

Diagnosta Laboratoryjny

GAZETA KRAJOWEJ IZBY
DIAGNOSTÓW LABORATORYJNYCH

Rok 4, numer 3 (11)
Sierpień 2006

GAZETA
BEZPŁATNA

***Diagności
Laboratoryjni
kandydatami
do samorządu
terytorialnego***



Gazetę „Diagnosta Laboratoryjny”, którą Państwo otrzymają, traktować chcemy jako wydanie wakacyjne. Zawrzeć w niej chcę, i kieruję, szczególny apel do Państwa.

Miesiące, które będą nas zbliżać do końca 2006 roku, będą także szczególne, z tytułu odpowiedzi, które będziemy musieli znaleźć i dać, tak dla rozwiązań dla naszego kraju, jak i dla naszego zawodu.

Czekają nas wybory do władz samorządowych - wspólnoty zawodowej. Czekają nas wybory do władz samorządowych samorządu lokalnego, samorządu terytorialnego. To są te właściwe powody, dla których kieruję apel do wszystkich diagnostów laboratoryjnych.

Obok wyborów do władz samorządowych czekają nas również wybory delegatów na II Krajowy Zjazd Diagnostów Laboratoryjnych. Mijają cztery lata, kiedy funkcjonujemy w gronie zawodów zaufania publicznego. Ten wyznacznik, jakim jest zaufanie publiczne, tworzy uzasadnienie do mego apelu, kierowanego, do Państwa. Nie spoczywają na nas, na diagnostach laboratoryjnych, pomówienia i potrzeba dokonania lustracji w naszych zespołach, ponieważ służyliśmy i pracowaliśmy przez wiele dziesięcioleci w mało eksponowanych strukturach służby zdrowia; mimo, że od naszej pracy zależało często, a właściwie zawsze, rodzaj skutecznej terapii podjętej wobec pacjenta.

A jednak niewielu było w strukturach służby zdrowia takich osób, którzy chcieli oddać należny szacunek i należną wagę wykonywanej pracy, w służbie zdrowia obywateli, przez diagnostów laboratoryjnych. Obecnie kiedy mamy świadomość znaczenia swojej pracy, a szczególnie gdy z ław poselskich wybijane są słowa, jak strofy, że nie sposób myśleć o rzetelnych medycznych świadczeniach bez uprzednich i współbieżnych, z prowadzoną terapią medyczną, badaniach laboratoryjnych wykonywanych w medycznych laboratoriach diagnostycznych.

Nie ciąży zarzut na diagnostach laborato-

ryjnych czerpanie korzyści finansowych ze swojej pracy, i nadużywanie stanowiska lub miejsca pracy dla swoich prywatnych celów. Dlatego też w rozpoznanej, poprzez badania sondażowe, wiarygodności i prestiżu oraz zaufania, zawód nasz uzyskuje wysokie notowania w grupie zawodów medycznych. Dlatego też apeluję.

Pójdźmy do wyborów samorządowych z własnymi kandydatami, z naszego środowiska, na: radnych, wójtów, starostów i marszałków sejmików wojewódzkich i także do innych zadań w strukturach samorządu terytorialnego.

Zgłoszmy naszych kandydatów. Twórzmy komitety wyborcze dla diagnostów kandydujących do władz samorządowych. Wiarygodność i rzetelność naszego zawodu dowodzona przez wiele lat jest rękojmią dla nas i społeczeństwa, które będzie wybierać radnych do samorządu.

Ponadto, w tle wyborów samorządowych, dokonywać się będą wybory spośród nas, delegatów, na II Krajowy Zjazd Diagnostów Laboratoryjnych. A mają to być osoby chcące uczestniczyć w samorządzie zawodowym, podnoszące rangę zawodu, poprzez utrzymanie i podnoszenie kształcenia zawodowego i tworzenie dostępności dla chcących rozpocząć nowe rodzaje specjalizacji.

Dokonana w Sejmie nowelizacja ustawy o diagnostyce laboratoryjnej, w wyniku debaty poselskiej nie zachwiała prawem naszym do posiadania odrębnego zawodu medycznego, a więcej nawet, ugruntowała postawione wymogi i wymagania kompetencyjne oraz dookreśliła warunki dopuszczania do wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej i uprawnień zawodowych (w tym numerze zostaje zamieszczony tekst repliki Prezesa KRDL zaczerpnięty z diariusza prac Sejmowej Komisji Zdrowia na wystąpienie Prezesa NRL - strona 5)

Ufam i jestem przekonany, że delegatami na Nasz, II Krajowy Zjazd (Delegatów) Diagnostów Laboratoryjnych wybrani zostaną najlepsi z najlepszych, bo przecież diagnostami laboratoryjnymi zostali również najlepsi.

Prezes KRDL
Henryk Owczarek



Sprawozdanie za rok 2005

Krajowa Rada Diagnostów Laboratoryjnych zgodnie z art. 39 ustawy o diagnostyce laboratoryjnej z dnia 28 sierpnia 2003 r. przesyła sprawozdanie z działalności Samorządu diagnostów laboratoryjnych za trzeci rok działalności Samorządu diagnostów

laboratoryjnych tj. za rok 2005.

Ustawa o diagnostyce laboratoryjnej z dnia 27 lipca 2001 z późn. zm. określiła czym są czynności diagnostyki laboratoryjnej oraz doprecyzowała kryteria regulujące tytuł uprawniający do wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego i wskazała miejsce wykonywania czynności z zakresu diagnostyki laboratoryjnej określając je medycznym laboratorium diagnostycznym.

1. W kolejnym roku działania samorządu I Kadencji KRDL, Biuro KIDL po nabyciu prawa własności do lokalu, mieści się przy ul. Konopackiej 4 w Warszawie. Budynek pod tym adresem jest siedzibą Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych i lokalem Biura Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych.

2. Podobnie jak w poprzednich latach nie zmieniła się struktura i podstawa działalności KIDL i KRDL. Jedynym źródłem funkcjonowania i finansowania KRDL są składki członków wpisanych na listę KIDL, diagnostów laboratoryjnych. Korporacja diagnostów laboratoryjnych dotąd nie wystąpiła z wnioskiem do Ministerstwa Zdrowia i Sejmowej Komisji Budżetowej o dofinansowywanie swojej działalności w trybie znanym jak wobec NIL i NIPiP. Dotacje ze środków publicznych, z dyspozycji państwa pozwoliłyby na szerszy zakres działalności Korporacji, szczególnie w zaniebawianej przez lata pomocy dla diagnostów laboratoryjnych w ich ustawowym obowiązku ustawicznego kształcenia i uzyskiwania specjalizacji.

3. Diagnostami laboratoryjnymi w roku 2005 zostały tylko te osoby, które złożyły wnioski o wpis na listę diagnostów laboratoryjnych, a które spełniały wymogi określone ustawą. Aktualnie do 31 grudnia 2005 roku zostało wpisanych na listę diagnostów laboratoryjnych 10580 osób. Czynnych diagnostów laboratoryjnych w zawodzie na koniec 2005 roku było 10257, przy czym 93 pozostawało

na uprawnieniach do świadczeń emerytalnych. Te osoby nie zawieszały prawa do wykonywania zawodu.

4. Do 31 grudnia 2005 roku KRDL wydała 446 dokumentów - Prawo Wykonywania Zawodu Diagnosty Laboratoryjnego, które zastąpi wydawane wcześniej przed 2005 rokiem, "Zaświadczenie" o wpisie na listę diagnostów laboratoryjnych potwierdzające uprawnienia do wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej. Wydawanie niniejszego dokumentu nie może nabrać właściwego tempa i spełniającego oczekiwania członków Korporacji z przyczyny ograniczonej możliwości finansowania kosztów związanych z opisywaniem i wysyłką dokumentów. Wśród wpisanych na listę w 2005 roku diagnostów laboratoryjnych potwierdzające uprawnienia do wykonywania zawodu kierunkiem lekarskiego wykonujący czynności diagnostyki laboratoryjnej i mający specjalizację w wymagany z ustawy zakresie.

5. Biuro KIDL właściwie zamknęło rejestr i ewidencję medycznych laboratoriów diagnostycznych w 2005 roku. Aktualnie są one weryfikowane pod kątem zgodności danych zgłoszonych we wnioskach i następuje aktualizacja danych ulegających zmianie, a dotyczących osób zatrudnionych, bądź ich uprawnienia do wykonywania zawodu. Ewidencja jest aktualizowana. Według informacji dostępnych w KIDL istnieje jeszcze pewien obszar działalności laboratoriów analitycznych, które nie są wpisane w rejestr KRDL, a które świadczą tak podmiotom medycznym jak i pacjentom swoje usługi. Ten obszar wymaga ciągłej interwencji, i współdziałania z odpowiednimi Urzędami na terenie województw, rejestrującymi działalność gospodarczą. Współudział w tym zakresie z Wojewódzkimi Oddziałami Narodowego Funduszu Zdrowia pozwala regulować zakres świadczeń laboratoryjnych zgodnie z wymogami rozporządzenia Ministra Zdrowia dotyczącymi wymaganych standardów i warunków świadczeń udzielanych w medycznym laboratorium diagnostycznym.

6. W ewidencji KRDL na 31 grudzień 2005 roku pozostaje 2321 medycznych laboratoriów diagnostycznych. Funkcje kierownicze nie są spełniane we wszystkich laboratoriach przez osoby posiadające wymagane specjalizacje tak co do stopnia jak i zakresu specjalizacji właściwych do specyfiki i rodzaju laboratorium. Tę niezgodność KRDL usilnie stara się eliminować poprzez mobilizację środowiska do podejmowania kształcenia specjalizacyjnego. W wyniku tych

W NUMERZE

Sprawozdanie za rok 2005	3-5
Tekst repliki Prezesa KRDL zacierpnięty z dziennika Sejmu Komisji Zdrowia	5
Diagnostyka zakażeń wirusowych	6-10
Pomiary oksymetryczne	10-12
Pojęcie i zakres immunodiagnostyki	12-14 16
Informacja dotycząca Prawa Wykonywania Zawodu Diagnosty Laboratoryjnego	15
USTAWA o zmianie ustawy o diagnostyce laboratoryjnej oraz ustawy o zawodach lekarza i lekarza dentysty	17-18
Opinie prawne Rady Prawnego KIDL	18
Diagnostyka Sp. z o.o. laureatem XVI edycji konkursu „Teraz Polska”	19
Informacja o Stowarzyszeniu Niepublicznych Medycznych Laboratoriów Diagnostycznych „LAB”	19

Uchwały XVII, XVIII, XIX posiedzenia Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych - Opinie prawne Rady Prawnego KIDL
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 24 czerwca 2006 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie specjalizacji i uzyskiwania tytułu specjalisty przez diagnostów laboratoryjnych
- Wyjaśnienie dotyczące różnicy celów zakresów i zadań między samorządem zawodowym, a związkiem zawodowym

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

działań w 2005 roku i bieżącym specjalizację podjęło około 1200 osób, w ustalonym trybie w trakcie współdziałań Ministerstwa Zdrowia, CMKP, Uczelni Medycznych oraz KRDL i na wniosek KIDL.

7. Zostali powołani Pełnomocnicy Rektora ds. Organizacji Szkolenia Specjalizacyjnego Diagnostów Laboratoryjnych w Akademii Medycznych oraz Przedstawiciele KRDL w Specjalizacyjnych Komisjach Egzaminacyjnych i Komisjach Postępowania Kwalifikacyjnego dla diagnostów laboratoryjnych rozpoczynających odpowiednią specjalizację. Także został powołany Zespół Ekspertów ds. dygnowanych przez KRDL dla określonych rodzajów specjalizacji diagnostycznych.

8. KRDL w minionym roku zachowała swoją strukturę centralną, a w poszczególnych województwach RP nadal działają wybrani Uchwałą KRDL, jej Przedstawiciele spełniający pierwszy kontakt diagnostów laboratoryjnych z KIDL. Oni też stanowią źródło informacji o funkcjonowaniu medycznych laboratoriów diagnostycznych w terenie.

9. KRDL poprzez swoich przedstawicieli uczestniczyła i współpracowała w tworzeniu i opracowaniu projektów ustaw, wnioskując o zmianę, opiniując dokonywane zmiany projektów ustaw, a także uczestniczyła w pracach Sejmowych Podkomisjach i Komisjach debatujących nad programowymi projektami zgłoszonymi do Sejmu.

Działania statutowe.

