

Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych

Rok 4, numer 1 (9)
Kwiecień 2006

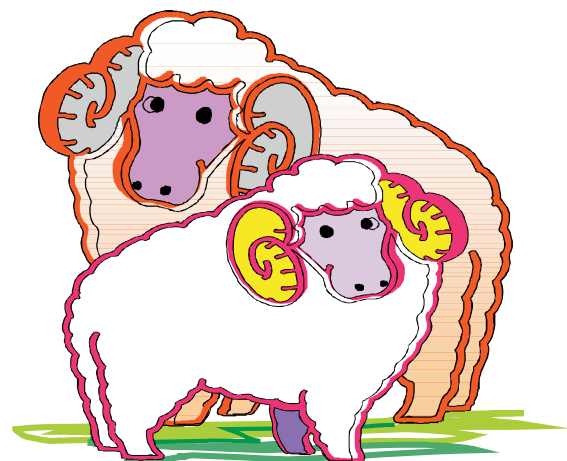
Diagnosta Laboratoryjny

GAZETA KRAJOWEJ IZBY
DIAGNOSTÓW LABORATORYJNYCH

GAZETA
BEZPŁATNA



**Nadzwyczajny
Krajowy Zjazd
Diagnostów
Laboratoryjnych
Warszawa
13 stycznia 2006 r.**



Zbliżające się Święta Wielkanocne skłaniają wszystkich do życzeń, a Diagnostom Laboratoryjnym należą się ze szczególnych względów, gdyż jak wielu w naszym Kraju Ojczyźnianym, Diagnostyci pracują bez rozgłosu i bez hucznej zapowiedzi, często pomijani i nieuwzględniani przez udających sumienie obywatelskie i zaangażowanych społecznie autorów programów, artykułów, redaktorów pism medycznych. Życzyć wypada, aby najbliższy rok w mediach i artykułach pism medycznych znalazły się treści o znaczącym i poczesnym miejscu wśród świadczeń medycznych badań i wyników diagnostyki laboratoryjnej, także o diagnostach laboratoryjnych. Aby badania te, stały się autentycznie źródłem oszczędności wydawanych kwot na leki, tak przez pacjentów, jak i ze środków publicznych; aby pacjenci mieli pełne prawo i dostęp do badań i wyników laboratoryjnych, aby środowiska współtworzące diagnozę i terapię miały zrozumienie dla troski o zdrowie pacjenta, że **nie ma innej drogi rozpoznania patofizjologii, jak tylko poprzez profesjonalną diagnostykę laboratoryjną**. Życzę diagnostom wytrwałości i skuteczności w osiąganiu tych celów, aby nadzieja która się wiąże z nadchodzącą wiosną była twórcza i wyzwalała potencjał w każdym z nas. Życzymy radosnych pogodnych dni świątecznych. Życzymy także sukcesu w życiu zawodowym i stabilności w życiu rodzinnym i osobistym. Życzymy zmian, których oczekujemy i które przynieść mogłyby społeczności diagnostów wydatną poprawę bytu i warunków pracy. Życzymy stałości pracy i godziwych warunków wynagrodzenia. Życzymy szczególnej opatrności Niebios i Zmartwychwstałego Pana.

Redakcja Gazety „Diagnosta Laboratoryjny”



**Szanowni Państwo;
Diagności
Laboratoryjni!**

Od wielu miesięcy noszę w sercu zamiar zwrócenia się listem do Was Diagności Laboratoryjni, którzy od lat wspieraliście to co jednym wydawało się mrzonką, innym zamiarami nie do zrealizowania, a jednak stajemy dziś mając za sobą opracowany i uchwalony kodeks etyki diagnosty laboratoryjnego, obok wielu znaczących punktów na mapie osiągnąć w drodze do uznania naszego zawodu za partnera świadczeń zdrowotnych.

Dziś, zdaje sobie sprawę z tego, że bez Waszego czynnego wsparcia i częstego nawet Waszego wzburzenia i niezadowolonia, nie starczyłoby mi sił ani wytrwałości, by wspólnie osiągnąć prawa dla Was, do specjalizacji w 12 kategoriach, i możliwości przeprowadzania świadczeń w zakresie diagnostyki w oparciu o ustawę i regulujące nimi rozporządzenia. Nie mam jeszcze na dzień dzisiejszy poczucia, że wszystko zostało wykonane, co służyć będzie pacjentom w trosce o ich zdrowie i ich życie, a Wam Diagności poprawiłoby standard życia i psychiczny komfort. Dla wielu z Was otwarcie możliwości ku specjalizacji ograniczone jest materialnymi trudnościami. To też, w najbliższym czasie obok programowego działania Izby zmierzającego do dalszej prawnej regulacji ustawy o diagnostyce, nie spoczne i nie odetchnę, aż nie będą Wam zabezpieczone do granic możliwości ułatwienia na drodze do specjalizacji.

Jest kilka pozytywnych faktów, na które chciałbym zwrócić uwagę. Wśród tych, to Wasze nadzieje, i oczekiwania, kierowane do Izby, że zostaną podjęte starania o właściwe wynagrodzenia dla diagnostów laboratoryjnych; oraz fakty kolejne, że pomimo, iż diagności tworząc samorząd mieszkają w różnych miejscach na całym terenie Polski, nie przeżywają ani nie odczuwają różnic regionalnych ani też, że nie

mają kompleksów względem ośrodków medycznych, i z tych, i z odległych skupisk wiejskich czy obsługujących ludność miejską. Tworząc rodzinę Diagnostów Laboratoryjnych jesteśmy reprezentantami diagnostyki polskiej. Nie dzieli nas, ani różnicują województwa czy regiony Polski. Mamy własną Krajową Korporację Zawodu Diagnosty Laboratoryjnego, mamy własną Izbę, własny Samorząd Diagnostów Laboratoryjnych.

Czuje się dumny, że przyszło mi być pierwszym prezesem Naszej Korporacji, czuję się dumny, że dzisiejsza diagnostyka ma do zaoferowania w ramach świadczeń zdrowotnych rzetelność badań laboratoryjnych opartych na wysokiej klasie jakości aparatury laboratoryjnej i profesjonalizmie wykonawców, przez co stają się badanie te: diagnostyczne i prognostyczne. Czuje się i jestem zafascynowany Wami, Diagności Laboratoryjni, że nie wygłaszacie w mediach, że praca i służba Wasza ma wymiary, które decydują o czymś życiu i zdrowiu, losie badanego i kierunku leczenia; że nie skarżycie się publicznie. Nie jesteśmy nosicielami i zarzewiem buntu, i nie tworzymy koterii finansowej w służbie zdrowia, Jesteście dumą Służby Zdrowia, że pracujecie jak pszczołki, chociaż wielu innych głośniejszych jest od Was, brzęcząc i bucząc o swojej wielkości i doniosłości, i należnych im apanaży. Nie jesteście pierwszymi do orderów, ani do zaszczytów. Nie rozgłaszamy tego a jednak pracujemy. Podejmujecie specjalizacje wbrew finansowym niedoborom i braku ułatwień, które dane są innym. Ale nierówności te: społeczne, prawne, obywatelskie niezgodne z Konstytucją RP staną się przedmiotem usilnych starań waszej Korporacji, by wstrząsnąć tymi co tworzą prawo i regulują finansowaniem. Jestem po stokroć dumny i zaszczycony, że mogę czuć się Prezesem, tak znakomitego Towarzystwa, o tak wysokiej kulturze i najwyższym poziomie edukacji zawodowej.

Prezes
Krajowej Rady
Diagnostów Laboratoryjnych

Henryk Owczarek

W NUMERZE	
Etyka i deontologia diagnosty laboratoryjnego	4-5
List do redakcji.	6
Diagnostyka laboratoryjna i patobiochemia choroby Alzheimera	7-9
Odpowiedź na artykuł zamieszczony w miesięczniku Med.-info.	10-11
Zarządzanie medycznym laboratorium diagnostycznym w aspekcie ekonomiczno finansowym	12
Informacja dotycząca Prawa wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego	13
Etiologia powstawania wysięków i przesieków	14-15

W biuletynie:

- Uchwały XIII posiedzenia KRDL
- Opinie prawne
- Notatka dotycząca ceny badań w SPZOZ i NZOZ

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

www.kidl.org.pl e-mail: biuro@kidl.org.pl

WYDAWCA
Krajowa Rada
Diagnostów Laboratoryjnych
Redakcja:

Henryk Owczarek - Prezes KRDL
Czesław Główniak - Sekretarz KRDL
Stanisław Krężel - Red. Naczelny
Tomasz Dryl - Red. Techniczny
Grzegorz Szych - Konsultacja Tech.
Nakład 10 000 + 500 egz.
Druk: Drukarnia A-Z Andrzej Zieliński
03-741 Warszawa ul. Białostocka 42

Złoty wiek mikrobiologii obejmował koniec XIX wieku i początek XX, kiedy to poznawano poszczególne drobnoustroje odpowiedzialne za swoiste choroby zakaźne. Rozwój wiedzy mikrobiologicznej inspirował badania w zakresie immunologii zakaźnej, rozwoju diagnostyki mikrobiologicznej, profilaktyki swoistej obejmującej szczepienia i antybiotykoterapię. Koniec XX wieku i początek XXI jest określany jako złoty wiek mikrobiologii molekularnej, genetyki i biologii komórki na poziomie molekularnych interakcji patogen-gospodarz (1).

Pierwszym genomem bakteryjnym, który został w pełni zsekwencjonowany, skatalogowany i opublikowany przez Fleischmanna w 1995 roku, był genom *Haemophilus influenzae*. Od tego okresu zostały poznane w pełni genomy około 100 szczepów różnych gatunków drobnoustrojów i około 150 jest na różnych etapach kompletowania. Wśród 35 zsekwencjonowanych gatunków bakterii chorobotwórczych znajdują się różne szczepy gatunków *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* i *Streptococcus pyogenes* (2).

Głównym bodźcem do poznania sekwencji pełnego genomu organizmów jest uzyskanie lepszego zrozumienia biologii i ewolucji drobnoustrojów, określenie regionów swoistych dla identyfikacji drobnoustrojów poprzez odpowiednie sondy diagnostyczne, określenie genów wirulencji, nowych skutecznych genów dla szczepionek i miejsc docelowych dla antybiotyków.

Szerokie spektrum zastosowań osiągnięć mikrobiologii molekularnej obejmuje zastosowanie w diagnostyce mikrobiologicznej (3), epidemiologii (4), inżynierii genetycznej (5), do opracowania nowych skutecznych szczepionek, w tym szczepionek DNA (6) oraz badania na poziomie molekularnym interakcji patogen-gospodarz.

Po krótkim przeglądzie osiągnięć molekularnych i zastosowań w wymienionych obszarach mikrobiologii zostaną przedstawione, jako główny temat, zastosowania technik molekularnych w diagnostyce mikrobiologicznej, wskazania do stosowania metod biologii molekularnej, problemy związane z interpretacją wyników, czułość i swoistość metod oraz konieczność walidacji diagnostycznych technik molekularnych.

Poszczególne artykuły prezentowane w postaci niniejszego cyklu są prezentacją stosowanych metod w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Akademii Medycznej

w Lublinie i obejmują główny zakres zastosowań metod biologii molekularnej w różnych aspektach mikrobiologicznej diagnostyki molekularnej. Między innymi zostanie omówione zastosowanie metod biologii molekularnej do identyfikacji drobnoustroju w bezpośrednim materiale klinicznym lub identyfikacji izolatu po hodowli w zakresie gatunku i szczepu, określenie obecności genów warunkujących oporność na antybiotyki oraz identyfikację genów warunkujących syntezę czynników wirulencji. Celowość stosowanych metod zostanie omówiona w aspekcie podstawowych problemów/niedoskonałości w klasycznej diagnostyce mikrobiologicznej. W badaniach epidemiologicznych metody molekularne obejmują zarówno metody diagnostyczne służące do identyfikacji gatunku, jak i typowania szczepów. Badane są źródła i drogi szerzenia się drobnoustrojów oraz możliwości przekazywania informacji genetycznych, występowanie pewnych genotypów i skutki mutacji. Podstawowe techniki obejmują: podstawowe metody PCR, amplifikacja 16S rRNA, hybrydyzacja, fragmentacja DNA restrykcyjną endonukleazą i badanie polimorfizmu określonych fragmentów DNA.

