

# Diagnosta Laboratoryjny

Rok 5, numer 2 (14)

Lipiec 2007

GAZETA KRAJOWEJ IZBY  
DIAGNOSTÓW LABORATORYJNYCH

GAZETA  
BEZPŁATNA

“ŚLEPIEC MUSI ŻYĆ PŁACZĄC NIE WIDZĄC NAWET WŁASNYCH ŁEZ”

## Co uzdrowi polski system ochrony zdrowia?

### Prawda czy Fałsz

Rzetelna analiza i diagnoza przyczyn zapaści;  
badanie rynku świadczeń zdrowotnych;  
wyższe wynagrodzenia dla etatowych niskoopłacanych profesjonalistów medycznych (komu i ile- diagności, pielęgniarki, technicy, lekarze niefunkcyjni

1 0

*Prywatyzacja;  
uwłaszczenie lekarza;  
outsourcing;*

*po raz który  
oddłużenie?*

0 1

*Dofinansowanie  
przez samorząd  
lokalny*

*Dopłaty pacjenta  
do świadczeń*

Wcześniejsza profilaktyka i diagnostyka laboratoryjna

*Wynagrodzenia 2-3 razy  
wyższe niż przeciętne*

Zmianowość a nie dyżury

1 0

Wysokospecjalistyczny sprzęt medyczny dostępny od 6.00 do 22.00

*Zwiększyć wpływy z  
budżetu 6 % PKB*

Lekarz POZ dostępny całą dobę wynagradzany za pacjentów leczonych a nie wirtualnych

0 1

*Czy szpitalami i przychodniami przestaną kierować lekarze.*

*Więcej pracy i służby mniej megalomanii.*

*Uwolnić lekarzy od funkcji administracyjnych i menadżerskich.*

“UWŁASZCZENIA LEKARZY NA MAJĄTKU PAŃSTWOWYM TO ANARCHIA”

**USTAWA Z DNIA 27 LIPCA 2001 r.  
O DIAGNOSTYCE LABORATORYJNEJ**

**Art. 21. Diagnosta laboratoryjny jest obowiązany do postępowania zgodnego ze wskazaniami wiedzy zawodowej, z zasadami etyki zawodowej oraz z należyłą starannością.**

Aby być na bieżąco,  
trzeba by czytać 19 artykułów dziennie  
we wszystkich językach świata!

**NIEREALNE?**

**Czytaj przeglądy systematyczne,  
których doskonałym źródłem  
jest Biblioteka Cochrane!**



**The Cochrane Library**

Evidence for healthcare decision-making

Możesz z niej korzystać bezpłatnie poprzez  
**Narodowy Dostęp do Biblioteki Cochrane**  
ze strony internetowej  
Agencji Oceny Technologii Medycznych  
[www.aotm.gov.pl/cochrane](http://www.aotm.gov.pl/cochrane)

**CHCESZ WYGRAĆ 10 000 zł  
I BYĆ NA BIEŻĄCO Z NAJBARDZIEJ  
AKTUALNYMI DOWODAMI NAUKOWYMI?**

Weź udział w konkursie  
pod patronatem Ministra Zdrowia



*tak, korzystam*

Do 1 października 2007 r. do godziny 17.00  
na stronie [www.aotm.gov.pl](http://www.aotm.gov.pl)  
zgłoś opis wykorzystania przez Ciebie  
kompletnych i wiarygodnych dowodów naukowych.

Szczegóły na stronie Agencji Oceny Technologii Medycznych  
[www.aotm.gov.pl/konkurs](http://www.aotm.gov.pl/konkurs)  
konkurs@aozm.gov.pl  
+48 22 566 72 00

**PARTNERZY**

Naczelna Izba Lekarska, Kolegium Lekarzy Rodzinnych w Polsce, Konsultant Krajowy w dziedzinie kardiologii, Naczelna Izba Pielęgniarek i Położnych, Kolegium Pielęgniarek i Położnych Rodzinnych w Polsce, Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych, Konferencja Rektorów Akademickich Uczelni Medycznych, Departament Nauki i Szkolnictwa Wyższego Ministerstwa Zdrowia, Cochrane Collaboration w Polsce.

PATRONI PRASOWI

**Gazeta  
Lekarska**  
Przez 110 lat

**Lekarz Rodzinny**

**MAGAZYN  
PIELĘGNIARKI  
I POŁOŻNEJ**

**Diagnosta  
Laboratoryjny**

**Służba Zdrowia**

**DIAGNOZA**  
LECZENIE W PRAKTYCE



Spółeczeństwu polskiemu i Polsce potrzeba jest stworzyć nowoczesną służbę zdrowia dającą ochronę zdrowia Obywatelom. Potrzebna jest Polsce nowoczesność w stosowaniu terapii i metod rozpoznawania zaburzeń organizmu i rozpoznawania choroby. Polsce

potrzebne są metody nowoczesnego leczenia. Te zaś nie sprowadzają się do dostępu pacjenta do leku niekiedy bez recepty, które obniżają lub wygaszają objawy lecz nie usuwają przyczyn. W Polsce potrzebna jest na miarę potrzeb współczesnych, medycyna nowoczesna. Ta zaś zaczyna się od profilaktyki zdrowotnej. Profilaktyką nie jest wywiad lekarski czy pielęgniarstwo, ani zgłaszane symptomy pacjenta i nie one pozwalają na wczesne wykrycie choroby lub zaburzenia zdrowia ani też nie pozwalają na monitorowanie niepomyślnych następstw choroby. Cele te uzyskuje się w drodze badań diagnostyki medycznej w tym laboratoryjnej. Identyfikację niezdiagnozowanych chorób i zaburzeń prowadzi się w szybkim trybie bardziej przez techniki badań objęte diagnostyką laboratoryjną niżeli pragmatyką dotychczas stosowaną. Stąd powszechnie mówi się o potrzebie reformy systemu ochrony zdrowia.

#### Z czego wynika potrzeba programu reformy służby zdrowia?

Potrzeba dokonania reformy służby zdrowia zgłaszana była już przez pacjentów i nośniki medialne od końca lat 80-tych. Służba zdrowia w minionym systemie politycznym i gospodarczym nie była wolna od niedoskonałości. Czyniono jej zarzuty, że była elitarna, nakierowana na wybiórcze regiony, na wybiórcze grupy społeczne. Finansowanie w służbie zdrowia w poprzednim okresie nie wykazywało znamion kalkulacji kosztów i nakładów oraz potrzeb wynikających z rozpoznania zdrowotności społeczeństwa polskiego. Lata 90-te wymusiły zmiany nie tylko w przestrzeni gospodarczej kraju ale również w zakresie finansowania dobrodziejstw konstytucyjnych jakimi są ochrona zdrowia i oświata. Podstawowym kryterium oceny sprawności powszechnego systemu ochrony zdrowia obywateli stał się stosunek nakładu na służbę zdrowia do PKB w przeliczeniu % udziału na obywatela. Powszechnym przekonaniem było i jest, że dekompensacja systemu ochrony zdrowia wynikała ze szczupłości funduszy przeznaczonych na świadczenia zdrowotne, finansowane ze środków publicznych. Stwierdzić

należy, że dotąd nie został zmieniony system dystrybucji tymi środkami. Hasło „Pieniądz za pacjentem” ciągle jest czynnikiem wywołującym zarzuty do Państwa, nadal jakoby nadopiekuńczego, co staje się obecnie przyczyną dysproporcji między oczekiwaniami pacjentów oraz pracowników służby zdrowia a systemem finansowania i rozdziałem środków publicznych. Postawić należy pytanie: Jakie są cele i zadania obecnie reformowanego systemu ochrony zdrowia?

#### Jakie są cele i zadania obecnie reformowanego systemu ochrony zdrowia?

- unowocześnienie systemu ochrony zdrowia i zarządzania środkami finansowymi pochodzącymi z budżetu
- poprawa zdrowotności społeczeństwa
- wczesne rozpoznanie zagrożeń dla populacji polskiej lokalnie i indywidualnie
- skrócenie trwania choroby i okresu przywracania do sprawności zawodowej
- wydłużenie okresu aktywności zawodowej dla populacji polskiej
- oszczędność postępowania leczniczego w ratowaniu życia i zdrowia
- osiągnięcie stanu w postępowaniu medycznym, że leki mające działanie uboczne nie będą zlecane i podane bez wcześniejszego badania laboratoryjnego diagnostycznego (bo badanie laboratoryjne pozwala rozpoznać w indywidualnych przypadkach negatywne skutki działania leku)
- by badania laboratoryjne diagnostyczne stały się dostępne przed podaniem np. antybiotyku w szczególności w wieku niemowlęcym, dziecięcym i młodzieńczym do lat 18

#### Jakie są zadania środowiska diagnostów laboratoryjnych w reformowanym systemie ochrony zdrowia?

- Diagnostów laboratoryjnych stosownie do wykształcenia i zgodnie z dyspozycjami wyniesionymi z toku kształcenia muszą uczestniczyć w działaniach państwowych i lokalnych władz terenowych w rozpoznawaniu stanu zdrowotnego społeczeństwa.
- Diagnostów laboratoryjnych stać się muszą partnerem i współkonsultującym członkiem programu sanacji społeczeństwa polskiego.
- Diagnostów laboratoryjnych muszą być rozpoznawani jako świadczeniodawcy i wpisani w ustawę o świadczeniach zdrowotnych.
- Diagnostów laboratoryjnych z tytułu swojej wiedzy winni stać się także odpowiedzialni za stan zdrowotności populacji polskiej i braku przeciwdziałań zagrożeniom dla zdrowia i życia.

### W NUMERZE

Rola Środowiska Diagnostów Laboratoryjnych w Reformowanym Systemie Ochrony Zdrowia.	3-4
Borelioza z Lyme, laboratoryjne metody rozpoznania zakażenia.	5-7
Jaka jest przyczyna tak dużej różnorodności cen za badania laboratoryjne?	8-9
Jakość wyników badań laboratoryjnych a zdrowie	9
Współczesne cytometry i ich zastosowanie	10-14
Zarządzanie jakością w laboratorium diagnostyki medycznej	14-16
Przewlekłe zespoły mieloproliferacyjne (chronic myeloproliferative disease-CMPD)- charakterystyka, klasyfikacja i cechy	17-21
Współczesne wymagania dotyczące użytkowania pomieszczeń, aparatury pomiarowo-badawczej oraz sprzętu	22-24
Doskonalenie Systemu Jakości w akredytowanym laboratorium.	24-25
Rozważanie o cenach	26

### W biuletynie:

- Uchwały pierwszego posiedzenia II kadencji KRDL
- Uchwały drugiego posiedzenia II kadencji KRDL
- Uchwały trzeciego posiedzenia II kadencji KRDL
- Stanowisko nr 1/II/2007 KRDL
- Korespondencja między KIDL a Ministerstwem Zdrowia
- Korespondencja między KIDL a Ministerstwem Zdrowia
- Informacja ze spotkania KKPnRW WwSZ
- Pytania i odpowiedzi z NFZ

### WYDAWCA

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 10 000 + 500 egz.

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

Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych

03-428 Warszawa; ul. Konopacka 4

tel. (022) 741-21-55; (022) 741-21-57 (022) 741-11-60;

faks: (022) 741-21-56

Nazwa Odbiorcy: Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych.

03-428 Warszawa; ul. Konopacka 4

Numer rachunku: 72102010420000880200105692

Bank PKO BP. IV Oddział Warszawa

Diagności laboratoryjni zobowiązani są:

do pełniejszej eksploracji poznawczej osiągnięć medycznych i wyników badań naukowych możliwych do wykorzystania w postępowaniu diagnostycznym, medycznym i leczniczym

- do prowadzenia badań porównawczych na dużych statystycznych próbkach materiału biologicznego i ich analiz, które pozwolą różnicować patologie stosownie do płci, wieku, grup zawodowych, populacji lokalnych i przestrzenno klimatycznych różnic w geografii kraju oraz wynikających z potrzeb migracyjnych populacji ludzkiej
- (te badania pozwolą na indywidualizowanie badań laboratoryjnych i indywidualizowanie zaleceń i wskazań terapeutycznych)
- do wnikliwej analizy materiału badania laboratoryjnego (który zawiera około 60% informacji o pacjencie), szczególnie gdy istnieje zalecenie inwazyjnej terapii medycznej i komunikowania tychże wyników oraz interpretację lekarzowi
- do opracowania raportu o stanie zdrowotności społeczeństwa na podstawie materiału dostępnego z badań laboratoryjnych
- do opracowania komunikatywnego języka zaczerpniętego i stosowanego w naukach szczegółowych jako sposobu przekazu informacji o stanie zdrowia pacjenta dla lekarza i pielęgniarki
- do opracowania systemu pozyskiwania informacji służebnych rozpoznaniu stanu zdrowia pacjenta dla diagnozy i terapii lekarsko farmaceutycznej

Stąd stawiamy tezę, że organizm ludzki i jego fizjologia zawierają w sobie wiele pokładów i poziomów, na których można budować nowe rozpoznanie zdrowia i choroby. One stanowią winny przestrzeń nowych penetracji, możliwości pozyskania klucza do przyczyn choroby i metod przywracania zdrowia.

Fizjologiczne często podłoże chorób nakazuje poszukiwanie informacji na ich temat w dyscyplinach nauk, wokół których porusza się diagnostyka laboratoryjna. Pośród nich m.in. kluczowe i centralne miejsce zajmuje:

- chemia kliniczna
- hematologia laboratoryjna
- cytomorfologia medyczna
- immunologia kliniczna
- genetyka medyczna
- parazytologia medyczna
- mikrobiologia
- wirusologia
- transfuzjologia serologiczna
- toksykologia
- epidemiologia
- analityka kliniczna

Takie stanowisko wynika z centralnego usytuowania w/w nauk w diagnostyce laboratoryjnej stąd też wynikała potrzeba obudowania specjalizacjami kształcenia diagnostów laboratoryjnych.

Obecność diagnostyki laboratoryjnej w procesie stałego monitorowania zdrowia i zmian chorobowych a także procesie w terapii farmakologicznej jest elementem nowoczesnym w medycynie. Wysokie nakłady, które ponosi jednostka i społeczny system ochrony zdrowia, w tym także budżet państwa są zwykle wynikiem spóźnionego reagowania na sygnały organizmu. Brak osadzenia przez współczesne leczenie diagnostowania jednostek chorobowych i ordynowania farmakoterapii w oparciu o diagnostykę powoduje, że znaczna część diagnoz i ordynowanej farmakoterapii konstruowana jest na wywiadzie od pacjenta oraz metodzie prób i błędów w poszukiwaniu panaceum i medykamentów na zgłaszane dolegliwości. W ten sposób zwiększa się zużycie leków i częstotliwość kontaktu pacjent lekarz, pacjent specjalista, pacjent szpital z obopólnym odczuciem, że generuje się w ten sposób coraz większe koszty. Środkiem skutecznym, szczególnie w polskiej służbie zdrowia, gdzie brak jest mechanizmów jak i nawyków tak i po stronie pacjenta jak i lekarza, że jednym z filarów dobrej diagnozy i terapii jest oparcie ich na

dobrej, wiarygodnej diagnostyce medycznej w tym laboratoryjnej.

Dlatego Krajowa Rada Diagnostów Laboratoryjnych wnosila uwagi do projektów ustaw, by przynajmniej populacja dzieci i młodzieży objęta była stałą, powszechną metodą budowania diagnozy i terapii w oparciu o diagnostykę laboratoryjną. Świadomość tego diagności laboratoryjni posiadają.

Dlatego tak ważnym elementem dochodzenia do prawa wykonywania zawodu jest edukacja na poziomie przeddyplomowym i podyplomowym. W tym kierunku szły zamiary Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych i Ministerstwa Zdrowia, oraz Konsultantów Krajowych by stworzyć profesjonalne podstawy komunikacji zawodowej między specjalistami i świadczeniodawcami w obrębie służby zdrowia.

Uzyskiwanie przez diagnostów laboratoryjnych 12 specjalizacji w obszarach diagnostyki laboratoryjnej stanowi fundament wspierania i budowania optymalnej wiedzy o fizjologii i patologii dostarczanej lekarzowi i farmaceutyce przez diagnostę laboratoryjnego. Staje się to konieczne tym bardziej, gdy rozpoznanie postępowania leczniczego w oparciu o metody werbalno obserwacyjne stają się nie niezawodne. Zdolność wyrażania werbalnie tak po stronie pacjenta i lekarza objawów chorobowych i ich obserwacja staje się coraz płytsza i zawodna.

Diagnostyka laboratoryjna tworzy poprzez badania materiału biologicznego pacjenta nie tyle suplement do wywiadu i obserwacji ale podstawę leczenia i staje się bardziej niezawodną i jedyną na ten czas wiarygodną metodą naukową, empiryczną (EBM).

Badanie laboratoryjne stanie się wiarygodne jak opisano wcześniej, gdy będą wykonane przez osoby profesjonalne, zgodnie z procedurą, którą powinny określać standardy postępowania medycznego na każdym poziomie świadczeń.

Ważność tych uwag jest niepodważalna. Opracowywane przez KIDL standardy jakości we wszystkich typach medycznych laboratoriów diagnostycznych wyprzedzają obecną strategię praktyk lekarskich.

Wysiłek środowiska diagnostów laboratoryjnych w nowym, reformowanym systemie ochrony zdrowia pozwalać będzie na realizację założonych celów. Podjęte przez około 1,5 tys. diagnostów laboratoryjnych kształcenie specjalizacyjne nowym trybem rokuje pozytywnie dla przyszłości udziału badania laboratoryjnego w procesie diagnozy i terapii, wykonywanego przez profesjonalnych diagnostów laboratoryjnych, zaś standardy jakości opracowane dla medycznych laboratoriów diagnostycznych będą skuteczne ponieważ zapewnią pełniejszą ochronę zdrowia.

Stanie się to realne gdy zostaną uwzględnione nasze postulaty w reformowanym systemie zdrowia obywateli. Odejście w praktykach leczniczych od dowolności i uznaniowości włączenia niezbędnych do diagnozowania i monitorowania terapii elementów uzyskiwania danych o zdrowiu i chorobie na rzecz obowiązującej, określonej ściśle procedury postępowania leczniczego przyniesie skutki nie tylko w płaszczyźnie zdrowotności społeczeństwa ale nade wszystko także oszczędności finansowanych dotychczasowych sposobów leczenia. Zaoszczędzone środki błędnych leków powtarzających i przedłużających cykle lecznicze mogą być przesunięte na wysoko specjalistyczne świadczenia, których społeczeństwo również oczekuje. Diagnozowanie zdrowia i choroby wraz z monitorowaniem procesu terapeutycznego oparte na empirycznym badaniu laboratoryjnym tworzyć będą medycynę XXI wieku, natomiast wiarygodność wyniku badań będzie gwarantowana obowiązującą normą przy udziale KIDL.

#### 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 Wrzosiem (tel. kom.: 607 875 660).**

Kierownik Biura KIDL  
Stanisław Krężel

### Borelioza z Lyme, laboratoryjne metody rozpoznania zakażenia

Tomasz Chmielewski, Stanisława Tylewska-Wierzbanowska,  
Samodzielna Pracownia Riketsji, Chlamydii i Krętków Odzwierzęcych  
Państwowego Zakładu Higieny, Warszawa

Borelioza z Lyme jest najczęściej występującą na świecie chorobą zakaźną, przenoszoną przez kleszcze. Zakażenie to ma charakter wieloukładowy, w którym można wyodrębnić kolejne stadia. W początkowym okresie, we wczesnej fazie (I stadium), po kilku dniach lub tygodniach od chwili zakażenia, pojawia się rumień wędrujący, któremu mogą towarzyszyć objawy grypopodobne.

Następnie dochodzi do zakażenia wielu narządów i układów (II stadium); pojawiają się dolegliwości ze strony ośrodkowego lub obwodowego układu nerwowego, układu kostno-stawowego lub układu krążenia. Późna borelioza z Lyme charakteryzuje się nieodwracalnymi zmianami stawowymi, uszkodzeniem układu nerwowego w postaci encefalopatii lub uszkodzeniem nerwów czaszkowych, obwodowych, a także przewlekłym zanikowym zapaleniem skóry. Wielopostaciowość choroby wymaga diagnostyki różnicowej i często sprawia trudności w prawidłowym rozpoznaniu.

Dla ułatwienia identyfikacji zakażeń jak i dla celów epidemiologicznych wprowadzono definicję przypadku boreliozy z Lyme. Pierwszą definicję sformułowano w 1991 roku w USA. Obejmowała ona chorych z rumieniem wędrującym oraz chorych z co najmniej jednym objawem boreliozy późnej i potwierdzeniem rozpoznania klinicznego badaniem laboratoryjnym [1]. Europejska definicja wprowadzona w 1996 roku jest szersza niż amerykańska ze względu na występowanie w Europie, co najmniej trzech chorobotwórczych dla człowieka genogatunków *B. burgdorferi* sensu lato, tj. *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garini* oraz *B. afzeli* i związane z tym większe zróżnicowanie objawów choroby [18].

W Europie najczęściej występują *B. garini* i *B. afzeli*, podczas gdy *B. burgdorferi* sensu stricto znacznie rzadziej i zwykle w Europie wschodniej. Zróżnicowanie szczepów wywołujących zakażenia na naszym kontynencie muszą być brane pod uwagę przy opracowywaniu nowych testów diagnostycznych, jak PCR oraz antygenów diagnostycznych do badań serologicznych. Jest to bardzo ważne ponieważ w ostatnim czasie wykryto w Europie kolejne, nowe chorobotwórcze genogatunki, *B. valaisiana* i *B. spielmanii*.

### Antygeny *Borrelia burgdorferi* sensu lato w diagnostyce zakażenia

Swoiste dla *B. burgdorferi* białka, które mogą być wykorzystane jako antygeny diagnostyczne charakteryzują się znaczną heterogennością. Występujące w Europie trzy chorobotwórcze dla człowieka genogatunki i jeden w Ameryce Płn można podzielić na przynajmniej siedem serotypów, biorąc pod uwagę jedynie zróżnicowanie występujących na powierzchni komórek swoistych białek OspA. Odpowiadają one podziałowi na genogatunki: *B. burgdorferi* sensu stricto - serotyp 1, *B. afzeli* - serotyp 2, *B. garini* - serotypy od 3 do 7 [23].

W przypadku białka OspC, na podstawie różnic w sekwencji aminokwasów, wyodrębniono dotychczas 4 serotypy krętków [24]. Jest to białko wysoce immunogenne, odpowiedzialne przede wszystkim za wczesną odpowiedź humoralną.

Jednym z najbardziej immunogennych białek w komórce *B. burgdorferi* jest flagelina, białko wchodzące w skład wici. Wywołuje ono silną i wczesną odpowiedź humoralną. Białko to w początkowym i końcowym odcinku łańcucha, wykazuje wysoki stopień homologii z sekwencją aminokwasów flageliny *Bacillus subtilis* (65%) i *Salmonella Typhimurium* (56%) [20]. Epitopy charakterystyczne dla gatunku *B. burgdorferi* zlokalizowane są tylko między 129 a 251 aminokwasem. Końcowa sekwencja tego polipeptydu wykazuje aż 80% homologii z białkiem flageliny *T. pallidum* [5].

Obecnie w diagnostyce wykorzystywane są także wysoce konserwatywne, a jednocześnie immunogenne epitopy w heterogennych białkach wytwarzanych in vivo, jak np. peptyd C6 w białku VlsE czy analog białka DbpA (p17).

Podstawą rozpoznania boreliozy z Lyme jest obecność określonych objawów klinicznych, potwierdzonych badaniem laboratoryjnym, wykrywającym swoiste przeciwciała klasy IgM i/lub IgG dla antygenów *B. burgdorferi*.

### Metody diagnostyczne

Prawidłowe rozpoznanie boreliozy z Lyme zależy od odpowiednio dobranych metod i antygenów diagnostycznych, następnie od prawidłowej interpretacji wyników.

Powszechnie stosowane testy ELISA są czułe, proste w wykonaniu, gwarantują szybkie uzyskanie wyniku nie podlegającego subiektywnym ocenom badacza. Niestety ich niska swoistość, wynosząca 29-71% w zależności od zastosowanego antygeny [11], może prowadzić do błędnych rozpoznań.

Stosowane testy diagnostyczne do wykrywania boreliozy z Lyme różnią się między sobą antygenem diagnostycznym. W testach pierwszej generacji była to cała komórka bakteryjna, stosowana w metodach immunoenzymatycznych w formie sonikatu lub cała, nienaruszona komórka w odczynie immunofluorescencji. Ze względu na bardzo małą swoistość, praktycznie testy tej grupy nie są już stosowane.

Zestawy diagnostyczne ELISA stosowane w badaniach przesiewowych powinny należeć przynajmniej do drugiej generacji, ponieważ w grupie tej została udoskonalona swoistość i w dużym stopniu zostały ograniczone krzyżowe reakcje. Do tej grupy należą testy, w których albo antygenem diagnostycznym są izolowane frakcje białek albo stosowana jest wstępna absorbcja krętkami Reitera. Szczep używany do produkcji antygeny muszą wytwarzać białko OspC umożliwiające wykrycie swoistej odpowiedzi w klasie IgM oraz DbpA (decorin binding protein A, dawniej p17), będące dominującym antygenem w odpowiedzi IgG.

W najnowszej, trzeciej generacji testów, jako antygeny diagnostyczne stosowane są rekombinowane białka. Dotychczas otrzymano i sprawdzono pod względem przydatności w diagnostyce boreliozy z Lyme, białka p83/100 (wskaźnik późnej fazy choroby), p41 (flagelina, p41int (wewnętrzna część cząsteczki flageliny o masie 14 000, nie reagująca krzyżowo z flageliną innych gatunków bakteryjnych), białka błony zewnętrznej OspA i OspC i p39. Ostatnie badania wskazują, że dzięki uzupełnieniu antygeny diagnostycznego o rekombinowane białka DbpA (p17) i p58, a także p14, p30, p43 można uzyskać większą czułość testu. Ostatnio z powodzeniem w Stanach Zjednoczonych wprowadzono rekombinowany swoisty antygen VlsE i pochodzący z niego syntetyczny peptyd C6. Przydatność tych antygenów zdają się potwierdzać badania surowic pochodzących od europejskich chorych z rumieniem wędrującym, ACA i zapaleniem stawów. Jednocześnie jednak zwraca się uwagę na konieczność ostrożnego przenoszenia wyników badań z USA do Europy ze względu na występujące tu zróżnicowanie genogatunków i heterogenność immunodominujących epitopów antygeny VlsE [6].