Zakres działań KRDL wynikał z ustawy o diagnostyce laboratoryjnej i planu zadań założony na rok 2005 dla samorządu diagnostów laboratoryjnych oraz z potrzeb wynikających z działalności Samorządu, jak również z wymogów służących zapewnieniu pełnego dostępu pacjentom do świadczeń diagnostyki laboratoryjnej na poziomie standardów określanych procedurami medycznymi i rozporządzeniami Ministerstwa Zdrowia:

a) Opracowany i uchwalony został Kodeks Etyki Diagnosty Laboratoryjnego.

b) Opracowany został Regulamin zakresu i zasad działania Wizytatorów KRDL.

c) Wydane przez KRDL „Prawo Wykonywania Zawodu Diagnosty Laboratoryjnego” otrzymało 446 diagnostów laboratoryjnych.

d) KRDL miała udział w prowadzeniu cyklu kursów i szkoleń okołospecjalizacyjnych oraz współorganizowaniu z innymi podmiotami ustawicznego kształcenia zawodowego dla diagnostów laboratoryjnych.

e) KRDL dokumentowała aktualizację danych osobowych członków Korporacji

KIDL zgodnie z zapisami ustawy.

f) KRDL prowadziła komunikację i korespondencję z podmiotami administracji państwa, ustawodawstwa, administracją terenową oraz jednostkami służby zdrowia.

g) KRDL prowadziła dla zainteresowanych aktualizację i informacje dotyczącą diagnostyki laboratoryjnej, medycznych laboratoriów diagnostycznych, udzielanych świadczeń medycznych, kształcenia i wymogów oraz warunków dotyczących specjalizacji w komunikacji internetowej udostępnianej dla diagnostów laboratoryjnych w całym kraju.

h) KRDL prowadziła szeroki zakres porad prawnych dla diagnostów i doradztwo w zakresie restrukturyzacji podmiotów świadczących usługi medyczne oraz prawa pracy i prowadziła porady ogólnoprawne.

i) KRDL umacniała strukturę samorządową, dla sprawowania merytorycznego nadzoru KIDL nad działalnością diagnostyczną wykonywaną przez diagnostów laboratoryjnych.

j) KRDL przygotowała zasady realizacji sposobu doskonalenia zawodowego przez diagnostów laboratoryjnych. W porozumieniu z ośrodkami kształcenia uzgodnione zostały zasady przyznawania punktów edukacyjnych. W roku 2005 dokonano i:

a) Odbyło się pięć posiedzeń Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych.

b) Przyjęto 23 uchwały i 4 stanowiska KRDL.

c) Odbyło się 10 posiedzeń Prezydium KRDL.

d) Zakończono pracę nad Kodeksem Etyki Diagnosty Laboratoryjnego - Deontologią Diagnosty Laboratoryjnego, poprzedzone konsultacjami w środowisku, dyskusją w zespołach roboczych i opiniami profesjonalistów z zakresu etyki oraz stylistów językowych.

e) Dokonano aktualizacji w elektronicznej bazie danych, która została porównana z danymi dokumentowanymi w teczkach osobowych. Była konieczna ze względu na zmiany zgłaszane przez diagnostów laboratoryjnych dotyczące adresu, nazwiska, miejsca pracy, osiągniętych specjalizacji, przejście na emeryturę lub rentę oraz niekiedy dotyczące utraty zatrudnienia w zawodzie.

f) KRDL wykonywała w dalszym ciągu nałożone na KIDL, a przeniesione z zadań administracji państwowej na samorząd czynności administracyjnych wynikających z ustawy dotyczących ewidencji medycznych laboratoriów diagnostycznych oraz opracowała zasady sprawowania merytorycznego nadzoru nad wykonywaniem czynności diagnostyki

laboratoryjnej, uprawnieniami osób wykonujących te czynności oraz spełnianiem wymaganych standardów jakości określonych rozporządzeniem MZ w medycznych laboratoriach diagnostycznych.

g) Rozpoznanie charakteru funkcjonujących medycznych laboratoriów diagnostycznych wymagało dalszej aktualizacji danych samych podmiotów, jak również osób wykonujących czynności w laboratoriach i pełniących funkcje kierowników w tych laboratoriach. Aktualizacja danych tych stanowi często podstawę przy zawieraniu umów na świadczenia zdrowotne finansowane ze środków publicznych z podmiotami prowadzącymi leczenie pacjentów.

h) KIDL wydała 448 "Zaświadczeń" o wpisie do ewidencji i zdjęła 48 laboratoriów z ewidencji, które uległy likwidacji, bądź też zmianie w wyniku ich restrukturyzacji.

i) Na bieżąco przez KIDL prowadzona jest dokumentacja i księgowanie składek członków Korporacji wnoszonych na poczet działalności statutowej. Dokumentacja ta jest dokonywana w wersji elektronicznej i klasycznej księgowości.

KIDL prowadzi także księgowość ubezpieczeń indywidualnych OC dla poszczególnych diagnostów laboratoryjnych wykonujących swój zawód. Ubezpieczenia te dokonywane są na podstawie zawartej umowy z ubezpieczycielem. W okresie do 31 grudnia 2005 r. umowę z ubezpieczycielem zawarło około 5000 czynnych zawodowo diagnostów laboratoryjnych.

Działalność informacyjna i szkoleniowa oraz kształceniowa.

1) KRDL prowadziło edycję gazety o nakładzie 11 500 egz. Gazeta jest nieodpłatna i kolportowana do każdego diagnosty laboratoryjnego na koszt KIDL. W 2005 roku wydanych zostało 3 numery.

2) Obok druku i edycji Gazety, sumptem KIDL, zostały wykonane i dotarły do każdego diagnosty teksty:

Rozporządzenie Ministra Zdrowia w sprawie specjalizacji i uzyskiwania tytułu specjalisty przez diagnostów laboratoryjnych,

■ Rozporządzenie Ministra Zdrowia w sprawie wymagań, jakim powinno odpowiadać medyczne laboratorium diagnostyczne,

■ tekst jednolity ustawy o diagnostyce laboratoryjnej,

■ programy informujące o kształceniu dostępnych dla diagnostów laboratoryjnych.

3) KRDL współorganizowała i współtworzyła program kształcenia dla diagnostów

laboratoryjnych. Zorganizowane zostały konferencje o zasięgach wojewódzkich i krajowym, dając możliwość uczestnikom otrzymania certyfikatu za udział w szkoleniu. Zasady przyznawania punktacji za udział w szkoleniu zostały opracowane przez KRDL wraz z organizatorami i konsultowane ze specjalistami oraz z ośrodkami dydaktycznymi.

4) KRDL była inicjatorem i postulatorem rozszerzenia zakresu i dziedzin możliwych specjalizacji dostępnych dla diagnostów laboratoryjnych.

Zadania wpisane w zakres działalności statutowej KIDL i wynikające z uchwał KRDL wykonane były w 2005 roku przy udziale członków KIDL i zespołu pracowników Biura KIDL. KRDL w minionym roku poszerzyła zakres możliwości realizacji zadań statutowych tworząc korzystniejsze warunki lokalowo - przestrzenne nie tylko pracownikom Biura KIDL, ale przede wszystkim dla osób uczestniczących w programach kształcenia, poprawiając warunki okresowego pobytu w czasie udziału w kursach i szkoleniach. W tym też celu zostały wykonane dalsze prace adaptacyjne w budynku KIDL, które poprawiły standard pomieszczeń i stworzyły dogodniejsze warunki uczestnikom kształcenia, członkom Korporacji. Istotą wszystkich zamierzeń KRDL było zagwarantowanie na wyższym poziomie warunków pracy w medycznych laboratoriach diagnostycznych przez osoby kompetentne, posiadające prawo do

wykonywania zawodu, realizujące tryb kształcenia specjalizacyjnego oraz kształcenia ustawicznego dając pacjentom, świadczeniobiorcom pełną wiarygodność, tworząc poczucie zaufania do wykonawców zawodu diagnosty laboratoryjnego.

Utrzymywany ciągle reżim ekonomiczny na wydatki pokrywane ze składek członków Korporacji, pomimo wypełnienia w coraz szerszym stopniu zadań ustawowych i statutowych w kolejnym roku działania samorządu zawodowego dał możliwość modernizacji budynku przy równoczesnej spłacie części zaciągniętego kredytu bankowego. Celem jest stworzenie w siedzibie KIDL zaplecza edukacyjnego i specjalizacyjnego dla diagnostów laboratoryjnych.

Zadaniem na rok kolejny - następny będzie dla Samorządu diagnostów laboratoryjnych:

a) Przygotowanie i dostarczenie pozostałym członkom Korporacji, uprawnionym do wykonywania zawodu, dokumentu „Prawo Wykonywania Zawodu Diagnosty Laboratoryjnego”.

b) Pomoc dla wszystkich członków nie tylko w organizowanych cyklach szkoleń okołospecjalizacyjnych dla diagnostów laboratoryjnych i kształcenia ustawicznego, ale przede wszystkim zapewnienie materiałów szkoleniowych z poszczególnych dziedzin objętych specjalizacjami dostępnymi dla diagnostów, które przygotowywane będą przez powołany Zespół Redakcyjny Biblioteki Diagnosty Laboratoryjnego.

c) Współtworzenie nowelizacji ustawy zmiany ustawy o diagnostyce laboratoryjnej z zachowaniem treści orzeczeń Trybunału Konstytucyjnego.

d) Wystąpienie do Trybunału Konstytucyjnego o stwierdzenie niezgodności z Konstytucją RP zasad funkcjonowania i finansowania Korporacji Zawodów Medycznych ze środków publicznych, odnosząc ją do istniejącej nierówności prawnej, tak w sposobach prawa do specjalizacji na koszt budżetu państwa, jak również działalności Korporacji dofinansowanej z pominięciem tego samego dla KIDL.

e) dalsza integracja środowiska diagnostów laboratoryjnych.

f) tworzenie szerszej płaszczyzny ustawowej pozwalającej medycznym laboratoriom diagnostycznym uczestniczyć w kontraktowaniu świadczeń zdrowotnych bezpośrednio z NFZ.

Nadrzędnym dla samorządu diagnostów laboratoryjnych celem i zadaniem będzie udzielanie pacjentom świadczeń zdrowotnych na najwyższym poziomie dla utrzymania, ratowania zdrowia i życia zachowując prawo, i reguły dobrego współżycia społecznego pomiędzy pacjentami oraz współświadczeniodawcami.

Z poważaniem
Prezes Krajowej Rady
Diagnostów Laboratoryjnych
Henryk Owczarek

Tekst repliki Prezesa KRDL zaczerpnięty z diariusza prac Sejmowej Komisji Zdrowia (nr 30) na wystąpienie Prezesa NRL.

Na początku chciałbym zwrócić uwagę, że w ustawie – matce doprecyzowane były wszelkie sprawy, które potem zmieniono w wyniku nowelizacji. Nowelizację taką wymusiła w pewnym sensie ówczesna Naczelna Izba Lekarska. Myśmy wyrazili zgodę na te zmiany po to, aby w ogóle mogła zaistnieć Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych i jej ustawowe organy. Szybko jednak te zmienione zapisy zostały zakwestionowane przez Naczelną Radę Lekarską do Trybunału Konstytucyjnego. My nie byliśmy więc ani twórcami tych zapisów, ani też nie od nas wyszedł wniosek kwestionujący ich konstytucyjność. Trybunał natomiast wskazał, aby określone zostały zasady, na jakich lekarze dopuszczeni będą do wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej. Wskazał również, iż nie ulega wątpliwości, że ze względu na różnice programowe w zakresie kształcenia lekarzy i analityków medycznych (chodzi tu o kierunek magisterski analityków medycznych, który jest już niemal na wszystkich uczelniach medycznych), niezbędne jest określenie dodatkowych warunków, które spełniać muszą lekarze, aby móc wykonywać wszystkie czynności diagnostyki laboratoryjnej.

Trybunał wskazał także, że wadą ustawy jest nieprecyzyjność i niedookreślenie zawartych

w niej zapisów. Myślę jednak, że przedłożenie rządowe, o którym obecnie mówimy, szczególnie w art. 6, nadal stosuje terminologię nieprecyzyjną. Dalej mamy więc do czynienia z niedookreślonością, którą przecież zakwestionował Trybunał Konstytucyjny. Co prawda mówi się tu w odniesieniu do lekarzy o „wiedzy i umiejętności w zakresie wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej”, ale powstaje zaraz pytanie, co daje tę wiedzę i umiejętności, jakie kursy, szkolenia i specjalizacje, a ponadto kto będzie to określał. Dlatego też Izba Lekarska ma decydować, jakie czynności będzie mógł wykonywać lekarz – diagnosta laboratoryjny.

Powstaje taka sytuacja, że tworzą się już dwie grupy zawodowe diagnostów laboratoryjnych: lekarzy i nie lekarzy. Stawia to pod znakiem zapytania całą przedłożoną nowelizację, której celem było uporządkowanie i wprowadzenie nadzoru nad czynnościami diagnostyki laboratoryjnej. Zarówno w ustawie – matce, jak i w ustawie obecnie obowiązującej, a więc po nowelizacji, zapisany jest jednolity nadzór nad tymi czynnościami. W przedłożeniu rządowym, zaproponowanym obecnie, tworzy się wyraźny dualizm w zakresie kompetencji, nadzoru i oceny etycznej.

Kodeks etyczny uchwalony przez Nadzwyczajny Krajowy Zjazd Diagnostów Laboratoryjnych precyzuje bardzo szczegółowo, jakie są zasady etyczne w odniesieniu do poszczególnych czynności wykonywanych

przez diagnostów, podczas gdy w kodeksie etyki lekarskiej nie wymienia się nawet czynności z zakresu diagnostyki laboratoryjnej.

Jeśli chodzi natomiast o ewidencje laboratoriów, to w rozumieniu ustawy o diagnostyce laboratoryjnej każdy podmiot zobowiązany jest do zarejestrowania się w bazie Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych. Porządkujemy tę bazę i poszukujemy tzw. dzikich laboratoriów.

Kolejna sprawa dotyczy nadzoru sprawowanego przez wizytatorów, którzy będą mieli prawo, z mocy ustawy, oceniać, czy czynność wykonywana w laboratorium jest zgodna z zasadami etyki zawodowej. W przypadku jednak lekarza, który nie będzie członkiem Izby Diagnostów, wizytator nie będzie miał możliwości dokonania takiej oceny. W przypadku jakichkolwiek niejasności czy zarzutów pracownicy będą podlegali jurysdykcji dwóch odrębnych sądów zawodowych, przy czym zasady działania przyjęte przez Krajową Izbę Diagnostów są jasne i doprecyzowane, podczas, gdy w Naczelnej Izbie Lekarskiej są one, w odniesieniu do lekarzy-diagnostów enigmatyczne i niejasne.

Przedstawiony projekt zawarty w druku sejmowym nr 477 wprowadza więc pewną niespójność i dualizm w zakresie diagnostyki laboratoryjnej. To tyle z mojej strony, jeśli chodzi o ocenę wstępną rządowego projektu.

Rozwój medycyny, szerokie stosowanie inwazyjnych metod diagnostycznych oraz wzrost częstości zabiegów transplantacyjnych niosą za sobą znaczne ryzyko zakażeń różnymi patogenami, w tym także wirusami. W ostatnich latach obserwujemy znaczny postęp w diagnostyce wirusologicznej zakażeń wirusowych, co jest wynikiem m.in. wprowadzenia nowoczesnych metod badawczych. Poznano strukturę wielu wirusów, możliwa jest także ocena ich replikacji na poziomie molekularnym. Ponadto zwiększają się możliwości leczenia przeciwwirusowego przy pomocy środków farmakologicznych. Szybki rozwój biotechnologii i możliwość wykrywania kwasów nukleinowych oraz ich sekwencji zrewolucjonizował diagnostykę laboratoryjną zakażeń wirusowych. Poznanie struktury genomu wirusów daje możliwość badań nad rozprzestrzenieniem wirusów a wyniki tych badań są niezwykle istotne także dla obserwacji epidemiologicznych.