Dodatkowe techniki uzupełniające obejmują sekwencjonowanie i analizę genomu lub wybranych fragmentów w tym: badania obecności i sekwencji specyficznych genów, zastosowanie sond wielonukleotydowych, metody badające pełny genom, analiza plazmidów, wielopunktowe typowanie sekwencji. W przypadku badania wirusów wykorzystane są dodatkowo techniki PCR z zastosowaniem odwrotnej transkryptazy.

Inżynieria genetyczna - biotechnologie rekombinowanych białek

Stosując metody transdukcji i rekombinacji opracowano możliwości wprowadzania fragmentu obcego DNA do bakterii. Kontrolowane wprowadzenie określonego nowego materiału genetycznego do bakterii, przełamanie różnorodnych barier regulacyjnych, zmusza je do syntezy określonych białek. Najczęstsze wykorzystanie technik rekombinacji służy do produkcji ludzkich hormonów, cytokin, interferonu, białek służących jako antygeny w szczepionkach. Główne produkty uzyskane poprzez biotechnologię to insulina stosowana w leczeniu cukrzycy, ludzki hormon wzrostu, erytropoetyna w leczeniu anemii, interleukiny, interferon w leczeniu zaburzeń immunologicznych oraz rekombinowane szczepionki wirusowe i bakteryjne.

Zastosowanie mikrobiologii molekularnej w szczepieniach

Klonowanie genów, zarówno bakteryjnych

jak i wirusowych, pozwala na uzyskanie bezpiecznych szczepionek o dużej skuteczności, które są produktami wybranych genów lub wręcz określonymi fragmentami DNA. Szczepionki DNA, nad którymi prowadzone są intensywne badania, wydają się nieść rozwiązania dotychczasowych problemów. Są one bakteryjnymi plazmidami, które kodują białkowe antygeny. Po iniekcji do gospodarza, plazmid powoduje ekspresję białek antygenowych bezpośrednio w komórkach, do których został włączony na drodze transdukcji, przez co odpowiedź immunologiczna przeciwko temu antygenowi następuje bezpośrednio i jest kontynuowana. Szczepionki DNA dostarczają zatem raczej genu niż antygeny lub patogenu, stosując te same plazmidy zaangażowane w produkcję rekombinowanych białek. Również w przypadku szczepionek wirusowych nukleotydowa sekwencja (DNA lub RNA) może być sklonowana, replikowana i wprowadzona przez odpowiedni wektor do organizmu człowieka, aby kodować potencjalnie nieograniczone ilości odpowiednich białek. Takie szczepionki w badaniach na zwierzętach są podawane jako bezpośrednia zawiesina w soli poprzez iniekcję lub po precypitacji z cząstkami złota podawane są bezpośrednio do tkanek.

Następne możliwości kojarzone w przyszłości z molekularnymi technikami wiążą się z zsekwencjonowaniem genomu niektórych wirusów oraz *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium lepre* i pasożytem wywołującym malarię *Plasmodium falciparum*, przeciw którym ciągle brak jest skutecznej szczepionki. Pozwoliłoby to na skatologowanie genów wirulencji i białek o najwyższej immunogenności. Nie ma również szczepionki przeciw powszechnie występującym zakażeniom wywołanym przez *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pyogenes*, oczekiwania wiążą się z odpowiednimi osiągnięciami genomiki i proteomiki.

Zastosowanie osiągnięć biologii molekularnej zmierza również do określenia najważniejszych genów i ich wybranych sekwencji ORFs (open reading frames). W przypadku poszukiwań nowej skutecznej szczepionki przeciwko *N. meningitidis* i *S. pneumoniae* sekwencja pełnego genomu została poddana analizie celem identyfikacji ORFs kodujących białka różnych czynników zjadliwości, jak i o wysokim stopniu immunogenności.

Interakcje patogen-gospodarz

Poznanie sekwencji zarówno bakteryjnego, jak i ludzkiego genomu może być zastosowane w biotechnologii i rearanżacji

genów celem określenia całkowitego wpływu ekspresji i transkrypcji genów patogenów na komórki gospodarza.

Genetyczna determinacja reakcji obronnych człowieka dotyczy zarówno odporności nieswoistej oraz swoistej humoralnej (przeciwciała) oraz komórkowej (uczulone limfocyty, makrofagi i system cytokin oraz chemokin).

Jednym z naturalnych pierwotnych mechanizmów obronnych rozpoznających drobnoustroje jest system Toll-like receptorów. Liczne genetyczne defekty wpływają na funkcję tych receptorów i są związane z nawracającymi lub ciężko przebiegającymi infekcjami. Mogą to być defekty genów związanych z przekazywaniem wewnątrzkomórkowego sygnału aktywacji NF-kappa lub genów syntezy TNF, w tym polimorfizm genu TNF.

Różnorodne zmiany i ekspresja genów decydujących o powstawaniu przeciwciał, począwszy od różnicowania i dojrzewania limfocytów B, indukcji syntezy przeciwciał, ich klas i swoistości, decydują o skuteczności odpowiedzi na szczepienia oraz infekcje.

Zastosowanie metod biologii molekularnej w diagnostyce mikrobiologicznej

Diagnostyka mikrobiologiczna obejmuje następujące główne zadania: izolacja i identyfikacja patogenu, określenie czynników wirulencji i lekowrażliwości. Rozwój metod molekularnych traktujemy jako alternatywne w następujących sytuacjach:

- ◆ Gdy wzrost na podłożach jest powolny lub bakterie są bardzo wymagające, albo nie dają się hodować na pożywkach sztucznych

- ◆ drobnoustroje rosną wolno i są mało zróżnicowane

- ◆ hodowla drobnoustrojów stanowi zagrożenie dla personelu

- ◆ brak swoistych metod do różnicowania drobnoustrojów

- ◆ istnieje potrzeba określenia rozprzestrzeniania się infekcji (np. wirusowej)

Najczęściej stosowane metody molekularne w diagnostyce mikrobiologicznej są modyfikacją podstawowych technik jak hybrydyzacja, która jest najstarszą techniką i technika PCR.

Hybrydyzacja opiera się na podstawowej zależności komplementarności zasad kwasów nukleinowych; cytozyna tworzy podstawową parę z guaniną, a adenina z tyminą lub uracylem w RNA. Pojedyncza nić uzyskanego z próbki klinicznej DNA jest eksponowana do reakcji wiązania z pojedynczą nicią znakowanego, odpowiedniego fragmentu DNA sondy. Modyfikacje metody obejmują różnorodne wiązanie sondy do fazy stałej jak błony

nitrocelulozowe, magnetyczne kulki lub inne modyfikacje. Sondy mogą być znakowane w różnorodny sposób jak radioaktywne izotopy, substraty antygenowe, enzymy lub składniki reakcji chemiluminescencji.

Diagnostyczne możliwości na bazie reakcji PCR zostały stworzone i opublikowane przez Saiki w 1988 po zastosowaniu termostabilnej polimerazy DNA (Taq DNA polymerase) uzyskanej z *Thermus aquaticus*, a następnie dzięki automatyzowaniu syntezy oligonukleotydów (7).

Podstawowe techniki PCR obejmują identyfikację określonych fragmentów DNA kodujących rRNA. Ponieważ jest to fragment DNA występujący we wszystkich żywych organizmach jest uważany za uniwersalny. Występuje w postaci licznych kopii, co sprawia, że ich detekcja jest stosunkowo łatwa i składają się z regionów konserwatywnych, zmiennych i wysoce zmiennych, co pozwala na wysoki stopień oznaczenia specyficzności drobnoustroju. Są poza tym istotne dla przeżycia i mogą być zastosowane jako molekularny zegar do badań filogenetycznych.

PCR pozwala na selektywną amplifikację wybranych regionów DNA i obejmuje podstawowe powtarzane wielokrotnie następujące etapy:

- izolację DNA (materiał bezpośredni lub drobnoustroje z hodowli)

- denaturację DNA (temp. 92^o - 96^o C)

- dołączanie specyficznych starterów, które inicjują reakcję przyłączania nukleotydów i występują tylko u wybranego patogenu; może to być sekwencja określająca unikatową toksynę (37^o-72^oC) (startery-krótkie sekwencje oligonukleotydów komplementarna dla zdefiniowanych sekwencji matrycowego DNA).

- wydłużanie łańcucha DNA przyłączonego do startera przez termostabilną polimerazę. Warunki muszą być odpowiednio dobrane (72^oC) przez dołączanie kolejnych dezoksyrybonukleotydów (dNTP), proces jest katalizowany przez polimerazę Taq.

Amplifikacja obejmuje około 35-40 cykli przeprowadzonych w termocyklerze.

- detekcja produktów amplifikacji z zastosowaniem różnorodnych metod:

- ◆ elektroforeza produktów w żelu agarozowym produkt PCR jest określonej długości w sensie liczby nukleotydów, może być łatwo zdefiniowany w elektroforezie jako prążek o określonej lokalizacji w żelu.

- ◆ hybrydyzacja wykorzystuje komplementarność zasad budujących kwasy nukleinowe. Badane DNA denaturowane do postaci jednoniciowej i jest wiązane przez jednoniciową sondę o homologicznej sekwencji odpowiednio związaną z fazą

stałą i znakowane izotopami, enzymami lub chemiluminescencją.

Zastosowania technik PCR:

- ◆ Najczęściej stosowane techniki PCR służą do stwierdzenia, czy interesująca nas sekwencja nukleotydowa poszukiwanego patogenu jest obecna w badanej próbce lub nie.

- ◆ PCR można stosować do skopiowania określonego amplikonu w celu stwierdzenia lub sprawdzenia jego sekwencji nukleotydowej.

- ◆ Może mieć zastosowanie w badaniu sekwencji nukleotydów techniką „genetyczny odcisk palca”

- ◆ Produkty PCR mogą służyć jako sondy

- ◆ Technika PCR jest przydatna w badaniach klasyfikacyjno-taksonomicznych

- ◆ Techniki PCR z użyciem sond o szerokim zakresie występowania są stosowane do badań przeglądowych dotyczących różnorodności gatunków w próbkach środowiskowych.

W poszukiwaniu i identyfikacji patogenu metodami molekularnymi istnieje potrzeba określenia odpowiednich postulatów analogicznych do postulatów Kocha (8).

Celem przypomnienia, przedstawiam postulaty R. Kocha określające warunki pozwalające na stwierdzenie zależności między gatunkiem chorobotwórczego drobnoustroju, a powstałą chorobą:

1. Mikroorganizm musi być obecny we wszystkich przypadkach choroby i nieobecny u zdrowych osobników,

2. Poszukiwany drobnoustrój musi być izolowany i wyhodowany w czystej hodowli,

3. Ta sama choroba musi powstać, gdy wyizolowany drobnoustrój zostanie podany zdrowemu osobnikowi,

4. Ten sam drobnoustrój musi być izolowany ponownie od zakażonego czystą hodowlą osobnika.

W większości przypadków następujące kryteria brane są jako docelowe w określeniu patogenu za pomocą badań molekularnych.

- sekwencje DNA zawierające geny dla rRNA, które dla danego gatunku są swoiste i jednoznaczne

- sekwencje DNA zawierające określony gen dla toksyczności lub innych czynników patogennych,,

- określone sekwencje DNA swoistych antygenów,

- specyficzne sekwencje plazmidowego DNA,

- małe sekwencje niekodujące, najbardziej specyficzne dla danego gatunku. Pomimo istotnych zalet podkreślających, że metody molekularne pozwalają na szybką i czułą detekcję czynników infekcyjnych oraz ilościowe określenie patogenu, jak

w przypadku wirusa HIV-1 dla monitorowania leczenia lub przebiegu choroby, występują pewne ograniczenia i dezinformacje; dotyczą one różnych aspektów:

► W metodach „in-house”, które są najtańsze i często stosowane do celów diagnostycznych, występują trudności w porównywalności między laboratoriami co do stosowanych metod, wybranych fragmentów charakterystycznych dla danego patogenu oraz czułości i swoistości metody. Podkreśla się konieczność zewnętrznych kontroli. Ważnym jest doświadczenie personelu, jednak dla stosowania testów w rutynowej diagnostyce istnieje potrzeba opracowania warunków, które muszą być spełnione zgodnie z wymogami systemu jakości (9).

