp., oprócz nazwiska i adresu do korespondencji powinny zawierać nr wpisu na listę diagnostów laboratoryjnych (wzgl. nr PESEL)..
Dołączane natomiast do tej korespondencji kserokopie ważnych dokumentów, **muszą być potwierdzone za zgodność z oryginałem.**
Potwierdzenie takie można uzyskać w zakładzie pracy (komórki kadrowe),
u danego Przedstawiciela Wojewódzkiego KRDL (lista przedstawicieli dostępna w Internecie w zakładce KRDL Przedstawiciele KRDL na woj.) lub u notariusza. **Potwierdzenie zgodności kopii z oryginałem musi być zaopatrzone w pieczęć instytucji, datę i nazwisko osoby aprobującej.**
Przygotowywana w ten sposób korespondencja i przesyłana na adres biura KIDL ułatwi załatwianie Państwa spraw i potrzeb oraz przyspieszy udzielenie odpowiedzi w przedmiotowych problemach.

A P E L DO P.T. DIAGNOSTÓW LABORATORYJNYCH

Mając na uwadze doniosłość wykonywanego przez nas zawodu diagnosty laboratoryjnego – zawodu zaufania publicznego - przypominamy niniejszym wszystkim Koleżankom i Kolegom PT Diagnostom Laboratoryjnym, że na członkach Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych spoczywa obowiązek odpowiedzialności za własny samorząd zawodowy, a zatem odpowiedzialni też jesteśmy za kształtowanie naszej nienaganej postawy. Kwestia ta wpływa także z zasad ogólnych przedstawionych w Kodeksie Etyki Diagnosty Laboratoryjnego, który został uchwalony przez Nadzwyczajny Krajowy Zjazd Diagnostów Laboratoryjnych 13 stycznia 2006 roku.

Jednym z podstawowych obowiązków określonych Statutem KIDL (*vide*: III Rozdział: „Członkowie Izby, ich prawa i obowiązki”) jest systematyczne regulowanie składek, których – nie zmieniana od prawie 5 lat - wysokość 15.00 zł* miesięcznie została ustalona przez Krajową Radę Diagnostów Laboratoryjnych uchwałą nr 2/2003 z dnia 13 stycznia 2003 roku. Pamiętać więc należy, że jest to zatem obligatoryjna opłata za członkostwo w Krajowej Izbie Diagnostów Laboratoryjnych, do której każdy z nas wstąpił na podstawie własnoręcznie podpisanego wniosku o wpis na listę diagnostów laboratoryjnych oraz otrzymał dokument „Prawo Wykonywania Zawodu Diagnosty Laboratoryjnego” („PWZDL”).

PO RAZ KOLEJNY PRZYPOMINAMY WIĘC PT DIAGNOSTOM LABORATORYJNYM:

T Y L K O

O S O B Y P O S I A D A J Ą C E D O K U M E N T „P W Z D L ” M A J Ą U S T A W O W E U P R A W N I E N I A D O W Y K O N Y W A N I A N A S Z E G O Z A W O D U .

A P E L U J E M . Y

do tych wszystkich Koleżanek i Kolegów, którzy wykonują czynności diagnostyki laboratoryjnej i dotąd nie dysponują dokumentem „PWZDL”, że postępowanie takie jest naruszeniem zasad etyki zawodowej oraz jest niezgodne z obowiązującym prawem [*vide*: Rozdział 8 pt: „Odpowiedzialność karna”, art. 71 ustawy z dnia 27 lipca 2001 r. o diagnostyce laboratoryjnej (tekst jednolity.: Dz. U. 04. 144. 1529 z późn. zm.)].

A P E L U J E M Y

o systematyczne regulowanie swoich zobowiązań finansowych względem Izby i wnoszenie obligatoryjnych opłat związanych z członkostwem w KIDL. Tylko taka postawa diagnostów laboratoryjnych będzie gwarantem sprawnego działania naszego samorządu zawodowego

Prezydium
Krajowej Rady
Diagnostów Laboratoryjnych
Warszawa, 30 listopada 2007 r.

* od dn. 1 kwietnia 2008 r. wysokość składki członkowskiej wynosi 20.00 PLN zgodnie z uchwałą Nr 48/II/2008 KRDL z dnia 29 lutego 2008 r. (05 marca 2008 r.)

DIAGNOSTYKA GRZYBÓW

Część I. Diagnostyka grzybów drożdżopodobnych

Anna B. Macura

Zakład Mykologii Katedry Mikrobiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Grzyby drożdżopodobne mogą stanowić miejscową florę skóry lub błon śluzowych, mogą również być przyczyną grzybic. Po wykryciu obecności grzybów, odróżnienie tych dwóch sytuacji winno być wspólnym dziełem lekarza leczącego i diagnosty laboratoryjnego. Interpretacja wyniku badania mykologicznego może zostać poważnie zniekształcona przez błędy przedlaboratoryjne. Mogą one powstać przez nieodpowiednie przygotowanie pacjenta do pobrania materiału, błędną technikę pobierania oraz niewłaściwe warunki transportu materiału do laboratorium.

1. Pobieranie materiału do badań mykologicznych

Jest to jedna z ważniejszych części diagnostyki mykologicznej. Najczęstszym błędem na tym etapie jest pobranie materiału już po rozpoczęciu leczenia; zazwyczaj w następstwie niepowodzenia leczenia empirycznego. Aby wynik badania był wiarygodny, musi zostać zachowany okres karencji po odstawieniu leku systemowego lub miejscowego. Zazwyczaj czas nie może być krótszy, niż 2 tygodnie po zakończeniu leczenia miejscowego i miesiąc po przerwaniu leczenia systemowego. Idealem rozwiązaniem jest pobranie materiału przed rozpoczęciem leczenia, jeżeli wywiad i obraz kliniczny sugerują grzybicę. Materiał do badań mykologicznych jest bardzo zróżnicowany, korzystają z tych badań wszystkie specjalności medyczne. O wyborze materiału decyduje lokalizacja zakażenia. Materiały powinny być pobierane do jałowych pojemników, odpowiednich dla typu materiału i jak najszybciej dostarczone do laboratorium.

