

Diagnosta Laboratoryjny

Rok 4, numer 2 (10)
Czerwiec 2006

GAZETA KRAJOWEJ IZBY
DIAGNOSTÓW LABORATORYJNYCH

GAZETA
BEZPŁATNA

**Kto diagnostyki laboratoryjnej w leczeniu nie używa,
ten kieszeni pacjenta i naszego Państwa nadużywa.**



Z inicjatywy diagnostów laboratoryjnych
osła i Sanoka (woj. podkarpackie) wręczono

Jeszcze wczoraj niektórzy powiadali, że będziemy w leczeniu niepotrzebni, ale dziś okazujemy się jeszcze bardziej w diagnostyce niezbędni. Dobrze jest powrócić i przypomnieć znane już Państwu hasło z pierwszego numeru Gazety KIDL "Diagnosta Laboratoryjny": *"Nie ma medyka bez diagnostyka"*. Dziś należy uaktualnić to hasło zmodyfikowanym zapisem: *"Nie będzie rzetelnych wiarygodnych medyków bez rzetelnych i wiarygodnych w swoim zawodzie diagnostów laboratoryjnych"*. Potrzeba nam jest, a przede wszystkim pacjentom, śmiałych i oddanych diagnostyce laboratoryjnej, i absolwentów analityki, i biologii, i chemii, a nawet i absolwentów lekarzy, jeżeli ci poza analitykami uzupełnią kierunkowe podyplomowe kształcenie. Diagnostyka laboratoryjna potrzebuje ludzi zdeterminowanych, osób chcących podjąć ryzyko zmian zachodzących w służbie zdrowia, a także zmian w wyposażeniu laboratorium diagnostycznego.

Aparatura instalowana w laboratoriach nie wyręczy nas, jak chcieliby i widzieliby nas, w dość ograniczonym myśleniu, zaślepieni technokratycznymi wizjami. Miejsce wykształconego profesjonalisty, absolwenta po kierunku analityki medycznej i specjalistów zastąpione byłoby "beté machine". Tę wizję roztaczali w iluzji, tak dla chirurgii, jak i dla diagnostyki. Wydawała się ona możliwa w XVI-XVII wieku i nadal świeci złudnie przez wieki, choć dziś wydaje się oślepiac tylko tych, którzy mniej czasu włożyli w studiowanie, a więcej w marzycielstwo na jawie.

Intelektualne podejście do zdrowia to nie moda na nowinkarskie sugestie, ale zdolność połączenia tradycji, historii z wiedzą nabytą, a możliwą do osiągnięcia w trakcie kierunkowych studiów. To inteligentne łączenie sprawdzających się hipotez, odpowiadające badanym procesom poznawczym i osiągnięć naukowych.

Należy oddać szacunek i pamięć pierwszym badaczom, analitykom materiału biologicznego, że materiał taki nie pojmowali tylko jako oderwaną próbkę, ale badali jego łącznie z objawami chorobowymi zgłaszanymi przez pacjenta. Posłużyło im to za podstawę do stawianych hipotez, gdyż zachodzi zależność między właściwościami płynu ustrojowego, badanej próbki, a procesem choroby. Tak rodziła się nauka i praktyczna wiedza medyczna w powiązaniu z analityką laboratoryjną. Posiadając wiedzę o zachodzących relacjach między procesem chorobowym, a właściwością płynu ustrojowego i badanej próbki diagnostyka laboratoryjna stawiała się sposobem na budowanie wczesnego rozpoznania zagrożenia nie tylko dla jednostki, ale całej populacji i rodzaju ludzkiego. W tym rozpoznaniu, od drugiej połowy XX wieku upatrywano sygnały informujące, jako wyprzedzające skuteczne sposoby przeciwdziałania i poszukiwania zaradczych środków podejmowanych w określonym kierunku, by w porę chronić zdrowie jednostek i całej populacji ludzkiej. Mając tak poważne narzędzie jakim jest diagnostyka laboratoryjna oraz jej metody i materiał badany, diagności mogą wykorzystać swoją wiedzę wnikając w etiologię procesu chorobowego, badając, obserwując i dokonując syntezy, by odpowiedzieć dlaczego jedne procesy chorobowe się aktywizują, a inne ustępują. Zachęcamy właśnie do tego, by każdy stawał się "po trosze", badaczem naukowym, gdy stał się już diagnostą laboratoryjnym. Na materiale tym i posiadanym wykształceniu można dokonywać syntezy, stawiać hipotezy, uzasadniać je lub pozbawiać ich zasadności gdy nie są skuteczne w praktyce terapeutycznej. Taka jest przyszłość i miejsce dla diagnostów i diagnostyki laboratoryjnej w strukturze nauk medycznych, dla pożytku indywidualnego pacjenta i profilaktyki zdrowia publicznego.

Redakcja.



Szanowni Państwo;
Szanowni Diagnostycy
Laboratoryjni.

Dokonały się w diagnostyce laboratoryjnej zmiany nie tylko w wyposażeniu laboratoriów, strukturze laboratoriów i ich prawnego przyporządkowaniu, ale również dokonują się tam, gdy spoglądamy na wykonujących czynności diagno-

styczne w medycznym laboratorium diagnostycznym. Regulacje dokonane według ustawy w dostępie do zawodu diagnosty laboratoryjnego spełniły oczekiwania zarówno świata medycznego, jak również systemu kształcenia do zawodów medycznych. Izba Diagnostów podjęła i realizuje proces uszczelniania zawodu diagnosty laboratoryjnego, nie tyle w trosce o dostęp do tego zawodu, ile w trosce o pacjenta, by pozostawali w tym zawodzie te osoby, które swoją drogę do zawodu wypełniali podążaniem po śladach wiedzy uzyskując kwalifikacje w systemie uczelni wyższych i tą kwalifikacją nakierowaną na zawód. Kwalifikacja ta nie mogła być, ani nadana, ani zachowana z nabytego prawa do innego zawodu, a tylko jak wyżej wspomniane kierunkowe wykształcenie lub opisane jako wykształcenie przydatne uzupełnione określonym trybem uzgodnionym i przyjętym w porozumieniu Izby Diagnostów i Lekarskiej oraz Ministerstwa Zdrowia. Obok kształcenia podstawowego, zasadniczego, przeddyplomowego od kilku miesięcy diagnostom przydane zostały kształcenia specjalizacyjne i to w bardzo rozległej przestrzeni dyscyplin. Dostęp do specjalizacji i możliwość ich podjęcia w obecnych warunkach nie staje się automatycznym mechanizmem wyzwalającym aktywność środowiska diagnostów laboratoryjnych. Musimy tworzyć wzajemną pomoc, wspierać każdego, kto chce wstąpić na ścieżki specjalizacyjne. Niech każdy ma świadomość, że w ten sposób nasz zawód będzie nie tylko cenionym, lecz przede wszystkim niezawodnym i wiarygodnym. Budować będziemy przekonanie i wiedzę wśród współpartnerów świadczeń zdrowotnych, że różnorodność i wielorakość specjalizacyjnych sposobów podnoszenia kwalifikacji zawodowych wypracowana przez KIDL i dana w rozporządzeniu Ministra Zdrowia dokumentowane będą potwierdzoną ilością podjętych i rozpoczętych cykli specjalizacyjnych.

Jestem przekonany, że mimo mniej korzystnych warunków danych diagnostom w sposobie sięgania po specjalizację, to jednak rozwijając się w takiej różnorodności specjalizacyjnej, wchodząc w zespoły udzielających świadczeń medycznych nie będziemy wypierani przez chcących wymienić nas na paski i aparaty diagnostyczne. Przekonanie takie i wypowiedzi nie są odosobnione u medyków, którzy stracili kontakt nie tylko z zawodem, ale zostali wyalienowani w leczeniu, i od pacjenta, i od współdawców świadczeń zdrowotnych, a od lat zajmują się organizowaniem służby zdrowia. Otwarta droga do specjalizacji, w których kształcić się mogą diagnostycy powiększa krąg osób gotowych służyć i pomagać pacjentowi. Natomiast zdrowie publiczne jako specjalność nie będzie tylko dla lekarza, gdyż diagnosta laboratoryjny zechce ćwiczyć tą specjalność, będzie stać się mógł menadżerem przygotowanym do zadań publicznych. Diagnostycy laboratoryjni mogą i powinni stawać się menadżerami służby zdrowia. Mają za sobą wystarczające studia, w których otrzymali podstawę do zarządzania jednostkami służby zdrowia. W minionym okresie działania Izby zostało przygotowanych i wydanych ok. 2200 Prawa Wykonywania Zawodu po uprzednim udokumentowaniu wszystkich wymaganych punktów dopuszczających do wydania dokumentu. KIDL nie jest obojętna na tendencje rysujące się w strukturze niektórych jednostek służby zdrowia. Nie uważa Izba, że outsourcing jest lekarstwem i narzędziem nowoczesnego zarządzania i receptą na wysoką jakość i specjalizację usług. Nawet jeżeli istnieją zabezpieczenia dla pracowników przy tej formie restrukturyzacji, to niepojętą staje się argumentacja, że to co korzystne jest dla przejmującego w outsourcingu od publicznej jednostki służby zdrowia, jest niekorzystne dla niej samej. Podobnym błędem jak wyprowadzanie aptek ze szpitali i przychodni odbija się echem wyprowadzanie laboratorium z podmiotów publicznych. Zbyt wiele pytań i wątpliwości nasuwa się tutaj, szczególnie wówczas, gdy myślę o szerokim dostępie do specjalizacji dla diagnostów laboratoryjnych. Nawet przy bardzo rozległej formie podjętych starań przez Izbę o finansowanie z publicznych środków specjalizacji i częściowym udziale w kosztach przez Uczelnie Medyczne realizujące cykle kształcenia specjalizacyjnego, nie mogę pozbawić się wątpliwości dotyczącej tej formy szukania oszczędności w służbie zdrowia.

Prezes KRDL
Henryk Owczarek

W NUMERZE

Zastosowanie technik biologii molekularnej w diagnostyce mikrobiologicznej	4-6
Zastosowanie nowoczesnych technik w diagnostyce laboratoryjnej gruźlicy.	6-9
Diagnostyka laboratoryjna zakażeń Chlamydia pneumoniae i Chlamydia trachomatis	9-11
PLYNNY Z JAM CIAŁA.	12-14
STANDARDY JAKOŚCI W MEDYCZNYM LABORATORIUM DIAGNOSTYCZNYM	15-18
Charakterystyka szczepów Staphylococcus aureus z zastosowaniem metod fenotypowych.	19-22
OPINIE PRAWNE RADCY PRAWNEGO KIDL Grażyna Filipowska-Kejna WA 1376	22
Informacje bieżące	23

Uchwały XIV
posiedzenia KRDL
- Uchwały XV posiedzenia
KRDL
- Uchwały XVI
posiedzenia KRDL
- Uchwały
Nadzwyczajnego
Krajowy Zjazd
Diagnostów
Laboratoryjnych
- Opinie prawne

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

Krajowa Rada Diagnostów Laboratoryjnych

Redakcja:

Henryk Owczarek - Prezes KRDL
Czesław Głowniak - 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 możliwość wprowadzenia 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 precipitacji z cząstkami złota podawane są bezpośrednio do tkanek.

Następne możliwości kojarzone w przeszłości z molekularnymi technikami wiążą się z zsekwencjonowaniem genomu niektórych wirusów oraz *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium lepre* i pasażem wywołującym chorobę Plazmodium falciparum, przeciw którym ciągle brak jest skutecznej szczepionki. Pozwoliłoby to na skatalogowanie 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 właściwości 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 reanatacji

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 zszepienia 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 nie uzyskanego z próbki klinicznej DNA jest ekspozycja 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 zautomatyzowaniu 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:

- izolacja DNA (materiał bezpośredni lub drobnoustroje z hodowli)

- denaturację DNA (temp. 92o - 96o C)

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

- wydłużanie łańcucha DNA przyłączonego do startera przez termostabilną polimerazę. Warunki muszą być odpowiednio dobrane (72°C) 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 jednociowej i jest wiązane przez jednociową 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 ampliconu 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 określaniu patogenów 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-*

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

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. *Ped.res.* 2003. 54:1-7
3. M.A. Pfaller, Molecular approaches to diagnosing and managing infectious disease: practicality and costs. *Emerging Infect. Dis.* 2001. 7:1080-6040.
4. N.Zaidi, K. Konstantinou, 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. Saito R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, J. Scherf, 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 Akademii Medycznej 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 karbolową 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 specyficznością sekwencji nukleotydowych, 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 fluorescencyjnymi 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 ^{14}C . W czasie wzrostu prątki zużywają radioaktywny substrat i wydają go w postaci $^{14}\text{CO}_2$. Radioaktywność w aparacie Bactec mierzona jest w skali od 000 do 999. Przyrost ilości wydalanego $^{14}\text{CO}_2$ 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 CO_2 , N_2 i O_2 . 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 specyficzność 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 nukleinowy 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-glikozyłaza 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 próbką. 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 dodatknych 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 prętka. W kolejnym etapie wykrywane są namnożone wcześniej fragmenty RNA. Do detekcji wykorzystana jest hybrydyzacja z amplifikowanego RNA z sondami wyznakowanymi barwnikiem - estrem akrydyny. Gdy sonda nie hybrydyzuje barwnik ulega hydrolizie, co powoduje eliminację sygnału tła. Pomiar sygnału świetlnego emitowanego przez wyznakowaną sondę, po hybrydyzacji z produktem amplifikacji odbywa się w chemiluminometrze. 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 dodatknych 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. goodii*, *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 multiplex PCR (amplifikowanym fragmentem jest ITS genu 16S rRNA) następuje hybrydyzacja produktów z 22 sondami na jednym pasku nitrocelulozy (12). Test umożliwia 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 zawierają różnorodne sekwencje umożliwiające zróżnicowanie klinicznie ważnych gatunków mykobakterii z wyjątkiem

kompleksu *tuberculosis*.

