

Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych

Diagnosta Laboratoryjny

**Rok 5, numer 1 (13)
Marzec 2007**

**GAZETA KRAJOWEJ IZBY
DIAGNOSTÓW LABORATORYJNYCH**

**GAZETA
BEZPŁATNA**



Jeżeli Twoim celem jest:

- wiarygodny wynik najwyższej jakości
- redukcja kosztów
- minimalizacja czynności obsługowych
- unowocześnienie Laboratorium
- selektywny dobór testów
- sprawne zarządzanie pracą wielu analizatorów parametrów krytycznych - GemWeb
- system kontroli jakości w czasie rzeczywistym



To najlepszym rozwiązaniem jest

analizator parametrów krytycznych
(gazometria, elektrolity, metabolity, oksymetria)

GEM PREMIER 3000



COMESA POLSKA Sp. z o.o.
03-699 Warszawa
ul. Wolińska 4
tel.: (48) 22 336 18 00, 678 90 60
fax: (48) 22 336 18 72



Występując przed Państwem dzisiaj nie mam jeszcze jasnego przeświadczenia w kwestii miejsca na drodze, po której zdążamy by usytuować właściwie diagnostykę laboratoryjną, która stała się częścią świadczeń medycznych. Proces sytuowania diagnostyki

laboratoryjnej rozpoczął się w sposób tak znaczący od daty i odkrycia możliwości, jakie daje badanie laboratoryjne z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego. Ponadto dokonały się przemiany w świadomości pracowników służby zdrowia i pacjentów, że dla uzyskania podstaw medycznych dla terapii farmakologicznej, czy chirurgicznej, włączone w proces leczniczy muszą być badania laboratoryjno-diagnostyczne z wysokim poziomem wiarygodności. Na ten cel przewidzieć należało odpowiednie nakłady finansowe. Z pewnością jesteśmy jednym a może jedynym krajem, w którym z przyczyn ustrojowej transformacji pacjenci i służba zdrowia, postavili pytania o rząd kwot przeznaczonych na świadczenia laboratoryjne. Zestawianie wydatków przeznaczonych na badania laboratoryjno-diagnostyczne w Polsce i w krajach innych bez ich odniesienia do kosztów nakładów pracy w innych dziedzinach medycznych zaburza właściwą ocenę. Pytaniem coraz częściej stawianym jest: Gdzie tkwi przyczyna niedostatku?

W poziomie udzielenia świadczeń zdrowotnych? Ich powszechności czy też w wąskiej dostępności?

Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych budowała swoją przestrzeń prawną na argumentach, którymi jest i był ograniczany dostęp pacjenta do laboratoryjnych świadczeń. Wielu, stąd też, dostrzegało w tym zjawisku przyczynę jałowego przebiegu finansów przez służbę zdrowia. Udział diagnostyki w standardach i procedurach medycznych jest nadal niewielki, choć możliwość do kształcenia i rozwoju zawodowego zostały wielokrotnie - z 2 specjalizacji w krótkim czasie do 12. Boleję, że temu procesowi nie towarzyszą programy i reformy w służbie zdrowia. Przyczyna takiego stanu nie tkwiła i nie tkwi po stronie pacjentów i diagnostów. Szukać jej należy w sposobach dystrybucji środków finansowych, które pozostają nadal w tej samej grupie zawodowej od wielu dziesiątek lat. Wielu znawców tych zagadnień dostrzegając przyczynę finansowej zapaści w służbie zdrowia, której zasoby nie są tak małe porównując koszty nakładów na świadczenia i procentowy składnik dochodu narodowego przeznaczanego na opiekę zdrowotną uważa, że rozwiązanie tych problemów leży po stronie sejmu i rządu,

Twierdząc, że przyczyna tkwi od kilkudziesięciu lat w sposobie zarządzania służbą zdrowia. Brak bowiem jest przedstawicieli wszystkich czterech korporacji medycznych w decyzjach tak ważnych jak zarząd i nadzór nad finansami w ochronie zdrowia.

Celem nadrzędnym Pierwszej Kadencji Samorządu Diagnostów Laboratoryjnych było umocowanie diagnostyki laboratoryjnej i diagnostów w regulacjach prawnych. Okazało się że takie budowanie przestrzeni dla diagnostyki laboratoryjnej było uzasadnione. Nie sposób dziś jest odmówić racji tkwiącej w oczywistości takiego podejścia i rozstrzygnięcia. Proszę Państwa! Dziś po prawnych zapisach diagności mają możliwość specjalizacji w 12 medycznych dziedzinach świadczeń zdrowotnych. Te regulacje stały się już rzeczywiste. Żaden oponent o zdrowym umyśle nie zgłasza sprzeciwu np. co do konieczności badań laboratoryjno-genetycznych przy ustalaniu niektórych parametrów biologicznych pacjenta. A kto?, proszę Państwa! jest wykonawcą tych badań i najbardziej jest do tego przygotowany? Podobny aspekt dotyczy każdej specjalności dostępnej dla diagnostyki laboratoryjnej. Były badania o różnorodnym profilu wykonywane i przedtem przez laboratoria, na użytek medycyny. Dziś jednak pod nimi podpisze się każdy z Państwa, gdy jest ich wykonawcą. Starania o taką prawną regulację były zamierzone i zostały doprowadzone do końca. Obecnie po naszej stronie stają także specjaliści tych dyscyplin, którzy rozumieją złożoność tych badań i poziom wymaganych kwalifikacji, które leżeć winny po stronie diagnostów laboratoryjnych.

Jaką koncepcję i strategię przyjąć należy na II kadencję. Po stronie pasywów mamy bazę lokalową zdatną do podjęcia kształcenia wielospecjalizacyjnego. Mamy koncepcje i sposoby na realizację dostępnego Państwu, diagnostom internetu, który dawać będzie możliwość pobierania przez diagnostę laboratoryjnego edukacyjnego programu. Podjęty został do realizacji program biblioteki „Diagnosty laboratoryjnego”. Będą to kompendia wiedzy z różnych dyscyplin opracowane przez badaczy – diagnostów. Po stronie aktywów - stanowimy i jesteśmy prężnym środowiskiem rozwijającym się zawodowo i naukowo. Już w tej kadencji 1500 diagnostów rozpoczęło specjalizację o różnym kierunku. Ten fakt podjęcia specjalizacji budzi podziw i uznanie. Decyzję swoją podjęli pomimo, że nie zostały jeszcze uregulowane finalnie zasady finansowania kosztów kształcenia w sposób podobny, jak to dane jest specjalizującym się w innych zawodach medycznych. Obecnie finansowanie ich specjalizacji odbywa się w części na koszt własny. Jest w tym udział Ministerstwa na wniosek KIDL - obecny lecz nie w pełni zadowalający. Jaką zatem należy przyjąć strategię? Właściwie dobraną strategią wygrywa się dużo. Mamy pełne rozpoznanie. Stanowimy społeczność jednorodną, niezależnie, czy

W NUMERZE

Przemówienie Prezesa KRDL na otwarcie II KZDL	3-4
Spór o miejsce samorządu zawodowego w administracji publicznej Polski	4-5
Zagadnienia profesjonalizmu w medycynie i w diagnostyce laboratoryjnej	5-9
Outsourcing	9-11
Borelioza: dlaczego diagnostyka jest taka trudna	11-13
Akredytacja laboratorium medycznego	14
Kryteria i zasady oceny jakości w diagnostyce cytogenetycznej chorób genetycznych	16-19
Zastosowanie techniki porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy w cytogenetyce klinicznej	19-21
Współczesne możliwości cytogenetyki klinicznej w diagnostyce chorób genetycznych	23-27
Choroba Huntingtona, zasady i metody diagnostyki molekularnej	27-29
Nowe metody w diagnostyce chorób dziedzicznych	29-31

W biuletynie

- Uchwały Drugiego Zjazdu Diagnostów Laboratoryjnych

- Uchwały XXI posiedzenia Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych

-

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: 7210201042000088020105692
Bank PKO BP. IV Oddział Warszawa

Krajowa Rada Diagnostów Laboratoryjnych
Redakcja:
Henryk Owczarek - Prezes KRDL
Czesław Główniak - Sekretarz KRDL
Stanisław Krężel - Red. Naczelny
Marcin Ruszkiewicz - Red. Techniczny
Grzegorz Szych - Konsultacja Tech.
Nakład 12 000 + 500 egz.

Druk: Drukarnia A-Z Andrzej Zieliński
03-741 Warszawa ul. Białostocka 42

diagnosta pracuje w NZOZ czy w SPZOZ. Diagnosta jest dobrze wykształcony. Dobrze opanował wiedzę biologiczno-medyczną. Opanował dobrze współczesną, dostępną wiedzę technologiczną i jej zastosowanie w badaniach laboratoryjnych. Jakże możemy założyć cele dla Izby na drugą kadencję. Czy będą to zadania samorządowe, czy zadania dające możliwość dostępu do wiedzy diagnostom i przysposabiające diagnostów do bardziej wiarygodnych i trafnych świadczeń dla pacjentów?, czy też będą to cele i zadania o charakterze związku zawodowego, którym nie jesteśmy i nie będziemy. Cel związkowy osiągnąć można, lecz tylko poprzez realizację samorządowych zadań. Celem naszym musi być solidność i diagnostyczność badań laboratoryjnych.

Szanowni Państwo, Drodzy Diagnosty!

Tych śmiałych celów i zamierzeń nie będzie można zrealizować jeżeli po stronie lekarskiej nie będzie podjęty podobny wysiłek ten, który stał się udziałem naszej Izby! To na postulat Izby zostały przyspieszone i wdrożone prace nad standardami jakości badań w diagnostycznych i mikrobiologicznych laboratoriach. Razem z Konsultantami Krajowymi i Towarzystwami Naukowymi opracowywane zostają standardy jakości badań dla profilowanych laboratoriów hematologicznych, immunologicznych, genetycznych i cytologicznych. Tu chcę podkreślić wysoki poziom zaangażowania i zrozumienie dla naszych zamierzeń. Widzę je w postawach i obronie naszej koncepcji przez krajowych specjalistów, którzy stanowią reprezentację i wywodzą się z kształcenia lekarskiego. Stworzenie standardów jakości badań pozwoli na kompleksowe rozwiązania przyjęte w dziedzinie diagnostyki laboratoryjnej a które w dalszym postępowaniu zainicjują i zaistnieją sensu stricto w dyscyplinach klinicznych. Z inicjatywy i przy współudziale Izby efektem tych prac pionierskich będzie możliwość ujęcia badań laboratoryjnych w procedurach postępowania medycznego. Wówczas badanie laboratoryjne nie będzie przypadkowym zdarzeniem w procedurze postępowania medycznego. To pozwoli oszacować koszty poszczególnych etapów postępowania medycznego i udział diagnostyki laboratoryjnej w procesie leczenia. Przyjęta przez Ministerstwo struktura szpitali tworząca sieć usług dostępnych pacjentom nie może być realizowana z pominięciem miejsca laboratoriów medycznych nie tworzących monolitu organizacyjnego i finansowego. Świadczenia laboratoryjne są zbyt ważnym źródłem informacji stosunkowo łatwo i ekonomicznie dostępnym, by je wyłączać ze struktury organizacyjnej szpitali i przychodni, gdyż przynoszą wielorakie oszczędności dla procesu diagnozowania i terapii pacjenta.

Strategią do realizacji wskazanych celów winien być udział pacjentów chcących uczestniczyć w tworzeniu nowoczesnego charakteru świadczenia zdrowotnego w tym także udział diagnostów laboratoryjnych, którzy zechcą ukazywać nieodzowność i konieczną obecność świadczenia laboratoryjnego w postępowaniu medycznym.

Diagnosta laboratoryjny musi stać się w odczuciu pacjentów zwornikiem procesu leczenia, którego architektem będzie lekarz a wykonawcą pielęgniarka i aptekarz. Stąd tylko krok dzieli nas do zapisu ustawowego, w którym medyczne laboratorium diagnostyczne stanie się podmiotem, umowy kontraktowej na udzielanie świadczeń w zakresie diagnostyki laboratoryjnej. Dlatego też medyczne laboratoria diagnostyczne nie mogą stawać się w takim rozumieniu jedynym miejscem poszukiwania rezerw finansowych i oszczędności dla jednostki organizacyjnej Służby Zdrowia. Najbliższe lata II Kadencji KRDL będą przykładem i polem zmagania o takie zabezpieczenie. Badania diagnostyczne w koszyku świadczeń medycznych nie może być reglamentowane i traktowane jako świadczenie socjalne a podmioty udzielające nieodpłatnie świadczenia zdrowotne finansowane z podatków obywateli nie mogą być traktowane, jako przejaw opisany w innych zjawiskach chorobą sierocą. Na budżet służby zdrowia składa się majątek Skarbu Państwa, i płacone przez obywateli podatki pośrednie i bezpośrednie. Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych ma zaistnieć w drugiej kadencji działalności KRDL jako mecenas zarówno diagnostów laboratoryjnych jak również pacjentów, którymi często jesteśmy sami jak i inni obywatele

Prezes KRDL

(-) Henryk Owczarek

Spór o miejsce samorządu zawodowego w administracji publicznej Polski .

Ewa Tuszevska- Rzecznik Dyscyplinary KIDL

W dniu 22 listopada 2006 r. odbyła się w Poznaniu ogólnopolska konferencja naukowa na temat: **Spór o miejsce samorządu zawodowego w administracji publicznej Polski .**

Organizatorem konferencji był Instytut Nauk Politycznych i Dziennikarstwa Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Miejscem konferencji Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu [Collegium Minus - Mała Aula] ul. Wieniawskiego 1.

Celem konferencji było - jak informowali w zaproszeniu organizatorzy - „ zaprezentowanie przez przedstawicieli czołowych ośrodków naukowych w kraju, wyników badań nad istotą samorządu zawodowego i jego znaczeniem w ustroju demokracji obywatelskiej....Pozycja samorządu zawodowego została znacząco wzmocniona przez przejęcie od państwa szeregu kompetencji administracyjnych dotyczących między innymi nadzoru nad wykonywaniem zawodu. Od kilku lat trwa w Polsce debata publiczna dotycząca przyszłości samorządu zawodowego. W jej trakcie przywoływane są argumenty podważające zasadność dalszego funkcjonowania tego typu organizacji. Pojawia się w tym miejscu wątpliwość czy izby samorządu zawodowego są instytucjami wzmacniającymi procesy demokratyczne i rozwój samorządności, czy też są strukturą anachroniczną, zagrażającą umacnianiu się ładu rynkowego w Polsce”.

Otwarcia konferencji dokonali J.M. Prorektor UAM prof. Dr hab. Janusz Wiśniewski oraz Dziekan Wydziału Nauk Społecznych prof. Dr hab. Jan Grad, którzy w serdecznych słowach przywitali przybyłych oraz życzyli owocnych obrad.

I sesji plenarnej przewodniczył prof. Dr hab. Jerzy Babiak, w jej ramach wykłady wygłosili :

Prof.dr hab. Jacek Sobczak, Uniwersytet im. A.Mickiewicza w Poznaniu „*Korporacje prawnicze potrzeba czy iluzja?*”.

Dr hab. Robert Kmiecik, Uniwersytet im. A.Mickiewicza w Poznaniu „ *Korporacje samorządu zawodowego w Polsce tradycja, współczesność i perspektywy rozwoju*”.

Dr Krystyna Babiak, Okręgowa Izba Radców Prawnych w Poznaniu [wystąpienie w imieniu Krajowej Rady Radców Prawnych]

„*Prognozy działania samorządu radców prawnych na tle nowelizacji przepisów dotyczących zawodów prawniczych*”.

W dyskusji podkreślano- ogólnie niski poziom prawa stanowionego, małe zaangażowania środowiska na rzecz dobra wspólnego i tworzenia prawa, zbyt wolne samooczyszczenie się środowisk prawniczych.

Poseł PO p. Stuligrosz członek komisji sejmowej ds. konstytucji za szczególnie ważne zadanie samorządów uznał jej funkcję samooczyszczającą, ze swojej strony zadeklarował chęć współpracy ze środowiskiem samorządów zawodowych , w szczególności w ocenie aktów prawnych tworzonych w sejmie a dotyczących zawodów zaufania publicznego.

Po krótkiej przerwie na kawę rozpoczęła się II sesja plenarna, której przewodniczył prof. Dr hab. Stanisław Wykrętowicz z Wyższej Szkoły Bankowej w Poznaniu, w jej ramach wykłady wygłosili:

Konstanty Radziwiłł. Naczelna Izba Lekarska w Warszawie

„ Samorząd lekarzy w lekarzy dentyistów w Polsce na tle doświadczeń europejskich”

Mgr Klaudia Nowak, Wyższa Szkoła Bankowa w Poznaniu

„Ustrój i zadania samorządu lekarskiego w Polsce i w Niemczech”

Dr n. med. Krzysztof Kordel, Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu , Rzecznik Odpowiedzialności Zawodowej OIL w Poznaniu

„ Czy pacjent ma szansę wygrać z lekarzem? Refleksje Okręgowego Rzecznika Odpowiedzialności Zawodowej”

Dr Jędrzej Skrzypczak Uniwersytet im. A.Mickiewicza w Poznaniu, doradca O.R.Z.O.Z OIL w Poznaniu

„Najważniejsze problemy prawne odpowiedzialności zawodowej lekarzy”

Dr Elżbieta Buczkowska Naczelna Izba Pielęgniarek i Położnych w Warszawie

„Samorząd zawodowy pielęgniarek i położnych oraz jego znaczenie w rozwoju demokracji obywatelskiej”

Wykładowcy przedstawili m.in. aktualny stan prawny regulujący

działalność lekarzy, lekarzy dentystów oraz pielęgniarek i położnych w Polsce. Zwrócili także uwagę na niedoskonałość przepisów prawnych uchwalanych przez Sejm oraz stanowionych przez inne organy administracji państwowej, trudności w dostosowaniu przepisów prawa do zmieniających się warunków wykonywania zawodów medycznych spowodowane długimi terminami działania komisji sejmowych, brak obrony interesów zawodowych obywateli polskich na terenie UE, [tylko polskim pielęgniarkom nie uznano kompetencji zawodowych w UE] podkreślano konieczność obligatoryjnego członkostwa w izbach samorządów zawodowych przede wszystkim ze względu na orzecznictwo dyscyplinarne decydujące o poziomie wykonywania zawodów zaufania publicznego gdzie norma etyczna nie może mieć podległości wobec normy prawnej.

Po przerwie na obiad rozpoczęła się III sesja plenarna, której przewodniczył dr hab. Robert Kmiecik - sekretarz konferencji. Wykłady wygłosili:

Andrzej Kułagowski, Iwona Karpiuk- Suchecka Krajowa Rada Komornicza w Warszawie

„Rola samorządu Komorniczego w demokratycznym państwie prawa”.

Maciej Ostrowski, Krajowa Izba Biegłych Rewidentów w Warszawie

„Rola biegłych rewidentów we współczesnym państwie prawa”.

Tomasz Taczewski, Krajowa Izba Architektów

„Samorząd zawodowy architektów doświadczenia czterech lat pracy na rzecz budowy państwa prawa i jego kultury”

Były to bardzo ciekawe wystąpienia, pozwoliły zebranym inaczej spojrzeć na działalność zawodową biegłych rewidentów, komorników, architektów. Na bariery prawne utrudniające im rzetelne wykonywanie zawodu szczególnie architektki ich dyplomy nie są uznawane w UE co powoduje pracę polskich architektów cenionych w UE na czyjeś nazwisko, niechlujność prawa nie ułatwia przeprowadzania kontroli biegłym rewidentom a przepisy zabraniające uczestniczenia w opracowywaniu prawa zawodu reprezentowanego mogą spowodować, że stanie się ono jeszcze mniej czytelne tym samym łatwiejsze do nieprzeżegania.

O możliwość zabrania głosu poprosił przewodniczącego sesji przedstawiciel Izby Weterynaryjno- Lekarskiej [nie zgłoszony wcześniej jako uczestnik]. W swoim wystąpieniu reprezentant 12,5 tys. lekarzy weterynarii przybliżył problemy swojego środowiska, zwracając uwagę na możliwość lepszego przebicia się samorządów zawodowych ze swoimi tak przecież podobnymi problemami poprzez zwołanie konferencji Prezesów Samorządów Zawodowych - korporacje zawodowe powinny mieć swoje miejsce w strukturze administracyjnej państwa wynikające z przepisów.

IV sesja ostatnia była dyskusją panelową z udziałem przedstawicieli środowiska naukowego, polityków i działaczy samorządu zawodowego: moderatorem był prof. Dr hab. Stanisław Wykreutowicz.

Dyskutanci podkreślali, że problemy na jakie natrafiają samorządy poszczególnych zawodów są podobne wręcz niekiedy takie same- to sugeruje aby i działania ich było wspólne- szczególnie w pracach legislacyjnych co gwarantuje samorządom prawo a nie jest to przestrzegane w praktyce. Projekty docierają do samorządów zbyt późno albo propozycja zmian przedstawiona w czasie nie jest brana pod uwagę. Koniecznym jest więc ściślejsza współpraca z posłami, nacisk na nich połączony z informacją o zagrożeniach wynikających z ustanowienia złego prawa. Niepokojący jest brak porozumienia pomiędzy samorządami a administracją rządową i terenową, brak odpowiedzi na przesyłane pisma ze strony rządzących administratorów.

O zainteresowaniu problemami samorządów przez organy władzy a właściwie o braku tego zainteresowania świadczył brak na sali podczas obrad przedstawicieli władzy terenowej, parlamentarzystów [z wyjątkiem posła PO p.Stuligrosza] oraz szeroko pojętych mediów TV, radia gazet.

Pragnę w tym momencie nadmienić, że uczestniczyłam w tej konferencji w zastępstwie Pana Prezesa Henryka Owczarka, któremu obowiązki służbowe uniemożliwiły przyjazd do Poznania i wzięcie udziału w konferencji. Czułam się w obowiązku zabrać głos i zaprezentować nasz samorząd zawodowy jak się okazało najmłodszy stażem wśród obecnych na konferencji. Krótko przedstawiłam długą drogę dochodzenia do ustawy o diagnostyce, odrębność zawodu diagnosty, jego usytuowanie w strukturze ochrony zdrowia, trudności wynikające z braku odrębnego finansowania diagnostycznych badań

laboratoryjnych oraz wykonywania zawodu w warunkach wolnego rynku ale nie zawsze uczciwej konkurencji.

Podsumowania obrad i zamknięcia konferencji dokonał dr Tadeusz Walas z-ca dyrektora Instytutu Nauk Politycznych i Dziennikarstwa Uniwersytetu im. A. Mickiewicza.

Ze swojej strony uważam, że konferencja była ciekawa, bardzo dobrze zorganizowana wniosła dużo do mojej wiedzy na temat innych samorządów, pozwoliła poznać ich sukcesy i trudności w działaniu szczególnie w zakresie odpowiedzialności zawodowej czy dyscyplinarnej czyli zagadnieniom mi szczególnie bliskim z racji sprawowanej funkcji. Pragnę podziękować tą drogą Instytutowi Nauk Politycznych i Dziennikarstwa UAM za zorganizowanie tej bardzo potrzebnej dla samorządów zawodowych konferencji.

Zagadnienia profesjonalizmu w medycynie i w diagnostyce laboratoryjnej

Dr med. Marek H Dominiczak, Dyrektor Pracowni Humanistyki Medycznej, NHS Greater Glasgow and Clyde, oraz Konsultant w Biochemii Klinicznej, NHS Greater Glasgow Clinical Biochemistry Service; Gartnavel General Hospital, Glasgow G12 0YN, Wielka Brytania

Dlaczego krytykujemy "Największe dobrodziejstwo ludzkości"?

Na wyspie Kos na Morzu Egejskim stoi platan pod którym, jak głosi legenda, w starożytnej Grecji Hipokrates nauczał 'nowej' medycyny. Jednocześnie, na tej samej wyspie, w tym samym czasie działał największy tradycyjny „szpital” w starożytnej Grecji świątynia boga zdrowia Asklepiosa (później przechrzczonego przez Rzymian na Eskulapa), gdzie leczącymi byli kapłani. To, co reprezentował Hipokrates zostało zaakceptowane jako początki racjonalnej medycyny i proto-nauka medyczna. Pisma Hipokratesa dotyczyły nie tylko specyfiki leczenia lecz także dyskutowały (np. w traktacie „O chirurgii”) zachowania lekarza i stosunek lekarza do społeczeństwa. W ciągu następnych wieków, pokolenia lekarzy i myślicieli poszukiwały właściwej równowagi pomiędzy sztuką i nauką w medycynie.

Skutki ogromnego postępu, który zrobiła medycyna odzwierciedla tytuł podręcznika historii medycyny napisanego w Anglii przez Roya Portera, który brzmi „Najlepsza rzecz, która zdarzyła się ludzkości” (1). Jednocześnie charakterystyczne jest, że gdy dzisiejszy lekarz-naukowiec pisze o najważniejszych osiągnięciach medycyny, jego lista zawiera jedynie opis technologicznych osiągnięć które ratują lub przedłużają życie a nie, trudniejsze do zdefiniowania, osiągnięcia „sztuki” medycznej (2): jest to wyrazem naszego zafascynowania nauką datującego się do okresu Oświecenia.

A można przecież argumentować, że czegoś na tego typu listach brakuje: dzisiejsi pacjenci narzekają na jakość służby zdrowia.- krytycyzm szpitali, przychodni i personelu medycznego jest stałym tematem podejmowanym przez media. Konsumeryzm próbuje zredukować pacjenta do pozycji klienta, i to klienta, który musi coraz bardziej pilnować własnego interesu. Kilka lat temu w anglojęzycznej prasie ukazał się satyryczny rysunek dotyczący przyszłości medycyny: przedstawiał on małego człowieczka schodzącego po schodach szpitalnych z duża skrzynką na narzędzia pod pachą. Na skrzynce widniał napis „Usuwanie wyrostka- zrób to sam”. Gdy idzie o farmakoterapię, wiadomo że nawet w bardzo dobrze zorganizowanych próbach klinicznych 20-30% uczestników nie bierze przepisanych leków; w codziennej praktyce znaczy to że około jedna trzecia wysiłku wkładanego w medycynę profilaktyczną, jak np. w leczenie hiperlipidemii i nadciśnienia, idzie po prostu na marne. Z drugiej strony działania uboczne leków znajdują się wysoko na liście przyczyn śmiertelności.

Uzyskanie odpowiedzi na pytanie co powoduje wspomnianą niezgodność pomiędzy tym co medycyna może teoretycznie osiągnąć i jej efektywnością w codziennym życiu jest niezmiernie istotne.

Patrząc na okres szybkiego rozwoju nauk medycznych w 19 wieku, czasu, który stał się okresem formatywnym dla obecnej medycyny, widzimy jak formował on nowoczesny obraz lekarza w społeczeństwie. Artyści poprzez obrazy takie jak „Klinika Doktora Agnew” namalowany w 1889 przez T Eakinsa czy klasyczny już dzisiaj obraz

„Doktor” L Fildesa z roku 1891, przedstawiający lekarza spędzającego noc przy łóżku chorego dziecka, zbudowali w świadomości publicznej obraz lekarza, który łączył ideał humanitarnej pomocy z efektywnym zastosowaniem nauki medycznej. Był to także okres, w którym nauka i naukowcy zaczęli wielkimi krokami wkraczać do medycyny. Louis Pasteur, który zrewolucjonizował leczenie był nie-lekarzem. Od jego czasów nie-medyczna kontrybucja do opieki zdrowotnej wzrastała logarytmicznie. Zrewolucjonizowanie dydaktyki medycznej w USA przez Abrahama Flexnera na początku 20 wieku (dokonane zresztą na podstawie osiągnięć medycyny europejskiej) utwierdziło nauki podstawowe jako jeden z filarów edukacji lekarza. Od tego czasu model lekarza-naukowca zaczął dominować w obrazie medycyny zastępując, zwłaszcza w medycynie akademickiej, model lekarza-opiekuna. W dalszej ewolucji pojawił się na scenie model wielospecjalistycznego zespołu.