W szczególności dotyczy to spełnienia następujących warunków:

- Brak uniwersalnych standardów odnośnie:
 - ♦ walidacji metod
 - ♦ kontroli jakości badań w aspekcie czułości i swoistości
 - ♦ możliwości weryfikacji co do określenia klinicznej czułości i specyficzności badań i pewności co do najczęściej stosowanych metod „in-house”
 - ♦ interpretacja wyników i przebieg badania wymagają ustaleń
- W większości przypadków koszt badań molekularnych jest wysoki i wymagałoby ustalenia, kto pokrywa koszt badania.
- Wybór metody w aspekcie określenia czy identyfikujemy DNA ograniczeniem wówczas jest brak możliwości stwierdzenia czy izolowane DNA pochodzi z drobnoustroju żywego czy martwego. W przypadku badania RNA ograniczeniem jest krótkotrwałość RNA do kilku minut.
- Komercyjne zestawy do molekularnych technik manualnych detekcji i identyfikacji patogenu zabezpieczają odpowiednią standaryzację metody, są łatwe w użyciu, postępowanie jest proste. Przeznaczone są do identyfikacji izolatów z hodowli lub bezpośredniej detekcji w materiale klinicznym. Intensywnie wzrasta liczba testów dla poszczególnych gatunków bakterii i wirusów.
- Automatyzacja i stosowanie nukleotydów o dużej gęstości, służących jako sondy lub chipy, zwiększa swoistość i wiarygodność wyników. Negatywną cechą badań prowadzonych w zestawach automatycznych jest konieczność wyznaczenia wysokiego poziomu linii odcinającej (border line) co wzmacnia swoistość, ale obniża czułość metody. Przykładowe testy w systemie automatycznym dopuszczone przez FDA do rutynowej diagnostyki obejmują diagnostykę *C. trachomatis*, *Gardnerella-Trichomonas-Candida*, *Mycobacterium tuberculosis*, *N. gonor-*

rheae, *Streptococcus* oraz wirusowe: HIV, HCV, CMV. Stosowane metody obejmują techniki PCR, LCR, hybrydizację i rozwijające się dynamicznie techniki real-time RCR.

Zastosowanie metod biologii molekularnej do wykrywania genów oporności na antybiotyki

Standardowe metody fenotypowe oznaczania wrażliwości na antybiotyki, tj. metoda dyfuzyjno-krażkowa i oznaczanie wartości MIC, nie zawsze umożliwiają wykrycie obecności genów nadających oporność. Z drugiej strony, obecność genu oporności na dany antybiotyk nie zawsze wyklucza zastosowanie tego leku w terapii. Gen może nie wykazywać ekspresji lub poziom ekspresji genu jest mały. W takich sytuacjach konieczne jest równoczesne wykrycie funkcjonalnego produktu genów odpowiedzialnych za oporność na dany antybiotyk. Pomimo dynamicznego rozwoju metod molekularnych nie wydaje się, aby genotypowanie zastąpiło w najbliższym czasie metody fenotypowe do badania oporności na antybiotyki. Techniki molekularne stosuje się zatem głównie na potrzeby badań epidemiologicznych lub naukowych; na potrzeby usługowe stosowane są czułe metody fenotypowe.

Badania molekularne oporności na antybiotyki wymagają bardzo dużej wiedzy, a interpretacja wyników często nie jest jednoznaczna. Oporność drobnoustrojów na poszczególne antybiotyki jest kodowana przez jeden lub kilka genów, często zgrupowanych w integronach, które są kontrolowane często przez jeden promotor. Utrata promotora lub jego siła ekspresji decydują dodatkowo o ilości produktu nadającego oporność na antybiotyki (10). Poszczególne typy oporności na antybiotyki wymagają określonych metod molekularnych, właściwych dla poszczególnych gatunków drobnoustrojów, co zostało przedstawione w poszczególnych artykułach.

Piśmiennictwo:

1. C.A. Holland, F.L. Kiechle. Point-of-care molecular diagnostic systems: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology* 2005.
2. V.L. Chan. Bacterial genomes and infectious diseases. *Fed. res.* 2003. 54:1-7
3. M.A. Pfaffer, Molecular approaches to diagnosing and managing infectious disease: practicality and costs. *Emerging Infect. Dis.* 2001. 7:1080-1040.
4. N.Zaidi, K. Konstantinov, M.Zervos. The role of molecular biology and nucleic acid technology in the study of human infection and epidemiology. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2003. 127:1098-1105.
5. F.L. Kiechle, C.A. Holland. Genomics, transcriptomics, proteomics, and numbers. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2003. 127:1089-1092.
6. E.R. Moxon. Applications of molecular microbiology to vaccinology. *Lancet* 1997. 350:1240-44.
7. Saiki R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Ehrlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
8. D. Harmsen, C. Singer, J. Rothganger et al. Diagnostics of *Neisseriaceae* and *Moraxellaceae* by ribosomal DNA

sequencing: ribosomal differentiation of medical microorganisms. *J. Clin. Microb.* 2001. 39:936-942.

9. B.A. Forbes. Introducing a molecular test into the clinical microbiology laboratory. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2003. 127:1106-1111.

10. A.C. Fluit, M.R. Visser, F.J. Schmitz. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin. Microb. Rev.* 2001. 14:836-871.

Maria Kozioł-Montenka

*Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej
Akademia Medyczna im. Profesora Feliksa
Skubiszewskiego w Lublinie*

Zastosowanie nowoczesnych technik w diagnostyce laboratoryjnej gruźlicy.

Szybkie i trafne rozpoznanie zakażenia wywołanego przez *M. tuberculosis* jest podstawowym elementem strategii zwalczania gruźlicy w Świecie. Niezwykły postęp w rozwoju diagnostyki gruźlicy, opracowanie i wprowadzenie nowych metod o wysokiej czułości i specyficzności, skracających czas uzyskania potwierdzenia bakteriologicznego przynosi wymierne korzyści w krajach rozwiniętych. Jednakże w większości regionów Świata, gdzie gruźlica jest ogromnym problemem zdrowotnym te nowoczesne aplikacje ciągle nie znajdują zastosowania. Pomimo prowadzenia walki z gruźlicą w ramach specjalnych programów, niedostatek skutecznych metod wykrywania obecności prątków w materiałach klinicznych, ich identyfikacji oraz oznaczania wrażliwości na leki powoduje, że programy te nie przynoszą one pożądanego rezultatu. Ten artykuł przedstawia nowoczesne metody mikrobiologicznej diagnostyki gruźlicy w kontekście metod konwencjonalnych oraz sugestie dotyczące ich właściwych zastosowań w poszczególnych etapach pracy laboratoryjnej.

Większość patogennych gatunków mykobakterii charakteryzuje się długim okresem wzrostu, co powoduje, że diagnostyczne procedury laboratoryjne gruźlicy trwają do 12 tygodni. Badanie mikrobiologiczne polegające na stwierdzeniu obecności prątków gruźlicy w materiale diagnostycznym (1) jest najważniejszym badaniem w rozpoznaniu gruźlicy i ma na celu stwierdzenie obecności prątków kwasoodpornych (AFB), uzyskanie czystej hodowli prątków na podłożach oraz identyfikację gatunku najszybciej jak to jest możliwe. Zalecane jest uzyskanie wyniku hodowli oraz wyniku testu lekowrażliwości w czasie 30 dni.

Bakterioskopia jest szybkim badaniem wykorzystującym cechę kwasoodporności prątków, które zabarwione fuksyną karbolkową nie ulegają odbarwieniu kwaśnym alkoholem (metoda Ziehl-Neelsena; ZN). Czas badania mikroskopowego jest krótszy przy zastosowaniu metody fluorescencyjnej z auraminą, zalecanej do stosowania jako metoda przesiewowa (2). Liczba AFB

możliwa do wykrycia tą metodą wynosi od 5000 do 10 000 komórek w 1 ml (3) materiału od chorego. Homogenizacja i zagęszczenie materiału klinicznego poprawia czułość tej metody (4). Bakterioskopia jest najszybszą metodą rozpoznawania choroby, jest badaniem prostym i tanim. Wadą metody jest jej niska czułość oraz brak możliwości odróżnienia w próbkach klinicznych pomiędzy *M. tuberculosis*, a prątkami niegruźliczymi (NTM). Możliwość takiego rozróżnienia w trakcie oceny preparatu daje metoda oparta na zastosowaniu „peptydowych kwasów nukleinowych” (PANs). PANs są to cząsteczki podobne do DNA, w których zastąpiono szkielet cukrowo-fosforanowy podobnym peptydowym. Połączenie PAN i DNA/RNA odbywa się zgodnie ze specyficzną sekwencją nukleotydową, powiązanie jest jednak mocniejsze niż pomiędzy DNA-DNA. Hydrofobowy charakter molekuł PANs ułatwia im łatwiejsze przechodzenie przez ścianę komórkową i w odpowiednich warunkach połączenie się ze specyficzną sekwencją kwasu nukleinowego. PANs są znakowane barwnikami fluoroscencyjnymi umożliwiającymi wizualizację reakcji w mikroskopie (5).

Bakterie z rodzaju *Mycobacterium* wymagają do wzrostu pożywek wzbogaconych białkiem zwierzęcym. W latach 30 Lowenstein i Jensen wprowadzili stałą pożywkę wzbogaconą jajami kurzymi, która została uznana za optymalną i jest używana w laboratoriach na całym świecie. Hodowla szczepu *M. tuberculosis* na pożywce Lowenstein-Jensena (LJ) stanowi „złoty standard” w potwierdzeniu procesu chorobowego w gruźlicy.

Automatyczne i półautomatyczne systemy do hodowli prątków na pożywkach płynnych umożliwiają uzyskanie wcześniejszego potwierdzenia wzrostu bakterii. Pierwszym tego typu systemem był Bactec 460TB (Becton-Dickinson), w którym hodowlę prątków zakłada się w płynnej pożywce Middlebrooka 7H12 zawierającej jako substrat wzrostowy kwas palmitynowy znakowany ¹⁴C. W czasie wzrostu prątki zużywają radioaktywny substrat i wydają go w postaci ¹⁴CO₂. Radioaktywność w aparacie Bactec mierzona jest w skali od 000 do 999. Przyrost ilości wydalanego ¹⁴CO₂ w czasie hodowli świadczy o namnażaniu się prątków i jest określany jako indeks wzrostu (6). System MB/Bact (Organon Technika) jest w pełni zautomatyzowanym komputerowym systemem kolorymetrycznym do wykrywania AFB. Hodowlę zakłada się w butelkach inkubacyjnych zawierających 10ml płynnej

pożywki Middlebrooka 7H9 z mieszaniną gazów CO₂, N₂ i O₂. Butelka opatrzona kodem paskowym zostaje umieszczona w cieplarni, w miejscu wyznaczonym przez komputer. W czasie wzrostu prątków, zwiększone stężenie dwutlenku węgla powoduje zmianę zabarwienia umieszczonego na dnie butelki wskaźnika kolorymetrycznego. Pomiar zmiany zabarwienia jest wykonywany i rejestrowany automatycznie. Komputer stale monitoruje system hodowli i graficznie prezentuje intensywność wzrostu prątków w założonych hodowlach (7). Uzyskanie pozytywnego wyniku hodowli na pożywkach płynnych w systemie Bactec lub MB/BacT jest możliwe w czasie od 7 dni do 4 tygodni. Ze względu na długi okres wzrostu większości patogennych gatunków mykobakterii poszukiwano szybkich metod molekularnych do bezpośredniej identyfikacji AFB w materiałach klinicznych. Kryteria te spełniają testy oparte na amplifikacji kwasów nukleinowych (NAAs) a zwłaszcza PCR. Łańcuchową reakcję polimerazy zastosowano do detekcji *M. tuberculosis* w rok po ukazaniu się pierwszych opisów tej metody (8). Mimo że specyficznosc pojedynczej reakcji amplifikacji jest wysoka, czułość reakcji pozostaje na poziomie hodowli na podłożach.

Wprowadzenie nested PCR, w którym produkt z pierwszej reakcji jest reamplifikowany w drugiej pozwala na wykrycie jednego lub kilku organizmów w badanej próbce.