Prątki gruźlicy charakteryzują się naturalną wrażliwością na wszystkie leki przeciwpłatkowe z wyjątkiem *M. bovis*, który jest naturalnie odporny 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 odporny 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 uznaną 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 81pz 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, enzymem konwertującym 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 przeciwpłatkowe, 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, delecji lub rearanżacji 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 multiplex 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. Chakravorty 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, Thornton, Kerry M. Maclellan, Thomas L. Brink, Denise E. Lockwood, Mark Romagnoli, June Turner, William G. Merz, 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. Scarparo, 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, E. Favari, 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. Drobniewski. 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, Manterola 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. Sirvastava K, Das R, Jakhmola P, Gupta P, Chauhan DS, Sharma VD, Singh HB, Sachan AS, Katoh VM. Correlation of mutations detected by Inno-LiPa with levels of rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Indian J. Med Res*. 120, 8:100-105, 2004

18. Watterson SA, Wilson SM, Yates MD, Drobniewski 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): 25632567, 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 Garzelli. 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

Jolanta Paluch-Oleś

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 Chlamydia w skład którego wchodzi obecnie Chlamydia psittaci, Chlamydia 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 siateczkowatego 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 liście komórki gospodarza, a jednocześnie forma ta jest zdolna do wnikania i zakażenia kolejnych komórek. RB posiada strukturę mniej zwartą niż EB, jest formą aktywną metabolicznie, ma zdolność syntezy DNA, RNA i białek.

Chorobowość 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 drobnoustroj ma łagodny przebieg z charakterystycznym podostym początkiem choroby, trudnym do

rozpoznania w pierwszej fazie. Pierwszymi objawami są ból gardła i chrypka. Kaszel pojawia się z kilkudniowym opóźnieniem. Podwyższona temperatura ciała występuje na początku choroby. W badaniu krwi stwierdza się podwyższone OB, poziom białych krwinek pozostaje niezmienny. Ciężki przebieg zakażenia zdarza się rzadko i dotyczy głównie ludzi w podeszłym wieku oraz przypadków infekcji mieszanych najczęściej ze *Streptococcus pneumoniae*. Pierwotna infekcja *Chlamydia pneumoniae* indukuje produkcję przeciwciał w klasie IgM i IgG. Po powtórny kontakt z antygenem poziom przeciwciał IgG i IgA wzrasta szybko bez odpowiedzi w klasie IgM. Po przebiegu ostrej infekcji wywołanej przez *Chlamydia pneumoniae* przeciwciała klasy IgG można wykryć w surowicy przez trzy do pięciu lat. Przeciwciała klasy IgA znikają szybko, ich czas półtrwania wynosi 5-6 dni. Rola przeciwciał w ochronie przed reinfekcją nie jest znana.

Najistotniejszą cechą zakażeń wywołanych przez *Chlamydia pneumoniae* jest możliwość przechodzenia w infekcje przewlekłe, pomimo łagodnego lub nawet bezobjawowego przebiegu. Podwyższone, stabilne miana IgA są uważane za wskaźnik przewlekłych infekcji *Chlamydia pneumoniae*. Wielośrodkowe badania wykazały związek przewlekłych zakażeń *Chlamydia pneumoniae* z chorobą wieńcową, miażdżycą, tętniakiem aorty brzusznej, sarkoidozą, astmą oskrzelową, przewlekłą obturacyjną chorobą płuc.

Diagnostyka zakażeń Chlamydia pneumoniae

Hodowla

Chlamydia pneumoniae jako bezwzględny pasożyt wewnątrzkomórkowy ma bardzo duże wymagania odżywcze i w związku z tym jest drobnoustrojem trudnym do hodowli in vitro. Hoduje się go na liniach komórkowych i w woreczku żółtkowym zarodków kurzych. Wykazano, że najwrażliwsze na zakażenie *Chlamydia pneumoniae* są linie komórkowe HL i HEp2. Wytworzone w hodowli komórkowej wtręty *Chlamydia pneumoniae* wykrywa się i identyfikuje przy użyciu swoistych gatunkowo i rodzajowo przeciwciał monoklonalnych, stosując metody immunofluorescencji pośredniej lub bezpośredniej. Linie HeLa 229 i McCoy używane do hodowli pozostałych gatunków chlamydii wykazują bardzo niską wrażliwość na zakażenie *Chlamydia pneumoniae*.

Rozpoznanie zakażenia *Chlamydia pneumoniae* w oparciu o hodowlę jest bardzo trudne. Wpływają na to takie czynniki jak: powolny, trwający dni, tygodnie wzrost w warunkach in vitro, nieokreślona wrażliwość stosowanych linii komórkowych na zakażenie *Chlamydia pneumoniae*, a tym samym nieznana czułość metody. Ponadto brak jest wyraźnego określonego miejsca,

z którego należy pobierać materiał do badań. Najczęściej izolowano *Chlamydia pneumoniae* z wymazów z gardła. Zastosowanie hodowli komórkowej do rutynowej diagnostyki zakażeń *Chlamydia pneumoniae* jest w znacznym stopniu ograniczone.

Wykrywanie antygeny Chlamydia pneumoniae

Mimo zastosowania przeciwciał monoklonalnych do detekcji antygeny *Chlamydia pneumoniae* bezpośrednio w materiale, metoda ta wykazuje niską czułość i ma wątpliwą wartość diagnostyczną. Wykorzystywana jest głównie do stwierdzania obecności *Chlamydia pneumoniae* w wymazach z gardła, jednak niewielka ilość drobnoustroju w nabłonku górnych dróg oddechowych może być przyczyną fałszywie ujemnych wyników.

Polimerazowa reakcja łańcuchowa (PCR)

Metoda PCR polegająca na wykrywaniu DNA w badanym materiale znalazła szerokie zastosowanie w diagnostyce zakażeń *Chlamydia pneumoniae*. Zidentyfikowano kilka obszarów genomowego DNA *Chlamydia pneumoniae*, które uznano za swoiste dla różnicującej i identyfikującej amplifikacji. Najczęściej stosowane są startery dla odcinka PstI (437bp) genomu o nieustalonej dotychczas funkcji, dla podjednostki 16S rRNA lub dla genu kodującego główne białko błony zewnętrznej. Metody PCR dotychczas stosowano do wykrywania DNA *Chlamydia pneumoniae* w materiale pobieranym z gardła, nosa, pęcherzyków płucnych, płwociny a także w monocytach krwi obwodowej i blaszce miażdżycowej.

Mimo doświadczalnie stwierdzonej wyższej czułości PCR nad metodami hodowlanymi test ten ma również pewne ograniczenia. Istotną sprawą jest wybór materiału do badań, czas i sposób jego pobrania oraz transport do laboratorium. Ponadto w materiale mogą znajdować się inhibitory Taq DNA polimerazy, fałszujące wynik reakcji. Innym problemem jest dobór sposobu oczyszczania DNA i kontaminacji.

Badania serologiczne w diagnostyce Chlamydia pneumoniae

Dotychczas podstawowym badaniem w kierunku zakażeń *Chlamydia pneumoniae* jest wykrywanie swoistych gatunkowo przeciwciał w surowicy krwi pacjentów. Metodą referencyjną jest mikroimmunofluorescencja (MIF), w której jako antygen wykorzystuje się formalizowane ciała elementarne *Chlamydia pneumoniae* pozbawione rodzajowo swoistego lipopolisacharydu.

Do badań serologicznych w kierunku *Chlamydia pneumoniae* wykorzystuje się również test ELISA, w którym jako antygen stosuje się białka zewnątrz błonowe

wyekstrahowane z ciałek elementarnych. Białka te posiadają epitopy swoiste dla *Chlamydia pneumoniae*, które nie dają reakcji krzyżowych z *Chlamydia trachomatis* i *Chlamydia psittaci*.

W przypadku pierwszej ostrej infekcji *Chlamydia pneumoniae*, po około 3 tygodniach od zakażenia pojawiają się przeciwciała w klasie IgM, zaś IgG po 6-8 tygodniach. W przypadku kolejnego zakażenia poziom IgG wzrasta bardzo szybko osiągając w ciągu 1-2 tygodni miana powyżej 1:512.

Chorobotwórczość Chlamydia trachomatis

Ze względu na występujące w zewnętrznej warstwie ściany komórkowej białko wyodrębniono 18 serotypów *Chlamydia trachomatis*. W 1991r. odkryto 3 nowe serotypy Da, 1a, L2a. Serotypy A-C wywołują jaglicę prowadzącą do ślepoty, serotypy D-K odpowiadają za zakażenia narządów płciowych oraz wtórne zapalenia spojówek u noworodków i dorosłych, zaś serotypy L1-L3 wywołują ziarniniaka wenerycznego (lymphogranuloma venereum - LGV). Jaglica, zwana egipskim zapaleniem spojówek, to choroba zakaźna obejmująca spojówki i rogówkę. Przenoszona jest przez kontakt bezpośredni, okres inkubacji wynosi ok. 5-12 dni. Najwcześniejszymi objawami jaglicy są: łzawienie, wydzielina śluzoworopna, przekrwienie spojówki i pojawianie się zmian grudkowatych. Badanie rogówki wykazuje zapalenie warstwy nabłonkowej, nacieki podnabłonkowe oraz wrastanie naczyń brzożnych do rogówki (łuszcza). W miarę rozwoju choroby pojawiają się zbliznowacenia spojówek, zniekształcenia powiek. Utrata wzroku może nastąpić w ciągu kilku lat.

Serotypy D K to szczepy okulenitalne, wywołujące bezobjawowe lub skąpoobjawowe zakażenia głównie u ludzi młodych. Przenoszone są drogą kontaktów seksualnych. Odpowiedzialne są także za zapalenie spojówek (bez zapalenia rogówki i bliznowacenia) do których dochodzi na drodze autoinfekcji. U mężczyzn powodują: zapalenie cewki moczowej, zapalenie pęcherza, zapalenie najądrzy i zapalenie prostaty.

U kobiet wywołują: zapalenie cewki z częstomoczem, ropomoczem (bezbakteryjnym), zapalenie pęcherza moczowego, zapalenie szyjki macicy, zapalenie macicy i jajowodów.

U kobiet ciężarnych mogą powodować: poronienia i porody przedwczesne, opisywane są także przypadki zakażeń wewnątrzmacicznych. Serotypy D K *Chlamydia trachomatis* są przyczyną zakażeń okołoporodowych - podczas porodu drogami natury w ok. 70% przypadków dochodzi do zakażenia

noworodka. U 1/3 noworodków rozwija się zapalenie spojówek. Może dojść do kolonizacji nosogardzieli noworodka, co w konsekwencji prowadzi po ok. 3-16 tyg. do zapalenia dolnych dróg oddechowych. Chlamydia trachomatis jest czynnikiem, który musi być brany pod uwagę w diagnostyce przewlekłych zapaleń miednicy mniejszej. Formujący się w zatoce Douglasa galaretowaty wyśiek prowadzi do wytworzenia zrostów okołojajowodowych oraz zamknięcia jajowodów. Proces ten jest istotną przyczyną niepłodności. Rozprzestrzenianie się infekcji może doprowadzić do powstania zapalenia okołowątrobowego. Niektórzy badacze wskazują na Chlamydia trachomatis, jako na jeden z czynników etiologicznych powstawania raka szyjki macicy. Inną znaną patologią o etiologii chlamydiowej jest zespół Reitera łączący w sobie zapalenie cewki moczowej, stawów oraz spojówek. Jego powstanie związane jest z podobieństwem antygenowym pomiędzy antygenami chlamydii, a antygenami układu HLA.

Diagnostyka zakażeń Chlamydia trachomatis

Materiałem do badań w kierunku zakażeń Chlamydia trachomatis są: wymazy lub zeszkrobiny z cewki moczowej, z szyjki macicy, gardła, spojówek, sperma i moczu. Ten ostatni wykorzystywany jest głównie do metody PCR.

Materiał z cewki moczowej należy pobierać z głębokości 1,5-2 cm w sposób umożliwiający zebranie komórek nabłonkowych, materiał z kanału szyjki macicy pobieramy po wcześniejszym usunięciu śluzu i wydzieliny ropnej. Wymazówkę (bawełnianą /celulozową) lub część należy wsunąć do kanału szyjki i przyciskając ruchem obrotowym pobrać komórki nabłonkowe. W zakażeniach dróg oddechowych pobieramy wymazy spod nagłośni lub tylnej ściany gardła. Wymaz ze spojówek lub zeszkrobiny z worka spojówkowego pobieramy cząstką platynową po 24h bez kropli i maści. Materiał do hodowli transportujemy w podłożu 2SP (surowica cielęca + antybiotyki) 24h w 4°C lub zamrażamy do -20 °C. Materiał do IF наносимы natychmiast na szkiełko podstawowe, suszymy i utrwalamy etanolem lub metanolem.

Uwidocznienie obecności drobnoustroju w materiale klinicznym za pomocą barwienia Bezpośrednie uwidocznienie obecności bakterii po zabarwieniu metodą Giemsa było podstawową techniką diagnostyczną, jednak z powodu niewielkiej czułości nie jest już stosowane w ocenie próbek klinicznych.

Hodowla

W 1965 roku wprowadzono metodę hodowli Chlamydia trachomatis na komórkach McCoy. Techniki hodowli wymagają dobrej jakości biopłatów błony śluzowej kanału szyjki macicy i cewki moczowej oraz niskiej temperatury w czasie ich transportu do laboratorium. Technika ta jest pracochłonna i czasochłonna. Czułość hodowli określana jest na 55-85% w przypadkach zakażeń szyjki macicy u kobiet, natomiast w zakażeniach cewki moczowej u mężczyzn jest niższa. Do hodowli stosuje się obecnie linie HeLa 229, McCoy, BHK 21 i zarodki kurze. Inkubacja trwa 72h do barwienia jodyną i 48h do IF. W rutynowych badaniach klinicznych hodowle są generalnie zastępowane przez podobnie lub nawet bardziej czułe testy identyfikacji antygenów.

Wykrywanie specyficznych antygenów

W latach osiemdziesiątych pojawiły się dwa typy testów identyfikujących antygeny Chlamydia trachomatis. W teście immunofluorescencji bezpośredniej (DIF) stosuje się monoklonaalne przeciwciała znakowane fluoresceiną, skierowane przeciwko białkom komórkowym, które pozwalają bezpośrednio wykazać obecność ciałek elementarnych w rozmazach pobranych z narządów płciowych lub zeszkrobinach z worka spojówkowego. Testy te są względnie swoiste, ale wymagają dużego doświadczenia. Testy immunoenzymatyczne (EIA) są oparte na przeciwciałach skierowanych przeciwko powierzchniowym lipopolisacharydom. Są one powszechnie stosowane w badaniach próbek klinicznych. Swoistość testów EIA jest wysoka. Czułość testów DIF i EIA nie jest wyższa niż 70% dla próbek z szyjki macicy i prawdopodobnie niższa dla materiałów z cewki moczowej mężczyzn i moczu. Testy DIF i EIA wymagają co najmniej 105 drobnoustrojów, aby uzyskać wynik dodatni, tak więc ich przydatność jest mniejsza w rozpoznawaniu infekcji bezobjawowej, w przypadku której występuje mniejsza liczba drobnoustrojów.