W grzybicach uogólnionych pobierana jest krew przy łóżku chorego, bezpośrednio do płynnego podłoża Sabourauda oraz punktaty pobrane drogą biopsji z narządów podejrzanych o infekcję grzybiczą. W grzybicach narządowych do wykonania testów serologicznych są pobierane: surowica, płyn mózgowo-rdzeniowy oraz inne płyny ustrojowe. Płyn mózgowo-rdzeniowy, w objętości 3,5 ml, jest pobierany przez nakłucie lędźwiowe, następnie zagęszczany przez wirowanie; osad jest przeznaczony do posiewów i przygotowania preparatów, natomiast supernatant może być wykorzystany do wykonania testów serologicznych. W przypadku podejrzenia grzybic układu oddechowego pobiera się: płwocinę, popłuczyny oskrzelowe, wymazy z krtani i nosogardzieli. Z przewodu pokarmowego materiałem jest kał, treść żołądkowo-jelitowa, żółć. U zdrowych osób w próbkach kału mogą występować grzyby. Materiałem z układu moczopłciowego może być mocz, wymazy z cewki moczowej, pochwy, szyjki macicy, sromu oraz żołądki i spod napletka. W przypadku podejrzenia grzybic skóry i jej przydatków pobiera się ropę, wymazy, łuski skórne, opilki paznokciowe i włosy z miejsc zmienionych chorobowo. W schorzeniach laryngologicznych materiał stanowią: wymazy z ucha, wydzielina z zatok szczękowych, wymaz z języka, podniebienia itp. W podejrzeniu grzybic oka materiałem jest wymaz z worka spojówkowego, zeszkrobiny z owrozczenia rogówki (6, 8, 9).

2. Izolacja i identyfikacja grzybów

Z grzybów drożdżopodobnych najważniejszą rolę w zakażeniach odgrywa rodzaj *Candida*, a szczególnie gatunek *C. albicans*. Istnieje kilkanaście innych gatunków potencjalnie patogennych, ostatnio odgrywających coraz większą rolę jako czynniki etiologiczne kandydozy, szczególnie u osób „z grup ryzyka”. Grzyby drożdżopodobne najczęściej spotykane w materiałach klinicznych przedstawiono w tabeli I.

Pierwszym etapem badania jest przygotowanie preparatów bezpośrednich z materiału klinicznego. Preparat taki pozwala na wykazanie obecności grzybów, orientacyjną ocenę ich ilości oraz rodzaju form morfologicznych. Istnieje kilka rodzajów preparatów bezpośrednich: 1) barwiony metodą Grama, 2) wilgotny przygotowany w płynie fizjologicznym, 3) rozjaśniony, przy użyciu 10-20% KOH lub dwumetylosulfotlenku (DMSO), 4) barwiony metodą negatywno-pozytywną (przygotowany z osadu płynu

mózgowo-rdzeniowego, w przypadku podejrzenia o kryptokokozę), 5) preparat pod przeźroczystym przylepcem w przypadku podejrzenia zakażenia grzybami z rodzaju *Malassezia* 6) preparat barwiony metodą Schaeffera-Fultona pozwalający różnicować *Saccharomyces cerevisiae*. W preparatach bezpośrednich w przypadku grzybów drożdżopodobnych można wykazać różne pod względem wielkości i kształtu blastosporę oraz elementy pseudogrybni, a dla grzybów z rodzaju *Geotrichum* charakterystyczne artrospory (Ryc. 1). Do oceny preparatów używany jest przede wszystkim mikroskop świetlny o powiększeniu od 100 do 1500, najczęściej stosuje się powiększenie 100 i 400 (5, 9).

Najważniejszym etapem badania mykologicznego jest hodowla, pozwalająca na wyizolowanie szczepu grzyba z materiału klinicznego. Podstawowym podłożem stosowanym w mykologii lekarskiej do hodowli grzybów jest podłoże Sabourauda w postaci bulionu lub podłoża stałego o składzie: 1% peptonu, 2-4% glukozy oraz w przypadku podłoża stałego 1,8% agaru. Często stosuje się modyfikację podłoża Sabourauda przez dodanie antybiotyku przeciwbakteryjnego (chloramfenikol, gentamycyna). Hodowle grzybów z rodzaju *Malassezia* prowadzi się na podłożu agarowym Sabourauda z dodatkiem oliwy z oliwek lub innych lipidów (związki Tweenu). Hodowlę inkubuje się w temperaturze 37°C i 27°C. Założone hodowle kontroluje się codziennie przez 7-10 dni. Wzrost grzybów na podłożu przy prawidłowo wykonanych posiewach stanowi dowód obecności grzybów w badanym materiale klinicznym. Większość grzybów drożdżopodobnych wyrasta na podłożu w postaci kolonii gładkich, białych lub kremowych, kolonie szorstkie tworzy gatunek *C. krusei*, śluzowy jest charakterystyczny dla *Cryptococcus neoformans*, wzrost skórzasty dla rodzaju *Geotrichum*, zabarwienie kolonii w odcieniach czerwieni dla grzybów z rodzaju *Rhodotorula*, natomiast czarny dla *Aureobasidium (Pullularia)* (6, 8, 9).

Z hodowli grzybów na podłożach sporządza się preparaty barwione metodą Grama celem oceny mikroskopowej komórek grzybów (blastosporów, artrosporów) w mikroskopie świetlnym. Ponieważ najczęściej z materiałów klinicznych izolowany jest gatunek *C. albicans*, można wykonać próbę filamentacji (test kiełkowania, *germ-tube test*), który daje wynik dodatni tylko dla *C. albicans*. Test ten polega na wytwarzaniu charakterystycznych wypustek po 3-6 godzinach inkubacji grzybów w surowicy. Następnym prostym badaniem jest ocena morfologii grzybów na podłożu zubożonym. Do badania używa się różnych podłoży (PCB, ryżowe, kukurydziane itp.) na których wykazuje się obecność chlamydosporów (grubościenne, dużych komórek przetrwalnikowych), co jest cechą tylko gatunku *C. albicans*. Ponadto na tych podłożach różnicuje się grzyby z rodzaju *Candida* na tworzące pseudogrybnie i nie posiadające tej cechy. Te dwie wymienione próby pozwalają na odróżnienie gatunku *C. albicans* dominującego w materiałach klinicznych (9).