Z czasem, medycyna w USA stała się wielkim biznesem, a nawet w brytyjskiej Narodowej Służbie Zdrowia (National Health Service), która przez lata była wzorem dla innych, model lekarza dostępnego „kiedy potrzeba tego wymaga” został ostatnio zmieniony na pracownika od którego wymaga się żeby był szpitalu tylko w czasie określonym kontraktem. Powoduje to nowe problemy związane z np. ze zmniejszoną ciągłością opieki oraz możliwością rozmycia się odpowiedzialności za chorego gdy leczony on jest przez wielodyscyplinarne zespoły. Mimo że przyszłość medycyny określana jest dzisiaj poprzez wymienianie jej wzrastających możliwości technicznych, ciągle nie możemy sobie poradzić z problemami takimi jak otyłość czy cukrzyca; stanami, w których do efektywnej profilaktyki potrzebne są też działania inne niż stosowanie leków. Przy całej efektywności obecnych procedur, bezosobowość szpitali i centrów diagnostycznych często przestrasza i powiększa stres chorego człowieka, przedłużając proces zdrowienia.

Stale zwiększające się możliwości nauk biomedycznych powodują, że mogą one coraz poważniej ingerować w prywatne życie człowieka. Na przykład, pełny profil genetyczny może być ogromnie pomocny przewidywaniu ryzyka wystąpienia chorób, lecz dostępność genetycznych baz danych dla firm ubezpieczeniowych może wiązać się z poważnym kosztem dla osób, u których stwierdzi się obciążenie „niepożądanymi” genami, a być może nawet z odmową ubezpieczenia. Internet i postępująca komputeryzacja danych klinicznych przyspieszają prace naukowe, ale także zwiększają ryzyko nieautoryzowanej dystrybucji i sprzedaży poufnych danych.

Coraz lepiej wykształcone społeczeństwo w wielu wypadkach jest w stanie ocenić szkodliwy potencjał poszczególnych odkryć i chce dokładnie wiedzieć co naukowcy mają w zanadrzu. Dlatego też nauka musi być w coraz większym stopniu dyskutowana w kontekście innych społecznych problemów. Tego typu kontekstualizacja nie ma nic wspólnego z postawą anty-naukową: jest to po prostu typem sprzężenia zwrotnego związanym, paradoksalnie, ze zwiększającym się wpływem odkryć naukowych na życie codzienne.

Niekompletność wiedzy medycznej

Podstawowym problemem w biomedycynie pozostaje to, że fachowa wiedza medyczna jest niepełna. Algorytmy nie mogą w chwili obecnej zastąpić oceny indywidualnego pacjenta dokonywanej przez lekarza. Dotyczy to zarówno oceny i interpretacji objawów jak i prób diagnostycznych. Stopień w jakim rozwiązanie danego problemu wymaga indywidualnej oceny dokonanej przez kompetentnego profesjonalistę definiuje m.in. społeczną istotność zawodu.

Jamous and Peloite wprowadzili pojęcie stosunku I/T jako pomiaru stopnia pożądanego profesjonalizmu w różnych dziedzinach (3,4). W stosunku tym „I” oznacza indeterminację- czyli nieprzewidywalność i potrzebę indywidualnej oceny, a „T” to wiedza przewidywalna, pozwalająca np. na zastosowanie algorytmów. Zawody, z definicji, mają wysoki stosunek I/T. Istotną kwestią, dyskutowaną ostatnio podczas debaty nad profesjonalizmem lekarzy zapoczątkowanej przez Królewskie Towarzystwo Internistów (The Royal College of Physicians) w Londynie jest pytanie, kto powinien kontrolować indeterminację w zawodzie lekarza, (innymi słowy, kto interpretuje 'subiektywną' część medycyny): lekarz, administrator czy też sam pacjent (3). Dwa główne sposoby podejścia które determinują praktyczne wykorzystanie wiedzy medycznej to medycyna oparta na wiarygodnych faktach (evidence-

based medicine, EBM) i medycyna skoncentrowana na pacjencie (patient-centered medicine).

EBM jest jak dotąd najpoważniejszą próbą usystematyzowania i kontroli indeterminacji. Dowody EBM oparte są głównie na statystycznym prawdopodobieństwie. Z drugiej strony, medycyna skoncentrowana na pacjencie jest to indywidualne zastosowanie wiedzy oparte na ocenie i doświadczeniu lekarza i na charakterystyce indywidualnego pacjenta. To podejście akceptuje wysoki stopień indeterminacji. Z punktu widzenia zawodu, czy to lekarza czy diagnosty laboratoryjnego, zdefiniowanie roli członków zawodu w kontroli (i zmniejszaniu) indeterminacji jest podstawowym czynnikiem określającym wagę tych zawodów w całości opieki zdrowotnej.

Rola lekarza

Jaka jest zatem obecna rola lekarza i innych zawodów składających się na służbę zdrowia?

Czy przyszłość to rola 'mechaników zdrowia' którzy podchodzą do pacjenta wyłącznie z algorytmem generowanym przez systemy informatyczne? Wydaje się, że obecnie podstawową rolą lekarza jest przetłumaczenie wiedzy opartej na statystycznym prawdopodobieństwie na działanie w stosunku do konkretnego pacjenta. Rola diagnosty laboratoryjnego może być zdefiniowana na podobnych zasadach.

Ten proces indywidualnej translacji ogólnych zasad leczenia na postępowanie w indywidualnym przypadku jest kluczowy dla praktyki dobrej medycyny. Jest on potwierdzeniem starej lekarskiej prawdy, że medycyna to nie tylko obserwacja objawów ale ich interpretacja w kontekście osobowości i stylu życia leczonego człowieka. Trzeba tu zaznaczyć, że rola kontekstu zależy od typu schorzenia i tym samym specjalności medycznej. Byłoby naiwnym twierdzić, że w przypadku zatrzymania akcji serca czy operacji w krążeniu pozaustrojowym, umiejętności techniczne nie są daleko ważniejsze niż jakiekolwiek inne działania. Z drugiej strony, leczenie stanów przewlekłych, a zwłaszcza profilaktyka, zależą w dużej mierze od znajomości kontekstu, warunków i historii życia chorego.

Tego typu medycyna nie może być praktykowana bez skutecznego porozumiewania się lekarza z pacjentem a to z kolei zależy od wielu czynników, jednym z których jest zaufanie jakie chorego pokłada w lekarzu i innych przedstawicielach służby zdrowia. Naturalnie, lekarz, czy też kolektywnie służba zdrowia, muszą być zdolne do przekazania pacjentowi informacji w sposób maksymalnie jasny i zrozumiały (5).

A zatem, poza kontrolą indeterminacji, zdolność oceny kontekstu choroby i sposób porozumiewania się z pacjentem, są cechami osobowości leczącego składającymi się na profesjonalizm.

Profesjonalizm w zawodach związanych ze służbą zdrowia

Już jakiś czas temu, w społeczności lekarskiej nastąpiło pewne przebudzenie ze stanu samozadowolenia, w który wprowadziła medycynę technologia: zainicjowany w roku 1980 Project Professionalism prowadzony przez American Board of Internal Medicine sparafrazował Hipokratesa, potwierdzając, że „humanizm jest integralną częścią umiejętności klinicznych i pracy klinicznej”. W Wielkiej Brytanii problemy profesjonalizmu w medycynie zostały podjęte przez grupę roboczą Królewskiego Kolegium Internistów (The Royal College of Physicians' Working Party on Defining and Maintaining Professionalism in Medicine) (3,4,6).

Wielki Słownik Poprawnej Polszczyzny PWN definiuje bycie profesjonalnym jako bycie kompetentnym i fachowym. Istnieje kilka definicji profesjonalizmu w relacji do medycyny. Węższa z nich stwierdza, że profesjonalizm to suma podejść i zachowań lekarza, w odróżnieniu od wiedzy naukowej i umiejętności technicznych. Szersza definicja (zaproponowana przez Pickera w ramach wspomnianej powyżej Grupy Roboczej) definiuje profesjonalizm jako sumę znajomości medycyny i zdolności technicznych, stałego uaktualniania wiedzy a także - w stosunkach z pacjentem- empatii, umiejętności słuchania, zdolności komunikowania się i uczciwości. Ostatnim dodatkiem do tej definicji jest zawarcie w niej efektywności lekarza jako członka wielospecjalistycznego zespołu.

Podstawowym wynikiem profesjonalizmu, powinno być zaufanie społeczeństwa do członków danego zawodu. Na zachowanie profesjonalne składają się uczciwość w stosunku do pacjenta, ściśle zachowywanie zasad poufności, i budowanie zaufania poprzez jasne traktowanie istniejących sprzeczności interesów.

W Karcie Lekarza (Medical Professionalism in The New Millennium. The Physician's Charter) opublikowanej przez American Board of Internal Medicine, główne zasady to priorytet dobra pacjenta, uszanowanie jego autonomii i zasada sprawiedliwości społecznej (rozumiana jako powszechna dostępność takiej opieki) (7). Karta potwierdza, że ugoda pomiędzy społeczeństwem i lekarzem opiera się na wiedzy lekarza, na którą z kolei składa się wiedza naukowa i doświadczenie osobiste. Według Karty, lekarz ma nie tylko obowiązek podtrzymywania wysokiego standardu swojej pracy, ale także poszerzania wiedzy, popierania badań naukowych i działania w kierunku zapewnienia właściwego użytku z odkryć naukowych.

Odpowiedzialność i samoregulacja w zawodzie.

Z powodu kontekstualizacji społecznej problemów związanych ze zdrowiem, żaden z zawodów związanych z tą sferą nie jest w sensie społecznym autonomiczny. Lekarz odpowiedzialny jest zarówno przed pacjentem jak i przed instytucjami regulacyjnymi (tzn. odpowiedzialnymi za standardy zawodowe) oraz przed swoim pracodawcą. Kluczowa dla zawodu jest zdolność samoregulacji, czyli zadbania o ustanowione standardy przez grupę wyłonioną spośród członków zawodu. Samoregulacja w wypadku zawodów związanych z opieką zdrowotną jest efektywna jedynie jeżeli procedury dotyczące odpowiedzialności zawodowej są jasne dla społeczeństwa i organizacji rządowych. Jest tu też niezmiernie istotne istnienie mechanizmu niezależnej kontroli. W Wielkiej Brytanii zawód lekarski, jak idzie o egzekwowanie standardów praktyki i działania dyscyplinarne, regulowany jest przez General Medical Council. Szkolenia i egzaminy prowadzone były tradycyjnie przez Królewskie Kolegia, chociaż ostatnio stworzona agencja rządowa prawdopodobnie zmieni ten model. Obok tego, British Medical Association działa jako związek zawodowy lekarzy.

W biochemii klinicznej Clinical Pathology Accreditation (CPA) jest organizacją odpowiedzialną za standardy w laboratoriach i za ich akredytację. Szkolenie podyplomowe w medycynie laboratoryjnej jest kierowane równolegle przez Królewskie Kolegium Patologów (którego członkami mogą zostać, po złożeniu odpowiednich egzaminów, zarówno lekarze jak i absolwenci kierunków ścisłych) i przez Association for Clinical Biochemistry, która jednocześnie pełni rolę związku zawodowego dla absolwentów nauk ścisłych pracujących w biochemii klinicznej.

Obecnie główne zagadnienia wymagające rozwiązań to zapewnienie równowagi pomiędzy samoregulacją i odpowiedzialnością lekarza w stosunku do administracji, oraz wypracowanie optymalnego modelu partnerstwa pomiędzy organizacjami zawodowymi, agencjami rządowymi i menadżerami szpitali. Opinia lekarska sugeruje, że kluczowe jest tutaj utrzymanie wiodącej roli zawodu poprzez definiowanie i kontrolę utrzymania standardów a także odpowiedzialność za program szkolenia podyplomowego. Ponadto, w systemie gdzie skomplikowane procedury wykonywane są przez zespoły wielospecjalistyczne, efektywne komunikowanie się i ugody pomiędzy zawodami wchodzącymi w skład służby zdrowia nabiera podstawowego znaczenia.

Zagadnienia związane z profesjonalizmem, które są szczególnie istotne dla diagnostyki laboratoryjnej

Powyższa dyskusja dotyczyła w większości zagadnień profesjonalizmu w odniesieniu do zawodu lekarza. Zagadnienia te są w dużej części wspólne z tymi, z którymi mają do czynienia diagnostyki laboratoryjnej.

W diagnostyce laboratoryjnej jest również ważne zdefiniowanie zakresu koniecznej wiedzy naukowej i określenie stopnia indeterminacji i potrzeby oceny opartej na doświadczeniu diagnosty. Model ten musi znaleźć odbicie w programach szkolenia. Należy także wyraźnie zdefiniować zespoły w których funkcjonuje diagnosta laboratoryjny, i określić sposoby komunikacji w tych zespołach. Potrzebne jest też zdefiniowanie kodu zachowań zapewniających działanie diagnosty w interesie pacjenta.

Myśląc o diagnostyce laboratoryjnej w kontekście publikacji Royal College of Physicians and Surgeons of Canada zatytułowanej „Umiejętności w nowym tysiącleciu” (Skills for the New Millennium)(8) a także wcześniejszej publikacji American Medical Association zatytułowanej „Kontrakt społeczny medycyny z ludzkością”(9) wydaje się że następujące cechy charakteryzować współczesnego diagnostę:

1. Wysoki standard wiedzy specjalistycznej. Nie ma żadnych wątpliwości, że jakość wiedzy specjalistycznej jest głównym czynnikiem determinującym status danej profesji. Jest to wiedza, która, żeby wypełnić swoją rolę, musi być bez przerwy uzupełniana. W wypadku diagnosty laboratoryjnego jest to wiedza metodologiczna, umiejętność interpretacji danych, i zdolność rozpoznawania przyszłych trendów w nauce. Diagnostyka laboratoryjna jest też dziedziną która ma prawdopodobnie najsolidniejsze w sferze medycznej podstawy do krytycznej oceny prawdopodobieństwa i stopnia niepewności w interpretacji danych.
2. Jedną z podstawowych cech diagnosty laboratoryjnego musi być szacunek dla osoby pacjenta, przetłumaczalny w diagnostyce laboratoryjnej głównie na działania zapewniające poufność wyników i baz danych. W skali szpitala, diagnosty powinni zacząć odgrywać wiodącą rolę w rozwijaniu systemów ochrony danych.
3. Konieczność pracy nad postępem nauki i promowaniem tego postępu w diagnostyce laboratoryjnej. Pasywna postawa w stosunku do rozwoju, badań i postępu szkodzi profesjonalizmowi.
4. Porozmiewanie się z innymi zawodami, a zwłaszcza z lekarzem leczącym. Profesja musi stale inwestować w komunikację i efektywne przekazywanie informacji kolegom-klinicytom. Obecność dokładnej i jasno przedstawionej informacji o pracy laboratorium, sposobach pobierania materiału i dostępności interpretacji danych staje się tym ważniejsza im bardziej specjalistyczna i rozcłonkowana staje się opieka medyczna.
5. Stała edukacja społeczeństwa, pacjentów i innych zawodów medycznych na temat pożytku płynącego z wysokiej jakości diagnostyki laboratoryjnej. Taka edukacja jest efektywna jedynie stoi za nią silna profesja diagnostów laboratoryjnych. Propagowanie diagnostyki laboratoryjnej w szerszym społeczeństwie jest kluczowe dla uzyskania siły politycznej potrzebnej zawodowi do postępu.
6. Odpowiedzialność za kształcenie nowej kadry oraz mentorstwo. Chodzi tu nie tylko o przekazanie istniejącej wiedzy, ale o jej ciągłą modyfikację związaną ze zmieniającym się zapotrzebowaniem ze strony klinicystów.
7. Umiejętność pracy w zespołach wielodyscyplinarnych, i przywożenia takim zespołom. Patrząc pragmatycznie na diagnostykę laboratoryjną należy zdać sobie sprawę, że praca diagnosty laboratoryjnego chociaż jest jedną z kluczowych części rozpoznania, sama w sobie nie stanowi lekaarskiej diagnozy. Zatem, jak już stwierdzono powyżej, diagnosta laboratoryjny musi ściśle współpracować, na zasadzie partnerstwa, z lekarzem leczącym.

Samoregulacja.

Samoregulacja polega na zarządzaniu zawodem przez jego członków. Składa się na to ustanawianie standardów, licencjonowanie członków zawodu a także w wielu wypadkach organizowanie, lub nadzór nad systemem egzaminów podyplomowych, a także dyskusja i kształtowanie opinii o zawodzie na szerszym forum społecznym. Jednym z najważniejszych zadań jest wypracowanie strategii zabezpieczającej przyszłość zawodu, czyli planowanie rekrutacji nowych członków, a także dostosowywanie programów szkolenia do bieżących potrzeb klinicznych. Ważny jest też udział członków zawodu w naborze nowych kandydatów do zawodu, tzn. w różnego rodzaju komisjach rekrutacyjnych. (10).

Autor tego artykułu jest przekonany że efektywna samoregulacja jest kluczowym czynnikiem w kształtowaniu przyszłości zawodu i zapewnieniu jego odpowiedniego statusu w niepisanej hierarchii służby zdrowia. Zdobycie i utrzymanie prawa do samoregulacji nie jest łatwe ostatnio zwiększyła się presja agencji rządowych i administracji, w kierunku objęcia, przynajmniej częściowej, kontroli nad zawodami.

Ważnym pytaniem jest czy samoregulacja może odbywać się, jak to było w przeszłości, ściśle w obrębie członków danego zawodu: odpowiedź na to jest prawdopodobnie negatywna. W strukturze samoregulacji musi być miejsce na reprezentację ze strony pacjentów a także ze strony członków najbliższej współpracujących zawodów.

Rozpatrzmy jak problemy związane z samoregulacją wyglądają obecnie z punktu widzenia diagnostyki laboratoryjnej.

1. Definicja zawodu. Diagnostyka laboratoryjna cierpi od wielu lat z powodu zbyt wąskiej definicji. Wielostrumieniowy model biochemii klinicznej, który zaproponowany w roku 1999 (11) opisuje najważniejsze części dynamicznej diagnostyki laboratoryjnej. Składają się na to rutynowa diagnostyka szpitalna, system kształcenia podyplomowego, badania naukowe i ocena nowych technologii, udział w próbach klinicznych, przetwarzanie danych i informatyka oraz szeroko rozumiane szkolenie.

2. Efektywna samoregulacja musi wykazać się zdecydowanym działaniem dążącym do wykorzenienia niekompetencji, unikania konfliktu interesów i, generalnie, dążenia do utrzymania wysokich standardów etycznych przez członków zawodu. Profesja musi się zgodzić na wypracowanie systemu, w którym członkowie, których standardy są niższe od ustanowionych przez samoregulujący się system, są wyłączeni z zawodowej społeczności. W diagnostyce laboratoryjnej łączy się to nierozzerwalnie z akredytacją laboratoriów.

3. Utrzymanie wysokiego poziomu wiedzy, użyteczności klinicznej i racjonalna ekonomika. Podobnie do obecnie praktykowanej ciąglej oceny praktyki lekarskiej, w diagnostyce laboratoryjnej konieczny jest system kontroli, który demonstrowałby istnienie mechanizmów zapewniających wysokie standardy w powyższych dziedzinach.

4. Skuteczna samoregulacja powinna też generować przestrzeń dla rozwoju. Zawód, w którym nie ma miejsca dla rozwoju i postępu powoli obumiera. Nie chodzi tutaj o to, żeby każdy diagnosta laboratoryjny stał się aktywnym badaczem, ale o to, żeby diagnosta laboratoryjny jako społeczność popierał rozwój ośrodków badawczych które pracują na korzyść całego zawodu. Niezmiernie istotne jest też strategiczne planowanie kierunków przyszłego rozwoju. Na przykład, tak jak parę lat temu kluczowym pytaniem było do jakiego stopnia diagnosta powinien się zaangażować w rozwijające się badania genetyczne, tak teraz pytaniem tym jest w jakim stopniu należy ukierunkować diagnostykę w kierunku przetwarzania danych i systemów informatycznych.

Współpraca z klinicystami.

Wracając do problemu kontaktu z klinicystami, w mojej opinii, jako osoby zaangażowanej zarówno w diagnostykę laboratoryjną jak i praktykę kliniczną, przyszłość diagnostyki zależy od jak najściślejszej współpracy między lekarzami i absolwentami nauk ścisłych będącymi Członkami zawodu. Jest to najważniejsza gwarancja umocnienia całej Dyscypliny. Tego typu wspólny front jest także kluczowy dla zapewnienia partnerstwa pomiędzy zawodem, agencjami rządowymi i menadżerami.

Współpraca taka została ostatnio umocniona w ramach brytyjskiej Association for Clinical Biochemistry (ACB), gdzie utworzono sekcję Praktyki Klinicznej (ACB Clinical Practice Section). W Wielkiej Brytanii od kilku lat lekarze pracujący w diagnostyce laboratoryjnej mogą także formalnie utrzymywać praktykę kliniczną, specjalizując się w medycynie metabolicznej. Motorem utworzenia Sekcji Praktyki Klinicznej w ACB była chęć zapobieżenia odpływowi lekarzy z biochemii klinicznej. Członkostwo sekcji CPS, mimo że skupia się ona na problemach związanych z praktyką lekarską, jest otwarte dla wszystkich członków ACB. Obecne cele ACB CPS to:

1. Formowanie zawodowej tożsamości klinicystów w biochemii klinicznej i popieranie ich praktyki klinicznej.
2. Szeroka informacja o praktyce klinicznej mającej miejsce w ramach biochemii klinicznej.
3. Tworzenie forum wymiany informacji na temat praktyki klinicznej w biochemii klinicznej.
4. Współpraca z organizacjami zajmujących się podobnymi zagadnieniami, np. z Królewskim Kolegium Patologów czy też ze Związkiem Patologów Klinicznych (The Royal College of Pathologists i Association of Clinical Pathologists).

Podsumowanie

. Zagadnienie profesjonalizmu w diagnostyce laboratoryjnej jest bardzo podobne do problemów profesjonalizmu w społeczności lekarskiej. Zdefiniowanie cech profesjonalizmu jest podstawowe dla określenia samego zawodu, a także dla jego długoterminowego przetrwania w zmieniającej się strukturze opieki zdrowotnej. Jest ono też istotne dla statusu danego zawodu wśród profesji składających się na służbę zdrowia. Wyłaniające się definicje profesjonalizmu dotyczą z jednej strony wiedzy i jej interpretacji w kontekście leczenia indywidualnego pacjenta, a z drugiej, zachowań i stosunku członków zawodu do problemów etycznych i społecznych. Przy zwiększającym się znaczeniu kontekstu społecznego nauki i jednocześnie coraz większych jej możliwości, te dwa składniki profesjonalizmu są nierozzerwalnie związane. Dlatego też wprowadzenie Kodeksu Etyki Diagnostyki Laboratoryjnej ma ogromne znaczenie dla przyszłości zawodu.

Piśmiennictwo

1. Porter R. The Greatest Benefit to Mankind: A Medical History of Humanity from Antiquity to the Present. Harper Collins, London 1997.
2. Editorial. Looking back at the millennium in medicine. N Engl. J Med 2000;342: 42-9
3. Royal College of Physicians. Doctors in society: medical professionalism in the changing world. Report of a Working Party of the Royal College of Physicians of London: RCP, 2005.
4. Royal College of Physicians. Doctors in society: medical professionalism in the changing world. Technical supplement to a report of a Working Party of the Royal College of Physicians of London: RCP, 2005.
5. Hebanowski M, KLiszczy J, Trzeciak B. Poradnik komunikowania się lekarza z pacjentem. Biblioteka Lekarza Rodzinnego, PZWL 1994 Warszawa 1994 1-96
6. Tallis RC. Doctors in society: medical professionalism in the changing world. Clin Med 2006; 6:7-12.
7. **Project Professionalism American Board of Internal Medicine. Medical Professionalism in the New Millennium: A Physician's charter. Ann Int Med 2002;136: 243-6.**

INFORMACJA

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

Kierownik Biura KIDL
Stanisław Krężel

8. Frank JR, Jabbour M Tugwell P et al. Skills for the new millennium: report of the societal needs working group, CanMEDS2000 Project. Annals Royal College of Physicians and Surgeons of Canada 1996; 29:206-16.

9. American Medical Association. Declaration of Professional Responsibility: Medicine's Social Contract with Humanity. <http://www.ama-assn.org/ama/upload/mm/369/decoprofessional.pdf> (22 lutego 2007)

10. Freidson E. The profession of medicine. New York: Dodd, Mead and Co. 1975.

11. Dominiczak MH. Laboratory Medicine: the need for a broader view. The Multiple Bundle model of clinical laboratory function. CCLM 1999; 37:97-100

Outsourcing Irena Aleksandrowicz

Outsourcing bywa zazwyczaj definiowany jako przedsięwzięcie polegające na wydzieleniu ze struktury organizacyjnej przedsiębiorstwa macierzystego realizowanych przez nie funkcji i przekazanie ich do realizacji innym podmiotom gospodarczym (outside-resource-using tzn. wykorzystanie zasobów zewnętrznych). Outsourcing ma charakter działań restrukturyzacyjnych, które mają na celu redukcję struktury organizacyjnej przedsiębiorstwa ograniczenie zatrudnienia, zmniejszenie liczby komórek i stanowisk organizacyjnych, zmniejszenie szczebli zarządzania. Tym się różni od zwykłego zlecenia, że prowadzi do przebudowy systemu wokół zasadniczej działalności i zbudowania trwałych relacji partnerskich. Pojęcie outsourcingu do praktyki zostało wprowadzone w latach 80 ubiegłego stulecia przez koncern General Motors na określenie systemu zewnętrznego zaopatrzenia w części. Natomiast do teorii zarządzania weszło na dobre w latach 90 XX wieku. Nie jest zjawiskiem nowym. Nieodłącznie towarzyszy działalności wytwórczej. Działalność gospodarcza, nawet w jej prostych formach, opiera się bowiem na współdziałaniu różnych podmiotów gospodarczych.

Ogólne cele outsourcingu.

Za pomocą outsourcingu, podobnie jak w przypadku innych przedsięwzięć restrukturyzacyjnych, mogą być osiągnięte różnorodne cele przedsiębiorstwa: strategiczne, rynkowe, ekonomiczne, organizacyjne, motywacyjne.

Głównym celem strategicznym outsourcingu jest skoncentrowanie się przedsiębiorstwa macierzystego na **działalności kluczowej**, decydującej o jego perspektywach rozwojowych.

Osiągnięcie celów strategicznych powinno umożliwić pełniejsze osiągnięcie celów rynkowych np. poprawę pozycji konkurencyjnej przedsiębiorstwa macierzystego, zwiększenie skali jego działalności. To powinno prowadzić do lepszego osiągnięcia celów ekonomicznych np. zwiększenia przychodów, redukcji kosztów, poprawy wyników ekonomicznych i ograniczenie ryzyka ekonomicznego prowadzonej działalności gospodarczej. Zostają osiągnięte cele organizacyjne poprzez uproszczenie lub zmianę struktur i procedur.

Docelowo zmniejszają się koszty funkcjonowania przedsiębiorstwa i wzrasta skuteczność jego działania

Warunki outsourcingu.

Podstawowym warunkiem outsourcingu, który musi spełniać przedsiębiorstwo macierzyste, jest **akceptacja wydzielenia ze strony jego właścicieli i kierownictwa**. Przedsiębiorstwo macierzyste musi mieć możliwość zapewnienia **skutecznej kontroli** działalności po jej wydzieleniu. Z punktu widzenia wydzielenia działalności istotne są: **autonomiczny obszar działalności** (rynkowo, przedmiotowo lub terytorialnie), **akceptacja outsourcingu przez pracowników wydzielanej działalności**, **możliwość obiektywnego określenia wymiernych ekonomicznie wyników tej działalności**

Zasady ogólne outsourcingu.