Hybrydyzacja DNA

Testy oparte o hybrydyzację DNA polegają na uwidocznieniu kompleksu pomiędzy sondą molekularną, a obecną w materiale biologicznym cząsteczką kwasu nukleinowego drobnoustroju. Podstawą procesu hybrydyzacji jest zdolność kwasów nukleinowych do tworzenia struktury dwuniciowej pomiędzy komplementarnymi, jednoniciowymi fragmentami DNA. W przypadku zakażeń chlamydiami, sondą jest fragment genu omp I kodujący główne białko błony zewnętrznej lub fragment plazmidowego DNA. Wykrycie kompleksu

sonda-kwas nukleinowy patogenu jest możliwe dzięki wyznakowaniu sondy izotopem promieniotwórczym, biotyną, fluoresceiną lub enzymem katalizującym reakcję barwną.

Hybrydyzacja typu „dot-blot” - w metodzie tej uzyskany z materiału biologicznego kwas nukleinowy nanosi się na filtr nitrocelulozowy lub nylonowy, poddaje się denaturacji a następnie hybryduje z wyznakowaną sondą. Detekcja powstałego kompleksu zależy od zastosowanej metody znakowania.

Hybrydyzacja in situ polega na wykrywaniu kwasów nukleinowych patogenu bezpośrednio w tkankach gospodarza. Uzyskane fragmenty tkanek utrwalają się na szkiełku mikroskopowym, poddaje denaturacji i hybrydyzacji ze znakowaną sondą molekularną.

PCR, LCR

Obecnie dostępne są na rynku testy oparte na polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR) i ligazowej reakcji łańcuchowej (LCR). Testy te oparte są na amplifikacji grupowo lub gatunkowo swoistych sekwencji DNA kodujących główne białka błony zewnętrznej MOMP lub fragment plazmidowego DNA. Otrzymane produkty amplifikacji wizualizuje się w żelu agarozowym barwionym bromkiem etydydny lub z zastosowaniem techniki hybrydyzacji (Southern -blot). W metodzie LCR detekcja jest oparta na mikrocząsteczkowej metodzie MEIA. Czułość tych metod przewyższa 90%. Testy te wykrywają o 20% więcej infekcji niż metoda hodowli lub EIA. Za większość przypadków fałszywie ujemnych odpowiedzialna jest obecność inhibitorów reakcji.

Badania serologiczne w diagnostyce Chlamydia trachomatis

W diagnostyce serologicznej C. trachomatis wykrywa się swoiste przeciwciała klasy IgG i IgA w surowicy metodą ELISA z użyciem oczyszczonego LPS z błony zewnętrznej C. trachomatis jako antygeny lub metodą mikroimmunofluorescencji (MIF). Metody te mają jednak istotne ograniczenia. Uważa się, że ocena poziomu przeciwciał, w zakażeniach układu moczowo-płciowego wywołanych przez C. trachomatis, nie pozwala na wiarygodną ocenę aktywności procesu chorobowego. Powodem może być zbyt mała produkcja przeciwciał lub fałszywie dodatnie wyniki spowodowane reakcjami krzyżowymi z antygenami innych drobnoustrojów.

Literatura dostępna w Redakcji.

Justyna Niedźwiadek.

FLYNY Z JAM CIAŁA.

Badanie i interpretacja (cz.II).

Dr hab.n.med. Maria Mantur, Mgr anal.

med. Magdalena Borowiec

Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki

Klinicznej AMB

Płyn w jamie opłucnowej - u około 90% chorych jest wysiękiem. Główną przyczyną powstawania przesieków nienowotworowych jest niewydolność oddechowa, niewydolność krążenia lub marskość wątroby. Natomiast przesieki nowotworowe powstają pod wpływem rozwoju nowotworów złośliwych płuc lub opłucnej.

• Płyn w jamie osierdziejowej fizjologicznie u zdrowych dorosłych osób znajduje się w bardzo niewielkich ilościach (ok. 20-25 ml) i jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania serca. Fizjologiczny płyn osierdziejowy nie różni się składem od osocza krwi. Główną przyczyną gromadzenia się płynów wysiękowych w jamie osierdza jest: • zapalenie wysiękowe osierdza w przebiegu zawału mięśnia sercowego • wirusowe, bakteryjne i grzybicze zapalenie osierdza

• zapalenie wysiękowe osierdza w przebiegu chorób reumatycznych tkanki łącznej • zapalenie wysiękowe jako powikłanie zaawansowanej mocznicy

• nowotwory pierwotne płuc i/lub przerzuty • krew w worku osierdziejowym na skutek mechanicznego uszkodzenia naczyń wieńcowych lub naruszenia ciągłości ściany komór serca.

Nakłucie worka osierdziejowego wykonuje się ze wskazań życiowych, kiedy nagromadzony płyn może grozić tamponadą serca.

Płyn w jamie otrzewnowej - najczęstszą przyczyną gromadzenia się płynów w jamie otrzewnowej jest marskość wątroby oraz nowotwory narządów wewnętrznych w obrębie jamy brzusznej. Wysięki nowotworowe stanowią około 50% wszystkich patologicznych płynów w jamie otrzewnowej. Pozostała część płynów to przesieki i wysięki zapalne nienowotworowe.

Płyn przesiekowy zwany też płynem puchlinowym pojawia się w jamie otrzewnowej najczęściej z powodu niewydolności krążenia, zespołu nerczowego oraz marskości wątroby. Jest to płyn klarowny, jasnożółty, o charakterze niezapalnym, niskobiałkowy i z niską leukocytozą.

DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA

FLYNY Z JAM CIAŁA

Colony: badanie płynu jest standardem

w monitorowaniu leczenia i rokowaniu. Cytodiagnostyka płynów z jam ciała Badanie cytologiczne płynów obejmuje: • badanie ilościowe komórek: tzw. cytoza ogólna liczba komórek w 1 μ l płynu oraz granulocytoza - liczba granulocytów w 1 l płynu • badanie jakościowe - różnicowanie komórek na podstawie ich morfologii

Tabela 1. Porównanie przesieku i wysięku na podstawie badania cytologicznego

Mikroskopowa ocena ilościowa	Przesiek	Wysiek
Cytoza	< 500 μ l	> 1000 μ l
Leukocytoza	< 100 μ l	> 1000 μ l
Granulocytoza	< 50 %	> 50 %
Mononukleary (komórki jednojądrzaste)	< 50 %	> 50 %

Tabela 2. Porównanie przesieku i wysięku na podstawie badań biochemicznych

BADANIE BIOCHEMICZNE	PRZESIEK	WYSIEK
Q białkowy	< 0,5	> 0,5
Q LDH	< 0,6	> 0,6
Rodzaj białka w płynie	Przewaga albumin	Przewaga globulin
Obecność fibrynogenu i monomerów fibryny	Nie występują	Występuje fibrynogen i/lub monomery fibryny
Q albuminowy	> 0,8	< 0,3
Q α - amylazy	< 0,4	> 0,5
Glukoza	Jak w surowicy	Niższe niż w surowicy
Bilirubina	< 0,6 mg/dl	> 0,6 mg/dl
LDL	Nie stwierdza się	Występuje
Chylomikrony	Nie stwierdza się	Chłonka w jamie otrzewnowej (barwa mleczna)
Cytokiny prozapalne	(-)	(+)
Markery nowotworowe	(+/-)	(+)
Przeciwciała przeciwko MPO (p-ANCA)	(-)	(+/-)
Przeciwciała przeciwko PR3 (c-ANCA)	(-)	c-ANCA +/-

Płyn do badań cytologicznych należy pobrać na heparynę w stężeniu 50j/ml lub na EDTA-K2 (do próbki morfologicznej).

Badanie cytologiczne ilościowe

Badanie cytologiczne ilościowe ma na celu określenie liczby komórek jądrzastych w 1 μ l płynu. Elementy morfotyczne liczy się w komorze Fuchsa-Rosenthala o pojemności 3,2 μ l. W metodzie tej wykorzystuje się płyn Samsona, który lizuje krwinki czerwone, utrzuwa komórki jądrzaste oraz wybarwia ich jądra na kolor ciemnoczerwony.

Wykonanie:

1. Do komory Fuchsa-Rosenthala wlewa się 10 μ l płynu

płynu z jam ciała, wymieszać i

2. Odstawić na około 30 minut w celu zhemolizowania erytrocytów oraz wybarwienia komórek jądrzastych

3. Wcześniej przygotowaną komorę Fuchsa-Rosenthala napełnić rozcieńczonym płynem i pozostawić w komorze wilgotnej na 30 min. w celu opadnięcia komórek na dno komory

4. Policzyć komórki na powierzchni całej siatki co odpowiada obj. 3,2 mm³ komory Fuchsa-Rosenthala a następnie wyliczyć liczbę komórek w 1 μ l płynu wg wzoru: Liczba komórek w 1 μ l = liczba komórek w całej komorze : 3

Badanie cytologiczne jakościowe tzn. różnicowanie komórek

Badanie cytologiczne ma na celu określenie

rodzaju komórek i opisanie ich morfologii. Preparat cytologiczny należy wykonać w cytowirówce, której zaleta jest to, że,

• preparat cytologiczny uzyskuje się z niewielkiej objętości płynu

• komórki w czasie wirowania osadzają się bezpośrednio na szkiełku podstawowym

• preparat jest o równomiernej grubości na niewielkiej powierzchni szkiełka

• komórki

w preparacie są niezniszczone i niezdeformowane

• krótki czas od wykonania do zabarwienia preparatu

• niski koszt badania

• ze względu na wkładki CYTOSET jednorazowego użytku zachowane jest bezpieczeństwo pracy

Technika wykonania preparatów

• płyn dokładnie wymieszać i rozcieńczyć

• wykonać kilka preparatów z płynu nierozcieńczonego oraz rozcieńczonego 3- i 5- krotnie (Tab.3)

• jeżeli płyn jest bardzo mętny, płyn rozcieńczyć 10- krotnie (Tab.3)

WAŻNA INFORMACJA DOTYCZĄCA PRAWA WYKONYWANIA ZAWODU DIAGNOSTY LABORATORYJNEGO

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

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 sierpnia 2006 r. PT Diagnosty Laboratoryjni posiadający numer wpisu na listę diagnostów od 06001 do 08000 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.

PROSIMY O PILNE AKTUALIZOWANIE ZMIENIONYCH ADRESÓW DO KORESPONDENCJI.

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

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

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

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

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

Tabela 3. Rozcieńczenie płynu

Rozcieńczenie	Płyn	0,9% NaCl
3 -krotne	0,5	1 ml
5 - krotne	0,5	2 ml
10 - krotne	0,5	4,5 ml

Metody barwienia

Metody barwienia preparatów mikroskopowych dzieli się na trzy grupy

1. Metody polegające na utrwalaniu wilgotnych preparatów a następnie ich barwieniu:

1.1. Metoda Papanicolaou

1.2. Barwienie hematoksyliną i eozyną

2. Metody polegające na wysuszeniu preparatów przed barwieniem

2.1. Metoda May - Grunwalda i Giemsy

3. Barwienia różnicujące

3.1. Barwienie przyżyciowe czerwienią obojętną i zielenią janusową.

4. Barwienia cytochemiczne

Wykrywanie i oznaczanie aktywności poszczególnych enzymów służy do diagnostyki różnicowej komórek nienowotworowych i nowotworowych oraz do określenia stopnia ich złośliwości.

Metoda May-Grunwalda Giemsy

Metoda May-Grunwalda Giemsy (MGG) stosowana jest w rutynowej laboratoryjnej diagnostyce hematologicznej do barwienia rozmazów krwi obwodowej i szpiku. Po wprowadzeniu niewielkiej modyfikacji przystosowano metodę MGG do barwienia preparatów cytologicznych z płynów z jam ciała.

Odczynniki:

Odczynnik May-Grunwalda - nierozcieńczony

Odczynnik Giemsy; rozcieńczony tuż przed użyciem 1 : 20 H₂O dest.

Wykonanie barwienia:

♦ Preparat po wyjęciu z cytowirówki utwalić Cytofixem lub suszyć na powietrzu przez ok. 30 - 60 minut

♦ Odczynnik May-Grunwalda (nierozc.) - 3 minuty

♦ H₂O destylowana 2 minuty

♦ Odczynnik Giemsy (rozcz. 20x) - 7 minut

♦ Preparat spłukać wodą i wysuszyć w temperaturze pokojowej.

Uwaga!

Jeżeli preparat nie może być zabarwiony w ciągu 30-60 minut od jego wykonania, należy obowiązkowo pokryć utrwalaczem CYTOFIX w aerozolu, który utrwała oraz zabezpiecza komórki przed nadmiernym wysychaniem i deformacją. Tak zabezpieczony preparat może być przechowywany ok. 2-3 lat.

Barwienie przyżyciowe czerwienią obojętną i zielenią janusową.

Metoda pozwala na odróżnienie histiocyty od komórek międzybłonka i komórek nowotworowych, które pozostają niezabarwione.

Metoda desorpcji barwników.

W metodzie tej najpierw barwi się komórki barwnikiem podstawowym np. fioletem krezolu, a następnie poddaje komórki działaniu czynników odbarwiających np. H₂O₂. Jądra komórek międzybłonka ulegają znacznemu odbarwieniu (desorpcji), natomiast jądra komórek nowotworowych odbarwiają się słabo lub nie odbarwiają się wcale.

Barwienia cytochemiczne

Aktywności fosfatazy alkalicznej i aminopeptydazy. Metoda ma szczególne znaczenie w różnicowaniu komórek gruczolaków i różnych typów gruczolakoraków.

Reakcja PAS służy do różnicowania komórek. Dodatnia reakcja komórki międzybłonka, reakcja ujemna komórki nowotworowe.

Barwienie mucykarminem do różnicowania komórek gruczolakoraków. Reakcja dodatnia - obecność śluzu w komórkach.

Barwienie oranżem akrydyny do wykrywania komórek nowotworowych w mikroskopie fluorescencyjnym. Reakcja dodatnia - obecność w cytoplazmie reszkowych kwasów nukleinowych jądra.