Identyfikacja grzybów drożdżopodobnych oparta jest na podstawie prób biochemicznych, w których wykorzystuje się zdolności grzybów drożdżopodobnych do fermentacji związków węglowodanowych (glukoza, laktoza, maltoza, sacharoza, galaktoza, rafinoza itp.) oraz asymilacji związków węglowodanowych (auksanogram) i azotowych. Na podstawie prób biochemicznych opracowano komercyjne testy identyfikacyjne dla grzybów drożdżopodobnych (API 20 C, API 20 C AUX, ID 32 C) pozwalające w czasie 48-72 godz. zidentyfikować najczęściej wykrywane u ludzi gatunki grzybów drożdżopodobnych. Do prób biochemicznych zalicza się również próbę na ureazę oceniającą zdolność rozszczepiania mocznika oraz ocenę wrażliwości grzybów na aktidion. Istnieje również szereg komercyjnych podłoży np. chromogenne, pozwalających na szybkie odróżnienie niektórych gatunków lub rodzajów grzybów (1, 6, 9).

3. Badanie ilościowe

W materiałach klinicznych, takich jak płwocina, mocz oraz kał w zakażeniach grzybami drożdżopodobnymi powinny być wykonywane badania ilościowe. Ocena ilościowa polega na określeniu liczby komórek grzybów, wyrażonej liczbą kolonii (CFU = *colony forming units*) w 1 ml lub 1 g badanej próbki. Błony śluzowe często są miejscem bytowania grzybów drożdżopodobnych; grzyby te również występują na stałe w przewodzie pokarmowym człowieka, gdzie są pod kontrolą endogennej flory bakteryjnej.

Człowieka, gdzie są pod kontrolą endogennej flory bakteryjnej. Ma to znaczenie przy zastosowaniu antybiotykoterapii, kiedy następuje szybki wzrost grzybów w przewodzie pokarmowym, co uwidacznia się obfitą ich izolacją z kału. Diagnostyczna procedura badania ilościowego polega na enzymatycznej i mechanicznej homogenizacji materiałów. Próbkę rozcieńczoną i nierozcieńczoną odpowiednio przygotowaną inkubuje się w określonych warunkach oraz ocenia ilościowo grzyby w zakresie od 10^2 do $\geq 10^6$ w 1 ml lub 1 g. Obecność grzybów w stężeniu $\geq 10^6$ komórek w jednostce objętości materiału ($\geq 10^6$ CFU/ml) jest znamienna patognomicznie. Przy liczbie komórek grzybów 10^4 - 10^5 w 1 ml płwociny lub 1 g kału wymagane jest kontrolne badanie, natomiast nieznamienna patognomicznie jest obecność 10^3 kolonii grzybów w 1 ml lub 1 g. Dla moczu przy prawidłowo pobranej próbce obecność 10^2 CFU/ml jest nieznamienna patognomicznie, przy ilości 10^3 CFU/ml należy wykonać badanie kontrolne, natomiast liczba kolonii grzybów CFU $\geq 10^4$ może wskazywać na infekcję dróg moczowych lub grzybiczą posocznice (3). W wielu laboratoriach metodę tę stosuje się w formie półilościowej oznaczając posiew z materiału klinicznego. Pobiera się 1 oczko czy badanego materiału klinicznego na podłoże. Wzrost ocenia się: + pojedyncze kolonie, ++ kilkanaście kolonii, +++ kilkadziesiąt kolonii oraz ++++ wzrost zlewny. Nawet taka półilościowa metoda informuje klinicystę o obfitości grzybów i ma szczególne znaczenie w leczeniu pacjentów z grup ryzyka.

4. Badanie lekooporności

Do oceny wrażliwości grzybów na antymikotyki stosuje się szereg metod bardziej lub mniej zalecanych, które dzielą się na ilościowe, półilościowe i jakościowe. Metody ilościowe określają najniższe stężenie związku chemicznego hamującego wzrost badanego szczepu grzybów (MIC - Minimal Inhibitory Concentration w mg/l) lub najmniejsze stężenie grzybobójcze (MFC - Minimal Fungicidal Concentration w mg/l). Technika wykonania tych oznaczeń polega na rozcieńczeniu (inkorporowaniu) badanego leku w podłożu hodowlanym płynnym lub stałym. Stosując metody rozcieńczeniowe można określać stężenie chemioterapeutyku powodujące zahamowanie 50% (IC_{50}) lub 90-99,9% komórek grzybów w hodowli płynnej (IC_{90} , IC_{95} , $IC_{99,9}$). W metodach półilościowych określa się stopień wrażliwości grzybów drożdżopodobnych w odniesieniu do wybranych stężeń tzw. krytycznych. Istnieje wiele takich testów komercyjnych jak Mikrotest ATB Fungus, Fungitest, E-test itp. Wynik odczytywany jest wizualnie lub automatycznie na czytniku, kwalifikując grzyby na wrażliwe, średnio wrażliwe lub odporne na określony lek. Oprócz tych metod w rutynowej diagnostyce stosowana jest metoda dyfuzyjno-krażkowa, która oparta jest na porównawczej ocenie wartości MIC oznaczanych metodą rozcieńczeniową z wielkościami stref zahamowania wzrostu (9).

Metody referencyjne zalecane przez instytucje europejską i amerykańską są dostępne pod adresami: 1) Instytucja europejska: **EUCAST** - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (www.escmid.org/sites/index.aspx/) oraz 2) Instytucja amerykańska **CLSI** - Clinical and Laboratory Standards Institute (www.clsi.org/). Dostępne są następujące dokumenty:

M27-A - Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts

M38-A - Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi

M44-A - Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing

5. Diagnostyka serologiczna

Metody serologiczne stosowane w diagnostyce grzybic wywołanych przez grzyby drożdżopodobne obejmują wykrywanie obecności antygenów grzybów, swoistych przeciwciał przeciwgrzybiczych oraz kompleksów antygen-przeciwciała w surowicy krwi i innych płynach ustrojowych chorego. Spośród grzybic ogólnoustrojowych wywołanych przez grzyby drożdżopodobne odczyny serologiczne stosuje się w kandydozie i kryptokokozie. Odczyny te powinny być wykonywane rutynowo i równoległe z badaniami