**W każdym przypadku, powinny być oznaczone przeciwciała obu klas.** Uzyskanie ujemnego wyniku badania serologicznego we wczesnej fazie zakażenia nie przesądza o rozpoznaniu. Zalecane jest powtórzenie badania z nową próbką surowicy po upływie 4 tygodni od wystąpienia pierwszych objawów choroby.

Należy także pamiętać, że swoiste przeciwciała wykrywane są także u osób zdrowych, co może świadczyć o bezobjawowym przebiegu choroby. W zależności od stopnia narażenia na kontakt z kleszczami odsetek osób z przeciwciałami wynosi od 12% w normalnej populacji (krwiodawcy) do około 40% w grupach ryzyka np. wśród leśników [3,4]. Obecność samych przeciwciał, bez objawów zakażenia, nie może być wskazaniem do leczenia.

W 2000 roku opublikowano, opracowane przez międzynarodową grupę ekspertów, zalecenia dotyczące prawidłowej diagnostyki laboratoryjnej boreliozy z Lyme (angielska wersja „MiQ 12 Lyme Borreliose” dostępna w internecie na stronie: <http://www.dghm.org/red/index>).

Ze względu na liczne nieswoiste reakcje krzyżowe i fałszywie dodatnie wyniki, których nie można było wyeliminować w powszechnie stosowanych testach ELISA, mimo wprowadzania różnych antygenów diagnostycznych (sonikat całej komórki, izolowane białka, antygeny rekombinowane), zalecana jest obecnie dwustopniowa diagnostyka serologiczna.

. Polega ona na oznaczeniu w pierwszym etapie poziomu przeciwciał półilościowymi testami ELISA o wysokiej czułości. Następnie, próbki surowic, z którymi uzyskano wynik dodatni lub wątpliwie dodatni są badane jakościową metodą Western-blot o wysokiej swoistości, w celu weryfikacji wcześniejszych rezultatów. Interpretacja wyników badań ELISA i Western-blot odbywa się według ściśle ustalonych kryteriów.

#### Western-blot

Jako test potwierdzający Western blot powinien charakteryzować się wysoką, nie mniejszą niż 95% swoistością.

Pierwsze kryteria oceny wyniku badania metodą Western-blot ustalone zostały przez Center for Disease Control and Prevention (CDC) w Atlancie, USA. Interpretacja uzyskanych wyników zgodnie z tymi kryteriami jest często zalecana przez producentów testów i nie rzadko automatycznie stosowana na kontynencie europejskim. Może to prowadzić do błędów w rozpoznaniu.

Opracowanie kryteriów oceny wyników badań metodą Western-blot przeprowadzonych u chorych z terenu Europy jest bardziej złożone ze względu na występowanie kilku genogatunków chorobotwórczych na obszarze tego kontynentu.

Analiza występowania przeciwciał przeprowadzona w ramach programu EUCALB, wykazała przydatność następujących 8 antygenów w diagnostyce zakażeń *B. burgdorferi* sensu lato: OspC i p41 dla IgM oraz p83/100, p58, p41, p39, OspC, DbpA (p17) dla IgG, jakkolwiek wykazano zróżnicowane ich znaczenie. Stwierdzono, bowiem że czułość i swoistość metody zależna jest od genogatunku szczepu użytego jako antygen diagnostyczny. Ważnym elementem jest zastosowanie kryteriów uwzględniających odpowiedź immunologiczną na antygeny szczepów najczęściej występujących na danym terenie. Ponadto, przyjęta interpretacja wyników powinna być również powiązana z charakterystyką objawów klinicznych stwierdzanych na danym terenie [13].

Aby poprawnie zinterpretować wynik badania, potrzebna jest informacja na temat czasu trwania choroby, z którym ściśle związane jest pojawienie się przeciwciał dla określonych antygenów. We wczesnej boreliozie znaczenie ma intensywność przynajmniej dwóch frakcji białkowych (p41 i OspC) i w związku z tym konieczne jest stosowanie odpowiednich kontroli wewnętrznych, aby ocenić badanie półilościowo.

Dostępne są testy, w których rozdziałowi poddano albo lizat całej komórki albo wyselekcjonowane białka *B. burgdorferi* produkowane przez komórki *E. coli* w wyniku manipulacji genetycznych.

Zaletą lizatu całej komórki jest możliwość wykrycia większej liczby immunogennych frakcji. Wadą natomiast to, że w niektórych przypadkach trudno jest rozróżnić frakcje swoiste od krzyżowo reagujących. Zastosowanie jako antygen diagnostyczny w metodzie immunoblot, szczepu, który wytwarza swoiste, immunogenne białka wymaga dokładnej standaryzacji i bardzo precyzyjnej identyfikacji frakcji białkowych przy pomocy przeciwciał monoklonalnych.

Na terenie Europy zalecany jest w diagnostyce Western-blot z antygenami *B. afzelii* (szczep PKo) ponieważ charakteryzuje się największą czułością.

Przyjmuje się, że jeżeli antygenem jest szczep *B. afzelii* to wynik immunoblot jest dodatni jeżeli przeciwciała IgM reagują przynajmniej z jedną frakcją z pośród: p41 (silna reakcja), p39, OspC, DbpA (Osp17). Wraz ze zmianą antygeny diagnostycznego zmieniają się również kryteria interpretacji (patrz Tabela I).

Zastosowanie antygenów rekombinowanych ma wiele zalet. Użycie ich daje pewność, że uzyskane reakcje dotyczą wyłącznie swoistych białek. Ponadto, możliwe jest zastosowanie w jednym teście swoistych białek pochodzących z różnych genogatunków, np. DbpA OspC i BmpA, a także swoistych peptydów będących fragmentami białek, które w całości wywołują reakcje krzyżowe, jak np. białko p41 i peptyd p41 int., a także antygenów wytwarzanych przez bakterie tylko w warunkach *in vivo*, jak DbpA i VlsE. Ponadto, testy z antygenami rekombinowanymi są obecnie lepiej wystandaryzowane niż z lizatem komórkowym [15].

Dodanie do zestawu antygenów białek DbpA i VlsE znacznie zwiększa czułość testu. We wczesnym stadium choroby, często przeciwciała IgG dla VlsE pojawiają się przed przeciwciałami IgM dla innych antygenów [21,22].

#### Inne badania

Podstawą rozpoznania laboratoryjnego boreliozy z Lyme są badania serologiczne. Opisywane są jednak serologicznie ujemne przypadki choroby. Przyczyna tego zjawiska nie jest wyjaśniona, między innymi tłumaczy się to możliwością powstawania kompleksów immunologicznych [16]. W związku z tym, jeżeli mimo ujemnego wyniku nadal klinicznie podejrzewane jest zaawansowane stadium boreliozy, można zastosować inne dodatkowe metody diagnostyczne, jak np. PCR lub hodowlę itp. Mają one także zastosowanie u chorych z nietypowym rumieniem wędrującym, przy podejrzeniu wczesnej neuroboreliozy, w której nie zostały jeszcze wytworzone przeciwciała oraz u chorych z obniżoną odpornością.

#### PCR

Łańcuchowa reakcja polimerazy umożliwia wielokrotne powielanie określonych, charakterystycznych dla danego drobnoustroju fragmentów genomu. W przypadku *B. burgdorferi* sensu lato, najczęściej wykrywane są sekwencje genów kodujących flagelinę, białka błony zewnętrznej (Osp), 16S-RNA i 5S-23S-RNA [14]. PCR jest metodą bardzo czułą, a dolna granica wykrywalności wynosi około 10-1000 komórek w badanej próbce. Pomimo swych niewątpliwych zalet posiada jednak szereg ograniczeń. Do najważniejszych należy rodzaj materiału do badania i stadium choroby, w którym został pobrany. Materiał genetyczny krętków częściej można wykryć w ostrej fazie choroby niż w jej okresie przewlekłym. DNA krętków wykrywa się w około 60-70% wycinków skóry pobranych z rumienia wędrującego i w około 60% wycinków ze zmian typu ACA [14,17,19]. U chorych z rumieniem wędrującym DNA *B. burgdorferi* we krwi stwierdza się nie częściej niż u około 18% chorych, w płynie mózgowo-rdzeniowym DNA wykrywa się w 38% przypadków w neuroboreliozie wczesnej i w 25% w neuroboreliozie późnej [8,9]. W zależności od stosowanych starterów czułość metody PCR w płynie stawowym wynosi od 48% dla starterów komplementarnych do sekwencji genu 16S rRNA do 96% dla starterów dla OspA [10]. Na wynik badania może mieć wpływ obecność w badanym materiale DNA pochodzącego z komórek gospodarza, jak i hamujący wpływ innych składników tkankowych takich jak hemoglobina, heparyna, porfiryny. Ograniczenia te mogą prowadzić do uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich jak i fałszywie ujemnych. Poważny wpływ na otrzymany wynik mają też metody ekstrakcji DNA, gdyż ze względu na niewielką liczbę bakterii w badanym materiale może dochodzić do strat prowadzących do fałszywie ujemnego wyniku [14]. Ponadto startery zastosowane do reakcji muszą umożliwiać amplifikację fragmentów DNA charakterystycznych dla wszystkich chorobotwórczych i potencjalnie chorobotwórczych genogatunków *B. burgdorferi* sensu lato z tą samą czułością.

#### Hodowla

Klasyczne postępowanie w diagnostyce mikrobiologicznej, hodowla i izolacja czynnika etiologicznego nie spełnia warunków wymaganych w rutynowej diagnostyce. Aby wydać wynik hodowlę krętków prowadzi się do 3 miesięcy. Uzyskany po tym czasie ujemny wynik nie wyklucza zakażenia. Krętki *B. burgdorferii* można izolować ze zmian skórnych (biopaty), płynu mózgowo-rdzeniowego, płynu stawowego i krwi. Czułość tej metody w II stadium choroby waha się od około 10 do 30%. Najczęściej dodatnie posiewy uzyskuje się z biopatów skóry pobranych z rumienia (ok. 50-85%), rzadziej z płynu mózgowo-rdzeniowego (ok. 10%), z chrząstki stawowej; najmniej izolacji uzyskuje się z płynu stawowego i krwi.

Do hodowli krętków *B. burgdorferii* stosowane jest bardzo bogate podłoże BSK (Barbour'a, Stoenner'a, Kelly'ego) i jego różne modyfikacje, najczęściej podłoże BSK w skład którego wchodzi ponad 60 składników, takich jak aminokwasy, witaminy, elektrolity; dodatkowo jest wzbogacane surowicą króliczą (6%) [12]. Inokulum nie może być mniejsze niż 10 komórek bakteryjnych. Gęstość zawiesiny bakteryjnej w podłożu BSK-H po inkubacji 14 dni nie przekracza 1010 komórek w 1 ml, a czas między podziałami komórkowymi wynosi około 12 godzin. Na podłożach stałych bakterie te rosną jeszcze wolniej [7].

*B. burgdorferi* są bakteriami powoli rosnącymi na dostępnych obecnie sztucznych podłożach bakteriologicznych. Optymalna temperatura wzrostu krętków przy obniżonym poziomie tlenu wynosi 32-37°C.

### Hodowla i PCR

W porównaniu z zakażeniami innymi drobnoustrojami, liczba krętków w dostępnych do badania próbkach materiału klinicznego jest bardzo mała, na granicy wykrywalności metodą PCR. Ocenia się, że w płynie mózgowo-rdzeniowym liczba tych drobnoustrojów nie przekracza 50 komórek w 1 mL [8], i uzyskanie wystarczającej ilości DNA krętków do amplifikacji metodą PCR jest często niemożliwe. Można najpierw wykonać posiew, a następnie po hodowli przez 1-2 tygodnie, poszukiwać DNA *B. burgdorferi* sensu lato metodą PCR. Ma to szczególnie znaczenie w przypadkach klinicznego rozpoznania neuroboreliozy przy słabej odpowiedzi immunologicznej lub jej braku. Taki sposób postępowania z materiałem klinicznym, podnosi znacznie czułość badania diagnostycznego w kierunku boreliozy [2].

Tabela. Interpretacja wyniku badania metodą Western-blot z antygenami występujących w Europie genogatunków

Genogatunek*	Frakcje antygenowe wykrywane przez przeciwciała klasy:	
	IgM	IgG
<i>B. afzelii</i>	Co najmniej jedna frakcja z: p39, OspC, p17 lub silna reakcja z antygenem p41	Co najmniej dwie frakcje z: p83/100, p58, p43, p39, p30, OspC, p21, DbpA (p17), p14
<i>B. garini</i>	Co najmniej jedna frakcja z: p39, OspC lub silna reakcja z antygenem p41	Co najmniej jedna frakcja z: p83/100, p39, p30, OspC, p21, DbpA (p17)
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	Co najmniej jedna frakcja z: p39, OspC, p17 lub silna reakcja z antygenem p41	Co najmniej jedna frakcja z: p83/100, p58, p56, OspC, p21, DbpA (p17)
Antygeny rekombinowane	Co najmniej dwie frakcje z: p39, OspC, p41 int., p17 lub silna reakcja z antygenem OspC	Co najmniej dwie frakcje z: p83/100, p58, p39, OspC, p41 int., DbpA (p17)

\* genogatunek, z którego przygotowano antygen diagnostyczny

### Piśmiennictwo

- Centers for Disease Control and Prevention. Case definitions for public health surveillance. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. **39** (RR-13):19-21 (1990)
- Chmielewski T., Fielt J., Gniadkowski M., Tylewska-Wierzbawska S. Improvement to laboratory recognition of Lyme borreliosis with the combination of culture and PCR methods. *Mol. Diagn.* **7** (3/4):155-162 (2003)
- Chmielewski T., Tylewska-Wierzbawska S. Występowanie przeciwciał swoistych dla *Borrelia burgdorferi* u ludzi zdrowych na terenie Polski. *Przeg. Epidemiol.* **56**, 33-38 (2002)
- Chmielewski T., Tylewska-Wierzbawska S. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* and HGE antibodies in forest workers in Poland. IX International Conference on Lyme Borreliosis and other tick-borne diseases. 18-22.08.2002. New York, USA.
- Coleman J.L., Benach J.L. Identification and characterization of an endoflagellar antigen of *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Invest.* **84**, 322-330 (1989)
- Goetner G., Schulte-Spechtel U., Hillermann R., Liegl G., Wilske B., Fingerle V. Improvement of Lyme borreliosis serodiagnosis by a newly developed recombinant immunoglobulin G (IgG) and IgM line immunoblot assay and addition of VlsE and DbpA homologues. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 3602-3609.
- Kurti T.J., Munderloch U.G., Johnson R.C., Ahlstrand G.G. Colony formation and morphology in *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.* **25**, 2054-2058 (1987)
- Lebech A.-M., Hansen K. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in urine samples and cerebrospinal fluid samples from patients with early and late Lyme neuroborreliosis by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 1646-1653 (1992)
- Nocton J.J., Bloom B.J., Rutledge B.J., Persing D.H., Logigian E.L., Schmid C.H., Steere A.C. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid in Lyme neuroborreliosis. *J. Infect. Dis.* **174**, 623-627 (1996)
- Nocton J.J., Dressler F., Rutledge B.J., Rys P.N., Persing D.H., Steere A.C. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid from patients with Lyme arthritis. *N. Engl. J. Med.* **330**, 229-234 (1994)

- Nohlmans M.K.E., Blaauw A.A.M., van den Bogaard A.E.J., van Boven C.P.A. Evaluation of nine serological tests for diagnosis of Lyme borreliosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**, 394-400 (1994)
- Pollack R.J., Teleford III S.R., Spielman A. Standardization of medium for culturing Lyme disease spirochetes. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 1251-1255 (1993)
- Robertson J., Guy E., Andrews N., Wilske B., Anda P., Grandstrom M., Hauser U., Moosmann Y., Sambri V., Schellekens J., Stanek G., Gray J. A European multicenter study of immunoblotting in serodiagnosis of Lyme borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2097-2102 (2000)
- Schmidt B.L. PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 185-201 (1997)
- Schulte-Spechtel U., Lehnert G., Liegl G., Fingerle V., Heimerl C., Johnson B.J.B., Wilske B. Significant improvement of the recombinant *Borrelia*-specific immunoglobulin G immunoblot test by addition of VlsE and a DbpA homologue derived from *Borrelia garini* for diagnosis of early neuroborreliosis. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 1299-1303 (2003).
- Schutzer S.E., Coyle P.K., Belman A.L., Golightly M.G., Drulle J. Sequestration of antibody to *Borrelia burgdorferi* in immune complexes in seronegative Lyme disease. *Lancet* **335**:312-315 (1990)
- Schwartz I., Wormser G.P., Schwartz J.J., Cooper D., Weissensee P., Gazumyan A., Zimmermann E., Goldberg N.S., Bittker S., Campbell G.L., Pavia C.S. Diagnosis of early Lyme disease by polymerase chain reaction amplification and culture of skin biopses from erythema migrans lesions. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 3082-3088 (1992)
- Stanek G., O'Connell S., Cimmino M., Aberer E., Kristofertsch W., Grandstrom M., Guy E., Gray J. European Union concerted action on risk assessment in Lyme borreliosis: clinical case definitions for Lyme borreliosis. *Wien. Klin. Wochenschr.* **108**, 741-747 (1996)
- von Stedingk L.V., Olsson I., Hanson H.S., Asbrink E., Hovmark A. Polymerase chain reaction for detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in skin lesions of early and late Lyme borreliosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**, 1-5 (1995)
- Wallich R., Moter S.E., Simon M.M., Ebnet K., Heiberger A., Kramer M.D. The *Borrelia burgdorferi* flagellum-associated 41-kilodalton antigen (flagellin): molecular cloning, expression, and amplification of the gene. *Infect. Immun.* **58**, 1711-1719 (1990).
- Wilske B. Diagnosis of Lyme borreliosis in Europe. *Vector-Borne Zoon. Dis.* **3**(4), 215-227 (2003)
- Wilske B., Fingerle V., Schulte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol Med. Microbiol.* **49**, 13-21 (2007).
- Wilske B., Preac-Mursic V., Gobel U.B., Graf B., Jauris S., Soutschek E., Schwab E., Zumstein G. An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 340-350 (1993)
- Wilske B., Preac-Mursic V., Jauris S., Hofmann A., Pradel I., Soutschek E., Schwab E., Will G., Wanner G. Immunological and molecular polymorphisms of OspC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **61**, 2182-2191 (1993)

### Adres autorów

Państwowy Zakład Higieny  
Samodzielna Pracownia Riketsji, Chlamydii i Krętków  
Odzwierzających  
ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa  
tel. 022-5421261, e-mail: tchmielewski@pzh.gov.pl

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

Upzejmie 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

**Jaka jest przyczyna tak dużej różnorodności cen za badania laboratoryjne?**

**dr Ewa Świątkowska**  
**ZDL ICZMP Łódź**

Zaistniałe w Polsce przemiany ustrojowe oraz reforma w ochronie zdrowia wymusiły stworzenie systemu wydatkowania publicznych środków finansowych w oparciu o rzeczywiste koszty poniesione przez zakłady opieki zdrowotnej (zoz) przy leczeniu określonych przypadków chorobowych.

Reforma ta spowodowała współistnienie na rynku usług medycznych dwóch niezależnych podmiotów, w tym wypadku zoz- publicznych i niepublicznych. Dodatkowo nastąpiło urynkowienie części usług medycznych. Powstanie wolnego rynku usług medycznych i wprowadziło zasadę konkurencyjności także w zakresie badań laboratoryjnych. Zasada ta powinna być oparta nie tylko na konkurencyjności oferowanych cen ale również i jakości usług, a ta z kolei jest pochodną spełnienia określonych standardów, zapewniających jakość oraz umożliwiających ich obiektywną weryfikację, przy jednoczesnej ochronie pacjenta i personelu. Nasz wysiłek winien być skierowany na jakość wyniku jak również i całej oferowanej usługi, z uwzględnieniem również jej strony ekonomicznej.

Medyczne laboratorium diagnostyczne może funkcjonować jako niezależny niepubliczny zoz lub być częścią publicznego lub niepublicznego zoz-u. Już sam fakt formy własności laboratorium może rzutować na charakter i rozkład kosztów mających wpływ na cenę jednostkową badania laboratoryjnego.

Medyczne laboratorium diagnostyczne jest laboratorium badawczym wykorzystującym ilościowe i jakościowe metody analityczne i badania w materiale biologicznym pobranym od pacjentów na zlecenie lekarskie lub na życzenie własne pacjenta. Badania te stanowią część postępowania lekarskiego mającego na celu rozpoznanie choroby, monitorowanie jej przebiegu i leczenia oraz określenie stanu zdrowia dla celów profilaktycznych, epidemiologicznych i orzecznictwa lekarskiego. Każde laboratorium zobowiązane jest do prowadzenia stałej, codziennej i w pełni udokumentowanej wewnątrzlaboratoryjnej kontroli jakości wszystkich wykonywanych badań, jak również musi poddawać się stałej kontroli zewnątrzlaboratoryjnej, przynajmniej w jednym z istniejących systemów krajowych lub międzynarodowych. Za stworzenie systemu zapewnienia jakości i prowadzenia kontroli odpowiedzialny jest kierownik laboratorium bądź osoba przez niego upoważniona, o odpowiednich kwalifikacjach, która jest zobowiązana do przeprowadzania wewnętrznych kontroli oraz do prowadzenia i przechowywania dokumentacji. Koszty materiałów kontrolnych oraz zużywanych odczynników na wykonanie oznaczeń kontrolnych oraz koszty udziału w zewnętrznych sprawdzianach muszą być uwzględnione w kalkulacji kosztów badań.

Warunki lokalowe laboratorium powinny spełniać wymagania niezbędne dla właściwej organizacji pracy oraz higieny i bezpieczeństwa pracy zgodnie z rozporządzeniem MZ. Każdy materiał biologiczny podlegający procesom analitycznym w laboratorium medycznym traktujemy jako materiał zakaźny i dlatego personel laboratorium musi mieć zapewnioną odpowiednią ilość odzieży ochronnej, rękawiczek, sprzętu jednorazowego, środków czystościowych i dezynfekcyjnych. Materiał biologiczny po wykonaniu badań musi być poddany właściwej utylizacji.

Współczesne medyczne laboratoria są nowoczesne, o dużym stopniu automatyzacji, zapewniające dużą sprawność i niezawodność procesów analitycznych oraz zatrudnia personel o odpowiednich kwalifikacjach do typu i profilu prowadzonych badań.. Często laboratorium dla zapewnienia ciągłości wykonywanych badań musi posiadać aparaturę zastępczą (np. szpitalne i duże laboratoria), urządzenia telekomunikacyjne i systemy informatyczne.

Należy uznać, że jakość wykonywanych badań w takich nowoczesnych laboratoriach, dobrze zarządzanych powinna być wysoka i porównywalna. Również koszty poniesione na wykonywanie badań na takim samym sprzęcie analitycznym, podobnymi lub takimi samymi metodami i odczynnikami powinny być porównywalne. Jednakże tak nie jest.

W Polsce obserwujemy dość duże rozdrobnienie jeśli chodzi o ilość działających laboratoriów medycznych niewiele jest dużych laboratoriów wykonujących powyżej 1 miliona badań /rok. Dodatkowo obserwujemy, że od czasu wdrożenia reformy w ochronie zdrowia bardzo wiele laboratoriów wykonuje zdecydowanie mniejszą ilość badań laboratoryjnych być może dlatego, że część badań wykonują nowopowstałe laboratoria sektora niepublicznego a być może dlatego, że zmniejszyła się ilość zleceń lekarskich.

Laboratorium medyczne funkcjonujące w publicznym sektorze ochrony zdrowia ma obowiązek prowadzić swój rachunek kosztów wg rozporządzenia MZ z 22.12.1998 ( Dz U nr 164 poz.1194 ) a wszelkich zakupów niezbędnych materiałów i zestawów odczynnikowych dokonuje drogą zamówień publicznych. Bezpośredni i główny wpływ na cenę jednostkową - ma ilość asortymentu zgłoszona do postępowania przetargowego jak również forma własności sprzętu analitycznego - zakup na własność czy dzierżawa.

Laboratoria niepubliczne dokonują zakupów negocjując ceny bezpośrednio z dostawcami.

W chwili obecnej dzięki automatyzacji procesów analitycznych następuje zmniejszenie ilości zużywanych odczynników. Zakupy odczynników i sprzętu medycznego drogą postępowania przetargowego, dzięki konkurencji pomiędzy dostawcami umożliwia uzyskanie dość niskich cen jednostkowych przy produkcji o porównywalnej jakości, przy zachowaniu stałości cen nawet na okres trzech lat. W ten sposób istnieje możliwość obniżania bezpośrednich kosztów wykonywania badań. Poprzez pozyskiwanie sprzętu analitycznego o szerokich możliwościach analitycznych, szybkich, o wysokiej wydajności, które mogą być połączone systemem komputerowym- możemy również optymalizować zatrudnienie jak również powierzchnię zajmowaną przez laboratorium. Ograniczenie zajmowanej powierzchni zmniejsza koszty eksploatacyjne ale również może wiązać się z polepszeniem i usprawnieniem organizacji pracy w laboratorium.

Dokonany w czwartym kwartale 2006 roku 30% wzrost wynagrodzeń w ochronie zdrowia, głównie w sektorze publicznym, ma dość istotny wpływ na wzrost cen jednostkowych badań laboratoryjnych, szczególnie w tych placówkach gdzie zatrudniony jest personel o wysokich kwalifikacjach i gdzie pełnione są dyżury zakładowe.

Laboratoria sektora niepublicznego są różnej wielkości małe, duże lub sieciowe, wykonując różny zakres i różne ilości badań laboratoryjnych. Większość wykonuje tylko te badania, które można wykonać na różnego typu analizatorach. Natomiast część badań manualnych, pracochłonnych lub specjalistycznych wolą zakupić w laboratoriach publicznych lub dążą do zaniechania tego typu badań diagnostycznych. Często pracują w pomieszczeniach o małej powierzchni, przy optymalnie zredukowanym stanie zatrudnienia personelu fachowego. Stąd rachunek kosztów wynikający z eksploatacji i wynagrodzeń może być znacznie korzystniejszy w porównaniu z laboratoriami sektora publicznego. Z kolei część dużych i sieciowych laboratoriów niepublicznych ponosi koszty posiadania i utrzymania środków transportu niezbędnych do przewożenia materiału biologicznego pobranego od pacjentów, często z dość dużych odległości.