Mikroskopia elektronowa - ocena struktur submikroskopowych w celu ustalenia odmiany histopatologicznej oraz stopnia zaawansowania nowotworu.

Ocena komórek w mikroskopie fazowo-kontrastowym - dokładna analiza cytologiczna nieutralizowanych i nie barwionych rozmazów.

Metody dodatkowe mają pomocnicze znaczenie w diagnostyce różnicowej komórek nowotworowych. Niekiedy mogą okazać się użyteczne tylko w wybranych przypadkach. Najbardziej niezawodne wyniki daje określenie liczby, morfologii oraz fenotypu komórek metodą cytometrii przepływowej.

W chwili obecnej badanie płynów z jam ciała tylko w aspekcie określenia czy płyn jest wysiękiem czy przesiękiem nie posiada wartości diagnostycznej. Lekarz chce otrzymać kompleksowy wynik badania płynu łącznie z opisem (diagnozą laboratoryjną) uwzględniającą cechy fizyczne, biochemiczne oraz jakościową i ilościową ocenę mikroskopową komórek. Wynik badania powinien wskazywać na czynnik etiologiczny oraz określić stopień zaawansowania choroby. Podczas labora-

toryjnej interpretacji wyników należy uwzględnić:

♦ jaki jest preparat, ubogo czy bogato-komórkowy

♦ jak są rozłożone komórki - równomiernie czy tworzą skupiska

♦ czy komórki międzybłonka posiadają jedno, dwa czy kilka jąder

♦ czy występują figury podziałowe komórek

♦ podać procentowy udział komórek poszczególnych linii komórkowych

♦ zaznaczyć, czy występują komórki o cechach atypii, a jeśli tak to czego ona dotyczy

♦ przeanalizować wyniki oznaczeń biochemicznych nie tylko w płynie lecz także i surowicy krwi (wsp. Q)

♦ po konsultacji z lekarzem w uzasadnionych przypadkach można wykonać dodatkowe badania szczegółowe, np. oznaczyć markery nowotworowe, interleukiny prozapalne itp. Najczęściej popełniany błąd przedlaboratoryjny

♦ niewłaściwa technika pobrania płynu,

♦ brak pobrania płynu na antykoagulant,

♦ niewłaściwy antykoagulant,

♦ nieodpowiednia proporcja antykoagulantu do płynu,

♦ brak jednoczesnego pobrania próbki krwi,

♦ zbyt długi czas przechowywania płynu przed dostarczeniem do laboratorium,

♦ płyn wykrzepiony komórki uwięzione w wytworzonym skrzepie z krzepnących włókien fibryny (płyn krzepnący nie nadaje się do badań cytologicznych)

Błąd laboratoryjny

♦ niewłaściwa technika wykonania i barwienia preparatu

♦ niedokładna ocena cytologiczna

♦ niewłaściwie dobrany panel badań biochemicznych

Błąd interpretacji wyniku

♦ niekompleksowa ocena wszystkich badanych parametrów

♦ brak współpracy laboratorium z lekarzem zlecającym badanie

PODSUMOWANIE

Aby wynik badania płynu z jamy ciała był diagnostycznie wiarygodny, powinien być pozbawiony błędów przedlaboratoryjnego, laboratoryjnego oraz błędów interpretacji. Płyn powinien być pobrany na skrzep, na antykoagulant oraz na podłoże transportowe i wraz z próbką krwi pacjenta szybko dostarczony do laboratorium. Badanie laboratoryjne płynów z jam ciała jest wieloparametryczne i pracochłonne, wymaga od osoby wykonującej badanie dużej wiedzy i doświadczenia. Do prawidłowej interpretacji wyniku niezbędna jest ścisła współpraca diagnosty laboratoryjnego z lekarzem leczącym pacjenta.

STANDARDY JAKOŚCI
W MEDYCZNYM LABORATORIUM
DIAGNOSTYCZNYM

Zygmunt Kopczyński
Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej Katedry
Onkologii Akademii Medycznej
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Od współczesnego medycznego laboratorium diagnostycznego oprócz: nowych technologii, większej dostępności do badań, szerokiej oferty, kompleksowej i profesjonalnej obsługi pacjenta, dobrej współpracy z otoczeniem medycznym, usługi doradczej /pomocy w doborze odpowiedniego badania lub panelu badań do danej sytuacji klinicznej/, większego udziału diagnosty laboratoryjnego w interpretacji wyników badań laboratoryjnych, większej odpowiedzialności, większego bezpieczeństwa dla pacjentów i personelu medycznego oczekuje się przede wszystkim wiarygodnego wyniku badania laboratoryjnego.

Wiarygodny wynik badania laboratoryjnego cechujący się wysoką jakością, jest zapewnieniem, że zawiera on w granicach przyjętego zakresu niepewności, informacje na temat cech biologicznych pacjenta, które potrzebne są lekarzowi w określonym czasie do postawienia diagnozy lub do oceny prowadzonego leczenia.

Wiarygodny wynik badania laboratoryjnego:

- wspomaga proces określania stanu zdrowia
- skraca czas pobytu chorego w szpitalu
- skraca czas rehabilitacji chorego
- szybciej doprowadza chorego do normy
- Niewiarygodny wynik badania laboratoryjnego
- opóźnia wykrycie schorzenia
- prowadzić może do wykrycia niewłaściwego schorzenia
- prowadzić może do niewłaściwego wyboru leczenia

Wykonanie badania laboratoryjnego jest procesem złożonym, polegającym na przechodzeniu elementów wejścia, poprzez czynności przedanalizacyjne, analizyczne i poanalizyczne, do elementu wyjścia jakim jest wynik badania laboratoryjnego. Wymagania wejściowe związane są z nakładem niezbędnym do rozpoczęcia procesu wykonania badania. Stanowią one między innymi: materiały, metody, procedury, wiedzę, informacje, doświadczenie, środki badawcze.

Istotną rolę w określaniu wymagań wejściowych pełnią strony zainteresowane, z których każda ma swoje potrzeby i oczekiwania. Kierownictwo laboratorium jako strona zainteresowana powinno określić:

– sekwencję czynności procesu wykonania badania laboratoryjnego i ich wzajemne oddziaływanie

– kryteria i metody potrzebne do zapewnienia skuteczności zarówno przebiegu jak i nadzorowania tych czynności

– sposób monitorowania, pomiaru i analizy czynności składających się na proces wykonania badania laboratoryjnego

– działania niezbędne do osiągnięcia wysokiej jakości zaplanowanych badań laboratoryjnych

– działania zmierzające do ciągłego doskonalenia badania laboratoryjnego

Proces badania laboratoryjnego obejmuje czynności:

a) przedanalizyczne (przygotowanie pacjenta do badań, przygotowanie zlecenia, pobieranie materiału do badań, transport materiału do badań, przechowywanie materiału do badań)

b) analizyczne (dobór metod badawczych, dobór aparatury pomiarowo-badawczej, kontrola jakości wyników badań)

c) poanalizyczne (opracowanie wyników badań, konsultacja wyników badań, przedstawienie i wydawanie wyników badań, zabezpieczenie próbek po zakończeniu badania).

Czynności przedanalizyczne zajmują około 56% czasu przeznaczanego na badanie, wykonuje się je manualnie i ten etap postępowania jest najczęstszym źródłem błędów. Czynności analizyczne zajmują około 35% czasu. Z kolei czynności poanalizyczne, które zajmują około 9% czasu przeznaczanego na badanie mogą być źródłem około 18% błędów.

Przedstawione czynności procesu badania laboratoryjnego należy analizować i usprawniać tak, aby zapewnić medycznemu laboratorium diagnostycznemu najwyższą efektywność i płynność toku pracy. Błędy, które mogą pojawić się w trakcie badania laboratoryjnego wynikają między innymi z:

- nieprawidłowego przygotowania pacjenta do badania / badań
- niestarannego wypisania zlecenia
- nieprawidłowego pobrania materiału do badań
- niewłaściwego oznakowania próbek
- niewłaściwego transportu materiału
- zaniedbań na etapie przyjmowania materiału do badań
- nieprawidłowego przechowywania materiału do badań
- wadliwej obróbki wstępnej materiału do badań
- niewłaściwie dobranej metody badawczej
- niewłaściwie dobranej technologii aparatury badawczo-pomiarowej
- nieprawidłowej oceny wyników kontroli badań laboratoryjnych
- wadliwie przygotowanego sprawozdania z badań

Proces usługi laboratoryjnej można opisać procedurami i instrukcjami działania, które szczegółowo przedstawiają czynności badania laboratoryjnego. Skuteczne wdrożenie procedur i instrukcji jest gwarantem zmniejszenia błędów przedanalizacyjnych, analizycznych i poanalizycznych. Większość tych czynności, które składają się na proces usługi laboratoryjnej można wystandaryzować.

Standardy jakości zawarte w rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 3 marca 2004 roku w sprawie wymagań, jakim powinno odpowiadać medyczne laboratorium diagnostyczne i w rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 23 marca 2006 roku w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych są wypełnieniem delegacji ustawowej art. 17 ust. 3 i 4 ustawy z dnia 27 lipca 2001 o diagnostyce laboratoryjnej.

W sposób uogólniony rozporządzenie z dnia 3 marca 2004 roku określa:

1. Wymagania, jakie powinny spełniać pomieszczenia i urządzenia medycznego laboratorium diagnostycznego ze szczególnym uwzględnieniem warunków sanitarnych pomieszczeń i urządzeń.

2. Wymagania fachowe wobec personelu i kierownictwa laboratorium. Zgodnie z zapisami zawartymi w tym rozporządzeniu:

a) pomieszczenia laboratorium powinny być dostosowane do rodzaju prac, jakie są w nich wykonywane, w sposób zapewniający poprawną jakość pomiarów i wiarygodność wyników

b) pomieszczenia i urządzenia laboratorium muszą gwarantować bezpieczne i higieniczne warunki pracy

c) w laboratorium wyodrębnia się:

- pomieszczenia główne
- pomieszczenia specjalne
- pomieszczenia socjalne

- pomieszczenia służące do obsługi pacjentów, w przypadku gdy na terenie laboratorium jest również pobierany materiał do badań.

d) w pomieszczeniach do wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej, bieżąco kontroluje się warunki mogące mieć wpływ na wyniki badań

e) laboratorium wyposaża się w aparaturę pomiarowo-badawczą dostosowaną do rodzaju wykonywanych badań, umożliwiającą stosowanie metod badawczych zgodnych z aktualnym stanem wiedzy.

W rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 21 marca 2006 roku zmieniającym rozporządzenie w sprawie wymagań, jakim powinno odpowiadać medyczne laboratorium diagnostyczne § 5.4 otrzymał brzmienie:

Laboratorium prowadzi dokumentację dotyczącą aparatury pomiarowo-badawczej

oraz sprzętu, stanowiących wyposażenie laboratorium zawierającą:

- 1) karty gwarancyjne;
- 2) specyfikacje techniczne;
- 3) datę rozpoczęcia eksploatacji;
- 4) wykaz pracowników przeszkolonych i upoważnionych do obsługi oraz osób bezpośrednio odpowiedzialnych za daną aparaturę lub sprzęt;
- 5) instrukcję użytkowania;
- 6) zapisy kalibracji;
- 7) instrukcje postępowania przy działaniach naprawczych i korygujących;
- 8) oświadczenie o dopuszczeniu do użytkowania po usunięciu awarii;
- 9) dane o bieżącej obsłudze i kontroli;
- 10) dane o konserwacji bieżącej i okresowej prowadzonej przez użytkowników zgodnie ze wskazaniami wytwórców lub podmioty autoryzowane przez dystrybutorów lub wytwórców.

Wymagania fachowe wobec personelu i kierownictwa laboratorium określają:

- a) kierownikiem laboratorium jest osoba, która posiada tytuł specjalisty zgodnie z profilem laboratorium
- b) osoby zatrudnione na stanowisku kierownika laboratorium nie krócej niż rok przed dniem wejścia w życie rozporządzenia i nie posiadają tytułu specjalisty, mogą być zatrudnione na tym stanowisku, jednak nie dłużej niż 4 lata od dnia wejścia w życie rozporządzenia
- c) w laboratorium zatrudnia się osoby, które posiadają kwalifikacje zawodowe odpowiadające zakresowi zadań na danym stanowisku pracy.

Drugie rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 23 marca 2006 roku w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych dotyczy:

- a) zlecenia badania laboratoryjnego
- b) pobierania materiału do badań laboratoryjnych
- c) transportu materiału do badań laboratoryjnych
- d) przyjmowania materiału do badań laboratoryjnych
- e) przechowywania materiału do badań laboratoryjnych
- f) metod badawczych
- g) kontroli jakości wyników badań laboratoryjnych
- h) przedstawienia i wydawania wyników badań laboratoryjnych

W sposób uogólniony standardy te określają wymogi następujących czynności:

Zlecenie badania laboratoryjnego

1. Laboratorium opracuje w porozumieniu z podmiotem, dla którego w sposób ciągły realizuje lub będzie realizować zlecenia badań laboratoryjnych oraz wdroży i stosuje

procedurę zlecenia badania laboratoryjnego.

2. Procedura zlecenia określa w szczególności formularz zlecenia badania laboratoryjnego, który zawiera w szczególności:

- dane pacjenta
- dane lekarza zlecającego badania
- miejsce przesłania wyniku lub dane osoby upoważnionej do odbioru wyników badań
- rodzaj materiału i jego pochodzenie
- zlecane badania
- tryb wykonywania badania
- datę i godzinę pobrania materiału do badania
- dane osoby pobierającej materiał do badania
- datę i godzinę przyjęcia materiału do laboratorium
- istotne dane kliniczne pacjenta

Pobieranie materiału do badań laboratoryjnych

1. Laboratorium opracuje, wdroży i stosuje procedurę pobierania materiału do badań oraz udostępni je stałemu zleceniodawcy, który potwierdza zapoznanie się z tymi procedurami. Sposób pobierania materiału do badań nie może wpływać na właściwości próbki.