Wydzielenie działalności musi być podporządkowane celom strategicznym rozwoju przedsiębiorstwa. **Bilans skutków wydzielenia** zarówno pozytywnych, jak i negatywnych, **musi być jednoznacznie pozytywny** dla przedsiębiorstwa macierzystego z punktu widzenia długookresowej strategii. **Decyzja o wydzieleniu działalności musi być poprzedzona wszechstronnymi i wnikliwymi badaniami** obejmującymi aspekty organizacyjne, techniczne, kadrowe, majątkowe, finansowe, księgowe, prawne itp. Wydzielenie działalności oznacza nie tylko zmianę zasad funkcjonowania wydzielanej działalności, ale również zakładu macierzystego.

Rodzaje outsourcingu.

W zależności od różnorodnych okoliczności przedsięwzięcia outsourcingowe muszą być rozpatrywane z punktu widzenia następujących kryteriów: celu wydzielenia, rodzaju wydzielanych funkcji, zakresu i trwałości wydzielenia oraz podporządkowania wydzielonej działalności. Wydzielenia jako przedsięwzięcia restrukturyzacyjne są podejmowane w celu **naprawy** sytuacji przedsiębiorstwa, jego dostosowania do zmiany warunków i wymagań otoczenia, zapewnienia warunków do przeszłego rozwoju przedsiębiorstwa. Stąd outsourcing naprawczy, dostosowawczy i rozwojowy.

Zakres wydzielenia może być całkowity (tj. dochodzi do likwidacji wszystkich, poza zadaniowymi, powiązań ze strukturą zakładu macierzystego) lub częściowy zachowujący niektóre powiązania ze strukturą przedsiębiorstwa macierzystego. W przypadku, gdy wydzielenie nie obejmuje likwidacji powiązań prawnych, mamy do czynienia z tzw. wydzieleniem wewnętrznym. Outsourcing może mieć charakter strategiczny lub taktyczny.

Outsourcing **strategiczny** to wydzielenie związane ze strategią rozwoju zakładu macierzystego (a więc trwałe). Outsourcing **taktyczny** to wydzielenie nie związane z celami strategicznymi rozwoju zakładu (nietrwałe) tzn. realizowane na okresy krótsze niż horyzont strategiczny przedsiębiorstwa macierzystego. Poszczególne rodzaje outsourcingu są ze sobą powiązane. Outsourcing **naprawczy** może mieć charakter strategiczny lub taktyczny. Outsourcing **dostosowawczy i rozwojowy** są zazwyczaj przedsięwzięciami o charakterze strategicznym. Outsourcing naprawczy polega zazwyczaj na wydzieleniu funkcji pomocniczych i funkcji obsługi. Wydzielenie funkcji kierowniczych i podstawowych wiąże się z outsourcingiem dostosowawczym i rozwojowym. Całkowite wydzielenia są zazwyczaj związane z outsourcingiem **kontraktowym**, a wydzielenia częściowe występują zwykle w przypadku outsourcingu **kapitałowego**. Wyodrębnienia wewnętrzne mogą być traktowane jako przygotowanie wydziałów zewnętrznych, przede wszystkim w formie outsourcingu kapitałowego

Partnerzy outsourcingowi.

Biorąc pod uwagę powiązania przedsiębiorstwa macierzystego z partnerem outsourcingowym wyróżniamy dwa rodzaje takich partnerów: **niepowiązanych kapitałowo** z zakładem macierzystym i **powiązanych kapitałowo lub w inny sposób**. Forma organizacyjno-prawna może być różna, ale dopuszczalna prawnie. Mogą to być zarówno osoby fizyczne posiadające zdolność prawną, jednoosobowe przedsiębiorstwa prywatne, spółki jawne lub handlowe, przedsiębiorstwa państwowe, spółdzielcze, fundacje, zakłady budżetowe itp. Partnerami outsourcingowymi mogą być zarówno podmioty krajowe, jak i zagraniczne..

Outsourcing, a kluczowe kompetencje.

Za kluczowe kompetencje są uznawane te zasoby i umiejętności przedsiębiorstwa, które ze względu na ich poziom i unikalność przyczyniają się do realizacji produktów i procesów (określonych jako kluczowe) dających przedsiębiorstwu przewagę konkurencyjną na rynku. Wśród specjalistów w zakresie zarządzania rozpowszechniony jest pogląd, że **działalność związana z kluczowymi kompetencjami nie powinna być przedmiotem outsourcingu**.

. Negatywne skutki outsourcingu.

Nieprawidłowe wprowadzenie outsourcingu tzn. niezgodne z ogólnie pojętymi jego celami, mogą wynikać bądź z **niedostatecznej wiedzy**, bądź z **niewłaściwych tzn. niezgodnych z interesami zakładu macierzystego intencji**. Brak wiedzy na temat outsourcingu powoduje najczęściej powierzchowne traktowanie problemu wydzielenia, niedostrzeganie wielostronnych uwarunkowań outsourcingu oraz jego strategicznego charakteru, stosowanie uproszczonych metod analizy celowości wydzielenia, nadmiernie optymistyczne szacowanie przewidywanych korzyści, lekceważenie ryzyka i trudności. **Należy pamiętać, iż outsourcing jest rozwiązaniem strategicznym, więc i błędy popełnione przy jego wprowadzaniu mają najczęściej taki wymiar.** Bardziej szkodliwe dla zakładu macierzystego od braku wiedzy są, wg M. Trockiego, przedsięwzięcia outsourcingowe podejmowane w celach sprzecznych z interesem przedsiębiorstwa.

W outsourcingu kontraktowym intencją likwidacji działalności w strukturze zakładu macierzystego i przekazanie jej do realizacji niezależnemu podmiotowi może być dążenie do uzyskania z tego tytułu **nielegalnych gratyfikacji**. Większość zleceń zakładu macierzystego na usługi zewnętrzne może być tak duża, że dla ich pozyskania podmioty zewnętrzne mogą uciekać się do takich działań. Zawyżanie cen za usługi outsourcingowe jest jednym ze sposobów **wyprowadzania środków finansowych** poza zakład macierzysty. Duże możliwości realizacji interesów partykularnych daje też outsourcing kapitałowy. Może on być podejmowany w celu **transferu najbardziej wartościowych składników majątkowych** zakładu macierzystego do spółek-córek w celu osłabienia kontroli nad ich wykorzystaniem. Jeśli jednocześnie podejmowane są działania zmniejszające udziały zakładu macierzystego może się okazać, że jego właściciele **zostają pozbawieni kontroli** nad wytransferowanym majątkiem. Outsourcing kapitałowy bywa też podejmowany w celu **tworzenia intratnych stanowisk** członków rad nadzorczych i członków zarządu dla zaufanej grupy pracowników. Dla uniknięcia problemów i oporów związanych z koniecznością likwidacji działalności w strukturze zakładu, a zwłaszcza problemów redukcji zatrudnienia, tworzy się spółki-córki w celu realizacji wydzielanej działalności, pomimo świadomości, iż taka spółka nie utrzyma się jako samodzielny podmiot gospodarczy. Zastosowanie takiego wydzielenia kapitałowego **okresowo tylko odsuwa problemy**, które w dalszej perspektywie czasowej i tak dadzą o sobie znać. Niepotrzebne są więc koszty takiego wydzielenia. Innym przykładem outsourcingu kapitałowego niewłaściwie zastosowanego jest rozproszenie działalności gospodarczej pomiędzy wiele powiązanych kapitałowo podmiotów, aby lepiej sterować przepływem pieniądza i zyskiem w celu ograniczenia obciążeń fiskalnych.

Outsourcing w zakładach opieki zdrowotnej.

Od roku 1998 rozpoczęto wydzielanie lecznictwa ambulatoryjnego ze zintegrowanych struktur opieki zdrowotnej po to, by w przeszłości usługi świadczone w lecznictwie ambulatoryjnym były realizowane przez sektor prywatny. W 1999 roku wprowadzono system ubezpieczeniowo-budżetowy, którego zadaniem jest finansowanie usług i procedur medycznych wykonywanych przez świadczeniodawców. Zadanie to realizowane jest poprzez organizację przetargów na zamawiane świadczenia zdrowotne, zawieranie umów na ich realizację i określenie systemu rozliczeń. Od 2000 roku rozpoczęto proces tworzenia Regionalnych Programów Restrukturyzacji w ochronie zdrowia, które obejmują wszystkie jednostki służby zdrowia w poszczególnych województwach. Po raz pierwszy dokonano swoistego „remanentu” zasobów tych jednostek, w wyniku którego powstały wieloletnie Regionalne Programy Restrukturyzacji. Każdy z tych programów powinien uwzględniać lokalne wskaźniki epidemiologiczne, przemiany demograficzne, plany rozwoju społeczno-gospodarczego danego regionu oraz korelację z planami Powiatowych Urzędów Pracy w zakresie restrukturyzacji zatrudnienia i re kwalifikacji zawodowej. Na kierownikach zakładów opieki zdrowotnej ustawowo spoczywa obowiązek prowadzenia **rachunku kosztów** działalności jednostki.

W każdym zakładzie opieki zdrowotnej wydzielić można **ośrodki kosztów zadaniowe** (np. w szpitalu oddziały, a w przychodniach POZ poradnie) i **usługowe o charakterze medycznym i nie medycznym**. Do **ośrodków usługowych o charakterze medycznym** zalicza się wszelkie laboratoria analityczne, mikrobiologiczne, patomorfologiczne itp., pracownie diagnostyczne RTG, tomografii komputerowej itp., jednostki prowadzące rejestrację, dokumentację i statystykę chorych oraz izbę przyjęć.

Ośrodki usługowe o charakterze nie medycznym to pralnia, kuchnia, obsługa techniczna, obsługa gospodarcza, zarząd i administracja. Outsourcing jako przedsięwzięcie restrukturyzacyjne, jest podejmowany w celu **sanacji** sytuacji zakładu opieki zdrowotnej, jego dostosowania do zmian warunków i wymagań otoczenia oraz w dalszej perspektywie dla zapewnienia warunków przyszłego rozwoju jednostki. Pierwszym etapem w wielu placówkach służby zdrowia było wydzielenie funkcji pomocniczych i obsługi, czyli usług o charakterze nie medycznym. Rolę etatowych sprzątaczek przejęli pracownicy firm sprzątających. Usługi pralnicze, transportowe, czy ochroniarskie najczęściej również ulegają całkowitemu wydzieleniu, co wiąże się z outsourcingiem kontraktowym. Niektóre szpitale zrestrukturyzowały swoje zaplecze żywieniowe poprzez wyodrębnienie i stworzenie spółki pracowniczej na bazie istniejącej dotychczas kuchni, bądź całkowicie zlikwidowały to zaplecze i korzystają z usług kateringowych. Coraz częściej, szczególnie w nowych szpitalach, poza zapleczem żywieniowym dla pacjentów, na tej samej bazie funkcjonują restauracje, czy kawiarnie dla odwiedzających i pracowników. Niektóre placówki wydzierżawiły część wygospodarowanej powierzchni na prywatne gabinety lekarskie, aptekę, kwaciarnię, usługi fryzjerskie, czy księgarnię. Wyodrębnieniu ulegają niektóre funkcje administracyjne (np. księgowość, usługi socjalne, prawne, czy też marketingowe). Ponieważ na rynku usług o charakterze nie medycznym jest coraz więcej sprawdzonych podmiotów gospodarczych, które mają kilku- lub wieloletnie doświadczenie w zakresie wykonywanych usług, ryzyko wydzielenia w tej sferze może być niewielkie.

Inaczej przedstawia się sytuacja na rynku **usług o charakterze medycznym**.

Ponieważ w zasadniczy sposób różni się od każdej innej działalności wytwórczej i usługowej, działalność ta **musi uwzględniać realizację wyższych celów**, a nie tylko przynoszenie korzyści materialnych. Gwarancją właściwej obsługi chorych w sferze usług o charakterze medycznym jest **fachowy, specjalnie przeszkolony** w tym celu zespół pracowników. Często pierwszy kontakt z pracownikami izby przyjęć, czy rejestracji, kształtuje wizerunek całego zakładu opieki zdrowotnej. Ogólna życzliwość i chęć niesienia pomocy dają pacjentom i ich rodzinom poczucie bezpieczeństwa i pewność fachowej obsługi.

Każda działalność diagnostyczna oferująca usługi na wysokim poziomie umożliwia lekarzowi postawienie szybkiej i trafnej diagnozy, wdrożenie właściwej terapii, a często również monitorowanie postępów leczenia. Zarówno dobrze wyposażone zakłady diagnostyki obrazowej, jak i laboratoria analityczne, czy mikrobiologiczne, poza usługami dla jednostki macierzystej mogą wykonywać usługi dla innych jednostek. Niektóre z tych usług mogą stanowić **kluczowe kompetencje** zakładu ze względu na ich poziom i unikatowość, co daje placówce przewagę konkurencyjną. Największym kapitałem każdego zakładu pracy są **wysoce wykształceni specjaliści** w różnych dziedzinach. Ich talent, kompetencje i inteligencja mogą decydować o kondycji finansowej jednostki, w której są zatrudnieni.

Podsumowanie.

Outsourcing jako przedsięwzięcie restrukturyzacyjne jest głównie rozwiązaniem strategicznym. Bilans skutków wydzielenia zarówno pozytywnych, jak i negatywnych musi być **jednoznacznie pozytywny** dla zakładu macierzystego. Obecnie trudno przewidzieć jakie będą efekty końcowe dzisiejszych działań restrukturyzacyjnych. Reformę opieki zdrowotnej, która wymusiła te działania, wprowadzono **w pośpiechu** bez uwzględnienia przedziału czasowego jaki potrzebny jest na przeszkolenie przynajmniej pionu kierowniczego. Zabrakło czasu na metodyczne opracowania procesów restrukturyzacyjnych w zespołach konsultantów krajowych w zakresie poszczególnych specjalności medycznych i specjalistów w dziedzinie ekonomii.

Samodzielność, jaką otrzymali kierownicy zakładów opieki zdrowotnej, często bez właściwego przygotowania, **nie zawsze jest właściwie wykorzystywana**. Zdarza się, że działają oni **na niekorzyść** zakładu opieki zdrowotnej. Najczęściej wynika to z niezrozumienia specyfiki jednostki, którą zarządzają i **braku zdolności analitycznego prognozowania** skutków podjętych decyzji.

Jeśli dyrektorem zakładu opieki zdrowotnej jest ekonomista, to powinien konsultować swoje decyzje z zespołem klinicystów lub specjalistów w różnych dziedzinach medycyny. Jeśli jest to konieczne zawsze może się odwołać do opinii konsultanta wojewódzkiego, regionalnego bądź krajowego w danej specjalności. Niektóre decyzje świadczą o całkowitym niezrozumieniu problemów, które ma rozwiązać manager danej jednostki.

Dotyczy to np. zwolnień pracowników o wysokich kwalifikacjach, likwidacji laboratoriów podczas, gdy w promieniu 50 km nie ma żadnego ośrodka diagnostycznego, z którym można by podpisać umowę kontraktową, czy też rezygnacja z własnej bazy laboratoryjnej na rzecz umowy kontraktowej z niewiarygodnym laboratorium np. prywatnym. Ostatnio coraz częściej dla pozornych oszczędności dyrektorzy łączą analitykę z mikrobiologią w jeden dział diagnostyczny. Jest to **model sprzed 20 lat**, kiedy obie dziedziny nie odgrywały tak wielkiego znaczenia w ogólnym procesie terapeutycznym. Postęp wiedzy jest tak ogromny i możliwości diagnostyki zmieniły się na tyle, iż powinny one funkcjonować jako oddzielne, niezależne jednostki.

Niedoceniane są oszczędności jakie niesie za sobą rzetelna diagnostyka. Koszty, jakie ponosi szpital na leki często są nieadekwatne do leczonych jednostek chorobowych. Szczególnie dotyczy to wydatków na antybiotyki lub środki dezynfekcyjne.

Dział diagnostyczny medycyny to nie „suchy” wynik, który można otrzymać w stosunkowo krótkim czasie przy zastosowaniu zautomatyzowanych systemów. **Ważna jest rzetelna interpretacja tego wyniku**. Żadna aparatura zaprogramowana na pewne stałe standardy, nie zastąpi w tym specjalisty z długoletnim doświadczeniem. Szczególnie w procesach restrukturyzacji większe znaczenie jako ciało doradcze powinni pełnić konsultanci w poszczególnych działach medycyny. Powinni oni zasiadać w komisjach konkursowych na stanowiska kierownicze zarówno oddziałów szpitalnych, jak i zakładów diagnostycznych.

Kierownicy zakładów opieki zdrowotnej powinni być zobowiązani do zasięgania opinii konsultantów na temat wiarygodności merytorycznej ewentualnych partnerów outsourcingowych na usługi medyczne.

Decydować powinna jakość, a nie pozornie niska cena usługi.

Każdy proces restrukturyzacji powinien poprzedzić rzetelny rachunek ekonomiczny, dokonany w okresie długofalowym z uwzględnieniem specyfiki ośrodka kosztowego i zewnętrznych realiów, w którym funkcjonuje. Oby nie było tak, jak w Kanadzie, gdzie po restrukturyzacji, która polegała na zwolnieniach pielęgniarek i lekarzy, państwo poniosło olbrzymie koszty leczenia swych obywateli w USA, a ponowne pozyskanie doświadczonej kadry medycznej okazało się niemożliwe, gdyż znaleźli inne miejsca pracy lub się przekwalifikowali (artykuł w Forum, 1998).

Dobrze przygotowany proces restrukturyzacji powinien uwzględniać wszelkie aspekty restrukturyzowanej działalności, z wprowadzeniem określonych wymogów i procedur opracowanych przez interdyscyplinarne zespoły autorytetów w poszczególnych specjalnościach medycznych.

Literatura.

- Cichomska G. Dzika redukcja. Gazeta Lekarska 2000, nr 4
- Kijak R. Odkuwanie monopolu. Lekarz Polski 2000, nr 30/58
- Łopuch R. Odzyskać szacunek. Gazeta Lekarska 2000, nr 4
- Materiały pomocnicze „Szkolenie krajowe w zakresie zarządzania opieką zdrowotną dla kadry kierowniczej średniego szczebla” wyd. Międzynarodowa Szkoła Menedżerów W-wa 2001.
- Przesmycka M. Wotum nieufności. Gazeta Lekarska 2000, nr 4
- Trocki M. Outsourcing. Metoda restrukturyzacji działalności gospodarczej.
- wyd. PWE W-wa 2001
- Weidenfield W. W. Wessels. Europa od A do Z.
- Wyd. Wokół nas Gliwice 1999.

Borelioza: dlaczego diagnostyka jest tak trudna?

Elżbieta Witecka-Knysz², Małgorzata Klimczak², Karol Lakwa³, Joanna Zajkowska¹, Sławomir Pancewicz¹, Maciej Kondrusik¹, Sambor Grzegorzczuk¹, Renata Świerbińska¹, Teresa Hermanowska-Szpakowicz¹

1 Klinika Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji Akademii Medycznej w Białymstoku

2 Wojewódzki Zespół Specjalistycznej Opieki Zdrowotnej we Wrocławiu

3 EUROIIMMUN POLSKA Sp. z o.o.

Wstęp

Wykonywane rutynowo w laboratoriach testy serologiczne w kierunku boreliozy często sprawiają trudności interpretacyjne, ponieważ odpowiedź immunologiczna może przebiegać odmiennie od typowego schematu opisywanego w przypadku innych chorób infekcyjnych. Główne problemy, jakie napotykamy w diagnostyce laboratoryjnej boreliozy są wynikiem strategii życiowych *Borrelia burgdorferi*, skomplikowanej odpowiedzi immunologicznej i niedoskonałości metod diagnostycznych.

Strategie życiowe *Borrelia burgdorferi* i ich konsekwencje diagnostyczne

1. Zmienność morfologiczna *Borrelia burgdorferi*

Żywe komórki *Borrelia burgdorferi* charakteryzują się unikalnymi, wyróżniającymi je spośród większości bakterii, cechami. W odpowiedzi na stres środowiskowy ruchliwe formy spiralne przeobrażają się w cysty (forma L, bakteria pozbawiona ściany komórkowej, która przybiera formę sferyczną), ukrywając materiał genetyczny w oczekiwaniu na powrót sprzyjających warunków , , . Proces ten jest odwracalny, zarówno w warunkach in vitro, jak i in vivo. Z chwilą powstania cyst znikają specyficzne antygeny, które były dotychczas rozpoznawane przez układ immunologiczny, co prowadzi do zahamowania produkcji przeciwciał. Spadek poziomu przeciwciał lub ich brak sprzyja odtworzeniu spiralnej formy krętka z cysty.

Alternatywnym wyjaśnieniem nawracającej lub przewlekłej manifestacji narządowej jest przetrwanie w tkankach składników bakterii, które prowokują reakcje zapalne. *Borrelie* mogą wytwarzać również formy blebs, które zawierają głównie lipoproteiny OspA, OspB, OspD i niskocząsteczkową lipoproteinę o masie od 6 do 10 kDa. Lipoproteiny te są silnymi induktorami reakcji zapalnych. Obecność tych pęcherzyków pozakomórkowych z czynnymi biologicznie lipopeptydami w zajętych tkankach może przyczyniać się do utrzymywania się stanu zapalnego nawet wówczas, gdy nieobecne są zdolne do namnażania bakterie.

2. Zmienność antygenowa *Borrelia burgdorferi*

W diagnostyce serologicznej trzeba brać pod uwagę ogromny, nie spotykaną u innych bakterii heterogenność i polimorfizm antygenów. W związku z tym równie zróżnicowane są powstające w odpowiedzi na kontakt z nimi przeciwciała. Stwarza to poważne trudności w konstruowaniu testów laboratoryjnych, które powinny wychwytywać z dużą czułością wszystkie wyprodukowane przeciwciała, przy równoczesnym uniknięciu reakcji krzyżowych z przeciwciałami powstałymi po kontakcie z innymi patogenami.

Borrelia dokonuje zmiany swoich antygenów powierzchniowych jako wyraz adaptacji na zmieniające się warunki środowiska (kleszcz/kregowiec/różne tkanki). Natomiast zmienność w obrębie tego samego antygeny np. OspC prezentują również inne gatunki *Borrelia*, np. *B. recurrentis* powodująca dur powrotny, uciekając w ten sposób przed wytworzonymi już specyficznymi przeciwciałami.

Unikanie odpowiedzi immunologicznej poprzez zmiany antygenów powierzchniowych, prowadzi do prezentacji nowych antygenów układowi immunologicznemu, przeciwko którym nie ma jeszcze wytworzonych przeciwciał. Dlatego przeciwciała skierowane przeciwko pierwotnym antygenom nie mogą spełniać swoich ochronnych funkcji, a odpowiedź immunologiczna staje się nieadekwatna.

Dodatkowym utrudnieniem jest pojawianie się, lub też zanikanie wielu antygenów w różnych stadiach choroby i w różnych stanach fizjologicznych *Borrelia burgdorferi*, wynikających z uruchomienia unikalnych strategii życiowych.

3. Wewnątrzkomórkowe przebywanie *Borrelia burgdorferi* oraz ukrywanie się patogenu w obszarach immunologicznie uprzywilejowanych.

Podczas infekcji produkcja przeciwciał jest wolna, a ilość przeciwciał ochronnych może być zbyt niska, co jest powodem niewystarczającej skuteczności obrony immunologicznej. Daje to szansę bakteriom dotarcia do stref organizmu, gdzie są chronione przed atakiem przeciwciał. Takimi niszami mogą być przestrzenie wewnątrzkomórkowe (k. śródbłonna i fibroblasty), ośrodkowy układ nerwowy, aparat ruchu i inne. Oprócz niemożności przedostania się antybiotyków do niektórych przestrzeni zajmowanych przez bakterie, utrudniony jest też kontakt układu immunologicznego zakażonego pacjenta z przebywającymi wewnątrzkomórkowo krętkami *Borrelia burgdorferi*, czego efektem jest brak lub osłabienie odpowiedzi immunologicznej i nieefektywne leczenie. Przebywanie żywych bakterii wewnątrz komórek i w miejscach niedostępnych dla komórek układu immunologicznego wiąże się z niebezpieczeństwem wznowy choroby po wydostaniu się krętków z ukrycia. W takich sytuacjach, w późnym okresie choroby może niekiedy dojść do produkcji przeciwciał typowych dla wczesnych stadiów choroby.

Wykonując badania serologiczne należy wziąć pod uwagę możliwość lokalnej produkcji przeciwciał (kompartmentalizacji odpowiedzi immunologicznej), ograniczonej do określonych przestrzeni (płyn stawowy, PMR). W takich sytuacjach badanie surowicy krwi może nie wykazać obecności spodziewanych przeciwciał, lub odpowiedź serologiczna może być wyrażona słabo. Jednorazowo uzyskany ujemny wynik badania serologicznego, szczególnie we wczesnej fazie choroby, nie wyklucza zakażenia. Wiąże się to ze stopniowym rozwojem odpowiedzi humoralnej, w miarę prezentowania nowych antygenów.

Odpowiedź immunologiczna na zakażenie *Borrelia*

Po ukłuciu przez kleszcza bakterie *Borrelia burgdorferi* zajmują skórę, skąd w ciągu kilku dni potrafią się przedostać do wielu tkanek. Ciągłe brak jest jednak kompletnych i pewnych informacji wyjaśniających przebieg kolejnych faz infekcji boreliozowej, takich jak: mechanizm transportu bakterii *Borrelia burgdorferi* wewnątrz naczyń, rodzaj czynników umożliwiających krętkom opuszczenie systemu naczyniowego oraz szczegóły potwierdzonego już klinicznie organotropizmu.

W wyniku zakażenia *Borrelia burgdorferi*, podobnie jak w wyniku innych infekcji, uruchomiony zostaje cały szereg reakcji immunologicznych, zarówno swoistych, jak i nieswoistych, mających na celu eliminację patogenu.

Rozwój odpowiedzi immunologicznej w zakażeniu *Borrelia burgdorferi* przebiega w kilku etapach. Pierwszy etap, w którym nie wykrywa się swoistych przeciwciał trwa około trzech tygodni od momentu zakażenia. W tym czasie funkcjonują wrodzone mechanizmy obrony polegające na działaniu komórek żernych (makrofagów, granulocytów), lizozymu, interferonu, układu dopełniacza komórek cytotoksycznych. W drugim etapie rozwija odpowiedź nabyta, czyli następuje rozpoznanie obcych antygenów i przygotowanie do rozpoczęcia pełnej swoistej odpowiedzi immunologicznej. Powstają zarówno limfocyty B produkujące swoiste przeciwciała, jak i limfocyty T z receptorami wiążącymi obcy antygen. Etap ten ma wielkie znaczenie dla rozwoju pełnej i prawidłowej odpowiedzi immunologicznej. Wszelkie zaburzenia mechanizmów nieswoistych we wczesnym okresie zakażenia mogą uniemożliwić skuteczną eradykację patogenu w dalszych etapach odpowiedzi i, w konsekwencji doprowadzić do rozwoju stanu przewlekłego choroby.

Podobnie jak w większości zakażeń, jako pierwsze pojawiają się **przeciwciała w klasie IgM**. Uwalniane są na początku pierwotnej odpowiedzi immunologicznej. Charakteryzują się małym powinowactwem do antygeny, sprzyjają silnej aktywacji dopełniacza (do 400x bardziej niż IgG) i wiązaniu receptorów FcR na komórkach żernych oraz fagocytozie. Następnie pojawiają się **przeciwciała w klasie IgG**, które stanowią główne immunoglobuliny w walce z patogenami.