Wszystkie te czynniki mogą końcowo wpłynąć na cenę końcową badania.

**PRZYPOMNIENIE STATUTOWE**

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

**APELUJEMY O SYSTEMATYCZNE OPLACANIE OBLIGATORYJNYCH SKŁADEK**



Każdy kierownik laboratorium powinien w oparciu o szczegółową statystykę wykonywanych badań dokonywać analizy kosztów wpływających na cenę końcową badania i porównywać ją z cenami badań w innych laboratoriach, szczególnie o podobnym lub takim samym wyposażeniu i zakresie wykonywanych badań. Znajomość kosztów laboratorium jest bardzo ważna przy ustalaniu cen jednostkowych badań laboratoryjnych. Kierownik laboratorium oprócz tego że jest osobą posiadającą wysokie kwalifikacje zawodowe musi być również osobą odpowiedzialną za całokształt działalności również w zakresie konkurencyjności laboratorium na rynku usług medycznych. W oparciu o rachunek kosztów można ocenić czy wykonywanie określonych badań jest uzasadnione z ekonomicznego punktu widzenia, czy należy zrezygnować z jego wykonywania i w uzasadnionych przypadkach zakupić je w innym ośrodku.

Zastanawiające jest więc dlaczego przy ustalonych zasadach funkcjonowania a nawet wyposażenia medycznych laboratoriów obserwujemy tak duże zróżnicowanie cen jednostkowych badań w poszczególnych kategoriach w naszym kraju.

Czyżby negocjacyjny charakter dokonywania zakupów pozwalał laboratorium sektora niepublicznego na uzyskiwanie tak niskich cen zakupowych zestawów odczynnikowych od dostawców co w następstwie daje bardzo niskie ceny jednostkowe badań laboratoryjnych z jakimi się spotykamy w laboratoriach niepublicznych.

### Jakość wyników badań laboratoryjnych a zdrowie

HANNA HAUSNER

Człowiek jest siłą napędową w rozwoju wielu dziedzin nauki - co rzutuje na jakość życia.

U zarania dziejów ludzie otrzymali przesłanie - "czyńcie sobie ziemię 'poddaną'" - tak też się dzieje, choć nie zawsze z dobrym skutkiem.

Cechą naszych czasów jest wzrost znaczenia jakości we wszystkich dziedzinach życia. Właściwą jakością jest szczególnie istotna w obszarach, gdzie od niej zależy nie tylko zadowolenie i satysfakcja klienta, ale przede wszystkim zdrowie i życie człowieka. Takim obszarem niewątpliwie jest opieka zdrowotna.

Zgodnie z dokumentami Światowej Organizacji Zdrowia /WHO/ jakość w opiece zdrowotnej jest jednym z najwyższych priorytetów.

W dokumencie „Zdrowie 21” zawarte jest 21 celów opieki zdrowotnej.

Cel 16 mówi „do 2010r należy zapewnić zarządzanie w opiece zdrowotnej w kierunku przejścia na programy zorientowane na populację oraz na opiekę medyczną ukierunkowaną na wynik zdrowotny” /1/ Wynika z tego, że placówki służby zdrowia muszą dążyć do zadowolenia pacjenta, uwzględniając jego potrzeby oraz poprawić jakość świadczonych usług.

Zdrowie jest specyficzną wartością o szczególnym wymiarze etycznym.

Zdrowie nie jest towarem - nie ma ceny - jest bezcenne.

WHO uznaje fakt, że pojęcie zdrowia jest pojęciem bardzo złożonym.

Jest kilka definicji zdrowia - m.in. \* zdrowie to stan dobrego samopoczucia fizycznego, psychicznego i społecznego, a nie tylko nieobecność choroby lub niepełnosprawności /2/-definicja z 1947 r \*zdrowie jest warunkiem wstępnym dobrostanu fizycznego i psychicznego oraz dobrej jakości życia; jest miarą postępu w dziedzinie zmniejszenia ubóstwa, zacieśnienia więzi społecznych i eliminowania dyskryminacji” /3/

Zdrowie wreszcie jest stanem subiektywnym, a więc ocenia je osoba, która ta kwestia dotyczy, ale w sensie obiektywnym o zdrowiu może orzekać tylko lekarz.

Lekarz zbierając wywiad dotyczący stanu zdrowia pacjenta - stawia hipotezę. W wielu przypadkach tu właśnie zaczyna się rola diagnostyki laboratoryjnej, bowiem ta hipoteza musi (powinna być) zweryfikowana.

Wyniki badań laboratoryjnych rzutują na dalsze postępowanie lekarza względem pacjenta.

Wielce istotną sprawą jest, aby wynik badania diagnostycznego był wiarygodny. Wynik (raport z badania) jest końcowym efektem naszej pracy. Wiarygodny wynik można uzyskać tylko w laboratoriach spełniających wymagane standardy ze szczególnym uwzględnieniem kompetentnego personelu (wykształcenie, doświadczenie) Czy człowiek nie zasługuje na wiarygodny wynik ?? - jest to pytanie retoryczne a jednak . . .

Zatem przed nami - diagnostami - jest wiele pracy., aby laboratoria spełniały standardy jakości - w szerokim tego słowa znaczeniu.

Jest absolutnie właściwe, aby sondażowo przeprowadzić ankietę celem oceny aktualnego stanu diagnostyki laboratoryjnej w Polsce.

Wymagania jakości obejmują zarówno małe laboratoria w terenie, laboratoria w szpitalach, sanepidach, stacjach krwiodawstwa, laboratoria naukowe jak i duże sieci laboratoriów.

Pomocne w tej ocenie są Normy : PN-EN ISO/IEC 17025:2005 , PN-EN 15189:2006r oraz wytyczne zawarte w rozporządzeniach Ministra Zdrowia. Bez względu na rodzaj wdrażanego systemu zarządzania jakością trzeba uwzględnić dwa podstawowe pojęcia - procesy i klientów. Proces opisuje sposób , w jaki wykonywana jest praca w organizacji /laboratorium/. Aby jakość końcowej usługi była właściwa, ważny jest prawidłowy / udokumentowany / przebieg procesu. Drugim pojęciem systemu jakości jest klient. Od klienta / pacjenta wszystko się zaczyna. To ON jest naszym pracodawcą, od NIEGO pochodzą pieniądze. Istotne w systemie jakości jest to, aby zechciał ON nadal korzystać z usług właśnie naszego laboratorium. Zmiana zasad funkcjonowania opieki zdrowotnej sprawiła, że tak jak w innych branżach - bardzo istotną stała się rywalizacja o klienta / pacjenta.

Jednym ze sposobów zwiększających konkurencyjność jest właśnie jakość, a w szczególności zarządzanie przez jakość. Budowanie jakości ma na celu uporządkowanie, a następnie doskonalenie całej organizacji / laboratorium. Jest to bardzo ważny instrument budowania zaufania między organizacją a aktualnymi i przyszłymi klientami.

Jakość to także możliwość eliminowania niepewności i szansa na budowanie trwałego zaufania.

Zmiana zasad finansowania zakładów opieki zdrowotnej wpłynęła na wzrost znaczenia takich pojęć jak : jakość, efektywność działania, racjonalizacja kosztów.

Celem pracy laboratorium stało się nie tylko samo wykonanie badania, ale dążenie by świadczona usługa była właściwej jakości, spełniała wymagania klienta / pacjenta i płatnika. Jakość staje się podstawą skutecznego funkcjonowania, wyznacznikiem kultury organizacji, czynnikiem sukcesu rynkowego a nawet utrzymania się na rynku. W takich właśnie dobrze działających laboratoriach chcemy pracować i osiągać satysfakcję z pracy, poprzez możliwość rozwoju zawodowego. Diagnostyki laboratoryjni pracują w wielu dziedzinach / branżach : analityka, mikrobiologia, immunologia, cytodiagnosticska, patologia, genetyka, parazytologia, epidemiologia, służba krwi itd.

Wszystkich nas łączy wspólne zadanie -- dobrze wykonać swoją pracę, aby uzyskany wynik był przydatny w dalszych postępowaniach - medycznych, wywiadu epidemiologicznego, w analizie zakażeń szpitalnych, właściwym doborze antybiotyku, w badaniach genetycznych , przetaczaniu krwi analizie stanu zdrowia społeczeństwa itd, itd. Jest to szerokie pojęcie medycyny laboratoryjnej, medycyny opartej na faktach - takim celem służy nasza praca.

1 - J.B.Karski „Zdrowie 21 - zdrowie dla wszystkich w XXI wieku” Centrum organizacji i Ekonomiki Ochrony Zdrowia . Warszawa 1999 s.34

2 - J.B.Karski „Teoria organizacji i zarządzania w promocii zdrowia ” CO i EOZ “ Warszawa 1997r s.7

3 - J.B.Karski , A.Koronkiewicz „Zdrowie 21 - zdrowie dla wszystkich w XXI wieku .Podstawowe założenia polityki zdrowia dla wszystkich w Regionie Europejskim WHO” Biuro Regionu Europejskiego Kopenhaga-Warszawa 2000r.s13

**Nowa epoka cytometrii przepływowej- współczesne cytometry i ich  
zastosowanie**

Dr Jarosław Baran

Zakład Immunologii klinicznej PAIP Collegium Medicum UJ

Cytometria jest metodą pomiaru właściwości fizycznych i/lub chemicznych pojedynczych komórek lub innych „cząstek” biologicznych (izolowane jądra komórkowe, kwasy nukleinowe, mitochondria, chloroplasty itp.). W cytometrii przepływowej pomiary te dokonywane są w urządzeniach zwanych cytometrami przepływowymi w trakcie przepływu komórek lub cząstek w strumieniu cieczy. Definicja ta obejmuje więc również liczniki hematologiczne, jednak dla celów tego opracowania zostanie ona ograniczona tylko do aparatów zdolnych do pomiaru właściwości fizycznych i fluorescencji komórek/cząstek przepływających w strumieniu cieczy (zwanych również cytofluorometrami). Dzięki postępowi jaki się dokonał w ostatnich latach w optyce, elektronice, inżynierii laserów, dzięki rozwojowi informatyki dzisiejsze cytometry przepływowe są urządzeniami o znacznie większych możliwościach pomiarowych ale i łatwiejszymi w obsłudze. Również postęp w produkcji coraz to nowych barwników fluorescencyjnych sprawił, że współczesne cytometry potrafią analizować jednoczasowo nawet do kilkunastu parametrów pochodzących z pojedynczej komórki. Zasadniczo wyróżnia się dwa rodzaje cytometrów przepływowych - analizatory i sortery komórkowe. Sortery posiadają zdolność nie tylko zbierania danych o przepływających komórkach (ich analizy) ale również izolacji (sortowania) w wysokim stopniu czystości (>99%) komórek spełniających określone przez operatora kryteria.

Ostatnie lata dzięki wprowadzeniu technologii cyfrowej zapoczątkowały nową epokę w rozwoju cytometrii przepływowej jako techniki naukowo-badawczej. Opracowanie to stanowi formę kompendium wiedzy o dostępnych obecnie komercyjnych cytometrach przepływowych i ich zastosowaniu zarówno w diagnostyce medycznej jak i badaniach podstawowych. Z założenia więc informacje dotyczące opisu cytometrii przepływowej jako metody diagnostyczno-badawczej nie będą przedstawione. Czytelnika zainteresowanego podstawami cytometrii przepływowej odsyłam do artykułu „Cytometria przepływowa - istota metody i jej wykorzystanie” (1).

**Rozwój cytometrii przepływowej**

Początki cytometrii przepływowej sięgają roku 1934, kiedy to Moldavan opublikował na łamach Science artykuł o metodzie liczenia komórek płynących w kapilarze za pomocą czujnika fotoelektrycznego (2). Był to jednak tylko pomysł i sam autor nigdy nie wprowadził go w życie. Pierwsze urządzenia powstały natomiast w połowie lat 40-tych i analizowały one komórki bakteryjne „płynące” w powietrzu a nie w strumieniu cieczy. W 1947 r. Gucker opublikował pierwsze doniesienie o cytofluorometrycznej detekcji bakterii w aerozolach (3). Badania te rozpoczęte jeszcze w trakcie trwania II Wojny Światowej, sponsorowane przez armię amerykańską miały na celu szybką identyfikację w powietrzu bakterii i/lub ich zarodników na wypadek użycia broni biologicznej. Z oczywistych względów badania te nie mogły być ujawnione przed zakończeniem wojny, stąd opublikowane zostały dopiero w 1947 r. W urządzeniu tym próbki powietrza analizowane były w „komorze przepływu” w ciemnym polu (podobnie jak w mikroskopii ciemnego pola) po oświetleniu światłem widzialnym z najmocniejszej znanej wówczas lampy jaką był reflektor samochodu marki Ford. Urządzenie to pozwalało na detekcję z 60% prawdopodobieństwem cząstek o średnicy 0.6 um. Paradoksalnie historia zatoczyła koło, gdyż w ostatnich latach po atakach terrorystycznych armia amerykańska ponownie interesuje się cytofluorometryczną metodą wykrywania bakterii w powietrzu (4). Do roku 1970 na rynku cytometrycznym istniały tylko dwie firmy: amerykańska Bio/Physics Systems, założona przez Lou Kamensky'ego, produkująca Cytograf i Cyto fluorograf oraz niemiecka Phywe AG dystrybuująca Impulscytometer (ICP), komercyjną wersją aparatu Dittricha i Gohde firmy Partec. Wkrótce potem Technicon wprowadził na rynek Hemalog D, pierwszy z serii przepływowych liczników hematologicznych różnicujących populacje leukocytów, a w 1974 r. Becton-Dickinson wprowadził sorter komórkowy FACS, zapoczątkowujący technologię FACS (Fluorescence Activated Cells

Sorters). Rok później Coulter wszedł na rynek z TPS-1, zastępując go później serią EPICS. W roku 1976, po połączeniu Johnson & Johnson z Bio/Physics Systems powstał Ortho Diagnostics Systems, który w 1978 r. nabył prawa również do ICP od Phywe AG, oferując zarówno analizatory (Cytofluorograf), jak i sortery (ICP). Tak więc na początku lat 80-tych, trzy duże firmy B-D, Coulter i Ortho oferowały laserowe cytometry przepływowe z możliwością sortowania. Po roku 1985 zarówno B-D jak i Coulter wprowadziły niesortujące cytometry przepływowe (FACScan i EPICS Profile) wykorzystujące chłodzone powietrzem lasery argonowe o niskiej mocy. Urządzenia te przeznaczone były zarówno do diagnostyki klinicznej jak i badań naukowych. W połowie roku 1987 Ortho zaprzestało produkcji cytometrów i sprzedało zobowiązania serwisowe B-D. Powtórnie Ortho pojawiło się na rynku w 1992 r. z modelem Cytoron Absolute budowanym w Japonii przez firmę Omron, by stopniowo znowu wycofać się pod koniec dekady. W 1988 r. na rynku cytometrycznym pojawiła się firma Cytomation, początkowo oferująca tylko systemy CICERO do udoskonalania przetwarzania danych i przyspieszania sortowania dla dostępnych wówczas urządzeń sortujących, aby w 1994 r. rozpocząć sprzedaż modułowych sorterów MoFlo („modular high speed celi sorter”) stworzonych przez zespół Gera van den Engha w Lawrence Livermore National Laboratory (5). Od tego czasu datuje się obecność trzech wielkich firm cytometrycznych, które dominują na rynku do chwili obecnej: BD Biosciences, Beckman Coulter (połączone w 1997 r.) i DakoCytomation (połączone w 2001 r.). Oprócz tych trzech wielkich, na rynku obecne są i inne firmy oferujące swoje cytometry.

**Analizatory cytofluorometryczne****1. BD Biosciences**

**FACScan** firmy Becton Dickinson był pierwszym nowoczesnym analizatorem dostępnym komercyjnie od 1985 r. Początkowo było to urządzenie „trzykolorowe” współpracujące z komputerem Hewlett-Packard serii 300 w programie Consort 30 lub Consort 32. W połowie lat 90-tych seria systemów analizy Consort została zastąpiona przez FACStation współpracującą z komputerami Apple Macintosh. Wraz ze zmianą systemu komputerowego na Apple'a rosnącym zapotrzebowaniem na analizę czterokolorową Becton-Dickinson zmodernizował model do dwulaserowego (laser argonowy 488 nm i diodowy 635 nm) analizatora czterokolorowego nazywając go **FACSCalibur**. Urządzenie to rejestruje w opcji jednolaserowej 7 parametrów, w tym 3 fluorescencje: zieloną (515-545 nm, „FL1”), żółto-pomarańczową (564-606 nm, „FL2”) i czerwoną (> 670 nm, „FL3”); w opcji dwulaserowej - 8 (4 fluorescencja - czerwona 653-669 nm, „FL4” - wzbudzana jest przez laser diodowy 635 nm). Dla wybranego rodzaju fluorescencji możliwa jest analiza „szerokości” sygnału („pulse width”) wykorzystywana do eliminacji dubletów i agregatów komórkowych. Dodatkowym parametrem jest czas. System akwizycji danych może rejestrować komórki lub „cząstki biologiczne” przepływające z częstością > 30 000/s. Możliwa jest regulacja prędkości przepływu próbki: niska (12 u,l/min), średnia (35 u,l/min) i wysoka (60 u,l/min). Dodatkowo, FACSCalibur może być wyposażony w opcję sortowania działającą na zasadzie mechanicznego wychwytu wybranej (jednej) populacji przez kapilarę poruszającą się ruchem wahadłowym w strumieniu cieczy („catcher tube sorting”). Ze względu na małą wydajność tego typu sortowania (ok. 300 komórek/s) i fakt, że sortowana populacja jest bardzo rozcieńczona (kapilara aspiruje relatywnie duże objętości płynu), rozwiązanie to nie cieszy się dużą popularnością. Zbieranie i analiza danych (zapisanych w systemie FCS 2.0) odbywa się w programie CellQuest lub CellQuest Pro na komputerach Apple'a wyposażonych w procesor PowerPC G4.

**FACSCount** jest małym analizatorem przeznaczonym do przeprowadzania analizy subpopulacji limfocytów CD4 i CD8 u pacjentów zakażonych wirusem HIV. Wyposażony w helowo-neonowy zielony laser (543 nm) rejestruje 2 rodzaje fluorescencji emitowanej przez fykoerytrynę i koniugat fykoerytryny z barwnikiem cyjaninowym. FACSCount desygnowany jest głównie do laboratoriów klinicznych w krajach o wysokiej zachorowalności na AIDS.

**LSR II** zapoczątkował nową linię analizatorów BD. Jest to w pełni cyfrowy analizator mogący współpracować z 4 kserami i analizujący do 15 fluorescencji! Zastąpił on analogowy aparat **LSR I**, który mógł być skonfigurowany jako trójlaserowy, z możliwością analizy 6 fluorescencji. LSR II w optymalnej konfiguracji może posiadać niegazowy („solid state”) kser Sapphire 488 nm (Coherent), laser YAG 355 nm do emisji UV (Lightwave), 25 mW fioletowy diodowy laser YioFlame 405 nm (Coherent) i czerwony laser diodowy 638 nm. Całkowitą nowością techniczną jest wprowadzenie optyki światłowodowej i rozdział sygnałów biegnących do poszczególnych detektorów rozmieszczonych po okręgu za pomocą zwierciadeł o bardzo wysokiej wydajności. Rozwiązanie to sprawia, że straty światła są zminimalizowane ponieważ po odbiciu, każdy sygnał przechodzi tylko przez jeden filtr optyczny umieszczony bezpośrednio przed detektorem.

LSR II wykorzystuje do zbierania danych w pełni cyfrowy system FACSDiVa i nowy oparty o komputery typu IBM program pracujący w środowisku Windows XP. System cyfrowy umożliwia m.in. zastosowanie dowolnego parametru lub logicznej kombinacji (i/lub) dwu i więcej parametrów do rejestracji sygnałów („triggering”). Wszystkie sygnały podlegają cyfrowej obróbce równocześnie z częstotliwością 10 milionów razy na sekundę (10 MHz) wykorzystując 14-bitowe przetworniki sygnałów analogowych na cyfrowe („analog to digital converters”). Elektroniczny „czas martwy” jest wyeliminowany, co pozwala na zwiększenie liczby analizowanych komórek (ponad 20000/s). Dzięki wyeliminowaniu wzmacniaczy logarytmicznych możliwy stał się bardziej dokładny pomiar fluorescencji, poprawiając liniowość, kompensację i ocenę ilościową. Kompensacja może być dokonana dla wszystkich par fluorescencji zarówno przed jak i po zebraniu danych przy użyciu „software’u”. Sygnały liniowe są zamieniane na skalę logarytmiczną (5 dekad) również „software’owo” przy użyciu 18-tobitowej elektroniki. Maksymalnie urządzenie może rejestrować 16, a w analizie można używać 36 parametrów, w tym pole powierzchni („area”) i standardową wysokość piksu („height”) dla wszystkich 16 parametrów, plus dodatkowo dwa „ratio”, szerokość piksu („width”) i czas.

**FACSCanto I** i **FACSCanto II** to najnowsze, w pełni cyfrowe analizatory. Pierwszy z nich, dwulaserowy został wprowadzony na rynek w końcu 2003 r. Wyposażony w 20 mW laser 488 nm typu „solid state” i 17 mW He-Ne laser diodowy 633 nm, jest 6-ciekolorowym (FITC, PE, PerCP lub PerCP-Cy5.5, PE-Cy7 i APC, APC-Cy7) analizatorem. W analizie można używać 27 parametrów, w tym pole powierzchni, wysokość i szerokość piksu dla wszystkich 8 parametrów (fluorescencje + „scatter”), 2 „ratio” i czas. FACSCanto II wprowadzony w 2006 r. jest rozbudowaną o 3 laser (fioletowy diodowy 405 nm) wersją Canto I umożliwiającą w pełnej konfiguracji analizę 8 parametrów fluorescencyjnych (dodatkowo PacificBlue i AmCyan, wzbudzone trzecim laserem). W obu urządzeniach, zbieranie i analiza danych odbywa się podobnie jak w przypadku LSR II w systemie FACSDiVa w programie pracującym w środowisku Windows XP. Wszystkie parametry są rejestrowane w skali liniowej (262 141 kanałów) i cyfrowo zamieniane na 5-ciodekadową skalę logarytmiczną przy użyciu 18-tobitowej elektroniki, co znacznie poprawia liniowość i precyzję pomiarów.

## 2. Beckman Coulter

**EPICS XL** był pierwszym i przez wiele lat jedynym komercyjnym niesortującym cytometrem wykorzystującym cyfrową obróbkę sygnału, co dawało unikalną przewagę nad pozostałymi cytometrami wyposażonymi w elektronikę analogową. W przypadku analizy logarytmicznej eliminuje to konieczność stosowania wzmacniaczy logarytmicznych - wszystkie dane są zbierane w skali linearnej i cyfrowo przekształcane na logarytmiczne. Cyfrowa elektronika umożliwia

również kompensację wszystkich par fluorescencji. Dzięki wprowadzeniu nowych barwników fluorescencyjnych EPICS XL był jedynym analizatorem mogącym analizować 4 fluorescencje wzbudzone światłem lasera argonowego o długości fali 488 nm. Analiza danych odbywa się w programie XL SYSTEM II v.3.0 lub EXPO32 ADC. XL SYSTEM II pracuje w środowisku DOS w systemie Windows 98SE i wykorzystuje do zapisu danych format FCS 2.0. System jest w stanie zbierać 12 parametrów, z czasem, stosunkiem fluorescencji („ratio”) i parametrem PRISM, włącznie - identyfikuje populacje komórkowe w oparciu o „pozytywność” lub „negatywność” dla maximum 6-ciu wybranych markerów. Program EXPO 32 ADC („Advanced Digital Compensation”) dodatkowo umożliwia automatyczną kompensację do 4 fluorescencji i analizę do 16 parametrów. Model EPICS XL-MCL dodatkowo wyposażony jest w automatyczny podajnik próbek („multicarousel loader”).

**Cytomics FC 500** jest cyfrowym analizatorem, mogącym przeprowadzać detekcję 5-ciu fluorescencji (FITC, PE, PE-Texas red, PE-Cy5 lub APC i PE-Cy7) wzbudzanych przez jeden lub dwa lasery (20 mW laser argonowy 488 nm i 20 mW laser He-Ne 633 nm lub 5 mW laser diodowy 635 nm), z cyfrową kompensacją i skalą logarytmiczną po przekształceniu danych zbieranych w 20 bitowej skali linearnej. FC 500 analizuje dane w programie CXP lub MXP (przystosowany do zbierania próbek z płytek titracyjnych) w systemie Windows 2000, używając do zapisu formatu FCS 3.0. Urządzenie zapisuje do 16 parametrów uwzględniając czas, stosunek fluorescencji i PRISM. W analizie możliwe jest użycie 24 parametrów. Możliwa jest również kompensacja „software’owa”, a prezentowane dane w formie wykresów punktowych („dot-plot”) lub histogramów mogą być łatwo przenoszone do innych aplikacji Microsoft lub konwertowane do formatu PDF. Cytomics FC 500 może wchodzić w skład zautomatyzowanej stacji cytometrycznej („Integrated Cytometry Solution”), przygotowującej i podającej próbki do analizy.

**Cell Lab Quanta** jest najnowszym analizatorem firmy Beckman-Coulter wyposażonym w laser 488 nm oraz lampę rtęciową umożliwiającą wzbudzenie barwników światłem o długości 366 nm, 405 nm lub 435 nm. Urządzenie rejestruje 3 kolory fluorescencji oraz objętość komórek („Coulter volume”; rozwiązanie stosowane w licznikach hematologicznych) i ich ziarnistość („side scatter”), co umożliwia dokładniejsze niż w innych systemach zróżnicowanie morfologiczne badanych populacji oraz podanie wielkości komórek (nm) lub ich średniej objętości (femtolitry). Dodatkową zaletą aparatu jest wyposażenie w pompy-strzykawkę, precyzyjnie dozujące objętość badanej zawiesiny komórkowej, umożliwiając podanie wartości bezwzględnych analizowanych populacji komórkowych. Małe rozmiary aparatu oraz możliwość współpracy z uniwersalnym podajnikiem próbek („Mufti-Platform Loader”) są kolejnym atutem tego cytometru.