2. Procedury te uwzględniają w szczególności wymagania:

- a) krew do badań wykonywanych rutynowo jest pobierana:
 - po wypoczynku nocnym
 - na czczo
 - przy zachowaniu dotychczasowej diety
 - przed leczeniem lub po ewentualnym odstawieniu leków mogących wpływać na poziom mierzonego składnika, o ile nie zaburza to procesu terapeutycznego
- c) mocz do badania ogólnego wykonywanego rutynowo jest pozyskiwany:
 - z pierwszej porannej mikcji
 - po wypoczynku nocnym
 - na czczo
 - przy zachowaniu dotychczasowej diety
 - przed leczeniem lub po ewentualnym odstawieniu leków mogących wpływać na poziom mierzonego składnika, o ile nie zaburza to procesu terapeutycznego

3. Procedury pobrania materiału zawierają w szczególności informacje dotyczące:
 - godzin pobierania materiału
 - sposobu pobierania materiału
 - rodzaju i objętości pobieranego materiału
 - kolejności pobierania próbek materiału
 - pojemników na materiał i ich oznakowania
 - postępowania ze sprzętem i materiałami medycznymi stosowanymi przy pobieraniu

4. Osoba pobierająca:
 - przy każdym pacjencie stosuje nową parę rękawiczek jednorazowego użytku
 - weryfikuje tożsamość pacjenta
 - oznakowuje zgodnie ze zleceniem pojemnik z materiałem

- sprawdza zgodność oznakowania ze zleceniem

- składa na zleceniu podpis potwierdzający pobranie materiału zgodnie z podstawowymi wymaganiami oraz z procedurą pobrania materiału

Transport materiału do badań laboratoryjnych

1. Materiał do badań laboratoryjnych jest dostarczany do laboratorium przez upoważnione osoby w zamkniętych probówkach lub pojemnikach, w zamkniętym opakowaniu zbiorczym oznaczonym „MATERIAŁ ZAKAŻNY”.

- 2) Dostarczenie pobranych próbek do laboratorium następuje w warunkach i w czasie ściśle odpowiadającym procedurom, które laboratorium opracuje, wdroży i stosuje oraz udostępni zleceniodawcom z uzyskaniem potwierdzenia zapoznania się z tymi procedurami.

- 3) Procedury transportu materiału zawierają w szczególności informacje dotyczące: zabezpieczenia materiału przed uszkodzeniem

- bezpieczeństwo osoby transportującej materiał
- minimalizację skutków skażenia w wypadku uszkodzenia transportowanego materiału

- opisu pojemników i opakowań zbiorczych
- przeznaczonych do transportu
- dopuszczalnego czasu transportu
- dopuszczalnego zakresu temperatury transportu
- sposobu dekontaminacji w przypadku skażenia z uwzględnieniem rodzajów materiału

Przyjmowanie materiału do badań laboratoryjnych

- 1) Laboratorium opracuje, wdroży i stosuje procedury:

- przyjmowania
- rejestrowania
- wewnętrznego oznakowania materiału do badań.

- 2) Laboratorium udostępnia zleceniodawcom procedury przyjmowania materiału do badań z uzyskaniem potwierdzenia zapoznania się oraz sprawdza zgodność zlecenia z oznakowaniem materiału oraz przydatność materiału do badania.

- 3) W przypadku stwierdzenia przez laboratorium niezgodności otrzymanego materiału do badań z wymaganiami dotyczącymi pobierania i transportu, pracownik zgłasza to kierownikowi lub osobie przez niego upoważnionej, którzy w razie potwierdzenia niezgodności mogą odmówić wykonania badania. Odmowę wykonania badania odnotowuje się w dokumentacji i zawiadamia zleceniodawcę. Dalsze postępowanie z materiałem laboratorium uzgadnia ze zleceniodawcą.

Przechowywanie materiału do badań laboratoryjnych

1. Laboratorium opracuje, wdroży i stosuje procedury przechowywania materiału do badania laboratoryjnego dla wszystkich wykonywanych badań, określając warunki i maksymalny czas przechowywania, z uwzględnieniem w szczególności aktualnej wiedzy medycznej i zaleceń wytwórców wyrobów medycznych stosowanych do diagnostyki in vitro.

Maksymalne czasy od pozyskania materiału do wykonania badania, pochodzące z dokumentu naukowego Światowej Organizacji Zdrowia „Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations & stability of blood, plasma and serum samples” (WHO/DIL/LAB/99.1 Rev. 2), opracowanego przez międzynarodową grupę ekspertów pod przewodnictwem prof. W.G. Guder (Monachium, Niemcy) zawarto w załączniku nr 3 rozporządzenia z dnia 23 marca 2006 r.

2. W przypadku gdy badanie jest wykonywane po upływie maksymalnego czasu i pozyskania materiału do wykonania badania, to w dokumentacji odnotowuje się przyczyny oraz zaznacza się na formularzu wyników fakt wykonania badania po tym czasie.

3. Laboratorium prowadzi dokumentację dotyczącą przechowywania materiału przed i po wykonaniu badania z uwzględnieniem

- miejsca
- czasu

- temperatury
- sposobów postępowania
- osób odpowiedzialnych za przechowywanie materiału

Metody badawcze

1. Laboratorium stosuje metody badawcze, które odpowiadają aktualnej wiedzy medycznej i są:

- opublikowane w piśmiennictwie międzynarodowym lub krajowym lub
- opracowane i opisane dla potrzeb danego laboratorium z uwzględnieniem udokumentowanego przez laboratorium procesu walidacji.

2. Laboratorium ustala listę wykonywanych badań i udostępnia ją zleceniodawcom z uzyskaniem potwierdzenia zapoznania się.

3. Laboratorium opracuje, wdroży i stosuje procedury stosowanych metod, które zawierają:

- cel i zasadę wykonywania badania
- wykaz wyrobów medycznych stosowanych do diagnostyki in vitro, w tym odczynników, kalibratorów i materiałów kontrolnych wraz z warunkami ich przechowywania
- instrukcje przygotowania materiału do badań
- opis postępowania analitycznego
- opis charakterystyki parametrów anality-

cznych metody zvalidowanej przez laboratorium

- wykaz czynników interferujących
- zakres biologicznych wartości referencyjnych uzyskiwanych przy stosowaniu danej metody z podaniem źródła informacji

Kontrola jakości wyników badań laboratoryjnych.

1. Każdy rodzaj oznaczenia wykonywanego przez laboratorium podlega stałej wewnątrz- i zewnątrz-laboratoryjnej kontroli jakości wyników badań.

2. Laboratorium opracuje zgodnie z aktualną wiedzą medyczną, wdroży i stosuje procedury wewnątrzlaboratoryjnej kontroli jakości wyników dla wszystkich rodzajów wykonywanych badań, w których określone są:

- rodzaje materiału kontrolnego
- częstotliwość i forma tej kontroli
- metody oceny błędów przypadkowych i błędów systematycznych

- kryteria akceptacji i zasady postępowania w przypadku dyskwalifikacji wyników kontrolnych z uwzględnieniem zaleceń Centralnego Ośrodka Badań Jakości w Diagnostyce Laboratoryjnej

3. Za prowadzenie programów kontroli jakości wyników badań odpowiada kierownik laboratorium lub wyznaczony przez niego pracownik.

4. Laboratorium stosuje materiały kontrolne o różnych poziomach ocenianego składnika.

5. Każdy niemianowany materiał kontrolny podlega wyznaczeniu wartości umownie należnych oraz rozproszenia uzyskanych wyników. Jeżeli wyniki kontrolne spełniają wymagania jakościowe, określone w procedurze kontroli jakości, to są podstawą założenia kart kontroli.

6. W przypadku gdy nie występują materiały kontrolne lub nie są dostępne, co jest poświadczane przez wytwórcę tych materiałów lub jego upoważnionego lub autoryzowanego przedstawiciela, minimalną formą kontroli jakości wyników jest kontrola powtarzalności wyników badań pacjentów.

7. Laboratorium kontroluje wielkość błędu systematycznego nie rzadziej niż raz w miesiącu oraz przy każdej możliwości jego wystąpienia, a w szczególności przy:

- zmianie serii odczynnika
- zmianie kalibracji
- pojawieniu się sygnału ostrzegawczego (np. ukierunkowane odchylenia w kontroli odtwarzalności lub zmiana średnich dziennych).

8. W przypadku stwierdzenia niezgodności lub błędów laboratorium wprowadza działania korygujące i naprawcze w swoim zakresie kompetencji.

9. Laboratorium prowadzi dokumentację

kontroli wewnątrzlaboratoryjnej, w której odnotowuje:

- wyniki oznaczeń
- stwierdzone przekroczenia dopuszczalnych zakresów błędów

podjęte działania korygujące, naprawcze i zapobiegawcze.

10. Laboratorium bierze stały udział w podstawowych programach międzylaboratoryjnej kontroli jakości organizowanych przez COBJ w Diagnostyce Laboratoryjnej. Dla badań nieobjętych podstawowymi programami bierze udział w innych programach krajowych i międzynarodowych.

11. Laboratorium poddaje kontroli międzylaboratoryjnej wyłącznie wyniki uzyskane przy wykorzystaniu aparatury pomiarowo-badawczej stanowiącej jego wyposażenie oraz wymienionych w procedurze metody badawczej wyrobów medycznych stosowanych do diagnostyki in vitro.

12. Poświadczeniu przez kierownika laboratorium podlegają:

- wyniki uzyskane w programach międzylaboratoryjnej kontroli jakości badań
- analiza wyników kontroli jakości badań z wyjaśnieniem wykazanych niezgodności
- podejmowane działania naprawcze i zapobiegawcze.

13. Dokumentacja kontroli jakości wyników badań jest przechowywana co najmniej przez 10 lat.

Przedstawienie i wydawanie wyników badań laboratoryjnych.

1. Laboratorium opracuje, wdroży i stosuje procedury wydawania wyników badań laboratoryjnych ze szczególnym uwzględnieniem informacji o wynikach znajdujących się w zakresie wartości krytycznych.

2. Formularz wyników badania laboratoryjnego jest ustalany przez laboratorium w porozumieniu ze zleceniodawcą, który zawiera w szczególności pola:

- data wydruku / wykonania badania
- rodzaj badania
- dane pacjenta
- miejsce przesłania wyniku badania lub dane osoby upoważnionej do odbioru
- dane laboratorium wykonującego badania
- data i godzina przyjęcia materiału do badań
- wyniki w formie liczbowej lub opisowej
- zakres biologicznych wartości referencyjnych
- laboratoryjna interpretacja wyników
- dane osoby autoryzującej badanie
- informacje dotyczące widocznych zmian właściwości próbki, które mogą mieć wpływ na wynik badania.

3. Wynik badania laboratoryjnego zawiera podpis i odcisk pieczęci osoby autoryzującej wynik badania z włączeniem wydawania wyniku w postaci elektronicznej.

4. Formularz wyników badania laboratoryj-

nego wypełnia się w sposób czytelny.

5. Wyniki badań laboratoryjnych przechowywane są co najmniej 10 lat.

Niniejsze standardy zostały opracowane w celu zapewnienia właściwego poziomu i jakości czynności diagnostyki laboratoryjnej, w których skład wchodzi również czynności polegające na wykonywaniu oceny jakości i wartości diagnostycznej badań oraz laboratoryjnej interpretacji i autoryzacji wyniku badań. Stanowią one opis wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej od zlecenia badania do wydania wyniku badania laboratoryjnego. Standardy jakości zawarte w obydwu rozporządzeniach zostały opracowane przez Zespół ds. Organizacji i Wdrażania Systemu Jakości w Medycznych Laboratoriach Diagnostycznych i Mikrobiologicznych powołany zarządzeniem Ministra Zdrowia przy wsparciu merytorycznym Biura Akredytacji w Ministerstwie Zdrowia oraz przy współudziale:

- konsultantów krajowych i wojewódzkich w dziedzinie diagnostyki laboratoryjnej
- Centrum Monitorowania Jakości w Ochronie Zdrowia w Krakowie
- Centralnego Ośrodka Badań Jakości w Diagnostyce Laboratoryjnej w Łodzi
- przedstawicieli Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych
- przedstawicieli Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej
- przedstawicieli Kolegium Medycyny Laboratoryjnej

Przy opracowaniu standardów jakości Zespół brał pod uwagę normę PN EN ISO/IEC 17025 : 2005 (U) "Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorujących" oraz normę PN EN ISO 15189 „Laboratoria medyczne – szczególne wymagania dotyczące jakości i kompetencji”.

Medyczne laboratoria diagnostyczne w ciągu 3 lat mają obowiązek dostosować działalność do wymagań określonych w rozporządzeniu Ministra Zdrowia z 23 marca 2006 roku w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych.

Wdrożenie przedstawionych standardów jakości w medycznych laboratoriach diagnostycznych w Polsce w ciągu trzech lat będzie ogromnym wysiłkiem dla diagnostów laboratoryjnych. Konieczne będzie opracowanie odpowiednich procedur, instrukcji i zapisów. Ogromna liczba diagnostów laboratoryjnych została już przeszkolona w zakresie tworzenia dokumentacji systemu jakości, dla wielu szkolenia takie będą konieczne. Do realizacji tych zadań środowisko diagnostów

laboratoryjnych jest dobrze przygotowane, posiada liczną kadrę wykładowców, specjalistów ds. jakości w laboratoriach medycznych i auditorów. Posiada też doskonałą bazę lokalową w budynku stanowiącym własność Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych w Warszawie przy ul. Konopackiej 4.

Przygotuję i przedstawię propozycję programu szkoleń, który powinniśmy rozpocząć w IV kwartale tego roku kalendarzowego.

W podsumowaniu pragnę wyrazić swoje przekonanie, że środowisko diagnostów laboratoryjnych wdroży standardy jakości w obowiązującym terminie. Wdrożenie standardów jakości w medycznych laboratoriach diagnostycznych i mikrobiologicznych korzystnie wpłynie na cały system ochrony zdrowia w Polsce, zarówno w kontekście bezpieczeństwa pacjentów, jak i w kontekście korzyści dla laboratoriów i podmiotów, które te laboratoria utworzyły.

UWAGA!!!

Wszystkim osobom przesyłającym do Biura KIDL kserokopie dokumentów zwracam uprzejmie uwagę, aby kserokopie te były potwierdzone za zgodność z oryginałem, przy czym kopie dokumentów można potwierdzać np.: w kadrach zakładu pracy lub u Przedstawiciela KRDL na dane województwo, względnie - odpłatnie - u notariusza. Potwierdzenie zgodności danego dokumentu z oryginałem musi być zaopatrzone w pieczęć instytucji, datę i nazwisko osoby aprobującej.