W miarę rozwoju procesu chorobowego, to jest przechodzenia infekcji przez kolejne stadia, obserwuje się **ewolucję produkcji przeciwciał skierowanych przeciwko różnym antygenom**, zależnie od stadium choroby. Wczesna odpowiedź immunologiczna (głównie przeciwciała w klasie IgM) skierowana jest przeciwko białku flagelliny p41 oraz do białka OspC związanego z błoną zewnętrzną. **We wczesnym etapie infekcji *Borrelia burgdorferi* układ immunologiczny rozpoznaje zaledwie kilka antygenów**. W miarę upływu czasu odpowiedź immunologiczna rozszerza się na coraz większą liczbę białek antygenowych. **Późniejsze stadia choroby charakteryzują się obecnością przeciwciał skierowanych do wielu różnych białek**, takich jak: p39 i p58, a następnie: p83/100, p53, p43, p39, p30, p21, Osp17, p14 (pojawiają się one tygodnie, miesiące i lata później)⁸. Przeciwciała anty-OspC w klasie IgG w późniejszych stadiach choroby są obecne bardzo rzadko. Dla kontrastu, przeciwciała anty-OspC w klasie IgM mogą utrzymywać się u niektórych pacjentów przez lata, nawet po skutecznej terapii. Tak więc obecność specyficznych przeciwciał w klasie IgM nie może stanowić jedynego kryterium diagnostycznego potwierdzającego świeżą infekcję.

Podobnie jak w przypadku przeciwciał w klasie IgM, odpowiedź immunologiczna w klasie IgG może utrzymywać się przez lata i dlatego nie może służyć np. monitorowaniu leczenia. Przeciwciała, które zostały wyprodukowane w wyniku infekcji mogą być stwierdzane we krwi nawet po 10-ciu, a niekiedy po 20-tu latach od momentu stwierdzenia choroby (w obu klasach), ale ich obecność nie jest wskaźnikiem aktywnego zakażenia. Oprócz stanów związanych ze wznową choroby, z reinfekcją, z prawidłową pamięcią immunologiczną, mogą wystąpić zjawiska nie związane z infekcją *Borrelia burgdorferi* np. reakcje krzyżowe z nieswoistymi antygenami krętków.

Trudności w diagnostyce boreliozy

Laboratoryjną diagnostykę boreliozy utrudnia interpretacja wyników, a mianowicie **niemożność odróżnienia aktywnego zakażenia od przebytego w przeszłości**, nawet w sytuacji gdy wykrywane przeciwciała są całkowicie swoiste. Ponadto **stężenie wykrywanych przeciwciał nie koreluje ze stanem klinicznym pacjenta**. Często wysokie stężenia przeciwciał klasy IgG stwierdzane są u pacjentów bez objawów choroby. Prowadząc diagnostykę boreliozy należy pamiętać o jej ograniczeniach i brać pod uwagę sytuacje prowadzące do fałszywych wyników.

1. Wyniki fałszywie dodatnie w serodiagnostyce boreliozy.

Ograniczenie diagnostyki do testów skryningowych. Niestety w laboratoriach w Polsce najczęściej diagnostyka boreliozy polega na wykonaniu tylko testu przesiewowego. Przeprowadzono **badania dotyczące częstości występowania reakcji fałszywie dodatnich testów skryningowych**. Grupę 202 leśników z okolic Białegostoku oceniono pod względem obecności przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* klasy IgG i IgM (osobno) za pomocą testów skryningowych ELISA trzech producentów. Wszystkie wyniki pozytywne i wątpliwe potwierdzono testami Western blot z pełnym ekstraktem *Borrelia afzelii* i rekombinowanym antygenem VlsE. W przypadku przeciwciał klasy IgG uzyskano wyniki fałszywie dodatnie testów ELISA u od 3 do 27 osób (w zależności od producenta). W przypadku przeciwciał klasy IgM uzyskano wyniki fałszywie dodatnie testów ELISA u od 20 do 74 osób! Dane te obrazują jak **bardzo istotne jest wykonywanie testów Western blot, które dzięki wysokiej swoistości eliminują wyniki fałszywie dodatnie**. Rezygnacja z wykonania testów potwierdzających może być przyczyną błędnego rozpoznania boreliozy czego skutkiem często jest stosowanie niepotrzebnej, długotrwałej (3-4 tygodnie!) antybiotykoterapii.

Reakcje krzyżowe. Są wynikiem innych infekcji, np. zakażenia krętkiem *Treponema pallidum*, Ehrlichia, zakażenia wirusami Herpes (szczególnie Epstein-Barr). Problem ten dotyczy przede wszystkim przeciwciał wykrywanych w klasie IgM. Powodem reakcji krzyżowych są niektóre antygeny *Borrelia*, które występują licznie również w innych mikroorganizmach, np.: p41, p58-60, p66, p68, p71, p73. Reakcje krzyżowe wpływają na wynik testów przesiewowych i mogą być zweryfikowane w testach Western blot.

Hypergammaglobulinemia. W przypadku chorób autoimmunologicznych z wysokim mianem autoprzeciwciał dodatnie wyniki oznaczeń przeciwciał przeciw *Borrelia burgdorferi* charakteryzują się często nietypowym obrazem w odniesieniu do stadium choroby i rodzaju antygenów, przeciwko którym skierowane są przeciwciała. Manifestacje kliniczne chorób tkanki łącznej mogą przypominać boreliozę (np. zapalenie i bóle stawów, objawy neurologiczne) dlatego w wątpliwych przypadkach należy przeprowadzić diagnostykę różnicową z chorobami autoagresywnymi.

2. Wyniki fałszywie ujemne w serodiagnostyce boreliozy.

Zbyt wcześnie wykonane badanie: Przeciwciała w klasie IgM pojawiają się zwykle ok. 4 tygodni po zakażeniu, zaś przeciwciała IgG pojawiają się zazwyczaj między 4 a 8 tygodniem od zakażenia. Dlatego testy serologiczne (również Western blot) są mało przydatne w diagnostyce wczesnych stadiów boreliozy z powodu niskiej czułości testów na początku choroby. Testy serologiczne stają się bardziej użyteczne w późniejszych stadiach choroby, kiedy ich czułość jest lepsza.

Defekt immunologiczny stwierdzany u pacjenta: słaba odpowiedź immunologiczna lub całkowity jej brak. W sytuacjach takich metody pośrednie zawodzą.

Obecność kompleksów immunologicznych. W przypadku masywnego zakażenia bakteriami *Borrelia burgdorferi* może dojść do związania krążących przeciwciał przez antygeny bakteryjne. Powstawanie kompleksów immunologicznych obserwuje się szczególnie w stanach ostrych, gdy zakażenie jest masywne. Przeciwciała występujące w postaci kompleksów immunologicznych nie mogą być wykryte przez powszechnie stosowane metody serologiczne (np. ELISA). Istnieje możliwość rozbijania kompleksów immunologicznych w celu uwolnienia przeciwciał, co stwarza szansę ich oznaczenia. W związku z trudnościami natury technicznej związanymi ze standaryzacją tych metod, nie są jeszcze dostępne testy komercyjne, które mogłyby być stosowane rutynowo. W takiej sytuacji można spróbować powtarzać badania serologiczne na przestrzeni długiego czasu (niekiedy kilku miesięcy), ponieważ w późniejszym okresie choroby wzrasta szansa wykrycia wolnych przeciwciał.

Lokalna produkcja przeciwciał. Opisywane są przypadki lokalnej produkcji przeciwciał, np. wyłącznie w płynie stawowym lub w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR). W związku z istnieniem bariery płynu mózgowo-rdzeniowego, produkowane lokalnie przeciwciała w PMR, mogą nie być wykrywane w surowicy krwi. Należy w takich sytuacjach badanie wykonać w obu materiałach: we krwi i w PMR, po czym obliczyć indeks przeciwciał.

Wpływ antybiotykoterapii wdrożonej w początkowym stadium choroby. W tym przypadku może mieć miejsce osłabienie odpowiedzi humoralnej. Wprawdzie istnieje szansa wykrycia przeciwciał w kolejnych badaniach, ale czasami wyniki są stale negatywne, mimo klinicznego rozpoznania boreliozy (np. obecność rumienia wędrującego).

Wewnątrzkomórkowe przebywanie *Borrelia burgdorferi*. Kontakt układu immunologicznego z patogenem jest niemożliwy i w konsekwencji powoduje brak oczekiwanych przeciwciał. Do chwili pojawienia się antygenów bakteryjnych we krwi i rozpoznania ich przez układ immunologiczny, nie ma możliwości wykrycia swoistych przeciwciał.

Wnioski

Diagnostyka boreliozy nie jest łatwa, ponieważ nie dysponujemy jednoznacznym testem (co wynika ze złożonej budowy i zmienności antygenowej bakterii) oraz z powodu trudności interpretacyjnych. Niestety żadna z dostępnych metod diagnostyki laboratoryjnej boreliozy nie pozwala na odróżnienie aktywnego zakażenia od śladu po przebyłym zakażeniu. Wyjątek stanowi hodowla, która jako jedyna dowodzi obecności żywych bakterii w badanym materiale.

W diagnostyce serologicznej boreliozy należy zwrócić szczególną uwagę na to kiedy i jaki materiał pobierany jest do badania oraz czy diagnostyka prowadzona jest zgodnie z obowiązującymi standardami postępowania. **Wyniki należy interpretować zawsze uwzględniając stan kliniczny pacjenta.** O ewentualnym powtarzaniu badań serologicznych powinien decydować lekarz po przeanalizowaniu dotychczasowych wyników i postępu choroby. W przypadku utrzymywania się wyraźnych objawów klinicznych przy stałej seronegatywności należy przeprowadzić narządową diagnostykę różnicową w kierunku obecności innych schorzeń o podobnym obrazie klinicznym jak stwierdzany w boreliozie.

Literatura

Murgia R, Piazzetta C, Cinco M.: Cystic forms of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: induction, development, and the role of RpoS. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 114(13-14): 574-9 (2002).

Brorson O, Brorson: An in vitro study of the susceptibility of mobile and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* to metronidazole. *APMIS*, 107(6): 566-576, (1999).

Brorson O, Brorson SH.: Transformation of cystic forms of *Borrelia burgdorferi* to normal mobile spirochetes. *Infection*, 25: 240-6 (1997).

Grunter et al: Conversion of *Borrelia garinii* cystic forms to motile spirochetes in vivo. *APMIS* 2001 May; 109(5): 383-8.

Outer Surface Lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* Activate Vascular Endothelium In Vitro

Sellati TJ, Abrescia LD, Radolf JD, Furie MB, *Infection and Immunity*, Aug. 1996, p. 31803187

Widhe Mona: Immune Responses in Human Lyme Boreliosis. Linköping University Medical Dissertations No. 778, 2003.

Hauser U, Lehnert G, Lobentanzer r, Wilske B.: Interpretation Criteria for Standardized Western Blots for Three European Species of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato. *Journal of Clinical Microbiology*, June 1997, 35(6): 1433-1444.

Akin E, McHugh GL, Flavell RA, Fikrig E, Steere AC.: The immunoglobulin (IgG) antibody response to OspA and OspB correlates with severe and prolonged Lyme arthritis and the IgG response to P35 correlates with mild brief arthritis. *Infect Immun* 1999 Jan; 67(1): 173-81.

Kalish RA, McHugh G, Granquist J, Shea B, Ruthazer R, Steere AC.: Persistenz von Immunoglobulin M oder Immunoglobulin G Antikörper Reaktionen auf *Borrelia burgdorferi* 10-20 Jahre nach einer aktiven Boreliose (Lyme Krankheit). *Clin. Infect. Dis.* 2001, Sept.15; 33(6): 780-5.

KOMUNIKAT RZECZNIKA DYSCYPLINARNEGO KIDL Rzecznik Dyscyplinarny KIDL nie odpowiada na telefony i anonimowe pisma .

Upriejmie informuję, że zainteresowane osoby i strony kierujące do Rzecznika Dyscyplinarnego KIDL (ul. Konopacka 4, 03-428 W-wa) skargi i pisma powinny przysyłać je pisemnie (!!!) z podaniem adresu do korespondencji, zaś w przypadku PT Diagnostów Laboratoryjnych, oprócz adresu, należy podać numer wpisu na listę diagnostów lab. DANE TE POZOSTAJĄ WYŁĄCZNIE W DYSPOZYCJI

I DO INFORMACJI RZECZNIKA DYSCYPLINARNEGO KIDL
Rzecznik Dyscyplinarny KIDL
Ewa Tuszewska

Czy akredytacja laboratorium medycznego jest dużym wyzwaniem ?

Opracowanie: Hanna Hausner, Iwona Szkop

W styczniu bieżącego roku, Prezes Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych podpisał porozumienie o współpracy z Polskim Centrum Akredytacji, podejmując tym samym decyzję o aktywnym promowaniu polityki pro-jakościowej wśród diagnostów laboratoryjnych. Mamy nadzieję, że inicjatywa ta, poparta utworzeniem Grupy Roboczej ds. polityki pro-jakościowej w medycznych laboratoriach diagnostycznych i mikrobiologicznych, spotka się z dużym odzewem naszego środowiska i zwiększy wzrost zainteresowania działaniami prowadzącymi do uzyskiwania certyfikatów potwierdzających kompetencje techniczne laboratoriów medycznych.

Uzyskanie certyfikatu akredytacji wymaga jednak dużego wysiłku włożonego w przygotowanie personelu, zaplecza logistycznego i wreszcie dokumentacji niezbędnej dla uruchomienia procedury akredytacyjnej. W ramach budowanego systemu jakości, pracownicy muszą podporządkować się określonym wymaganiom oraz skrupulatnie przestrzegać ustalonych procedur i instrukcji postępowania, zaś kierownictwo musi zapewnić i udowodnić swoje zaangażowanie w tworzenie i wdrożenie systemu zarządzania oraz ciągłe doskonalenie jego skuteczności. W praktyce akredytacja oznacza, że laboratorium spełnia wszystkie wymagania normy odniesienia, zapewniając jednocześnie, że posiada m.in.:

- stale nadzorowaną organizację oraz sprawnie funkcjonujący system zarządzania,
- personel o odpowiednich, udokumentowanych kwalifikacjach i uprawnieniach, które są na bieżąco uzupełniane i doskonalone,
- odpowiednie pomieszczenia i wyposażenie spełniające określone wymagania techniczne, stale monitorowane oraz zapewniające wykonywanie pomiarów w warunkach kontrolowanych,
- ustalone procedury badawcze, udokumentowane i zwalidowane w mającym zastosowanie zakresie, odpowiednim do wymagań zleciodawcy,
- zgodny z wymaganiami systemu zapewnienia jakości, zapewniający spójność pomiarową wykonywanych badań z metodami odniesienia, który jest ustalany, wdrażany i nadzorowany przez kompetentnego pełnomocnika ds. jakości,
- system rozpatrywania skarg i reklamacji, który pozwala na natychmiastowe podejmowanie działań korygujących i zapobiegawczych.

W naszym kraju jednostką upoważnioną do akredytacji laboratoriów badawczych, w tym laboratoriów diagnostyki medycznej, jest Polskie Centrum Akredytacji. W przypadku złożonego wniosku ocenie poddaje się kompetencje techniczne laboratorium, zapewniające ustaloną jakość badań zgłoszonych do akredytacji oraz organizację i system zarządzania, gwarantujący klientom, że świadczone usługi mają możliwie najwyższą i powtarzalną jakość oraz są ciągle doskonalone. Laboratorium samo wyznacza metody badawcze, na które zamierza uzyskać akredytację. Jednostka musi spełniać ogólne wymagania dotyczące laboratoriów badawczych i wzorcowych wymienione w normie PN-ISO/IEC 17025:2005 oraz te elementy normy PN-ISO/IEC 15189:2006, które mają zastosowanie w obszarze jej działania.

Poniżej przedstawiamy Państwu fragmenty rozmowy z naszą koleżanką - panią mgr Marią Hardt - właścicielem i kierownikiem jednego, które jako piąte w kraju uzyskało w styczniu bieżącego roku akredytację PCA dla większości stosowanych w nim procedur badawczych.

Co skłoniło Państwa do podjęcia tak skomplikowanego wyzwania?

Laboratorium jest szczególnym miejscem pracy. Krzyżuje się w nim wiele procesów. Tylko sprawne panowanie nad nimi, poprzez ściśle określone procedury, daje dobrej jakości produkt finalny, jakim jest w tym przypadku wynik badania laboratoryjnego. Uważam, że poprzez

metrycznej wiedzy personelu, dobrej aparatury, sprzętu i odczynników. System Zarządzania Jakością umożliwia „panowanie” nad wynikami kontroli wewnątrz i zewnątrzlaboratoryjnej, oraz właściwe i pełne wykorzystanie tychże wyników, jako narzędzia służącego do ustawicznego monitorowania procesów badawczych w laboratorium.

Jak długo trwało przygotowanie Państwa laboratorium do akredytacji? Jaki zakres akredytacji udało się Państwu uzyskać?

Od początku istnienia laboratorium, to jest od 1983 roku, nadrzędnym celem naszego działania było wydawanie wyników najwyższej jakości. W tym kierunku stale rozwijaliśmy i doskonaliliśmy nasze zasoby. System Zarządzania Jakością zgodny z wymaganiami normy 17025 oraz oparty na elementach normy 15189 wdrażamy od 2001 roku. Nasza dokumentacja była wielokrotnie udoskonalana i poprawiana. Oczywiście, w ślad za tym szły również działania, które doskonalili kompetencje techniczne laboratorium. Do tej pory uzyskaliśmy akredytację 21 metod badawczych z zakresu biochemii, hematologii, koagulologii, immunochemii i analityki ogólnej. Stanowią one większość podstawowych badań wykonywanych w naszym laboratorium. W następnym etapie planujemy poddać procesowi akredytacji kolejne metody badawcze.

Czy możliwe jest samodzielne przygotowanie laboratorium do tak skomplikowanego zadania? Skąd czerpalicie Państwo wzorce i zdobywaliście niezbędne informacje?

Podstawową wiedzę o systemach zarządzania jakością oraz wymaganiach technicznych dla laboratoriów medycznych uzyskałam poprzez szkolenia odbyte w Polskim Centrum Badań i Certyfikacji. Uzyskałam tam również tytuł audytora wewnętrznego. Ale szczególnie dla mnie ważnym, bo praktycznym efektem szkoleń w PCBC było stworzenie koleżeńskiego „zespołu ds. jakości” spośród osób, które ukończyły powyższe szkolenia i podobnie jak ja wdrażały system jakości w swoich laboratoriach. Wzajemna wymiana informacji i zdobytych doświadczeń była na tym pierwszym etapie niezwykle cenną pomocą. Uważam, że zatrudnienie firmy zewnętrznej pomaga, ale nie zwalnia pracowników laboratorium z samodzielnego opisanie systemu pracy i wdrożenia dokumentacji.

Powszechnie uważa się, że przygotowanie laboratorium do akredytacji wymaga poniesienia dużych nakładów na remont pomieszczeń, pozyskanie nowoczesnego sprzętu, dostosowanie infrastruktury i ogólne zmodernizowanie laboratorium. Czy koszty dostosowania laboratorium w istocie są tak wysokie?

Jestem w tej szczęśliwej sytuacji, że działamy w nowym lokalu, niewymagającym większych modernizacji. Laboratorium zawsze posiadało i posiada obecnie sprzęt dobrej jakości. Mimo tego, że mieliśmy dobrą bazę wyjściową, to wprowadzenie ciągłego monitoringu aparatury i odczynników, a także materiałów odniesienia, oraz stosowanie jeszcze większej liczby kontroli, było dużym wyzwaniem finansowym. Inne działania, które podjęliśmy, wiązały się z rozbudowaniem sieci informatycznej, ustawicznymi szkoleniami i doskonaleniem personelu. To niewątpliwie koszty, ale trzeba również dodać, że „panowanie nad systemem” przynosi wiele korzyści.

Czy spodziewacie się Państwo adekwatnego wzrostu zysków, tak aby poniesione wydatki mogły zostać zrekomensowane wpływami z bieżącej działalności?

Nasz system jest jeszcze stosunkowo młody i nie potrafim podać precyzyjnego rachunku „strat” i „zysków”. Na pewno można liczyć, że poprzez wprowadzenie systemu jakości uzyskamy większe zaufanie naszych klientów. Pragnę podkreślić, że panowanie nad systemem przynosi przede wszystkim większą satysfakcję z dobrej jakości wyników. Akredytacja poświadcza nasze kompetencje.

Serdecznie dziękujemy za rozmowę

SZANOWNI PAŃSTWO

Miesięczne składki OC diagnosty laboratoryjnego pozostają bez zmian, tj. 3,00 Zł.

Szczegóły zamieszczone są na stronie internetowej www.kidl.org.pl w zakładce „Ubezpieczenia”

Kierownik Biura KIDL
Stanisław Krężel

**WAŻNA INFORMACJA
DOTYCZĄCA WYDAWANIA DOKUMENTU
“PRAWO WYKONYWANIA ZAWODU
DIAGNOSTY LABORATORYJNEGO”**

Biuro Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych uprzejmie informuje, że dokument “Prawo Wykonywania Zawodu Diagnosty Laboratoryjnego” jest nadal wydawany sukcesywnie wszystkim tym osobom, które posiadają kompletne dokumenty i uregulowane zobowiązania finansowe wobec Izby (tj. składki członkowskie).

PRZYPOMNIENIE :

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

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

PT Diagnosty Laboratoryjni nie posiadający do tej pory PWZDL proszeni są o dokonanie w/w wpłaty, przysłania jej kserokopii oraz uzupełnienia ewentualnych braków w dokumentacji.

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

UWAGA :

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

**PROSIMY O PILNE AKTUALIZOWANIE
ZMIENIONYCH ADRESÓW DO KORESPONDENCJI.**

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

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

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

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

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

**Kryteria i zasady oceny jakości w diagnostyce cytogenetycznej
chorób genetycznych**

Prof. dr hab. Ewa Bocian
Zakład Genetyki Medycznej
Instytut Matki i Dziecka w Warszawie

Badania cytogenetyczne stanowią podstawę pre- i postnatalnej diagnostyki specyficznych chorób i zespołów klinicznych uwarunkowanych aberracjami chromosomowymi. Szczególna rola tych badań wynika z tego, że ich wynik stanowi nie tylko podstawę dla prawidłowego rozpoznania choroby, lecz także umożliwia identyfikację rodzin ryzyka genetycznego. Badania te mają więc zasadnicze znaczenie dla oceny ryzyka powtórzenia się choroby w rodzinie, jak też profilaktyki chorób genetycznych. Wyjątkową wagę i znaczenie mają badania cytogenetyczne w diagnostyce prenatalnej chorób genetycznych. Ich wyniki niekiedy decydują o dalszych losach ciąży. Szczególnie istotny jest w tych badaniach czas oczekiwania na wynik diagnostyczny i co się z tym łączy, ograniczenie możliwości jego weryfikacji. Tylko te z wymienionych zagadnień sprawiają, że istnieje uzasadniona konieczność zapewnienia, tak z klinicznego jak i prawnego względu, wysokiej skuteczności i wiarygodności badań cytogenetycznych. Spełnienie tego wymogu nie jest możliwe bez opracowania a następnie wdrożenia do praktyki odpowiednich, uwzględniających specyfikę tych badań standardów metodycznych i organizacyjnych. W tym celu konieczne jest określenie wymogów i zaleceń dotyczących zasad procedury diagnostycznej, stosowanie których zapewniłoby wysoki, w pełni profesjonalny standard badań. Zapewnienie takiego standardu wymaga prowadzenia systematycznej kontroli jakości badań, zarówno wewnątrz laboratoryjnej jak też zewnętrznej. Opracowanie systemu kontroli jakości wymaga natomiast ustalenia konkretnych zasad i kryteriów oceny jakości badań cytogenetycznych dostosowanych do charakteru tych badań. Postępująca komercjalizacja usług diagnostycznych stanowi dodatkowe wyzwanie do podjęcia działań służących zapewnieniu wysokiej jakości badań prowadzonych w laboratoriach cytogenetycznych.

Stały postęp jaki dokonuje się w zakresie dbałości o jakość badań cytogenetycznych wyraża się przede wszystkim coraz szerszym wprowadzaniem systemów jakości i coraz mocniej artykułowaną potrzebą działań dotyczących wymogu akredytacji laboratoriów cytogenetycznych w większości krajów europejskich. Wrazem ogromnej potrzeby wypracowania i ujednolicenia, a w przyszłości wprowadzenia jako obowiązujących w krajach europejskich standardów tych badań było opracowanie i opublikowanie przez Europejskie Towarzystwo Cytogenetyczne zaleceń i standardów jakości w cytogenetyce klinicznej. Niestety, w Polsce nie ma jeszcze określonych obowiązujących standardów badań cytogenetycznych. Nie działa też, mimo podejmowanych wcześniej prób wdrożenia systemu opracowanego na bazie brytyjskiego NEQAS, żaden system zewnętrznej kontroli jakości tych badań diagnostycznych. Celem niniejszego opracowania jest bardzo zwięzłe z konieczności, przedstawienie kryteriów i zasad oceny jakości badań cytogenetycznych służących diagnostyce chorób genetycznych.

Zasady analizy cytogenetycznej

Podstawowe kryteria skutecznej i wiarygodnej analizy oraz zasad oceny kariotypu dotyczą przede wszystkim wyboru i jakości badanej tkanki, stosowania odpowiednich do wskazań technik badawczych uwzględniających zarówno metody cytogenetyki konwencjonalnej jak i molekularnej oraz sposobu przedstawiania i interpretacji wyniku badania. W zaleceniach dotyczących standardów badań należy uwzględnić zasady dotyczące:

- pobierania, przechowywania i transportu materiału do badań hodowli komórkowych
- analizy chromosomowej
- procedury diagnostycznej dla określonych aberracji i zespołów chromosomowych
- postępowania w przypadku zaistnienia określonych problemów diagnostycznych
- postępowania w przypadku powstania technicznych problemów laboratoryjnych;

- prowadzenia dokumentacji badań; sposobu i formy opisu wyniku diagnostycznego, a także wewnętrznej kontroli laboratoryjnej.

Szczegółowe wskazówki i opracowania metodyczne dotyczące powyższych procedur powinny być wypracowywane i dostępne w formie pisemnej w każdym laboratorium.

Material do badań cytogenetycznych

Materiałem do badań cytogenetycznych są zazwyczaj próbki; krwi żyłnej, krwi pępowinowej, skóry, płynu owodniowego, kosmówki i innych tkanek. Jakość próbki, sposób jej pobrania, warunki przechowywania i transportu mają zasadnicze znaczenie dla możliwości uzyskania wyniku badania. Zazwyczaj, ze względu na konieczność hodowli komórek konieczne jest pobieranie materiału jałowo do oznakowanych odpowiednio naczyń. Oznakowanie powinno zawierać co najmniej dwie dane identyfikacyjne pacjenta. Czas przechowywania i transportu należy ograniczyć do minimum. Szczegółowe informacje na ten temat powinny być dostarczone wszystkim ośrodkom zlecającym badania.