1. Charakterystyka zakażeń wirusowych.

Choroby o etiologii wirusowej posiadają pewne właściwe tylko sobie cechy epidemiczne, które w sposób szczególny wyróżniają je z grupy drobnoustrojów oraz w głównej mierze warunkują rozwój, przebieg i zanikanie choroby w populacji ludzkiej. Odrębność epidemiczna chorób wirusowych uwarunkowana jest następującymi cechami wirusów:

- bezwarunkowe wewnątrzkomórkowe pasożytnictwo. Poza komórką mogą przebywać tylko w fazie zakaźnej. Środowisko zewnętrzne działa na nie inaktywująco, dlatego poza organizmem gospodarza mogą przetrwać tylko nieznacznie gatunki posiadające wysoką oporność na działanie czynników środowiskowych,
- zdolność do szybkiej mutacji antygenowej, co umożliwia adaptację do zmienionych warunków, a w dalszej kolejności zmianę tropizmu wirusa,
- różne gatunki wirusów (często z różnych grup systematycznych) wywołują podobne lub nawet identyczne objawy chorobowe,
- ograniczona zdolność obronna organizmu. Duża liczba typów serologicznych oraz duża zmienność antygenowa są przyczyną częstych zachorowań o charakterze epidemicznym,
- zjawisko latencji (stan utajony). Polega na zahamowaniu cyklu rozwojowego wirusa. Wirus nie namnaża się, natomiast jego kwas nukleinowy dzieli się równolegle z podziałem zakażonej komórki. Latencja umożliwia wirusom przetrwanie w populacji, przeżycie okresów międzyepidemicznych oraz warunkuje powstawanie chorób przewlekłe postępujących oraz chorób nowotwo-

rowych.

Niejednakowa symptomatologia chorób wirusowych u poszczególnych osób zależy od takich czynników jak wirulencja danego szczepu wirusa, odporność zakażonego organizmu, kolejność zakażenia.

2. Materiały do badań wirusologicznych

W diagnostyce wirusologicznej wyróżniamy dwa kierunki badań, tj. izolację z materiału klinicznego i identyfikację wirusa, oraz wykazanie odpowiedzi immunologicznej, tj. wykrywanie przeciwciał. Warunkiem uzyskania miarodajnych wyników badań laboratoryjnych jest dobór właściwego materiału diagnostycznego, odpowiednie jego pobranie, właściwe przechowywanie i transport, posługiwanie się metodami i odczynnikami wystandaryzowanymi zapewniającymi wiarygodność wyniku, a więc jego powtarzalność.

Do badań serologicznych i immunologicznych materiałem może być surowica, pełna krew lub plazma. Do izolacji wirusów mogą być przysyłane biopaty ze zmienionego chorobowo miejsca, płyn mózgowo-rdzeniowy, wymazy (z pochwy, gardła, zmian skórnych, odbytnicy), krew, mocz, aspirat z dróg oddechowych.

Próbka materiału klinicznego przeznaczona do diagnostyki wirusologicznej powinna być jak najszybciej dostarczona do laboratorium, ponieważ przeżywalność wirusa zmniejsza się wraz z upływem czasu. Ważne jest aby do próbki były dołączone informacje kliniczne dotyczące chorego, od którego ten materiał pochodzi, takie jak choroba zasadnicza, przyczyna wysłania badanego materiału w kierunku badań wirusologicznych, wiek i płeć. Mogą one mieć istotne znaczenie dla prawidłowego doboru metod diagnostycznych, zastosowania odpowiedniej linii komórek do izolacji wirusa, a w konsekwencji mogą mieć wpływ na ostateczny wynik rozpoznania.

Podstawą diagnostyki wirusologicznej jest wykrycie wirusa i/lub swoistych przeciwciał przeciwko antygenom wirusowym, co jest ważnym elementem także z epidemiologicznego punktu widzenia. Wykrywanie kwasów nukleinowych może być cennym uzupełnieniem klasycznych metod izolacji wirusów.

3. Hodowla i izolacja wirusów

Izolacja i identyfikacja wirusów z materiałów klinicznych pobranych od pacjentów jest wskazana do stwierdzenia etiologii choroby. Przed postawieniem ostatecznej diagnozy wirusologicznej należy odpowiedzieć na następujące pytania:

- Czy wyizolowany wirus jest rzeczywiście czynnikiem etiologicznym w badanym przypadku,
- Czy próbki do badania zostały pobrane we

właściwym czasie choroby,

- Gdzie i w jakich warunkach próbki przechowywano,
- Jakimi metodami wykonywano badania,
- Czy była również badana surowica chorego z okresu ostrego i rekonwalescencji celem wykazania 4-krotnego wzrostu miana przeciwciał lub wykazanie obecności przeciwciał w klasie IgM.

Do izolacji wirusów możemy wykorzystywać trzy różne systemy doświadczalne, tj. zwierzęta laboratoryjne, zarodki ptasie oraz hodowle komórek in vitro. Wybór odpowiedniej metody do izolacji wirusa zależy przede wszystkim od wrażliwości (genetycznie uwarunkowanej) tych obiektów na badany wirus. Ważna jest również droga wprowadzenia wirusa do organizmu, co zależy od tropizmu badanego wirusa do określonej tkanki lub narządu.

Zwierzęta laboratoryjne są używane do badania tylko wówczas, gdy nie można zastosować innych metod hodowli. Metoda ta posiada również pewne wady, tj. wysoki koszt, długi okres oczekiwania na wynik, choć niejednokrotnie jest to najlepszy sposób izolacji wirusa. Należy również pamiętać o możliwości bezobjawowego zakażenia używanych zwierząt wirusami postronnymi, co w konsekwencji może doprowadzić do postawienia fałszywego rozpoznania.

Zarodki ptasie, a zwłaszcza zarodek kurzy, ze względu na niskie koszty i dość prostą metodykę zakażenia znalazły zastosowanie do izolacji wirusów. Intensywny metabolizm i szybkie podziały komórek są dogodnymi warunkami dla rozwoju różnych wirusów. Metoda ta jest używana także obecnie w diagnostyce wirusa grypy.

Wprowadzenie hodowli komórek do badań nad wirusami było ogromnym przełomem w wirusologii, pozwoliło na poznanie morfologii, cyklu rozwojowego wewnątrz zakażonej komórki, odkrycie nowych wirusów a także znalazło praktyczne zastosowanie w produkcji szczepionek. Początki tej metody przypadają na lata dwudzieste XX wieku, ich rozwój nastąpił w latach czterdziestych, zwłaszcza w badaniach prowadzonych w 1949r. przez Endersa nad wirusem poliomyelitis. Obecnie stosowane są hodowle komórek in vitro wyprowadzone z tkanek człowieka i zwierząt, tj. pierwotne, półciągłe i ciągłe linie komórek (zarówno komórki normalne jak i nowotworowe). W rutynowej diagnostyce laboratoryjnej używane są półciągłe linie komórek (diploidalne) utrzymywane przez 20-50 pasażi lub ciągłe (heteroploidalne). Replikację wirusa w hodowli komórek można wykryć obserwując charakterystyczne zmiany

w hodowli komórek, czyli tzw. efekt cytopatyczny (CPE - Cytopathic effect); metodą hemadsorpcji (zdolność niektórych wirusów - świnki, arbowirusów, niektóre picornawirusy do aglutynowania krwinek czerwonych niektórych gatunków zwierząt - świnka morska, koza, kurczęta); metodą interferencji, (tj. hamowanie replikacji jednego wirusa przez inny wirus).

Efekt cytopatyczny (CPE) widoczny jest w bezpośredniej obserwacji lub po zabarwieniu. Wartość tych badań jest bardzo duża, zwłaszcza gdy badany materiał normalnie jest jałowy-krew, płyn mózgowo-rdzeniowy. Natomiast ich wartość może budzić wątpliwości w przypadku popłuczyn z gardła, wynik wówczas może być przypadkowy. Wady tych metod to długotrwałość oraz duży koszt. Do najczęściej używanych linii komórek pasażowanych należą komórki linii FL pochodzące z amnionu człowieka, diploidalne człowieka - linia Wistar, linii HeLa - wyprowadzone z raka szyjki macicy, Hep-2 z raka krtani, Detroit-6 z przerzutu raka do płuc.

Typowe laboratorium wirusologiczne musi używać różne linie komórek do izolacji różnych, klinicznie ważnych wirusów. Na przykład wirus cytomegalii (CMV) może być tylko hodowany w komórkach diploidalnych, podczas gdy influenza virus izoluje się zwykle w heteroploidalnych, np. MDCK - linii wyprowadzonej z nerki psa (Madin-Darby canine kidney).

4. Serologiczna diagnostyka zakażeń wirusowych.

Odczyn serologiczny polega na swoistym wiązaniu antygeny z homologicznym przeciwciałem. Mechanizm reakcji serologicznej polega bądź na powstawaniu kompleksów immunologicznych wytrącających się z roztworu w postaci osadu, bądź na blokowaniu aktywności biologicznej badanego antygeny. Odczyny serologiczne stosowane są do wykrywania antygenów obecnych w pobranym materiale klinicznym, antygenów po namnożeniu wirusa we wrażliwych komórkach (w hodowli komórek, zarodku kurzym, zwierzętach laboratoryjnych) lub przeciwciał obecnych w surowicy chorego (niekiedy również w płynie mózgowo-rdzeniowym lub w wydzielinach ustroju) będących następstwem reakcji immunologicznej na zakażenie. W przypadku gdy poszukujemy obecności przeciwciał posługujemy się wzorcowymi antygenami, natomiast gdy wykrywamy obecność antygeny używamy surowiec wzorcowych o znanej specyficzności.

Do klasycznych, a zarazem podstawowych metod serologicznych należą: odczyn aglutynacji, precypitacji, neutralizacji (odczyn zobojętnienia Ont), wiązania

dopełniacza (OWD). Metody klasyczne, aczkolwiek stosowane w diagnostyce niektórych zakażeń wirusowych, coraz częściej wypierane są z rutynowej diagnostyki przez nowoczesne metody szybkiej diagnostyki. Obecnie najczęściej stosowane są w diagnostyce chorób i zakażeń wirusowych metody immunomorfologiczne, których wspólną zasadą jest związanie jednego ze składników reakcji antygen + przeciwciało odpowiednim znacznikiem. W zależności od użytego znacznika (fluorochrom, izotop, enzym) odróżniamy metody immunofluorescencyjne (IFA), radioimmunologiczne (RIA) bądź immunoenzymatyczne (EIA).

Metody immunoenzymatyczne, które znalazły największe zastosowanie, polegają na wykrywaniu aktywności enzymu związanego z przeciwciałem. W diagnostyce zakażeń wywołanych przez wirusy stosowana jest powszechnie metoda pośrednia (heterogenna) tzw. ELISA - enzyme linked immunosorbent assay. Próba ta wykonywana jest z reguły w fazie stałej. Najczęściej stosowanym enzymem jest peroksydaza chrzastowa (HRD, horseradish peroxidase) lub fosfataza zasadowa. Do oceny antygeny służy tzw. metoda kanapkowa (sandwich) o schemacie Ab FS - Ag - Ab E, zaś do oceny przeciwciał symetryczna Ag FS - Ab - Ag E bądź asymetryczna Ag FS - Ab1 - Ab2 E. Metoda ELISA stosowana jest w różnych modyfikacjach, jako dwuetapowa technika pośrednia, dwuetapowa bezpośrednia, lub tzw. metoda kompetencyjna (sandwich inhibition), kiedy oznakowane przeciwciała współzawodniczą antygeny, z których jeden jest w fazie stałej.

Metoda ELISA stosowana jest zarówno do oznaczeń jakościowych (stwierdzenie obecności antygenów i przeciwciał) jak i do ilościowych, tj. określania miana w danej jednostce objętości. Umożliwia ona ponadto wykrywanie aktywności w określonych klasach immunoglobulin (Ig G lub Ig M) lub identyfikację przeciwciał dla poszczególnych jednostek strukturalnych wirusów. Z uwagi na duże zalety tej techniki, takie jak mały koszt, wysoka czułość oraz możliwość pełnej automatyzacji znalazła zastosowanie w masowych badaniach, zwłaszcza rutynowych. W powszechnym użyciu są testy produkowane przez różne firmy. Testy różnych producentów oparte są na tej samej zasadzie, różnią się jedynie procedurą wykonania.

Badania serologiczne mogą być tzw. badaniami przesiewowymi, które dają wynik ujemny lub dodatni. Niekiedy zachodzi konieczność wykonania tzw. testu potwierdzenia, który eliminuje możliwość wystąpienia reakcji niespecyficznych.

Metody serologiczne, pomimo stale wprowadzanych ulepszeń, obciążone są wadami typowymi dla reakcji serologicznych, tj. różna czułość i swoistość testów diagnostycznych, brak reaktywności przed serokonwersją, bądź trudności interpretacyjne związane np. ze zmiennością wirusów.

Wprowadzenie szybkich testów serologicznych miało przełomowe znaczenie w diagnostyce laboratoryjnej chorób i zakażeń wirusowych. Dzięki tym metodom możliwe stało się ścisłe etiologiczne rozpoznawanie wielu zakażeń wirusowych (np. wzw), określenie fazy zakażenia oraz jego naturalnej ewolucji. Należy jednak pamiętać, że odpowiedź organizmu na zakażenie jest bardzo zróżnicowana, co powoduje, że etiologiczne rozpoznawanie na podstawie badań serologicznych jest nieraz niemożliwe. Naturalny przebieg zakażenia związany jest z występowaniem tzw. okna serologicznego, co uniemożliwia postawienie diagnozy etiologicznej. Niektóre wreszcie wirusy, np. HBV, pod wpływem presji immunologicznej organizmu wytwarzają mutanty, co dodatkowo zwiększa trudności rozpoznawcze.

Metody western-blotting.