Sekretarz KRDL
Czesław Główniak

KOMUNIKAT

Zgodnie z art. 17 ustawy z 27 lipca 2001 roku o diagnostyce laboratoryjnej (Dz.U. z 2001 roku, Nr 100, poz. 1083 z późn. zm.) laboratorium nie jest do rejestru zakładu opieki zdrowotnej. Laboratorium może być także jednostką organizacyjną zakładu opieki zdrowotnej, jednostki badawczo-rozwojowej albo wyższej uczelni medycznej. Status zakładu opieki zdrowotnej laboratorium uzyskuje z chwilą wpisu do rejestru zakładów opieki zdrowotnej prowadzonego przez Wojewodów (ustawa z 30 sierpnia 1991 roku o zakładach opieki zdrowotnej - Dz.U. Nr 91, poz. 408 z późn. zm.). Tym samym laboratorium, musi uzyskać wpis do rejestru wojewody. W obecnym stanie prawnym nie jest dopuszczalne funkcjonowanie medycznego laboratorium diagnostycznego tylko i wyłącznie na podstawie wpisu do ewidencji działalności gospodarczej.

Dodatkowo, zgodnie z art. 19 ust. 2 w/w ustawy o diagnostyce laboratoryjnej

podmiot, który prowadzi laboratorium, jest obowiązany wystąpić z wnioskiem o wpis laboratorium również do ewidencji Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych; ul. Konopacka 4; 03-428 Warszawa. (tel. 022 741-21-57)

Jednocześnie uprzejmie informuję, że podmiot który udziela świadczeń zdrowotnych bez wymaganego prawem wpisu podlega karze aresztu, ograniczenia wolności albo grzywny (art. 147a kodeksu wykroczeń).

Z poważaniem Prezes KRDL

(-) Henryk Owczarek

INFORMACJA.

W związku z wypisywaniem dokumentu "Prawo Wykonywania Zawodu Diagnosty Laboratoryjnego", po raz kolejny apelujemy do wszystkich Państwa posiadających:

- stopnie naukowe (doktora, doktora habilitowanego, profesora nadzwyczajnego, profesora zwyczajnego),
- stopnie specjalizacji w danej dziedzinie i zakresie (I stopnia, II stopnia), aby w trybie bardzo pilnym przesyłali do biura KIDL brakujące kserokopie wymienionych dokumentów potwierdzonych za zgodność odpisu z oryginałem.

W przypadku niedopełnienia przez Szanownych PT Diagnostów Laboratoryjnych powinności określonych w uchwale nr 14/2003 KRDL z dnia 13 marca 2003 r. - ewentualne zmiany w dokumencie "Prawo Wykonywania Zawodu ..." związane będą z dodatkowymi kosztami, które poniosą osoby zainteresowane.

Prosimy uprzejmie, tych wszystkich PT Diagnostów Laboratoryjnych, którzy w ostatnim czasie:

- uzyskali specjalizację,
 - zmienili adres zamieszkania,
 - zmienili dowód osobisty,
 - zmienili zakład pracy,
 - zmienili stan cywilny,
- aby w trybie pilnym przesyłali do biura KIDL kserokopie (potwierdzone za zgodność odpisu z oryginałem), w/w dokumentów, zgodnie z art. 8 ust. 3 ustawy z dnia 27 lipca 2001 r. o diagnostyce laboratoryjnej (tekst jednolity: Dz. U. 2004.144.1529).

Sekretarz KRDL
Czesław Główniak

Składka członkowska w KIDL wynosi 15,00 zł

(słownie: piętnaście złotych) miesięcznie
(podstawa prawna: paragraf 1 uchwały nr 2/2003 KRDL z 13 stycznia 2003 r.)

APELUJEMY O SYSTEMATYCZNE OPLACANIE SKŁADEK

Charakterystyka szczepów *Staphylococcus aureus* z zastosowaniem metod fenotypowych.

Jacek Międzobrodzki*, Natalia Małachowa*, Tomasz Markiewski*, Anna Białecka**, Andrzej Kasprówcz**,

*) Zakład Mikrobiologii, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków,

**) Centrum Badań Mikrobiologicznych i Auto szczepionek im. Dr. Jana Bobra, ul. Sławkowska 17, 31-016 Kraków.

Wprowadzenie.

Bakterie z gatunku *Staphylococcus aureus* (gronkowiec złocisty) są wszechobecne w biosferze. Kolonizują różne środowiska, ale początek zawsze biorą od ludzi i zwierząt, gdyż rozmnażają się tylko w wyższych organizmach. U zdrowych ludzi stanowią one główny składnik mikroflory prawidłowej skóry i błon śluzowych, ale mogą także być przyczyną zakażeń endogennych lub egzogennych u osobników z predyspozycją do zakażenia. Jest to podstawą zaliczenia tych bakterii do tzw. mikroflory oportunistycznej lub względnie komensalnej. Gatunek *S. aureus* stanowi obecnie także jeden z głównych czynników etiologicznych zakażeń szpitalnych. Na początku lat sześćdziesiątych dwudziestego wieku po raz pierwszy w Europie odnotowano epidemie powodowane przez metycilinooporne szczepy tego gatunku (ang. Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* - MRSA) aby wkrótce rozprzestrzenić się na cały świat i urosnąć do rangi globalnego problemu epidemiologicznego. Oporność szczepów MRSA na wiele różnych leków, ale przede wszystkim ich oporność na działanie antybiotyków beta-laktamowych (penicylinowych) uczyniły zakażenia powodowane przez te szczepy niebывale trudne i kosztowne w leczeniu [Hacek J. wsp., 1999; Rubin i. wsp., 1999; Dzierżanowska, 2000]. Z tego względu tak dużą wagę przywiązuje się obecnie do lokalizacji źródeł zakażeń i kontroli rozprzestrzeniania się szczepów MRSA. Czynniki etiologiczne powodujące epidemię infekcji wywodzi się od pojedynczej komórki, której potomstwo jest genetycznie identyczne lub blisko spokrewnione z organizmem źródłowym (tzw. charakter klonalny czynnika etiologicznego). Mikroorganizmy, które są klonalnie pokrewne mają te same czynniki wirulencji, cechy biochemiczne oraz właściwości genomowe. Jednakże w obrębie gatunku *S. aureus* występuje znaczna różnorodność wśród występujących organizmów, które izolowane z różnych źródeł w różnym czasie oraz z różnych obszarów geograficznych można zakwalifikować do wielu różnych typów lub

szczepów.

Typowanie bakteryjnych izolatów lub podgatunków (subspeciation) jest niezbędnym narzędziem w kontroli transmisji nosicielstwa szczepów *S. aureus* oraz epidemii. Ze względu na klonalny charakter gatunku *S. aureus* niezwykle istotne jest określenie na podstawie markerów epidemiologicznych stopnia pokrewieństwa analizowanych izolatów klinicznych. Właściwie dobrana metoda typowania pozwala na uzyskanie obrazu transmisji zakażeń na badanym obszarze oraz umożliwia znalezienie źródła pochodzenia danego ustroju i tym samym prowadzi do jego skutecznej eradykacji. W trakcie długo trwającej rywalizacji człowieka z gronkowcem złocistym opracowany został szereg metod typowania określających korelacje epidemiologiczne szczepów *S. aureus* i identyfikacji szczepów należących do tego gatunku. Historycznie pierwsze zostały opracowane metody fenotypowe oparte na prezentowanych przez bakterie cechach będących wynikiem ekspresji genów oraz poniekąd oddziaływania środowiska zewnętrznego. W niniejszej pracy zostaną przedstawione metody typowania szczepów *S. aureus*, które były, a niektóre z nich są nadal stosowane w dochodzeniach epidemiologicznych oraz korelacji wśród szczepów gronkowca złocistego.

1. Biotypowanie.

W badaniach epidemiologicznych lub ekologicznych w celu precyzyjnego określenia źródła szczepu i drogi jego rozprzestrzeniania się, może zaistnieć potrzeba podania dokładniejszej charakterystyki analizowanych szczepów i podzielenia ich na jeszcze mniejsze jednostki systematyczne. System biotypowania pozwala na różnicowanie szczepów *S. aureus* ludzkich i zwierzęcych w poszczególne biotypy i warianty ekologiczne (ecovars). Biotypowanie opiera się na czterech podstawowych reakcjach, mianowicie reakcji produkcji stafylokinazy, p-hemolizyny, koagulacji osocza bydlęcego oraz typ wzrostu na agarze z fioletem krystalicznym [Devriese, 1984]. Inny system zaproponowany przez Brytyjczyków sugerował podział na sześć biotypów oznaczonych literami od A do F. Jego podstawą są różnice w produkcji metabolitów takich jak stafylokinaza (fibrylizyna), barwnik, hemolizyna alfa i beta, clumping factor, zdolność wykrępania osocza ludzkiego lub wołowego, wzrost na agarze z fioletem krystalicznym, możliwość typowania zestawem fagów a także pochodzenie [Jeljaszewicz i. wsp., 1978].

2. Serotypowanie.

Immunologiczna analiza antygenów powierzchniowych komórki, czyli metoda serotypowania szczepów *S. aureus* jest najpowszechniej wykorzystywana do określania typu serologicznego otoczki oraz typu koagulazy, [Schlichting i. wsp., 1993]. Pomimo że zostało zidentyfikowanych 11 typów otoczkowych dla gatunku *S. aureus*, aż 85-90 % klinicznych izolatów MRSA należy do 5 lub 8 serotypu otoczkowego [Watts i. wsp., 2005]. Tak więc metoda ta ma niską siłę różnicującą i stosowana jest tylko w Japonii [Łopaciuk i Dzierżanowska, 2002]. Pomimo to typowanie serologiczne może być metodą uzupełniającą do innych metod typowania szczepów *S. aureus*. U bakterii tych znanych jest obecnie ponad trzydzieści aglutynogenów (występujących na powierzchni komórki różnych determinant antygenowych wielocukrowych i białkowych). W oparciu o te aglutynogeny stosuje się dwie metody typowania serologicznego: metodę Oedinga i Haukenesa oraz metodę Pilleta [Jeljaszewicz i. wsp., 1978]. W obu tych metodach bada się aglutynację szczepów z surowicami typowymi lub wzorcowymi. W pierwszej metodzie zastosowanie znajduje czternaście surowic wzorcowych. Wychodząc z założenia, że każdy szczep ma na swej powierzchni kilka aglutynogenów, ma miejsce fakt, że może być aglutynowany przez kilka surowic. W ten sposób uzyskuje się wzór serologiczny dla pojedynczego szczepu. Drugą metodą - Piletą, opiera się też na ok. czterech surowicach typowych, z których każda aglutynuje szczep tylko jednego typu. Niewątpliwą zaletą typowania serologicznego tymi metodami jest stabilność aglutynogenów i możliwość typowania szczepów dających się typować fagami. Wadą tej metody to brak standardów typowania kontrolowanych przez jeden ośrodek referencyjny.

3. Typowanie bakteriofagowe.

Koncepcja typowania gronkowców przy pomocy bakteriofagów została opracowana w latach czterdziestych XX wieku. Fagi wyróżnia określona swoistość (lytic spectrum), a bakterie posiadają określony wzór fagowy (phage pattern), gdyż lizowane są przez określone fagi. Jest to podstawą do wyróżnienia fagowych grup, a także odpowiadających im grup bakterii, typujących się tymi fagami. Do typowania ludzkich szczepów gatunku *S. aureus* stosuje się międzynarodowy zestaw fagów tworzących cztery podstawowe grupy, od I do IV, oraz dodatkową grupę mieszaną [Jeljaszewicz i. wsp., 1978]. System typowania fagami został wystandaryzowany przez International Subcommittee on Phage Typing of

Staphylococci [Parker, 1972]. Od tego czasu stosuje się międzynarodowy zestaw 23 bakteriofagów. Częstość dodatkowo używa się dwóch miejscowo wyselekcjonowanych fagów, które stają się bardzo pomocne w typowaniu szczepów, które nie reagują na międzynarodowy zestaw fagowy. Liza komórek bakteryjnych powodowana przez bakteriofagi prowadzi do powstawania tzw. lysinek. Rozróżnia się dwa typy reakcji typowania bakteriofagami, reakcję silną i słabą. O reakcji silnej mówi się wtedy, gdy liczba powstałych lysinek na szalce przekracza pięćdziesiąt. Podczas typowania uzyskuje się niekiedy wynik reakcji słabej, jednak do określania pokrewieństwa badanych szczepów wykorzystuje się jedynie wynik uzyskany w reakcji silnej. Tylko taki jest wynikiem brany pod uwagę i statystycznie istotny. Jeśli u gronkowców nie obserwuje się lizy komórek w trakcie zastosowania standardowego rozcieńczenia (RTD - Routine Test Dilution) wówczas stosuje się stu krotnie wyższe stężenie fagów (100 x RTD).

Przez wiele lat metoda typowania bakteriofagami była powszechnie stosowaną metodą dla typowania szczepów gatunku *S. aureus* i do kontroli epidemiologii szczepów MRSA. Kilka epidemii zostało zidentyfikowanych właśnie dzięki tej metodzie, która ma zdecydowanie lepszą siłę dyskryminującą niż inne metody fenotypowe, np. zymotypowanie czy określenie typu otoczkowego. [Kerr i wsp., 1990; Richardson i Reith, 1993; Cox i wsp., 1995; Piechowicz i Galiński, 2005].

Wartość tej metody w odniesieniu do szczepów MRSA obniża wysoki odsetek szczepów nietypujących się podstawowym zestawem fagów. Niektóre źródła donoszą, że około 20-30 % szczepów MRSA nie poddaje się typowaniu bakteriofagami [Bannerman i wsp., 1995; Schlichting i wsp., 1993], ale wyniki uzyskane przez Khalifa i wsp. wskazują, że populacja szczepów MRSA nie dających się typować fagami może stanowić nawet 75% wszystkich wyizolowanych szczepów [Khalifa i wsp., 1989]. W związku z tak wysokim odsetkiem szczepów nietypujących się wartość uzyskiwanych informacji o pokrewieństwie szczepów jest znacząco zaniżona ze względu na niemożność określenia stopnia pokrewieństwa szczepów nie typowanych. Wartość tej metody jest także znacznie ograniczona poprzez brak powtarzalności uzyskiwanych wyników. Te same szczepy mogą dawać różne wyniki kiedy są typowane na przestrzeni czasu. Problem ten narasta wówczas, gdy przeprowadza się długo terminowe badania nad kolekcją szczepów. Ograniczona powtarzalność testu, olbrzymi

nakład pracy powiązany z utrzymaniem fagów i jakości kontroli oraz występowanie szczepów niedających się typować fagami, obniżyły znaczenie tej metody w ciągu ostatniego dziesięciolecia.