Hodowle komórkowe

Podstawową powinnością laboratorium jest dbałość o to aby stosowane metody hodowli komórek zapewniały wysoką skuteczność badań (odsetek badań zakończonych uzyskaniem wyniku) oraz optymalny dla analizy indeks mitotyczny i morfologię chromosomów. Każde laboratorium musi dysponować metodą hodowli umożliwiającą uzyskiwanie chromosomów charakteryzujących się po wybarwieniu dużą rozdzielczością prążkową. Podstawowe zalecenia dotyczące sposobu prowadzenia hodowli są następujące;

- konieczne jest zakładanie zawsze co najmniej dwóch hodowli komórek od pacjenta z zastosowaniem różnych serii i/lub podłoży hodowlanych. Dotyczy to szczególnie badań prenatalnych
- hodowle komórek pacjenta należy prowadzić w dwóch cieplarkach, a wszystkie zabiegi związane z ich prowadzeniem powinny być wykonywane oddzielnie. Postępowanie takie zmniejsza ryzyko infekcji hodowli.
- Dla próbek krwi pępowinowej konieczne jest zawsze wykonanie testu sprawdzającego czy rzeczywiście próbka zawiera krew płodu a nie matki
- Jeśli jest to możliwe to hodowle powinny być utrzymywane aż do czasu wydania wyniku diagnostycznego (nie dotyczy to hodowli limfocytów)

Analiza chromosomowa

Kariotyp można określić jedynie po przeprowadzeniu pełnej analizy obrazu prążkowego całego zestawu chromosomów (należy pamiętać, że żadna z metod cytogenetyki molekularnej umożliwiających analizę całego genomu takich jak M-FISH czy SKY, CGH, i aCGH nie zapewniają możliwości identyfikacji wszystkich aberracji chromosomowych). W standardach analizy chromosomowej należy uwzględnić;

- Konieczność dysponowania przez laboratorium pełnym zestawem standardowych technik barwienia chromosomów umożliwiających charakterystykę stwierdzonych aberracji
- Liczbę analizowanych (z określeniem liczby chromosomów i chromosomów płci) komórek z odniesieniem jej do wskazań, które zadecydowały o wykonaniu badania, jakości uzyskanych preparatów chromosomów i wstępnego wyniku analizy chromosomowej
- Definicję klonu komórkowego i zasady określania kariotypu jako mozaikowego
- Zasady wykluczania mozaikowości, a w przypadku badań prenatalnych zasady odróżniania mozaikowości prawdziwej od pseudomozaikowości
- Zasady analizy obrazu prążkowego chromosomów obejmujące liczbę komórek, w której należy dokonać takiej analizy, określenie poziomu rozdzielczości prążkowej w odniesieniu do wskazania do badania oraz sposobu weryfikacji wyniku analizy w celu zapewnienia odpowiedniej wiarygodności uzyskanego wyniku diagnostycznego

Kryteria i zasady oceny jakości w diagnostyce cytogenetycznej chorób genetycznych

W zaleceniach dotyczących standardów badań należy także uwzględnić;

- Konieczność jak najpełniejszej charakterystyki stwierdzonej aberracji umożliwiającej prawidłową interpretację cytogenetyczną i kliniczną uzyskanego wyniku badania
- Bezwzględna konieczność ustalenia pochodzenia stwierdzonej aberracji umożliwiającej prawidłową ocenę ryzyka genetycznego w rodzinie pacjenta oraz
- Zasady sporządzania dokumentacji analizy chromosomowej

Problemy diagnostyczne

Większość problemów diagnostycznych w badaniach cytogenetycznych jest rezultatem niedostatecznej czułości i rozdzielczości klasycznych metod analizy obrazu prążkowego chromosomów. Nie zawsze też różnicowanie prążkowe małych regionów chromosomów jest dostateczne dla identyfikacji przegrupowań między nimi. Czasami także z przyczyn natury technicznej nie jest możliwe pełne wykorzystanie informacji zawartej w obrazie prążkowym. Każdy cytogenetyk powinien mieć świadomość tych ograniczeń możliwości diagnostycznych badań cytogenetycznych. Standardy badań powinny zawierać zalecenia dotyczące sposobu postępowania w przypadku zaistnienia określonych problemów diagnostycznych. Dotyczą one przede wszystkim konieczności weryfikacji uzyskanego wyniku przy zastosowaniu zwiększonej rozdzielczości prążkowej lub powtórnej oceny kariotypu w innej tkance, zastosowania innych, szczególnie molekularnych metod analizy chromosomów i/lub całego genomu.

Techniczne problemy laboratoryjne

Świadomość potencjalnych problemów jakie mogą wystąpić w pracy laboratoryjnej nakłada obowiązek na kierownika laboratorium takiej organizacji pracy aby zmniejszyć do minimum ryzyko ich powstania. W opracowaniu zasad organizacji pracy diagnostycznej należy uwzględnić procedury zapobiegające najczęstszemu przyczynom błędnej oceny kariotypu do których należą; zamiana badanych próbek pochodzących od dwóch pacjentów, zmieszanie komórek od dwóch pacjentów, obecność komórek matczynych w próbkach materiału płodowego oraz błędy biurowe przy wypisywaniu wyników badań. Przyczyną innych błędów, których prawdopodobieństwo zależy nie tylko od właściwej organizacji pracy (działania systemu kontroli wewnątrz laboratoryjnej) ale także od poziomu profesjonalizmu pracowników laboratorium mogą być; nieprawidłowe przeprowadzenie badania oraz nieprawidłowa interpretacja wyniku badania.

Dokumentacja badań

Dokumentacja badań powinna zawierać podstawowe dane identyfikacyjne pacjenta, wskazanie do badania, numer i datę badania, szczegółowy opis wykonanego badania oraz uzyskany wynik badania. Opis badania musi zawierać opis próbki badanej, hodowli komórek, zastosowanej metodyki barwienia chromosomów oraz zapis przeprowadzonej analizy chromosomowej i jej dokumentację. W badaniach metodami cytogenetyki molekularnej także opis zastosowanych sond i specyficznych warunków badania. Dokumentacja badania musi umożliwiać prześledzenie całego procesu diagnostycznego i powinna być przechowywana zgodnie z obowiązującymi przepisami prawa.

Komunikat dla diagnostów Laboratoryjnych

Biuro KIDL negocjuje z Bankami, które zainteresowane byłyby udzielaniem kredytów inwestycyjnych dla diagnostów laboratoryjnych wg uproszczonych procedur i uprzywilejowanych reguł zastosowanych wobec grup zawodów stabilnych, oraz uczestniczących w restrukturyzacji Zakładów Opieki Zdrowotnej i będących przedmiotem restrukturyzacji. Celem jest wynegocjowanie nie tylko niskiego oprocentowania udzielonego kredytu ale również korzystnych warunków spłacania i udzielania gwarancji kredytobiorcom. Wstępnie zostaje załączona do Gazety informacja o warunkach udzielania kredytu konsumpcyjnego - w celu rozpoznania ewentualnych wysokości kredytu zainteresowanych podmiotów gospodarczych lub osób.

Koszt wysyłki informacji pokrywa Bank.

Wyniki badań

Wynik badania powinien mieć standardowy charakter, zawierać jasny i zrozumiały dla nie specjalisty opis kariotypu. Szczegółowe zalecenia dotyczące sposobu opisu wyniku badania cytogenetycznego powinny uwzględniać dane pacjenta i wskazanie do badania, numer laboratoryjny i datę badania, sposób opisu stwierdzonego kariotypu wzorem, interpretację cytogenetyczną i kliniczną, określenie dalszego postępowania diagnostycznego a dla badań nie spełniających określonego standardu wyjaśnienie przyczyn tego faktu. Wynik badania powinien być podpisany przez osobę wykonującą badanie i autoryzowany przez uprawnioną do tego osobę.

Wewnętrzna kontrola laboratoryjna

W każdym laboratorium powinien działać system wewnętrznej kontroli jakości wykonywanych w nim badań diagnostycznych. Jego celem jest zapewnienie odpowiedniego standardu badań poprzez monitorowanie procedury diagnostycznej, zakresu i metodyki badań, sposobu prowadzenia dokumentacji i opisu wyników oraz porównywanie ich z ustalonymi dla tych badań standardami. Wykrywanie i rozwiązywanie technicznych problemów laboratoryjnych oraz problemów diagnostycznych jest także jednym z elementów systemu wewnętrznej kontroli jakości. W systematycznym monitorowaniu procedury diagnostycznej należy zwrócić uwagę na następujące elementy: działanie systemu identyfikacji i przechowywania materiału do badań, sposób prowadzenia dokumentacji badań, czas trwania i skuteczność badań oraz sposób opisu wyników badań. Istotnym aspektem wewnętrznej kontroli jakości badań jest weryfikacja wszystkich wyników analizy chromosomowej przez drugą osobę. Raz w roku powinna być dokonywana weryfikacja protokołów i procedur stosowanych w laboratorium. Powinny one mieć formę pisemną.

Zasady oceny jakości badań cytogenetycznych

Kontrola jakości badań diagnostycznych polega w zasadzie na ocenie zdolności laboratorium do wykonania tych badań, poprawności uzyskiwanych wyników i ich interpretacji. Podstawę do ustalenia czy laboratorium spełnia określone wymogi dotyczące jakości badań stanowić może zarówno retrospektywna kontrola jakości jak też ocena jakości w testowych próbkach referencyjnych rosyłanych do laboratoriów. Próbkę referencyjną stanowić może preparat chromosomowy lub zawiesina komórek w utrwalczu.

Kryteria oceny jakości badań cytogenetycznych powinny uwzględniać:

- Ogólną ocenę zdolności laboratorium do wykonywania badań diagnostycznych obejmującą sposób organizacji i zarządzania, wyposażenie aparaturowe oraz stosowane techniki badawcze
- Skuteczność stosowanych metod badawczych (odsetek badań zakończonych uzyskaniem wyniku) oraz średni czas trwania badań diagnostycznych
- Ocenę technicznej jakości preparatów chromosomowych z losowo wybranych próbek, a szczególnie uzyskiwanej rozdzielczości prążkowej i jej dostosowanie do wskazań decydujących o wykonaniu badań
- Ocenę wyniku badania, jego formy i treści merytorycznej. Ocenie powinny podlegać: poprawność zastosowanej procedury badania i uzyskanego wyniku, poprawność zapisu kariotypu wzorem wg ISCN (2005), sposób opisu oraz poprawność interpretacji cytogenetycznej i klinicznej uzyskanego wyniku badania.

Standardy jakości badań cytogenetycznych minimalny poziom akceptowalności

Standard badań stanowi wypadkową oceny jakości wielu parametrów składających się na całą, procedurę diagnostyczną. Określenie minimalnych, możliwych jeszcze do zaakceptowania standardów dla tych parametrów warunkuje możliwość dokonania oceny, a zatem i kontroli jakości badań. Możliwość uzyskania odpowiedniego standardu cytogenetycznych badań diagnostycznych uwarunkowana jest w dużym stopniu spełnieniem przez laboratorium

określonych wymogów dotyczących zespołu badawczego, organizacji i zarządzania oraz wyposażenia laboratorium.

Metodyka i procedury diagnostyczne

Zespół badawczy

Odpowiedni standard wysoko specjalistycznych badań, do których niewątpliwie należą badania cytogenetyczne może być zapewniony jedynie przez wyszkolony, o najwyższych kwalifikacjach zawodowych zespół osób wykonujących badania. Powinny one legitymować się wyższym lub średnim wykształceniem biologicznym lub medycznym i być przeszkolone w zakresie cytogenetyki klinicznej. Każda osoba ze średnim wykształceniem i / lub z niedostatecznym doświadczeniem w pracy diagnostycznej powinna mieć zapewnione doradztwo i opiekę (w tym autoryzację uzyskiwanych przez nią wyników badań) osoby o wyższych kwalifikacjach zawodowych.

Kierownikiem laboratorium powinna być osoba z wyższym wykształceniem medycznym, analitycznym medycznym lub biologicznym, posiadająca specjalizację w zakresie laboratoryjnej genetyki medycznej, w miarę możliwości ze stopniem naukowym. Osoba ta powinna mieć nie tylko odpowiednią wiedzę teoretyczną ale także duże doświadczenie w zakresie diagnostyki cytogenetycznej.

Kierownik laboratorium odpowiedzialny jest między innymi za kierunki prowadzonych badań, podnoszenie kwalifikacji zawodowych personelu oraz wprowadzanie nowoczesnych metod badawczych umożliwiających stałe doskonalenie diagnostyki cytogenetycznej. Jego zadaniem jest również taka organizacja pracy aby uzyskiwane w badaniach diagnostycznych wyniki były wydawane bez opóźnień. Warunkiem tego jest przede wszystkim zachowanie właściwych proporcji pomiędzy liczbą badań i liczbą osób je wykonujących. W zaleceniach Europejskiego Towarzystwa Cytogenetycznego (E.C.A.) dotyczących standardów badań cytogenetycznych podaje się np., że średnie obciążenie pracą na osobę w ciągu roku powinno wynosić 250 - 350 badań. Zależy ono w pewnym stopniu od stosowanej metodyki i wyposażenia laboratorium (np. automatyzacji analizy kariotypu) a także organizacji pracy administracyjnej. Generalnie, zalecane jest aby w laboratorium wykonywanych było co najmniej 500 badań cytogenetycznych (wszystkich badań łącznie) rocznie. Zapewnienie odpowiedniego standardu badań i ciągłości serwisu diagnostycznego natomiast wymaga zatrudnienia w laboratorium co najmniej dwóch doświadczonych cytogenetyków poza kierownikiem laboratorium.

Należy pamiętać, że specyfika cytogenetycznych badań diagnostycznych decyduje o konieczności stałej współpracy cytogenetyków z genetykami klinicznymi oraz lekarzami innych specjalności. W związku z tym pracownicy laboratorium powinni mieć zapewnioną możliwość specjalistycznej konsultacji medycznej w wymagających tego sytuacjach diagnostycznych.

Wyposażenie laboratorium

Podstawowe wyposażenie aparaturowe laboratorium cytogenetycznego, poza sprzętem typowym dla każdego laboratorium powinno zawierać:

- dobrej klasy mikroskopy z wyposażeniem do fluorescencji i automatycznej fotografii lub do komputerowego systemu rejestracji, analizy i dokumentacji kariotypu
- mikroskop odwrócony (jeśli prowadzone są badania prenatalne)
- komorę z laminarnym przepływem powietrza, najlepiej typu "biohazard"
- odpowiednie inkubatory do hodowli komórkowych (np. z kontrolowanym stężeniem CO₂ i poziomem wilgotności)
- pojemnik do bankowania komórek w ciekłym azocie oraz
- wyciąg chemiczny digestorium.

Bardzo istotne jest aby większość spośród wymienionych aparatów była w co najmniej dwóch egzemplarzach co łączy się z koniecznością spełnienia podanych wcześniej wymogów dotyczących hodowli komórek oraz zapewnienia ciągłości pracy. Każdy aparat powinien być zaopatrzony w instrukcję obsługi i poddawany okresowej kontroli sprawności działania

Stosowane w laboratorium techniki badań i procedury diagnostyczne muszą odpowiadać powszechnie przyjętym standardom umożliwiającym skuteczną i wiarygodną identyfikację aberracji chromosomowych. W laboratorium powinien być stosowany pełny zakres standartowych technik barwienia (prążki G, Q, C, Ag-NOR, DADAPI) umożliwiających identyfikację i charakterystykę aberracji chromosomowych. W laboratoriach referencyjnych powinna być także stosowana technika fluorescencyjnej hybrydizacji *in situ* (FISH). Powinny one wykonywać badania z zastosowaniem tej metody analizy chromosomów zarówno dla potrzeb własnych, jak i mniejszych, nie dysponujących tą metodą laboratoriów cytogenetycznych.

Drugim zasadniczym warunkiem zapewnienia odpowiedniego standardu badań cytogenetycznych jest prowadzenie analizy kariotypu przy adekwatnej do wskazania rozdzielczości prążkowej chromosomów. Minimalny standard w tym zakresie jest następujący:

- 400 prążków w haploidalnym zestawie chromosomów dla wykrywania aneuploidii
- 550 prążków dla diagnostyki przypadków upośledzenia umysłowego, wad rozwojowych i dysmorfii oraz niepowodzeń ciąży

Skuteczność i czas trwania badania

Minimalne, możliwe jeszcze do zaakceptowania standardy dotyczące skuteczności badań cytogenetycznych (odsetka badań, w których uzyskano wynik) dla różnego typu materiału badanego, zgodnie z zaleceniami E.C.A., powinny być następujące: dla próbek krwi, wód płodowych i trofoblastu 98%, natomiast dla próbek skóry i różnych tkanek płodowych 60%.

Akceptowany jako minimalny standard czas badania powinien natomiast wynosić dla badań:

- krwi - 28 dni
- pilnych badań krwi obwodowej, pępowinowej i szpiku - 7 dni
- płynu owodniowego i trofoblastu - 21 dni
- innych tkanek - 28 dni
- prenatalnej diagnostyki aneuploidii metodą FISH/QF-PCR - 4 dni

Co najmniej 80% wykonanych w laboratorium badań powinno odpowiadać wymienionym powyżej standardom aby uznać, że spełnione zostały wymogi dotyczące jakości tych badań.

Wynik badania

Ocenić podlegać powinno każde z wymienionych wcześniej kryteriów dotyczących zawartości merytorycznej i sposobu opisu wyniku badania. Zastosowanie punktowej oceny błędów, braków i nieścisłości w opisie wyniku może umożliwić obiektywną ocenę jego poprawności. Błędy można podzielić zależnie od ich znaczenia na drobne, znaczne i poważne. Opis wyniku badania może uzyskać pozytywną ocenę tylko, wtedy gdy jego poprawność oceniona jest na co najmniej 95%. Oznacza to, że nie można popełnić w opisie wyniku żadnego poważnego błędu a uzyskanie minimalnego standardu łączy się z popełnieniem kilku drobnych lub jednego znacznego i jednego drobnego błędu. Poniżej przedstawiono przykłady różnego rodzaju błędów dla poszczególnych kryteriów oceny opisu wyniku diagnostycznego.

- Poprawność procedury badania
 - Drobny błąd: - nie wykonano zgodnie z przyjętymi standardami dostatecznej analizy lub odpowiednich testów.
 - Poważny błąd: - nie wykonano odpowiedniej do zalecanych standardów analizy lub testów w wyniku czego interpretacja kliniczna wyniku może być niejednoznaczna.
- Poprawność uzyskanego wyniku
 - Drobny błąd - niepełna lub nieprecyzyjna charakterystyka stwierdzonej aberracji, np. niedokładnie określone punkty złamań chromosomów
 - Znaczny błąd: - nie rozpoznanie aberracji lub rozpoznanie aberracji, której nie ma
- Interpretacja cytogenetyczna wyniku i zapis kariotypu wg ISCN
 - Drobny błąd: - interpretacja nieadekwatna do uzyskanej w badaniu rozdzielczości prążkowej chromosomów
 - niewielki błąd w zapisie kariotypu wzorem (np. brak kropki, średnika itp.)
 - Znaczny błąd: - zaniechanie podania wszystkich prawdopodobnych interpretacji wyniku
 - duży błąd w zapisie kariotypu wzorem (tzn. taki, że wzór kariotypu jest zaprzeczeniem jego opisu).
- Opis kariotypu
 - Drobny błąd: - pominięcie w opisie płci, istotnych określeń takich jak "zrównoważony", "wzajemna" określenia ramion chromosomów zaangażowanych w aberrację etc.
 - Znaczny błąd: - opis niezrozumiały (nieczytelny) lub wprowadzający w błąd
- Interpretacja kliniczna
 - Drobny błąd: - brak odniesienia stwierdzonej aberracji do wskazania będącego podstawą oceny kariotypu lub pominięcie w opisie nazwy zespołu, który został stwierdzony.
 - Znaczny błąd: - niewłaściwa ocena lub brak informacji o ryzyku genetycznym, oraz brak omówienia możliwych skutków klinicznych.
 - Poważny błąd: - błąd diagnostyczny, błędna informacja dotycząca zespołu klinicznego, która może być przyczyną niewłaściwego postępowania medycznego lub udzielenie innej niewłaściwej informacji mogącej prowadzić do poważnych skutków dla badanych osób.

Systemy oceny jakości badań diagnostycznych

Na zakończenie warto jeszcze przedstawić możliwości i ograniczenia systemu retrospektywnej kontroli jakości oraz systemu opartego na ocenie jakości w testowych próbkach referencyjnych rozsyłanych do laboratoriów. Ta druga forma (metoda) sprawdzianu jakości badań wymaga większego wysiłku organizacyjnego i nakładów finansowych związanych z koniecznością sporządzania przez uprawnione do tego laboratorium wielu standardowych próbek testowych z określonymi aberracjami chromosomowymi. Zaletą sprawdzianu prowadzonego tą metodą jest natomiast prostsza sama ocena jakości badań jak i łatwiejsza ocena porównawcza poszczególnych laboratoriów, zwłaszcza w zakresie sposobu opisu i interpretacji uzyskanych wyników. Wiąże się to z tym, że wszystkie poddające się kontroli laboratoria otrzymują ten sam wystandaryzowany materiał do badań. Podstawową wadą omawianego systemu kontroli jest to, że uzyskany wynik (czas badania, jakość preparatu, sposób przeprowadzania analizy chromosomowej i opisu wyniku) nie musi odzwierciedlać rzeczywistej jakości pracy laboratorium w odniesieniu do badań rutynowych. Materiał testowy jest zazwyczaj traktowany inaczej (lepiej) w celu uzyskania dobrej oceny jakości.

W przypadku metody retrospektywnej, zewnętrznej kontroli jakości badań ocenie podlega rzeczywista praca laboratorium. Poddawane są jej badania diagnostyczne losowo wybrane spośród wykonanych już wcześniej badań. Oceniany materiał nie może być więc inaczej traktowany niż zwykle rutynowe badania. Wadą tego systemu kontroli jest natomiast to, że małe laboratoria wykonujące niewielką liczbę badań mogą mieć problem z dostarczeniem do oceny określonych (wymaganych) przypadków.

Zastosowanie techniki porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy (array CGH) w cytogenetyce klinicznej

Dr hab. med. Paweł Stankiewicz
Zakład Genetyki Medycznej
Instytut Matki i Dziecka
Kasprzaka 17A
01-211 Warszawa

Wprowadzenie

Określenie prawidłowej liczby chromosomów przez Tijo i Levana w 1956 r. oraz opracowanie techniki uzyskiwania preparatów chromosomowych umożliwiły identyfikację pierwszych aberracji chromosomowych u człowieka i stworzyły podstawy cytogenetyki klinicznej. Jej dalszy rozwój związany był z wprowadzeniem po koniec lat 60-tych XX wieku metod prążkowego barwienia chromosomów. Konwencjonalne metody oceny kariotypu umożliwiają uzyskiwanie do 850-1000 prążków w haploidalnym zestawie chromosomów prometafazowych, dzięki czemu możliwe jest identyfikowanie aberracji chromosomowych o wielkości ok. 2-3 milionów par zasad (mpz). Dalsze zwiększenie rozdzielczości technik badawczych stało się możliwe na przełomie lat 80-tych i 90-tych dzięki zastosowaniu metod biologii molekularnej w badaniach cytogenetycznych. Powstała wtedy nowa gałąź cytogenetyki klinicznej – cytogenetyka molekularna. Opracowana pod koniec lat 80-tych ub. wieku technika fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) (*fluorescence in situ hybridization*) polega na identyfikacji określonych sekwencji DNA chromosomowego znajdującego się w preparacie cytologicznym za pomocą sond molekularnych wyznakowanych lub wykrywanych z wykorzystaniem związków fluorescencyjnych tak, by możliwe było uwidocznienie ich kompleksów z badanym DNA w mikroskopie fluorescencyjnym. Metoda FISH stała się podstawowym narzędziem badawczym cytogenetyki klinicznej i jest wykorzystywana głównie w diagnostyce zespołów mikrodelecyjnych oraz w analizie regionów subtelomerowych u pacjentów z niepełnosprawnością intelektualną i cechami dysmorfii.

Porównawcza hybrydyzacja genomowa (CGH)

Jedną z modyfikacji techniki FISH jest porównawcza hybrydyzacja genomowa (CGH) (*comparative genomic hybridization*). Polega ona na hybrydyzacji dwóch genomowych DNA zmieszanych w proporcji 1:1, badanego i referencyjnego do prawidłowych chromosomów metafazowych na szkiełku podstawowym. Zastosowanie różnych fluorochromów do detekcji obu tych genomów umożliwia porównawczą ocenę ilościową intensywności sygnałów fluorescencyjnych na całej długości kontrolnych chromosomów za pomocą odpowiedniego programu komputerowego (Ryc. 1). Metoda ta można analizować cały genom w jednym badaniu z rozdzielczością ok. 5-10 mpz. Konwencjonalna CGH wykorzystywana była dotychczas przede wszystkim w cytogenetyce nowotworów do identyfikacji nie zrównoważonych aberracji chromosomowych.

W cytogenetyce klinicznej CGH znalazła szersze zastosowanie w zmodyfikowanej wersji o zwiększonej rozdzielczości tzw. HR-CGH (*high-resolution CGH*). Polepszenie rozdzielczości do 2-3 mpz uzyskano w wyniku opracowania tzw. dynamicznych profili referencyjnych, specyficznych dla poszczególnych chromosomów.

HR-CGH wykorzystuje się do identyfikacji małych, widocznych niechrupnoważonych aberracji chromosomowych, które nie mogą być określone za pomocą metod prążkowych. HR-CGH umożliwia również identyfikowanie submikroskopowych rearanżacji chromosomowych u ok. 10% pacjentów z prawidłowym kariotypem.

Znaczne zwiększenie potencjału diagnostycznego techniki CGH osiągnięto poprzez zastąpienie chromosomów metafazowych uszeregowanymi i umocowanymi na szkiełku podstawowym fragmentami DNA takimi jak kłony BAC (*bacterial artificial chromosome*) lub PAC (*P1-derived artificial chromosome*), cDNA (*complementary DNA*), produkty PCR lub zsyntetyzowane oligonukleotydy. Analizowane DNA genomowe pacjenta oraz DNA referencyjne znakuje się odmiennie i ko-hydryzuje w odwrotnych kombinacjach (Ryc. 1). Nadmiar lub brak fragmentu genomu widoczny jest jako odchylenie od oczekiwanego koloru fluorescencyjnego gdy jest taka sama ilość odpowiednich fragmentów obu analizowanych DNA (proporcja 1:1). Ta metoda badawcza umożliwia analizę całego genomu w pojedynczym teście z rozdzielczością zależną praktycznie jedynie od wielkości i liczby zastosowanych klonów.

Technikę array CGH stosowano z powodzeniem do analizy wybranych regionów chromosomowych, całych chromosomów lub całych genomów. Dotychczas największe zastosowanie znalazły mikromacierze BAC-owe zawierające ok. 3 tysiące klonów, które umożliwiają analizę całego genomu z rozdzielczością ok. 1 mpz. Znacznie rzadziej stosowano mikromacierze z ponad 30.000 klonów BAC pokrywającymi cały genom (*tiling path arrays*).

Wykorzystanie array CGH w diagnostyce klinicznej

W ostatnich 10-15 latach okazało się, że wiele chorób powstaje w wyniku często niewidocznych w mikroskopie świetlnym rearanżacji genomowych. Lupski (1998) określił te nieprawidłowości mianem chorób genomowych (*genomic disorders*). Fenotyp kliniczny tych chorób jest konsekwencją nieprawidłowej ilości białka kodowanego przez wrażliwy na dawkę gen, zlokalizowany w regionie genomu, który uległ rearanżacji.

Ogromny postęp w rozwoju technik biologii i cytogenetyki molekularnej oraz zastosowanie komputerowej analizy porównawczej sekwencji DNA poznanych dzięki zsekwenjonowania genomu człowieka umożliwiły odkrycie specyficznych struktur DNA. Struktury te określono jako segmentalne duplikacje lub kopie sekwencji DNA o niskiej częstości powtórzeń (*low-copy repeats*, LCRs). Okazało się, że czynią one niektóre regiony naszego genomu szczególnie podatnymi na rearanżacje genomowe. Przez wiele lat pozostawały one poza zakresem rozdzielczości tradycyjnych metod biologii molekularnej i cytogenetyki konwencjonalnej. Dopiero zastosowanie technik FISH i array CGH umożliwiło analizę oraz identyfikację tego typu nieprawidłowości.

Metoda array CGH w ciągu ostatnich kilku lat rewolucjonizuje cytogenetykę kliniczną. Wykorzystywana była ona głównie w diagnostyce klinicznej pacjentów z niepełnosprawnością intelektualną, cechami dysmorfii, wrodzonymi wadami lub autyzmem. U tych pacjentów metody prążkowego barwienia chromosomów wykazują aberracje chromosomowe stwierdza się w ok. 3-4% przypadków. Analiza regionów subtelomerowych umożliwia identyfikację nieprawidłowości chromosomowych w dalszych ok. 5-6% przypadków. Tak więc, za pomocą obu tych metod aberracje chromosomowe można wykryć w ok. 8-10% pacjentów z niepełnosprawnością intelektualną. W zależności od zastosowanych kryteriów włączenia do badań, metoda CGH do mikromacierzy umożliwiła wykrycie rearanżacji chromosomowych u dalszych 5-17% pacjentów (z prawidłowym kariotypem i testem subtelomerowym).