Wśród szerokiego panelu alternatywnych technik amplifikacji kwasów nukleinowych, tylko niektóre zostały zatwierdzone przez FDA (Food and Drug Administration), są to Amplicor (Roche) i AMTD (Gen Probe) (9, 10). Amplicor służy do bezpośredniej detekcji *M. tuberculosis* na poziomie molekularnym, PCR powiela fragment genu 16S rRNA w ten sposób, że pojedyncza molekula kwas nukleinowego może być wykryta w obecności milionów innych molekuł DNA. Wynikiem reakcji produktu amplifikacji z sondą genetyczną jest barwny precipitat a wynik odczytywany jest fotometrycznie. Ochronie przed kontaminacją służy system AmpErase (enzym N-glikozylaza uracylu), który, jest częścią procesu amplifikacji i nie wymaga żadnych dodatkowych czynności. Zapobieganie wynikom fałszywie negatywnym umożliwia internal control (IC). IC jest wprowadzana do każdej reakcji amplifikacji i amplifikowana razem z badaną próbą. Zapewnia to indywidualne monitorowanie każdego pacjenta i daje pewność, że rezultat jest negatywny, a nie fałszywie ujemny z powodu zahamowania reakcji amplifikacji. Czułość

testu dla materiałów z górnych dróg oddechowych wynosi 79,4-91,1%, dla materiałów ujemnych w bakterioskopii czułość testu jest niższa i wynosi 40,0-73,1%. FDA zaleca stosowanie testu do detekcji *M. tuberculosis* w AFB dodatnich materiałach klinicznych pobranych od chorych z podejrzeniem TB płuc (9).

W zestawie AMTD (Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test) mykobakteryjny RNA uwalniany jest z komórek przez sonifikację, następnie wykonywana jest amplifikacja fragmentów genomu badanych bakterii oparta na technologii TMA (transcription mediated amplification - amplifikacja przez odwrotną transkrypcję). W szeregu reakcji zachodzących w stałej temperaturze powstają biliony kopii fragmentu RNA prątka. W kolejnym etapie wykrywane są namnożone wcześniej fragmenty RNA. Do detekcji wykorzystana jest hybrydyzacja zamplifikowanego RNA z sondami wyznakowanymi barwnikiem - estrem akrydyny. Gdy sonda nie hybryduje barwnik ulega hydrolizie, co powoduje eliminację sygnału tła. Pomiar sygnału świetlnego emitowanego przez wyznakowaną sondę, po hybrydyzacji z produktem amplifikacji odbywa się w chemiluminometrycznej. Test ten wyróżnia to, że cała procedura przeprowadzona jest w jednej temperaturze i w jednej próbce co redukuje ryzyko kontaminacji. AMTD jest zaakceptowany przez FDA do detekcji *M. tuberculosis* w materiałach klinicznych AFB dodatnich i ujemnych.

Identyfikacja gatunków prątków w laboratoriach klinicznych nadal pozostaje zajęciem trudnym i czasochłonnym. Fenotypową identyfikację gatunku wykonuje się w oparciu o czas wzrostu kolonii, ich morfologię i wytwarzanie barwnika, oraz na podstawie wyników testów biochemicznych. Istniejące techniki wykorzystują do identyfikacji komórki prątków uzyskane w wyniku hodowli na podłożach. Nowoczesną techniką różnicowania prątków jest chromatografia cieczowo-wysokociśnieniowa; HPLC (11) oparta na analizie składu niewielkiej frakcji kwasów tłuszczowych określanych jako alfa-alkilobeta-hydroksy kwasy (znanych pod nazwą kwasów mikolowych), stanowiących główną komponentę ściany komórkowej prątków. Technika ta umożliwia zidentyfikowanie około 60 gatunków z rodzaju *Mycobacterium*, w tym pozwala odróżnić *M. avium* od *M. intracellulare* oraz *M. bovis* BCG od pozostałych z kompleksu *tuberculosis*.

Do określenia gatunków mykobakterii dostępne są sondy genetyczne, które zastosowane do materiałów z hodowli

w ciągu 2 godzin identyfikują najważniejsze gatunki. Sondy AccuProbe wykorzystują naturalną właściwość kwasów nukleinowych do tworzenia hybryd pomiędzy komplementarnymi łańcuchami. Dostępne są sondy dla *M. tuberculosis complex*, *M. avium*, *M. avium complex*, *M. intracellulare*, *M. gordonae*, *M. kansasii*. Metoda jest wysoce specyficzna, lecz wymaga wykonania oddzielnych testów dla poszczególnych gatunków. Sondy genetyczne znalazły szerokie zastosowanie w połączeniu z innymi technikami np. z PCR co radykalnie zwiększa ich czułość. Przykładem takiego zastosowania jest komercyjny test INNO-LiPA *Mycobacteria* v2, w którym po etapie multipleks PCR (amplifikowanym fragmentem jest ITS genu 16S rRNA) następuje hybrydyzacja produktów z 22 sondami na jednym pasku nitrocelulozy (12). Test umożliwił identyfikację kompleksu *tuberculosis* i 15 gatunków prątków z grupy NTM.

„Microarray” jest to technika opracowana w połowie lat 90-tych przez Browna i Schena. Na nośniku, którym może być szklana, silikonowa płytka (chip) lub nylonowa membrana, robot umieszcza w mikronowych odstępach nanogramowe ilości DNA zawierającego unikalne dla poszczególnych genów sekwencje. Podczas inkubacji nośnika z badanym DNA dochodzi do hybrydyzacji komplementarnych łańcuchów. Jeśli badane DNA zostanie oznakowane barwnikiem fluorescencyjnym lub izotopem radioaktywnym możliwa jest ocena jakościowa i ilościowa przeprowadzonej hybrydyzacji. Metoda „microarray” z powodzeniem jest wykorzystywana do identyfikacji gatunków mykobakterii na podstawie analizy 82 unikatowych sekwencji genu 16S rRNA.

Sekwencjonowanie DNA to technika odczytywania kolejności zasad tworzących cząsteczkę DNA uznana za „złoty standard” przy rozróżnianiu gatunków mykobakterii (13, 14).

Identyfikacja polega na porównaniu sekwencji badanego szczepu do sekwencji referencyjnej. Najczęściej używaną sekwencją jest gen kodujący 16S rRNA, który jest obecny u wszystkich gatunków bakterii i zawiera konserwatywne i zmienne regiony. Sekwencjonowanie wysoce zmiennego obszaru tego genu pozwala na identyfikację najważniejszych gatunków mykobakterii. Jednakże *M. kansasii* i *M. gastri* wykazują identyczną sekwencję tego regionu. Fragmenty genu kodującego białko 32-kDa, genu białko szoku cieplnego 65-kDa oraz ITS genu 16S-23S rRNA zwierają różnorodne sekwencje umożliwiające zróżnicowanie klinicznie ważnych gatunków mykobakterii z wyjątkiem

kompleksu *tuberculosis*.

Prątki gruźlicy charakteryzują się naturalną wrażliwością na wszystkie leki przeciwprątkowe z wyjątkiem *M. bovis*, który jest naturalnie oporny na pyrazynamid (PZA). Pojawienie się opornych szczepów *M. tuberculosis* stanowi poważne zagrożenie skutecznej walki z gruźlicą ze względu na niewielką liczbę leków stosowanych w terapii gruźlicy. Oporność prątków na jeden lub więcej leków jest wynikiem błędnych działań w leczeniu chorych. Test wrażliwości na leki wykonuje się standardowo po wyhodowaniu szczepu z rodzaju *Mycobacterium*. Podstawową lekowrażliwość oznacza się na: izoniazyd (INH), streptomycynę (SM), ryfampicynę (RMP) i etambutol (EMB).

W Polsce stosowana jest metoda stężeń absolutnych w połączeniu ze wskaźnikiem oporności, w której oporność jest wyrażona stosunkiem najniższego stężenia hamującego wzrost (MIC) szczepu od chorego, do MIC szczepu wzorcowego H37Rv. Wskaźnik oporności równy 4 lub więcej wskazuje, że szczep jest oporny na leki.

Molekularne mechanizmy oporności są w przeważającej części spowodowane mutacjami punktowymi wywołujących substytucję aminokwasu tzw. mutacje zmiany sensu. Wykryto również mutacje ciche oraz rzadziej spotykane mutacje strukturalne (niewielkie insercje lub delecje) (15).

Genetyczny mechanizm oporności prątków na rifampicynę uznana za marker MDR, jest uwarunkowany mutacjami w obrębie genu *rpoB* kodującego polimerazę RNA. Praktycznie wszystkie (96%) RIF-oporne szczepy posiadają punktowe mutacje we fragmencie długości 81bp tego genu. Mutacje te są nieobecne u szczepów RIF wrażliwych, dlatego ten fragment genu *rpoB* uznano za idealny do badań nad nowymi technikami detekcji oporności na ten podstawowy lek.

Izoniazyd jest lekiem stosowanym tylko w gruźlicy ze względu na naturalną oporność innych bakterii na ten lek. Mutacje powodujące oporność prątków na INH występują głównie w obrębie genów *katG* i *inhA*, ich obecność stwierdzono u 75-85% INH-opornych szczepów.

Okolo 65-75% szczepów *M. tuberculosis* opornych na streptomycynę posiada mutacje genu 16S rRNA, lub genu *rpsL*, który koduje białko S12.

Ponad 70% szczepów *M. tuberculosis* opornych na pyrazynamid wykazuje obecność mutacji w obrębie genu *pncA* kodującego pyrazynamidazę, enzym konwertujący pyrazynamid do formy aktywnej.

Etambutol hamuje wbudowywanie kwasów mikołowych do ściany komórkowej

prątków. U 70% szczepów prątków występują mutacje genu *embB* będące przyczyną oporności na ten lek, której następstwem jest nieskuteczność etambutolu w terapii. Molekularny test Line Probe Assay (16) wykonuje się w oparciu o amplifikację fragmentu genu *rpoB* przy zastosowaniu biotynylowanych starterów i hybrydyzację produktu PCR z sondami genetycznymi. Komercyjny test INNO-LiPA Rif.TB (17) stosuje się do szczepów *M. tuberculosis*, oraz do bezpośredniej identyfikacji i oznaczania oporności na Rif w materiałach klinicznych.

Na pasku znajduje się 5 sond dla sekwencji *rpoB* niezawierających mutacji (wild-type), 4 sondy dla specyficznych mutacji w rejonie *rpoB*, sonda dla *M. tuberculosis complex*, oraz kontrola reakcji barwnej. Kodonami w których najczęściej występują punktowe mutacje są 531 (TCG→TTG), 516 (GAC→TAC, GAC→GTG), 526 (CAC→ACC, CAC→GAC, CAC→TAC). Test znajduje zastosowanie w rutynowej diagnostyce, szczególnie do próbek klinicznych pozytywnych w bakterioskopii. Wykonanie testu zajmuje około 48 godzin.

Techniką łączącą PCR z hybrydyzacją jest DNA Microarray do jednoczesnej detekcji oporności *M. tuberculosis* na kilka leków, przykładowo do identyfikacji mutacji w obrębie genów: *katG* i *inhA* oraz *rpoB*.

Sekwencjonowanie produktów PCR (18) jest najbardziej bezpośrednią i wiarygodną metodą wykrywania mutacji znanych, jak i nowopowstałych. Jest również główną techniką używaną do wyjaśniania genetycznych mechanizmów oporności na leki. Z powodu złożoności mechanizmów oporności na niektóre leki, przykładowo na INH, metoda ta nie znalazła rutynowego zastosowania w diagnostyce gruźlicy. Obecnie dostępne molekularne metody mogą być pomocne w szybkiej detekcji mutacji powodujących oporność na leki przeciwprątkowe, jednak wyniki testów genetycznych powinny zostać potwierdzenie metodami fenotypowymi.

Analiza transmisji gruźlicy i wykrywania źródeł zakażenia wymaga możliwości porównywania szczepów *M. tuberculosis*. Jest to szczególnie ważne w związku z rozprzestrzenianiem się szczepów MDR. W tym celu stosowanych jest kilka metod molekularnych: RFLP/DNA „fingerprinting” metoda polega na detekcji specyficznych fragmentów restrykcyjnych poprzez hybrydyzację „Southern blot” ze znakowanymi sondami DNA. Różnice w wielkości fragmentów restrykcyjnych są wynikiem mutacji punktowych, delekcji lub rearanzacji w obrębie chromosomu. Analizą tą można typować wszystkie izolaty M...

tuberculosis. Specyficzność otrzymanych wzorów jest zależna od liczby kopii w genomie analizowanej sekwencji insercyjnej IS6110 (19, 20). Technika RFLP jest stosowana do śledzenia epidemii, w badaniach taksonomicznych do ustalania pokrewieństwa między gatunkami.