Testy oparte na technice western blot zawierają większą liczbę antygenów aniżeli testy przesiewowe, co daje możliwość wykrywania różnych przeciwciał, także tych, których obecności nie można wykazać przy zastosowaniu metody immunoenzymatycznej. Są one używane do potwierdzenia wyników dodatnich w teście EIA jako testy uzupełniające lub tzw. testy potwierdzenia (confirmatory test). Znalazły one zastosowanie w diagnostyce zakażeń wywołanych wirusem HCV, HIV.

Typowanie serologiczne (serotypia).

W oparciu o występowanie przeciwciał wykrywanych metodą ELISA można przeprowadzić typowanie serologiczne (określenie przynależności wirusa do danego typu serologicznego). W metodzie tej wykorzystuje się syntetyczne peptydy odpowiadające produktom określonego regionu genomu wirusa. Metoda ta ma zastosowanie do określania typu serologicznego wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV).

5. Metody biologii molekularnej w diagnostyce zakażeń wirusowych

Tradycyjne metody diagnostyczne nie są już wystarczające, głównie z uwagi na dość długi czas oczekiwania na wynik. Niejednokrotnie mamy też do czynienia z bardzo małą ilością badanego materiału. Bardzo często w przypadku zakażeń wirusowych, konieczne jest określenie fazy zakażenia, tj. różnicowanie fazy latentnej od czynnego procesu. Z tego względu coraz większego

znaczenia w diagnostyce nabierają metody biologii molekularnej, której początki datują się od poznania struktury DNA. Nauka ta posługuje się tak precyzyjnymi technikami, jak izolacja genów, klonowanie (biosynteza genów), sekwencjonowanie (oznaczanie kolejności nukleotydów), hybrydyzacja oraz amplifikacja DNA (otrzymywanie olbrzymiej ilości DNA).

Do rozwoju tych metod przyczyniło się odkrycie w latach 70-tych enzymów restrykcyjnych. Są to nukleazy bakteryjne, które rozpoznają określone sekwencje DNA niezależnie od rodzaju organizmu i przecinają ją w odpowiednim miejscu. Zwykle są to krótkie odcinki zawierające od 4 do 6 zasad.

Metody biologii molekularnej można podzielić na metody analizy kwasów nukleinowych oraz metody wykrywania materiału genetycznego

5.1. Metody analizy kwasów nukleinowych
Główne techniki stosowane w analizie kwasów nukleinowych to sekwencjonowanie, hybrydyzacja i analiza restrykcyjna.

5.1.1. Sekwencjonowanie DNA (fragmentowanie DNA)-ustalenie sekwencji nukleotydów; przeprowadza się wtedy, gdy poszukujemy pojedynczego genu w genomie. Obecnie najczęściej stosowane są do sekwencjonowania DNA dwie metody: Maxama i Gilberta oraz F. Sangera i wsp. Obydwie metody dają możliwość odczytania sekwencji 400-700 nukleotydów w jednym doświadczeniu. Sekwencjonowanie DNA jest możliwe tylko wtedy, gdy dysponujemy wyodrębnionymi fragmentami DNA, tj. po ich uprzednim sklonowaniu i ustaleniu mapy restrykcyjnej. W ostatnich latach techniki sekwencjonowania DNA zostały udoskonalone i częściowo zautomatyzowane, co stworzyło możliwości podjęcia prób sekwencjonowania całych genomów.

5.1.2 Hybrydyzacja

W metodzie tej badany DNA lub RNA jest rozpoznawany i przyłączany (na zasadzie komplementarności zasad guanina-cytosyna, tyminaadenina) do sond genetycznych. Proces hybrydyzacji przebiega w sposób następujący. DNA składa się z 2 łańcuchów polinukleotydów, w których poszczególne nukleotydy łączą się na zasadzie komplementarności (guanina z cytozyną, tymina z adeniną) wiązaniami wodorowymi w podwójną prawoskrętną spiralę (helix). Po denaturacji (pęknięciu wiązań wodorowych) powstają dwa pojedyncze łańcuchy. Pojedyncze nici pochodzące z różnych wirusów a zarazem komplementarne do siebie, łączą się tworząc podwójną nić. Hybrydizować mogą zarówno 2 pojedyncze łańcuchy DNA, jak również nić DNA i RNA.

Sonda genetyczna jest to krótki odcinek

jednoniciowego DNA (fragment uprzednio wyizolowanego genomu lub syntetyczny oligonukleotyd) lub RNA. Posiadają one znaną sekwencję i są komplementarne do sekwencji badanego kwasu nukleinowego wirusa. Najczęściej mają długość 20-40 nukleotydów. Identyfikację umożliwiają wbudowane znaczniki izotopowe (P32, P33, S35) lub nieizotopowe (biotyna, digoksygenina, fosfataza zasadowa). Reakcja hybrydyzacji może być stosowana w następujących wariantach:

- plamkowa (dot lub slot blot) - badany materiał (surowica lub ekstrakt kwasów nukleinowych z badanych tkanek) nakrapla się na błonę nitrocelulozową lub nylonową,

- southern blot - wyizolowane DNA rozdziela się elektroforetycznie w żelu, trawi restryktazami i przenosi na nitrocelulozową lub nylonową powierzchnię,

- northern blot - postępowanie jak wyżej, lecz dotyczące RNA,

- liquid hybridization - hybrydyzacja w roztworze polegająca na łączeniu sondy z DNA bądź RNA w środowisku płynnym, elektroforetycznym rozdzielaniu, przeniesieniu na membranę i identyfikacji.

- reverse hybridization - hybrydyzacja odwrotna; odmiana, w której do nośnika przymocowane są sondy, a w buforze hybrydazyjnym zawieszony jest materiał genetyczny.

- hybrydyzacja in situ - sonda hybryduje z DNA lub RNA obecnym w mikroskrawkach badanej tkanki.

Metoda hybrydyzacji daje szansę bardzo wczesnego rozpoznania zakażenia, zanim jeszcze powstaną przeciwciała, a zastosowanie odpowiednich sorterów i komputerów umożliwia automatyzację badań. Dlatego coraz częściej jest stosowana w komercyjnie dostępnych testach diagnostycznych.

5.1.3. Analiza restrykcyjna.

W metodzie tej wykorzystano endonukleazy restrykcyjne, czyli enzymy rozpoznające swoje sobie sekwencje nukleotydów i przecinające je, czego efektem jest powstawanie tzw. fragmentów restrykcyjnych. Połączenie techniki hybrydyzacji z analizą restrykcyjną dało metodę służącą do oceny polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP Restriction Fragment Length Polymorphism). Metoda ta pozwala określić charakterystyczny dla danego wirusa wzór RFLP. Stosowana jest do identyfikacji typów genetycznych, mutacji czy wreszcie nowych szczepów.

5.2. Wykrywanie materiału genetycznego wirusów.

Do tego celu najczęściej stosowane są następujące metody: PCR, LCR, zależna od sekwencji amplifikacja kwasów nukleinowych, bDNA, SSCP.

5.2.1. Metoda łańcuchowa polimerazy

(PCR)

PCR (polymerase chain reaction) - łańcuchowa reakcja polimerazy opracowana została przez Kary Mullisa w 1983 r. w Cetus Corporation w Emeryville w Kalifornii. Zasada metody polega na amplifikacji, czyli powieleniu przez polimerazę wybranego fragmentu DNA w nieograniczonej liczbie kopii a następnie określeniu sekwencji kwasu nukleinowego wirusa. Amplifikacja polega na enzymatycznej syntezie in vitro specyficznych fragmentów DNA. Proces ten obejmuje powtarzające się cykle denaturacji, przyłączania prymarów (tzw. starterów) i odtwarzaniu wielu kopii DNA. Synteza DNA następuje przy użyciu polimerazy DNA. Stopień amplifikacji wynosi 2^n , gdzie n = liczba cykli. Stąd po 20 cyklach możemy otrzymać ok. 1 miliona cząstek DNA z 1 cząsteczki wyjściowej. Dwuniciowy DNA poddawany amplifikacji jest to tzw. target DNA.

Odmiany metody PCR:

a/ RT-PCR - do wykrywania RNA zastosowano termostabilny enzym o właściwościach odwrotnej transkryptazy oraz polimerazę DNA, co znacznie upraszcza procedurę. RNA poddawany jest odwrotnej transkrypcji. Z materiału pobranego od chorego izolowany jest RNA, którego informacja genetyczna w procesie odwrotnej transkrypcji zostaje przepisana na sekwencję cDNA, który służy jako matryca w reakcji PCR. Technika ta coraz częściej jest stosowana do różnicowania czynnego zakażenia od fazy latentnej.

b/ nested PCR - PCR typu gniazdowego - produkty otrzymane w pierwszych cyklach reakcji stosowane są do przeprowadzania następnych cykli.

Metoda PCR jest stale ulepszana pod względem szybkości reakcji, oraz prostoty i automatyzacji. Reakcje PCR przeprowadza się w specjalnych aparatach z automatycznie regulowaną temperaturą, tzw. cyklerach cieplnych (thermal cycler).

Metoda PCR znalazła bardzo szerokie zastosowanie dzięki możliwości badania kwasów nukleinowych pochodzących z bardzo małych ilości materiału genetycznego. W praktyce oznacza to wykrywanie materiału genetycznego wirusów nie dających się hodować w ogóle lub trudnych do hodowli, a także w przypadku zintegrowania jego genomu z genomem komórki gospodarza. PCR umożliwia rozpoznanie dwóch sekwencji różniących się tylko jednym nukleotydem. Ponadto daje możliwość wykrywania mutantów różnych wirusów, np. HCV. Coraz częściej wykorzystywaną cechą PCR jest możliwość ilościowego oznaczania poszczególnych sekwencji.

5.2.2. Zależna od sekwencji amplifikacja kwasów nukleinowych NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification).

Alternatywną metodą do PCR jest system NASBA. W metodzie tej identyfikuje się poszukiwany materiał genetyczny i namnaża go w postaci RNA. Amplifikacja zachodzi w roztworze zawierającym T7 RNA polimerazę, RNA-zę H, odwrotną transkryptazę i 2 specyficzne primery (jeden zawierający 45 nukleotydów, drugi 20 nukleotydów) oraz bufor. Metoda ta jest procesem izotermicznym, nie wymaga więc cyklera cieplnego. Daje amplifikację RNA bilion krotną w ciągu 2 godz.

5.2.3. Reakcja łańcuchowa ligazy - LCR (Ligase Chain Reaction)

W reakcji tej nie zachodzi namnożenie lecz identyfikacja określonych sekwencji. Cztery pary starterów zostają przyłączone do komplementarnych miejsc na matrycowym DNA przy udziale enzymu ligazy. W ten sposób w jednym cyklu powstają dwa produkty, które służą jako matryca w następnych etapach reakcji. Wystąpienie mutacji w miejscu ligacji może być przyczyną zahamowania reakcji, a tym samym brakiem produktu reakcji. Z tego względu metoda LCR jest stosowana do identyfikacji mutacji.

5.2.4. Metoda rozgałęzionego DNA bDNA (branched DNA)

W reakcji biorą udział dwie sondy wykrywające, sonda chwytająca oraz bDNA zwany również wzmacniaczem, którego rozgałęziona struktura umożliwia przyłączenie dużej liczby znaczników. Sondy wykrywające mają sekwencje komplementarną do poszukiwanego DNA lub RNA, a także sekwencje komplementarne do sondy chwytającej lub do bDNA. Sonda chwytająca na stałe połączona z nośnikiem rozpoznaje i łączy się z jedną z sond wykrywających poszukiwany DNA lub RNA oraz z bDNA. Obecność znaczników wykrywana jest chemiluminescencyjnie. Wynik pomiaru mierzony emisją światła jest wprost proporcjonalny do ilości DNA lub RNA w badanej próbce.

Metoda bDNA nie wymaga odwrotnej transkrypcji, amplifikacji ani ekstrakcji kwasu nukleinowego z materiału klinicznego. Może być używana do określenia stopnia wirerii, wpływu leczenia przeciwwirusowego na poziom wirerii oraz do oceny zależności między odpowiedzią immunologiczną a poziomem wirerii.

5.2.5. SSP (Strand-Specific Conformation Polymorphism)

Metoda ta umożliwia wykrycie różnic w sekwencjach DNA lub RNA. Materiał genetyczny (namnożony lub wyizolowany z materiału klinicznego) poddaje się

denaturacji a następnie szybkiemu schłodzeniu. W wyniku tego procesu powstają pojedyncze nici, w których odtwarzają się miejscowo odcinki dwuniciowe (zgodnie z regułą komplementarności zasad). Następnie nici rozdziela się w żelach niedenaturujących (chronią one regiony dwuniciowe). Szybkość rozdziału zależy od ilości i długości odcinków dwuniciowych. Im więcej jest fragmentów dwuniciowych tym migracja jest szybsza. Po wybarwieniu bromkiem etydy (EtBr) lub solami srebra uwidacznia się wzór rozdzielonych fragmentów ukazując różnice w sekwencjach nukleotydów badanej próbki. Sposób ten służy np. do wykrywania mutacji.

5.3. Real-Time PCR

Jest to reakcja PCR z analizą przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym stosowana do ilościowego pomiaru cDNA, DNA, RNA. Real-Time PCR pozwala na wykrywanie produktów amplifikacji we wczesnej fazie reakcji, tj. fazie ekspotencjalnej i pełne monitorowanie kinetyki reakcji PCR. Teoretyczne zasady techniki PCR zakładają, że ilość produktu po zakończeniu reakcji powinna być wykładniczo proporcjonalna do początkowej puli analizowanej sekwencji w badanej próbce przed reakcją. Opracowano kilka metod do analizy przyrostu ilości produktów w reakcji PCR - wszystkie oparte są na związkach fluorescencyjnych. Wymagają one specjalnie przystosowanego termocyklera, który sprzężony jest z fluorymetrem umożliwiającym pomiar fluorescencji w trakcie trwania reakcji PCR. Zaletą metody real-time PCR jest, że amplifikacja i detekcja zachodzi w jednym zintegrowanym systemie, niskie ryzyko kontaminacji i krótki czas cykli. Wzrost fluorescencji jest proporcjonalny do liczby wytwarzanych amplikonów. Technika ta jest obecnie szeroko stosowana do detekcji DNA i RNA w połączeniu z odwrotną transkrypcją. Jest wykorzystywana jako metoda ilościowa (do badania całkowitej ilości DNA lub RNA), do genotypowania oraz wykrywania wirusowych kwasów nukleinowych w próbkach klinicznych zawierających dużą ilość innego rodzaju DNA.