Produkcja mikromacierzy BAC-owych konstruowanych głównie w ośrodkach akademickich jest kosztowna i czasochłonna. Przyszłość metody array CGH wiąże się z technologią oligonukleotydową, która umożliwia drukowanie lub syntetyzowanie na jednym szkiełku podstawowym setek tysięcy oligonukleotydów (średnio o długości ok. 60 nukleotydów). Sondy oligonukleotydowe można wybierać z fragmentów genomu wolnych od sekwencji powtarzających się, co umożliwia znaczne zmniejszenie lub nawet

wyeliminowanie kosztownego Cot-1 DNA stosowanego w macierzach BAC-owych do kompetycyjnego tłumienia niespecyficznych sekwencji DNA powtarzających się o dużej częstości.

Obecnie są już dostępne komercyjnie mikromacierze z kilkuset tysiącami oligonukleotydów, np. firm Agilent lub NimbleGen. Innym rodzajem są mikromacierze z oligonukleotydami do identyfikacji SNPs np. firm Affymetrix lub Illumina. W porównaniu do array CGH macierze SNP-owe umożliwiają dodatkowo wykrywanie disomii jednorodzielskich, określanie pochodzenia rodzicielskiego stwierdzanych nieprawidłowości lub wykrywanie zanieczyszczenia komórkami maczynymi w badaniu prenatalnym. Duża liczba oligonukleotydów oraz zastosowanie odpowiedniej analizy statystycznej sprawiły, że mikromacierze oligonukleotydowe mają większą czułość i rozdzielczość niż mikrocchipy BAC-owe. Wydaje się, że w najbliższym czasie zastąpią one technologie BAC-ową.

Technika CGH do mikromacierzy okazała się również przydatna do identyfikacji genów patogennych. Vissers i wsp. (2004) zastosowali całogenomową mikromacierz BAC-ową w grupie pacjentów z zespołem CHARGE. W jednym przypadku zidentyfikowali mikrodelecję w regionie 8q12 zawierającą gen *CHD7*. U części pacjentów znaleziono mutacje punktowe w tym genie wykazując, że gen ten jest odpowiedzialny za zespół CHARGE. Stosując technikę array CGH trzy niezależne zespoły zidentyfikowały nową powtarzającą się submikroskopową mikrodelecję w chromosomie 17q21.31. Ocenia się, że mapujący się w niej gen *MAPT* może być odpowiedzialny za 1% przypadków niepełnosprawności intelektualnej.

Jednym z ważnych efektów zastosowania techniki CGH do mikromacierzy było odkrycie, że genomy ludzi różnią się między sobą fragmentami DNA o wielkości nawet kilkuset tysięcy par zasad. Zmiany te określono jako zmienność liczby kopii fragmentów DNA (CNV) (*copy-number variation*). Kopie CNV zidentyfikowano w ponad 1.500 regionach genomu o łącznej długości 360 mpz. Stanowią one 12% naszego genomu czyli więcej niż suma wszystkich znanych polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (tzw. SNPs). Ocenia się, że rearanżacje DNA w większym stopniu niż zmiany pojedynczych nukleotydów mogą być odpowiedzialne za ewolucję gatunku człowieka, zmienność osobniczą, a może również za podatność i/lub powstawanie chorób.

Interpretacja wyników uzyskanych metodą array CGH

Wysoka częstość występowania kopii CNVs w genomie człowieka utrudnia interpretację wyników badań metodą array CGH. Większość kopii CNV jest prawdopodobnie wariantami polimorficznymi i nie manifestuje się fenotypowo. Tylko niektóre z nich są odpowiedzialne za powstawanie chorób o dziedziczeniu mendelowskim, cech wielogenowych lub niechorobowych cech fenotypowych, włącznie z cechami zachowania (osobowości). W ocenie czy stwierdzona zmiana jest patogenna, bardzo przydatne jest określenie jej pochodzenia (najczęściej za pomocą FISH lub array CGH). Z rzadkimi wyjątkami (np. w zespole mikrodelecji 22q11.2), zmiany odziedziczone od rodziców ocenia się jako łagodne polimorfizmy a zmiany *de novo* jako potencjalnie patogene. Drugim przydatnym kryterium jest wielkość kopii CNV. Zmiany o wielkości powyżej 1-2 mpz oceniane są jako prawdopodobnie patogene a zmiany poniżej 500 kbp są raczej polimorfizmami. W interpretacji kopii CNV korzysta się również coraz częściej z internetowych baz danych, w których gromadzone są identyfikowane warianty polimorficzne.

W celu zminimalizowania wpływu kopii CNV na wynik badania metodą array CGH skonstruowano tzw. mikromacierze selektywne (*targeted arrays*) z sondami swoistymi tylko do regionów związanych z określonymi znanymi chorobami genomowymi (Ryc. 2). Ocenia się, że mikromacierze selektywne umożliwiają wykrywanie nieprawidłowości u ok. 6-10% pacjentów z idiopatyczną niepełnosprawnością intelektualną a mikromacierze o rozdzielczości 1 mpz lub pokrywające cały genom w ok. 10-15% przypadków.

Trudności interpretacyjne wynikające z obecności kopii CNVs są główną przyczyną ograniczonego zastosowania metody

Wady i zalety metody array CGH

Główną zaletą metody array CGH jest możliwość jednoczesowej analizy całego genomu równoważnej z setkami lub nawet tysiącami pojedynczych testów metodą FISH. Metoda array CGH umożliwia wykrywanie praktycznie wszystkich widocznych oraz submikroskopowych nie równoważonych aberracji chromosomowych. Do badań nie są wymagane dzielące się komórki dzięki czemu można analizować np. materiał pośmiertny. W przypadku małej ilości materiału do badań może być on namnażany. Kierując na badanie metodą array CGH lekarz nie musi być doświadczonym dysmorfologiem. Ponadto, analiza genomu tą metodą nie jest tak czasochłonna jak np. niejednokrotnie w badaniu metodą FISH.

Jedną z największych zalet metody array CGH okazała się możliwość wykrywania mozaikowości nieidentyfikowalnych w konwencjonalnych badaniach cytogenetycznych. W metodzie array CGH genomowe DNA izolowane jest ze wszystkich jądrzastych komórek krwi podczas gdy w rutynowych badaniach metodami prążkowymi analizuje się chromosomy limfocytów T, które wcześniej za pomocą stymulacji fitohemaglutyniną zostały pobudzone do podziałów mitotycznych. W badaniach dużej grupy pacjentów z zastosowaniem metody array CGH stwierdzono obecność mozaikowości chromosomowej aż w 8% przypadków. Odsetek nieprawidłowych komórek zawierał się w przedziale 3-77%. Wśród wykrytych nieprawidłowości opisywano monosomie i trisomie całych chromosomów, chromosomy markerowe oraz delecje interstycjalne i terminalne (również submikroskopowe).

Array CGH okazała się również bardzo przydatna do identyfikacji miroduplikacji chromosomowych (np. regionów zespołów DiGeorge, Pradera i Williego/Angelmana, Smith i Magenis, regionu 1p36 oraz genu *MECP2*), które czasami nie były wykrywane w badaniu metodą FISH z powodu ograniczonej rozdzielczości chromosomów metafazowych i/lub nieuwzględnienia w badaniu jąder interfazowych. Ponadto, w regionach subtelomerowych identyfikowano nie równoważenia interstycjalne, które nie mogły być wykryte za pomocą tradycyjnego testu subtelomerowego FISH.

Podstawową wadą metody array CGH jest niemożność wykrywania równoważonych aberracji chromosomowych (z równoważone translokacje chromosomowe występują z częstością 1/500 zdrowych osób) oraz większości aneuploidii (z wyjątkiem 69,XXY lub 69,YYY). Dla wielu laboratoriów problemem jest wysoki koszt badania (szczególnie niezbędnego do badań tą metodą skanera), jakkolwiek metoda podlega automatyzacji i wraz z jej upowszechnieniem, badania powinny być ono niedługo tańsze od konwencjonalnej analizy kariotypu.

Podsumowanie

Najnowsza technika cytogenetyki molekularnej, porównawcza hybrydizacja genomowa (array CGH) od kilku lat rewolucjonizuje badania diagnostyczne. Umożliwia ona analizę całego genomu po kątem identyfikacji nie równoważonych aberracji chromosomowych w jednym badaniu z nieosiągalną dotychczas rozdzielczością. Wieloośrodkowe badania pacjentów z niepełnosprawnością intelektualną i/lub cechami dysmorfii oraz prawidłowym kariotypem z wykorzystaniem różnych wariantów array CGH wykazały obecność submikroskopowych nie równoważonych rearanżacji genomowych w 5-17% przypadków. Nieoczekiwanie, kilka identyfikowanych patogennych nieprawidłowości stanowią zmiany mozaikowe niemożliwe do wykrycia za pomocą konwencjonalnych metod analizy kariotypu. Dostępne komercyjnie mikromacierze oligonukleotydowe z ponad 300.000 zsyntetyzowanych sond oligonukleotydowych cechują się wyższą rozdzielczością i czułością niż stosowane dotychczas mikromacierze BAC-owe i w najbliższej przyszłości będą je zastępować.

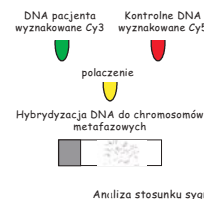
Piśmiennictwo

Cheung SW i wsp. Development and validation of a CGH microarray for clinical cytogenetic diagnosis. Genet. Med. 2005, 7:422-432.

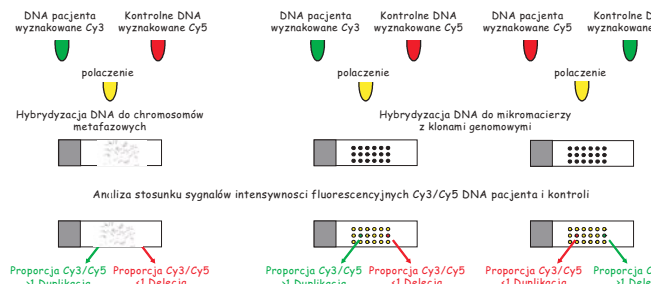
- de Vries BBA i wsp. Diagnostic genome profiling in mental retardation. Am.J. Hum. Genet. 2005, 77:606-616.
- Friedman J. M. i wsp. Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation. Am.J Hum.Genet. 2006, 79:500-513.
- Menten B i wsp. Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalances in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of the literature. J. Med. Genet. 2006.
- Redon R i wsp. Global variation in copy number in the human genome. Nature 2006, 444:444-454.
- Shaw-Smith C i wsp. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. J. Med. Genet. 41:241-248.

Rycina 1. Zasada techniki CGH i array CGH. W konwencjonalnej CGH jako matrycę wykorzystuje się chromosomy metafazowe. W technice CGH do mikromacierzy zamiast chromosomów metafazowych stosowane są fragmenty DNA (np. klony genomowe BAC) przymocowane do szkiełka podstawowego a analizowane genomowe DNA badanego pacjenta i DNA referencyjne znakuje się odmiennie i ko-hybrydyzuje w odwrotnych kombinacjach. Nadmiar lub brak fragmentu genomu widoczny jest jako odchylenie od oczekiwanego koloru fluorescencyjnego, który występuje, uzyskiwane wtedy gdy jest taka sama ilość odpowiednich fragmentów obu analizowanych DNA (1:1).

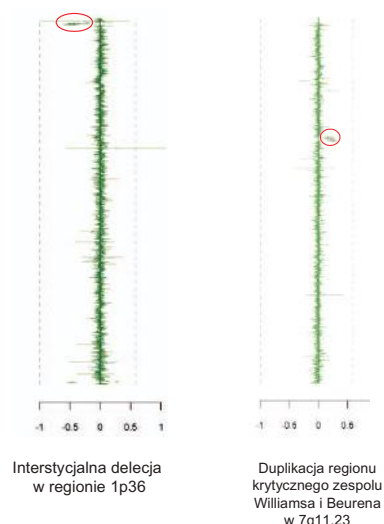
Konwencjonalne CGH



Array CGH



Rycina 2. Przykłady wyników badań metodą array CGH z wykorzystaniem technologii BAC-owej (wersja 5.0 macierzy selektywnej Baylor College of Medicine). Po lewej stronie przedstawiono wynik interstycjalnej delecji w regionie 1p36, która nie została wykryta za pomocą subtelomerowego testu metodą FISH. Po prawej stronie pokazano wynik wzajemnej mikroduplikacji regionu typowej mikrodelecji zespołu Williamsa i Beurena. Mikroduplikacje czasami nie są wykrywane w badaniu metodą FISH z powodu ograniczonej rozdzielczości chromosomów metafazowych i/lub nieuwzględnienia w badaniu jąder interfazowych



**CENTRUM KSZTAŁCENIA PODYPŁOMOWEGO
FUNDACJI ROZWOJU DIAGNOSTYKI LABORATORYJNEJ**
ul. Bociana 22, 31-231 Kraków
tel./fax. 012 61 45 238

NOWE KURSY W 2007 ROKU

TYTUŁ/ Kierownik naukowy	TERMINY
„Zasady organizacji pracy i zarządzania laboratorium. Systemy jakości” prof. dr hab. Jerzy W. Naskalski	05.02-07.02.2007 16.04-18.04.2007
„Wybrane zagadnienia z laboratoryjnej diagnostyki endokrynologicznej” prof. dr hab. Jerzy W. Naskalski	19.02-22.02.2007 23.04-26.04.2007 18.06-21.06.2007 17.09-20.09.2007

KONTYNUACJA KURSÓW

TYTUŁ/ Kierownik naukowy	TERMINY
„Hematologia laboratoryjna w praktyce” prof. dr hab. Milena Dąbrowska	12.02-15.02.2007
„Postępy w zakresie patogenezy, rozpoznawania, zapobiegania i leczenia powikłań cukrzycy” prof. dr hab. Jacek Sieradzki	15.01-17.01.2007 12.03-14.03.2007 15.10-17.10.2007 19.11-21.11.2007
„Wybrane zagadnienia z diagnostyki biochemicznej chorób nowotworowych” prof. dr hab. Jan Kanty Kulpa	15.01-18.01.2007 19.03-22.03.2007 14.05-17.05.2007
„Badania laboratoryjne dla oddziałów intensywnej terapii i medycyny ratunkowej” prof. dr hab. Jerzy W. Naskalski	12.02-14.02.2007

Szczegółowe informacje o programie i sposobie organizacji dostępne są w biurze Centrum Szkolenia Podypłomowego Fundacji Rozwoju Diagnostyki, ul. Bociana 22, 31-231 Kraków, tel. 012 61 45 238 w godzinach od 9.00 do 17.00 oraz na stronie internetowej www.diaglab.pl

**Współczesne możliwości cytogenetyki klinicznej w
diagnostyce chorób genetycznych**

Prof. dr hab. Ewa Bocian
Zakład Genetyki Medycznej
Instytut Matki i Dziecka w Warszawie

Cytogenetyka kliniczna stanowiąc od wielu już lat integralną część genetyki medycznej, zajmuje się identyfikacją i charakterystyką aberracji chromosomowych oraz badaniem ich roli w patologii człowieka. Podwaliny tej dziedziny genetyki powstały w latach 70. kiedy to opracowane zostały metody prążkowego barwienia chromosomów umożliwiające analizę kariotypu. Rozwój tych metod analizy chromosomów zaowocował bogatą dokumentacją związku przyczynowo-skutkowego pomiędzy obecnością różnych, często niewielkich aberracji chromosomowych i specyficznymi zespołami cech klinicznych stwierdzanych u pacjentów. Od tego czasu badania cytogenetyczne stały się jednym z podstawowych elementów procesu diagnostycznego chorób genetycznych. Stanowią podstawę rozpoznania klinicznego choroby, umożliwiają identyfikację rodzin ryzyka genetycznego, a także służą poznawaniu patomechanizmu i podłoża molekularnego tych chorób. Rozpoznawane w badaniu kariotypu aberracje chromosomowe, należą bowiem do tych zmian genomu, które, jak miało to miejsce po raz pierwszy w przypadku dystrofii mięśniowej Duchenne'a, umożliwiają niejednokrotnie mapowanie genów warunkujących chorobę.

Dokonania poznawcze i możliwości diagnostyczne cytogenetyki klinicznej wynikają z rozwoju metod biologii molekularnej oraz postępu technologicznego. Opracowanie i wdrożenie do badań nowych technik cytogenetycznych wykorzystujących metody biologii molekularnej zaowocowało powstaniem nowej, ciągle rozwijającej się dziedziny cytogenetyki molekularnej. Metody badawcze cytogenetyki molekularnej stanowią obecnie niezbędne uzupełnienie prążkowych metod oceny kariotypu określanych mianem klasycznych lub konwencjonalnych. Umożliwiają one identyfikację i charakterystykę tych wszystkich aberracji, które dotychczas sprawiały problemy diagnostyczno interpretacyjne w badaniach metodami klasycznymi. Dzięki nim poznajemy także coraz lepiej etiologię i patomechanizmy chorób dziedzicznych.

Aspekty kliniczne aberracji chromosomowych

Aberracje chromosomowe, których ekspresja kliniczna dotyczy zazwyczaj zaburzeń funkcji wielu narządów i układów oraz wyraża się szerokim spektrum objawów, stanowią problem kliniczny w każdej niemal specjalności medycznej. Skutki kliniczne aberracji chromosomowych wynikają z braku równowagi genetycznej, której przyczyną jest zwykle zmiana dawki genów i zaburzenie ich funkcji regulacyjnych. W związku z tym aberracje zrównoważone tzn. takie, których powstawaniu nie towarzyszy utrata lub zwiększenie ilości materiału chromosomowego, nie mają zazwyczaj wpływu na cechy fenotypowe. Mogą natomiast zmniejszać zdolność do prokreacji manifestującą się najczęściej występowaniem poronień samoistnych we wczesnym okresie ciąży. U ~ 4-6% par małżeńskich z takimi problemami stwierdza się aberrację chromosomową. W skrajnych przypadkach aberracje te skutkują bezpłodnością. Ograniczenia zdolności do prokreacji wynikają z faktu, że większość aberracji jest letalna, o czym świadczy ich obecność w ok. 60% poronień samoistnych jak również i to, że stwierdza się je w ok. 6% przypadków martwych urodzeń i zgonów okołoporodowych. Aberracje chromosomowe stwierdzone są także u 5-20% dzieci urodzonych z mnogimi wadami rozwojowymi. Wśród żywo urodzonych noworodków występują z częstością 1/200. Obecność zrównoważonej aberracji chromosomowej może także zwiększać ryzyko wystąpienia nie zrównoważonej aberracji u potomstwa jej nosiciela. Polega ono zazwyczaj na obecności tzw. częściowej trisomii i monosomii fragmentów chromosomów objętych rearanżacją rodzicielską. Ryzyko urodzenia chorego dziecka w rodzinach nosicieli zrównoważonych aberracji chromosomowych zależy od rodzaju aberracji, wielkości chromosomu lub fragmentu chromosomu objętego aberracją, czasami także od płci jej nosiciela.

Niezrównoważone aberracje chromosomów objawiają się zazwyczaj opóźnieniem rozwoju somatycznego, cechami dysmorfii w

budowie ciała, mnogimi wadami rozwojowymi oraz niepełnosprawnością intelektualną. Zespół wymienionych cech klinicznych stanowi więc wskazanie do wykonania badania cytogenetycznego (Tab.1). Nawet jednak wtedy, gdy specyficzna konstelacja cech fenotypowych umożliwia rozpoznanie kliniczne określonego zespołu chromosomowego (np. zespołów Downa, Turnera, Pradera-Williego czy cri du chat) bezwzględnie konieczne jest potwierdzenie rozpoznania badaniem kariotypu pacjenta. Natomiast wskazaniem do prenatalnej oceny kariotypu płodu jest większe od populacyjnego, ryzyko urodzenia dziecka z aberracją chromosomową. Ryzyko takie pojawia się przede wszystkim wtedy gdy matka ma więcej aniżeli 35 lat lub jedno ze współmałżonków jest nosicielem zrównoważonej aberracji chromosomowej. Wskazaniem do prenatalnej oceny kariotypu są także: aneuploidia u dziecka z poprzedniej ciąży, wady rozwojowe stwierdzone u płodu w badaniu USG oraz nieprawidłowe wyniki badań przesiewowych w surowicy matki.

Tabela 1. Wskazania do oznaczenia kariotypu

- Cechy fenotypowe określonego zespołu chromosomowego
- Zespół wad rozwojowych i/lub cechy dysmorfii oraz opóźnienie rozwoju psychoruchowego
- Zaburzenia rozwoju cielesno - płciowego
- Niepowodzenia rozrodo
- Występowanie strukturalnej aberracji chromosomowej w rodzinie

Klasyczne metody oceny kariotypu możliwości i ograniczenia diagnostyczne

Specyfika badań cytogenetycznych polega przede wszystkim na konieczności prowadzenia hodowli komórkowych umożliwiających uzyskanie dzielących się komórek w stadium metafazy, oraz trudnej, wymagającej dużego doświadczenia, mikroskopowej analizie specyficznym wybarwionych chromosomów. W przypadku badań prenatalnych łączy się także z ograniczonymi możliwościami pozyskiwania materiału do badań i weryfikacji uzyskanego wyniku jak również z koniecznością jak najszybszego otrzymania wyniku diagnostycznego. Metody cytogenetyki klasycznej polegają na specyficznym, prążkowym barwieniu chromosomów lub specyficznym regionów i struktur chromosomowych, umożliwiającym identyfikację poszczególnych chromosomów oraz rozpoznawanie i charakterystykę ich nieprawidłowości (Fot.1). Najczęściej stosowana jest technika uzyskiwania prążków G określaną symbolem GTG (prążki G uzyskiwane przez trawienie chromosomów trypsyną i barwienie odczynnikiem Giemsy). Obraz prążkowy chromosomów stanowi odzwierciedlenie ich strukturalnego i funkcjonalnego zróżnicowania. Liczba uzyskanych w standardowym badaniu kariotypu prążków (zazwyczaj 450-550, a przy zastosowaniu określonej metody 850 w 23 chromosomach) decyduje o czułości metody badania i w efekcie o wielkości rozpoznawanych aberracji. Im większa jest liczba prążków (tzw. rozdzielczość prążkowa) tym mniejszy defekt chromosomowy może być zidentyfikowany (Tabela 2).

Tabela 2 Czułość i rozdzielczość metod cytogenetyki klasycznej

Rozdzielczość prążkowa	Wielkość wykrywanej aberracji w milionach par zasad (Mpz)
400	10
550 - 850	5 - 3
Wielkość	całego genomu człowieka ~ 3000 przeciętnego chromosomu ~ 50 prążka chromosomowego ~ 3-7,5

Wynik badania cytogenetycznego i jego interpretacja

Nieprawidłowy wynik badania cytogenetycznego stwierdza się w ok. 10-30% badań postnatalnych i w 3-5% przypadków prenatalnej oceny kariotypu. Interpretacja wyniku nie sprawia trudności w przypadku stwierdzenia aberracji chromosomowej, która odpowiada określonemu zespołowi klinicznemu lub może być przyczyną obserwowanych u chorego objawów klinicznych. Trudności interpretacji klinicznej powstają natomiast wtedy, gdy mimo nieprawidłowego fenotypu pacjenta, czasami nawet objawów klinicznych określonego zespołu chromosomowego, stwierdzony zostanie prawidłowy kariotyp lub zrównoważona aberracja chromosomowa. W obu tych przypadkach istnieje prawdopodobieństwo obecności u chorego bardzo małej, submikroskopowej aberracji, dla wykrycia której czułość rutynowej metody oceny kariotypu nie była wystarczająca. Problemy diagnostyczno-interpretacyjne wyników badań cytogenetycznych dotyczą także identyfikacji dodatkowego materiału chromosomowego oraz złożonych translokacji chromosomowych. W tych przypadkach aberracja zostaje wykryta, nie ma natomiast możliwości pełnej charakterystyki nieprawidłowości. Brak precyzyjnie zdefiniowanego kariotypu uniemożliwia wówczas określenie zależności pomiędzy stwierdzoną aberracją a zespołem cech fenotypowych u chorego. Niewykrycie natomiast obecnej u pacjenta submikroskopowej aberracji chromosomowej uniemożliwia ustalenie pełnej i wiarygodnej diagnozy.

Ograniczenia diagnostyczne (dotyczące skuteczności i wiarygodności) badań cytogenetycznych prowadzonych metodami konwencjonalnymi wynikają, ogólnie rzecz ujmując, z trzech przyczyn. Pierwsza z nich to niedostateczna czułość i rozdzielczość tych metod do wykrywania małych i/lub submikroskopowych aberracji. Kolejne dotyczą subiektywizmu oceny uzyskanego wzoru prążkowego chromosomów i nie zawsze wystarczającego zróżnicowania tego obrazu do rozpoznania lub pełnej charakterystyki aberracji chromosomowych. Dobrym przykładem tych ograniczeń diagnostycznych są regiony telomerowe chromosomów. Barwią się one jasno metodą GTG i nie wykazują, swoistego dla poszczególnych chromosomów, zróżnicowania prążkowego, co decyduje zazwyczaj o braku możliwości rozpoznania małych rearanżacji w obrębie tych regionów. Opracowanie w latach 80. metody hybrydyzacji *in situ*, a następnie wdrożenie tej techniki i wielu jej odmian do badań cytogenetycznych, umożliwiło bardziej skuteczną i wiarygodną diagnostykę aberracji chromosomowych. Metody te nie tylko poszerzyły znacznie możliwości diagnostyczne i poznawcze badań cytogenetycznych ale także zaowocowały rozstrzygnięciem wielu problemów diagnostyki klinicznej chorób dziedzicznych.

Metody cytogenetyki molekularnej

Podstawową metodą cytogenetyki molekularnej stosowaną w diagnostyce zespołów chromosomowych jest fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH od ang. fluorescence *in situ* hybridization). Umożliwia ona wykrywanie specyficznych sekwencji DNA w chromosomach, jądrach interfazowych lub skrawkach tkanek znajdujących się w preparatach cytologicznych. W określonych warunkach sonda molekularna (specyficzny fragment DNA) tworzy kompleks (hybrydyzuje) z komplementarnym do niej fragmentem chromosomu. Zależnie od rodzaju zastosowanej sondy „rozpoznaje” ona tylko określony, niewielki fragment chromosomu lub jego struktury (np. centromer, telomer), lub też cały chromosom. Kompleks sondy z DNA chromosomowym wykrywany jest następnie w mikroskopie fluorescencyjnym. Mikroskopowa detekcja miejsca hybrydyzacji sondy możliwa jest dzięki wyznakowaniu jej bezpośrednio barwnikiem fluorochromowym lub poprzez modyfikacje chemiczne np. biotyną lub digoksygeneiną. Te ostatnie sondy wykrywane są w reakcji immunocytochemicznej z przeciwciałami sprzężonymi z fluorochromem. Zastosowanie sond wyznakowanych różnymi fluorochromami emitującymi fluorescencję w różnych kolorach (tzw. wielobarwna FISH) umożliwia równoczesną identyfikację kilku

Sekwencji DNA w jednej komórce.

Analiza cytogenetyczna metodą FISH jest bardzo prosta i polega na stwierdzeniu obecności (lub braku), ocenie wielkości, liczby oraz lokalizacji sygnału fluorescencyjnego sondy w chromosomach.

W związku z tym, że stosowane w badaniu metodą FISH sondy muszą mieć określoną specyficzność, metoda ta umożliwia identyfikację tylko tych aberracji chromosomowych, których obecność lub lokalizacja w genomie została już wcześniej stwierdzona innymi metodami. A zatem jest to metoda uzupełniająca klasyczną analizę prążkową chromosomów i nie może zastąpić jej w ocenie kariotypu.