## 3. DakoCytomation

Cytomation wystartowało w końcu lat 80-tych z systemami CI CERO do ówczesnych cytometrów sortujących, poprawiając ich szybkość sortowania i możliwości analizy danych. Po sukcesie odniesionym z sorterami MoFlo, już jako DakoCytomation, w 2001 r. firma wprowadziła na rynek analizator CyAn. Jest to maksymalnie 11-parametrowy (9 fluorescencji), trójlaserowy instrument, który w optymalnej konfiguracji posiada 150 mW wiązkę 488 nm i 50 mW wiązkę 351 nm (UV), obie z chłodzonego wodą lasera argonowego Enterprise II (Coherent) i 12,5 mW czerwony laser diodowy 635 nm. Alternatywnie, urządzenie można wyposażyć w 20 mW laser Sapphire 488 nm (Coherent) i 25 mW fioletowy laser diodowy VioFlame 405 nm (Coherent). Akwizycja i analiza danych odbywa się w programie Summit pracującym w systemie Windows NT, z możliwością kompensacji wszystkich par fluorescencji w czasie rzeczywistym podczas akwizycji, jak i później podczas analizy. Analiza może się odbywać również „off line” na innych komputerach PC. Maksymalna prędkość akwizycji to 50 000/s. Niewątpliwą zaletą tego urządzenia jest łatwość rozbudowy i

zmiany konfiguracji w zależności od potrzeb (łatwo wymienne filtry).

#### 4. Partec GMBH

Powstała w 1960 r. firma Partec produkuje cytometry najdłużej spośród wszystkich firm cytometrycznych. Obecnie firma oferuje urządzenia wyposażone zarówno w lampy rtęciowe i/lub lasery jako źródła światła, z możliwością sortowania, jak i elektronicznego pomiaru objętości komórek, umożliwiające zróżnicowanie morfologiczne leukocytów. Dodatkowo, dzięki zastosowaniu precyzyjnych strzykawk dozujących określoną objętość próbki do analizy, możliwe jest uzyskanie bezwzględnej liczby badanych populacji komórkowych. Nowa linia cytometrów obejmuje zarówno proste, jednolaserowe, jednoparametrowe urządzenia, które mogą być zasilane z baterii - **CyFlow**, jak i wielolaserowe instrumenty, z cyfrową obróbką danych, zdolne do pomiaru 14 parametrów fluorescencyjnych **CyFlow ML**. Seria CyFlow może być wyposażona w następujące źródła światła: 100 W lampę rtęciową (źródło UV), fioletowy laser diodowy 407 nm, niegazowy laser niebieski 488 nm (20 lub 200 mW), zielony Nd-YAG laser 532 nm (do 100 mW) lub czerwony laser diodowy 635 nm (15 lub 25 mW). Szybkość przepływu próbki jest regulowana „software'owo” w przedziale od 0-3 ml/min z wykorzystaniem precyzyjnych pomp-strzykawk. Model CyFlow ML może być wyposażony w dwa detektory dla parametru FSC („forward scatter”). Pierwszy, rejestruje natężenie światła ugiętego w osi biegu promienia pod kątem 2-6°, drugi, pod kątem 6-14°. Sygnały dla parametru SSC („side scatter”) i fluorescencji są zbierane przez obiektywy mikroskopowe o wysokim współczynniku transmitancji dla światła UV (opracowane przez Partec) i przesyłane do odpowiednich fotopowielaczy. Wysokość pików, szerokość i integral („area”) są zamieniane z analogowych na cyfrowe przy użyciu szybkich 16-bitowych konwerterów, a zmiana skali logarytmicznej na liniową i odwrotnie odbywa się przy użyciu programu FloMax, w środowisku Windows. Dane są zapisywane w formacie FCS 2.0 i możliwy jest zapis danych z >10 000 000 komórek. W sumie możliwa jest akwizycja 16 podstawowych parametrów, w analizie można wykorzystać dalszych 16 pochodnych. Maksymalna prędkość akwizycji wynosi >10 000 komórek/s.

Jak większość cytometrów firmy Partec, seria CyFlow może być wyposażona w zamknięty system sortowania oparty o przełączanie przepływu („fluid switch sorters”). W systemie tym kanał przepływu w punkcie detekcji rozwidła się na kształt litery Y. Jedno ramię jest ramieniem zlewkowym, drugie sortującym. Sterowany piezoelektrycznie tłoczek kieruje wybraną komórkę do ramienia sortującego, a komórki niepożądane do ramienia zlewkowego. Rozwiązanie to umożliwia sortowanie komórek znacznie większych niż przy użyciu standardowych sorterów kropkowych (komórki roślinne, komórki wysp Langerhansa).

Pierwszą linią cytometrów Partec była seria **PAS**, jedyna łącząca w komercyjnych cytometrach jako źródła światła lampę rtęciową i laser. Podobnie jak seria CyFlow, seria PAS obejmuje proste i skomplikowane analizatory mogące mieć opcję sortowania. Generalnie, w porównaniu z serią CyFlow urządzenia tego typu są większe i mogą być wyposażone w większe lasery (np. chłodzony powietrzem laser argonowy 488 nm). Dodatkowo, mogą współdziałać ze stacją przygotowania i podawania próbek - **ROBBY**. Stacja ta jest w stanie dozować przeciwciała i/lub fluorochromy, dodawać odczynniki lizujące erytrocyty i utrwalające próbki, łącznie 16 różnych odczynników z kontrolowanym czasem inkubacji.

#### 5. Guava Technologies, Inc.

**Guava Personal Cell Analysis (PCA) System** jest bardzo małym (niewiele większym od laptopa, z którym współpracuje), przenośnym cytometrem, niewymagającym do analizy próbek buforu! Komora przepływu jest na tyle szeroka, że umożliwia analizę przepływających komórek bez ryzyka częstego zatykania i wymaga zaledwie kilku ul próbek! Urządzenie wyposażone jest w zielony laser YAG 532 nm i rejestruje 3 parametry: FSC i dwie fluorescencje przy długości fali 575 nm i 675 nm. Program CytoSoft umożliwia akwizycję i analizę danych w systemie Windows. Trzy osobne moduły programu: Guava

ViaCount, Guava Express i Guava Nexin umożliwiają odpowiednio podanie bezwzględnej liczby żywych komórek, badanie ekspresji markerów powierzchniowych oraz analizę apoptozy. Ekspresję markerów powierzchniowych ocenia się z użyciem przeciwciał sprzężonych z fykoerytryną (PE) lub barwnikiem cyjaninowym Cy3, żywotność - z użyciem 7-aminoaktynomycyny D, apoptozę - z użyciem aneksyny V sprzężonej z PE. Ze względu na brak płynu okrywowego, gwarantującego przepływ komórek jedna za drugą, a tym samym gwarantującego precyzję pomiaru, urządzenie to nie nadaje się do analizy cyklu komórkowego.

#### Komercyjne kropkowe sortery komórkowe

Sortery kropkowe wykorzystują wysokiej częstotliwości (15-200 kHz) drgania kryształu piezoelektrycznego powodujące rozzerwanie strumienia cieczy wypływającego z komory przepływu na pojedyncze krople. Ze względu na dużą efektywność, tego typu sortery są najpopularniejsze i takie zostaną przedstawione w niniejszym opracowaniu. Zasada działania tych urządzeń została szczegółowo opisana w artykule „Cytometria przepływowa - istota metody i jej wykorzystanie” (1).

Wśród sorterów kropkowych wyróżnia się dwa podtypy: sortery o niskiej szybkości sortowania („Low speed sorters”) - do 10 000-15 000 komórek/s oraz sortery o dużej szybkości („high speed sorters”) powyżej 20 000 komórek/s. W celu osiągnięcia dużych szybkości sortowania konieczne jest wysokie ciśnienie (20-100 psi) płynu w którym płyną komórki (płyn okrywowy), co dla niektórych typów komórek może być szkodliwe.

#### 1. BD Biosciences

Pierwsze komercyjne sortery komórkowe firmy B-D nie bardzo odbiegały od prototypu zbudowanego przez zespół Leonarda Herzenberga na uniwersytecie Stanforda (6). Obecne sortery kropkowe firmy B-D obejmują zarówno linię urządzeń wyposażonych w elektronikę analogowo-cyfrową, jak i w pełni cyfrową. **FACSVantage SE** jest następcą urządzeń z lat 90-tych typu FACStar, FACStar Plus i FACSVantage. Ten analogowo-cyfrowy instrument typu „stream in air” (analiza odbywa się w powietrzu w strumieniu cieczy wypływającym z dyszy o określonej średnicy), może współdziałać z trzema laserami i rejestrować do 12 fluorescencji. Ciśnienie płynu może być regulowane w zakresie od 2.0 psi (przy dyszy o średnicy 400 μm) do 60 psi z użyciem dyszy 70 μm i opcji TurboSort umożliwiającej sortowanie z prędkością do 25 000 komórek/s. Użycie opcji MacroSort pozwala na sortowanie komórek o wielkości ok. 100 μm, z prędkością do 500 komórek/s. Do zbierania i obróbki danych urządzenie może być wyposażone w dwa zasadniczo różniące się systemy: analogowy lub cyfrowy -**FACSDiVa**. W wersji analogowej każdy z parametrów wzbudzonych światłem lasera 488 nm może być użyty jako „trigger”, a maksymalnie 8 parametrów może być analizowanych. Sygnały ze skali liniowej są zamieniane na skalę logarytmiczną przy użyciu analogowych wzmacniaczy o zakresie 4 dekad. Kompensacja fluorescencji odbywa się tylko „hardware'owo”. Parametry wysokości, integralu i szerokości pików są zamieniane z analogowych na cyfrowe przy użyciu 10-ciobitowych konwerterów. W wersji analogowej, analiza danych (maksimum 16 parametrów) odbywa się z użyciem programu CellQuest Pro na bazie komputerów Apple Macintosh wyposażonych w procesor G4 Power PC. Opcja cyfrowa obróbki sygnału (FACSDiVa) pozwala na użycie dowolnego parametru lub logicznej kombinacji dowolnych parametrów jako „trigger”. Wszystkie parametry (maksimum 16) są rejestrowane w skali liniowej (262 141 kanałów) i cyfrowo zamieniane na 5-cio dekadową skalę logarytmiczną przy użyciu 18-tobitowej elektroniki. Kompensacja może być dokonywana zarówno „hardware'owo”, jak i „software'owo” po zebraniu danych. Analiza 36 parametrów odbywa się w programie FACSDiVa na komputerach Hewlett-Packard X4000 w systemie Windows. Dzięki wyeliminowaniu „czasu martwego” szybkość analizy zwiększyła się do 100 000 komórek/s. Zarówno w wersji analogowej jak i cyfrowej możliwe jest sortowanie 4 wybranych populacji komórkowych, a ustawianie punktu tworzenia kropli („drop delay”) odbywa się bardzo szybko i precyzyjnie dzięki opcji AccuDrop. W opcji tej, w trakcie bezpośredniej obserwacji sortowania mikrokuleczek, „drop delay”

dostosowuje się tak aby wszystkie mikrokuleczki fluoryzujące w świetle dodatkowej diody laserowej (umieszczonej powyżej probówek zbierających sortowane populacje) kierowane były do probówki. W przypadku, gdy część mikrokuleczek jest kierowana do probówki a część do zlewki, „drop delay” należy skorygować, tak aby wszystkie mikrokuleczki były kierowane do probówki. Dodatkowo, system usuwania aerozolu (Aerosol Menagement Option) zabezpiecza operatora przed ewentualną kontaminacją materiałem zakaźnym.

**FACSria**, najnowszy cyfrowy cytometr sortujący firmy BD wprowadzony na rynek w grudniu 2002 r., jest dwu- lub trójlaserowym sorterem o dużej szybkości sortowania, posiadającym unikalne rozwiązania techniczne eliminujące m.in. konieczność adjustacji optyki przez operatora (jak to ma miejsce w innych sorterach kropłowych). Jest to pierwszy i jak na razie jedyny sorter w którym analiza komórek odbywa się w kiuwecie (a nie w powietrzu!), co zwiększa czułość pomiaru. 20 mW laser Sapphire 488 nm („solid state”) i 17 mW laser He-Ne 633 nm są na wyposażeniu w wersji podstawowej, a 20 mW diodowy laser fioletowy 407 nm jest opcjonalny. Może on być wykorzystany do wzbudzenia m.in. barwnika Hoechst. Podobnie jak w LSRii, FACSria wyposażona jest w optykę światłowodową, a sygnały biegną do poszczególnych detektorów rozmieszczonych po okręgu w układzie nanogonálním, co umożliwia rejestrację 8-iu parametrów (7 fluorescencji i „side scatter”) z lasera 488 nm, i po 3 parametry z pozostałych dwóch laserów. FACSria wykorzystuje zmodyfikowany program FACSDiYa współpracujący z komputerami PC w systemie WindowsXP. Wszystkie dane są zbierane w skali linearnej (262 141 kanałów) i cyfrowo zamieniane na 5-ciodekadową skalę logarytmiczną (analogicznie jak w FACSDiYa). Komórki do analizy można podawać w kilku rodzajach probówek, a igła transportująca komórki jest omywana przez płyn zarówno wewnątrz jak i na zewnątrz, ograniczając ryzyko przeniesienia komórek z poprzedniej próbki. W trakcie zbierania komórki są ciągle mieszane zapobiegając ich sedimentacji. Całkowitą nowością techniczną jest proces sortowania, który zachodzi po wypłynięciu komórek z kiuwety analizującej. Jest to jakby połączenie typowego analizatora o nieadjustowalnej optyce z sorterem kropłowym. Również wymiarami FACSria przypomina bardziej analizatory, niż duże urządzenia sortujące. W porównaniu z typowymi sorterami tego typu całkowicie zmieniono ideę tworzenia kropli. W zastosowanym w FACSrii rozwiązaniu krople nie są tworzone przez drgającą z wysoką częstotliwością głowicę ale przez drgający strumień cieczy. Rzeczywisty punkt tworzenia kropli jest ustawiany przy użyciu systemu AccuDrop (analogicznie jak w FACSDiYa). Proces sortowania (na dwie lub cztery populacje) odbywa się pod ujemnym ciśnieniem, zabezpieczając operatora przed aerozolem i jest nadzorowany (opcja SortWatch), tak aby w przypadku np. zatkania dyszy zabezpieczyć probówki z sortowanymi komórkami przez odcięcie płynu i zasłonięcia probówek. Maksymalna szybkość sortowania to 60 000 komórek/s przy ciśnieniu płynu 75 psi. Ze względu na brak konieczności adjustacji optyki, FACSria może być obsługiwana przez mało doświadczonych adeptów cytometrii.

## 2. Beckman Coulter

**EPICS ALTRA** to dwulaserowy instrument analogowy umożliwiający detekcję do 8-miu parametrów: FSC, SSC i 6-ciu. fluorescencji dla wybranych barwników: FITC, PE, ECD (PE-Texas Red), PC5 (PE-Cy5), PC7 (PE-Cy7), APC i APC-Cy7. Detektor każdej fluorescencji może być użyty do rejestracji sygnałów pochodzących z 2 różnych laserów. Oznacza to, że pojedynczy fotopowielacz może „zbierać” fluorescencje wzbudzone przez różne lasery a pochodzące z barwników mających bardzo podobne spektra emisyjne (np. PE-Cy5 i APC). Wszystkie filtry są łatwo wymienne, bez konieczności ponownej adjustacji optyki. Dodatkowymi parametrami może być czas, stosunek dwóch fluorescencji („ratio”) oraz pomiar czasu przepływu („time of flight”) umożliwiający rozróżnienie pojedynczych komórek od ich agregatów. Do inicjacji zbierania danych („triggering”) możliwe jest zastosowanie dowolnego parametru lub dwu i więcej parametrów. Ciśnienie płynu okrywowego może być regulowane w zakresie od 0-15 psi w standardowym trybie pracy lub do 100 psi w opcji sortowania o dużej szybkości („high speed sorting”). Częstość generowania kropli w opcji „high speed” wynosi 90-100 kHz.

W opcji tej wysoka czystość i duży odzysk sortowanych komórek uzyskuje się przy prędkości sortowania nie przekraczającej 20 000 komórek/s. Opcja SortLOCK monitoruje i utrzymuje „drop delay” na stałym poziomie. Do zbierania i analizy danych zapisanych w formacie FCS 2.0 Altra wykorzystuje oparty o system Windows program EXPO32 (szczegółowiej opisany przy analizatorze EPICS). Kompensacja fluorescencji w układzie „każda z każdą” odbywa się „software’owo”. Dane liniowe z max 1024 kanałów są konwertowane do logarytmicznych przy użyciu analogowych wzmacniaczy. Do pomiarów bezwzględnej liczby receptorów wyrażonych jako „wiązanie przeciwciał przez komórkę” (Antibody Bound per Cell - ABC) lub „cząstek ekwiwalentów rozpuszczonego fluorochromu” (Molecules of Equivalent Soluble Fluorophore -MESF) istnieje możliwość przekonwertowania skali po analizie mikrokuleczek standaryzujących.

## 3. DakoCytomation

**MoFlo (Modular Flow Cytometer)** był pierwszym komercyjnie dostępnym sorterem typu "high speed" wyposażonym w cyfrowo-analogową elektronikę. Pierwotnie, jeszcze w wersji prototypowej zbudowany w Lawrence Livermore National Laboratory przeznaczony do szybkiej izolacji chromosomów, po modernizacji stał się urządzeniem o wszechstronnym zastosowaniu. MoFlo to otwarty, maksymalnie trójlaserowy systemem rozbudowywany w zależności od potrzeb operatora do 14 parametrów. Do wzbudzenia rejestracji sygnałów („trigger”) możliwe jest użycie logicznej kombinacji (i/lub) do 4 parametrów. Parametry wysokości piku są zamieniane z analogowych na cyfrowe przy użyciu 16-tobitowych konwerterów obejmujących 4096 kanałów fluorescencji (typowo w urządzeniach analogowych 1024). Cyfrowe przetworniki sygnału (DSP) pozwalają na „software’ową” kompensację każdej pary z 8 fluorescencji korygując błąd konwersji sygnału przez analogowe wzmacniacze logarytmiczne o zakresie 4 dekad. Częstość generowania kropli może dochodzić do 200 kHz, co daje możliwość sortowania z maksymalną prędkością 70 000 komórek/s. Proces sortowania na 2 lub 4 populacje jest nadzorowany przez system SortMaster, który dodatkowo automatycznie dostosowuje „drop delay” do optymalnej wartości w trakcie sortowania. W sytuacji kiedy system nie jest w stanie skorygować zmian, ładowanie kropli zostaje wyłączone a sygnał dźwiękowy informuje operatora o konieczności interwencji. Podobnie jak w analizatorach CyAn akwizycja i analiza danych odbywa się w programie Summit pracującym w systemie Windows NT, z możliwością kompensacji wszystkich par fluorescencji w czasie rzeczywistym podczas akwizycji, jak i później podczas analizy. Analiza może się odbywać również „off-line” na innych komputerach PC.

## 4. Cytopenia

Założona na początku nowego stulecia nowa kompania oferuje modułowe sortery InFlux z możliwością rozbudowy do 28 fluorescencji i szybkością sortowania do 100.000 komórek/s na 6 różnych populacji. Oparty o system Windows NT program przeznaczony jest do kontroli sortowania i ma raczej ograniczone możliwości analizy. Logiczna kombinacja bramek dopuszcza użycie 32 parametrów. Dobór źródeł światła oraz fotopowielaczy odbywa się na życzenie.

## Wykorzystanie cytometrii przepływowej

Komercyjne analizatory służą głównie do celów diagnostyki klinicznej, ze szczególnym uwzględnieniem diagnostyki onkohematologicznej (fenotypowanie komórek białaczkowych i chłoniakowych, analiza profilu DNA komórek nowotworowych, wykrywanie choroby resztkowej), oceny subpopulacji limfocytów w różnego typu niedoborach immunologicznych (wrodzonych i nabytych - w tym monitorowania poziomu limfocytów CD4 u pacjentów zakażonych wirusem HIV). Oprócz badań fenotypowych cytometria przepływowa jest wykorzystywana w diagnostyce immunologicznej do oceny funkcji komórek żernych umożliwiając diagnostykę zaburzeń chemotaksji, fagocytozy czy produkcji rodników tlenowych (deficyt mieloperoksydazy, przewlekła choroba ziarniniakowa). Dzięki cytometrii przepływowej możliwa jest również diagnostyka niektórych schorzeń autoimmunizacyjnych, np. badanie obecności autoprzeciwciał

przeciwpyłtkowych w małopłytkowościach, badanie ekspresji antygenu CD95 i apoptozy komórek w diagnostyce autoimmunologicznego zespołu proliferacji limfocytów (ALPS) (7), a badanie obecności antygenu HLA B27 może ujawnić predyspozycje do określonych schorzeń autoimmunizacyjnych. W transplantologii cytometria przepływowa znalazła zastosowanie do oznaczania antygenów HLA na powierzchni komórek dawcy i biorecy, do oceny obecności w surowicy biorecy przeciwciał cytotoksycznych dla komórek dawcy („crossmatch”). Kontrolne badania subpopulacji limfocytów u pacjentów po przeszczepie dają informację o stanie układu immunologicznego i skuteczności terapii immunosupresyjnej. W alergologii cytofluorymetryczna ocena stopnia degranulacji bazofilów czy analiza poziomów limfocytów pomocniczych o fenotypie Th1 i Th2 pozwala ocenić skuteczność terapii przeciwalergiczej. Również w cytogenetyce dzięki wykorzystaniu cytometrii przepływowej i techniki hybrydizacji in situ (FISH) możliwe stało się identyfikowanie mutacji chromosomalnych, jak np. mikrodelekcji 22q11 w zespole DiGeorge'a (8) czy chromosomu Filadelfia, występującego u ok. 95% chorych na przewlekłą białaczkę szpikową (9).

Coraz większego znaczenia diagnostycznego nabiera informacja nie tylko o obecności lub braku określonego markera komórkowego, ale o jego gęstości na powierzchni komórek. Analiza taka jest możliwa po porównaniu intensywności fluorescencji badanych komórek z intensywnością świecenia mikrokuleczek („beads”) sprzężonych ze znaną ale różną ilością fluorochromu. Dzięki wprowadzeniu technologii cyfrowej pomiar gęstości markerów komórkowych stał się o wiele dokładniejszy. Postęp ten bez wątpienia przyczyni się do upowszechnienia badania gęstości antygenów powierzchniowych w diagnostyce klinicznej.

Analiza cytofluorymetryczna wykorzystująca fluorescencję mikrokuleczek opłaszczonych przeciwciałami monoklonalnymi dla określonych cytokin lub chemokin, umożliwiając pomiar stężenia od kilku do kilkunastu rozpuszczalnych produktów komórkowych w pojedynczej próbce materiału (50 ul) sprawia, iż w tego typu badaniach cytometria wypiera testy immunoenzymatyczne (ELISA).

Niektóre z komercyjnych cytometrów zostały zaprojektowane do ściśle określonych zastosowań, jak np. cytometry firm: Optoflow (MICROCYTE) i Fluid Imaging Technologies, Inc. (FlowCAM) służące do detekcji, charakterystyki i zliczania mikroorganizmów w wodzie; cytometry firm: Bentley Instruments (Somacount i Bactocount), Delta Instruments b. v. (SomaScope i BactoScope) i FOSS Electric A/S (Fossomatic i BactoScan) służące do detekcji komórek somatycznych lub bakterii w mleku; czy cytometr firmy Luminex pozwalający na ilościową ocenę do 100 różnych antygenów, przeciwciał lub oligonukleotydów w pojedynczej próbce w oparciu o różnice w intensywności fluorescencji polistyrenowych mikrokuleczek. Również szeroko cytometry analizujące są wykorzystywane w laboratoriach badawczych, gdzie służą głównie do oceny ekspresji antygenów powierzchniowych i wewnątrzkomórkowych (cytokiny, hormony), oceny aktywności wielu enzymów (kinazy, kaspazy), oceny ekspresji genów lub mRNA dla różnych produktów komórkowych (technika FISH).

Sortery, dzięki dużej wydajności są wykorzystywane do izolacji bardzo rzadkich komórek, występujących z częstością  $10^{-6}$ - $10^{-7}$ , np. erytrocytów płodowych w krążeniu matki, komórek nowotworowych krążących w krwi czy komórek modyfikowanych genetycznie. Cytofluorymetryczna separację gamet męskich z chromosomem X od gamet z chromosomem Y wykorzystuje się do zapłodnień pozaustrojowych, a sortowane komórki wysp Langerhansa i komórki macierzyste są wykorzystywane do przeszczepów.

#### Podsumowanie

Współczesna cytometria przepływowa dzięki możliwościom wieloparametrowej analizy i cyfrowej obróbki sygnałów jest w stanie dostarczyć pełniejszą charakterystykę badanych populacji komórkowych. Dzięki wykorzystaniu zjawiska przeniesienia energii rezonansu (FRET - Fluorescence Resonance Energy Transfer) i stworzeniu całej gamy tandemów barwników (głównie koniugatów barwników cyjaninowych (Cy) z fikoerytryną (PE) lub allofokocyjaniną (APC) np. PE-Cy5, APC-Cy7), znacznie poszerzyła się lista

fluorochromów wzbudzanych światłem lasera niebieskiego (488 nm). Ten ogromny postęp na pewno przyczyni się do jeszcze szerszego wykorzystania cytometrii przepływowej zarówno w badaniach diagnostycznych jak i naukowych.

#### Podziękowanie

Powstanie tego opracowania nie byłoby możliwe bez monumentalnej monografii autorstwa dr Howarda Shapiro „Practical Flow Cytometry” wyd.4. Wiley-Liss, 2003.

#### Piśmiennictwo

1. J.Baran: "Cytometria przepływowa - istota metody i jej wykorzystanie". Mikrobiologia Medycyna, 1996, 3:33.
2. A.Moldavan: „Photo-electric technique for the counting of microscopical cells". Science, 1934, 88:188.
3. F.T.Gucker Jr., C.T. O'Konski, H.B. Pickard, J.N.Pitts Jr.: "A photoelectronic counter for colloidal particles". J.Am.Chem.Soc. 1947, 69:2422.
4. P.J.Stopa: "The flow cytometry of Bacillus anthracis spores revisited". Cytometry, 2000, 41:237.
5. G. van den Engh, W.Stokdijk: "Parallel processing data acquisition system for multilaser flow cytometry and cell sorting". Cytometry, 1989, 10:282.
6. L.A.Herzenberg, R.G.Sweet, L.A.Herzenberg: "Fluorescence activated cell sorting". Sci. Amer. 1976, 234:108.
7. J.J.H.Bleesing, T.A.Fleisher, J.M.Puck: "Autoimmune lymphoproliferative syndrome" w "Immunologic disorders in infants & children" red. E.R.Stiehm, H.D.Ochs, J.A.Winkelstein, Elsevier Saunders, 2004.
8. D.Kowalczyk, M.Zembala: "Niedobory odporności" w "Zarys immunologii klinicznej" red. M.Zembala i A.Górski, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2001.
9. J.Hansz: "Współczesna terapia przewlekłej białaczki szpikowej". Postępy Nauk Medycznych, 2000, 4.