mykologicznymi próbek materiałów klinicznych. Technikami serologicznymi służącymi do wykrywania przeciwciał przeciwgrzybiczych są odczyny precypitacyjne (podwójna dyfuzja w żelu, immunoelektroforeza przeciwprądowa), aglutynacyjne (hemaglutynacja bierna), fluorescencyjne (immunofluorescencja pośrednia), immunoenzymatyczne (ELISA, EIA), a także odczyn wiązania dopełniacza. Badania serologiczne wykrywające przeciwciała przeciwgrzybicze mają istotne znaczenie w diagnozowaniu chorych z prawidłowo funkcjonującym układem odpornościowym. W przypadku upośledzenia układu immunologicznego może być zaburzone wytwarzanie przeciwciał i dlatego powinny być wykonane badania serologiczne wykrywające antygeny i metabolity grzybicze obecne w płynach ustrojowych. Technikami wykrywającymi antygeny grzybicze są metody lateksowe, radioimmunologiczne i immunoenzymatyczne. Wśród antygenów wykrywanych w testach serologicznych w kandydozie można wymienić: mannan, mannoproteinę, glukan, białka szoku cieplnego (hsp90), enolazę, kwaśną proteazę oraz inne antygeny cytoplazmatyczne jak również antygeny ściany komórkowej. Bardzo istotne znaczenie ma czułość poszczególnych metod oraz swoistość, dlatego wykonuje się z tej samej surowicy kilka różnych testów serologicznych. U większości zdrowych osób występują przeciwciała anti-*Candida*, ponieważ grzyby te stanowią składnik fizjologicznej flory przewodu pokarmowego. Dynamika narastania przeciwciał sugeruje rozwój narządowej kandydozy. Natomiast stwierdzenie w surowicy lub płynach ustrojowych antygenów *Candida* jest istotne w rozpoznawaniu kandydozy. W diagnostyce serologicznej kryptokokozy wykazuje się przeciwciała oraz antygeny w płynie mózgowo-rdzeniowym i w surowicy. Najczęściej używanym testem jest test lateksowy, w którym wykrywa się antygen polisacharydowy otoczki *Cryptococcus neoformans*. Test ten pozwala na rozpoznanie kryptokokozy już we wczesnym stadium choroby (2, 8, 10, 12).

6. Diagnostyka molekularna

W ostatnich latach obserwuje się ogromny wzrost wiedzy z zakresu genomiki grzybów. Ciągłe odkrywane są nowe markery genetyczne przydatne do identyfikacji gatunków i typowania szczepów. W przypadku diagnostyki molekularnej możliwa jest identyfikacja patogenu bezpośrednio z materiału klinicznego, nie jest konieczne zakładanie czystych hodowli grzybów, przez co czas oczekiwania na wynik ulega skróceniu.

Istnieje bogata literatura dotycząca diagnostyki molekularnej. Metody wykorzystywane w diagnostyce grzybów w większości opierają się na reakcji łańcuchowej polimerazy PCR (*polymerase chain reaction*). Zasada tej metody i sposób postępowania przekraczają ramy tego artykułu. Zastosowanie PCR w diagnostyce grzybów chorobotwórczych opisano w wielu specjalistycznych publikacjach naukowych (4, 7, 11).

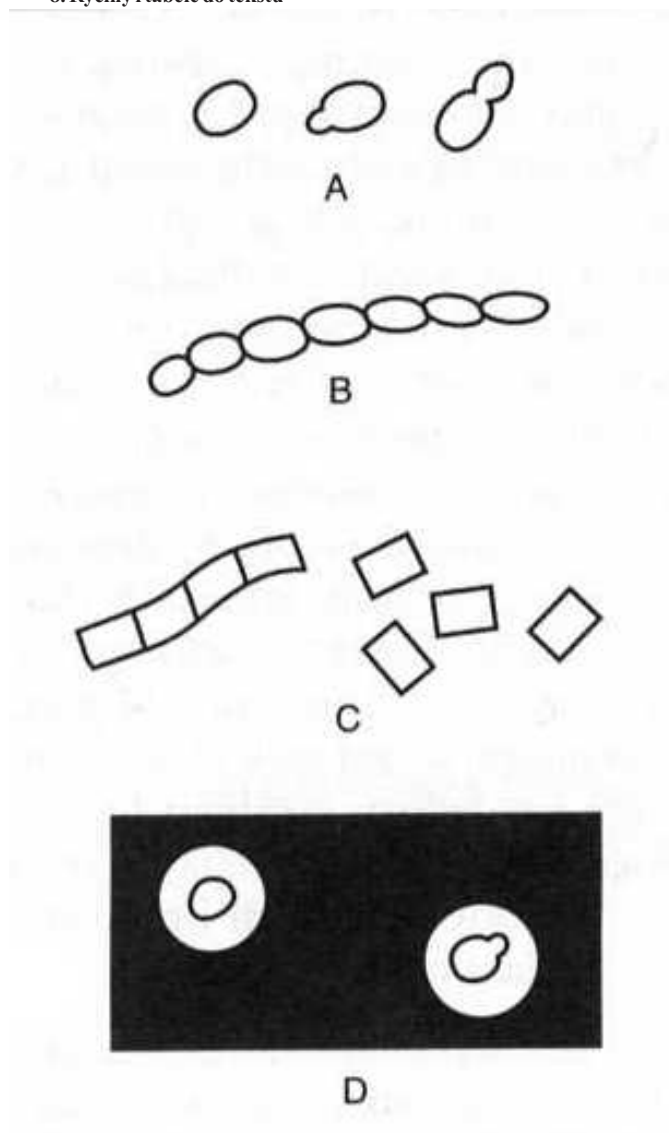
W Polsce diagnostyka molekularna grzybic stosowana jest w niewielu pracowniach diagnostyki mikologicznej z powodu wysokich kosztów badania i braku standaryzacji metod. Metody biologii molekularnej są coraz częściej wykorzystywane w placówkach naukowych.

7. Piśmiennictwo

1. Białasiewicz D.: Wstępna ocena przydatności testu Api Candida do identyfikacji grzybów drożdżopodobnych. Mikol. Lek. 1998, 5, 83-85.
2. Bochenek M., Rup E., Macura A. B.: Porównanie wybranych odczynów serologicznych stosowanych w diagnostyce inwazyjnej kandydozy. Mikol. Lek., 2007, 14, 179-183
3. Budak A.: Badanie ilościowe grzybów w materiałach klinicznych. [w] Zarys Mikologii Lekarskiej [red] E. Baran. VOLUMED, Wrocław, 1998. Str. 573-574.
4. Dobrowolska A., Bojarski Ł., Stączek P.: Metody i techniki molekularne stosowane w diagnostyce i epidemiologii zakażeń grzybami chorobotwórczymi. Wiad. Parazytol. 2002, 48, 241-255.
5. Dynowska M., Rosłem M., Biedunkiewicz-Ziomek A.: Wartość diagnostyczna preparatów bezpośrednich w rozpoznawaniu zakażeń grzybiczych. Mikol. Lek. 2004, 11, 251-257.