4. Antybiogram - ocena profilu lekowrażliwości.

Typowanie na podstawie profilu lekowrażliwości/lekooporności stanowi obok fagotypowania podstawową metodę różnicowania szczepów *S. aureus* wśród kilku metod fenotypowych [Blanc i wsp., 1994]. Metoda ta zyskała szerokie uznanie w placówkach diagnostycznych dzięki swojej względnej łatwości wykonania, a co ważniejsze jako jedna z nielicznych metod jest metodą wystandaryzowaną. Polskie laboratoria, podobnie jak wiele innych na świecie, posługują się standardami NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards (Approved Standards - Fifth Edition NCCLS document M7-A5, 2000)), co umożliwia porównywanie wyników pomiędzy różnymi ośrodkami diagnostycznymi na świecie. Na podstawie obecności lub braku cech oporności, szczepy mogą być różnicowane lub grupowane do tego samego klonu [Blanc, 1996]. Wzór oporności bakterii na antybiotyki w pewnej mierze zależy od środowiska w jakim znajdują się dane szczepy. W związku z tym identyczne antybiogramy mogą charakteryzować szczepy niespokrewnione jako wynik podobnej selektywnej presji otoczenia. Równorzędnie może zachodzić sytuacja odwrotna, w której izolaty tego samego klonu mogą przejawiać różne wzory lekowrażliwości w związku z nabyciem lub utratą plazmidów niosących geny oporności [Blanc i wsp., 1996; Gillespie i wsp., 1990; Tenover i wsp., 1994]. W większości przypadków, antybiogram nie może być użyty jako podstawowa metoda typowania szczepów MRSA. Jednak czasami wzór wrażliwości endemicznego lub epidemicznego klonu może być tak różniący się w obrębie badanej populacji, że antybiogram będzie wystarczającą metodą do wyselekcjonowania takiego szczepu. W badaniach rutynowych znajduje zastosowanie dyfuzyjno-krążkowa metoda oznaczania wrażliwości szczepów na antybiotyki, zwana od nazwisk jej autorów metodą Kirby-Bauera. Rodzaj i stężenie antybiotyku w krążku, który stosuje się przy badaniu wrażliwości gronkowców, zależy od pochodzenia szczepu.

5. Elektroforeza białek,

5. 1. Analiza profilu białek komórkowych - proteomu.

Rozwój technik elektroforetycznych pozwala porównywać szczepy w oparciu

o różnice białek komórkowych powierzchniowych i wydzielniczych lub wszystkich białek po uprzednim zlizowaniu komórek. Analiza wszystkich białek komórkowych otrzymanych po degradacji komórek poddanych działaniu lizostafiny może być wykonana techniką elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (PAGE). Wynikiem takiego rozdziału elektroforetycznego jest powtarzalny charakterystyczny wzór złożony z około pięćdziesięciu prążków [Thomson-Carter i Pennington, 1989; Gaston i wsp., 1988; Costas i wsp., 1989]. Uzyskiwane tą metodą różnice pomiędzy niespokrewnionymi szczepami MRSA są nieznaczne, co z kolei powoduje, iż siła różnicująca takiej metody jest niewielka. Niska niekiedy powtarzalność takich rozdziałów elektroforetycznych a tym samym niemożność porównania próbek szczepów z różnych źeli otrzymanych po analizie elektroforetycznej oraz niska korelacja wyników z innymi metodami, np. typowaniem przy pomocy bakteriofagów, stawia tę metodę w rzędzie technik o niewysokiej przydatności do typowania szczepów *S. aureus*, a zupełnie niskiej do MRSA na szerszą skalę [Weller, 2000].

5. 2. Immunoblotting.

Jednym ze sposobów udoskonalenia analizy białek jest wykonanie reakcji Western Blot z użyciem znakowanych przeciwciał antygronkowcowych z rozdzielonymi w trakcie elektroforezy antygenami tego szczepu. Źródłem takich przeciwciał może być zarówno surowica królicza po wcześniejszej ekspozycji zwierzęcia na *S. aureus* jak i mieszana surowica ludzka, przy założeniu, że wystarczająca liczba dawców miała kontakt z patogenem. Immunoblotting jest mniej niż poprzednio omówiona analiza białek komórkowych podatny na zmiany warunków podczas elektroforezy, i daje niższą liczbę prążków, przez co interpretacja wyników staje się łatwiejsza i jednoznaczna. Wszystkie szczepy *S. aureus* są typowalne tą metodą, chociaż podczas epidemii metoda może nie dawać wystarczającego zróżnicowania, aby prawidłowo wykluczyć niespokrewnione izolaty [Burnie i wsp., 1989; Mulligan i wsp., 1988; Gaston i wsp., 1988; Tenover i wsp., 1994].

5. 3. MLEE (ang. Multilocus Enzyme Electrophoresis).

Metoda MLEE pozwala na wykrycie allelicznego zróżnicowania wśród zarówno ludzkich jak i zwierzęcych patogenów, w tym także szczepów gronkowca złocistego. Typowanie metodą MLEE oparte jest na polimorfizmie badanych enzymów komórkowych. Stopień migracji poszczególnych białek zależy bezpośrednio od ich

składu aminokwasowego, w związku z czym, ponad 80% jednostkowych zmian w składzie aminokwasowym jest wykrywane poprzez zmiany własności elektroforytycznych badanych białek. Zmienność enzymatyczna jest odzwierciedleniem różnic genetycznych powstałych w loci tych enzymów. Szczepy bakteryjne mogą zostać zaklasyfikowane do poszczególnych typów elektroforetycznych (ET) na podstawie otrzymanych wzorów elektroforetycznych. Natomiast stopień pokrewieństwa izolatów jest określany na podstawie podobieństw i różnic występujących w profilu elektroforetycznym tych izolatów.

W przypadku diagnostyki szczepów MRSA wszystkie izolaty są typowalne, a powtarzalność metody jest zadawalająca. Siła różnicująca tej metody zależy jednak w pewnej mierze od tego, które enzymy zostały wybrane do analizy, gdyż niektóre z nich mogą okazać się monomorficzne nawet w obrębie znacznej kolekcji przebadanych szczepów. Całkowita liczba analizowanych enzymów waha się w granicach od dwunastu do dwudziestu, ale względna siła różnicująca każdego z nich nie została do tej pory oceniona [Tenover i wsp., 1994; Musser i Kapur, 1992; Opal i wsp., 1990]. Tak więc nie jest możliwe stwierdzenie, jaka będzie optymalna kombinacja enzymów pozwalająca na prawidłowe zróżnicowanie szczepów.

5.4. Zymotypowanie.

Jako jedna z odmian MLEE, zymotypowanie opiera się na polimorfizmie enzymów gronkowcowych należących do grupy lipaz, esteraz. Branger i wsp. zidentyfikowali trzy typy esteraz A, B i C. Polimorfizm enzymów jest określany na podstawie różnic w ruchliwości elektroforetycznej w żelu poliakrylamidowo-agarozowym powodowanych różnym zakresem aktywności wobec pięciu syntetycznych substratów: et- i p-octanu naftyłu, octanu indoksyłu oraz a- i p-maślanu naftyłu, a także oporności na dwuizopropylu fluorofosforan [Branger i Goulet, 1987]. Podobnie jak w metodzie MLEE szczepy są typowane na podstawie obserwowanych różnic w ruchliwości elektroforetycznej esteraz wyizolowanych z badanych szczepów *S. aureus*. Większość doniesień na temat przeprowadzonych badań z użyciem tej metody pochodzi od pojedynczego zespołu badawczego, który stosował tę metodę do typowania kolekcji szczepów *S. aureus* zarówno wrażliwych jak i opornych na metycilinę. Zostało wówczas wyodrębnionych dwadzieścia sześć zymotypów, z których czternaście należało do szczepów MRSA. Jak do tej pory wszystkie szczepy są typowalne, a otrzymywany wzór jest powtarzalny

i niezmienny. Trudno jest jednak jednoznacznie stwierdzić czy podobieństwa wśród esteraz są odzwierciedleniem pokrewieństw genetycznych pomiędzy tymi szczepami [Branger i Goulet, 1987; Branger i Goulet, 1989; Schlichting i wsp., 1993].

6. Identyfikacja gatunkowa *S. aureus* w laboratorium diagnostycznym.

Materiały kliniczne diagnozowane pod kątem obecności *S. aureus* można posiewać na podłoże agarowe z 5% krwią barania, lub podłoże wybiórcze np. podłoże Chapmana lub Baird Parkera. Charakterystyczne kolonie gronkowców izolowane z odpowiednich podłoży poddaje się dalszej szczegółowej analizie. W rutynowej diagnostyce laboratoryjnej, w identyfikacji gronkowców do gatunku, stosuje się metody biochemiczne, pozwalające na wykrycie:

- białka CF (clumping factor) - test szkiełkowy z plazmą króliczą;
- koagulazy wolnej - test próbówkowy z rozcieńczoną plazmą króliczą; DNA-zy termotabilnej;
- wykrycie jednoczesne CF, białka A, a niekiedy antygenów otoczki polisacharydowej, przy zastosowaniu lateksowych testów komercyjnych; cech biochemicznych z zastosowaniem komercyjnych testów diagnostycznych. Tak zidentyfikowane szczepy w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej mogą być poddane dalszym metodom analizy genetycznej stosowanym w dochodzeniach epidemiologicznych (Hryniewicz, 1999; Szwedczyk, 2005).

Podsumowanie

Konwencjonalna identyfikacja gatunków gronkowców oparta jest na charakterystyce morfologicznej, właściwościach fizjologicznych oraz chemicznym składzie ściany komórkowej [Bannerman i wsp., 1995; Brun i wsp., 1990; Ieven i wsp., 1995; Kloos i wsp., 1991; Renneberg i wsp., 1995]. Ogólna dokładność konwencjonalnych testów jest niska i mieści się w przedziale od 50 do 70% [Grant i wsp., 1994; Ieven i wsp., 1995; Perl i wsp., 1994; Renneberg i wsp., 1995]. Ze względu na to, że fenotyp charakteryzujący dany szczep powstaje dzięki współdziałaniu genotypu bakterii oraz czynników środowiskowych, dochodzić może do sytuacji kiedy szczepy niespokrewnione, pod wpływem działania selekcyjnej presji środowiska zewnętrznego, będą charakteryzowały się identycznymi profilami, co z kolei będzie prowadziło do błędnego określenia korelacji epidemiologicznych zachodzących pomiędzy tymi szczepami. Zatem opracowanie metod szybkiej i dokładnej identyfikacji gronkowców stało się niezwykle ważne, gdyż umożliwia wcześnie

wykrywanie ich potencjalnej zdolności do powodowania określonego stanu chorobowego, ustalenie wrażliwości na antybiotyki oraz może być pomocne w wyjaśnieniu klinicznego znaczenia każdego gatunku.

Obecnie czołową rolę w typowaniu bakterii, a w tym także i gatunku *S. aureus* przejęły metody molekularne oparte na analizie genomu bakteryjnego [Malachowa i wsp., 2005; Sabat i wsp., 2006]. Natomiast diagnostyczne metody fenotypowe odgrywają istotną rolę w określeniu rodzaju i gatunku analizowanych szczepów oraz pełnią funkcję metod pomocniczych w typowaniu epidemiologicznym.

Największe wyzwanie stanowi przeprowadzenie analizy, która miarodajnie i rzetelnie będzie grupować szczepy epidemiologicznie spokrewnione oraz wyróżniać je od szczepów niespokrewnionych. Zwyczajowo systemy typowania stosuje się do analizy epidemiologii szpitalnych, ale są one także pomocne w leczeniu pacjentów i pozwalając określić, czy dana infekcja jest infekcją pierwotną czy też nawracającą. Metody typowania przede wszystkim jednak umożliwiają poznanie i zrozumienie epidemiologii zakażeń.

Piśmiennictwo

1. Bannerman T.L., Hancock G.A., Tenover F.C., Miller J.M. 1995 Pulsed field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 33:551-555.
2. Blanc D.S., Petignat C., Moreillon P., Wenger A., Bille J., Francioli P. 1996 Quantitative antibiogram as a typing method for the prospective epidemiological surveillance and control of MRSA: Comparison with molecular typing. Infect. Contr. Epidemiol. 17: 654-659.
3. Blanc D.S., Lugeon C., Wenger A., Siegrist H. H., Francioli P. 1994 Quantitative antibiogram typing using inhibition zone diameters compared with ribotyping for epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 32:2505-9.
4. Branger C., Goulet P. 1987. Esterase electrophoretic polymorphism of methicillin-sensitive and methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol. 24:275-281.
5. Branger C., Goulet P. 1989. Genetic heterogeneity in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* revealed by esterase electrophoretic polymorphism. J. Hosp. Infect. 14: 125-134.
6. Brun Y., Bes M., Boeufgras J.M., Monget D., Fleurette J., Auckenthaler R., Devriese L.A., Kocur M., Marples R.R., Piemont Y., 1990. International collaborative evaluation of the ATB 32 staph gallery for identification of the *Staphylococcus* species. Zentbl. Bakteriol. 273:319-326.
7. Bumie J.P., Matthews R.C., Lee W., Murdoch D. 1989 A comparison of immunoblot and DNA restriction patterns in characterizing methicillin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol. 29: 255-261.
8. Costas M., Cookson B.D., Talsania H., Owen R. 1989. Numerical analysis of electrophoretic protein patterns of methicillin-resistant strains of

Staphylococcus aureus. J. Clin. Microbiol. 27: 2574-2581.

9. Cox R.A., Conquest C., Mallaghan C., Marples R.R. 1995 A major outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* caused by a new phage-type (EMRSA-16). J. Hosp. Infect. 29:87-106.

10. Devriese L.A. 1984. A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal species. J. Appl. Bacteriol. 56:215-20.

11. Dzierżanowska D. 2000. Antybiotykoterapia praktyczna, a-medica press, Bielsko-Biala.

12. Gaston M.A., DufT P.S., Naidoo J., EHis K., Roberts J.L., Richardson J.F., Marples R.R., Cooke E.M. 1988. Evaluation of electrophoretic methods for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol. 26: 189-197.

13. Gillespie M.T., Lyon B.R., Skurray R.A. 1990. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antibiotic resistance phenotypes. J. Med. Microbiol. 31:57-64.