### Zarządzanie jakością w Medycznych Laboratoriach Diagnostycznych Iwona Szkop

Zmiany, jakie zachodzą w sektorze ochrony zdrowia powoli uświadamiają nam fakt, że usługi medyczne, w tym usługi laboratoryjne, stają się produktami „na sprzedaż”, które z jednej strony powinny spełniać oczekiwania świadczeniobiorców, a z drugiej przyczyniać się do osiągnięcia zamierzonego w organizacji efektu ekonomicznego (1). Przekładając tę opinię na język medycznego laboratorium diagnostycznego możemy stwierdzić, że system pracy w dobrze zarządzanym laboratorium powinien być tak zorganizowany, aby zapewniał jak najszybsze wydanie zleceniodawcy wiarygodnego i odtwarzalnego wyniku badania, przy relatywnie zminimalizowanych kosztach jego wykonania. Stąd też coraz istotniejsze znaczenie mają działania podejmowane przez pracującą w nowoczesnym, menedżerskim stylu kadrę kierowniczą wielu laboratoriów medycznych, zmierzające do podniesienia jakości organizacji pracy, lepszego wykorzystania posiadanych zasobów materialnych, a w perspektywie zwiększenia udziału laboratorium w rynku usług medycznych. Niemniej wszelkie mechanizmy poprawy jakości powinny być wprowadzane stopniowo tak, aby dać szansę i czas na przygotowanie się personelu do stawianych wymagań.

#### EWOLUCJA ZARZĄDZANIA JAKOŚCIĄ W PRAKTYCE DZIAŁANIA MEDYCZNYCH LABORATORIÓW DIAGNOSTYCZNYCH

Od lat 50 tych ubiegłego wieku podstawowym standardem pracy w każdym liczącym się laboratorium jest spójny system kontroli jakości (QC - Quality Control). Należy przyjąć, że w odniesieniu do medycznego laboratorium diagnostycznego wdrożenie systemu kontroli jakości badań powinno oznaczać co najmniej:

- prowadzenie systematycznej wewnątrzlaboratoryjnej kontroli jakości (IQC - Internal Quality Control) poprzez codzienne oznaczanie próbek kontrolnych o znanych wartościach równoległe do próbek pacjenta oraz statystycznej ocenie uzyskanych wyników,
- udział w międzylaboratoryjnych badaniach porównawczych (EQC - External Quality Assessment) polegający na oznaczaniu nadesłanych przez wybrane „laboratorium centralne” materiałów kontrolnych i statystycznej analizie porównawczej wyników uzyskanych

w określonej grupie laboratoriów medycznych.

### Stosowane systemy jakości

Od lat 50-tych ubiegłego wieku podstawowym standardem pracy w każdym liczącym się laboratorium jest spójny **system kontroli jakości** (ang. *Quality Control*). Należy przyjąć, że w odniesieniu do medycznego laboratorium diagnostycznego wdrożenie systemu kontroli jakości badań powinno oznaczać co najmniej:

1. *prowadzenie systematycznej wewnątrzlaboratoryjnej kontroli jakości dla wszystkich metod ilościowych* - poprzez codzienne oznaczanie próbek kontrolnych o znanych wartościach równoległe do próbek pacjenta oraz statystyczną analizę uzyskanych wyników,
2. *udział w międzylaboratoryjnych badaniach porównawczych prowadzonych dla metod stosowanych w laboratorium* - polegający na oznaczaniu nadesłanych przez wybrane „laboratorium centralne” materiałów kontrolnych oraz analizie porównawczej wyników uzyskanych w określonej grupie laboratoriów medycznych.

W połowie lat 80-tych w wielu placówkach medycznych świata zaczęto wdrażać **system zapewnienia jakości** (ang. *Quality Assurance*), który zakłada, że wszystkie wykonywane w organizacji działania muszą być ustalone określonymi procedurami i instrukcjami, a następnie udokumentowane zapisami, tak aby realizowany produkt/usługa spełniał określone/przyjęte wymagania. W medycznych laboratoriach diagnostycznych system zapewnienia jakości może być budowany m.in. w oparciu o normy ISO (gł. Europa), rekomendacje NCCLS (USA) lub zasady GLP (Good Laboratory Practice). Budowanie sprawnego systemu zapewnienia jakości oznacza przede wszystkim niwelowanie różnic pomiędzy jakością pożądaną przez zleceniodawcę, możliwą do realizacji a stanem faktycznym. W odniesieniu do laboratorium medycznego wdrożenie systemu zapewnienia jakości powinno oznaczać:

- dążenie do poprawy jakości wyników kontroli wewnątrz- i zewnątrzlaboratoryjnej,
- zrozumienie, że działania własne oraz współpracowników mogą być niedoskonałe,
- rosnące uwrażliwienie na potrzeby klientów /zleceniodawców,
- dążenie do lepszego wykorzystania istniejących zasobów, czyli obniżania kosztów,
- stałą kontrolę, czy obniżanie kosztów nie wpłynęło negatywnie na jakość.

Od połowy lat 90-tych w placówkach medycznych, głównie Europy Zachodniej, wprowadzany jest **system zarządzania jakością** (*QMS - Quality Management System*), oparty o wymagania norm ISO oraz techniki statystycznego sterowania jakością (2). Termin zarządzanie jakością oznacza taki sposób zarządzania organizacją, który w efekcie końcowym przynosi korzystne wyniki ekonomiczne, połączone z mierzalną satysfakcją klientów. W odniesieniu do laboratorium medycznego wdrożenie systemu zarządzania jakością powinno oznaczać m.in.:

- możliwie wszechstronną i dogłębną analizę obszaru działania laboratorium, uwzględniającą stosowane i planowane metody badawcze, możliwości techniczne i lokalowe, zasoby ludzkie i finansowe, wymagania i potrzeby rzeczywistych oraz potencjalnych zleceniodawców,
- umieszczenie w centrum uwagi potrzeb klienta /zleceniodawcy,
- wprowadzenie wyrazistego przywództwa, usprawnienie obiegu informacji,
- obciążenie kierownictwa odpowiedzialnością za stałe doskonalenie systemu skalkulowane z rachunkiem kosztów,
- pełne zaangażowanie pracowników, przełamywanie barier i konfliktów interpersonalnych oraz efektywne ich motywowanie i szkolenie,
- ułożenie korzystnej współpracy z podmiotami zewnętrznymi (głównie dostawcami).

zastosowanie w laboratoriach medycznych była norma EN ISO/IEC 17025:1999 dotycząca kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących, która została zatwierdzona jako norma polska w 2001 roku (obecnie obowiązuje jej drugie, znowelizowane wydanie z roku 2005). W roku 2003 w krajach Unii opracowano i przyjęto do stosowania normę EN ISO/IEC 15189 określającą szczególne wymagania dla laboratoriów medycznych, która została wydana przez PKN w 2006 r. Zgodnie z zasadami przyjętego w Polsce systemu oceny zgodności, proces akredytacji laboratorium medycznego polega na formalnym uznaniu przez uprawnioną, **niezależną** organizację zewnętrzną (w Polsce wymogi te spełnia Polskie Centrum Akredytacji), że laboratorium posiada kompetencje do wykonywania określonych badań i jest w stanie zapewnić im należyta jakość. Warto podkreślić, że droga wiodąca do **akredytacji wykonywanych w laboratorium procedur badawczych nie jest łatwa, ale** dając gwarancje wysokiej jakości pracy zdobywa w naszym kraju coraz większą popularność.

Najnowszą koncepcją zarządzania organizacją, opisaną szczegółowo w normie ISO 9004, jest kompleksowy **system zarządzania przez jakość** (ang. *Total Quality Management*). Filozofia TQM, polegająca na ciągłym doskonaleniu i optymalizacji poszczególnych zadań organizacji, opiera się przede wszystkim na świadomości i zaangażowaniu całego personelu w osiąganiu zaplanowanego przez kierownictwo, często długofalowego celu. Idea TQM dotyczy pewnej kultury przedsiębiorstwa, a nie konkretnych rozwiązań technicznych. Część autorów dostrzega możliwość skutecznego wdrażania tej koncepcji w placówkach ochrony zdrowia, również w naszym kraju (3).

### NOWE TRENDY W ORGANIZACJI SYSTEMÓW PRACY MEDYCZNYCH LABORATORIÓW DIAGNOSTYCZNYCH

#### Harmonizacja wyników badań

Koncepcja harmonizacji wyników badań laboratoryjnych, która pojawiła się pod koniec ubiegłego wieku, miała na celu m.in. zredukowanie wielkości błędów systematycznych i ujednolicenie wyników badań w określonej grupie laboratoriów, głównie w odniesieniu do problemu różnic w wynikach międzylaboratoryjnych badań porównawczych. Autorzy wyróżniają **trzy podstawowe etapy procesu harmonizacji wyników badań (4)**:

- tworzenie w wybranej grupie laboratoriów stabilnych systemów analitycznych spełniających określone kryteria jakościowe,
- wykonanie serii badań porównawczych w oparciu o wspólne kalibratory i materiały kontrolne, prowadzące do wyliczenia współczynników korelacji wyrównujących różnice systematyczne,
- uzgodnienie na próbkach rzeczywistych zakresu wartości referencyjnych, krytycznych i ostrzegawczych (zwykle w tzw. laboratorium centralnym).

Dotychczasowe próby harmonizacji na skalę międzynarodową, podjęte m.in. przez IFCC, spotkały się z wieloma trudnościami, przede wszystkim ze względu na brak komutabilności materiałów kontrolnych i kalibracyjnych z rzeczywistymi próbkami pacjentów (4). W ostatnich latach ciekawy i stosunkowo prosty projekt **harmonizacji wyników badań zrealizowano** w 11 laboratoriach medycznych północno-wschodniej Rosji (5). Projekt polegał na synchronizacji rekalkibracji stosowanych w laboratoriach aparatów, bazującej na materiale pochodzącym od pacjentów (jako punkt odniesienia stosowano uśredniony wynik uzyskiwany w kilku oznaczanych próbkach). Według autorów **przed** harmonizacją rozbieżności wyników pomiędzy laboratoriami wynosiły 8-13%, natomiast wprowadzenie harmonizacji w całym regionie pozwoliło na zmniejszenie zmienności wyników średnio do 4%.

#### Konsolidacja badań i integracja laboratorium

**Konsolidacja badań** to skupienie maksymalnej ilości oznaczeń na 1 jednostce analitycznej pracującej przy użyciu różnych technik badawczych. **Integracja laboratorium** oznacza kompleksowe połączenie wszystkich działań prowadzonych w laboratorium w jeden ciągły proces, rozpoczynający się najczęściej przyjęciem materiału, a kończący wydaniem wyniku. Tak rozumiana konsolidacja i integracja

pracy laboratorium ma na celu:

- zmniejszenie ryzyka kontaktu personelu laboratorium z materiałem potencjalnie zakaźnym,
- zminimalizowanie ilości błędów popełnianych w fazie przedanalizacyjnej,
- ograniczenie do minimum czynności wykonywanych manualnie,
- znaczne skrócenie TAT,
- obniżenie kosztów obsługi laboratorium.

Jednym ze sposobów na konsolidację i integrację pracy w laboratorium medycznym stały się w ostatnich latach **platformy/moduły analityczne**, które umożliwiają pełną automatyzację etapu przedanalizacyjnego. Udowodniono, że konsolidując i integrując pracę w jedno skomputeryzowane i wysoce zautomatyzowane laboratorium (w tym wykonywanie wszystkich zleceń z 1 próbki), można istotnie skrócić czas potrzebny do wykonywania czynności manualnych przez pracowników fachowych, znacznie zwiększyć wydajność pracy bez zwiększenia zatrudnienia, a ponadto skrócić TAT dla niektórych parametrów o blisko 50% oraz znacznie obniżyć koszty badań (6, 7).

### Centralizacja i outsourcing

Wykonywanie dużych ilości badań w jednym laboratorium centralnym (*ang. core laboratories*) jest jednym z kierunków rozwoju nowoczesnej diagnostyki laboratoryjnej, niemniej występują tu pewne zagrożenia dla jakości badań, z których najważniejsze dotyczą problemów etapu przedanalizacyjnego, związanych głównie z wydłużonym transportem próbki z miejsca pobrania do miejsc wykonania.

Centralizacja badań ma jednak niewątpliwe zalety w postaci znacznej redukcji kosztów jednostkowych (tj. kosztów jednego oznaczenia), poziomu których nie mogą „wypracować” laboratoria obsługujące znacznie mniejszą ilość zleceńodawców. Z tendencją do centralizacji usług laboratoryjnych wiąże się pojęcie **outsourcingu zewnętrznego**, które oznacza przekazywanie wszystkich lub wybranych procesów pomocniczych przebiegających w szpitalu w ręce wyspecjalizowanych zewnętrznych podmiotów (8). W Polsce głównym powodem wyboru takiej formy korzystania z usług diagnostyki laboratoryjnej jest dążenie dyrektorów szpitali do zmniejszania nakładów kapitałowych na badania laboratoryjne oraz chęć uwolnienia się od części obowiązków związanych z reorganizacją i zarządzaniem laboratorium medycznym (9).

### Wykonywanie badań laboratoryjnych w systemie rozproszonym

W obszarze działania laboratoriów diagnostyki medycznej **możliwe są dwa systemy badań rozproszonych**.

1. *System laboratoriów satelitarnych*, który może obejmować kilka małych laboratoriów wykonujących badania z zakresu odpowiedniego do miejsca ich działania oraz potrzeb zleceńodawców, np. laboratorium na zapleczu sali operacyjnej lub OIOM-u, w oddziale kardiologii, w izbie przyjęć.

2. *System POCT (ang. Point of Care Testing)*, który obejmuje badania wykonywane poza laboratorium, w czasie i miejscu dogodnym dla pacjenta (*ang. bed-side testing*). Badania wykonuje lekarz lub sam pacjent tylko do własnego użytku. Pierwsze badania typu POCT, jako tzw. testy paskowe, wprowadzono do powszechnego stosowania w latach 70-tych ubiegłego wieku. Obecnie często stosowane są specjalne, proste w obsłudze analizatory typu POCT, działające głównie w oddziałach OIOM-u, które pozwalają na podejmowanie szybkich decyzji w stanach nagłych, np.: glukometry, gazometry, aparaty do oznaczania markerów sercowych. Z punktu widzenia jakości wyników badań laboratoryjnych **system POCT ma pewne wady, z których najważniejsze to:**

- brak udokumentowanej wiarygodności wyniku badania,
- brak ujednoliconego sposobu interpretacji wyniku,
- brak formalnej odpowiedzialności za wynik badania.

### Standaryzacja systemów zarządzania w medycznych laboratoriach diagnostycznych

W wielu laboratoriach medycznych, głównie USA, Australii i

Nowej Zelandii, standaryzacja metod pracy oparta jest o rodzime systemy zarządzania, które formułują ściśle określone wymagania dla laboratoriów działających na danym terenie, obejmujące m.in. metody i procedury dokumentacji badań, nadzorowania urządzeń oraz ujednolicone zasady komunikacji, przepływu informacji i wymiany danych. Przykładem tak rozumianej standaryzacji jest doniesienie dotyczące wyników współpracy 60 laboratoriów z USA (10), z których 70% ma te same, wystandaryzowane metody badań. Według autorów doniesienia **standaryzacja systemów zarządzania spowodowała istotne oszczędności** w laboratoriach działających w systemie, sięgające ok. 2,5 mln. USD na przestrzeni 4 lat.

### Doskonalenie jakości według zasad TQM

Koncepcja zarządzania organizacją realizowana poprzez wdrażanie zasad ciągłego doskonalenia, przedstawiona w pierwszej części pracy, została w ostatnich latach skutecznie urzeczywistniona w kilku laboratoriach medycznych na świecie, m.in. Hiszpanii i Brazylii (11, 12). Relacje autorów doniesień wskazują wyraźnie, że wprowadzanie zasad TQM ma sens tylko w przypadku dobrze działającego systemu zarządzania jakością według ISO 9001 w całej placówce medycznej, w skład której wchodzi laboratorium. Podkreśla się również fakt, że doskonalenie SZJ jest ważnym i przydatnym narzędziem do odnajdywania słabych punktów pracy laboratorium medycznego, co w efekcie zwiększa bezpieczeństwo pacjenta. Natomiast wprowadzenie zasad TQM nie zwiększyło stopnia zadowolenia klientów/zleceńodawców, ani nie poprawiło istotnych wskaźników ekonomicznych w omawianych laboratoriach.

### Piśmiennictwo:

- (1) Niżankowski R.: Jakość świadczeń zdrowotnych i jej ocena. *Zdrowie i Zarządzanie* 2003, nr 6, str. 7-17;
- (2) Broniewska G.: Systemy zarządzania jakością w opiece zdrowotnej. *Zdrowie i Zarządzanie* 2003, nr 6, str. 39-47
- (3) Golec M.K., Soluch S., Augustyniak G.: Kompleksowe zarządzanie jakością w służbie zdrowia. *Zdrowie Publiczne* 2001, nr 111, str. 32-40;
- (4) Naskalski Jerzy W.: Międzylaboratoryjna harmonizacja wyników badań. *Badanie i Diagnostyka* 2003, nr 9 (11), str. 73-76;
- (5) Ivanova L. I. i wsp.: Split sample approach in harmonization of laboratory investigation in North West Region of Russia. *AACC Annual Meeting 2006*, presentation number: D-90
- (6) Berlitz F.A. i wsp.: Successful Lean Thinking implementation in Clinical Laboratory. *AACC Annual Meeting 2006*, presentation number: D-86
- (7) Barberis M.C. i wsp.: Changing from three hospital laboratories to an outsourced core-lab improves quality and efficiency. *AACC Annual Meeting 2006*, presentation number: D-85
- (8) Swadźba J.: Outsourcing usług laboratoryjnych dla szpitali. *Zdrowie i Zarządzanie* 2002, nr 1, str. 13-16
- (9) Waclaw J.: Tendencje w rozwoju metod zarządzania na przykładzie sektora publicznego. *Antidotum* 2003, nr 7, str. 16-26
- (10) Newton N.C. i wsp.: Criteria Based Laboratory Standardization. *AACC Annual Meeting 2006*, presentation number: D-91
- (11) Haussen M.L. i wsp.: Critical aspects of ISO 9001 implementation and its benefits to a private clinical laboratory in Brazil. *AACC Annual Meeting 2006*, presentation number: D-89
- (12) Salas A. i wsp.: The Certification Model to Excellence in a Medical Laboratory using a new Spanish Guide for the Assessment of Quality Management System. *AACC Annual Meeting 2006*, presentation number: D-88

**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](http://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. (świadcetwo 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)



**Przewlekłe zespoły mieloproliferacyjne ( chronic myeloproliferative diseases- CMPD)- charakterystyka, klasyfikacja i cechy diagnostyczne.**

Dr hab.n.med. Jadwiga Nowicka

Katedra i Zakład Analitiky Medycznej,  
d. Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku  
Akademia Medyczna we Wrocławiu.

CMPD są chorobami komórki pnia charakteryzującymi się rozrostem jednej lub więcej linii mieloidalnej np. erytroidalnej, granulocytowej, megakariocytowej z zachowanym dojrzewaniem komórek, co sprawia, że wzrasta liczba granulocytów, erytrocytów i płytek krwi zarówno w szpiku jak we krwi obwodowej. Występują u 6-9 osób na 100000/rok, w przeważającej liczbie u osób dorosłych, najczęściej między 50-70 rokiem życia. Jedną z cech charakterystycznych dla CMPD jest różnego stopnia włóknienie szpiku, które może postępować. Megakariocyty i monocyty produkujące i uwalniające liczne czynniki wzrostu jak transformujący czynnik wzrostu- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), płytkowo pochodny czynnik wzrostu ( PDGF), czynnik wzrostu fibroblastów (FGF) stymulują nie nowotworowy rozrost fibroblastów a te produkują włókna retikuliny i kolagenowe odkładane w podścielisku szpiku. CMPD wykazują ewolucję przebiegu klinicznego, co jest ważną cechą charakteryzującą nie tylko przebieg kliniczny ale tłumaczą zmiany w badaniach laboratoryjnych. Już w r.1951 badacz chorób mieloproliferacyjnych - Wiliam Damesheck dowiódł, że są to choroby komórki pnia oraz zwrócił uwagę na możliwość przejścia jednej choroby w drugą oraz przejścia przewlekłego w ostry zespół mieloproliferacyjny. Warunkuje to konieczność śledzenia objawów chorobowych oraz wyników badań laboratoryjnych, które te zmiany wyprzedzają.

CMPD dawniej dzielono na 1. czerwienicę prawdziwą, 2. przewlekłą białaczkę szpikową, 3. nadpłytkowość samoistną, 4. zwłóknienie szpiku. Aktualny podział przewlekłych zespołów mieloproliferacyjnych wg WHO obejmuje szerszą grupę schorzeń o określonych kryteriach diagnostycznych jak:

- Przewlekła białaczka szpikowa (chronic myelogenous leukemia - CML)
- Przewlekła białaczka granulocytowa=neutrofilowa<sup>1</sup> (chronic neutrophilic leukemia -CNL)
- Przewlekła białaczka eozynofilowa (chronic eosinophilic leukemia - CEL)/ i zespół hipereozynofilowy (hypereosinophilic syndrome-HES)
- Czerwienica prawdziwa (polycythemia vera-PV)
- Przewlekła samoistna mielofibroza (chronic idiopathic myelofibrosis - CIM)
- Nadpłytkowość samoistna (essential thrombocythemia- ET)
- Przewlekła choroba mieloproliferacyjna niesklasyfikowana (chronic myeloproliferative disease, unclassifiable- CMPD U)

**Przewlekła białaczka szpikowa- CML** stanowi ok. 20% wszystkich białaczek. Jest to choroba komórki pnia- przewlekły zespół mieloproliferacyjny dotyczący w przewodzie linii granulocytowej. W 95% przypadków jest obecny chromosom Philadelphia translokacja długich ramion chromosomów 9 i 22 -t(9;22)(q34;q11) i/ lub fuzja genu BCR/ABL. W wyniku tej translokacji z chromosomu 9 zostaje przeniesiony gen ABL w miejsce złamań na chromosomie 22 i powstaje gen- hybryda BCR/ABL. Miejsce złamania genu BCR dotyczy najczęściej obszaru określanego jako major breakpoint cluster region (M-bcr). U 98% chorych na CML egzon genu BCR b2 lub b3 łączy się z egzonom a2 genu ABL i powstające transkrypty b2/a2 i b3/a2 są odpowiedzialne za kodowanie białka o masie 210 kDa zwanego p210 o aktywności kinazy tyrozynowej. W ostrej białaczce limfoblastycznej (ALL) u 50% dorosłych i 80% dzieci z obecnością dodatniego chromosomu Ph miejsce złamania znajduje się w miejscu zwanym minor- breakpoint cluster-region, a powstający transkrypt e1a2 koduje białko 190p. W trzeciej izoformie genu BCR/ABL miejsce złamania genu BCR jest zlokalizowane między egzonem e19 i e20 w  $\mu$ BCR, a produktem transkryptu jest białko p 230. W części przypadków z Ph- chromosomem można wykryć wyłącznie fuzje genu BCR/ABL metodą molekularną. Wykrycie może nastąpić drogą hybrydyzacji fluorescencyjnej in situ (FISCH) jąder komórkowych w interfazie, rearanżacji genu BCR metodą Southern blotting, typ transkryptu genu BCR/ABL metodą RT-PCR oraz ilość metodą RQ-PCR.

Przypadki Ph (-) i BCR/ABL (-) mają atypowe cechy kliniczne, szybciej ulegają progresji i gorzej odpowiadają na leczenie.

W etiologii CML bierze się pod uwagę promieniowanie jonizujące, ze względu na częstsze występowanie u osób które przeżyły wybuch bomby w Hiroshimie i Nagasaki, częstszą zachorowalność radiologów i osób po Rtg-terapii. Stwierdzono też częstsze występowanie u osób narażonych na przewlekłe działanie benzenu.

CML występuje u 1-1,5 przyp./100000 populacji/rok, nieznacznie częściej u mężczyzn. Dotyczy chorych w każdym wieku, szczególnie między 40-60 r. życia.

W naturalnym przebiegu CML wyróżnia się 3 fazy choroby: 1.faza przewlekła 2.faza przyspieszenia 3.faza przełomu blastycznego. Choroba może zostać rozpoznana w każdej fazie, często bez objawów klinicznych- w czasie badań laboratoryjnych morfologii krwi.

**W fazie przewlekłej** stwierdza się klinicznie powiększenie śledziony. W badaniach laboratoryjnych morfologia krwi wykazuje różne stężenie Hb: prawidłowe, zmniejszone lub zwiększone, podobnie może zachowywać się liczba płytek krwi. Liczba krwinek białych jest zazwyczaj zwiększona > 50 G/l nawet do 500G/l. W rozmazie krwi obwodowej występują wszystkie formy układu granulocytowego z przewagą mielocytów, z obecnością eozynofili i bazofili. Dawniej chorobę nazywano białaczką mielocytową, z uwagi na przewagę mielocytów w obrazie krwi.

Fosfataza alkaliczna granulocytów (FAG) jest 0 lub niska ( np. 5 j.score, przy normie 35-135 j. score)

Szpik jest bogatokomórkowy, ze zwiększeniem odsetka komórek układu granulocytowego z zachowaniem wszystkich form rozwojowych, odsetkiem mieloblastów <10%, zwiększeniem megakariocytów natomiast obniżeniem odsetka układu czerwono-krwinkowego i limfo-retikularnego.