6. Hoog G. S. de, Guarro J, Gené J, Figueras M.J.: Atlas of clinical fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 2000.
7. Macura A.B.: Diagnostyka molekularna grzybic. [w] Zarys Mikologii Lekarskiej [red] E. Baran. VOLUMED, Wrocław, 1998. Str. 583-587.
8. Ochman E.: Diagnostyka mikrobiologiczna i serologiczna układowych zakażeń grzybiczych [red] D. Dzierżanowska. -medica press, Bielsko-Biała, 2006, 56-70.
9. Pawlik B., Macura A.B.: Diagnostyka laboratoryjna w mikologii. [w] Zarys Mikologii Lekarskiej [red] E. Baran. VOLUMED, Wrocław, 1998. Str.541-572.
10. Quindos G., Moragues M. D., Ponton J.: The role of antigen and antibody testing in the diagnosis of invasive candidiasis. Mikol. Lek. 2004, 11 145-151.
11. Robak M., Baranowska K., Barszczewski W., Wojtatowicz M.: RAPD jako metoda różnicowania i identyfikacji drożdży. Biotechnologia. 2005, 4, 142-155.
12. Stradomska T. J.: Wykrywanie metabolitów w diagnostyce grzybic układowych. [w] Zakażenia grzybicze wybrane zagadnienia [red] D. Dzierżanowska. -medica press, Bielsko-Biała, 2006, Str. 71-78.

8. Ryciny i tabele do tekstu



Ryc 1. Spory grzybów drożdżopodobnych.
 A pączkujące blastospory *Candida albicans*
 B pseudogryźnia grzybów drożdżopodobnych
 C artrospory *Geotrichum* spp. (powstające przez fragmentację nitek grzyźni)
 D blastospory okrągłe, pączkujące, z otoczką mukopolisacharydową *Cryptococcus neoformans* (barwienie pozytywno-negatywne)

Tabela 1. Grzyby drożdżopodobne najczęściej spotykane w materiałach klinicznych

Rodzaj	Gatunek
Grzyby drożdżopodobne	
<i>Candida</i> (tworzą pseudogryźnie)	<i>albicans</i> + <i>stellatoidea</i> <i>krusei</i> <i>tropicalis</i> <i>kefyr</i> (<i>pseudotropicalis</i>) <i>parapsilosis</i> <i>guilliermondii</i> <i>pulcherrima</i> <i>zeylanoides</i> <i>lusitanae</i> <i>catenulata</i>
<i>Candida</i> (dawniej <i>Torulopsis</i>) (nie tworzą pseudogryźni)	<i>glabrata</i> <i>famata</i> <i>inconspicua</i> <i>dattilla</i>
<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
<i>Malassezia</i> (<i>Pityrosporum</i>)	kilka gatunków lipofilnych
<i>Trichosporon</i>	<i>cutaneum</i> (<i>beigelii</i>)
<i>Rhodotorula</i>	<i>mucilaginoso</i> <i>glutinis</i> <i>minuta</i>
Drożdże właściwe (workowce – Ascomycetes)	
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>
Niedoskonała forma (Endomycetes)	
<i>Geotrichum</i>	<i>candidum</i>

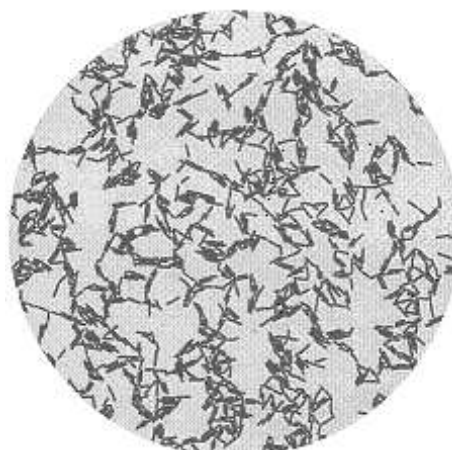
OCENA BIOCENOZY POCHWY, STOPNIE CZYSTOŚCI POCHWY.

A. Kasprzowicz, A. Białecka
 Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek im dr Jana Bobra w Krakowie

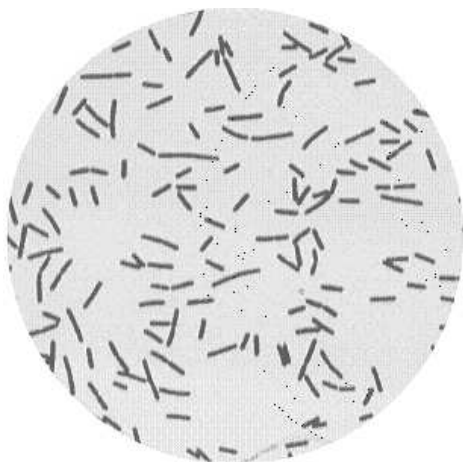
Ocena biocenozy pochwy, to ważne i jedno z częściej wykonywanych badań diagnostycznych. Jak wskazuje codzienna praktyka, często pod tym pojęciem zarówno przez lekarzy jak i pacjentów zamiennie używane są sformułowania: ocena stopnia czystości pochwy, biologia pochwy, badanie flory pochwy, rozmaz z pochwy itp.

Biocenoza pochwy to złożona populacja drobnoustrojów zasiedlająca nabłonek pochwy kobiety, ma charakter biofilmu. Skład gatunkowy (kompozycja), dynamika i struktura tego biofilmu ma podstawowe znaczenie dla zdrowia i czynności narządu rodno kobiety.

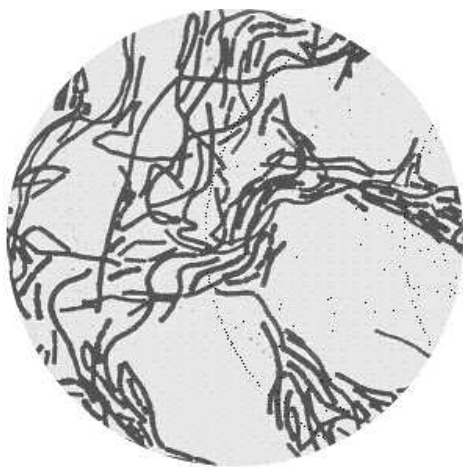
Środowisko pochwy stanowi samodzielną, stabilną biocenozę, w której najistotniejszym składnikiem są pałeczki kwasu mlekowego inaczej zwane pałeczkami Doderleina a właściwie grupa pałeczek *Lactobacillus* między innymi *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. rhamnosus*. Są to Gram dodatnie pałeczki występujące w wielu postaciach małe, średnie, olbrzymie. (Fot. 1, 2, 3) [1, 2, 3].