W przypadku dużego podobieństwa IS6110 RFLP szczepów z kompleksu tuberculosis stosuje się spoligotyping (21) - metodę której podstawą jest wykrywanie sekwencji przestrzeni pomiędzy krótkimi elementami repetytywnymi (DR) obecnymi w chromosomalnym locus DNA wyłącznie u *M. tuberculosis* complex.. Przy znanej, stałej liczbie kopii DR u szczepów wzorcowego H37Rv i *M. bovis* możliwe jest analiza porównawcza większej liczby szczepów. Metoda łączy technikę multipleks PCR z hybrydyzacją, jest stosowana do śledzenia transmisji szczepów MDR oraz odróżnienia *M. bovis* od pozostałych gatunków kompleksu tuberculosis.

Nowoczesne metody biologii molekularnej zrewolucjonizowały w ostatnich latach diagnostykę i badania epidemiologiczne gruźlicy. Szczególnie cennym osiągnięciem wydaje się błyskawiczne przejście od badań doświadczalnych do bezpośredniej diagnostyki mikrobiologicznej. Jednakże w diagnostyce gruźlicy, ze względu na specyficzny charakter choroby nie można polegać tylko na jednym, określonym schemacie uzyskania potwierdzenia bakteriologicznego procesu chorobowego. Powszechnie uznanym algorytmem jest łączenie technik tradycyjnych z nowoczesnymi w celu szybkiego wykrycia *M. tuberculosis* w materiale klinicznym, włączenie skutecznej terapii lekowej w celu odprątkowania chorego, a na skutek tego przerwanie łańcucha transmisji zakażenia.

1. Chakravarty S, Tyagi J S. Novel Multipurpose Methodology for Detection of Mycobacteria in Pulmonary and Extrapulmonary Specimens by Smear Microscopy, Culture and PCR. *J Clin Microbiol* 43(6):2702-2705, 2005;

2. Augustynowicz-Kopeć E. Źródła błędów i ich konsekwencje w diagnostyce laboratoryjnej gruźlicy. Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie, Zakopane 2002.

3. Smithwick RW. Laboratory manual for acid-fast microscopy, 2nd ed. Atlanta: Center for Disease Control. 1975

4. Charles G. Thomson, Kerry M. Maclellan, Thomas L. Brink, Denise E. Lockwood, Mark Romagnoli, June Turner, William G. Metz, Richard S. Schwalbe, Marcia Moody, Yvonne Lue, Selvin Passeni. Novel Method for Processing Respiratory Specimens for Detection of Mycobacteria by Using C18-Carboxypropylbetaine. *J Clin Microbiol* 36(7): 1996-2003, 1998

5. Stender H, Lund K, Petersen KH, et al. Fluorescence in situ hybridisation assay using peptide nucleic acid probes for differentiation between tuberculous and nontuberculous mycobacterium species in smears of mycobacterium cultures. *J Clin Microbiol* 37:2760-5, 1999

6. M. Cruciani, C. Scarpato, M. Malena, O. Bosco, G. Serpelloni, C. Mengoli. Meta-Analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without Solid Media, for Detection of Mycobacteria. *J Clin Microbiol* 42(5):2321-2325, 2004

7. F. Brunello, F. Fava, R. Fontana. Comparison of the

MB/BacT and BACTEC 460 TB Systems for Recovery of Mycobacteria from Various Clinical Specimens. *J Clin Microbiol* 37(4): 12061209, 1999

8. Brisson-Noël A, Gicquel B, Lecossier D, et al. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet* 4:106971, 1989

9. S. A. Watterson, F. A. Drobniński. Modern laboratory diagnosis of mycobacterial infections. *J Clin Pathol* 53: 727732, 2000

10. Soini H, Musser J M. Molecular Diagnosis of Mycobacteria. *Clin Chem* 47:809-814, 2001

11. Glickman SE, Kilburn JO, Butler WR, et al. Rapid identification of mycolic acid patterns of mycobacteria by high-performance liquid chromatography using pattern recognition software and a mycobacterium library. *J Clin Microbiol* 32:7405, 1994

12. Enrico Tortoli, Alessandro Mariottini, Gianna Mazzarelli. Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2. Improved Reverse Hybridization Multiple DNA Probe Assay for Mycobacterial Identification. *J Clin Microbiol* 41(9):4418-4420, 2003

13. Akos Somoskovi, Qunfeng Song, Judit Mester, Charise Tanner, Yvonne M. Hale, Linda M. Parsons, Max Salfinger. Use of Molecular Methods To Identify the Mycobacterium tuberculosis Complex (MTBC) and Other Mycobacterial Species and To Detect Rifampin Resistance in MTBC Isolates following Growth Detection with the BACTEC MGIT 960 System. *J Clin Microbiol* 41(7):2822-2826, 2003

14. Kirschner P, Böttger EC. Species identification of mycobacteria using rDNA sequencing. In: Parish T, Stoker NG, eds. Mycobacteria protocols. Totowa, New Jersey: Humana Press; 34961, 1998

15. Sajduda A, Brzostek A, Popławska M, Rstogi N, Sola C, Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z, Dziadek J, Portals F. Molecular Epidemiology of drug resistant Mycobacterium tuberculosis strains isolated from patients with pulmonary tuberculosis in Poland: a year study. *Int J Tuberc Lung Dis* 8 (12):1448-57, 2004

16. Gamboa F, Cardona P J, Mantrol J M, et al. Evaluation of a commercial probe assay for detection of rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis directly from respiratory and nonrespiratory clinical samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17:189192, 1998

17. Srivastava K, Das R, Jakhmola P, Gupta P, Chauhan DS, Sharma VD, Singh HB, Sachan AS, Katoch VM. Correlation of mutations detected by Inno-LiPA with levels of rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Indian J Med Res* 120, 8:100-105, 2004

18. Watterson SA, Wilson SM, Yates MD, Drobniński FA. Comparison of three Molecular Assays for Rapid Detection of Rifampin Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol* 7:1969-73, 1998

19. Neiman S, Sch-Gedes S, Richter E, Thielen H, Heykes-Uden H, Diehl R. Stability of IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Patterns of Mycobacterium tuberculosis Strains in Actual Chains of Transmission. *J Clin Microbiol* 38(7): 2563-2567, 2000

20. Igor Mokrousov, Olga Narvskaya, Elena Limeschenko, Anna Vyazovaya, Tatiana Otten, Boris Vyshnevskiy. Analysis of the Allelic Diversity of the Mycobacterial Interspersed Repetitive Units in Mycobacterium tuberculosis Strains of the Beijing Family. Practical Implications and Evolutionary Considerations. *J Clin Microbiol* 42(6): 24382444, 2004

21. Nicoletta Lari, Laura Rindi, Christophe Sola, Daniela Bonanni, Nalin Rastogi, Enrico Tortoli, Carlo Gatzelli. Genetic Diversity Determined on the Basis of katG463 and gyrA95 Polymorphisms, Spoligotyping, and IS6110 Typing, of Mycobacterium tuberculosis Complex Isolates from Italy. *J Clin Microbiol* 43(4):16171624, 2005

Journal of Pulmonology
Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej,
Akademia Medyczna w Lublinie

Diagnostyka laboratoryjna zakażeń *Chlamydia pneumoniae* i *Chlamydia trachomatis*

Według obecnej klasyfikacji mikrobiologicznej wszystkie chlamydie należą do rzędu Chlamydiales, który zawiera jedną rodzinę Chlamydiaceae. Do niedawna w obrębie rodziny Chlamydiaceae wyróżniano tylko jeden rodzaj Chlamydia

i zaliczano do niego wszystkie cztery znane gatunki chlamydii: *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae* i *C. pecorum*. W 1999 roku zaproponowano nową klasyfikację rodziny Chlamydiaceae i wyróżniono w niej drugi rodzaj Chlamydophila w skład którego wchodzi obecnie Chlamydophila psittaci, Chlamydophila pneumoniae oraz inne gatunki nie mające istotnego znaczenia w patogenie zakażeń u ludzi. *C. trachomatis* pozostała w rodzaju Chlamydia. Nowa klasyfikacja nie została jednak powszechnie zaakceptowana. W piśmiennictwie światowym używa się obie formy nazw gatunkowych.

Charakterystyka

Wszystkie drobnoustroje należące do rzędu Chlamydiales są bezwzględnie pasożytami wewnątrzkomórkowymi. Ze względu na brak zdolności syntezy własnego ATP ich rozwój jest możliwy tylko wewnątrz komórki gospodarza. W związku z tym są często określane jako pasożyty energetyczne. Drobnoustroje te są Gram ujemne, nie wykazują ruchu, nie posiadają mureiny w strukturze ściany komórkowej. Głównym składnikiem ściany komórkowej jest lipopolisacharyd. Charakterystyczną cechą wszystkich chlamydii jest ich unikalny dwuetapowy cykl rozwojowy. Komórki bakterii występują w dwóch formach, w postaci ciała podstawowego EB (elementary body) lub ciała siateczkowego RB (reticulate body). EB spełnia funkcję formy przetrwałej i czynnika inicjującego zakażenie. Jego zbita, zwarta struktura zapewnia komórce oporność na czynniki środowiska, umożliwia przetrwanie po lizie komórki gospodarza, a jednocześnie forma ta jest zdolna do wnikanía i zakażenia kolejnych komórek. RB posiada strukturę mniej zwartą niż EB, jest formą aktywną metabolicznie, ma zdolność syntezy DNA, RNA i białek.

Chorobotwórczość Chlamydia pneumoniae. Chlamydia pneumoniae została uznana w świecie jako bardzo częsty patogen w zakażeniach układu oddechowego u ludzi. Ocenia się, że większość populacji przechodzi 2-3 infekcje Chlamydia pneumoniae w ciągu życia. Występowanie przeciwciał dla Chlamydia pneumoniae wzrasta wraz z wiekiem i u osób dorosłych przekracza 50%. Zakażenie przenoszone jest drogą kropelkową a okres inkubacji wynosi od 2 do 4 tygodni. Najczęściej objawy kliniczne manifestują się zapaleniem płuc lub oskrzeli, zapaleniem gardła i zatok.

Większość zakażeń zarówno górnych jak i dolnych dróg oddechowych wywołanych przez ten drobnoustrój ma łagodny przebieg z charakterystycznym podostym początkiem choroby, trudnym do

Poniższą odpowiedź zamieszczamy jako sprostowanie błędnych analiz i osądów dotyczących medycznych laboratoriów diagnostycznych i udziału firmy Diagnostyka sp. z o.o. w porządkowaniu świadczeń laboratoryjnych. Dla jasności przedstawionych argumentów w załączeniu również aplikujemy artykuł który jest przedmiotem repliki.

Redakcja.

Jestem lekarzem, diagnostą laboratoryjnym i kierownikiem dużego laboratorium, wchodzącego w skład publicznej placówki ochrony zdrowia. Państwa artykuł „Rozdrobnienie wpływa na jakość” w Med-info z lutego 2006 wzbudził we mnie mieszane uczucia. Z jednej strony zadowolenie, że ktoś interesuje się tak ważną dziedziną medycyny, jaką jest diagnostyka laboratoryjna, z drugiej zaś uczucie zażenowania liczbą błędów i przekłamań w tak krótkim tekście.

Jak rozumiem, tezę Państwa artykułu było udowodnienie przewagi „jakościowej” dużych laboratoriów i firm diagnostycznych nad małymi, często rodzinnymi pracowniami działającymi w prywatnym sektorze usług medycznych, a także promowanie rozwiązań dążących do konsolidacji całego rynku diagnostyki laboratoryjnej, w tym również placówek publicznych, na drodze outsourcingu. Jest to ważny i aktualny problem, o którym można, a nawet trzeba dyskutować. Ale poważna polemika jest możliwa tylko wówczas, gdy osoby, które biorą w niej udział posiadają odpowiednią wiedzę w danym obszarze. W tej sytuacji skupię się więc wyłącznie na sprostowaniu Państwa najbardziej rażących błędów.

Po pierwsze: mylenie pojęć certyfikacja i akredytacja. Wymienione certyfikaty, „choćby certyfikaty RIQUAS” (poprawna nazwa to RIQAS) i inne, są wyłącznie certyfikatami uczestnictwa w danym programie kontroli. Takie certyfikaty otrzymują wszyscy uczestnicy programu, niezależnie od jakości wykonywanych badań. Natomiast certyfikat ISO, potwierdzający spełnianie wymagań określonej normy serii ISO 9001, również nie świadczy o jakości badań, ale o wprowadzeniu systemu zarządzania jakością w danej placówce. Według dokładnie tej samej normy można certyfikować fabrykę gwoździ, wytwórnię pudełek, szpital jako całość lub laboratorium medyczne.