14. Grant C.E., Sewell D.L., Pfaller M., Bumgardner R.V., Williams J.A. 1994. Evaluation of two commercial systems for identification of coagulase-negative staphylococci to species level. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 18:1-5.

15. Hack D. M., Suriano T., Noskin G. A., Kruszynski J., Reisberg B., Peterson L. R. 1999. Medical and economic benefit of a comprehensive infection control program that includes routine determination of microbial clonality. Am. J. Clin. Pathol. 111:647-54.

16. Hryniewicz W. 1999. Epidemiology of MRSA. Infection 27:3-6.

17. Ieven M., Verhoeven J., Pattyn S.R., Goossens H. 1995. Rapid and economical method for species identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. J. Clin. Microbiol. 33:1060-1063.

18. Jęlaszewicz J., Cybulska J., Dziarski R., Hryniewicz W., Ludwicka A., Świtalski L.M. 1978. Ziarenkowce gram-dodatnie: biologia, rozpoznanie i różnicowanie. Państwowy Zakład Higieny, Warszawa.

19. Kerr S., Kerr G.E., Mackintosh C.A., Marples R.R. 1990. A survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* affecting patients in England and Wales. J. Hosp. Infect. 16: 35-48.

20. Khalifa L., Heiba A.A., Hancock G. 1989. Nontypeable bacteriophage patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* involved in a hospital outbreak. J. Clin. Microbiol. 27: 2249-2251.

21. Kloos, W.E., Schleifer K.H., Gotz F., 1991. The genus *Staphylococcus*, p. 1369-1420. W: A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (red.), The prokaryotes. Springer-Verlag, New York, N. Y.

22. Łopaciuk U., Dzierżanowska D. 2002. Gronkowce metycylinooporne: mechanizmy oporności, czynniki zjadliwości oraz metody genotypowania. Post. Mikrobiol. 41:401-418.

23. Malachowa N., Sabat A., Gniadkowski M., Krzysztoń-Russjan J., Empel J., Miedzobrodzki J., Kosowska-Shick K., Appelbaum P.C., Hryniewicz W. 2005. Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, spa typing and multilocus sequence typing for clonal characterization of *Staphylococcus aureus* isolates. J. Clin. Microbiol. 43:3095-3100.

24. Mulligan M.E., Kwok R.Y.Y., Citron D.M., John J.F., Smith P.B. 1988. Immunoblots, antimicrobial resistance and bacteriophage typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 26: 2395-

2401.

25. Musser J.M., Kapur V. 1992. Clonal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: association of the *mec* gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. J. Clin. Microbiol. 30: 2058-2063.

26. Opal S.M., Mayer K.H., Stenberg M.J., Blazek J.E., Miokolich D.J., Dickensheets D.L., Lyhte L.W., Trudel R.R., Musser J.M. 1990. Frequent acquisition of multiple strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by healthcare workers in an endemic hospital environment. Infect. Contr. Hosp. Epidemiol. 11: 479-485.

27. Parker M.T. 1972. Phage-typing of *Staphylococcus aureus*, str 1-28. Wyd. Norris J.R., Ribbons D. W. W: Methods in microbiology. Academic Press, London.

28. Perl T.M., Rhomberg P.R., Bale M.J., Fuchs P.C., Jones R.N., Koontz F.P., Pfaller M.A. 1994. Comparison of identification systems for *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative *Staphylococcus* species. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 18:151-155.

29. Piechowicz L., Galiński J., Dajnowska-Stanczewa A., Garbac/ K. 2005. Phage types of *Staphylococcus aureus* isolated in Poland in 1999-2004. Med. Dośw. Mikrobiol. 57:109-113.

30. Renneberg, J., Rieneck K., Gutschik E. 1995. Evaluation of Staph ID 32 system and Staph-Zym system for identification of coagulase-negative staphylococci. J. Clin. Microbiol. 33:1150-1153.

31. Richardson J.F., Reith S. 1993. Characterization of a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (EMRSA-15) by conventional and molecular methods. J. Hosp. Infect. 25: 45-52.

32. Rubin R. J., Harrington C. A., Poon A., Dietrich K., Greene J. A., Moiduddin A. 1999. The economic impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York City Hospitals. Emerg Infect Dis 5:9-17.

33. Sabat A., Melles D.C., Mertirosian G., Grundmann H., van Belkum A., Hryniewicz W. 2006. Distribution of the serine-aspartate repeat protein-encoding *sdr* genes among nasal-carriage and invasive *Staphylococcus aureus* strains. J. Clin. Microbiol. 44:1135-1138.

34. Schlichting C., Branger C., Fournier J.M., Witte W., Boutonnier A., Wolz C., Goulet P., Doring G. 1993. Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing and phage typing: resolution of clonal relationships. J. Clin. Microbiol. 31: 227-232.

35. Szewczyk E.M. 2005. Diagnostyka bakteriologiczna. PWN Warszawa.

36. Thomson-Carter F.M., Pennington T.H. 1989. Characterisation of methicillin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* by analysis of whole-cell and exported proteins. J. Med. Microbiol. 28: 25-32.

37. Tenover F.C., Arbeit R., Archer G., Biddle J., Byrne S., Goering R., Hancock G., Hebert G.A., Hill B., Iolliis R. 1994. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 32: 407-415.

38. Watts A., Ke D., Wang Q., Pillay A., Nicholson-Weller A., Lee J. C. 2005. *Staphylococcus aureus* strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence. Infect Immun. 73:3502-11.

39. Weller T.M.A. 2000. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: which should be the international standard. J. Hosp. Infect. 44: 160-172.

OPINIE PRAWNE RADCY PRAWNEGO KIDL Grażyna Filipowska-Kejna WA 1376

Opinia w sprawie zatrudnienia na stanowisku kierownika laboratorium osoby nie posiadającej wymaganych kwalifikacji.

Zgodnie z § 6 rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 3.03.2004r. w sprawie wymagań jakim powinno odpowiadać medyczne laboratorium diagnostyczne /Dz.U nr 43 poz 408/ kierownik laboratorium musi posiadać specjalizację zgodną z profilem laboratorium. Dopiero w § 8 określono, że musi to być specjalizacja II stopnia. Specjalizacja nie jest natomiast wymagana do wykonywania zawodu diagnosty, wystarczy ukończenie, np. studiów magisterskich na kierunku analityka medyczna. Osoba, która stara się dopiero o specjalizację nie może podjąć pracy na takim stanowisku. Pracodawca ma jednak obowiązek zgodnie z art. 17. Kodeksu pracy ułatwić diagnozę uzupełnienie kwalifikacji poprzez specjalizację.

03.02.2006

Opinia w sprawie zatrudnienia na stanowisku młodszego asystenta osoby po licencjacji.

Zgodnie z pkt. 3a i 3b załącznika do rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 3.03.2004r. w sprawie wymagań jakim powinno odpowiadać medyczne laboratorium diagnostyczne /Dz.U nr 43 poz 408/ młodszym asystentem może być osoba posiadająca ukończone studia wyższe mające zastosowanie w diagnostyce. Przepis nie wymaga aby były to studia wyższe magisterskie jak w przypadku stwierdzenia prawa wykonywania zawodu diagnosty. Dlatego też licencjat na kierunku biologii może zostać zatrudniony na stanowisku młodszego asystenta jednak bez studiów magisterskich na tym kierunku oraz kształcenia podyplomowego w zakresie analityki medycznej nie będzie mógł uzyskać tytułu diagnosty laboratoryjnego.

21.04.2006

Opinia w sprawie dyżurów tzw. „pod telefonem.” w zakładach opieki zdrowotnej.

Zgodnie z art 32k ustawy o zoz osoby wykonujące zawód medyczny i posiadający wyższewyksztalcenie mogą być zobowiązani do pozostawiania poza zakładem pracy w gotowości do wykonania świadczeń zdrowotnych /dyżur pod telefonem/. Za każdą godzinę pozostawiania w gotowości do udzielania świadczeń pracownik otrzymuje wynagrodzenie w wysokości 50% swojej stawki godzinowej za każdą godzinę. Jeżeli zostanie wezwany do zakładu do wykonania świadczenia wynagrodzenie wynosi już 130% stawki godzinowej.

21.04.2006

**INFORMACJA
DLA PT DIAGNOSTÓW
LABORATORYJNYCH POSIADAJĄ-
CYCH UPRAWNIENIA DO
ZMNIEJSZENIA LUB
ZAWIESZENIA PŁATNOŚCI
SKŁADEK CZŁONKOWSKICH.**

Uprzejmie informuję, że w dniu 17 grudnia 2004 r. na X Posiedzeniu KRDL, została podjęta znowelizowana i ujednolicona w jednym dokumencie oraz odpowiadająca potrzebom PT Diagnostów, uchwała nr 62/2004 KRDL w sprawie zawieszenia obowiązku płatności składki członkowskiej na rzecz Korporacji lub zmniejszenia jej wysokości.

ZAWIESZENIE płatności składek w myśl w/w Uchwały dotyczy tych z Państwa, którzy:

- utracili pracę (paragraf 1 ust. 1),
 - pozostają na urlopie wychowawczym nie wykonując czynności na podstawie umowy o pracę lub umowy cywilnoprawnej (paragraf 1 ust. 2),
 - wykonują czynności diagnostyki laboratoryjnej w ramach wolontariatu bez pobierania wynagrodzenia (paragraf 1 ust. 3),
- ZMNIEJSZENIE** wysokości składek członkowskich o 50% dotyczy natomiast osób, 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 zainteresowanych diagnostów.

Dotychczasowe Uchwały nr 21/2003, 28/2003 i 32/2003 tracą swoją moc prawną. Zainteresowane osoby powinny przesyłać do Biura KIDL pisemne wnioski wraz z właściwymi dokumentami (np.: decyzja PUP, zaświadczenie o urlopie wychowawczym, umowa wolontariatu, decyzja ZUS w sprawach emerytalno - rentowych).

Sekretarz KRDL
Czesław Główniak

Diagnosty laboratoryjni od kilku miesięcy mogą nabywać uprawnienia specjalizacyjne. Wśród pierwszych laureatek z laboratoryjnej transfuzjologii medycznej 6 diagnostek złożyły państwowy egzamin specjalizacyjny i uzyskały tytuł specjalisty dnia 30 maja 2006 r.

To pierwsze tytuły specjalizacyjne z tej dziedziny diagnostyki laboratoryjnej w Polsce.

Wśród tych pionierek są:

- z Rzeszowa PT Panie mgr Wanda Zimny i mgr Urszula Kulpa;
- z Wrocławia PT Pani dr n. med. Elżbieta Klauza, zaś PT Pani mgr Małgorzata Watman-Danielkiewicz jest ze Słupska, a także lekarki medycyny PT Panie Anna Lipińska ze Szczecina i Monika Fabisz-Kołodzińska z Zielonej Góry.

Wszystkim składamy szczególne gratulacje i cieszy nas, że diagnosty laboratoryjni osiągają kolejne dostępne specjalizacje medyczne.

Prezes KRDL
Henryk Owczarek.

**KOMUNIKAT RZECZNIKA
DYSCYPLINARNEGO KIDL
KOMUNIKAT RZECZNIKA
DYSCYPLINARNEGO KIDL**

Rzecznik Dyscyplinarny KIDL nie odpowiada na telefony i anonimowe pisma. Uprzejmie informuję, że zainteresowane osoby i strony kierujące do Rzecznika Dyscyplinarnego KIDL (ul. Konopacka 4, 03-428 Warszawa) 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 laboratoryjnych. DANE TE POZOSTAJĄ WYŁĄCZNIE W DYSPOZYCJI I DO INFORMACJI RZECZNIKA DYSCYPLINARNEGO KIDL.

Rzecznik Dyscyplinarny KIDL
Ewa Tuszevska

KOMUNIKAT!!!

Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych przypomina wszystkim Koleżankom i Kolegom diagnostom laboratoryjnym, że wszelkie oficjalne informacje dotyczące diagnostów laboratoryjnych i diagnostyki laboratoryjnej (między innymi wszystkie uchwały KRDL, ważne opinie Rady Prawnego KIDL, ważne akty prawne, ważne dla każdego informacje, także dotyczące składek członkowskich, itp.) są opublikowane w poszczególnych numerach Gazety KIDL "Diagnosta Laboratoryjny". Gazeta jest bezpłatnie rozsyłana na adresy domowe do wszystkich PT Diagnostów Laboratoryjnych.

Zwracamy się z prośbą o wnikliwe zapoznawanie oraz posługiwanie się podanymi w gazecie informacjami. Z bezpośrednich rozmów telefonicznych, a także z korespondencji przesyłanej do biura KIDL droga pocztową i elektroniczną wynika, że nie wykorzystujecie Państwo materiałów tam zawartych. Rodzi to - naszym zdaniem - niepotrzebne długie telefoniczne i pisemne wyjaśnianie spraw, które nurtują PT Diagnostów, a są one już powszechnie dostępne oraz opublikowane na łamach gazety, biuletynu, czy też na naszych stronach internetowych. Sytuacja taka powoduje również i to, że ponosicie Państwo niepotrzebne koszty związane z rozmowami telefonicznymi i innymi formami kontaktu.

KIDL jest zawsze do dyspozycji Państwa i zawsze służymy wszelką pomocą, również w sprawach innych niż już opublikowane i podane do publicznej wiadomości w różnych formach medialnych. Przesyłając korespondencję do biura KIDL prosimy zawsze o posługiwanie się numerem wpisu na listę diagnostów laboratoryjnych oraz podawanie aktualnego adresu do korespondencji, a także co jest oczywiste - swoich danych osobowych.

Sekretarz KRDL
Czesław Główniak

**INFORMACJA DLA PT
DIAGNOSTÓW
LABORATORYJNYCH**

Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych w siedzibie, ul. Konopacka 4 w Warszawie dysponuje aktualnie 15 miejscami noclegowymi dla Diagnostów Laboratoryjnych na czas pobytu w Warszawie z okazji udziału w szkoleniach specjalizacyjnych i kursach. KIDL ma przygotowane pokoje, w których są wygodne warunki do noclegów (bez pościeli) i ewentualnego dziennego pobytu dla zamiejscowych diagnostów laboratoryjnych na czas szkolenia. Nocleg bez zobowiązań finansowych.

Zgłaszający, posiadający uregulowane składki członkowskie, kontaktuje się telefonicznie z Panem Jarosławem Wrzosem (tel. kom.: 607 875 660).

Kierownik Biura KIDL
Stanisław Kręzel