**Wg WHO** leukocytoza jest zwiększona, średnio wynosi ~ 170G/l, komórki układu granulocytowego są w różnych fazach dojrzewania, z pikami wzrostu w miejscu mielocytów i form podzielonych. Blasty stanowią zwykle 2% komórek, może być obecna bazofilia oraz eozynofilia, odsetek monocytów jest zwykle <3%, a ich bezwzględna liczba nie przekracza normy (<0,950 G/l), płytki krwi są prawidłowe lub zwiększone do 1000G/l, występuje łagodna niedokrwistość.

Szpik jest bogatokomórkowy, blasty w szpiku są <10% , zwykle stanowią mniej niż 5% komórek. Megakariocyty są mniejsze niż prawidłowe, o mniejszej liczbie jąder komórkowych. Ich odsetek w szpiku jest prawidłowy lub obniżony, natomiast u 40-50% chorych występuje umiarkowana proliferacja megakariocytów Układ erytroblastyczny jest zredukowany. U 40% chorych jest zwiększona ilość włókien retikuliny przy rozpoznaniu, koreluje z liczbą megakariocytów, wielkością śledziony i stopniem niedokrwistości. U niektórych chorych wzrasta liczba granulocytów kwasochłonnych. U 30% chorych mogą występować komórki pseudo- Gaucher'a (foamy cells) i barwiące się na niebiesko histocyty (see-bl), pochodzące z nowotworowego klonu.

**Przewlekła białaczka szpikowa faza przyspieszenia= akceleracji**

Poprzednie kryteria diagnostyczne wyróżniały fazę przyspieszenia gdy we krwi lub w szpiku: blasty >10% lub blasty i promielocyty >20% lub bazofile >20% lub eozynofile >20% lub erytoblasty we krwi >15%, płytki krwi <100G/l lub >1000 G/l, lub Hb <10g%, występowało włóknienie kolagenowe szpiku, pojawiły się nowe anomalie cytogenetyczne, powiększyła się śledziona mimo wcześniejszej normalizacji lub czas podwojenia krwinek białych <5 dni. Do rozpoznania fazy akceleracji wystarczyło spełnienie jednego z wymienionych cech diagnostycznych.

Wg WHO kryterium fazy akceleracji jest następujące (do rozpoznania wystarczy jedna cecha):

- blasty 10-19% we krwi obwodowej i/lub szpiku,
- bazofile we krwi obwodowej  $\geq 20\%$ ,
- utrzymująca się małopłytkowość  $< 100\text{G/l}$  niezależna od leczenia lub utrzymująca się nadpłytkowość ( $> 1000\text{G/l}$ ) nie odpowiadająca na leczenie,
- wzrastająca wielkość śledziony i wzrastająca liczba krwinek białych mimo leczenia,
- cytogenetyczne dowody wzrostu klonalnego tj pojawienie się dodatkowych aberracji, których nie stwierdzano przy rozpoznaniu.

W fazie akceleracji są widoczne cechy dysplazji, szczególnie występują dysplastyczne megakariocyty, mogą być cechy dysplazji linii granulocytowej i erytroblastycznej.

Proliferacja dysplastycznych megakariocytów w postaci skupisk z towarzyszącym włóknieniem retikuliny i kolagenowym może sugerować fazę akceleracji.

**Przewlekła białaczka szpikowa faza przełomu blastycznego=kryzy blastycznej** wg wcześniejszych kryteriów rozpoznawano gdy:

- Blasty we krwi obwodowej lub w szpiku  $> 30\%$ , lub blasty + promielocyty we krwi  $> 30\%$ ,
- lub blasty + promielocyty w szpiku  $> 50\%$ , lub występowało nacieczenie blastyczne narządów pozaszpikowych ( przełom pozaszpikowy).

Transformacja blastyczna jest w 2/3 mieloidalna (szpikowa), w 1/3 limfoblastyczna.

**Wg WHO przełom blastyczny** należy rozpoznać gdy:

blasty  $\geq 20\%$  we krwi obwodowej lub szpiku lub występuję

- pozaszpikowa proliferacja blastów lub są obecne
- duże ogniska blastów w szpiku.

W 70% kryza jest mieloidalna, może prezentować blasty podobne do występujących w różnych typach ostrych białaczek wg FAB z obecnością mieloblastów w różnym stadium dojrzewania, monoblastów, erytroblastów, megakarioblastów ze zwiększeniem lub bez zwiększenia odsetka form kwaso- i zasadochłonnych. U 20-30% chorych występuje przełom limfoblastyczny o morfologii L1 lub L2. Rzadko może wystąpić naprzemiennie przełom mielo- i limfoblastyczny. W niektórych przypadkach komórki blastyczne są bardzo młode lub heterogenne stąd do ich właściwego zakwalifikowania konieczne jest immunofenotypowanie.

Pozaszpikowa lokalizacja przełomu blastycznego często dotyczy skóry, węzłów chłonnych, śledziony i centralnego układu nerwowego (CNS), może być mieloidalna lub limfoidalna. Może ona dotyczyć również niektórych miejsc w kościach w postaci guzów, podczas gdy pozostały szpik wskazuje na fazę przewlekłą. Blasty należy odróżnić od miejsc dominacji promielocytów i mielocytów wokół beleczek kostnych i wokół naczyń w fazie przewlekłej.

Jak widać klasyfikacja faz CML uległa znacznej zmianie.

**W cytochemii** aktywność FAG jest niska w fazie przewlekłej, może być nadal niska lub podwyższyć się do granic prawidłowych w fazie przełomu blastycznego. Pozostałe reakcje cytochemiczne zależą od rodzaju przełomu blastycznego i zachowują się analogicznie do reakcji w ostrych białaczkach.

**Badanie cytogenetyczne:** u 80% chorych pojawiają się (oprócz Ph+) dodatkowe aberracje cytogenetyczne.

**Immunofenotypowanie.** Słaba ekspresja antygenów występujących w prawidłowych granulocytach jak CD15, HLA DR. W fazie blastycznej w mieloblastach jest brak lub słaba aktywność mieloperoxydazy (MPO), w przypadku przełomu mielo-monoblastycznego- CD13, CD14, CD15, CD33, w megakariocytach- CD41, CD61, w przypadku rozrostu erytroblastów -obecność glikoforyny, reakcji PAS na glikogen i hemoglobiny A. Komórki blastyczne mogą wykazywać obecność jednego lub więcej antygenów limfoidalnych. W przypadkach kryzy blastycznej B komórkowej występują dodatnie CD10, CD19, CD34, obecność TdT. Przy obecności antygenów limfoblastycznych może występować koekspresja jednego lub więcej antygenów mieloidalnych. Rzadko immunofenotyp może się zmieniać w kolejnej kryzie z mieloblastycznego na limfoblastyczny i odwrotnie.

### Ocena remisji w CML

W wyniku leczenia dojść może do całkowitej remisji hematologicznej, charakteryzującej się prawidłowym rozmazem krwi obwodowej i szpiku.

Całkowita remisja cytogenetyczna polega na całkowitym braku obecnego przed leczenie chromosomu Ph, natomiast całkowita remisja molekularna polega na całkowitym braku fuzji genu BCR/ABL, obecnego przed leczeniem na podstawie analizy co najmniej 20 metafaz.

### Przewlekła białaczka granulocytowa=neutrofilowa (CNL) wg WHO

Cechuje się klonalną proliferacją dojrzałych granulocytów. Jest rzadką chorobą występującą  $> 60$  roku życia. Charakteryzuje się klinicznie znacznym powiększeniem wątroby i śledziony, w badaniach laboratoryjnych zmianami we krwi obwodowej i szpiku.

Cechy diagnostyczne:

- W krwi obwodowej: leukocytoza  $\geq 25\text{G/l}$ , granulocyty z jądrem pałeczkowanym i podzielonym stanowią  $> 80\%$  białych krwinek, niedojrzałe granulocyty  $< 10\%$ , mieloblasty  $< 1\%$ , monocyty  $< 1\text{G/l}$ . Neutrofile często zawierają toksyczne ziarnistości, nie ma cech dysplazji układu granulocytowego.

- Szpik: bogatokomórkowy, mieloblasty  $< 5\%$ , krwinki białe i płytki krwi morfologicznie zwykle są prawidłowe,

- Ph(-), BCR/ABL(-),

- należy wykluczyć inne zespoły mieloproliferacyjne oraz zespół mielodysplastyczny i MDS/MPS.

**Aktywność FAG** jest podwyższona, podobnie jak w odczynach białaczkowych, brak innych anomalii cytochemicznych.

**Cytogenetyka** : u 90% karyotyp prawidłowy, u pozostałych może występować: +8, +9, del(20q), del(11q).

W czasie choroby nie stwierdza się wzrostu odsetka mieloblastów i promielocytów, lecz wzrasta odsetek mielocytów i dojrzałych granulocytów szpiku. Stosunek układu erytroblastycznego do granulocytowego może wynosić jak 1: 20. Rzadko występuje włóknienie retikuliny w szpiku.

### Przewlekła białaczka eozynofilowa(CEL)/ zespół hipereozynofilowy (HES) wg WHO

Wyrzucenie rozpoznania zespołu hipereozynofilowego jest utrzymywanie się eozynofilii

1,5G/l przez 6 miesięcy, natomiast przewlekłą białaczkę eozynofilową rozpoznaje się gdy eozynofilii  $> 1,5\text{G/l}$  towarzyszą mieloblasty we krwi obwodowej 2% -  $< 20\%$ , w szpiku  $> 5-19\%$ . W obrazie krwi i szpiku istnieje przewaga dojrzałych granulocytów kwasochłonnych, które mogą wykazywać hipersegmentację lub hiposegmentację jąder, w cytoplazmie ziarnistości kwasochłonne mogą być ubogie z obecnością jasnych, pozbawionych ziarnistości pól. Eozynofile mogą być większe, niekiedy z obecnością w cytoplazmie wodniczek. Różnicowanie form kwasochłonnych jest już widoczne w promielocytach, jakkolwiek promielocyty kwasochłonne i mielocyty kwasochłonne mogą nie być liczne. Eozynofilii może towarzyszyć neutrofilia, w niektórych przypadkach może występować monocytopenia i bazofilia. Czynnikiem złej prognozy jest obecność cech dysplazji w zakresie innych linii komórkowych.

**Badania cytogenetyczne i molekularne:** W CEL chromosom Ph (-), brak fuzji genu BCR/ABL. W przypadku obecności Ph+ i/lub BCR/ABL+ należy zakwalifikować jako CML z eozynofilią. W CEL występują anomalie cytogenetyczne dotyczące chromosomu 8 jak : +8, t(8;13), t(8;9), t(6;8) oraz chromosomu 5 jak : t(5;11), t(2;5), t(5;12). W 15% przypadków występuje gen FIP1L1/PDGFR.

**FAG** w górnej granicy normy ( $> 100$  .score)

**Należy wykluczyć** wiele schorzeń w przebiegu których występuje eozynofilia.

1. Wykluczyć przyczyny reakcji eozynofilowych wtórnych do:
  - alergii
  - chorób pasożytniczych
  - chorób infekcyjnych
  - chorób płuc (zespół Loeflera, "hypersensitiv pneumonitis")

- Wykluczyć odczynową eozynofilię w przebiegu:
  - chłoniaków T komórkowych, mycosis fungoides, zespołu Sezary'ego, ostrej białaczki limfoblastycznej/chłoniaka limfoblastycznego, mastocytozy.
- Wykluczyć choroby nowotworowe z eozynofilią:
  - przewlekłą białaczkę szpikową (MLC), ostrą białaczkę szpikową (MLA), typ M4eo, typ M2eo, inne choroby jak: czerwienica prawdziwa (PV), nadpłytkowość samoistna (TE), przewlekła idiopatyczna mielofibroza (CIMF), zespół mielodysplastyczny (MDS).
- Wykluczyć rozrost populacji limfocytów T i klonalny rozrost z nieprawidłowym fenotypem CD3+/CD4-/CD8- lub CD3+/CD4+/CD8-.

**Czerwienica prawdziwa (PV)** jest zespołem mieloproliferacyjnym wywołanym klonalnym rozrostem hematopoetycznej komórki pnia, cechującym się wzrostem produkcji krwinek czerwonych niezależnym od mechanizmów regulujących erytropoezę.

Zapadalność roczna wynosi 2,5/100000 ludzi/rok, między 40 i 80 rokiem życia, z nieznaczną przewagą u kobiet.

**Wg WHO** rozróżnia się 2 fazy choroby. 1. polycytemiczna faza w której krwinki czerwone są normocytowe, normochromiczne, w przypadku krwotoków np.z przewodu pokarmowego (z powodu skłonności do choroby wrzodowej) mogą być hipochromiczne i mikrocytowe. Czasami są obecne młode granulocyty, lecz komórki blastyczne nie występują. U >50% chorych występuje zwiększona liczba płytek krwi. Szpik jest bogato komórkowy w którym bogaty jest układ czerwokrwienny, granulocytowy, megakariocytowy (co określane jest jako panmyelosis), stąd nie ma przesunic w odsetku poszczególnych układów. Szczególnie rzuca się w oczy zwiększenie megakariocytów, które tworzą małe i duże zgrupowania komórek wokół zatok szpikowych. Megakariocyty mają podzielone jądra, nie wykazują cech dysplazji. U 30% chorych są obecne w szpiku różnego stopnia cechy zwłóknienia. U 95% chorych w szpiku jest ujemna reakcja na Fe. 2.faza zejściowa („spent”) określane też jako po polycytemiczna mielofibroza i „post polycytemic myeloid metaplasia (PPMM)”. W fazie tej liczba krwinek czerwonych normalizuje się i zmniejsza, występuje poikilocytoza, krwinki w kształcie łez. W szpiku obecne są włókna retikulino- i kolagenowe. Komórkowość szpiku jest różna, często obniżona, erytropoeza i granulopoeza zmniejszona. Występują grupy dysmorficznych megakariocytów. Funkcję krwiotwórczą przejmuje powiększająca się w wyniku pozaszpikowej hematopoezy śledziona, w której występuje linia erytroblastyczna, granulocytowa i megakariocytowa. Megakariocyty są obecne w zatokach śledziony. Wzrasta liczba niedojrzałych komórek, mieloblasty zarówno we krwi obwodowej jak szpiku stanowią <10% komórek.

**Cytogenetyka:** nie stwierdza się obecności Ph ani fuzji genu BCR/ABL. U 10-20% chorych występuje +8, +9.

**Badania molekularne** wykazały, że u >80% chorych występuje na poziomie komórki hematopoetycznej obecność mutacji genu kinazy tyrozynowej -JAK 2 V617F w wyniku czego powstaje nieprawidłowy enzym z fenyloalaniną zamiast waliny w poz.617, ten łączy się z wewnątrzkomórkową domeną receptora EPO tworząc kompleks EPO-R JAK2. Ulega on autofosforyzacji oraz wpływa na inne kinazy tyrozynowe powodując ich fosforyzację z następującą aktywacją dróg przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego, co jest przyczyną nadwrażliwości na działanie cytokin (SCF, IL-3, GM-CSF, EPO) i skutkuje mieloproliferacją. Mutację genu JAK 2 V617F wykazano również u ok. 50% chorych na mielofibrozę i u 25-50% chorych na nadpłytkowość samoistną.

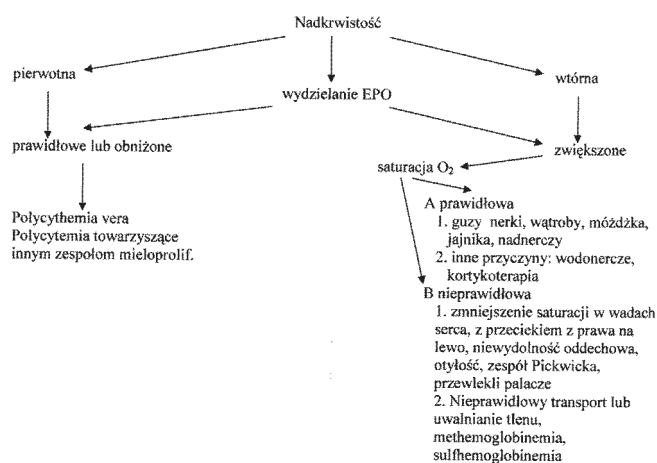
**Kryteria rozpoznania wg WHO** obejmują kryteria większe (A) i kryteria mniejsze (B)

Rozpoznanie czerwienicy stawia się w przypadku gdy obecne są A1+A2+którykolwiek 1 z A

lub A1+A2+2 którekolwiek z B.

- A1 zwiększenie masy krwinek czerwonych >25% ponad średnią lub Hb > 18,5g% u mężczyzn i Hb >16,5g% u kobiet

- A2 wykluczenie przypadków czerwienicy wtórnej w tym: rodzinna oraz wtórna do zwiększenia erytropoetyny (EPO)
- A3 powiększenie śledziony
- A4 obecność klonalnych genetycznych nieprawidłowości innych niż chromosom Ph lub fuzja genu BCR/ABL
- A5 Wzrost endogennej kolonii erytroidalnych in vitro
- B1 Nadpłytkowość >400G/l
- B2 liczba krwinek białych >12G/l
- B3 trepanobiopsja wykazuje wzrost wszystkich elementów komórkowych szpiku z przewagą układu erytroblastycznego i megakariocytów
- B4 niskie stężenie EPO w surowicy.



Erytropoetyna (EPO)- dane podstawowe.

- Glikoproteid o masie cząsteczkowej 36kD,
  - Gen kodujący EPO w chromosomie 7q11-q22, złożony z 5 eksonów i 5 intronów
  - W życiu płodowym EPO jest wytwarzana w wątrobie, w poza płodowym głównie w nerkach -90%, w wątrobie-10%. Stopień produkcji EPO jest regulowany stopniem utleniania krwi.
  - Stężenie EPO u zdrowych wynosi 15-30 j/l
  - W ciągu doby z moczem wydalają się 2j EPO
  - Receptory dla EPO na komórkach szeregu erytroidalnego głównie na BFU-E, CFU-E, proerytroblastach i erytroblastach.
- W nadkrwistości wtórnej jest nadmiar EPO!

**Najnowsza klasyfikacja** Polycythemia Vera Study Group z r.2005 uwzględnia w kryteriach diagnostycznych mutację genu JAK 2 V617F a także uwzględnia Ht jako cechę diagnostyczną, ogranicza do 4. kryteria grupy A. Zamiast liczby krwinek białych bierze się pod uwagę wyłącznie granulocyty i ich wzrost u palaczy tytoniu. Nie bierze się pod uwagę trepanobiopsji, a w jej miejsce ponownie uwzględnia się splenomegalię tym razem w badaniu obrazowym. Warunki rozpoznania czerwienicy prawdziwej (A1+A2 + którykolwiek 1 z A lub A1+A2+ 2 którekolwiek z B) nie uległy zmianie.

- A1 zwiększenie masy krwinek czerwonych >25% ponad średnią lub HT >=56% u kobiet
- i HT >=60% u mężczyzn,
- A2 wykluczenie przypadków czerwienicy wtórnej ( prawidłowa saturacja O<sub>2</sub> krwi tętniczej, brak wzrostu endogennej EPO.
- A3 powiększenie śledziony obecne w badaniu palpacyjnym
- A4 obecność mutacji genu JAK 2 V617F w komórkach hematopoetycznych
- B1 nadpłytkowość >400G/l
- B2 liczba granulocytów > 10G/l, u palaczy tytoniu >12,5G/l
- B3 splenomegalia w badaniu obrazowym
- B4 niskie stężenie endogennej EPO lub wzrost samoistny kolonii erytroidalnych.

**Przewlekła samoistna mielofibroza- CIM:**

rozrostowi klonu macierzystych komórek hematopoetycznych towarzyszy wzrost cytokin (głównie IL-8) które wpływają na zwiększenie odsetka nieprawidłowych megakariocytów i wraz z monocytami produkują transformujący czynnik wzrostu  $\beta$  (TGF  $\beta$ ), płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), czynnik wzrostu fibroblastów (FGF), stymulują proliferację fibroblastów, a te włókna retikulino- i kolagenowe odkładane w podścielisku w miejscu prawidłowego krwiotworzenia. Doprowadza to do ognisk krwiotworzenia w miejscach poza szpikiem jak śledziona i wątroba- które sprawowały tę funkcję w życiu płodowym.

**Cechy diagnostyczne** zależą od fazy choroby; charakterystyczny jest leukoerytroblastyczny obraz krwi obwodowej z poikilocytozą krwinek czerwonych, charakterystycznymi krwinkami w kształcie łez (dakrocyty, lakrimocyty) i powiększenie śledziona.

Leukocytoza najczęściej 20-50G/l z odmłodzeniem do mieloblasta. Liczba płytek prawidłowa, obniżona lub zwiększona, mogą być obecne płytki olbrzymie

Szpik trudny do uzyskania poprzez aspirację, często tzw. sucha punkcja.

Trepanobiopsja- jest podstawą rozpoznania. Wcześniejsza klasyfikacja mielofibrozy wyróżniała:

fazę początkową ze zwiększeniem komórek układu erytroblastycznego, granulocytowego i megakariocytowego, zwiększeniem fibroblastów i włókien retikulino- i kolagenowych; fazę drugą ze zmniejszeniem komórkowości szpiku, małymi koloniami erytroblastycznymi i granulocytowymi, dystroficznymi megakariocytami, gęstymi włóknami retikulino- i kolagenowymi, obecnością zwłóknienia koagenowego, pojawienie się nowych ognisk kostnienia; fazę końcową: ze zredukowaniem tkanki szpikowej, nielicznymi dystroficznymi megakariocytami, zajeciem miejsc zwłóknienia przez kostnienie. W badaniach radiologicznych odpowiada tej fazie zwężenie szpar szpikowych.

Inne badania: aktywność FAG : prawidłowa lub zwiększona, hiperurikemia.

**Wg WHO** Przewlekła idiopatyczna mielofibroza (CIMF) dzieli się na 2 fazy choroby. Faza przedzwłóknieniowa charakteryzuje się brakiem lub nieznacznym powiększeniem śledziona i/ lub wątroby. Hematologiczne parametry są różne, lecz często we krwi obwodowej występuje nieznaczna niedokrwistość z poikilocytozą i z nielicznymi lub brakiem krwinek w kształcie łez, są obecne erytroblasty. Leukocytoza jest nieznacznie podwyższona z obecnością metamielocytów, granulocytów z jądrem pałeczkowatym i podzielonym, mieloblastami które stanowią <10% komórek.

Szpik: Początkowo bogatokomórkowy. Układ erytroblastyczny jest zredukowany. Bogaty układ granulocytowy i megakariocytowy. Nieprawidłowe megakariocyty, przylegają do beleczek i zatok szpikowych. Megakariocyty w CIM wykazują największe zmiany spośród innych chorób mieloproliferacyjnych; mogą tworzyć skupiska, są duże i małe, z jądrami w kształcie „chmur” lub „balonów”. Włóknienie retikulino- i kolagenowe jest minimalne lub nieobecne. Występuje proliferacja naczyń w szpiku i guzki limfoidalne widoczne w ¼ badanych trepanobiopsji.

Faza zwłóknienia w tej fazie diagnozowanych jest 70-80% z CIM. Hematologicznie występuje niedokrwistość, leukoerytroblastyczny obraz krwi, liczne krwinki w kształcie łez. Liczba krwinek białych może być prawidłowa, obniżona lub podwyższona, nawet znacząco. Cechy dysgranulopoezy występują rzadko, lecz świadczą o transformacji w fazę bardziej agresywną. Odsetek mieloblastów jest niewielki, lecz gdy wynosi 10-19% świadczy o przyspieszeniu, gdy 20% i więcej o fazie blastycznej. Liczba płytek może być niska lub wysoka, mogą występować skupiska płytek i mogą być obecne krążące jądra megakariocytów, fragmenty megakariocytów lub mikro megakariocyty. Szpik: punkcja- najczęściej tzw. „sucha”, bez materiału

W trepanobiopsji występują miejsca niedojrzałych komórek, jednakże odsetek mieloblastów <10%. Charakterystyczna jest

zwiększona liczba poszerzonych zatok szpikowych w których obecna jest hematopoeza. Nietypowe megakariocyty są często znaczącym elementem szpiku. Czasami szpik traci hematopoetyczne elementy i składa się z włókien retikulino- i kolagenowych z małymi wyspami prekursorów hematopoezy usytuowanymi wewnątrz zatok. Występują ogniska nowotworzenia kości w postaci nieregularnych, pogrubiałych beleczek, które mogą stanowić ponad 50% objętości szpiku.

Pozaszpikowa hematopoeza występuje w zatokach śledziona i wątroby, z przewagą megakariocytów, czerwona miazga wykazuje zwłóknienie, w wątrobie zwłóknienie i marskość

**Immunofenotypowo-** nie stwierdza się nieprawidłowości.

**Cytogenetyka** Chromosom Ph (-), BCR/ABL(-). Zaburzenia chromosomalne występują u ok. 60% chorych, często powtarza się delecja del(13q), del(20q).

**Badania molekularne** u 35-50% chorych wykazują mutację genu JAK2 V617F oraz u niektórych chorych zwiększenie ekspresji genu PRV-1.

**Nadpłytkowość samoistna (ET) wg WHO**

Charakterystyka- klonalny zespół mieloproliferacyjny z zajęciem linii megakariocytów. Połowa chorych przy rozpoznaniu (laboratoryjnym) nie wykazuje zmian klinicznych. U połowy chorych występuje powiększenie śledziona i u 15-20% wątroby. U 20-50% chorych mogą wystąpić epizody zakrzepowe i/ lub krwotoczne.

Roczna zapadalność wynosi 2/100000/rok, głównie między 50-60 rokiem życia, podobna u obu płci. W młodszym wieku przeważają kobiety. Okres przeżycia wynosi 10-15 lat, dramatyczny wzrost liczby płytek rzuca je źle. Etiologia jest nieznana. Rzadko opisywane jest rodzinne występowanie. Sporadycznie ma miejsce transformacja w ostrą białaczkę lub zespół mielodysplastyczny.

**Kryteria diagnostyczne.** W krwi obwodowej utrzymująca się nadpłytkowość  $\geq 600$ G/l, anizocytoza płytek, występują płytki olbrzymie i mogą być obecne płytki bezziańiste. Występują skupiska płytek, rzadko pojedyncze megakariocyty. Krwinki czerwone są normocytowe, normochromiczne, w przypadku niedoboru żelaza mogą być mikrocytowe i hipochromiczne. Może wystąpić nieznaczna leukocytoza, różnicowanie krwinek białych jest na ogół prawidłowe, bazofilia nie występuje lub jest niewielka.