Wśród licznych modyfikacji podstawowej techniki FISH wykorzystywanych w diagnostyce cytogenetycznej wymienić należy przede wszystkim techniki M-FISH i SKY, (ang. *multiplex FISH* i *spectral karyotyping*) oraz porównawczą hybrydyzację genomową (CGH, ang. *comparative genomic hybridization*). Metody te umożliwiają analizę całego genomu w jednym badaniu. W tzw. wielobarwnym kariotypowaniu chromosomy identyfikowane są przy pomocy sond molekularnych wyznakowanych mieszaniną kilku fluorochromów stosowanych w różnych kombinacjach lub proporcjach ilościowych. W wyniku analizy widmowej fluorescencji poszczególnych chromosomów (z wykorzystaniem zestawu odpowiednich filtrów lub spektrofotometru), dokonywanej w komputerze, nadawane są im sztuczne barwy. Każdy z 24 chromosomów uwidoczniiony jest w innym kolorze. Ocena kariotypu tą metodą polega więc na analizie barwnego, a nie prążkowego obrazu chromosomów. Ta metoda wykorzystywana jest zarówno do niezwykle trudnej technicznie diagnostyki licznych i złożonych aberracji występujących w komórkach nowotworowych jak też do rozpoznawania aberracji konstytucyjnych, szczególnie złożonych rearanżacji, chromosomów markerowych czy innych addycji nieznanego pochodzenia. Podstawowym ograniczeniem tej metody badawczej jest stosunkowo mała czułość oraz brak możliwości identyfikacji, nie manifestujących się zmianą koloru, aberracji powstających w obrębie jednego chromosomu.

Technika CGH (ang. *comparative genome hybridization*) umożliwia wykrywanie zmian w chromosomach o charakterze delecji, duplikacji oraz amplifikacji. Polega na hybrydyzacji mieszaniny, wyznakowanego (w różnych kolorach) DNA komórki badanej i komórki referencyjnej do prawidłowych chromosomów w preparacie cytologicznym. Komputerowa, ilościowa analiza fluorescencji DNA komórki badanej i referencyjnej wzdłuż poszczególnych chromosomów umożliwia uzyskanie profili względnej intensywności fluorescencji dla każdego chromosomu. Jeśli w badanym DNA pacjenta nie ma nieprawidłowości to mieszczą się one w określonym zakresie tzw. wartości progowych (0.75-1.25). Delecje lub amplifikacje określonych sekwencji DNA chromosomowego skutkują zmniejszeniem lub zwiększeniem uzyskanych dla nich wartości względnej fluorescencji w stosunku do wartości referencyjnych. Następuje wówczas przesunięcie profilu intensywności fluorescencji tych regionów chromosomowych poza wartości progowe. W udoskonalonej wersji tej techniki badawczej (określanej jako HR-CGH od ang. *high resolution-CGH*) dzięki zastąpieniu sztywnych progów referencyjnych, identycznych dla każdego chromosomu, tzw. profilami dynamicznymi, specyficznymi dla każdego z chromosomów, uzyskano zwiększenie czułości metody z ~ 10 Mbp do ~ 3 Mbp. Nową, rozwijaną obecnie modyfikacją techniki CGH jest CGH do mikromacierzy (ang. *array CGH* - aCGH). Różni ją od klasycznej metody CGH tym, że mieszanina DNA badanego i referencyjnego hybrydyzowana jest nie do chromosomów metafazowych, lecz do zmapowanych wcześniej i umieszczonych na płycie klonów genomowych (określonych sekwencji DNA). Mikromacierze mogą być konstruowane dla pojedynczych chromosomów, specyficznych regionów chromosomowych lub też dla całego genomu komórki. Zastosowany w mikromacierzy zestaw klonów, ich wielkość oraz odległość między nimi w genomie decydują o możliwościach diagnostycznych, czułości i rozdzielczości metody. Stosowane obecnie mikromacierze mają rozdzielczość w zakresie od 1 Mbp-100 Kbp, a nawet do 10 Kbp. Tak więc metoda ta umożliwia analizę kariotypu z precyzją nieosiągalną dotychczas innymi metodami.

Współczesne możliwości cytogenetyki klinicznej w diagnostyce chorób genetycznych

Dostępne komercyjnie tzw. mikromacierze kliniczne umożliwiają identyfikację w jednym teście diagnostycznym mikrodelecji odpowiedzialnych za wszystkie znane zespoły mikrodelecyjne, rozpoznanie aberracji subtelomerowych oraz innych, znanych defektów genomu warunkujących choroby genetyczne.

Technika CGH znalazła wykorzystanie zarówno w cytogenetyce onkologicznej jak też do analizy kariotypu konstytucyjnego. Podstawową zaletą metody CGH jest możliwość analizy kariotypu bez potrzeby hodowli komórek i sporządzania z nich preparatów chromosomowych. Jest to szczególnie istotne dla badań komórek nowotworowych o małej aktywności proliferacyjnej. Wadą tej metody badawczej jest brak możliwości identyfikacji aberracji zrównoważonych, np. charakterystycznego dla przewlekłej białaczki szpikowej chromosomu Philadelphia [t(9;22)].

Przykłady wykorzystania możliwości diagnostycznych techniki FISH w praktyce klinicznej

Jak już wspomniano wcześniej wprowadzenie do badań cytogenetycznych techniki FISH znacznie poszerzyło możliwości diagnostyczne tych badań. Ta metoda analizy chromosomowej stanowi niezbędne uzupełnienie prążkowych metod oceny kariotypu konstytucyjnego jak też komórek nowotworowych (Tab.3). W zespołach mikrodelecji / mikroduplikacji FISH stosowana jest od wielu już lat jako metoda z wyboru (tabela 4, Fot.2a).

Tabela 3. Zakres wykorzystania techniki FISH w diagnostyce chorób dziedzicznych

- Wykrywanie submikroskopowych aberracji chromosomowych
- Identyfikacja dodatkowego materiału chromosomowego
- Precyzyjna charakterystyka złożonych aberracji chromosomowych
- Szybka diagnostyka najczęstszych aneuploidii chromosomów 13, 18, 21 oraz X i Y

Tabela 4. Wybrane zespoły mikrodelecji / mikroduplikacji chromosomowych

Zespół	Delecja /duplikacja
● Monosomii 1p36	1p36.3
● Wolfa-Hirschhorna	4p16.3
● Cri du chat	5p15.3
● Williamsa	7q11.23
● Beckwitha Wiedemanna	dup11p15.5
● Pradera i Williego/Angelmana	15q11q13
● Rubinstein Taybi	16p13.3
● Millera i Dieckera	17p13.3
● Smitha i Magenis	17p11.2
● Charcot Marie Tooth 1A	dup 17p11.2
● DiGeorgea/VCFS	22q11.2
● Monosomii 22q13	22q13.3
● Kallmanna	Xp22.3

Diagnostyka cytogenetyczna tych zespołów ma szczególne znaczenie dla weryfikacji, nie zawsze jednoznacznego, rozpoznania klinicznego. Charakterystyczne dla zespołów mikrodelecji szerokie spektrum zmienności objawów jest podstawową przyczyną trudności w ich diagnostyce. Zarówno w różnych zespołach jak i poszczególnych przypadkach określonego zespołu, delecje mogą się różnić wielkością od submikroskopowych do dużych, widocznych w badaniu kariotypu metodami klasycznymi.. Skuteczność i wiarygodność wyniku prążkowej oceny kariotypu zależy w tych sytuacjach diagnostycznych od wielkości delecji występującej w danym przypadku czy zespole. Dlatego tylko badanie metodą FISH z zastosowaniem specyficznej sondy molekularnej (rozpoznającej krytyczny dla zespołu region chromosomu) zapewnia skuteczną identyfikację delecji a tym samym

pełną diagnostykę choroby

Dzięki technice FISH odkrytych zostało wiele nowych zespołów mikrodelecyjnych, dla wielu także ustalono minimalną wielkość defektu chromosomowego warunkującego określony zespół kliniczny. Analiza zróżnicowanego obrazu klinicznego pacjentów z tym samym zespołem i różną wielkością stwierdzonego defektu chromosomowego umożliwiła przypisanie poszczególnych cech zespołu określonym miejscom w chromosomie. Wyjaśniona została w ten sposób zmienność fenotypowa takich zespołów mikrodelecyjnych jak: Pradera-Williego i Angelmana, Cri du chat, monosomii 1p36, czy też zespół uwarunkowanych rearanżacjami chromosomu 17p. Poznane zostało także podłoże zmienności fenotypowej zespołu Wolfa-Hirschhorna uwarunkowanego delecją chromosomu 4p. Okazało się bowiem, że w wielu przypadkach nieprawidłowy chromosom 4 stwierdzony u chorego dziecka jest produktem translokacji wzajemnej t(4;8) pochodzenia matczynego. U dziecka obecna jest w takich przypadkach monosomia 4p i trisomia fragmentu chromosomu 8p.

Drugi, nie mniej spektakularny przykład korzyści diagnostycznych i poznawczych jakie przyniosły metody cytogenetyki molekularnej stanowi identyfikacja submikroskopowych aberracji w regionach subtelomerowych chromosomów (Fot.2b). Aberracje te rozpoznawane są w około 5% przypadków niespecyficznej (o nieznanym etiologii) niepełnosprawności intelektualnej (NI). Jest to możliwe dzięki opracowaniu testu diagnostycznego zawierającego zestaw sond specyficznych dla regionów subtelomerowych 41 chromosomów. Umożliwia on analizę tych regionów i rozpoznawanie ich rearanżacji w jednym badaniu. Badania przeprowadzone w określonych klinicznie grupach pacjentów (tabela 5) wykazały, że aberracje te w około 30% przypadków mają charakter rodzinny. Możliwość ich wykrywania ma więc nie tylko znaczenie diagnostyczne i poznawcze lecz także stanowi podstawę dla profilaktyki choroby w rodzinie.

Tabela 5. Kryteria włączenia do badania regionów subtelomerowych

- Niepełnosprawność intelektualna (przypadki NI w rodzinie)
- Cechy dysmorfii i/lub drobne wady rozwojowe
- Prawidłowy kariotyp rutynowy
- Wykluczony zespół FraX
- Prawidłowy wynik podstawowego testu metabolicznego

Znakomitą ilustracją postępu jaki dokonał się w zakresie diagnostyki cytogenetycznej może być przypadek jednej z rodzin zarejestrowanych ponad 20 lat temu w Poradni Genetycznej naszego Zakładu. Powodem zgłoszenia był fakt urodzenia trojga dzieci z cechami głębokiego upośledzenia psychoruchowego i wadami rozwojowymi. Dopiero niedawno, dzięki zastosowaniu testu telomerowego opartego na technice FISH, u ojca tych dzieci stwierdzona została zrównoważona aberracja subtelomerowa. Nosicielem tej aberracji okazał się także dziadek chorych, zmarłych już dzieci i jak należy sądzić z analizy rodowodu wykazującego liczne przypadki NI w rodzinie także jego siostra.

Uzyskanie wyniku diagnostycznego umożliwiło więc udzielenie pełnej porady genetycznej tej rodzinie. Wśród niezaprzeczalnych korzyści jakie przyniosła możliwość analizy regionów subtelomerowych wymienić trzeba nie tylko wyjaśnienie przyczyn upośledzenia umysłowego w licznych przypadkach klinicznych ale także poznanie i/ lub charakterystykę nowych zespołów mikrodelecyjnych, których defekt zlokalizowany jest w tych regionach chromosomowych. Przykładem mogą tu być zespoły monosomii 1p36, 16p13.3 czy 22q13. Wśród wielu innych korzyści diagnostycznych jakie przyniosło zastosowanie FISH w badaniach cytogenetycznych trzeba wymienić możliwość identyfikacji dodatkowego materiału chromosomowego oraz bardziej skuteczną i

wiarygodną identyfikację złożonych rearanżacji chromosomowych (Fot.3)). Z klinicznego punktu widzenia szczególnie ważna jest możliwość identyfikacji niektórych regionów chromosomów płci (zwłaszcza chromosomu Y) w przypadkach zaburzeń różnicowania płciowego, obojactwa i różnych postaci dysgenezy gonad. U osób z cechami fenotypowymi zespołu Turnera i mozaikowym kariotypem wykazujących obecność chromosomów markerowych (występujących zamiast jednego chromosomu płci) właściwa identyfikacja tych chromosomów ma istotne znaczenie dla oceny ryzyka rozwoju procesu nowotworowego w gonadach (Fot.3a). Jest ono rzędu 30% jeśli u osoby z dysgenetycznymi gonadami w chromosomie markerowym obecny jest materiał chromosomu Y. Wynik badania metodą FISH stanowi więc podstawę do podjęcia określonego postępowania terapeutycznego zapobiegającego rozwojowi nowotworu. Dzięki tej metodzie analizy chromosomów można w niektórych przypadkach wyjaśnić przyczynę niezgodności płci fenotypowej z płcią chromosomalną. Można np. wykazać, że u chłopców z prawidłowym kariotypem żeńskim obecny jest (niewidoczny w badaniu klasycznym kariotypu) fragment krótkich ramion chromosomu Y.

Na zakończenie nie dającej się wyczerpać w tym miejscu długiej listy zastosowań techniki FISH w badaniach cytogenetycznych wymienić jeszcze należy możliwość szybkiej (w ciągu 1-2 dni) diagnostyki najczęstszych aneuploidii chromosomów 13, 18, 21 oraz X i Y. Chromosomy te mogą być identyfikowane metodą FISH w nie dzielących się komórkach interfazowych. Nie ma więc potrzeby hodowli komórek co skraca znacznie czas badania. Podkreślić jednak trzeba, że badanie to jest przydatne tylko w specyficznych sytuacjach klinicznych (np. w badaniach prenatalnych) wymagających szybkiego potwierdzenia obecności jednej z wymienionych aberracji.

Wśród nowych metod diagnostycznych, coraz szerzej stosowanych w ostatnich latach do identyfikacji nie zrównoważenia genomowego i wykorzystywanych także do szybkiej diagnostyki cytogenetycznej aneuploidii, aberracji regionów subtelomerowych czy innych aberracji submikroskopowych znalazły się niektóre metody biologii molekularnej jak np. MAPH (ang. Multiplex amplifiable probe hybridization), MLPA (ang. Multiplex ligation-dependent probe amplification) czy QF-PCR (ang. Quantitative fluorescent polymerase chain reaction). Badania wykonywane tymi metodami są znacznie prostsze, tańsze a także mniej pracochłonne aniżeli badania wykorzystujące technikę FISH.

Trudno przecenić dzisiaj znaczenie omówionych tutaj metod cytogenetyki molekularnej zarówno w diagnostyce klinicznej zespołów chromosomowych jak też niezwykle trudnej technicznie diagnostyce aberracji komórek nowotworowych. Na zakończenie warto może przytoczyć jeszcze wyniki badań przeprowadzonych metodami HR-CGH i a CGH w wymienionych wcześniej grupach pacjentów, u których standardowe badania cytogenetyczne nie rozstrzygnęły problemu diagnostycznego. Dotyczy to tych przypadków, w których obraz kliniczny pacjenta sugeruje aberrację chromosomową, a badanie cytogenetyczne wykazuje obecność zrównoważonej rearanżacji chromosomowej lub też prawidłowy kariotyp. Dzięki zastosowaniu tych nowych metod badawczych stwierdzono, że za znaczną część tych przypadków klinicznych, odpowiedzialne jest, zazwyczaj submikroskopowe, nie zrównoważenie genomu nie rozpoznane w standardowym badaniu cytogenetycznym (Fot.4). Odsetek takich przypadków (10-38% pacjentów ze zrównoważoną rearanżacją chromosomową i ~12% pacjentów z prawidłowym kariotypem) świadczy zarówno o skali problemów diagnostycznych jak też o wartości i przydatności nowoczesnych metod cytogenetyki i biologii molekularnej dla diagnostyki chorób dziedzicznych.

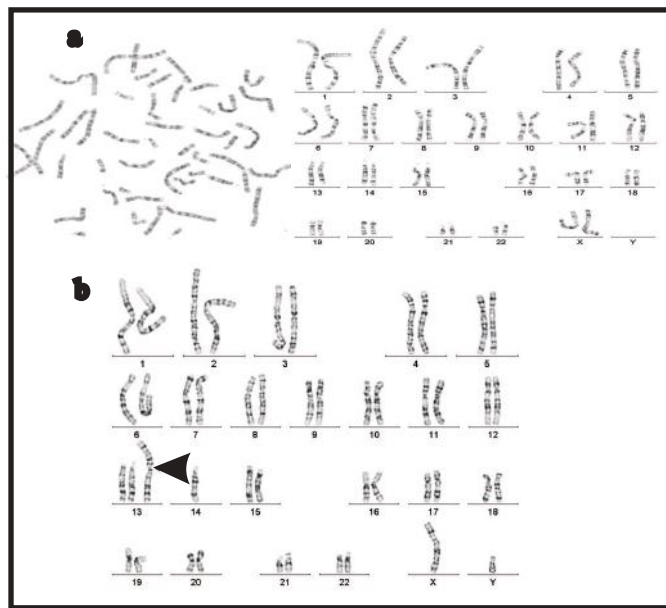
Podsumowanie

Chociaż w ostatnich latach jesteśmy świadkami kolejnego już przełomu technologicznego w zakresie diagnostyki klinicznej aberracji chromosomowych, to konwencjonalne metody analizy kariotypu mają nadal ważną rolę w procesie diagnostycznym.

Ani powstanie cytogenetyki molekularnej ani rozwijająca się obecnie technika porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy, umożliwiające analizę genomu z nieosiągalną dotychczas rozdzielczością, nie eliminują z procesu diagnostycznego

tradycyjnych metod cytogenetycznych. Wynika to z faktu, że żadna ze stosowanych dotychczas metod analizy chromosomów nie jest uniwersalna i wystarczająca do pełnej oceny kariotypu, tzn. do precyzyjnej identyfikacji wszystkich aberracji chromosomowych. Stałe doskonalenie metod cytogenetyki molekularnej sprawia, że coraz częściej rozpoznajemy aberracje chromosomowe w przypadkach, w których dotychczas nie było to możliwe. Coraz częściej jednak pełna diagnostyka aberracji wymaga zastosowania kilku, wzajemnie uzupełniających się metod badawczych, a aberracje identyfikowane dzięki najnowszym osiągnięciom metodycznym muszą być weryfikowane innymi, sprawdzonymi już, metodami. Tak więc spektakularny wzrost, w ostatnich latach, skuteczności i wiarygodności cytogenetycznej diagnostyki klinicznej wiąże się, o czym nie można nie wspomnieć, ze znacznym wzrostem jej kosztów. Wielkie nadzieje na ich obniżenie w niedalekiej przyszłości wiązać można z wprowadzeniem do rutynowej diagnostyki doskonalszych wersji różnego typu mikromacierzy i automatyzacji samego procesu diagnostycznego.

Fot.1. Obraz prążkowy chromosomów. (a) osoby z prawidłowym kariotypem żeńskim. Chromosomy widoczne pod mikroskopem (po lewej stronie) oraz ułożony, zgodnie z obowiązującymi zasadami kariogram (po prawej stronie), (b) kariogram pacjenta, u którego stwierdzono translokacyjną trisomię chromosomu 13 pary. Nieprawidłowy chromosom zaznaczono strzałką.



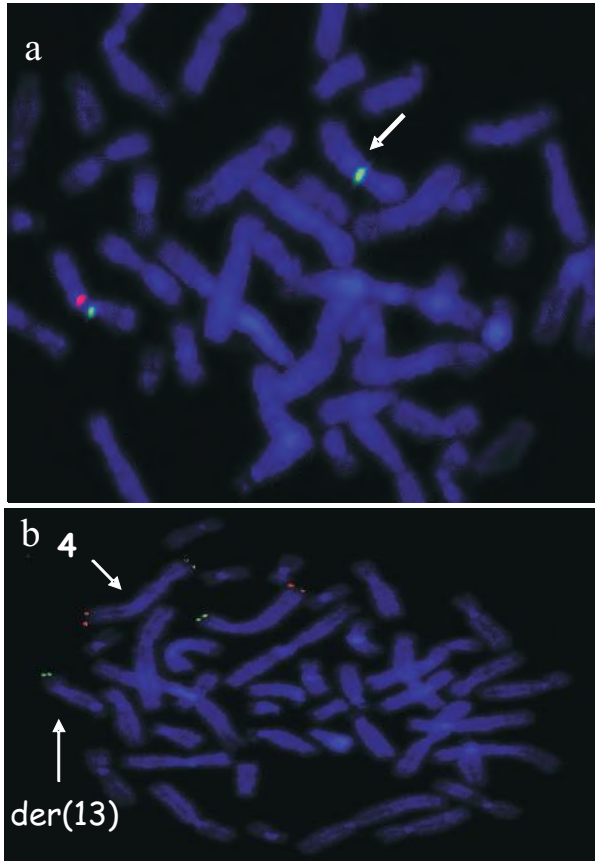
Prosimy uprzejmie, tych wszystkich PT Diagnostów Laboratoryjnych, którzy ostatnio:

- uzyskali specjalizację,
- zmienili adres zamieszkania,
- zmienili dowód osobisty,
- zmienili zakład pracy,
- zmienili nazwisko,

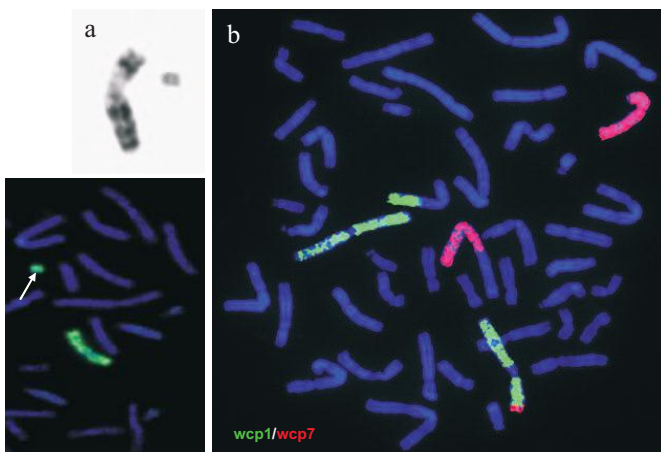
aby w trybie pilnym przesłali do biura KIDL kserokopię (potwierdzoną za zgodność odpisu z oryginałem), w/w dokumentów, zgodnie z art. 8 ust. 3 ustawy z dnia 27 lipca 2001 r. o diagnostyce laboratoryjnej (tekst jednolity: Dz. U. 2004.144.1529 z późn. zm.).

**Sekretarz KRDL
Czesław Głowniak**

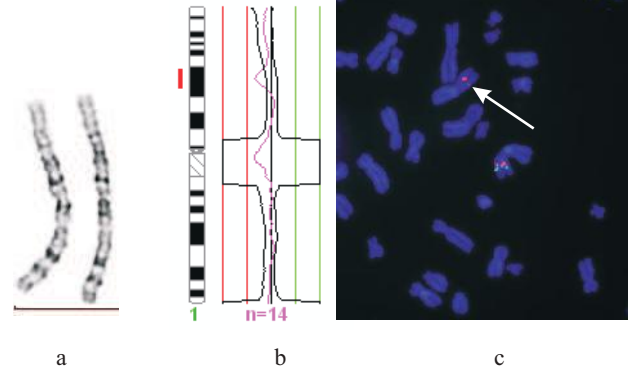
Fot.2 Submikroskopowe aberracje chromosomowe zidentyfikowane metodą FISH. (a) mikrodelecja chromosomu 7q11.23 typowa dla zespołu Williama. Nieprawidłowy chromosom zaznaczono strzałką (b) trisomia regionu subteleromowego chromosomu 4p [der(13)t(4;13)] stwierdzona u pacjenta z cechami niepełnosprawności intelektualnej..



Fot.3 Dwa przykłady identyfikacji aberracji chromosomowych metodą FISH (a) chromosom markerowy pochodzący z chromosomu X stwierdzony u pacjentki z zespołem Turnera. Nieprawidłowy chromosom zaznaczono strzałką. (b) Obraz złożonej translokacji pomiędzy chromosomami 1, 5 i 7 uzyskany metodą FISH z sondami malującymi (chromosomy 1 i 7 odpowiednio w kolorze zielonym i czerwonym).



Fot.4 Przykład identyfikacji delecji chromosomu 1 metodą HR-CGH. (a) obraz prążkowy tego chromosomu (b) Nieprawidłowy profil intensywności fluorescencji chromosomu 1 wykazujący obecność delecji (zaznaczonej na wzorcu prążkowym tego chromosomu w kolorze czerwonym) (c) weryfikacja wyniku diagnostycznego metodą FISH z odpowiednimi sondami molekularnymi. Chromosom z delecją zaznaczono strzałką.



Choroba Huntingtona zasady i metody diagnostyki molekularnej.

dr n. biol. Dorota Hoffman-Zacharska1, dr n. biol. Anna Sułek-Piątkowska2

1 Zakład Genetyki Medycznej; Instytut Matki i Dziecka w Warszawie
2 Zakład Genetyki; Instytut Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

Choroba Huntingtona [MIM +143100] (ang. Huntington Disease, HD) należy do grupy postępujących chorób neurodegeneracyjnych. Jest to najczęściej występująca (1:10 000 osób w populacjach kaukaskich pochodzenia europejskiego) genetycznie uwarunkowana choroba układu nerwowego. Nazwa choroby wywodzi się od nazwiska lekarza G. Huntingtona, który w 1872 w artykule poświęconym różnym formom płasawicy (On Chorea) opisał tę jednostkę jako postępującą i dziedziczną formę płasawicy. Stąd też późniejsza jej nazwa płasawica Huntingtona (Huntington chorea). Płasawica to jednak tylko jeden z objawów zaburzeń ruchowych charakterystycznych dla tej choroby, którym towarzyszą ponadto zaburzenia poznawcze i emocjonalne. Dlatego w chwili obecnej za prawidłową nazwę jednostki uważa się chorobę Huntingtona, chociaż w piśmiennictwie medycznym jak i w praktyce codziennej często wciąż spotyka się określenie płasawica Huntingtona.

OGólna charakterystyka choroby Huntingtona

Choroba należy do grupy chorób neurodegeneracyjnych o późnym początku. Wiek zachorowania u większości pacjentów to czwarta/piąta dekada życia. Jednakże choroba może rozpoczynać się w każdym wieku i dlatego wyróżnia się jej trzy postacie:

- postać młodzieńcza 10% chorych; wiek zachorowania poniżej 20 r.ż. (2% postać dziecięca o wieku zachorowania poniżej 10 r.ż.); jest to najostrejsza postać choroby zazwyczaj dziedziczona po chorym ojcu
- postać wieku średniego 80% pacjentów (forma klasyczna HD)
- postać wieku podeszłego 10% chorych, wiek zachorowania powyżej 60 r.ż.

Choroba Huntingtona jest chorobą postępującą prowadzącą do inwalidztwa chorego a następnie jego śmierci, w przeciągu 15-20 lat od momentu wystąpienia objawów.

Genetyka, podłoże molekularne choroby Huntingtona

Choroba Huntingtona przekazywana jest jako cecha autosomalna dominująca o penetracji zależnej od wieku. W dziedziczeniu obserwuje się zjawisko antycypacji, czyli wcześniejszego występowania objawów i ostrzejszego przebiegu choroby w kolejnych pokoleniach. Efektem fenotypowym zjawiska antycypacji jest pojawianie się w rodzinach młodzieńczej/dziecięcej postaci HD, obserwowane głównie w odcjowskim dziedziczeniu choroby (90%). Forma wczesna HD w może występować w dziedziczeniu odmatczynym, jednakże w tych przypadkach objawy choroby rozwijają się u matki już w wieku 20-26 lat. Takie przypadki są niezwykle rzadkie.