Dopiero akredytacja laboratorium w Polskim Centrum Akredytacji według jednej z dwóch norm: PN-EN ISO 17025 (to jest norma międzynarodowa, a nie „badanie międzynarodowe”) lub PN-EN ISO 15189 (w tej chwili projekt do zatwierdzenia) świadczy o kompetencjach

technicznych laboratorium, czyli jakości wykonywanych badań. Innych, wymienianych przez Państwa „licznych ścieżek akredytacyjnych”, jak do tej pory, nie ma. Należy dodać, że w Polsce tak rozumiana akredytacja (wybranych procedur badawczych) posiada tylko jedno z dziewięciu wymienionych przez Państwa laboratoriów, należące obecnie do firmy Synevo Laboratoria Medcover.

Po drugie: firma Diagnostyka sp. z o.o. jest na pewno liderem na rynku pod wieloma względami, jednak wymienione przez Państwa certyfikaty uczestnictwa, które posiada firma oraz autorski system informatyczny, nie są osiągnięciami niedostępnymi dla szerokiego ogółu laboratoriów (wbrew twierdzeniom p. dyr. A. Rysia). Jak na lidera przystało, zabrakło certyfikatów uczestnictwa w takich kontrolach międzynarodowych, jak np. kontrola hematologiczna Sysmex International Quality Assurance System /SIQAS/ czy kontrola serologiczna organizowana przez firmę Johnson & Johnson przy udziale Instytutu Hematologii.

Po trzecie: przypisanie „większości z istniejących 2412 podmiotów jedynie uczestnictwa w programie Polmicro” jest nieprawdą, ponieważ program ten jest skierowany wyłącznie do laboratoriów mikrobiologicznych, które stanowią tylko niewielki procent ogólnej liczby laboratoriów medycznych w Polsce.

Po czwarte: brak w tekście informacji o programach kontroli jakości badań prowadzonych już od ponad 25 lat przez Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Laboratoryjnej w Łodzi. Pan prof. A. Brzeziński wiele pracy i starań poświęcił tworzeniu powszechnie dostępnych, bezpłatnych programów badań porównawczych oraz promowaniu standardów jakości w polskich laboratoriach medycznych. Takimi programami są „Program Powszechny” oraz „Program Centralny” prowadzone według podobnych zasad co program „Polmicro” (bezpłatny, uczestnik otrzymuje co roku zaświadczenie o jakości oznaczeń).

Po piąte: błędny jest twierdzenie, że „wydatki NFZ-u na badania diagnostyczne wykazują tendencję spadkową”. Do tej pory nie udało się KJDL przeformować bezpośredniego kontraktowania badań diagnostycznych, a tendencję spadkową wykazuje liczba badań zlecanych przez lekarzy POZ i lekarzy rodzinnych (z przyczyn wiadomych). Wyjaśniam, że NFZ nie finansuje bezpośrednio badań diagnostyki laboratoryjnej tylko procedury medyczne, których badania laboratoryjne są częścią.

Po szóste: twierdzenie, że powstanie KIDL (na mocy ustawy o diagnostyce labora-

toryjnej), miało w założeniu wpłynąć bezpośrednio na poprawę jakości badań, jest dużym uproszczeniem. Korporacja zawodowa czuwa nad realizacją podstaw prawnych wykonywania zawodu i tworzy klimat sprzyjający poprawie jakości badań, m.in. poprzez uchwalenie Kodeksu Etyki Zawodu Diagnosty Laboratoryjnego. W odpowiedzi na zarzut, że KIDL „nic nie robi” w kwestii jakości i poprawy samopoczucia dyrektorów szpitali i lekarzy, to informuję, że:

- w diagnostyce laboratoryjnej, jako jednej z niewielu dziedzin medycyny, standardy jakości są wprowadzane na drodze rozporządzenia Ministra Zdrowia (używanie sformułowanie „jednolite standardy” jest błędem językowym i w języku polskim nazywa się pleonazm),

- powstał regulamin pracy wizytatorów KIDL, którzy będą mieli prawo do kontroli i oceny wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej przez diagnostę laboratoryjnego.

Po siódme: w medycznym laboratorium diagnostycznym nie można zatrudnić personelu bez odpowiednich kwalifikacji (patrz: rozporządzenie MZ z 3 marca 2004 w sprawie wymagań, jakim powinno odpowiadać medyczne laboratorium diagnostyczne).

Jestem ciekawy czy również łączycie Państwo zwiększającą się ciągle liczbę ujawnionych błędów lekarskich z działalnością lub jej brakiem NIL.

Tomasz Sadowski

(... “

Rozdrobnienie wpływa na jakość

Nie ma jednolitych standardów oceny jakości pracy laboratoriów. Nie ma też wymagań, by certyfikaty jakości posiadać. Ale ta sytuacja ma się zmienić.

Niewątpliwie brak jednolitych standardów i wymogów stawianych laboratorium pozwala na rozwój rynku prywatnych pracowni. Warto od razu przypomnieć, że ich masowy rozwój zaczął być możliwy po 1989 roku. Wtedy wystarczał wpis do rejestru działalności gospodarczej. Impulsu dostarczył rozwój prywatnego sektora usług medycznych oraz prywatyzacja (w wyniku systemowej reformy z 1999 roku) zakładów opieki zdrowotnej, zwłaszcza jednostek ambulatoryjnych. Często były to 1-2 osobowe firmy rodzinne, działające w naprędku zaadaptowanych, nie zawsze spełniających odpowiednie warunki, pomieszczeniach. Nic dziwnego, że wiele laboratoriów nie gwarantowało wystarczającej jakości usług. Dlatego pojawiły się pierwsze próby uregulowania tego rynku.

Barierę wejścia.

Poprawić sytuację miała konieczność rejestrowania laboratoriów jako NZOZ-ów, co pociąga za sobą wymóg uzyskania zgody na działanie wydawanej przez sanepid. Wprowadzono także przepisy prawne, pozwalające na kierowanie laboratorium jedynie osobom posiadającym odpowiednie kwalifikacje (ale już nie zatrudnianemu przez tę osobę personelowi). Ostatnią, trzecią barierą miało być powstanie Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych. Miało, bo jednak sytuacji do końca nie uzdrowiło. Ciągłe dyrektorzy szpitali nie mogą być pewni jakości badań. A na porządku dziennym są sytuacje, że lekarz zastanawia się, czy powiadomić laboratorium bądź dyrektora o powstałym błędzie diagnostycznym, czy po prostu zlecić wykonanie badania jeszcze raz. **Obligatoryjna jakość.**

– Dopiero teraz przygotowywane są przez zespół wdrażania systemów jakości standardy, nakładające obligatoryjnie obowiązek uczestnictwa w polskim programie badania jakości lub innych badaniach międzynarodowych, jak np. ISO 17025 – mówi prof. Jan Kanty Kulpa, krajowy konsultant w dziedzinie diagnostyki laboratoryjnej – Ogromnym sukcesem będzie, jeżeli wszystkie laboratoria będą podlegać programowi – dodaje. Ale już dziś istnieje wiele certyfikatów i ścieżek akredytacyjnych. Należą do nich chociażby certyfikaty RIQUAS (brytyjskiego laboratorium referencyjnego Random), certyfikaty fińskiego Labquality, Urinalysis Proficiency Study firmy Bayer. Istnieją też uregulowania rodzime – Krajowy Program Kontroli Jakości prowadzony przez Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Laboratoryjnej oraz Polmicro, prowadzone przy współudziale Narodowego Instytutu Zdrowia. **Popularny, tani.**

Mimo tego zdecydowana większość z istniejących 2412 podmiotów, bo tyle liczy sobie rejestr prowadzony przez Krajową Radę Diagnostów Laboratoryjnych, zdecydowała się jedynie na uczestnictwo w zapoczątkowanym w 1994 roku programie Polmicro. Czyli Ogólnopolskim Zewnętrznym Sprawdzianem Wiarygodności Badań Mikrobiologicznych, jak brzmi pełna jego nazwa. Program obejmuje zarówno sprawdzian praktyczny jak i teoretyczny. Odbyna się corocznie i składa się z 2,3 części. W sprawdzianie praktycznym laboratorium określa wrażliwość na antybiotyki, analizuje mechanizmy lekooporności nadesłanych szczepów bakteryjnych. Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej (COBJDM), który jest organizatorem programu, posiada szczepki referencyjne oraz szczepki kontrolne

bakterii. Sprawdzian teoretyczny polega na odpowiedzi na nadesłane pytania z zakresu mikrobiologicznej diagnostyki klinicznej. Wyniki testów są poufne – otrzymują jedynie uczestniczące w sprawdzianie laboratorium. Laboratorium po pomyślnym zdaniu sprawdzianu otrzymuje specjalne pismo zaświadczenie, że pracownia uzyskała dobry wynik w Sprawdzaniu Wiarygodności Badań w Mikrobiologii. Takie zaświadczenie podnosi prestiż laboratorium. Laboratoria, które biorą udział w sprawdzianach, nie tylko potwierdzają w nich wiarygodność prowadzonych przez nie badań oraz uzyskiwanych wyników, ale i wysokie kwalifikacje pracowników. Uczestnictwo w Polmicro ułatwia uzyskanie akredytacji, a w przypadku uzyskania złych wyników – wykrycie i usunięcie nieprawidłowości. Jednak sukces jego popularności tkwi zupełnie gdzie indziej. Po pierwsze, jest to jedyny tego typu program zalecany przez Ministerstwo Zdrowia. Po drugie, i znacznie ważniejsze, jako jedyna tego typu procedura sprawdzająca, jest absolutnie bezpłatna. Dla porównania w prowadzonym przez Kolegium Medycyny Laboratoryjnej (we współpracy z fińskim Labquality) Powszecznym Programie Zewnętrznego Oceny Jakości w Medycynie Laboratoryjnej – PPZOJMED sprawdzian badania moczu (badanie ogólne oraz osadu) kosztuje 255 złotych za próbkę, posiew krwi – 520 złotych. Program dostępny jest dla każdego laboratorium i obejmuje swoim zakresem: chemię kliniczną, hematologię, koagulologię, serologię grup krwi, immunologię, toksykologię, mikrobiologię, genetykę kliniczną oraz histopatologię.

Dużo stać.

Trochę nie ma co się dziwić, że laboratoria wybierają tańsze rozwiązania. Przy stałym wzroście wydatków na leki, wydatki NFZ na badania diagnostyczne wykazują tendencję spadkową. A przecież nie tylko certyfikaty i akredytacje świadczą o jakości. Wpływa na nią przede wszystkim codzienna i pracochłonna kontrola nad procesem analitycznym: kalibracja analizatorów oraz wielopoziomowa kontrola dokładności i odtwarzalności prowadzonych na nim badań. – To najczystsze źródło oszczędności w małych laboratoriach, bo są to kosztowne procedury – mówi Wojciech Budacz, dyrektor zarządzający Synevo, spółką-córką Medicovera. Dzisiaj firma skupia dziewięć laboratoriów, ale jej ambicją jest stać się liderem na rynku. Laboratoria spółki posiadają certyfikaty jakości ISO 17025. – W dużych sieciach można pozwolić sobie na rozłożenie tych kosztów na liczbę i zakres wykonywanych badań,

dzięki czemu nadal możemy zaoferować konkurencyjne stawki – dodaje Budacz. Jednak liderem na rynku, nie tylko zresztą pod względem ilości certyfikatów i akredytacji, jest Diagnostyka sp. z o.o. Wszystkie z 20 pracowników biorą udział w zewnętrznych, krajowych i międzynarodowych programach kontroli jakości, jak RIQUAS, Labquality, Urinalysis Proficiency Study oraz w Krajowych Programach Kontroli Jakości i Polmicro. Oprócz tego mają ISO 9001:2000 – Tworzyliśmy też Laboratoryjny System Informatyczny LIS-Tech, koordynujący pracę analizatorów, pozwalający na dystrybucję wyników, zarządzanie magazynami, tworzenie bazy danych i pozwalający na zarządzanie nimi – mówi Andrzej Ryś, dyrektor ds. rozwoju firmy. – Dużo laboratorium, wykonujące duże ilości oznaczeń, jest w stanie skutecznie dbać o jakość oznaczeń. Jest tak dlatego, że jesteśmy w stanie inwestować w informatyczne systemy wspomagające dwustopniową (automatyczną i ręczną) walidację wyników. Typowe laboratorium szpitala powiatowego (jest ich około 700), które wykonuje rocznie 150-200 tysięcy badań, może jedynie pomarzyć o takich narzędziach. Podobnie z innymi mniejszymi pracowniami. Widać więc, że konsolidacja rynku, mimo sprzeciwu Krajowej Rady Diagnostyki Laboratoryjnej, może pomóc także w podniesieniu jakości usług. Dla porównania w Niemczech, mimo iż badań wykonuje się więcej, liczba pracowników diagnostycznych jest o połowę mniejsza. Tym lepiej widać, jak rozdrobniona jest polska diagnostyka. Dla obniżenia kosztów na całym świecie tworzy się duże centra diagnostyczne, u których outsourcinguje się wykonanie badań. Dużo pracowników mają większe możliwości negocjacji cen odczynników, zakupu nowych maszyn.