Badanie funkcji płytek: zaburzenia adhezji oraz agregacji pod wpływem adrenaliny, rzadziej pod wpływem kolagenu i ADP, prowadzące do stanów zakrzepowo- zatorowych.

Szpik kostny jest bogato komórkowy, wykazuje proliferację głównie linii megakariocytowej; liczne megakariocyty zwłaszcza dojrzałe, często w skupiskach, olbrzymich lub małych, otoczone płytkami. Układ czerwonekrwinkowy i granulocytowy są prawidłowe, czasem ze zwiększonym, rzadziej obniżonym odsetkiem dojrzałych granulocytów. Zjawisko obecności innych komórek układu krwiotwórczego wewnątrz megakariocytów np. krwinek czerwonych lub białych nosi nazwę empelipolezy i może występować w ET. Morfologicznie sprawia to wrażenie jakby „fagocytowanych” przez megakariocyty krwinek, lecz zadaniem megakariocytów jest ich ochrona np. w przebiegu eksperymentalnego wstrząsu u zwierząt.

Trepanobiopsja- szpik jest prawidłowo komórkowy lub umiarkowanie hiperkomórkowy, bywa opisywana również zmniejszona komórkowość szpiku. Znaczącą cechą jest obecność dużych lub gigantycznych megakariocytów, o obfitej dojrzałej cytoplazmie i z dobrze wykształconymi, gładkimi płatkami jąder, które są na ogół liczne. Megakariocyty występują w formie skupisk oraz pojedynczych komórek rozproszonych w szpiku. W odróżnieniu od PV nie obserwuje się mikromegakariocytów. Charakterystyczne jest wypełnienie megakariocytami przestrzeni szpikowych. Ilość włókien retikulino- i kolagenowych jest prawidłowa, wzrost zwłóknienia kolagenowego przemawia przeciwko rozpoznaniu ET.

**Aktywność FAG-** jest podwyższona.

**Cytogenetyka:** nie ma znaczących zmian cytogenetycznych, nieprawidłowy kariotyp występuje u 5-10% chorych. Opisywana jest +8,+9, del(5q), t(3;3) i inv(3) lecz mimo iż są kojarzone z

nadpłytkowością są charakterystyczne dla ostrych białaczek lub zespołu mielodysplastycznego.

Dotychczas nie jest znany ani biologiczny ani genetyczny marker charakterystyczny dla ET, dlatego dla rozpoznania konieczne jest wykluczenie stanów chorobowych mogących być przyczyną nadpłytkowości jak inne choroby mieloproliferacyjne, guzy łite przed diagnozą, stany zapalne wśród których najczęstsza przyczyną nadpłytkowości jest reumatoidalne zapalenie stawów.

#### Diagnostyka różnicowa ET

Należy wykluczyć:

☞ **PV**: Prawidłowa masa krwinek czerwonych, Hb <18,5g% u mężczyzn i <16,5g% u kobiet, prawidłowe żelazo w szpiku, prawidłowa ferrytyna w surowicy, prawidłowe MCV

☞ **CML**: brak chromosomu Ph i fuzji genu BCR/ABL

☞ **CIM**: brak włóknienia kolagenowego, minimalne lub brak włóknienia retikulinozowego

☞ **MDS**: brak del (5q), t(3;3)(q21;26), inv(3)(q21q26), brak cech dysplazji układu granulocytowego, nieliczne lub brak mikromegakariocytów.

**Wtórna nadpłytkowość w przebiegu**: przewlekłych stanów zapalnych, nowotworów, wcześniejszej splenektomii, odczynu pokrwotocznego, u dawców krwi, w niedokrwistościach hemolitycznych, polekowa

#### Przewlekła choroba mieloproliferacyjna niesklasyfikowana-U-CMPD

☞ Należą tu. chorzy z kliniczną i laboratoryjną cechą przewlekłego zespołu mieloproliferacyjnego nie odpowiadający wszystkim kryteriom diagnostycznym lub zawierający kryteria diagnostyczne 2 lub więcej zespołów.

☞ Najwięcej przypadków U-CMPD to wczesne stadia PV, CIMF, ET w których charakterystyczne cechy nie są jeszcze w pełni rozwinięte w okresie pierwszej prezentacji lub późne stadia tych chorób, zwłaszcza CIMF. W przypadkach wczesnych stadiów pacjenci winni być obserwowani co 4-6 miesięcy.

☞ Cechy kliniczne: powiększenie wątroby i śledziony

☞ Zaznaczona mielofibroza w szpiku, leukocytoza i nadpłytkowość z lub bez niedokrwistości do ciężkiej cytopenii wtórnej do niewydolności szpiku

**Podsumowanie.** Wprowadzenie klasyfikacji WHO porządkuje wiele problematycznych zagadnień związanych z rozpoznaniem, odpowiednim zakwalifikowaniem i różnicowaniem zespołów mieloproliferacyjnych, które jako rozrosty klonalne są potwierdzane przez wyniki badań genetycznych i molekularnych. Jednak nadal pierwszą i podstawową jest diagnostyka cytomorfologiczna pozwalająca na powzięcie podejrzenia nowotworowego rozrostu na podstawie jakościowych i ilościowych kryteriów diagnostycznych, w dużej mierze opartych się na wiedzy diagnosty dostrzegającego szczegóły budowy komórek i ich wzajemnych zależności oraz i ich wzajemnych zależności oraz umiejętności podporządkowania ich wypracowanym w klasyfikacjach standardom.

#### Piśmiennictwo

Bain B., Pierre R., Imbert M., Vardiman J.W., Brunning R.D., Flandrin G.: Chronic eosinophilic leukemia and the hypereosinophilic syndrome. In: WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics Tumours of Hematopoietis and Lymphoid Tissues. Eds.: E.S. Jaffe, N.L. Harris, H. Stein, J.W.Vardiman. IARC Press, Lyon, 2001, 29-31.

Błasińska-Morawiec M.: Nadkrwistości. W.: Hematologia dla Studentów i Lekarzy. Red.: T. Robak. Uniwersytet Medyczny, Łódź, 2007, 183-189.

Georgii A., Buhr T., Buesche G., Kreft A., Choritz H.: Classification and staging of Ph-negative myeloproliferative disorders by histopathology from bone marrow biopsies. Leukemia and lymphoma. 1996,22, suppl.1, p. 15-29.

Góra-Tabor J., Grzybowska-Izydorzyc O.: Przewlekła białaczka szpikowa. W.: Hematologia dla Studentów i Lekarzy. Red.: T. Robak. Uniwersytet Medyczny, Łódź, 2007, 166-173

Imbert M., Bain B., Pierre R., Vardiman J.W., Tiele J., Flandrin G.: Chronic neutrophilic leukemia. In: WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics Tumours of Hematopoietis and Lymphoid Tissues. Eds.: E.S. Jaffe, N.L. Harris, H. Stein, J.W.Vardiman. IARC Press, Lyon, 2001, 27-28.

Imbert M., Pierre R., Thiele J., Vardiman J.W., Brunning R.D., Flandrin G.: Essential Thrombocythemia. In: WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics Tumours of Hematopoietis and Lymphoid Tissues. Eds.: E.S. Jaffe, N.L. Harris, H. Stein, J.W.Vardiman. IARC Press, Lyon, 2001, 39-41.

Hellmann A., Prejzner., Frydecka I. Mital I.: Zespoły mieloproliferacyjne. W: "Choroby Wewnętrzne" Red. A. Szczeklik. Kraków 2006, 1489-1511.

Pierre R., Imbert M., Thiele J., Vardiman J.W., Brunning R.D., Flandrin G.: Polycythemia vera. In: WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics Tumours of Hematopoietis and Lymphoid Tissues. Eds.: E.S. Jaffe, N.L. Harris, H. Stein, J.W.Vardiman. IARC Press, Lyon, 2001, 32-34.

Pluta A., Robak T.: Eozynofilia. W.: Hematologia dla Studentów i Lekarzy. Red.: T. Robak. Uniwersytet Medyczny, Łódź, 2007, 195-204.

"Podstawy hematologii" Red. A. Dmoszyńska, T. Robak. Czelej, Lublin, 2003, 215-230

Robak T.: Rokowanie w przewlekłej białaczce szpikowej. Acta Haematol. Pol. 1992, 23, 11-20.

Sulek K., Rzepecki P., Hałka J.: Diagnostyka cytomorfologiczna szpiku. Wydawnictwo Salezjańskie. Warszawa 2003, 146-161

Thiele J., Pierre R., Imbert M., Vardiman J.W., Brunning R.D., Flandrin G.: Chronic idiopathic myelofibrosis. In: WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics Tumours of Hematopoietis and Lymphoid Tissues. Eds.: E.S. Jaffe, N.L. Harris, H. Stein, J.W.Vardiman. IARC Press, Lyon, 2001, 35-38.

Thiele J., Imbert M., Pierre R., Vardiman J.W., Brunning R.D., Flandrin G.: Chronic myeloproliferative diseases unclassifiable. In: WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics Tumours of Hematopoietis and Lymphoid Tissues. Eds.: E.S. Jaffe, N.L. Harris, H. Stein, J.W.Vardiman. IARC Press, Lyon, 2001, 42-44.

Treliński J., Robak T.: Nadpłytkowości. W.: Hematologia dla Studentów i Lekarzy. Red.: T. Robak. Uniwersytet Medyczny, Łódź, 2007. 190-204.

Vardiman J.W., Brunning R.D., Harris N.L.: Chronic myeloproliferative diseases: Introduction. In: WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics Tumours of Hematopoietis and Lymphoid Tissues. Eds.: E.S. Jaffe, N.L. Harris, H. Stein, J.W.Vardiman. IARC Press, Lyon, 2001 17-19.

Vardiman J.W., Pierre R., Tiele J., Imbert M., Brunning R.D., Flandrin G.: Chronic myelogenous leukemia. In: WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics Tumours of Hematopoietis and Lymphoid Tissues. Eds.: E.S. Jaffe, N.L. Harris, H. Stein, J.W.Vardiman. IARC Press, Lyon, 2001, 20-26.

Urbańska-Ryś H.: Pierwotna (idioopatyczna) mielofibroza. W.: Hematologia dla Studentów i Lekarzy. Red.: T. Robak. Uniwersytet Medyczny, Łódź, 2007, 174-182

#### SZANOWNI PAŃSTWO

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

Szczegóły zamieszczone są na stronie internetowej

[www.kidl.org.pl](http://www.kidl.org.pl) w zakładce "Ubezpieczenia"

Kierownik Biura KIDL

Stanisław Krężel

## Współczesne wymagania dotyczące użytkowania pomieszczeń, aparatury pomiarowo-badawczej oraz sprzętu stanowiących wyposażenie medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych

Mgr Bogusław Żegleń

Certyfikowany Pełnomocnik ds. Systemów jakości  
NZOZ Laboratorium Analiz Lekarskich S.C.

### Wstęp

W dobie ogromnego postępu technicznego obserwowanego w ostatnich latach, skuteczność prowadzenia dobrej diagnostyki laboratoryjnej i mikrobiologicznej zależy w dużej mierze od rodzaju używanych urządzeń. Obecnie na rynku dostępny jest szeroki asortyment różnego rodzaju sprzętu, używanego w laboratoriach diagnostyki medycznej. Jednak mimo tak ogromnych możliwości wyboru, jeżeli chodzi o rodzaj stosowanych metod pomiarowo-badawczych, należy pamiętać, że wszystkie te urządzenia podlegają pewnym wymaganiom w postaci wytycznych z ramienia Unii europejskiej jak i pewnym zaleceniom krajowym. W ciągu ostatnich 10 lat pojawiło się wiele wytycznych normatywno-prawnych dotyczących funkcjonowania medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych. Te wytyczne dotyczą m.in. tematów związanych z eksploatacją i wymaganiami co do pomieszczeń jak również informacje związane z wyposażeniem, co wg normy PN-EN ISO 15189 obejmuje przyrządy, materiały odniesienia, materiały zużywalne, odczynniki i systemy analityczne.

Dla celów niniejszej publikacji zagadnienia związane z wymaganiami co do pomieszczeń i wyposażenia laboratorium medycznego zostały podzielone na następujące grupy:

1. Pomieszczenia.
2. Aparatura pomiarowo-badawcza
3. Aparatura pomocnicza określana również jako wyposażenie podstawowe.
4. Materiały zużywalne (drobny sprzęt, odczynniki, kalibratory, kontrole i inne)
5. Laboratoryjne systemy informatyczne.

Przedstawione aspekty działania laboratorium diagnostyki medycznej i mikrobiologicznej stanowią ważne czynniki wpływające na prawidłowość i wiarygodność wykonywanych badań. Dlatego na końcu każdego rozdziału dokonano podsumowania w postaci praktycznych uwag postępowania w danym temacie.

### 1. Pomieszczenia.

Wytyczne dotyczące pomieszczeń laboratoryjnych są zawarte w wielu różnych dokumentach.

Oprócz wytycznych normatywnych zawartych w normach PN-EN ISO 17025 i PN-EN ISO 15189 dużo informacji zostało przedstawionych w „Wytycznych dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych obowiązujących przy ubieganiu się o akredytację” (Wyd. Ministerstwa Zdrowia z listopada 2001), zwanej popularnie „niebieską książeczką”. W rozdziale IV dotyczącym pomieszczeń laboratorium medycznego są informacje o wyodrębnieniu pomieszczeń służących do obsługi pacjentów, pomieszczeń głównych, specjalnych i socjalnych wraz z opisem co należy uwzględnić w ramach tych poszczególnych rodzajów pomieszczeń. Również zwraca się uwagę na odpowiednie oznakowanie pomieszczeń i wyjść ewakuacyjnych. Kierownictwo laboratorium powinno określić warunki środowiskowe oraz sposób ich monitorowania w tych pomieszczeniach, w których stanowią one istotny czynnik wpływający na wyniki badań lub bezpieczeństwo.

Jeżeli chodzi o laboratoria mikrobiologiczne to w omawianych powyżej wytycznych można znaleźć bardzo szczegółowe informacje co powinno być uwzględniane w ramach poszczególnych pomieszczeń podzielonych na te 4 grupy - cytowane wcześniej. Zakres wyodrębniania poszczególnych pracowni zależy od typu laboratorium – typy od A do D. Podobne informacje dotyczące pomieszczeń można znaleźć w rozporządzeniu Ministerstwa Zdrowia z dnia 3 marca 2004 w sprawie wymagań, jakim powinno odpowiadać medyczne laboratorium diagnostyczne (Dz. U. 2004, nr 43, poz. 408).

W paragrafie 2 i 3 są informacje mówiące o tym, że pomieszczenia laboratorium powinny być dostosowane do rodzaju prac, jakie są w nich wykonywane, w sposób zapewniający poprawną jakość pomiarów i wiarygodność wyników oraz że pomieszczenia i urządzenia laboratorium muszą gwarantować bezpieczne i higieniczne warunki pracy. W dalszej części jest przedstawiony cytowany wcześniej z „niebieskiej książeczki” podział pomieszczeń z opisem składu poszczególnych pomieszczeń. Ważne są również informacje dotyczące znakowania tych pomieszczeń w sposób umożliwiający ich identyfikację oraz zgodnie z wymogami dotyczącymi bezpieczeństwa. W pomieszczeniach do wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej na bieżąco kontroluje się warunki mogące mieć wpływ na wyniki badań.

Dodatkowe informacje w postaci pewnych wytycznych (zaleceń) w kwestii dotyczących urządzania i planowania pomieszczeń laboratoryjnych można znaleźć w punkcie 5.2 Warunki lokalowe i środowiskowe normy PN-EN ISO 15189.

Z uwagi na fakt, iż medyczne laboratorium diagnostyczne jest zakładem opieki zdrowotnej – co wynika z ustawy o zakładach opieki zdrowotnej (Dz. U. 1991, nr 91, poz. 408 z późniejszymi zmianami) oraz ustawy o diagnostyce laboratoryjnej (Tekst jednolity: Dz. U. 2004, Nr 144, poz. 1529) nie sposób zapomnieć o rozporządzeniu Ministra Zdrowia w sprawie wymagań, jakim powinny odpowiadać pod względem fachowym i sanitarnym pomieszczenia i urządzenia zakładu opieki zdrowotnej z dnia 10 listopada 2006 roku (Dz. U. 2006, Nr 213, poz. 1568). Na uwagę zasługuje fakt, iż program dostosowania zoz do warunków przedstawionych w tym rozporządzeniu powinien być złożony przez Kierownika zakładu do organu prowadzącego rejestr zoz w terminie do 30 czerwca 2007 roku. Jest to ważna informacja szczególnie dla tych laboratoriów, które funkcjonują jako niezależne zakłady opieki zdrowotnej - nie wchodzące w strukturę organizacyjną przychodni, szpitala czy innej placówki, ponieważ obowiązek przedłożenia programów dostosowawczych, zaopiniowanych przez Państwową Inspekcję Sanitarną spoczywa na barkach Kierownika laboratorium. W rozporządzeniu tym - w przeciwieństwie do wcześniej obowiązującego rozporządzenia z dnia 22 czerwca 2005 roku – nie ma specjalnych wytycznych dla laboratoriów medycznych i mikrobiologicznych. Jest natomiast wiele ważnych kwestii – głównie budowlanych związanych z funkcjonowaniem zakładu wraz z działem jako jednostką organizacyjną, którą może być medyczne laboratorium diagnostyczne.

### Podsumowanie dla rozdziału 1:

- Opracować wykaz pomieszczeń wraz z podziałem ich na 4 wymienione grupy.
- Zidentyfikować i nazwać te pomieszczenia wraz z umieszczeniem informacji na drzwiach.
- Zaleca się stworzyć krótkie wykazy informacyjne dla każdego pomieszczenia, dotyczące rodzaju wykonywanych działań, wykazu sprzętu, istotne warunki środowiskowe jeżeli mają zastosowanie – np. monitorowanie temperatury, wilgotności, itp. lub inne działania typu procesy sanitarno-dezynfekcyjne.
- Opracować zasady dotyczące organizacji pracy i bezpieczeństwa na poszczególnych stanowiskach znajdujących się w tych pomieszczeniach

### 2. Aparatura pomiarowo-badawcza.

Do aparatury pomiarowo-badawczej zaliczamy te urządzenia, które jak sama nazwa mówi wykonują samodzielnie pomiary. Dla potrzeb niniejszego opracowania dokonano rozdziału urządzeń na pomiarowo-badawcze i urządzenia pomocnicze. Wynika to m.in. z wymagań dotyczących dokumentowania pracy i wykorzystania tego sprzętu. Dla wszystkich urządzeń mających zastosowanie w laboratoriach medycznych i mikrobiologicznych obowiązują te same regulacje prawne europejskie i krajowe.

**UPRZEJMIIE INFORMUJEMY, ŻE WSZYSTKIE UCHWAŁY KRAJOWEJ RADY DIAGNOSTÓW LABORATORYJNYCH SĄ OGÓLNIE DOSTĘPNE NA NASZEJ STRONIE [www.kidl.org.pl](http://www.kidl.org.pl) w zakładce: „PRAWO -> UCHWAŁY I KADECJI KRDL; UCHWAŁY II KADENCJI KRDL”.**

W przypadku medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych znajdują zastosowanie tzw. „wyroby używane do diagnozy *in vitro*”, które zgodnie z definicją zaczerpniętą z Dyrektywy 93/42/EEC oznaczają dowolny wyrób, który jest odczynnikiem, produktem odczynnika, zestawem, przyrządem, sprzętem lub systemem, stosowanym samodzielnie lub w połączeniu, przewidzianym przez producenta do stosowania *in vitro* w celu badania próbek pobranych z organizmu ludzkiego oraz w celu dostarczenia informacji o stanie fizjologicznym, stanie zdrowia, choroby lub wady wrodzonej. Można obecnie przyjąć, iż wszystkie wymagania medyczne trafiające na polski rynek spełniają unijne wymagania, określone m.in. w dyrektywach.

A jak przedstawiają się nasze krajowe wytyczne w zakresie urządzeń i wszelkiego sprzętu stosowanego w medycznej diagnostyce laboratoryjnej i mikrobiologicznej?

Aspekty związane z wyposażeniem aparaturowym laboratorium w największym zakresie opisują 2 rozporządzenia: pierwsze cytowane już wcześniej z dnia 3 marca 2004 w sprawie wymagań, jakim powinno odpowiadać medyczne laboratorium diagnostyczne, a drugie, które stanowi uzupełnienie do pkt. 5.4 pierwszego – rozporządzenie MZ z dnia 21 marca 2006 roku zmieniające rozporządzenie w sprawie wymagań, jakim powinno odpowiadać medyczne laboratorium diagnostyczne (Dz. U. 2006. Nr 59, poz. 422). W myśl rozporządzenia z 3 marca 2004 roku dokonano podziału wyposażenia na: podstawowe, pomiarowo-badawcze, umożliwiające pobieranie materiału, zapewniające bezpieczeństwo i higienę pracy oraz na urządzenia telekomunikacyjne i systemy informatyczne. Aparaturę pomiarowo-badawczą poddaje się badaniom kontroli z częstotliwością wynikającą z rodzaju aparatury i wskazań wytwórców.

W ramach dokumentacji aparatury pomiarowo-badawczej oraz sprzętu – zgodnie z rozporządzeniem z 21 marca 2006 wyróżnia się:

- karty gwarancyjne
- specyfikacje techniczne
- datę rozpoczęcia eksploatacji
- wykaz pracowników przeszkolonych i upoważnionych do obsługi oraz osób bezpośrednio odpowiedzialnych za daną aparaturę lub sprzęt
- instrukcje użytkowania
- zapisy kalibracji
- instrukcje postępowania przy działaniach naprawczych i korygujących
- oświadczenie o dopuszczeniu do użytkowania po usunięciu awarii
- dane o bieżącej obsłudze i kontroli
- dane o konserwacji bieżącej i okresowej prowadzonej zgodnie ze wskazaniami wytwórców.

Jak widać są to informacje, które powinny być już dawno wykorzystane i wdrożone w każdym laboratorium (ostatnie z rozporządzeń weszło w życie w kwietniu 2006 roku).

Te przedstawione wytyczne powinny stanowić minimum dokumentacyjne urządzeń laboratoryjnych. Jako uzupełnienie i rozszerzenie pewnych informacji na temat wyposażenia laboratorium stanowi punkt 5.3 normy PN-EN ISO 15189 oraz wytyczne z „niebieskiej książeczki” – zwłaszcza jeżeli chodzi o rodzaje wyposażenie laboratorium mikrobiologicznego.

#### • Podsumowanie do rozdziału 2:

- Należy opracować szczegółową listę aparatury pomiarowo-badawczej wraz ze skompletowaniem wszelkiej dotychczasowej dokumentacji danego urządzenia
- Określić zawartość dokumentacyjną wyposażenia pomiarowego wraz z ustaleniem identyfikacji urządzeń i dokumentów oraz wyznaczeniem osób opiekujących się danymi urządzeniami i nadzorującymi dokumentację
- Zazwyczaj zawartość dokumentacyjna tych urządzeń składa się z 2 części:

1). tzw. części stałej w postaci instrukcji (określanej często jako SOP) postępowania w zakresie: czynności konserwacyjnych codziennych i okresowych, skróconej stanowiskowej instrukcji obsługi wynikającej ze specyfiki pracy, wytycznych dotyczących prowadzenia czynności kalibracyjnych, kontrolnych, postępowania w przypadkach

występowania niezgodności wyników kontrolnych z wartościami oczekiwanymi oraz postępowania w przypadku wystąpienia awarii, 2). tzw. części zmiennej (nazywanej często Księgą LOG), która zawiera informacje o użytkownikach upoważnionych do pracy na urządzeniu i potwierdzających zapoznanie się z zasadami zawartymi w dokumentacji, informacje dotyczące specyfikacji technicznych, zakupu, instalacji, gwarancji, przeznaczenia z wykazem badań, wykazy odczynników, akcesoriów, dokumentacji firmowej oraz zapisy z działań konserwacyjnych (np. paszporty techniczne), kontrolnych, kalibracyjnych, zapisy z awarii, napraw i wszelkich innych działań w obrębie danego urządzenia

• Ważne aby personel po należyтым przeszkoleniu wdrażał w codzienną praktykę te przyjęte ustalenia opisane w dokumentacji urządzenia.

#### 1. Aparatura pomocnicza (wyposażenie podstawowe).

W skład aparatury pomocniczej inaczej klasyfikowanej (w niebieskiej książeczce) jako wyposażenie podstawowe wchodzi wszystkie pozostałe urządzenia laboratoryjne, jak: wirówki, cieplarki, lodówki, miesadła, myjki, mikroskopy, komory laminarne, sprzęt dożujący. Sprzęt ten również powinien posiadać stosowną dokumentację opartą na wymienianych wcześniej rozporządzeniach (zwłaszcza z 21 marca 2006 roku).

Z dotychczasowej praktyki wiadomo, iż zgodnie z ustawą o zakładach opieki zdrowotnej powinna być na bieżąco prowadzona dokumentacja urządzenia, która najczęściej miała postać paszportu technicznego. Patrząc na omawiane wcześniej rozporządzenia oraz na wytyczne normatywne każde laboratorium powinno dodatkowo opracować pozostałe elementy dokumentacji poszczególnych rodzajów sprzętu, jak choćby krótkie instrukcje stanowiskowe w oparciu o wytyczne producenta lub dostarczone przez niego, wszelkiego rodzaju zapisy (np. z wzorcowania), instrukcje postępowania na wypadek działań niepożądanych lub awarii, wykazy osób przeszkolonych i odpowiedzialnych.

W przypadku laboratoriów mikrobiologicznych doskonałe źródło informacji na ten temat stanowi dokument o nazwie EA-04/10 opracowany przez wspólną grupę roboczą EA/EURACHEM tłumaczony w Polskim Centrum Akredytacji we współpracy z Komitetem Technicznym PKN nr 3 ds. Mikrobiologii Żywności. Dokument ten dotyczy „Akredytacji Laboratoriów Mikrobiologicznych” i został opublikowany na stronach internetowych PCA w 2006 roku.