Fot. 1. Pałeczki *Lactobacillus* barwione metodą Grama i obserwowane pod mikroskopem przy powiększeniu 1500x. Forma krótka.



Fot. 2. Pałeczki *Lactobacillus* barwione metodą Grama i obserwowane pod mikroskopem przy powiększeniu 1500x. Forma średnia.



Fot. 3. Pałeczki *Lactobacillus* barwione metodą Grama i obserwowane pod mikroskopem przy powiększeniu 1500x. Forma olbrzymia.

Drobnoustroje te stanowią ochronę nabłonka pochwy przed inwazją innych drobnoustrojów zwłaszcza chorobotwórczych. Pałeczki kwasu mlekowego mają zdolności rozkładania glikogenu do kwasu mlekowego oraz produkują nadtlenek wodoru. Czynniki te uniemożliwiają kolonizację i namnażanie innych drobnoustrojów. A więc ilość i jakość (aktywność enzymatyczna) pałeczek kwasu mlekowego świadczy o stanie fizjologicznym pochwy. Obecność pałeczek kwasu mlekowego jest bardzo ważna dla utrzymania równowagi środowiska pochwy przez:

- utrzymywanie odpowiedniej kwasowości (niskie pH w granicach 3,5 - 4,2, uniemożliwia namnażanie się drobnoustrojów chorobotwórczych)
- produkowany przez pałeczki kwasu mlekowego nadtlenek wodoru (H_2O_2) uniemożliwia rozwój bakterii beztlenowych,
- pałeczki kwasu mlekowego przez swoją obecność blokują miejsca przylegania, adhezji do komórek nabłonkowych oraz stymulują układ odpornościowy.

Biocenoza pochwy to układ stabilny, jednak podlega ciągłym chociaż najczęściej niewielkim zmianom ilościowym, zarówno liczba pałeczek kwasu mlekowego ulega zmianie jak i bakterie pochodzące z przewodu pokarmowego lub kolonizujące ujście cewki, pojawiają się i przy prawidłowo funkcjonującej barierze ochronnej giną. Tak więc trwa ciągła rywalizacja o miejsce na błonie śluzowej pochwy i w stanie fizjologicznym występować mogą obok pałeczek kwasu mlekowego niewielkie ilości innych bakterii.

Spośród ponad 100 gatunków wykrytych w pochwie najczęściej spotykane drobnoustroje należą do rodzajów: *Staphylococcus*,

Corynebacterium, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Gardnerella*, *Ureaplasma*, *Mycoplasma*, *Propionibacterium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Mobiluncus*, *Veillonella*, *Clostridium* itd.

W sprzyjających okolicznościach może dojść do wystąpienia stanu niefizjologicznego (zapalnego), szczególnie jeżeli drobnoustroje te zasiedlą błonę śluzową pochwy i wyeliminują florę fizjologiczną. Na utrzymanie stanu fizjologicznego (prawidłowej biocenozy pochwy) mają wpływ różne czynniki min.:

- sytuacja hormonalna kobiety (pokiwanie, ciąża, cykl płciowy, przekwitanie)
- zabiegi chirurgiczne
- nieprzestrzeganie zasad higieny
- nawyki seksualne
- niekontrolowana antybiotykoterapia [1, 4]

Ocena biocenozy pochwy

Prawidłowa ocena biocenozy pochwy, stanu określającego aktualną sytuację w tym regionie, jest możliwa na podstawie oglądania obrazów treści pochwowej w preparatach barwionych metodą Grama i zakwalifikowania tego obrazu do odpowiedniego stopnia czystości pochwy [5, 6] np. wg Kuczyńskiej. Często stopnie te są mylone z grupą cytologiczną lub skalą Amsela czy Nugenta. Są też skrajne poglądy, niektórzy autorzy proponują porównywanie skal Nugenta czy Amsela ze stopniami Kuczyńskiej. Należy te pojęcia uporządkować i właściwie stosować [7, 8, 9].

- **stopnie czystości pochwy wg Kuczyńskiej** (wykonane starannie i odczytane przez doświadczonego mikrobiologa) mają na celu zobrazowanie aktualnego stanu biocenozy pochwy, określenie stanu fizjologicznego, stanu zapalnego, określenie proporcji pomiędzy grupami drobnoustrojów. Podstawowym kryterium oceny biocenozy wg Kuczyńskiej jest występowanie lub brak w treści pochwowej *Lactobacillus*

- **grupa cytologiczna wg Papanicolaou** (cytologia) wykonana przez cytologa określa stan morfologiczny złuszczonej komórki nabłonka. Ocena czy stan komórek jest prawidłowy czy nie. Pozwala ocenić stan zapalny bez sprecyzowania czynnika etiologicznego

- **kryteria Amsela** (oceny dokonuje lekarz) to rozpoznanie kliniczne bakteryjnej waginozy (BV). Kryteria Amsela opierają się na stwierdzeniu przynajmniej trzech z czterech objawów BV.

1. Szaro biała wydzielina
2. Obecność komórek „clue cells”
3. Kwasowość powyżej 4,5 pH
4. Rybi zapach (dodatni test aminowy)

- **Skala Nugenta** to rozpoznanie mikrobiologiczne BV. Ocena jest przeprowadzana na podstawie kryteriów mikrobiologicznych. W skali Nugenta ocena opiera się na oszacowaniu proporcjonalnego udziału poszczególnych rodzajów bakterii w preparacie i jego ocenie liczbowej (zapis w skali punktowej 0-10 punktów). Kryteria oceny są następujące: do 4 punktów stan prawidłowy, 4 - 6 punktów stan pośredni, powyżej 6 punktów świadczy o BV.

Tak więc nie można porównywać lub zastępować poszczególnych ocen, różnych metod klasyfikacji gdyż każda z nich ma inny cel, inne kryteria oceny nieprawidłowości. To krótkie zestawienie jednoznacznie wskazuje, że ocena biocenozy pochwy (stanu fizjologicznego czy zapalnego) jest najpełniej odzwierciedlona w stopniach czystości pochwy wg Kuczyńskiej. Natomiast dodanie pewnych elementów do stopni Kuczyńskiej i odnotowanie kilku dodatkowych etapów diagnostycznych takich jak pomiar pH treści pochwowej, wykonanie testu aminowego, odnotowanie obecności lub braku komórek „clue cells”, diagnostyka w kierunku *Trichomonas vaginalis* oraz opis morfologii drobnoustrojów może być przydatny do formułowania wyniku bardziej precyzyjnego

[10, 11]. Dodatkowo daje możliwość ukierunkowania dalszych badań i stwarza przesłanki co do dalszego postępowania diagnostycznego w danym konkretnym przypadku. Taką formę oceny biocenozy przedstawiono poniżej.