W Polsce mamy trzy typy pracowników.

FYP 1

Hematologia, koagulologia, analityka ogólna, biochemia
8-godzinna dostępność przez 6 dni w tygodniu.

FYP 2

Hematologia, koagulologia, analityka ogólna, biochemia, jonogramy, gazometria, immunochemia
24-godzinna dostępność przez 7 dni w tygodniu.

RRIFIŁOWE

Wąski określony profil badań specjalistycznych (np. hormony, fenotypizacja, markery onkologiczne, autoprzeciwciała) 8-godzinna dostępność przez 6 dni w tygodniu.

Autor: Agnieszka Katrynicz, Piotr Derentowicz
Źródło: Med.-Info 02.2006 “
...)

Zarządzanie medycznym laboratorium diagnostycznym w aspekcie ekonomiczno - finansowym

Zapoczątkowane w 1999 r. przez reformę opieki zdrowotnej zmiany zasad funkcjonowania służby zdrowia spowodowały początek działania konkurencyjnego rynku usług medycznych, a zmiany zasad finansowania zakładów opieki zdrowotnej wpłynęły na wzrost znaczenia jakości świadczonych usług i racjonalizacji kosztów.

Zakład opieki zdrowotnej stał się firmą, przedsiębiorstwem o humanitarnym przesłaniu, jednak ze wszystkimi elementami działalności gospodarczej wykonywanej w sposób zorganizowany z określonym miejscem i czasem świadczenia wykonywanych usług, oraz działającej w oparciu o rzetelne postawy ekonomiczne.

Zasady efektywnego zarządzania i skutecznej działalności operacyjnej dotyczą również czynnika sukcesu firmy, którym jest źródło finansowania i dyscyplina finansowa.

Wyżej wymienione zmiany dotyczą również medycznych laboratoriów diagnostycznych działających na rynku usług medycznych jako jednostki organizacyjne publicznych zakładów opieki zdrowotnej, oraz jako samodzielnie działające niepubliczne zakłady opieki zdrowotnej.

Art. 16 Ustawy z dnia 27 lipca 2001 r. o diagnostyce laboratoryjnej - wyciąg "Czynności diagnostyki laboratoryjnej przeprowadzane przez diagnostę laboratoryjnego wykonywane są w laboratorium,"

Art. 17 punkt 1 w/w Ustawy - wyciąg Laboratorium jest zakładem opieki zdrowotnej w rozumieniu Ustawy z dnia 30 sierpnia 1991 r. o zakładach opieki zdrowotnej,

Art. 17 punkt 2 w/w Ustawy Laboratorium może być także jednostką organizacyjną zakładu opieki zdrowotnej, jednostki badawczo rozwojowej albo wyższej uczelni medycznej.

Wyżej przytoczone artykuły Ustawy o diagnostyce laboratoryjnej nakazują postrzegać laboratorium diagnostyki medycznej jako jednostkę gospodarczą.

Dla skutecznego zarządzania i prawidłowego funkcjonowania jednostki gospodarczej konieczne jest dokonywanie

analizy sytuacji ekonomiczno-finansowej. Informacje dostarczane przez rachunkowość i wnikliwa obserwacja trendów zmian pozwala na wyciąganie wniosków o sytuacji firmy w przyszłości i w porę reagować na zmiany.

Głównym zadaniem rachunkowości jest stosowanie zasad, aby w sposób prawidłowy, rzetelny i jasny w sporządzonych sprawozdaniach finansowych przedstawić sytuację:

- majątkową,
- finansową,
- wynik finansowy.

Wynik finansowy jest to wyrażony w mierzalnym pieniężnym rezultacie działalności jednostki gospodarczej w danym okresie. Może on występować w postaci zysku netto lub straty.

Laboratorium diagnostyki medycznej działające na rynku usług medycznych jako Niepubliczny Zakład Opieki Zdrowotnej podlega Rozporządzeniu Ministra Finansów z dnia 26 sierpnia 2003 roku w sprawie prowadzenia podatkowej księgi przychodów i rozchodów.

Księga przychodów i rozchodów jest uproszczoną formą prowadzenia rachunkowości, może być stosowane przez tych podatników, którzy osiągają nie duże dochody i nie muszą prowadzić pełnej rachunkowości w postaci ksiąg podatkowych.

W przypadku, gdy laboratorium diagnostyki medycznej jest jednostką organizacyjną publicznego zakładu opieki zdrowotnej zasady rachunku kosztów reguluje: - artykuł 62 Ustawy z dnia 30 sierpnia 1991 r. o zakładach opieki zdrowotnej - wyciąg

" Minister Zdrowia i Opieki Społecznej określa w drodze rozporządzenia, szczególne zasady rachunku kosztów w publicznych zakładach opieki zdrowotnej."

- Rozporządzenie Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej

- z dnia 22 grudnia 1998 roku w sprawie szczególnych zasad rachunku kosztów w publicznych zakładach opieki zdrowotnej zarządza:

wyodrębnienie w strukturze organizacyjnej publicznego zakładu opieki zdrowotnej komórek organizacyjnych, które tworzą miejsca powstawania kosztów, zwane „ośrodkami kosztów”.

- Ośrodki kosztów dzieli się na:

1. ośrodki kosztów działalności podsta-

wowej,

2. ośrodki kosztów działalności pomocniczej,

3. ośrodek kosztów związanych z zarządzaniem zakładem jako całością zwanym „ośrodkiem kosztów zarządu”.

Z reguły laboratorium diagnostyki medycznej przypisane jest ośrodkowi kosztów związanym z wykonywaniem działalności wspomagającej działalność podstawową, zwanym dalej „ośrodkiem kosztów działalności pomocniczej”.

Nośnikami kosztów w ośrodku kosztów działalności pomocniczej są usługi świadczone przez ten ośrodek.

W laboratorium diagnostyki medycznej nośnikami kosztów są badania laboratoryjne.

Dlatego ważny i konieczny jest wykaz:

- wszystkich rodzajów wykonywanych badań w laboratorium diagnostyki medycznej,
- cennik badań,
- ewidencja ilościowo - rodzajowa wykonanych badań.

W laboratorium diagnostyki medycznej publicznego zakładu opieki zdrowotnej wyróżniamy dwie grupy kosztów działalności:

A) koszty bezpośrednie,

B) koszty pośrednie.

Rodzaje kosztów bezpośrednich:

1. materiały do badań diagnostycznych (reagenty, materiały odniesienia),
2. sprzęt jednorazowy do pobierania próbek do badań,
3. pozostały sprzęt laboratoryjny jednorazowy,
4. środki opatrunkowe,
5. środki dezynfekujące, czystościowe, odzież ochronna,
6. zużycie energii (elektryczna, ciepła, gaz, woda),
7. usługi (konserwacja i naprawa sprzętu, łączność, poczta, transport, utrzymanie czystości, wywóz nieczystości i utylizacja, pralnia),
8. wynagrodzenia osobowe,
9. pochodne wynagrodzeń (składki ZUS, Fundusz Pracy, odpisy na ZFŚS),
10. amortyzacja.

Koszty pośrednie rozliczane są wg ustalonych kryteriów przez Dyрекcję Publicznego Zakładu Opieki Zdrowotnej, mogą być ujmowane ze szczególnością odpowiadającą układowi rodzajowemu kosztów.

dokończenie str. 15

WAŻNA INFORMACJA DOTYCZĄCA PRAWA WYKONYWANIA ZAWODU DIAGNOSTY LABORATORYJNEGO

Biuro Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych uprzejmie informuje, że sukcesywnie wydawany jest dokument „Prawo Wykonywania Zawodu Diagnosty Laboratoryjnego”.

PRZYPOMNIENIE:

Chcąc otrzymać dokument „Prawo Wykonywania Zawodu Diagnosty Laboratoryjnego” należy:

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

Do końca czerwca 2006 r. PT Diagnosta Laboratoryjni posiadający numer wpisu na listę diagnostów od 04501 do 06000 proszeni są o dokonanie w/w wpłaty, przysłania jej kserokopii oraz uzupełnienia ewentualnych braków w dokumentacji.

PT Diagnosta Laboratoryjny we własnym interesie 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.

PROSIMY O PILNE AKTUALIZOWANIE ZMIENIONYCH ADRESÓW DO KORESPONDENCJI.

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

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

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

W przypadku dostarczenia przez diagnostę 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 NOWYM ZDJĘCIEM BĘDZIE MOŻLIWE NA PISEMNĄ PROŚBĘ I DODATKOWY KOSZT OSOBY ZAINTERESOWANEJ.

**ETIOLOGIA POWSTAWANIA
WYSIĘKÓW I PRZESIEKÓW**

Do surowiczych jam ciała zaliczamy: dwie jamy opłucnowe, jamę otrzewną i jamę osierdżiową. Wszystkie jamy ciała wyściełane są błoną surowiczą tzw. blaszką trzewną i blaszką ścienną. Błone surowiczą tworzy cienka warstwa tkanki łącznej, pokryta jedną warstwą spłaszczonych komórek tzw. komórek międzybłonka.

W warunkach fizjologicznych obie blaszki stykają się ze sobą tworząc bardzo wąską szczelinę, w której znajduje się niewielka ilość płynu. Fizjologicznie płyn niskobiałkowy z niewielką ilością limfocytów i komórek międzybłonka. Płyn jest potrzebny do zwilżania obu blaszek. Natomiast w warunkach patologicznych między blaszką trzewną i blaszką ścienną gromadzi się duża ilość płynu. W wyniku nadmiaru płynu tworzy się jama surowicza w pełnym tego słowa znaczeniu. Płyn wysiękowy może mieć charakter surowiczy, lipemiczny, krwisty lub ropny. Płyny przesiekowe w zależności od miejsca ich gromadzenia noszą nazwę:

Hydrothorax - płyn surowiczy w jamie opłucnowej,

Hydropericardium - płyn surowiczy w worku osierdżiowym,

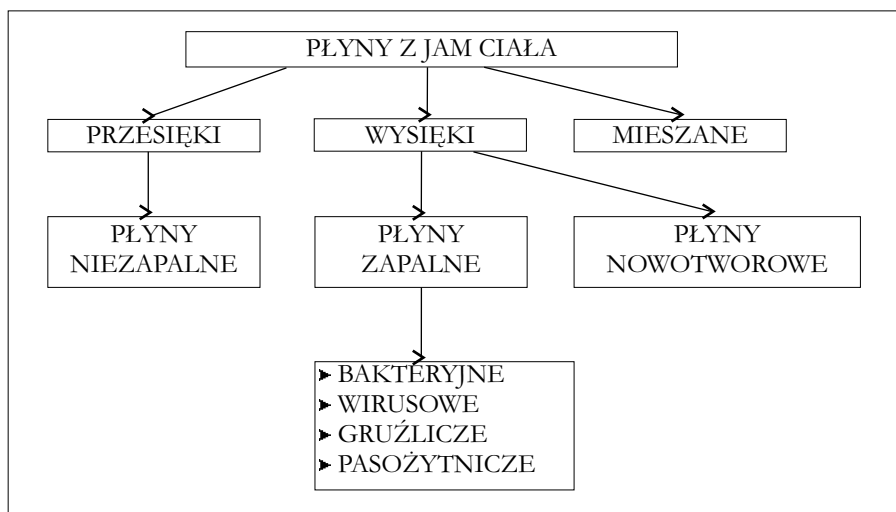
Ascites - płyn surowiczy w jamie otrzewnej (płyn puchlinowy).