6. Interpretacja wyników badań laboratoryjnych

Wyniki otrzymane z laboratorium wirusologicznego należy oceniać krytycznie. Wiele chorób wirusowych, np. choroby wieku dziecięcego (odra, ospa wietrzna, różyczka) rozpoznaje się jedynie na podstawie objawów klinicznych. Jednak potwierdzenie rozpoznania odgrywa obecnie ważną rolę ze względu na: możliwość terapii przeciwwirusowej; obowiązek zgłaszania zachorowań (ich rejestracja umożliwia kontrolę

epidemiologiczną i wczesne rozpoznawanie ewentualnych epidemii); Kontrolę rozprzestrzeniania się zakażeń w populacji (badania przesiewowe w kierunku HIV i wzv); Precyzyjne rozpoznanie niektórych zakażeń umożliwia rozpoczęcie odpowiedniego leczenia i oceny rokowania na przyszłość.

Wyniki wirusologicznych badań laboratoryjnych mogą być trudne do interpretacji ze względu na to, że OB jest często prawidłowy lub nieznacznie podwyższony; CRP tylko nieznacznie podwyższone; początkowo występuje leukopenia z limfocytopenią, później limfocytoza i monocytosis.

Rodzaj badań wirusologicznych zależy od tego czy rozpoznajemy ostre zakażenie pierwotne, czy zakażenie nawracające lub określenie stanu immunologicznego pacjenta. Wskazaniem do przeprowadzenia diagnostyki w kierunku zakażenia wirusowego mogą być objawy kliniczne wskazujące na zakażenie wirusowe, ocena stanu odporności, np. po szczepieniach ochronnych, bądź ocena sytuacji epidemiologicznej, np. podczas epidemii grypy.

Rodzaj badania oraz rodzaj materiału klinicznego w kierunku wykazania zakażenia zależą od celu badania. Duże znaczenie ma diagnostyka zakażeń wirusowych wrodzonych lub nabytych okołoporodowo (CMV, VZV, różyczka, HIV, HCV, HIV).

Kiedy należy pobrać materiał? W celu bezpośredniego stwierdzenia obecności wirusa należy pobrać tak wcześnie jak to tylko możliwe. Wiremii często poprzedza występowanie objawów klinicznych. Z drugiej zaś strony organizm może produkować przeciwciała neutralizujące, które wiążą wiriony, co zmniejsza wówczas wartość diagnostyki;

W celu pośredniego wykazania czynnika etiologicznego poprzez badania serologiczne 2 próbki surowicy w celu wykazania różnic w mianie przeciwciał; W celu określenia swoistych przeciwciał w klasie IgM jedna próbka surowicy pobrana jak najwcześniej na początku choroby. Wzrost poziomu przeciwciał w klasie IgG potwierdza rozpoznanie.

Na jakość wyniku ma także wpływ sposób przechowywania i transport materiału klinicznego. Dlatego powinien być dostarczony do laboratorium wirusologicznego jak najszybciej w pożywce płynnej (podłoże do hodowli komórek z dodatkiem antybiotyku o szerokim spektrum w celu zahamowania wzrostu bakterii i grzybów) w temp. 2-6 °C.

Próbki materiałów w celu izolacji wirusa powinny być pobrane możliwie jak

najwcześniej, tj. na początku choroby. W wielu zakażeniach wirusowych wirus daje się wykryć przed wystąpieniem objawów klinicznych choroby, szczyt osiąga w okresie ostrej fazy, zaś w okresie rekonwalescencji możliwość izolacji wirusa spada. Od tej zasady są oczywiście wyjątki, np. adenowirusy i enterowirusy mogą być obecne w kale przez tygodnie a nawet miesiące, zaś CMV może być wykrywalny w moczu przez dłuższy czas.

Wiele czynników wpływa na fakt wyizolowania wirusa z badanego materiału, tj. rodzaj wirusa, miejsce, z którego został pobrany, metody stosowane w diagnostyce, wiek pacjenta (u małych dzieci na przykład przez dłuższy czas niż od osób dorosłych daje się wyizolować wirus grypy), stan immunologiczny chorego (pacjenci z obniżoną odpornością dłużej eliminują HSV).

Surowica do badań serologicznych powinna być pobrana jak najwcześniej. W niektórych zakażeniach wirusowych identyfikacja przeciwciał w klasie IgM lub obecność wysokiego miana przeciwciał całkowitych jest potwierdzeniem zakażenia. Z reguły jednak jednorazowe badanie serologiczne daje możliwość określenia stanu immunologicznego chorego. Dlatego reguła powinno być przysyłanie w kierunku badań serologicznych dwóch próbek

surowicy, pierwszej z początkowego okresu choroby, i drugiej po upływie 10 - 14 dni.

Będzie wówczas możliwe stwierdzenie bądź czterokrotnego wzrostu miana przeciwciał lub ocena tylko zmiany poziomu przeciwciał.

Wynik dodatni dotyczący przeciwciał w klasie IgG nie pozwala na stwierdzenie jak długo utrzymują się one we krwi. Dlatego też należy badać podwójne próbki surowicy pierwszą pobraną na początku choroby i drugą po upływie 14 dni. Stwierdzenie zakażenia wirusowego jest możliwe przy co najmniej czterokrotnym wzroście miana przeciwciał w ciągu 14 dni; lub co najmniej czterokrotnym spadku miana przeciwciał w późniejszym okresie choroby. Bardzo cenną wskazówką jest badanie swoistych przeciwciał w klasie IgM. Są one wykładnikiem wczesnego zakażenia. Z tego względu surowicę należy pobrać na samym początku choroby.

Badania serologiczne są zawsze obarczone możliwością otrzymania wyników fałszywych. Wyniki fałszywie dodatnie otrzymujemy w przypadku reakcji krzyżowych z antygenami innego czynnika zakaźnego nie będącego przyczyną danego zakażenia bądź obecności przeciwciał w klasie IgG po szczepieniu. Natomiast wyniki fałszywie ujemne możemy otrzymać gdy zbyt wcześnie pobrano surowicę brak

przeciwciał lub zahamowania wytwarzania przeciwciał, np. w stanach immunosupresji. Wykluczając niedokładności techniczne, jest to związane z nieswoistymi reakcjami zachodzącymi wówczas, gdy w badanym materiale występuje np. czynnik reumatoidalny, zhemolizowana krew, kompleksy immunologiczne lub autoprzeciwciała. Najczęściej wyniki nieprawdziwe otrzymuje się od pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi, nowotworami, zwłaszcza rozrostowymi chorobami tkanki chłonnej lub ostrymi zakażeniami wirusowymi. Dlatego też w niektórych badaniach serologicznych stosowane są testy potwierdzenia w celu weryfikacji dodatnich wyników otrzymanych w badaniu przesiewowym.

Inne badania można weryfikować przy pomocy testu western-blot. Dużą trudność interpretacyjną stwarzają te próby, w których w teście WB otrzymuje się wynik wątpliwy (nierozstrzygnięty). W takich przypadkach powinno się badanie powtórzyć po upływie ok. 3 miesięcy lub zastosować metody biologii molekularnej celem stwierdzenia obecności materiału genetycznego wirusa.

*Prof. zw. dr hab. n. med.
Małgorzata Polę-Daciewicz
Kierownik Zakładu Wirusologii
Akademii Medycznej w Lublinie*

Pomiary oksymetryczne

Pomiary oksymetryczne

Do prawidłowego utlenowania tkanek niezbędna jest dostępność tlenu atmosferycznego, prawidłowa wymiana gazów pomiędzy płucami a krwią tętniczą, wbudowanie tlenu do hemoglobiny oraz transport i uwalnianie tlenu w tkankach. Słabe utlenowanie tkanek może być wynikiem nieprawidłowego działania któregośkolwiek z tych procesów. Do pełnej oceny gospodarki tlenem we krwi potrzebny jest pomiar ciśnienia parcjalnego tlenu (PO_2), oznaczenie stężenia hemoglobiny oraz określenie wysycenia hemoglobiny tlenem. Chociaż do prawidłowego utlenowania tkanek konieczne jest odpowiednio wysokie ciśnienie parcjalne tlenu (PO_2), należy wziąć pod uwagę również to, że ilość tlenu dostarczanego do tkanek zależy od zawartości tlenu w krwi tętniczej a to z kolei zależy od stężenia hemoglobiny i jej wysycenia tlenem.

Hemoglobina

Hemoglobina jest białkiem globularnym, którego funkcja polega na przenoszeniu tlenu z płuc do innych tkanek organizmu. Ponad 90% hemoglobiny stanowi hemoglobina A, prawidłowa hemoglobina

dorosłych jest tetramerem zbudowanym z dwóch różnych łańcuchów polipeptydowych: łańcucha złożonego ze 141 aminokwasów i łańcucha zawierającego 146 reszt aminokwasowych (HbA , $\alpha_2\beta_2$, m.cząst. 64500 Da). Drugą formę stanowi hemoglobina A2 (HbA_2 , $\alpha_2\delta_2$), której ilość waha się między 2-25%. Ponadto we krwi występują pochodne hemoglobiny powstałe na skutek procesu glikacji, głównie hemoglobina HbA_{1c} . W zależności od wieku we krwi występują też zmienne ilości innych hemoglobin. Hemoglobina embrionalna, produkowana przez ciałko żółte pomiędzy 3 a 8 tygodniem ciąży, składa się z różnych kombinacji łańcuchów α, ξ, γ i ϵ . Trzy główne formy tej hemoglobiny to Gower 1 ($\xi_2\epsilon_2$), Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$) i Portland ($\xi_2\gamma_2$). Hemoglobina płodowa (HbF) składa się z dwóch łańcuchów alfa i dwóch łańcuchów gamma ($\alpha_2\gamma_2$). Większość klinicznie istotnych mutacji genowych redukuje ilość syntetyzowanego łańcucha alfa lub beta (talasemie), co powoduje zmiany rozpuszczalności hemoglobiny (HbS lub HbC). Niekiedy, chociaż rzadko, mutacje genowe zmieniają powinowactwo hemoglobiny do tlenu. Hemoglobiny mogą

być podzielone na dwie klasy: zdolne do wiązania tlenu (prawidłowe Hb) i pochodne Hb niezdolne do wiązania tlenu (dyshemoglobiny). Do prawidłowych hemoglobin zalicza się oksyhemoglobinę (O_2Hb) i deoksyhemoglobinę (HHb). Oksyhemoglobina jest definiowana jako hemoglobina erytrocytów zawierająca tlen przyłączony do żelaza (Fe^{+3}) grupy hemu w sposób odwracalny. Deoksyhemoglobina jest to hemoglobina zdolna do wiązania tlenu, ale w momencie pomiaru jest oddlenowana. Do nieprawidłowych hemoglobin zalicza się hemoglobine tlenowęglową (karboksyhemoglobinę, $HbCO$), methemoglobine ($HbMet$) i sulfhemoglobine (HbS). Hemoglobina jest białkiem allosterycznym, co oznacza, że wiązanie tlenu z jedną z podjednostek jest uzależnione od jej oddziaływania z innymi podjednostkami. Ujmując ściślej, wiązanie tlenu do jednej z podjednostek hemoglobiny indukuje zmiany konformacyjne, które przekazywane na sąsiednie podjednostki zwiększają ich powinowactwo do tlenu. Taki proces ułatwia wiązanie tlenu do kolejnych podjednostek. Dlatego też wiązanie tlenu z hemoglobiną określa się jako kooperatywne, w przeciwieństwie do

wiązania tlenu z pojedynczym łańcuchem polipeptydowym mioglobiny, które jest niekooperatywne. Do biologicznych czynników mających najbardziej istotny wpływ na wiązanie tlenu do hemoglobiny należy stężenie jonów wodorowych, ciśnienie parcjale dwutlenku węgla, temperatura i stężenie 2,3-bis-fosfoglicerynianu (BPG, dawna nazwa 2,3-difosfoglicerynian, DPG) często nazywanymi regulatorami allosterycznymi, ponieważ stabilizują one konformację hemoglobiny nieutlenowanej (HHb) i w ten sposób ułatwiają uwalnianie tlenu. Ponieważ czynniki te oddziałują na różne miejsca w cząsteczce hemoglobiny, skutki ich działania podlegają sumowaniu.

Całkowita zawartość tlenu we krwi jest sumą stężenia tlenu związanego z hemoglobiną i tlenu fizycznie rozpuszczonego we krwi. Całkowite stężenie tlenu we krwi wynosi 9 mmol/l, z czego stężenie tlenu rozpuszczonego fizycznie wynosi 0,14 mmol/l a resztę stanowi tlen połączony z hemoglobiną (O₂Hb). Wychwyty tlenu przez krew w płucach zależy przede wszystkim od ciśnienia parcjale tlenu w pęcherzykach płucnych i od zdolności tlenu do swobodnego dyfundowania przez błonę pęcherzyka do krwi. Przy normalnym ciśnieniu parcjale tlenu w pęcherzykach płucnych, które wynosi około 102 mmHg i prawidłowym stężeniu hemoglobiny, ponad 95%, a przy ciśnieniu 110 mmHg ponad 98% hemoglobiny jest związana z tlenem. Gdy cała hemoglobina jest nasycona tlenem, dalszy wzrost ciśnienia parcjale tlenu w pęcherzykach płucnych po prostu zwiększa stężenie fizycznie rozpuszczonego tlenu we krwi tętniczej. Dostarczanie tlenu z krwi do tkanek jest uzależnione od gradientu ciśnienia parcjale tlenu pomiędzy krwią tętniczą i komórkami tkanek, a także od stopnia dysocjacji oksyhemoglobiny w erytrocytach.