#### • Podsumowanie do rozdziału 3:

- Sporządzić dokładny wykaz wszelkiego sprzętu pomocniczego
- Skompletować wszelką dotychczasową dokumentację każdego urządzenia
- Określić przeznaczenie urządzenia i osoby odpowiedzialne
- Każde urządzenie - o ile producent inaczej nie wymaga, powinno być przynajmniej raz na rok poddawane czynnościom konserwacyjnym (przegląd techniczny) wykonywanym przez wskazany uprawniony serwis
- Określić wymagania dokumentacyjne tego sprzętu wraz z identyfikacją w postaci takich rozwiązań jak:
  - na bazie paszportu technicznego uzupełnić dodatkowo wymagane informacje w rozporządzeniu z 21 marca 2006 roku
  - stworzyć pełną dokumentację w postaci przykładowej kilkustronicowej teczki urządzenia zawierającej kartę informacyjną, wytyczne dotyczące obsługi (instrukcje obsługi, postępowanie przy awariach), karty konserwacji, przeglądów, wzorcowania, karty awarii i przestojów z załączonymi raportami serwisowymi oraz inne dokumenty jak karty monitorowania temperatury, wykazy części zamiennych i inne.

#### 4. Materiały zużywalne – odczynniki.

Materiały zużywalne jak drobny sprzęt, odczynniki, kalibratory, materiały kontrolne i inne elementy z tego zakresu wykorzystania, stanowią również ważny element wyposażenia, który nie należy pomijać w działaniach mających na celu ewidencjonowanie i dokumentowanie procesów laboratoryjnych. Z wytycznych normatywno-prawnych w sprawie odczynników są tylko informacje przedstawione w „niebieskiej książeczce”, które mówią o stworzeniu tzw. kart środków badawczych zawierających takie zapisy jak:

- informacje dotyczące zakupu (czas dostarczenia, ilość)
- data ważności (wraz nr lot serii odczynnika)
- data/godzina otwarcia każdego nowego opakowania (inaczej data wprowadzenia do użycia wraz z datą zakończenia zużycia każdego opakowania)
- stan aktualny otwartego opakowania (czas przebywania w gotowości reakcyjnej)
- sposób przechowywania
- sposób utylizacji po zakończeniu badania.

UWAGA: Informacje podawane w nawiasach w powyższych punktach stanowią przypiski autora.

Wiele laboratoriów prowadzi powyższe zapisy w formie ewidencji magazynowej prowadzonej w formie papierowej lub elektronicznej jako moduł laboratoryjnego systemu informatycznego. Ważne jest aby w każdym laboratorium prowadzona była również dokumentacja, dotycząca zasad współpracy w firmami dostarczającymi wszelkie materiały zużywalne, formy zamawiania, reklamacji, karty charakterystyki substancji niebezpiecznych, sposoby utylizacji odczynników i opakowań oraz informacje o przechowywaniu.

#### ● Podsumowanie do rozdziału 4:

- Najlepszym rozwiązaniem jest stworzenie tzw. karty zużycia odczynnika, kalibratora, kontroli nazywanej inaczej kartą środka badawczego, która zawiera:

- nazwa laboratorium/pracowni
- nazwa odczynnika wraz z numerem identyfikacyjnym karty
- informacje o odczynniku: nr katalogowy, nazwa firmowa, wielkość opakowania, firma dostarczająca, warunki przechowywania, środki ostrożności, sposoby utylizacji
- data dostawy kolejnego opakowania wraz z lotem i datą ważności
- data wprowadzenia do użycia i data zakończenia użycia
- inne informacje jak: cena poszczególnych opakowań, ilość wykonanych badań, itp.

● *Wszystkie te informacje najlepiej opracować w formie tabelarycznej jako formularz dla każdego używanego w laboratorium odczynnika.*

- W przypadku użytkowania materiałów kontrolnych, kalibracyjnych i innego sprzętu należy postępować według wcześniej ustalonych schematów, najczęściej wynikających z zaleceń producenta urządzenia.

#### 5. Laboratoryjne Systemu Informatyczne.

Szacuje się, że we współczesnym laboratorium diagnostyki laboratoryjnej i mikrobiologicznej sprawnie funkcjonujący system informatyczny usprawnia i ogranicza tzw. dodatkową pracę dokumentacyjną w około 30 – 40 %. Dlatego każde laboratorium powinno dążyć do pełnej informatyzacji świadczonych usług.

Wytyczne na temat systemów informatycznych są zawarte głównie w:

- Załączniku B normy PN-EN ISO 15189
- Rozporządzeniu MZ z dnia 21 grudnia 2006 roku w sprawie rodzajów i zakresu dokumentacji medycznej w zakładach opieki zdrowotnej oraz sposobu jej przetwarzania (Dz.U. 2006, Nr 247, poz. 1819).

#### Podsumowanie do rozdziału 5:

Głównym zadaniem informatyzacji w laboratorium jest sprawne i łatwo dostępne gromadzenie danych dotyczących pacjentów, wykonywanych badań, rozliczeń ze zleceniodawcami, kontroli jakości i innych. Dlatego aby system

informatyczny jak najbardziej sprawnie funkcjonował należy:

- określić wewnętrzne potrzeby informatyczne laboratorium, tak aby potem mogły one być właściwie zdefiniowane przez firmy dostarczające oprogramowanie
- zaprojektować stanowiska
- ustalić zabezpieczenia, osoby odpowiedzialne
- przeszkolić personel
- opracować cały system dokumentacji obsługi i zabezpieczenia LIS z uwzględnieniem podręcznych instrukcji z wykazami badań, zakresów referencyjnych, płatników, lekarzy zlecających i innych.

#### Uwagi końcowe:

W przedstawionym opracowaniu przytoczono tylko skrót pewnych informacji na temat pomieszczeń i wyposażenia laboratoriów medycznych z odnośnikami do dokumentów uzupełniających i rozwijających te informacje.

Aby laboratorium umiejętnie radziło sobie z przedstawionymi wytycznymi w obszarze pomieszczeń i wyposażenia, powinno opierać swe działania o System Zarządzania Jakością, który stanowi doskonałe narzędzie do definiowania i dokumentowania wszelkich procesów zachodzących w postępowaniu diagnostycznym.

Ważne aby przy obecnie podejmowanych działaniach organizacyjnych w laboratorium uwzględniać wytyczne prawne a w szczególności nie wolno pomijać wytycznych zawartych w rozporządzeniu MZ z dnia 23 marca 2006 roku w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych (Dz.U. 2006, nr 61, poz. 435), które mają obowiązywać w terminie do końca marca 2009 roku.

#### Literatura:

- Norma PN-EN ISO/IEC 17025 - „Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorujących” – Wyd. PKN luty 2001
- Norma PN-EN ISO 15189 – „Laboratoria medyczne. Szczególne wymagania dotyczące jakości i kompetencji” – Wyd. PKN luty 2006
- Dyrektywa Rady Wspólnot Europejskich 93/42/EWG w sprawie wyrobów medycznych

### Doskonalenie Systemu Jakości w akredytowanym laboratorium.

**Bogumiła Hajdrowska**

Szanowny Czytelniku!

Zastanawiasz się, czy zbudować System Jakości w swoim laboratorium. Zapewniam Cię, że jest to doskonała inwestycja w rozwój firmy. Wystarczy zdobyć środki na jego wdrożenie i znaleźć zrozumienie wśród pracowników. Po ciężkiej pracy dostajesz największą nagrodę- upragniony Certyfikat Akredytacyjny. Przyjmujesz gratulacje, bo dzięki Tobie, Twojemu uporowi i pomysłom laboratorium potwierdziło swoje kompetencje. Ale nie możesz spocząć na laurach. System Jakości to nieustające doskonalenie. Sam Certyfikat przecież nie daje gwarancji, że funkcjonuje on bez zarzutu. Zawsze możesz zrobić coś prościej, szybciej i sprawniej. Dasz dowód na to, że System „wszedł w życie” a nie leży na półce w gabinecie szefa. Sam system doskonalenia odbywa się według następującego schematu:

planuj    wykonaj to co zaplanowałeś → sprawdź to co wykonałeś → doskonal to co wykonałeś. W tym celu masz do wyboru wiele narzędzi, takich jak: Przeglądy Systemu Zarządzania Jakością, Audyty wewnętrzne i zewnętrzne oraz wszelkie oceny, np. zadowolenie klientów.

Szczegółowy tryb planowania, przeprowadzania, dokumentowania oraz realizacji ustaleń podejmowanych w wyniku przeglądów zarządzania opisuje Procedura Ogólna.



Zgodnie z nią Przegląd Systemu Zarządzania Jakością dokonywany jest minimum 1 raz w roku zgodnie z wcześniej ustalonym harmonogramem w celu upewnienia się, że ustanowiony System Jakości spełnia postawione mu zadania. Pełnomocnik ds. jakości i kierownictwo laboratorium przygotowuje dane wejściowe wg normy PN EN ISO 9001:2009. Przykładowe dane potrzebne do przeglądu Systemu Zarządzania Jakością to

- wyniki auditów wewnętrznych
- sprawozdania personelu kierowniczego
- stosowność polityki jakości i procedur ogólnych
- oceny dokonane przez organizacje zewnętrzne
- przeprowadzone działania korygujące i zapobiegawcze
- działania podjęte w wyniku wcześniejszych przeglądów
- wyniki porównań międzylaboratoryjnych lub badań biegłości
- zmiany w zakresie i rodzaju wykonywanych badań
- sygnały zgłaszane przez klientów
- reklamacje i skargi
- zapisy dotyczące odstępstw
- potrzeby w zakresie szkoleń pracowników
- propozycje zmian w dokumentacji systemu jakości w celu uaktualnienia dokumentów
- posiadane zasoby oraz nadzór nad wyposażeniem pomiarowym i badawczym

W przeglądach systemu jakości uczestniczą: Dyrektor, Kierownik Laboratorium, Pełnomocnik ds. Systemu Jakości, Główny Księgowy i inne zaproszone osoby, których przegląd może dotyczyć. Dyrektor zatwierdza porządek dzienny przeglądu zarządzania na co najmniej 14 dni przed planowanym terminem.

Porządek dzienny zawiera co najmniej:

- datę przeglądu,
- listę osób uczestniczących,
- omawiane tematy ze wskazaniem osób referujących.

W trakcie przeglądu Pełnomocnik ds. jakości sporządza notatki zapisując wszelkie uwagi i spostrzeżenia. Wnioski z przeglądu wraz z działaniami doskonalącymi dokumentowane są w Raporcie z przeglądu Systemu Zarządzania Jakością

#### Raport z Przeglądu Systemu Zarządzania Jakością nr.....

Wykonany przez ..... dnia.....

#### I Opis danych wejściowych potrzebnych do przeprowadzenia przeglądu w tym

- Stosowność polityki i procedur SZJ
- Sprawozdanie personelu nadzorującego i kierowniczego za rok poprzedni
- Raporty z auditu wewnętrznego
- Działania korygujące i zapobiegawcze
- Ocena przez organizacje zewnętrzne
- Porównania biegłości
- Zmiany w zakresie i rodzaju wykonywanych badań
- Informacje zwrotne od klientów
- Inne istotne czynniki(sterowanie jakością zasoby szkolenia

itp )

#### II Załączniki dotyczące doskonalenia

Data podpis

Wszystkie zalecenia z przeglądu dotyczące doskonalenia dokumentowane są na kartach ustaleń z przeglądu.

#### Karta ustaleń nr .....

#### z Przeglądu Systemu Zarządzania Jakością nr.....

1. Opis ustalenia

2. Osoba odpowiedzialna za realizację ustalenia

3. Termin realizacji

Data i podpis osoby odpowiedzialnej

Akceptacja Dyrektora data i podpis

4. Potwierdzenie wykonania działań

Data i podpis Pełnomocnika ds. jakości

Pełnomocnik ds. jakości przechowuje wszystkie dokumenty związane z przeglądem Systemu Zarządzania Jakością, tj.: porządek dzienny, Raport z Przeglądu Systemu Zarządzania Jakością oraz Kartę ustaleń z Przeglądu Systemu Zarządzania Jakością. Wszelkie stwierdzone w trakcie przeglądu niezgodności prowadzą do uruchomienia działań korygujących i zapobiegawczych.

**Wdrożony i utrzymany Systemu Zarządzania Jakością da Ci przewagę nad innymi firmami z branży na konkurencyjnym rynku. Wzrośnie prestiż firmy zarówno w oczach obecnych, jak i potencjalnych klientów. Wyraźnie ograniczysz liczbę reklamacji przez co wzrośnie zadowolenie klienta. Niewątpliwą korzyścią jest uporządkowanie dokumentacji laboratoryjnej oraz podniesienie jakości pracy. Poprzez doskonalenie Systemu Zarządzania Jakością przez udokumentowanie działań całego personelu posiadasz mocny atut w sprawach sądowych.**

#### UWAGA !!!

#### Konkurs „Dowody naukowe? Tak, korzystam” Edycja Pierwsza 2007

#### Zasady konkursu

Agencja Oceny Technologii Medycznych we współpracy z Naczelna Izba Lekarska, Kolegium Lekarzy Rodzinnych w Polsce, Naczelna Izba Pielęgniarek i Położnych, Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych, Konferencje Rektorów Akademickich Uczelni Medycznych, Departamentem Nauki i Szkolnictwa Wzycznego Ministerstwa Zdrowia oraz Cochrane Collaboration w Polsce, ogłasza pierwszą edycję dorocznego konkursu

#### „Dowody naukowe? Tak, korzystam”

dla wszystkich, którzy najciekawiej opisz wykorzystanie dowodów naukowych z zasobów Cochrane Library lub innych źródeł dla poprawy jakości opieki zdrowotnej w Polsce.

Wiecej na stronie internetowej KIDL - [www.kidl.org.pl](http://www.kidl.org.pl)

### Rozważania o cenach i zasadność prowadzenia kontroli nad jakością świadczonych usług diagnostyki laboratoryjnej.

Teresa KURZAWA

Żyjemy w czasach ogromnego postępu wiedzy i możliwości. Cieszymy się z faktu, że możemy zaoferować naszym pacjentom najnowocześniejsze badania. Używamy wysokospecjalistycznych urządzeń, takich samych jak nasi koledzy w świecie. Stosujemy najlepsze, a więc i drogie odczynniki. Podnosimy stale poziom wiarygodności naszych oznaczeń, certyfikujemy nasze procedury badawcze. Trudno spotkać doktorat czy habilitację, której udziałem nie są diagnostyczne badania laboratoryjne. Prezentujemy wysoki poziom wiedzy, mamy kwalifikacje i wciąż je rozwijamy.

A jednak do naszego środowiska, do naszego zawodu (i jestem o tym przekonana) wdarły się prawa dzięki konkurencji, gdzie podstawowym kryterium popytu na świadczenie pozostaje cena, przy pełnym ignorowaniu wiarygodności dokonywanych pomiarów. Jakże są i mogą być reperkusje tych praktyk nietrudno sobie wyobrazić. Jako osoba od lat związana z zawodem diagnostyki laboratoryjnej zaczynam odczuwać pierwsze skutki takich nieuczciwych praktyk.

Tak więc, przemożna wola opanowania rynku usług diagnostycznych prowadziła dotąd do wymuszonej obniżki cen na te usługi. Stymulowało to działania zmierzające do unowocześniania metod badawczych jak również implikowało zmiany w strukturze organizacyjnej laboratoriów.

Głęboka analiza kosztów wykonania badań w naszych laboratoriach skłania mnie ku przeświadczeniu, że przy wymaganym poziomie jakości nie da się zejść poniżej pewnego poziomu kosztów. Wysoka jakość pozwala trafnie oceniać trudne diagnostycznie jednostki chorobowe. Zatem dziwi fakt pojawienia się na rynku laboratoriów (prywatnych) oferujących wykonanie badań w wielu przypadkach poniżej kosztów dobrych jakościowo materiałów i odczynników dostępnych na rynku nie mówiąc już o kosztach wykonania i innych składowych na podstawie których kalkuluje się cenę jednostkową badania.

Przyczyn takiego stanu rzeczy można szukać na przykład w stosowaniu metod wskaźnikowych niedopuszczalnych w świadczeniu usług medycznych czy też dumpingu celem zdobycia rynku i wyeliminowania wiarygodnych laboratoriów.

Dumping jest wykroczeniem przeciwko art. 8 ust. 1 i ust. 2 pkt. 1) i 3) ustawy z dnia 15 grudnia 200 r o ochronie konkurencji i konsumentów (Dz.U. z dnia 15 grudnia 2005r. Nr 244 poz. 2080 z późniejszymi zmianami) i jest karalny. Stosowanie metod wskaźnikowych w diagnozowaniu pacjentów jest nieetyczne, stanowi naruszenie ustawy o czynnościach diagnostyki laboratoryjnej przez diagnostę laboratoryjnego oraz podważa zaufanie do całej branży świadczącej usługi zdrowotne, a zwłaszcza do grupy (korporacji zawodowej) diagnostów laboratoryjnych. Niewłaściwa diagnoza postawiona na podstawie wyniku badania o niepewnej i niepotwierdzonej wiarygodności pociąga za sobą skutki zdrowotne i ekonomiczne.

I tak :

- ✍ pacjent niewłaściwie leczony wymaga znacznych nakładów na jego dodatkowe leczenie spowodowane powikłaniami wynikającymi z niewłaściwej terapii,
- ✍ niewłaściwe leczenie może doprowadzić do powikłań i zgonu chorego,
- ✍ środki przeznaczone przez NFZ, na finansowanie procedur medycznych przy niewykonaniu badań diagnostycznych są źródłem nieuprawnionego dochodu.

Laboratoria ponoszące koszty w sposób kwalifikowany, a więc ponoszące koszty osiągniętej wiarygodności są eliminowane z rynku. I co nam zostanie ?

Zostaną laboratoria nastawione na zysk, wykonujące oznaczenia wątpliwej jakości za to po wygórowanej cenie, bo pozbawione rzetelnej i uczciwej konkurencji.

Jakie jest wyjście z tej sytuacji ?

Przede wszystkim trzeba wrócić do przestrzegania norm moralnych, o których mówią szeroko pojęte zasady etyki w tym i nasz Kodeks Etyki. Ustalić zasady priorytetu nadrzędności dobra pacjenta i kontroli przestrzegania tych zasad. Doprowadzić do powszechnej certyfikacji procedur i akredytacji laboratoriów.

Umieścić wykaz laboratoryjnych badań diagnostycznych w „koszyku świadczeń gwarantowanych” dla zapewnienia celowości postępowania w diagnozowaniu chorego.

Wniosłoby to długo oczekiwaną przez nasze środowisko pozytywną odmianę.

Moim zdaniem i wielu diagnostów laboratoryjnych należy doprowadzić do ujednolicenia kryteriów ekonomicznych działania laboratoriów. Optymalne finansowanie wiarygodnych, certyfikowanych laboratoriów, wydaje się być związane z ustaleniem optymalnych cen badań diagnostycznych.

Kontrola stosowania optymalnych cen, realizacji części diagnostycznej „koszyka świadczeń” w kontraktach NFZ powinna zapewnić pacjentom wysoki poziom tych świadczeń.

Kontrola realizacji kontraktów w zakresie diagnostycznych badań laboratoryjnych powinna odbywać się z udziałem naszej korporacji. Stosowanie zaś przez NFZ sankcji za naruszenie umów kontraktowych, to jeden ze sposobów na rozwiązanie nurtujących nas problemów dotyczących walki z nieuczciwą konkurencją na rynku diagnostycznym.

Mam nadzieję, że moje przemyslenia zainicjują szerszą dyskusję na temat normalizacji rynku diagnostyki laboratoryjnej w naszym kraju i w efekcie zaowocują stworzeniem skutecznych mechanizmów walki z nieuczciwą konkurencją w imię dobra naszych pacjentów i środowiska diagnostów laboratoryjnych.

#### INFORMACJA

#### DLA PT DIAGNOSTÓW LABORATORYJNYCH POSIADAJĄCYCH UPRAWNIENIA DO ZMNIEJSZENIA LUB ZAWIESZENIA PŁATNOŚCI SKŁADEK CZŁONKOWSKICH.

Uprzejmie informuję, że uchwała nr 62/2004 KRDL z dnia 17 grudnia 2004 r. (opublikowana w Gazecie KIDL "DIAGNOSTA LABORATORYJNY" nr 1(6) z kwietnia 2005 r. oraz dostępna w Internecie w zakładce "PRAWO-Uchwały KRDL- X Posiedzenie KRDL) umożliwia PT Diagnostom Laboratoryjnym ubieganie się o zawieszenie obowiązku płatności składki członkowskiej na rzecz Korporacji lub zmniejszenia jej wysokości. W myśl w/w Uchwały:

1. o **ZAWIESZENIE** płatności składek mogą występować Diagnosty, którzy:

- a) utracili pracę (paragraf 1 ust. 1),
- b) pozostają na urlopie wychowawczym nie wykonując czynności na podstawie umowy o pracę lub umowy cywilnoprawnej (paragraf 1 ust. 2),
- c) wykonują czynności diagnostyki laboratoryjnej w ramach wolontariatu bez pobierania wynagrodzenia i nie posiadają zatrudnienia w innym zawodzie (paragraf 1 ust. 3),

2. o **ZMNIEJSZENIE** wysokości składek członkowskich o 50% mogą występować Diagnosty, którzy na mocy decyzji ZUS uzyskali prawo do emerytury, świadczeń przedemerytalnych lub renty, w tym inwalidzkiej - (paragraf 2).

Decyzje w sprawach wymienionych w paragrafie 1 ust. 1, 2 i 3 oraz w paragrafie 2 przedmiotowej uchwały KRDL podejmuje Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych na pisemny wniosek diagnostów. Zainteresowane osoby powinny przysłać do Biura KIDL pisemne wnioski wraz z właściwymi dokumentami (np.: decyzja PUP, zaświadczenie o urlopie wychowawczym, umowa wolontariatu, decyzje ZUS w sprawach emerytalno - rentowych, itp.).

**Zwracamy jednocześnie uwagę Sz. Państwa, że jedynie rozpatrywane są wnioski tych PT Diagnostów Laboratoryjnych, którzy posiadają uregulowane zobowiązania finansowe względem Izby. KIDL podejmuje odpowiednią decyzję, która obowiązuje od miesiąca złożenia wniosku w danej sprawie.**

Sekretarz KRDL  
Czesław Główniak

**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 liście 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 liście 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.

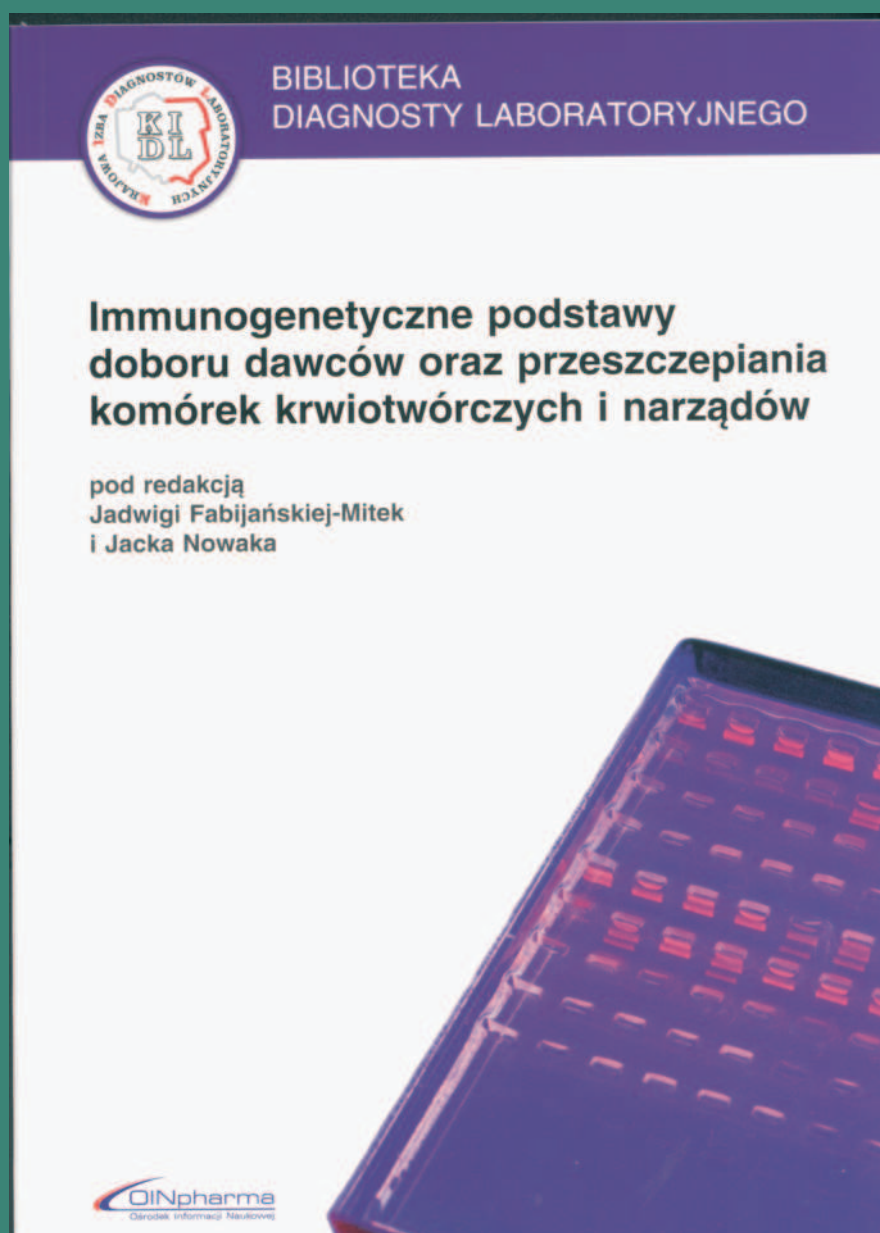
Zwracamy również uwagę, że dokument “Prawo Wykonywania Zawodu Diagnosty Laboratoryjnego” **nie zostanie wystawiony i nie będzie wysłany** tym diagnostom laboratoryjnym, którzy:

- posiadają braki w dokumentacji,
- zalegają z płatnościami 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.**

**Ukazała się kolejna książka z serii  
Biblioteka Diagnostyki Laboratoryjnej  
“Immunogenetyczne podstawy doboru dawców  
oraz przeszczepiania  
komórek krwiotwórczych i narządów”  
pod redakcją Jadwigi Fabijańskiej-Mitek i Jacka  
Nowaka**



**Zamówienia należy kierować :**

**OINPHARMA Sp. z o.o. ul. Prosta 69, 00-838 Warszawa tel:  
(022) 578 00 01, 578 00 12 fax: (022) 632 25 82  
[biuro@oinpharma.pl](mailto:biuro@oinpharma.pl), [www.oinpharma.pl](http://www.oinpharma.pl)**