RODZAJE PŁYNÓW Z JAM CIAŁA

Płyny gromadzące się w surowiczych jamach ciała mogą mieć charakter przesieku lub wysięku (Rycina 1.)

Rycina 1.

Algorytm podziału płynów z jam ciała.

**Charakterystyka płynów z jam ciała****Przesieki**

Obniżone ciśnienie onkocytne lub wysokie ciśnienie hydrostatyczne powoduje wyd-

stawanie się płynnych, niebiałkowych składników krwi z łożyska naczyniowego. Wewnątrznaczyniowy płyn pozakomórkowy tzw. osocze przesiąka przez ścianę naczyń bez ich uszkodzenia, gromadząc się w surowiczej jamie jako przesiek.

Przesieki to płyny niezapalne, przejrzyste o barwie bursztynowej. Ich cechą charakterystyczną jest niski ciężar właściwy $<1,015$ g/dl oraz niskie stężenie białka nie przekraczające 3,0 g/dl. W badaniu mikroskopowym stwierdza się:

1. nieliczne, złuszczone komórki międzybłonka
2. histiocyty tzw. makrofagi
3. pojedyncze limfocyty
4. sporadyczne granulocyty obojętno-chłonne.

Najczęstszą przyczyną powstawania przesieków jest

1. hipoproteinemia
2. hypoalbuminemia
3. niewydolność krążenia
4. niektóre wady serca
5. marskość wątroby
6. zespół nerczycowy.

Wysieki zapalne nienowotworowe

Wysieki gromadzą się w surowiczych jamach ciała na skutek uszkodzenia naczyń krwionośnych przez czynnik chorobotwórczy, uraz mechaniczny lub miażdżycę naczyń. Wysieki są to płyny zapalne o barwie ciemnożółtej, krwistej, mlecznej lub brunatne, przeważnie nieprzejrzyste, mętne z domieszką fibrynogenu i często krzepnących nici fibryny (włókniaka). W porównaniu do przesieków charakteryzują się wysokim ciężarem właściwym $>1,016$ g/dl i stężeniem białka $>3,5$ g/dl.

W badaniu mikroskopowym stwierdza się:

płyny wysiękowe charakteryzują tzw. odczyn komórkowy:

♦ Etiologia bakteryjna - płyn zapalny, cechą charakterystyczną jest odczyn granulocytowy, neutrofile pokrywają całe pole widzenia

♦ etiologia gruźlicza - charakterystyczne małe limfocyty T

♦ etiologia wirusowa - dominują głównie limfocyty B i plazmocyty

♦ etiologia alergiczna i pasożytnicza - granulocyty kwasochłonne stanowią powyżej 10% wszystkich komórek

♦ etiologia autoimmunologiczna - w obrazie cytologicznym płynu dominują monocyty i makrofagi

♦ etiologia miażdżycowa - duża przewaga makrofagów i komórek piankowatych

♦ długo zalegający wysięk lub zejściowa forma wysięku pod wpływem leczenia farmakologicznego makrofagi, przybierając formę komórek sygnietowatych

♦ wysięk krwisty - makrofagi oraz obecna w nich hemosyderyna jako pozostałość po strawionych erytrocytach (komórki żerne)

♦ wysięk z mieszanym składem komórkowym - odczyn nieswoistego podrażnienia.

Płyny nowotworowe

Nowotworowe płyny zapalne powstają najczęściej na skutek embolizacji naczyń krwionośnych. Niezależnie od sposobu inwazji komórek nowotworowych do błon surowiczych, komórki nowotworowe naciekają i wrastają do naczyń krwionośnych i limfatycznych. Rozrost nowotworowy prowadzi do zarastania naczyń i zwiększonej ich przepuszczalności, co potęguje gromadzenie się płynu w jamach surowiczych. Płyn może mieć charakter przesieku, wysięku lub płynu mieszanego, może być bogato lub ubogokomórkowy z obecnością lub bez komórek nowotworowych.

Obecność komórek nowotworowych w płynie wysiękowym w dużym stopniu zależy od szybkości tworzenia i resorpcji płynu. Komórki te pojawiają się w płynie dopiero w wyniku ich złuszczenia z nacieczonych błon surowiczych od strony jam ciała. Natomiast wczesny proces nowotworowy stymuluje transformację komórek międzybłonka powodując nadmierne ich złuszczenie.

**DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA
PŁYNÓW Z JAM CIAŁA**

Bezpośrednim wskazaniem do nakłucia jamy ciała jest obecność w niej płynu o niejasnej etiologii.

Celem badania płynu jest określenie jego rodzaju, czynnika etiologicznego na podstawie cech fizycznych, parametrów biochemicznych, hematologicznych i badań mikrobiologicznych. Wynik badania płynu

komórki międzybłonka, granulocyty, monocyty, makrofagi, limfocyty, plazmocyty, komórki LE.

W zależności od czynnika etiologicznego

może służyć do monitorowania leczenia i rokowania.

Pobieranie materiału do badań

Płyn niezależnie od jego rodzaju (wysięk, przesiek czy płyn mieszany) pobiera się przez nakłucie jamy ciała igłą punkcyjną. Płyn pobiera lekarz w godzinach przedpołudniowych, co zapewnia wykonanie badania w dniu pobrania materiału.

Płyn należy pobrać do trzech pojemników:

1. 50-100 ml płynu na skrzep - do badania cech fizycznych i parametrów biochemicznych
2. 10-20 ml płynu na antykoagulant do badań cytologicznych
3. do sterylnej probówki lub bezpośrednio na podłoże transportowo - do badań mikrobiologicznych.

Zawsze, równocześnie z pobraniem płynu należy pobrać pacjentowi 5 ml krwi na skrzep. Ma to na celu porównanie stężenia badanych składników w płynie i surowicy oraz wyliczenie współczynnika. Współczynnik (Q) dla danej substancji X oblicza się według wzoru:

$Qx = \frac{\text{stężenie substancji X w płynie}}{\text{stężenie substancji X w surowicy}}$

Równoległa ocena badanych parametrów w płynie i surowicy w tym samym laboratorium, tą samą metodą, na tym samym aparacie i podczas tego samego cyklu analitycznego dostarcza pełnej i niezbędnej informacji przydatnej do interpretacji wyniku.

Algorytm badania płynu

1. Określenie cech fizycznych
2. Oznaczenie liczby komórek w 1 μl płynu
3. Wykonanie kilku preparatów cytologicznych w cytowirówce
4. Wykonanie badań mikrobiologicznych
5. Odwirowanie płynu i krwi pobranej na skrzep
6. Wykonanie badań biochemicznych w płynie i krwi pacjenta oraz wyliczenie Q dla oznaczanych parametrów
7. Badanie mikroskopowe komórek
8. Interpretacja wyników z uwzględnieniem wszystkich wykonanych badań.

Badanie cech fizycznych

Przy ocenie cech fizycznych należy brać pod

uwagę: barwę płynu (przed i po odwirowaniu), przejrzystość (przed i po odwirowaniu), ciężar właściwy, osmolalność, pH, tendencję do wykrzepiania oraz próbę Rivalty.

Badania biochemiczne

Do podstawowych badań biochemicznych wykonywanych jednocześnie w płynie i surowicy krwi należy stężenie białka całkowitego i aktywność LDH. Natomiast do badań ze wskazań należy: stężenie glukozy, albumin, cholesterolu całkowitego i LDL, fibrynogenu, bilirubiny, CRP, aktywność α-amylazy, lateks R, ASO, cytokiny pozapalne i nowotworowe, markery nowotworowe (w szczególności CEA i AFP), przeciwciała swoiste z klasy IgG i IgM w kierunku *Mycobacterium tuberculosis*.

Cytodiagnostyka płynu

Badanie mikroskopowe komórek obejmuje badanie:

- ♦ ilościowe (cytoza) ogólna liczba komórek w 1 μl płynu (płyn + czynnik Samsona w stosunku 1:10)
- ♦ ilościowe (granulocytoza) - liczba granulocytów w 1 l płynu (płyn + odczynnik Türk w stosunku 1:10)
- ♦ jakościowe różnicowanie komórek i ocena ich morfologii.

Badania mikrobiologiczne

Diagnostyka mikrobiologiczna polega na wykonaniu i ocenie preparatu bezpośredniego z osadu odwirowanego płynu, posiewie na rutynowy zestaw podłoży w kierunku bakterii tlenowych, beztlenowych, grzybów i prątków gruźlicy (jeżeli lekarz nie zaleci inaczej).

Rutynowy zestaw podłoży Mikrobiologicznych:

- ♦ agar krwawy lub czekoladowy
- ♦ podłoże z cetrynidem dla pałeczek *Pseudo-monas*
- ♦ podłoże Saboroud'a przeznaczone do hodowli grzybów
- ♦ podłoże Chapmana dla gronkowców
- ♦ podłoże Mac Concey'a do hodowli i identyfikacji pałeczek *Enterobacteriaceae*

W przypadku etiologii gruźliczej hodowla płynu oparta jest na metodzie konwencjonalnej lub metodzie automatycznej, która należy do metod szybkich. Kolejnym etapem diagnostyki jest ocena morfologii wyrosłych kolonii oraz określenie lekowrażliwości wyhodowanych szczepów

antybiogram.

Podsumowanie

Przy współczesnym rozwoju medycyny badanie płynów z jam ciała tylko w kierunku określenia czy jest to wysięk czy przesiek posiada niską wartość diagnostyczną. Lekarz powinien otrzymać kompleksowy wynik badania, który wskazuje czynnik etiologiczny oraz określa stopień zaawansowania procesu chorobowego. Badanie płynów jest wielokierunkowe i pracochłonne, wymaga od diagnosty laboratoryjnego nabytej wiedzy i doświadczenia. Do prawidłowej interpretacji wyniku niezbędna jest ścisła współpraca diagnosty laboratoryjnego z klinicystą leczącym pacjenta.

Dr hab. n. med. Maria Mantur,

Magdalena Borowiec

Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Klinicznej, Akademia Medyczna w Białymstoku.

dokończenie ze str. 12

Całkowity koszt wykonania statystycznie pojedynczego badania laboratoryjnego wylicza się przez podzielenie sumy kosztów bezpośrednich i pośrednich przez ilość wykonanych badań laboratoryjnych w danym okresie rozliczeniowym.

Znajomość udziału kosztów rodzajowych w wyliczonym koszcie statystycznie pojedynczego badania laboratoryjnego jest bardzo ważną i konieczną informacją dla kierownika laboratorium diagnostyki medycznej służącą do:

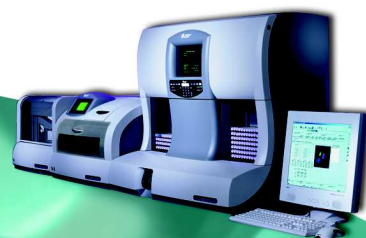
- wyliczenia i monitorowania prawidłowej ceny poszczególnych rodzajów badań laboratoryjnych,
- dla monitorowania zmian związanych z obniżeniem względnie z podwyższeniem ilości badań,
- dokładnego analizowania kosztów zmiennych,,
- do analizowania wskaźników ekonomiczno-finansowych.

Analiza wskaźnikowa prognozy rentowności i wskaźnika zyskowności, pozwala na prognozowanie rozwoju i możliwych zagrożeń sytuacji finansowej laboratorium diagnostyki medycznej.

mgr Elżbieta Adamska - Kranz
Kierownik Zakładu Diagnostyki Laboratoryjnej
Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego
w Koninie

CECHA FIZYCZNA	PRZESIEK	WYSIEK
Przejrzystość	Klarowny	Mętny
Ciężar właściwy	<1,016	>1,018
Próba Rivalty	(-)	(+)
Tendencja do wykrzepiania	(-)	(+)

Tabela 1. Porównanie przesieku i wysieku na podstawie cech fizycznych



hematologia

koagulologia

chemia
kliniczna

immunochemia

analiza osadu
moczu

parametry
krytyczne

cytometria
przepływowa



 **COMESA**

CH-Werfen Company

Comesa Polska Sp. z o.o.

03-699 Warszawa

ul. Wolińska 4

Tel.: (48) 22 336 18 00

Fax: (48) 22 336 18 72

e-mail: comesa.polska@comesa.pl

www.comesa.pl