Podłoże molekularne choroby Huntingtona stanowi mutacja dynamiczna mikrosatelitarnej sekwencji trójnukleotydowej (CAG)_n położonej w obrębie 1-szego eksonu genu IT15 [locus 4p16.3]. Sekwencja ta jest wysokopolimorficzna; u osób zdrowych liczba powtórzeń występuje w zakresie do 35 u osób chorych przekracza 36, z tym, że allele w zakresie 36-39 powtórzeń wykazują niepełną penetrację. Liczba powtórzeń w zakresie chorobotwórczym (obecnie oznaczonym jako od 36 do ponad 200) koreluje z wiekiem zachorowania pacjentów – im większa liczba powtórzeń tym wcześniejszy wiek zachorowania. Szczególnie widoczne jest to w młodzieńczej/dziecięcej postaci HD, gdzie liczba powtórzeń zawsze przekracza 50/55 a w przypadkach zachorowania w pierwszej dekadzie życia występuje w granicach 80-100 powtórzeń a niekiedy przekracza 200 (najwyższa opisana liczba powtórzeń to 265 i 250 przy zachorowaniu, odpowiednio w 3,5 i 2,5 r.ż.). Jak już wspomniano forma wczesna HD występuje zazwyczaj w dziedziczeniu choroby od ojca, co jest wynikiem wyższej niestabilności sekwencji w spermatogenezie niż oogenezie. Jeżeli nieprawidłowy gen przekazywany jest przez kobietę, zmiana liczby powtórzeń waha się w granicach ± 3 przy podobnej częstości ekspansji i kontrakcji. Jeżeli natomiast allel chorobotwórczy przekazywany jest przez mężczyznę to dominuje zjawisko ekspansji, której stopnia trudno przewidzieć, chociaż można spodziewać się zależności między stopniem mutacji a zakresem chorobotwórczym (CAG)_n. Niestabilność powtórzeń w spermatogenezie tłumaczy nie tylko odcjowską antycypację w dziedziczeniu HD, ale także występowanie sporadycznych przypadków HD. Mutacja de novo jest wynikiem ekspansji liczby powtórzeń bliskiej górnej granicy zakresu prawidłowego. Opisane do tej pory przypadki dotyczą liczby powtórzeń z zakresu 32-35 w dziedziczeniu odcjowskim.

Schemat genu IT15 i lokalizacji polimorficznej sekwencji (CAG)_n przedstawiono na Ryc.1

Diagnostyka molekularna choroby Huntingtona

Od roku 1993 diagnostyka molekularna HD opiera się na bezpośrednim obejmującym analizę liczby powtórzeń (CAG)_n w genie IT15 i ustaleniu czy u badanego mieści się ona w zakresie patogennym czy prawidłowym (badanie obejmuje oba allele genu).

W tym celu wykonuje się analizę obszaru powtórzeń (CAG)_n uzupełnianą niekiedy analizą obszaru powtórzeń (CAG)_n wraz z przyległym niskopolimorficznym obszarem powtórzeń (CCG)_n.

Metodyka badania opiera się na przeprowadzeniu reakcji PCR (DNA izolowany jest z leukocytów krwi obwodowej) i analizie produktów amplifikacji przy zastosowaniu wysokorozdzielczej elektroforezy w warunkach denaturujących.

Schemat analizowanego obszaru oraz metody badania przedstawiono na Ryc.2.

W rodzinach, których podejrzewa się występowanie lub występuje choroba Huntingtona można wykonać trzy rodzaje badań molekularnych:

- badanie diagnostyczne; wykonywane u osób z rozpoznaniem choroby (jest to badanie potwierdzające/wykluczające diagnozę kliniczną). Badanie to wykonuje się niezależnie od wieku pacjenta. Jako że częstość mutacji de novo może być większa niż obecnie szacowana (nawet do 10% zachorowań), badanie tego typu powinno być przeprowadzone w każdym przypadku, gdy obraz kliniczny wskazuje na chorobę, nawet pomimo braku wywiadu

rodzinnego. Podobnie w przypadkach lekoopornej padaczki wraz z objawami postępującej encefalopatii u dzieci, gdzie powinno być elementem diagnostyki różnicowej. Dotyczy to szczególnie bardzo wczesnej (dziecięcej) postaci HD, charakteryzującej się niespecyficznym obrazem klinicznym oraz możliwością wystąpienia objawów wcześniej niż u rodzica-nosiciela (przypadki bardzo rzadkie).

Jako że fenokopie HD obejmują około 3% przypadków chorych z klinicznym rozpoznaniem HD kierowanych na badanie molekularne, w przypadku braku mutacji genu IT15 możliwe jest rozważenie badania innych loci jak SCA17, DRPLA, HDL1 i HDL2

- **badanie przedobjawowe (przedkliniczne);** wykonywane jest tylko u osób pełnoletnich pochodzących z rodzin obciążonych HD (zarówno z 50% jak i 25% ryzykiem zachorowania)

Badania tego typu wykonywane mogą być tylko na własne życzenie osoby zainteresowanej i zawsze związane z poradnictwem genetycznym (praktycznie skierowanie na badania powinno pochodzić z Poradni Genetycznej). Tego typu badania nie wykonuje się u dzieci o 50% ryzyku zachorowania niewykazujących objawów choroby (nawet na życzenie rodziców).

- **badanie prenatalne;** obejmuje analizę DNA płodu, jeżeli jedno z rodziców jest chore, (jeżeli to możliwe rozpoznanie kliniczne powinno zostać potwierdzone badaniem molekularnym) lub jest nosicielem mutacji w okresie przedobjawowym choroby (rodzic, u którego występuje ryzyko zachorowania musi najpierw poddać się badaniu przedobjawowemu). W przypadku tego badania istotna jest możliwość wykonania równoczesnej analizy DNA płodu i obojga rodziców.

W przypadku choroby Huntingtona, podobnie jak i innych chorób monogenowych o późnym wieku zachorowania, najwięcej kontrowersji budzi wykonywanie testów przedobjawowych (badanie prenatalne można traktować jako szczególny przypadek takiego badania), dlatego już w 1994 roku przedstawiciele World Federation of Neurology Research Group on Huntington Disease oraz International Huntington Association opracowali wskazania do wykonywania tego typu badań/testów *Guidelines for the molecular predictive test in Huntington's disease*. Zasady te nie mają mocy prawnej, lecz stanowią wytyczne dla ustalenia jednolitych procedur w ośrodkach z różnych krajów o różnym podejściu i doświadczeniu w postępowaniu z rodzinami dotkniętymi tą chorobą. Wytyczne te stały się ponadto wzorem do opracowania zasad poradnictwa i diagnostyki innych dziedzicznych chorób neurodegeneracyjnych o późnym wieku zachorowania jak ataksje rdzeniowo-mózdkowe i choroba Parkinsona. Od 2001 roku przygotowywane są przez IHA wytyczne do przeprowadzania testów diagnostycznych *Guidelines for diagnostic genetic testing for Huntington's disease as an addition to the predictive test guidelines*.

Wieloletnie doświadczenia związane z przeprowadzaniem molekularnych testów diagnostycznych pozwoliły również na opracowanie wytycznych dotyczących stosowanej metodyki badań jak i interpretacji uzyskiwanych wyników, które zostały przedstawione w Tab.nr 1.

Sprawą kontrowersyjną i zależną od lokalnych ustaleń jest podawanie na wyniku badań laboratoryjnych liczby powtórzeń (CAG)_n. Po pierwsze, dlatego, że liczba powtórzeń nie pozwala przewidywać w konkretnym przypadku ani wieku zachorowania ani klinicznego przebiegu choroby. Po drugie oznaczenie liczby powtórzeń zawsze obciążone jest pewnym błędem, co wynika ze stosowanej metodyki [EMQN dopuszcza różnicę ± 3 powtórzeń w zakresie patogennym i ± 1 powtórzeń w zakresie prawidłowym], tak więc porównanie wyników uzyskanych z różnych laboratoriów przez osobę niekompetentną (np. pacjenta) mogłoby podważać ich wiarygodność. Należy wziąć pod uwagę fakt, że w niektórych laboratoriach nie oznacza się dokładnie liczby powtórzeń, lecz jedynie określa czy allele znajdują się w zakresie alleli prawidłowych, nieprawidłowych czy tzw. alleli pośrednich.

Szczegółowe dane dotyczące zasad testów diagnostycznych w chorobie Huntingtona znajdują się w publikacjach wyszczególnionych poniżej:

Levin B, Richie KL, Jakupciak JP (2006) Advances in Huntington's disease diagnostics: development of a standard reference material.; *Expert Rev Mol Diagn* 6(4):587-596

Potter NT, Spector EB, Prior TW (2004) Technical standards and Guidelines for Huntington Disease Testing.; *Genet Med*: 6(1): 61-65

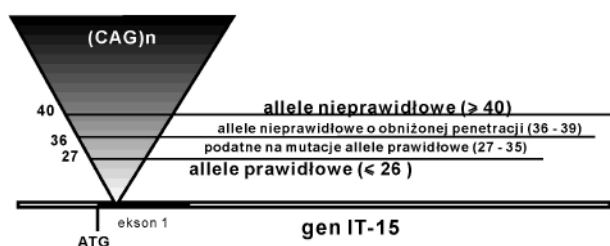
American College of Medical Genetics, American Society of Human Genetics (ACMG/ASHG) Genetic Testing Working Group. Laboratory guidelines for Huntington disease genetic testing. (1998) *Am J Hum Genet* 62, 1243-1247

Guidelines for the molecular genetics predictive test in Huntington's disease. International Huntington Association (IHA) and the World Federation of Neurology (WFN) Research Group on Huntington's Chorea. (1994). *Neurology* 44: 1533-1536

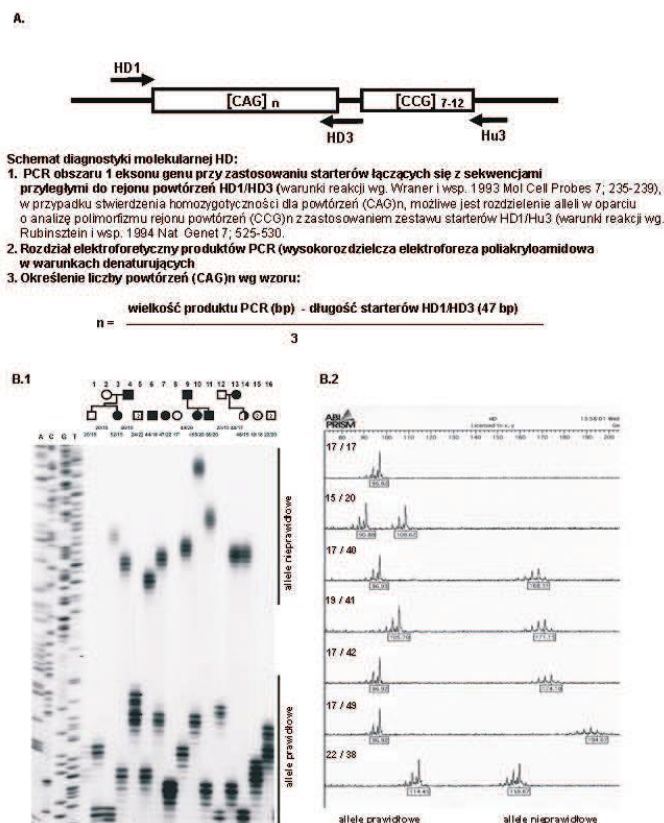
Tab. nr 1 Tabela przedstawia zakresy liczby powtórzeń (CAG)_n w genie *IT15*, wyodrębnione ze względu na interpretację wyników (pacjent- osoba z objawami HD, badany osoba zdrowa)

Liczba powtórzeń CAG	Zakres powtórzeń	Allel	Interpretacja
9 - 26	niepatogeny	prawidłowy (PR)	pacjent/badany nie jest chory/nie zachoruje na HD (u badanego nie ma podwyższonego ryzyka wystąpienia HD)
27 - 35	niepatogeny	pośredni (INT)	pacjent/badany nie jest chory/ nie zachoruje na HD (u badanego występuje allel o podwyższonej niestabilności, który może ulec mutacji do zakresu chorobotwórczego przy przekazywaniu go potomstwu*)
36 - 39	patogeny	nieprawidłowy (NP)	u pacjenta z rozpoznaniem HD jest to potwierdzenie diagnozy klinicznej (u badanego występuje podwyższone ryzyko wystąpienia HD, może zachorować lub nie)
40 i powyżej	patogeny	nieprawidłowy (NP)	pacjent/badany jest chory/zachoruje na HD

Ryc. 1 Schemat genu *IT15* z zaznaczoną w eksonie 1 lokalizacją polimorficznych powtórzeń (CAG)_n. Zaznaczono zakresy powtórzeń istotne dla badań diagnostycznych.



iy. 2 A. Schemat rejonu polimorficznych sekwencji (CAG)_n i (CCG)_n w pierwszym eksonie genu *IT15*, z zaznaczonym położeniem starterów wykorzystywanych w diagnostyce molekularnej oraz schemat oznaczania liczby powtórzeń (CAG)_n. B. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR z zastosowaniem starterów HD1/HD3; B1 6% poloakryloamidowy żel denaturujący (mocznik), fragmenty DNA znakowane przez wbudowanie podczas reakcji PCR a32PdCTP, B2 5,5% żel pliakryloamidowy denaturujący (mocznik) rozdział elektroforetyczny i analiza w systemie ABI Prism 377, fragmenty znakowane fluorescencyjnie (starter HD1).



NOWE METODY W DIAGNOSTYCE CHOROÓB DZIEDZICZNYCH

Magdalena Nawara
Zakład Genetyki Medycznej
Instytut Matki i Dziecka
01-211 Warszawa
Kasprzaka 17a

Diagnostyka molekularna chorób dziedzicznych wciąż pozostaje młoda dziedziną analizy genetycznej chociaż „stuknęło” jej już ponad ćwierć wieku. Identyfikację zmian w DNA, w badaniu rutynowym, umożliwiło po raz pierwszy specyficzne względem sekwencji nukleotydów fragmentowanie DNA enzymami restrykcyjnymi. Najlepszą i niekwestionowaną metodą identyfikacji błędów w informacji genetycznej jest sekwencjonowanie DNA. Technika ta jest obecnie dostępna w każdym laboratorium, a usługi tego typu za stosunkowo niską opłatą oferowane są przez dziesiątki wyspecjalizowanych firm. Mimo tego okazuje się, że w praktyce laboratoryjnej nie rezygnuje się z gotowych zestawów diagnostycznych szczególnie, gdy oferują one szybką i wiarygodną metodę analizy całego, niekiedy bardzo dużego genu człowieka. Tym bardziej, że niektóre metody umożliwiają identyfikację defektów, których nie wykrywa sekwencjonowanie. Jedną z takich metod, znajdującą coraz szersze uznanie jest MLPA (ang. multiplex ligation-dependent probe amplification).

PRZYPOMNIENIE

SKŁADKA CZŁONKOWSKA W KIDL WYNOSI 15,00 ZŁ (PIĘTNAŚCIE ZŁOTYCH) MIESIĘCZNIE(podstawa prawna paragraf 1 uchwały nr 2/2003 KRDL z 13 stycznia 2003 r)

APELUJEMY O SYSTEMATYCZNE OPŁACANIE OBLIGATORYJNYCH SKŁADEK CZŁONKOWSKICH

MLPA jest nową metodą umożliwiającą wykrywanie zmian liczby kopii określonej sekwencji DNA. W genomie diploidalnym delecja lub duplikacja jednej z kopii genu nie zostanie zidentyfikowana w reakcji sekwencjonowania, gdyż uzyskamy prawidłową sekwencję z drugiej kopii. W jednej reakcji MLPA można analizować do 45 różnych loci. Od czasu opracowania w 2002 roku (Schouten i wsp.) znajduje coraz więcej zastosowań (Tabela 1).

MLPA umożliwia jednocześnie powielanie w reakcji PCR kilkudziesięciu różnych fragmentów DNA. W klasycznej multiplexowej reakcji PCR stosuje się dla każdej powielanej sekwencji specyficzną parę starterów. Nadmiar starterów i różnice w wydajności amplifikacji poszczególnych matryc utrudniają z reguły późniejszą względną oceną ilościową. Dlatego też w metodzie MLPA matrycą do PCR nie jest genomowy DNA, a sondy hybrydujące do DNA.

Sondy MLPA składają się z dwóch oligonukleotydów, a każdy z nich zawiera jedną sekwencję komplementarną do sekwencji startera (ryc. 1A). Reakcja PCR zachodzi tylko w wypadku, gdy obie sondy po hybrydyzacji zostaną poddane reakcji ligacji i w ten sposób utworzą matrycę do PCR (ryc. 1B, C). Dla wszystkich matryc stosowana jest jedna para uniwersalnych starterów. Rozróżnienie poszczególnych loci jest możliwe dzięki temu, że odpowiednie dla nich produkty PCR różnią się wielkością (ryc. 1D). Produkty PCR są następnie poddawane rozdzielowi elektroforetycznemu w sekwenatorze. Porównywane są względne różnice wysokości (lub powierzchni) pików, między próbkami badanego pacjenta i osoby zdrowej (ryc. 2A). Różnice przekraczające wartości graniczne interpretowane są jako zmiany liczby kopii matrycy (ryc. 2B).

Z zasady działania tej metody wynikają liczne jej zalety, ale również ograniczenia (Tabela 2, 3). MLPA na pewno nie jest techniką uniwersalną i nie może być stosowana do wykrywania wszystkich typów mutacji. Natomiast może zastąpić w niektórych obszarach inne techniki, znacznie kosztowniejsze i bardziej pracochłonne. A to umożliwia rozszerzenie spektrum oferty diagnostycznej. W chwili obecnej MLPA wykorzystywana jest w ponad 500 laboratoriach biologii molekularnej na świecie.

Piśmiennictwo:

Schouten i wsp. (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic Acids Res. Jun 15;30(12):e57.

Tabela 1.

Przykłady zastosowań metody MLPA.

wykrywanie małych rearanżacji w genach, których mutacje warunkują choroby (np. BRCA1, APC, DMD, MECP2, CFTR i wiele innych)
wykrywanie dużych rearanżacji chromosomowych (zespoły Williamsa, Pradera-Williego/Angelmana, DiGeorge'a i inne)
zmiany liczby kopii regionów subtelomerowych
wykrywanie aneuploidii chromosomów 13, 18, 21, X, Y (również w płynie owodniowym)
wykrywanie metylacji wysp CpG (inaktywacja genów supresorów nowotworowych, zespół PWS/AS, zespół
diagnostyka nowotworów - zmiana liczby kopii DNA
analiza mRNA genów zaangażowanych w procesy zapalne i apoptozę

Tabela 2.

Zalety MLPA.

wykrywa zmiany liczby kopii ponad 40 sekwencji w jednej reakcji
odróżnia sekwencje różniące się jednym nukleotydem
wykorzystuje identyczny protokół dla wielu aplikacji
charakteryzuje się szybkością uzyskania wyników około 24 godziny
wszystkie odczynniki dostarczane są w zestawie przez producenta
wymaga aparatury dostępnej w większości laboratoriów zajmujących się genetyką molekularną (termocykler i sekwenator)
koszt jednej reakcji < 15 €

Tabela 3.

Wady MLPA.

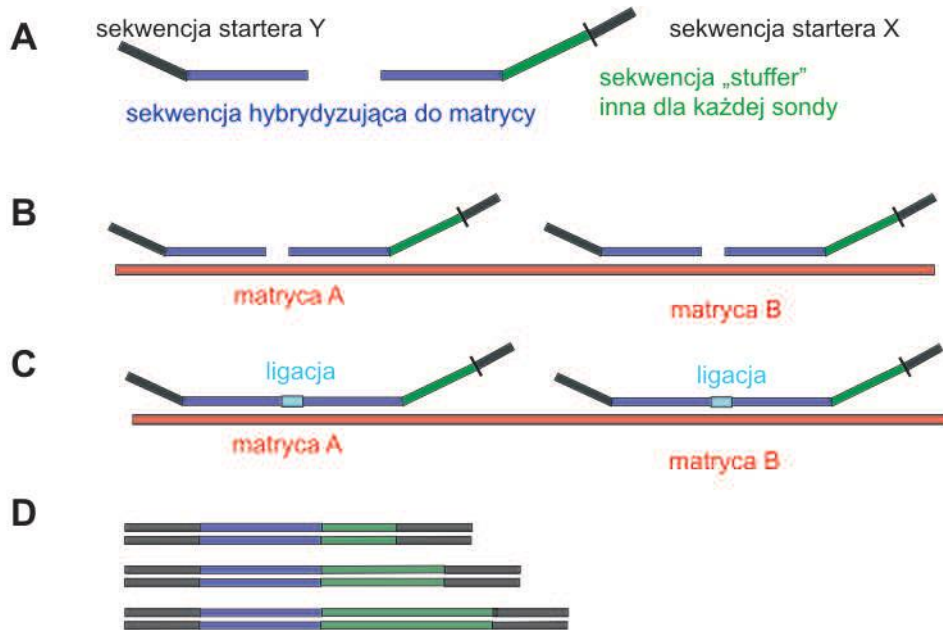
jest wrażliwsza na zanieczyszczenia i inhibitory reakcji (np. fenol) niż klasyczny PCR
nie może być stosowana do analizy pojedynczych komórek (w przeciwieństwie do FISH)
nie wykrywa zrównoważonych translokacji
nie wykrywa nieznanymi mutacji innych niż duże delecje i insercje (np. mutacji punktowych; możliwe jest natomiast takie zaprojektowanie sond, aby miejsce ligacji było dokładnie w miejscu znanej mutacji i aby reakcja nie zachodziła w wypadku wystąpienia mutacji)
ustawianie nowej aplikacji jest czasochłonne i pracochłonne
zestawy MLPA nie posiadają na razie certyfikatu CE do diagnostyki

Informujemy osoby ubiegające się o wpis na listę diagnostów laboratoryjnych, że do wniosku w tej sprawie (do pobrania z naszej strony www.kidl.org.pl) należy dołączyć:

- kserokopię pierwszej i drugiej strony dowodu osobistego (potwierdzoną za zgodność z oryginałem),
- kserokopię dyplomu ukończenia uczelni wyższej (potwierdzoną za zgodność z oryginałem),
- ew. kserokopię dyplomu specjalizacji lub stopni naukowych (potwierdzone za zgodność z oryginałem)
- zaświadczenie z zakładu pracy o zatrudnieniu, a także dokumenty potwierdzające staż pracy w diagnostyce lab.(świadcstwo pracy)
- rotę ślubowania,
- oświadczenie o niekaralności,
- 2 zdjęcia z lewym profilem o wymiarach 3,5 cm x 4,5 cm,
- Zaświadczenie o stanie zdrowia pozwalające na wykonywanie zawodu diagnosty laboratoryjnego (art. 9 ustawy z dnia 27 lipca 2001 r. o diagnostyce laboratoryjnej (tekst jednolity) - Dz.U.04.144.1529)

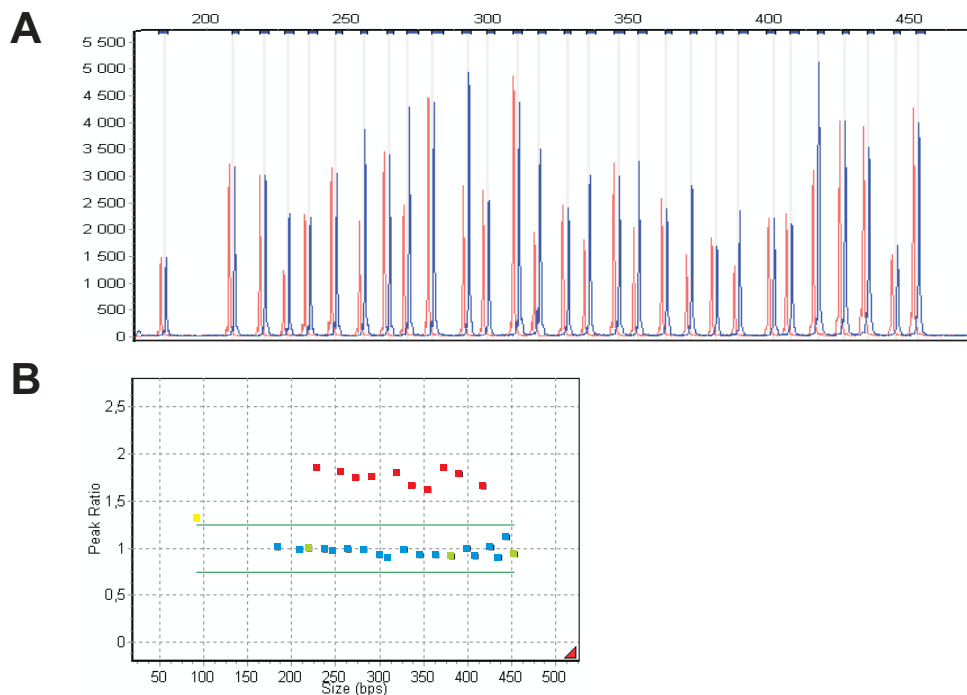
Rycina 1. Opis reakcji MLPA (na podstawie Schouten i wsp.)

- Sondy komplementarne do każdego locus różnią się długością dołączonej specyficznej sekwencji (tzw. stuffer sequence).
- Obie sondy hybrydują do specyficznej matrycy w genomowym DNA.
- Ligacja obu sond zachodzi z udziałem termostabilnej ligazy. Produkty ligacji sond są amplifikowane w reakcji PCR z zastosowaniem uniwersalnej pary starterów.
- Powstałe produkty mają różną wielkość (130-480 par zasad) i mogą zostać poddane rozdzielowi elektroforetycznemu



Rycina 2.

- Wyniki analizy MLPA: porównanie wyniku pacjenta (niebieskie piki) i osoby zdrowej (czerwone piki). Ilość uzyskanego produktu PCR na matrycy niektórych sond z zestawu jest znacznie wyższa u chorego.
- Wyniki po przeanalizowaniu: sondy hybrydujące w regionach, które uległy duplikacji przedstawione są jako punkty ponad linią graniczną. Sondy kontrolne przedstawione są jako zielone punkty, a sondy z badanych regionów na niebiesko.



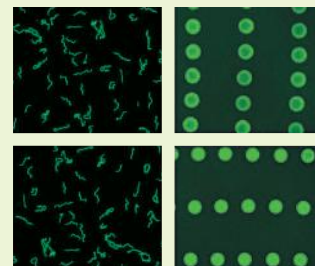
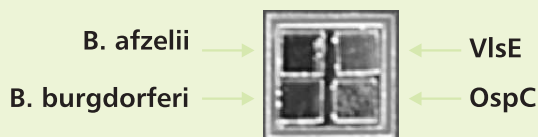


Diagnostyka boreliozy Zgodnie ze standardami



TESTY SKRYNINGOWE

IMMUNOFLUORESCENCJA POŚREDNIA



- Wygodna wielkość: płytki na 3, 5 lub 10 badań
- Technologia BIOCHIP: Borrelia afzelii, B. burgdorferi **PLUS** VlsE i OspC na jednym polu
- Możliwość oceny obu klas (IgG i IgM) na dwóch polach reakcyjnych jednego szkiełka

ELISA



- Najwyższa czułość: pełen ekstrakt Borrelia **PLUS** rekombinowany antygen VlsE
- Ilościowa ocena przeciwciał w klasie IgG i IgM
- Optymalizacja oceny IgM: bufor zawiera absorbent czynnika reumatoidalnego i IgG
- Testy do oceny przeciwciał w płynie mózgowo-rdzeniowym

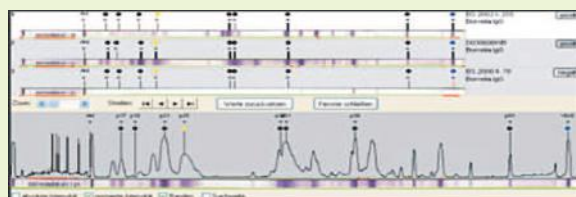
TESTY POTWIERDZAJĄCE



- Testy Western Blot: różnicowanie zakażeń Borrelia burgdorferi, afzelii, garinii
- Testy EUROLINE-WB: uniwersalne testy o najwyższej czułości
- Rozdzielony elektroforetycznie pełen ekstrakt Borrelia **PLUS** rekombinowane białko VlsE

PROGRAM EUROLINESCAN

- Elektroniczny odczyt pasm antygenowych
- Archiwizacja i wyszukiwanie wyników
- Przejrzysty wydruk wyniku
- Do odczytu wszystkich testów Western Blot EUROLINE-WB i EUROLINE (serologia infekcji, autoagresja, alergię)



**Szkolenia pracowników laboratoriów
Program Kontroli Jakości 2x do roku**

GRATIS!