Pomiar stężenia hemoglobiny

Pomiar stężenia hemoglobiny, ze względu na inną strukturę cząsteczki hemu w różnych pochodnych hemoglobiny, jest możliwy spektrofotometrycznie. Unikalne widmo absorpcyjne poszczególnych hemoglobiny powoduje łatwość ich pomiaru w mieszaninie. Absorbancja jest własnością addytywną, dlatego też konieczny jest jej pomiar przy wielu długościach fali światła. Najprostsze spektrofotometry mierzą hemoglobiny tylko przy dwóch długościach fali, zatem możliwy jest pomiar tylko O₂Hb i HHb. We współczesnych oksymetrach możliwy jest pomiar absorbancji przy 128 długościach fali, co umożliwia bardzo dokładne pomiary wielu pochodnych hemoglobiny. Pomiary przy różnych długościach fali nie tylko polepszają dokładność, ale także minimalizują lub

eliminują wpływ substancji interferujących. We współczesnych oksymetrach możliwy jest pomiar hemoglobin prawidłowych (O₂Hb i HHb) oraz dyshemoglobiny (głównie MetHb i COHb). Wyniki oznaczeń poszczególnych frakcji hemoglobiny są zwykle podawane jako procent hemoglobiny całkowitej.

Pomiar i wysycenie hemoglobiny tlenem

Wysycenie hemoglobiny tlenem oznacza stosunek funkcjonalnej hemoglobiny wysyczonej tlenem do całkowitej zdolności hemoglobiny do wiązania tlenu. Pośrednio pozwala na oszacowanie PO₂. Chociaż każdy sposób wyrażania wysycenia hemoglobiny tlenem powszechnie jest określany jako indeks saturacyjny, stosowane pojęcia nie wyrażają tego samego i mają różne definicje

1. Wysycenie (saturacja) hemoglobiny tlenem (SO₂),

Saturacja hemoglobiny tlenem (SO₂) jest określana jako stosunek stężenia oksyhemoglobiny (hemoglobiny utlenowanej O₂Hb) do sumy stężeń oksyhemoglobiny i deoksyhemoglobiny (hemoglobiny oddlenowanej, HHb):

$$SO_2 = \frac{[O_2Hb]}{[O_2Hb] + [HHb]}$$

Pomiar stężenia hemoglobiny przeprowadzany jest spektrofotometrycznie, a SO₂ wyrażane jest w procentach. Wyznaczone w ten sposób wysycenie hemoglobiny tlenem nie uwzględnia obecności innych hemoglobiny, np. hemoglobiny tlenkowej, methemoglobiny lub sulphemoglobiny. Równanie to może być stosowane tylko u osób, które nie mają dyshemoglobiny. SO₂ powszechnie jest mierzone przy pomocy pulsoksymetrów. Zasada tych urządzeń opiera się na pomiarze wysycenia tlenem w tętnicy poprzez pomiar stosunku pulsującego światła, które przechodzi przez łożysko naczyniowe podskórne przy dwóch długościach fali: 660 i 940 nm. Zarówno O₂Hb jak i HHb absorbują światło przy tych dwóch długościach fali, a pomiaru dokonuje się w warunkach statycznych i warunkach pulsacji. Stosunek sygnału przy 660 nm i bliskiej podczerwieni odnoszony jest do krzywej kalibracyjnej saturacji tlenem, która jest wyznaczona i zaprogramowana dla danego urządzenia. Chociaż pulsoksymetry są bardzo często stosowane, to pamiętać należy, że wszelkie nieprawidłowości wiązania tlenu przez hemoglobinę lub też obecność dyshemoglobiny dają wyniki obciążone błędem.

2. Udział procentowy frakcji oksyhemoglobiny (FO₂Hb),

Najbardziej właściwą metodą określania wysycenia hemoglobiny tlenem jest oznaczenie rzeczywistej frakcji hemoglobiny

utlenowanej (FO₂Hb), którą oblicza się jako stosunek stężenia oksyhemoglobiny do sumy stężeń wszystkich hemoglobiny obecnych w danym momencie w organizmie:

$$FO_2Hb = \frac{[O_2Hb]}{[tHb]}$$

$tHb = O_2Hb + HHb + OHb + MetHb + SulfHb$

Stosując oznaczenie FO₂Hb nie ma niebezpieczeństwa błędnego pomiaru wysycenia hemoglobiny tlenem nawet w obecności dyshemoglobiny. Obniżenie FO₂Hb we krwi tętniczej wskazuje albo na niskie ciśnienie parcjale tlenu albo na nieprawidłowe powinowactwo hemoglobiny do tlenu. Ilość tlenu, która jest przenoszona przez krew, określana jest przez trzy czynniki: ciśnienie parcjale tlenu (które odzwierciedla ilość tlenu rozpuszczonego we krwi), ilość hemoglobiny dostępnej w erytrocytach i powinowactwo tej hemoglobiny do tlenu. Obniżone ciśnienie parcjale tlenu oznacza obniżoną zdolność tlenu do dyfundowania z pęcherzyków płucnych do krwi. Taką sytuacją może mieć miejsce np. przy hipowentylacji. Obniżenie stężenia całkowitej hemoglobiny może wynikać z małej liczby erytrocytów, które zawierają prawidłowe stężenie hemoglobiny (jak w przypadku anemii normochromicznej) albo z obniżonego średniego stężenia hemoglobiny w erytrocytach, jak to ma miejsce w przypadku anemii hipochromicznej. Obniżenie FO₂Hb może się pojawić jako efekt zatrucia tlenkiem węgla, azotynami lub cyjankami, a zatem przy obecności dyshemoglobiny, które nie są w stanie prawidłowo wiązać lub wymieniać tlen. Klinicznie istotne jest rozróżnienie pomiędzy tętniczą hipokseją (obniżone tętnicze ciśnienie parcjale tlenu i obniżone SO₂ lub FO₂Hb z powodu niewystarczającej dostępności tlenu) i cyjanozą będącą skutkiem nieprawidłowego wysokiego stężenia zredukowanej hemoglobiny lub obecności chemicznie zmienionych hemoglobiny niezdolnych do przenoszenia tlenu. Jest oczywiste, że ani SO₂ ani FO₂Hb nie są miarą całkowitej ilości hemoglobiny połączonej z tlenem, bowiem ilość ta zależy od PO₂ i całkowitego stężenia hemoglobiny.

Podczas wstępnej oceny stanu klinicznego pacjenta nie powinno się polegać wyłącznie na pomiarach wykonywanych przy użyciu pulsoksymetrów. SO₂ mierzone tą metodą znacznie różni się od wartości FO₂Hb mierzonej przy użyciu CO-oksymetru, szczególnie w sytuacji zwiększonej ilości COHb lub MetHb. Udział procentowy O₂Hb zmniejsza się liniowo wraz ze wzrostem stężenia COHb (tlenek węgla zastępuje tlen przy atomie żelaza w hemie),

natomiast wartość saturacji SO_2 pozostaje powyżej 90%. W przypadku braku ekspozycji na tlenek węgla różnice pomiędzy saturacją SO_2 mierzoną przy pomocy pulsoksymetru i FO_2Hb mierzoną przez CO-oksymetr nie wynoszą z reguły więcej niż 3 do 5% u osób zdrowych.

3. Oszacowane wysycenie tlenem lub saturacja O_2 ($\text{O}_{2\text{SAT}}$).

Innym sposobem określenia wysycenia hemoglobiny tlenem jest korzystanie z obliczanej przez program komputerowy oksymetru wartości $\text{O}_{2\text{SAT}}$. Wartość ta jest obliczana na podstawie oznaczeń pH, PO_2 i stężenia hemoglobiny przy zastosowaniu empirycznego równania, które opiera się na założeniu, że powinowactwo hemoglobiny do tlenu jest prawidłowe, nie ma dyshemoglobin oraz stężenie BPG jest prawidłowe.

Aspekty analityczne pomiarów oksymetrycznych

Aby pomiary oksymetryczne były miarodajne, muszą być spełnione określone warunki. Krew pełna tętnicza powinna być pobrana anaerobowo do kapilar lub strzykawek heparynizowanych (ok. 0.05 mg heparyny/ml krwi). Krew arterializowana nie jest preferowana gdy ciśnienie skurczowe wynosi mniej niż 95 mmHg. Krew powinna być dokładnie wymieszana z heparyną, transportowana do laboratorium w lodzie, a oznaczenie wykonane natychmiast. Całkowity błąd oznaczeń oksymetrycznych zależy w dużej mierze od błędów przedanalizacyjnych, z których najważniejsze to palenie papierosów przed pobraniem krwi, obecność pęcherzyków powietrza w próbce, rozcieńczenie krwi antykoagulantem oraz nieprawidłowa temperatura transportu próbki. Istotne znaczenie ma obecność substancji interferujących, które mogą zmieniać widmo absorpcyjne hemoglobiny, a także pobranie krwi w stanie nierównowagi tlenowej. Oznaczając pO_2 u pacjentów białaczkowych z $\text{WBC} > 40 \times 10^3 \text{ mm}^3$ należy zwracać uwagę na to, czy nie ma spadku pO_2 w trakcie analizy. Spadek taki jest bowiem efektem bardzo szybkiego zużycia tlenu przez WBC.

Uwaga końcowa.

Każdy analityk wykonujący oznaczenia równowagi kwasowo-zasadowej na automatach, które podają również wysycenie hemoglobiny tlenem powinien zwracać szczególną uwagę na uzyskiwane wartości i nie interpretować mylnie prawidłowych wartości $\text{O}_{2\text{SAT}}$. Jeżeli nie ma możliwości dokonania pomiaru stężenia dyshemoglobiny, wyliczona wartość $\text{O}_{2\text{SAT}}$ praktycznie nie ma wartości diagnostycznej. Znajomość ograniczeń różnych sposobów określenia

wysycenia hemoglobiny tlenem może w wielu sytuacjach przyczynić się do poprawy procesu diagnostycznego.

Prof. dr hab. Krystyna Sztefko

Zakład Biochemii Klinicznej

PA Instytutu Pediatrii

Collegium Medicum UJ Kraków

POJĘCIE I ZAKRES IMMUNODIAGNOSTYKI

Wstęp

Immunodiagnostyka, wyodrębniona część diagnostyki laboratoryjnej, jest obecnie dobrze określoną dziedziną, zarówno pod względem teoretycznym, jak i praktycznym. Swoją odrębność zawdzięcza złożoności układu odpornościowego i stale rosnącej wiedzy o tajnikach tego układu. Wypracowane przez immunologów techniki badawcze znalazły zastosowanie nie tylko w innych obszarach nauki, jak: biologia, biochemia, ale także w innych działach diagnostyki laboratoryjnej, jak patomorfologia, mikrobiologia, czy parazytologia.

Immunodiagnostyka stanowi ważny trzon dwóch nowopowstałych nadspecialności: lekarskiej immunologii klinicznej, oraz nielekarskiej immunologii medycznej.

Zanim jednak zajmiemy się immunodiagnostyką sensu stricto, musimy dokonać krótkiej charakterystyki układu odpornościowego dla zrozumienia zasad i reguł warunkujących jego ocenę. Układ odpornościowy lub immunologiczny wywodzi się z układu krwiotwórczego i jego morfologicznym substratem jest szpik kostny i układ limfatyczny. Odporność generowana przez układ immunologiczny dzieli się na nieswoistą, inaczej wrodzoną lub naturalną i na swoistą, czyli nabytą. Odporność nieswoista, starsza pod względem filogenetycznym ma niski stopień rozpoznawania obcych substancji i rozróżnia je na zasadzie „swoi lub obcy”. Do składników tej odporności zalicza się układ dopełniacza, białka ostrej fazy, pochodne lektyn, jak flikoliny, kolektyny, liczne komórki krwi, jak: granulocyty, monocyty, komórki NK (naturalni zabójcy) i wiele innych. Odporność ta dominuje w świecie zwierząt na niskim etapie rozwoju i jest wyłączną formą u bezkręgowców. Pomimo prostoty działania odporność ta okazała się bardzo skuteczna, o czym świadczy bogactwo i liczebność gatunków fauny. Czynniki i mechanizmy odporności wrodzonej przetrwały okres ewolucji i zarówno u naczelnych, jak i u człowieka są one licznie reprezentowane. Co więcej, odporność nabyta wykorzystuje mechanizmy odporności wrodzonej w swoich reakcjach wykonawczych. Przykładem może być liza

krwinek czerwonych opłaszczonych przeciwciałami w obecności dopełniacza.

Odporność swoista (nabyta), powstała znacznie później w procesie ewolucji. Jej mechanizmy pojawiały się stopniowo i ulegały doskonaleniu w miarę powstawania gatunków na coraz wyższym szczeblu rozwoju. Obecnie u człowieka odporność swoistą tworzą dwie subpopulacje limfocytów: T i B. Produktem limfocytów B są przeciwciała należące do 5 klas immunoglobulin: IgG, IgA, IgM, IgD i IgE. Swoistość wyraża się w zdolności rozpoznawania zarówno przez w/w komórki, jak i przez przeciwciała, subtelnych różnic w strukturze substancji, drobnoustrojów pozwalających rozróżnić zmiany nawet 1 aminokwasu w budowie peptydu, czy kierunku rotacji optycznej oligosacharydu.

Ważną cechą odporności swoistej jest tzw. pamięć immunologiczna pozwalająca na szybką mobilizację komórek lub przeciwciał po wnikięciu do ustroju tego samego patogenu, z którym organizm poprzednio się zetknął. Polega na rozplmie klonu komórek, który posiada receptor dla danego antygeny drobnoustroju. Jest to tzw.

ekspansja klonalna. Tym się tłumaczy naszą odporność na kontakt z chorobami zakaźnymi, na które chorowaliśmy w dzieciństwie. Pomimo wielu zalet odporności swoistej, ma ona także wiele wad, jak choćby skłonność do indukowania odpowiedzi przeciwko własnemu antygenom ustroju, co prowadzi do autoimmunizacji i chorób autoimmunizacyjnych (autoimmunologicznych). Nadmierna reaktywność tej odporności związana jest natomiast z dużą grupą chorób z nadwrażliwości, z chorobami alergicznymi. Mutacje w obrębie komórek układu odpornościowego, głównie z zakresu odporności swoistej prowadzą do nowotworów tzw. chłoniaków (lymphoma). Tak, więc, wracając do pojęcia immunodiagnostyki należy przyjąć po pierwsze, że musi obejmować ocenę nie tylko odporności swoistej (nabytej), ale także odporności wrodzonej, gdyż obie uczestniczą w patogeniezie wielu chorób. Po drugie, że ocena sine que non winna być szeroka i dotyczyć możliwie jak najwięcej parametrów, gdyż jak się przekonamy później, nawet niedobór jednego, pozornie mało istotnego składnika układu immunologicznego może warunkować nie tylko ciężką chorobę, ale nawet zagrożenie życia.