Zasady postępowania w badaniu biocenozy pochwy (zasady ogólne):

Pacjentka zgłaszająca się na badanie biocenozy pochwy powinna być poinformowana, że badanie takie aby było wiarygodne musi być wykonane pod pewnymi warunkami:

nie należy wykonywać badań w trakcie antybiotykoterapii lub zaraz po jej zakończeniu, 48h bez kontaktów seksualnych

Materiał (treść wydzieliny pochwowej pobrać w jałowym wzierniku, jałową szpatułką lub szpatułką z tylnego sklepienia pochwy) natychmiast po pobraniu należy opracować:

- wykonać starannie rozmaz na szkiełku podstawowym i zabarwić metodą Grama
- wykonać pomiar pH
- wykonać test aminowy (zapachowy)

Mikroskopowa ocena biocenozy pochwy

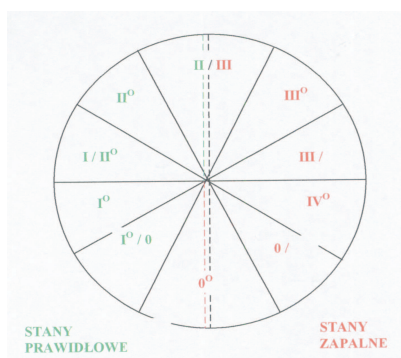
Prawidłowo (starannie) wykonany rozmaz i zabarwiony preparat metodą Grama należy oglądać pod mikroskopem (imersja). Jest on wskaźnikiem aktualnej sytuacji mikrobiologicznej w pochwie, i niekiedy przewyższa rutynowe posiewy treści pochwowej, zwłaszcza gdy nie jest możliwe natychmiastowe opracowanie, i materiał jest przechowywany na podłożach transportowych. Metoda Grama pozwala na uwidocznienie kształtu komórki, układów komórek względem siebie, rozróżnienie bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnych, ponadto pozwala uwidocznienie grzyby drożdżopodobne i ocenić pod względem ilościowym drobnoustroje i leukocyty. Obraz mikroskopowy oraz dodatkowe parametry (pH, test aminowy, obecność komórek „clue cells”) pozwalają zakwalifikować oceniany materiał do odpowiedniego stopnia czystości mikrobiologicznej pochwy, a także pozwala na wstępną interpretację kliniczną wskazując ewentualne czynniki etiologiczne [10]. Umożliwia również komentarz mikrobiologiczny, sugerując postępowanie diagnostyczne i terapeutyczne np. czy w konkretnym przypadku wystarczy podać preparat biologiczny uzupełniający florę fizjologiczną (stopień „0”), lub wykonać dodatkowe badania mikrobiologiczne np. w kierunku obecności *Chlamydia trachomatis* i/lub *Mycoplasma hominis* *Ureaplasma urealyticum*.

Niezbędnym dla wykonania prawidłowej biocenozy pochwy jest znajomość podziału stopni czystości pochwy wg Kuczyńskiej i doświadczenie w ocenie preparatów barwionych metodą Grama.

STOPNIE CZYSTOŚCI POCHWY wg K. KUCZYŃSKIEJ

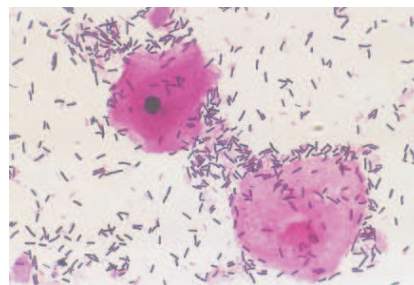
Podstawowym kryterium oceny biocenozy pochwy jest obecność lub brak pałeczek kwasu mlekowego oraz stosunek ilościowy innych drobnoustrojów i leukocytów. Podział obejmuje stopnie podstawowe 0°, I°, II°, III°, IV° oraz stopnie pośrednie 0/I, I/II, II/III, III/IV, 0/IV.

PODZIAŁ STOPNI CZYSTOŚCI POCHWY



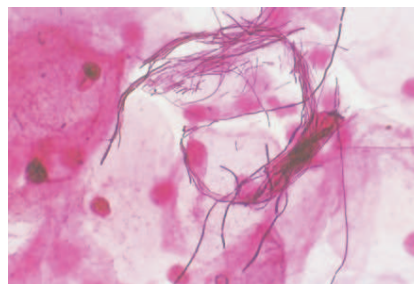
Stopnie czystości w stanach fizjologicznych i zapalnych pochwy (wg K. Kuczyńskiej).

STOPIEŃ CZYSTOŚCI I



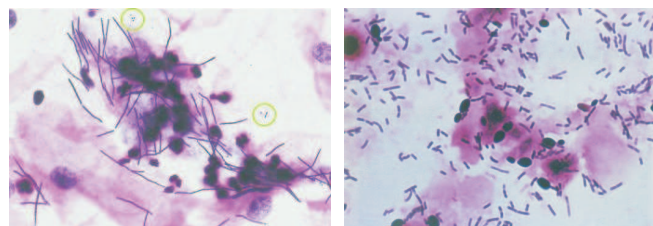
W obrazie mikroskopowym obecne są jedynie pałeczki kwasu mlekowego. Brak leukocytów i innych bakterii.

STOPIEŃ POŚREDNI I/II



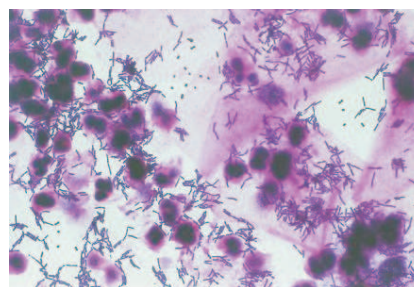
Obok prawidłowych pałeczek kwasu mlekowego pojawiają się pleomorficzne postacie tych drobnoustrojów i/lub pojedyncze leukocyty. Innych drobnoustrojów nie stwierdza się.