Materiał badawczy immunodiagnostyki

Materiał biologiczny nadający się do badania immunologicznego jest bardzo szeroki i obejmuje niemal wszystkie płyny i tkanki ustroju (zestawiono je w Tabeli 1). Zaznaczyć jednak należy, że zdecydowana

większość testów immunologicznych wymaga materiału świeżego, najlepiej nie poddanego działaniu utrwalaczy, wysokiej temperatury i innych środków fizykochemicznych. Po wykonaniu testu pozostały materiał może być przechowywany jedynie w stanie zamrożonym. W przypadku żywych komórek wymaga to odpowiedniej aparatury do kontrolowanego zamrażania i przechowywania w ciekłym azocie.

Możliwości badawcze immunodiagnostyki ocena płynów ustrojowych.

Wachlarz dostępnych metod jest bogaty i wykorzystywany nie tylko przez immunologów. Zestawiono je w Tabeli 2. Warto zwrócić uwagę, że dzielą się one na jakościowe i ilościowe. Z jakościowych immunoelektroforeza, a więc immunodifuzja białek po rozdzielu elektroforetycznym wobec przeciwciał pozostaje wciąż „złotym standardem” dla wykrywania braku lub nadmiaru immunoglobulin i innych białek w surowicy i płynach jam ciała. Inne immunologiczne metody jakościowe okazały się szczególnie przydatne w wykrywaniu szerokiego spektrum autoprzeciwciał, zwłaszcza w surowicy chorych. W wielu chorobach autoimmunizacyjnych dochodzi do powstawania różnych autoprzeciwciał, których wykrycie ma istotne znaczenie kliniczne. Dostępne handlowo testy w których na nośniku umieszczono szereg antygenów rekombinowanych pozwalają w wyniku jednorazowej inkubacji z badaną surowicą stwierdzić obecność odpowiednich autoprzeciwciał. Metoda „Western blotting” jest rozwinięciem tego podejścia, jednak dzięki rozdzielu elektroforetycznemu mieszaniny antygenów uzyskuje się tu więcej danych, jak masa cząsteczkowa danego autoantygeny, jego ruchliwość elektroforetyczna i inne. W przypadku antygenów lub nośników korpuskularnych manifestacją odczynu dodatniego jest reakcja aglutynacji lub zmętnienia roztworu.

Reakcje aglutynacji czynnej stosowane są głównie w hematologii. W ten sposób oznacza się autoprzeciwciała przeciwko krwinkom czerwonym, leukocytom czy płytkom krwi. Natomiast aglutynacja bierna polega na opłaszczeniu nośnika, np. kulek lateksu badanym antygenem. W ten sposób wykrywa się np. przeciwciała przeciwko γ -globulinie ludzkiej, czyli czynnik reumatoidalny. γ -globulina jest tu opłaszczona na kulkach lateksu i aglutynacja kulek jest wykładnikiem reakcji dodatniej.

Testy ilościowe wykorzystują liczne techniki badawcze, ale najbardziej popularną stała się ostatnio metoda immunoenzymatyczna ELISA. Wprowadzona w 1971 r. stała się podstawą zdecydowanej większości goto-

wych zestawów do oznaczeń ilościowych antygenów i przeciwciał, zwłaszcza w chorobach autoimmunizacyjnych i zakaźnych. Zaletą metody jest prostota wykonania, odczynniki bezpieczne dla wykonawcy, stosunkowo niedrogi sprzęt i aparatura potrzebne do realizacji. Zasada testu polega na związaniu dwóch reaktantów (antygeny i przeciwciała), z których jeden jest opłaszczony na immunosorbencie, zwykle płytce lub probówce plastikowej (nośnik). Następnie nośnik poddaje się reakcji z przeciwciałem przeciwko aglobulinie przeciwciała pierwotnego, znakowanym enzymem, najczęściej peroksydazą chrzanową. Enzym wykrywa się przy pomocy odpowiedniego substratu dającego reakcję barwną ocenianą kolorymetrycznie.

Czułość reakcji w zależności od warunków testu waha się od 1 do 10 ng/ml

Oprócz testu ELISA istnieje jednak wiele innych ilościowych technik badawczych, które zapewniają badanie wielkiej liczby próbek w sposób zautomatyzowany i powtarzalny. Niektóre z nich cechują się bardzo wysoką czułością. Należą tu przede wszystkim metody radioimmunologiczne (RIA, IRMA), nefelometryczne, turbidymetryczne czy luminiscencyjne. Nie będą one tutaj omawiane, bo dobrze znane są pracownikom laboratoriów analitycznych i wykorzystywane zwykle w dużych „kombajnach” laboratoryjnych. Warto tu jednak wspomnieć, że dla oznaczeń hormonów i ich przeciwciał metody radioimmunologiczne stanowią wciąż „złoty standard” ze względu na czułość i powtarzalność wyników (Tabela 3).

Metody odporności komórkowej

Dostępne metody można podzielić na dwie grupy: pierwszą, która umożliwia określić cechy fenotypowe komórek i wtórnie wyróżnić ich subpopulacje oraz drugą pozwalającą na badanie funkcji komórek. W odniesieniu do pierwszej grupy, istniejące metody pozwalają ocenić szeroki wachlarz makromolekuł, nie tylko powierzchniowych, ale także cytoplazmatycznych. W przypadku limfocytów, a także innych komórek krwi, są to tzw. antygeny różnicowania według klasyfikacji CD (cluster determinants). Zostały one określone na podstawie reaktywności przeciwciał monoklonalnych wytworzonych w różnych laboratoriach, ale wykrywających tą samą cząsteczkę, a właściwie determinantę antygenową (epitop). Przeciwciała te tworzą tzw. gniazdo (cluster) dla danego epitopu, stąd nazwa. Poszczególne determinanty określa się skrótem CD i liczbą, np. typowy marker limfocytów T to CD3, a limfocytów B

CD20. Liczba wykrywanych determinant przy pomocy nowo wytworzonych przeciwciał stale rośnie i obecnie przekracza już 360. Weryfikację swoistości tych przeciwciał przeprowadza się różnymi metodami, jak: cytometria przepływowa, immuno blotting (Western blotting), immunoprecypitacja, a także techniki molekularne. Szczególna rola przypada tu cytometrii przepływowej, ze względu na szybkość pomiaru, możliwość oceny ilościowej a także wykonywanie badania na żywych nieuszkodzonych komórkach. Dodatkową zaletą cytometrii przepływowej jest możliwość oceny średniej intensywności fluorescencji na badanych komórkach (tzw. ang. Mean Fluorescence Intensity MFI) pozwalająca określić gęstość danych receptorów na powierzchni komórek.

Druga grupa metod oceny odporności komórkowej obejmuje testy na żywych komórkach, zwykle w warunkach krótkotrwałej hodowli in vitro, określających zdolność do różnych funkcji, jak proliferacja, aktywność cytotoksyczna, fagocytoza, migracja i inne.

Do najczęściej stosowanych należy test transformacji blastycznej limfocytów. Polega on na stymulacji komórek przy pomocy substancji znanych z tego, że aktywują komórki do przemiany blastycznej, syntezę kwasów nukleinowych i następnej proliferacji. Są to tzw. lektyny - związki organiczne reagujące z cukrami - w sposób nieenzymatyczny, jak fitohemaglutynina (PHA), konkanawalina (ConA) i inne. Transformowane komórki można liczyć pod mikroskopem, ale zwykle ocenia się stopień syntezy DNA przy pomocy pomiaru izotopu (^3H - tymidyny) wbudowanego w DNA. W wielu chorobach dochodzi do istotnego spadku zdolności limfocytów do transformacji blastycznej.

Testy oceny cytotoksyczności limfocytów oparte są również o zastosowania izotopów. Komórki mające być przedmiotem ataku cytotoksycznego (komórki docelowe) znakuje się izotopem chromu ^{51}Cr . Interakcja pomiędzy komórkami efektorowymi i docelowymi prowadzi do uwolnienia cząsteczek izotopu, którego pomiar w supernatancie jest wykładnikiem aktywności cytotoksycznej. Test ten jest stosunkowo rzadko stosowany w rutynowych laboratoriach analitycznych. Istnieją również testy oceny cytotoksyczności komórek bez wymogu użycia izotopów oparte na pomiarze kolorymetrycznym.

Inną drogą oceny funkcji limfocytów jest pomiar wytwarzanych przez nie cytokin. Cytokiny są białkami o różnych funkcjach biologicznych. Spadek produkcji danej

cytokiny jest zwykle odbiciem upośledzenia funkcji komórki. Produkcję cytokin można badać w hodowli komórek *in vitro*, oceniając stężenie białka w supernatancie, lub oceniając wydzielanie danej cytokiny przez poszczególne komórki w teście ELISPOT. Niekiedy możliwa jest także ocena stężenia cytokin w surowicy i innych płynach ustrojowych, ale ze względu na bardzo krótki czas półtrwania i labilność tych białek metoda ta ma wątpliwą wartość.

Funkcje komórek - żernych granulocytów i monocytów.

Możliwa jest ocena co najmniej czterech czynników. Komórki poddaje się interakcji z bakteriami, np. *Escherichia coli* i liczy się komórki, które sfagocytowały bakterie. Te ostatnie, jeżeli są wyznakowane barwnikiem fluorescencyjnym umożliwiają pomiar liczby komórek w cytometrze przepływowym a więc fagocytozy. Aktywowane granulocyty, a także monocyty wytwarzają toksyczne pochodne tlenu, które pozwalają na zabicie sfagocytowanych bakterii, w wyniku tzw. wybuchu tlenowego. O żywotności komórek żernych świadczy ich zdolność do swobodnej migracji, do migracji ukierunkowanej, wywołanej jakąś substancją organiczną, np. LPS, czy chemiczną (chemotaksja) a także hamowania migracji. Służą do tego specjalne urządzenia, tzw. komory Boydena, w których umieszcza się badane komórki i daną substancję hamującą lub indukującą ruch komórek. Komórki i substancja są rozdzielone filtrem, w którym odbywa się migracja. Zakres migracji określa się w powiększeniu lupowym lub mikroskopowym (Tabela 2).

Ten bardzo ogólny przegląd technik odporności komórkowej nie dotyczył jednak oceny reaktywności swoistej pomiędzy swoście uczulonym limfocytom T i ligandem na powierzchni komórki docelowej. Dla wykrycia takich komórek konieczna jest zgodność alleli kodujących antygeny MHC pomiędzy komórką efektorową i docelową. Nowym rozwiązaniem tego wymogu są tzw. **tetrametry** będące rekombinowaną cząsteczką zawierającą antygeny MHC, receptor dla antygeny i fluorochrom. Tetramery umożliwiają określenie swoście reagujących komórek w cytometrze przepływowym. Okazało się, że ich odsetek w naciekach zapalnych, np. wirusowym zapaleniu wątroby jest bardzo niski i wynosi 1-2%. Technika tetrametrów, choć bardzo obiecująca, jest jednak obecnie jedynie w stadium badań naukowych i wymaga dalszego udoskonalenia i obniżenia kosztów realizacji.

Zastosowania immunodiagnostyki w medycynie klinicznej.

Wymienie tu tylko najważniejsze zastosowania a raczej ich przykłady, gdyż zakres immunodiagnostyki znacznie przekracza objętość tego artykułu.

Choroby autoimmunizacyjne

Toczeń układowy (lupus erythematosus) Jest to choroba o bogatej symptomatologii klinicznej ale także immunologicznej. Cechuje się obecnością licznych auto-przeciwciał, kompleksów immunologicznych w surowicy i ich odkładaniem w narządach i tkankach. Pod względem diagnostycznym do najważniejszych należy wykrycie przeciwciał przeciw jądrom komórkowym (P-Ia przeciw-jądrowe ang. ANA). Jest to szerokie pojęcie, gdyż obejmuje przeciwciała przeciwko kilkunastu różnym antygenom jądrowym. Do najczęstszych należą p-Ia p-ko nukleoproteinie oraz przeciwko DNA o podwójnej spirali (dsDNA). Obecność tych ostatnich przemawia za zajęciem nerek przez proces chorobowy.

Reumatoidalne zapalenie stawów - rzs (polyarthritis rheumatoidea)

Potoczną nazwą jest gościec stawowy. Jest to choroba będąca przewlekłym procesem zapalnym toczącym się w błonie maziowej stawów i prowadzącym do zniekształceń, usztywnień i znacznych upośledzeń funkcji stawów. Od dawna jednym z najczęstszych markerów choroby jest tzw. czynnik reumatoidalny (ang. rheumatoid factor RF), będący przeciwciałem klasy IgM przeciwko immunoglobulinie G. Znaczenie diagnostyczne RF jest jednak ograniczone, gdyż istnieją postaci rzs RF ujemne. Nowym testem cechującym się wysoką swoistością dla rzs (ponad 90%) jest oznaczanie przeciwciał p-ko białkom bogatym w reszty cytruliny (anty-CCP). Przeciwciała te pojawiają się już we wczesnej fazie choroby i ich miano wykazuje związek ze stopniem zniszczenia błony maziowej i chrząstki stawowej.

Wole Hashimoto (struma lymphomatosa)

Jest to niedoczynność tarczycy związana z obecnością kilku autoprzeciwciał i zniszczeniem mięszu gruczołu przez proces autoimmunologiczny. Najczęściej stwierdza się przeciwciała przeciwko peroksydazie tarczycowej (mikrosomalne) i p-ko tyreoglobulinie, wykrywane metodą ELISA lub radioimmunologiczną.

Pierwotna marskość żółciowa (cirrhosis hepatis biliaris primaria)

Proces autoimmunizacyjny niszczy tu tkaninę wątroby i doprowadza do rozplemu tkanki łącznej i w konsekwencji do marskości z zastojem żółci. U 95% chorych stwierdza się obecność przeciwciał przeciw-mitochondrialnych (ang. AMA). Są one

kluczowe dla rozpoznania tej choroby.