STOPIEŃ CZYSTOŚCI II

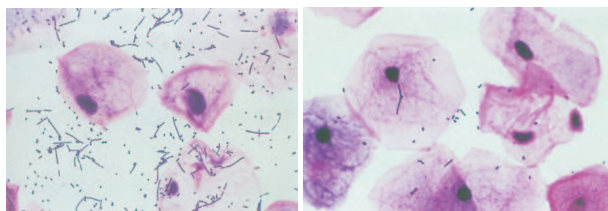


Wśród licznie występujących pałeczek kwasu mlekowego spostrzega się pojedyncze, różniące się zasadniczo od pałeczek kwasu mlekowego bakterie Gram ujemne i/lub Gram dodatnie. Leukocyty występują sporadycznie.

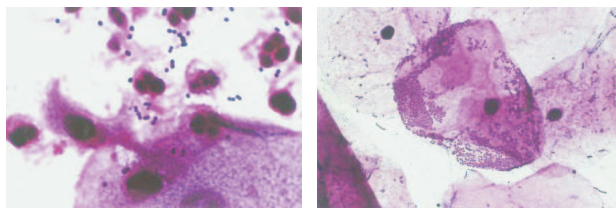
STOPIEŃ POŚREDNI II/III



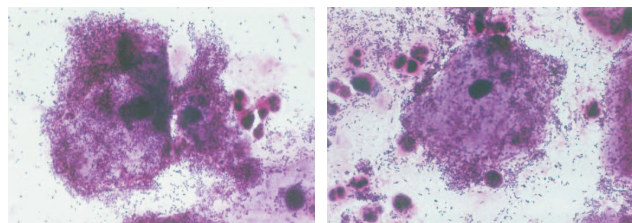
Obok dużej liczby pałeczek kwasu mlekowego pojawiają się liczne leukocyty. Występuje mieszana flora bakteryjna. Stosunek mieszanej flory bakteryjnej do pałeczek kwasu mlekowego wynosi 1:1.

[STOPIEŃ CZYSTOŚCI III]

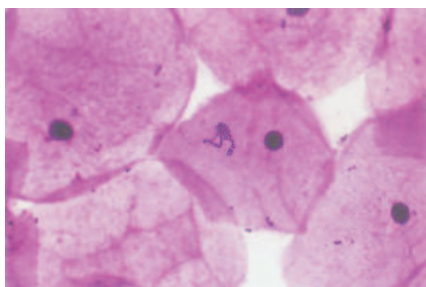
Pojedyncze pałeczki kwasu mlekowego. W polu widzenia mikroskopu widoczna jest obfita mieszana flora bakteryjna i liczne leukocyty lub leukocytów jest niewiele.

STOPIEŃ POŚREDNI III/IV

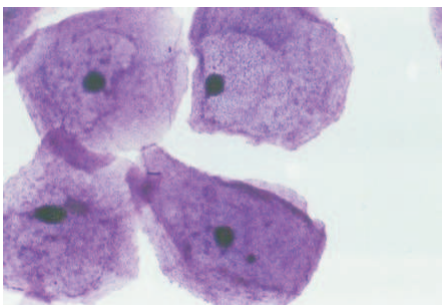
Pałeczki kwasu mlekowego występują sporadycznie, obfita mieszana flora bakteryjna. Leukocyty liczne lub ich niewiele.

STOPIEŃ CZYSTOŚCI IV

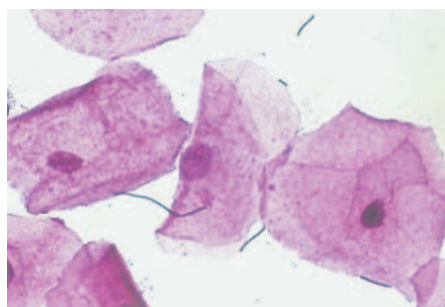
Brak pałeczek kwasu mlekowego. Całe pole widzenia mikroskopu pokryte jest jednorodną lub mieszaną florą bakteryjną. Zwraca uwagę duża różnorodność form bakteryjnych. Odczyn leukocytny znaczny lub zupełny brak leukocytów.

STOPIEŃ POŚREDNI 0/IV

Brak pałeczek kwasu mlekowego. Niewielka liczba bakterii. Odczyn leukocytny znaczny lub zupełny brak leukocytów.

STOPIEŃ CZYSTOŚCI 0

Jest to obraz mikroskopowy bezbakteryjny. Odczyn leukocytny znaczny lub brak leukocytów. Zerowy stopień czystości pochwy rozpoznajemy u dziewczynek w okresie spokoju hormonalnego, u kobiet w okresie połogu i u kobiet natychmiast po leczeniu stanu zapalnego pochwy.

STOPIEŃ POŚREDNI 0/I

W obrazie mikroskopowym widoczne są tylko pojedyncze pałeczki kwasu mlekowego. Brak innej flory bakteryjnej. Brak leukocytów.

Piśmiennictwo:

1. Verhelst R. et al: Comparison between Gram stain and culture for the characterization of vaginal microflora: Definition of a distinct grade that resembles grade I microflora and revised categorization of grade I microflora. BCM Microbiology, 2005; 5:61
2. Reid G., Bruce A. W.: Selection of *Lactobacillus* strains for urogenital probiotic applications. JID , 2001; 183 (Suppl 1): 77-80
3. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2002. MMWR 2002; 51: 42-5
4. Bulanda M. et al: Flora bakteryjna pochwy i wpływ czynników egzo i endogennych na jej zmiany. Gin. Pol., 1996; 67: 28-33
5. Kuczyńska K.: Modyfikacja stopni czystości pochwy. Gin. Pol., 1975; 46:361
6. Nugent R.P., et al: Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. J. Clin. Microbiol., 1991; 29:297
7. Malarewicz A.: Próba określenia standardu w diagnostyce zakażeń szyjki macicy. Mikrobiologia Medycyna, 2000; 2(23): 3 5
8. Mączyńska B.: Diagnostyka waginozy bakteryjnej i atypowych zakażeń przenoszonych drogą płciową. Diagnosta Laboratoryjny, 2008; 1(16): 13-17
9. Schwertz A., et al: Throwing the dice for the diagnosis of vaginal complaints. An. Clin. Microbiol., 2006; 5:4
10. Kasprówicz A., Białecka A.: Diagnostyka mikrobiologiczna zakażeń dróg rodnych. Mikrobiologia Medycyna, 1995; 4:29-33
11. Kasprówicz A.: Bakteryjne zakażenie pochwy. Bacterial vaginosis. Mikrobiologia Medycyna, 1998; 17:29-33