Niedobory odporności

Stany te dzielą się na pierwotne, będące wynikiem wrodzonego braku jakiegoś składnika układu lub funkcji, występujące głównie u małych dzieci oraz na wtórne spowodowane inną chorobą zasadniczą np. procesem nowotworowym, spotykane zwykle u dorosłych. Te ostatnie są znacznie częstsze, ale w większości podręczników immunologii o wiele więcej miejsca poświęca się niedoborom pierwotnym. Wynika to z faktu, że ich patogeneza jest znacznie bardziej złożona, a także dlatego, że ich wykrycie pozwoliło wyjaśnić wiele mechanizmów działania układu odpornościowego. Immunodiagnostyka pełni tu rolę kluczową w ustaleniu rozpoznania, ale w przypadku niedoborów pierwotnych coraz częściej wymaga powiązania z genetyką. Ich przyczyną jest bowiem najczęściej defekt na poziomie molekularnym.

Stosunkowo najczęstszymi niedoborami pierwotnymi odporności są niedobory humoralne głównie dotyczące klas lub podklas immunoglobulin ale także składników dopełniacza. Przy pomocy immunoelektroforezy i technik ilościowych można tu dokładnie określić rodzaj i zakres danego deficytu a także monitorować w przebiegu leczenia substytucyjnego.

Jednym z najgroźniejszych niedoborów pierwotnych jest grupa tzw. ciężkiego złożonego niedoboru odporności (SCID-ang. severe combined immunodeficiency syndrome). Występują tu braki poszczególnych subpopulacji limfocytów lub ich składników komórkowych jak ekspresja antygenów zgodności tkankowej, enzymów jak np. rekombinaz DNA itp. Ważną rolę w diagnostyce tych stanów pełni cytometria przepływowa, pozwalająca określić nie tylko typ zmiany ale i jego zakres ilościowy.

Diagnostyka niedoborów wtórnych jest zwykle dużo prostsza. Sprowadza się najczęściej do stwierdzenia deficytów immunoglobulin lub poszczególnych subpopulacji leukocytów w krwi obwodowej. Szczególne miejsce przypada tu wtórnemu nabytemu niedoborowi odporności (AIDS), będącemu właściwie chorobą zakaźną, ale prowadzącą do zniszczenia limfocytów T CD4+ warunkujących działanie niemal całego układu odporności. Oznaczenie we krwi poszczególnych rodzajów przeciwciał przeciw składnikom wirusa HIV, wirerii oraz liczby limfocytów T CD4+ ma zasadnicze znaczenie we postępowaniu leczniczym chorych.

Zapalenia

Choroby zakaźne

Diagnostyka chorób zakaźnych oparta jest w znacznym stopniu na metodach antygen

dokończenie str. 16

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 i 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.

PT Diagnosty Laboratoryjni posiadający numer wpisu na listę diagnostów powyżej 08001 proszeni są o dokonanie w/w wpłaty, przysłania jej kserokopii oraz uzupełnienia ewentualnych braków w dokumentacji.

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

UWAGA:

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

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

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

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

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

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

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

patogenu lub przeciwciała. W wirusowych zapaleniach wątroby typu B i C istnieją szczegółowe schematy oznaczeń poszczególnych antygenów wirusów i ich przeciwciał w przebiegu choroby, pozwalające określić stopień jej zaawansowania. Równolegle oznacza się liczbę kopii kwasów nukleinowych wirusów (DNA w typie B i RNA w typie C zapalenia wątroby) przy pomocy technik molekularnych (PCR).

Zapalenia nerek

W zapaleniu kłębuszków nerkowych, oprócz oznaczeń immunoglobulin, aktywności dopełniacza i obecności kompleksów immunologicznych w surowicy, ważną rolę odgrywa badanie immunofluorescencyjne biopsjatu nerki. Pozwala ono wykryć swoiste złoża wwym. białek a niekiedy także antygeny w określonych miejscach kłębuszka nerkowego i pomóc w ustaleniu ścisłego rozpoznania. Badanie wykonuje się najczęściej na skrawkach mrożonych (kriostatowych) dla zachowania labilnych cząsteczek białka.

Zapalenia naczyń

Jest to grupa około 20 chorób o nieustalonej etiologii, o mieszanej patogeniezie, częściowo zakaźnej, częściowo autoimmunizacyjnej. W chorobach tych często występują przeciwciała przeciwko cytoplazmie granulocytów tzw. ANCA. Jest ich kilka rodzajów ale do najważniejszych zalicza się cANCA (przeciwko proteinazie-3) i pANCA (przeciwko mieloperoxydazie). W ziarniniaku Wegenera cANCA występują u ponad 90% chorych i ich miano jest odbiciem aktywności choroby.

Nowotwory

Metody immunodiagnostyczne służą tu głównie do wykrywania antygenów nowotworowych a zwłaszcza tzw. antygenów płodowo-nowotworowych, jak antygen karcino-embryonalny (CEA) czy alfa-fetoproteina (AFP). Ten pierwszy występuje w wielu rakach (nowotworach złośliwych pochodzenia nabłonkowego) i ma znaczenie nie tyle diagnostyczne, co monitorujące wznowę po chirurgicznym usunięciu guza. AFP pojawia się w surowicy

Tabela 1

Materiał badawczy immunodiagnostyki

Płyny ustrojowe	Komórki i tkanki
Surowica	Krew
Płyny z jam ciała	Szpik kostny
Mocz	Skrawki narządowe
Płyn mózgowo-rdzeniowy	Rozmazy i osady komórkowe
Popłuczyny oskrzelowo-płucne	Biopsje cienkoigłowe

Tabela 2

Możliwości techniczne immunodiagnostyki

Płyny	Komórki i tkanki
Techniki żelowe	Immunofluorescencja
Immunoelektroforeza i jej odmiany	Immunocyto(histo)chemia
ELISA	Cytofluorometria przepływowa
RIA, IRMA	ELISPOT
Nefelometria	Ilościowa analiza obrazu
Luminiscencja	Test transformacji blastycznej
Turbidymetria	Ocena cytotoxyczności limfocytów
Immunoblotting („Western blotting”)	Ocena fagocytozy („Phagotest”)
Immunoprecypitacja	Ocena wybuchu tlenowego („Phagoburst”)
Aglutynacja czynna i bierna	Migracja swobodna i ukierunkowana (chemotaksja)

Tabela 3

Surowica – obiekty badawcze

Immunoglobuliny (klasy i typy)	Składowe dopełniacza (obecność, funkcja)
Autoprzeciwciała	Cząsteczki adhezyjne
Antygeny (tkankowe, narządowe, infekcyjne, nowotworowe, hormony)	Cytokiny, chemokiny i ich rozpuszczalne receptory
Kompleksy immunologiczne	Złuszczone białka kom. (Fas, CTLA-4 itp.)
Białka ostrej fazy	Antygeny płodowo-nowotworowe
Białka szoku cieplnego	Enzymy i ich inhibitory

u chorych z rakiem pierwotnym wątroby oraz u pacjentów z niedojrzałymi potworniakami jądra i ma tu pewne znaczenie diagnostyczne. Ponadto jej wykrycie w płynie owodniowym w przebiegu ciąży jest pośrednią wskazówką wady rozwojowej ośrodkowego układu nerwowego płodu.

Podsumowanie

Ten krótki i pobieżny przegląd możliwości immunodiagnostyki ma jedynie wskazać czytelnikowi kierunki zastosowań metod immunologicznych w codziennej pracy laboratorium diagnostycznego. Bardziej szczegółowe dane można znaleźć w podanych poniżej pozycjach piśmiennictwa,

a także na stronach www, jak np. www.mcl.diag.pl

Jan Żeromski

Katedra Immunologii Klinicznej

Akademii Medycznej

im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Piśmiennictwo

Clinical Immunology: Robert R. Rich i wsp. Ed. Mosby, London, N.Y. 2001

Immunologia. Red. I. Roitt, J. Brostoff, D. Male. Tłum. polskie pod red. J. Żeromskiego, PZWŁ i Wyd. Med. Slotvinski Verlag, Warszawa, Bremen 2000.

Autoantibodies. Red. J.B. Peter, Y. Shoenfeld. Elsevier, Amsterdam 1996.

Zarys immunologii klinicznej. Red. M. Zembala, A. Górski, PZWŁ, Warszawa 2001.

Zaburzenia odporności u dzieci. Red. K. Zeman. PZWŁ, Warszawa, 2002.

Immunopatologia praktyczna. Red. J. Żeromski, PZWŁ, Warszawa 2000.

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.

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

USTAWA

z dnia 23 czerwca 2006 r.

**o zmianie ustawy o diagnostyce laboratoryjnej oraz ustawy
o zawodach lekarza i lekarza dentysty. (Dz.U.06.117.790)**

Art. 1. W ustawie z dnia 27 lipca 2001 r. o diagnostyce laboratoryjnej (Dz. U. z 2004 r. Nr 144, poz. 1529 oraz z 2005 r. Nr 119, poz. 1015) wprowadza się następujące zmiany:

1) art. 6 otrzymuje brzmienie:

"Art. 6. Osobą uprawnioną do samodzielnego wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej w laboratorium jest:

- 1) diagnosta laboratoryjny;
- 2) osoba posiadająca tytuł zawodowy lekarza i prawo wykonywania zawodu lekarza oraz wiedzę i umiejętności w zakresie wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej, o których mowa w art. 2, uzyskane w ramach specjalizacji, o której mowa w art. 16 ust. 1 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. z 2005 r. Nr 226, poz. 1943 i Nr 253, poz. 2131) lub posiadająca umiejętności z zakresu węższych dziedzin medycyny, o których mowa w art. 17 ust. 1 tej ustawy;"

2) art. 6a otrzymuje brzmienie:

"Art. 6a. 1. Osobą uprawnioną do wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej w laboratorium jest również osoba, która posiada:

- 1) tytuł zawodowy technika analityki medycznej;
- 2) tytuł zawodowy licencjata uzyskany na kierunku analityka medyczna
- 3) tytuł zawodowy, o którym mowa w art. 7 ust. 1 pkt 2.

2. Osoby, o których mowa w ust. 1 pkt 1 i 2, wykonują samodzielnie czynności diagnostyki laboratoryjnej, o których mowa w art. 2 pkt 1-3, a czynności, o których mowa w art. 2 pkt 4, pod nadzorem diagnosty laboratoryjnego.

3. Osoby, o których mowa w art. 7 ust. 1 pkt 2, wykonują wszystkie czynności diagnostyki laboratoryjnej pod nadzorem diagnosty laboratoryjnego.

4. Osoba posiadająca tytuł zawodowy lekarza i prawo wykonywania zawodu lekarza, w czasie realizacji programu specjalizacji i innych form kształcenia podyplomowego, odbywanych na podstawie ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty, wykonuje czynności diagnostyki laboratoryjnej w laboratorium pod nadzorem osób, o których mowa w art. 6;"

3) art. 7 otrzymuje brzmienie:

"Art. 7.

1. Diagnostą laboratoryjnym jest osoba, która:

1) ukończyła studia wyższe na kierunku analityka medyczna i uzyskała tytuł zawodowy magistra lub

2) ukończyła studia wyższe na kierunkach:

- a) biologia lub farmacja i uzyskała tytuł zawodowy magistra,
- b) chemia lub biotechnologia i uzyskała tytuł zawodowy magistra lub magistra inżyniera,
- c) weterynaria i uzyskała tytuł zawodowy lekarza weterynarii - oraz odbyła kształcenie podyplomowe, o którym mowa w art. 7a, potwierdzone egzaminem, albo uzyskała specjalizację I lub II stopnia lub tytuł specjalisty w dziedzinie analityki klinicznej, diagnostyki laboratoryjnej, mikrobiologii lub toksykologii, lub

3) ukończyła studia wyższe na kierunku lekarskim i uzyskała tytuł zawodowy lekarza oraz odbyła kształcenie podyplomowe, o którym mowa w art. 7a, lub

4) posiada dyplom wydany w państwie innym niż państwo członkowskie Unii Europejskiej lub państwo członkowskie Europejskiego Porozumienia o Wolnym Handlu (EFTA) - strona umowy o Europejskim Obszarze Gospodarczym lub

Konfederacja Szwajcarska uznany w Rzeczypospolitej Polskiej za równoważny z dyplomem uzyskiwanym w Rzeczypospolitej Polskiej, potwierdzającym tytuł zawodowy magistra na kierunku analityka medyczna, lub

5) posiada kwalifikacje do wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego nabyte w państwie członkowskim Unii Europejskiej lub państwie członkowskim Europejskiego Porozumienia o Wolnym Handlu (EFTA) - stronie umowy o Europejskim Obszarze Gospodarczym innym niż Rzeczypospolita Polska lub w Konfederacji Szwajcarskiej, uznane w Rzeczypospolitej Polskiej zgodnie z ustawą z dnia 26 kwietnia 2001 r. o zasadach uznawania nabytych w państwach członkowskich Unii Europejskiej kwalifikacji do wykonywania zawodów regulowanych (Dz. U. Nr 87, poz. 954, z późn. zm.1));

6) posiada pełną zdolność do czynności prawnych;

7) posiada stan zdrowia pozwalający na wykonywanie zawodu diagnosty laboratoryjnego;

8) została wpisana na listę diagnostów laboratoryjnych.

2. Diagnostą laboratoryjnym może być również osoba posiadająca prawo wykonywania zawodu lekarza i specjalizację I lub II stopnia lub tytuł specjalisty w dziedzinie analityka klinicznego, analityka lekarskiego, diagnostyka laboratoryjna lub mikrobiologia, mikrobiologia i serologia, mikrobiologia lekarska, jeżeli została wpisana na listę diagnostów laboratoryjnych;"

4) w art. 7a ust. 1-4 otrzymują brzmienie:

"1. Kształcenie podyplomowe osób, o których mowa w art. 7 ust. 1 pkt 2 i 3, przeprowadzają szkoły wyższe, które prowadzą studia na kierunku analityka medyczna, zwane dalej "jednostkami szkolącymi".

2. Kształcenie podyplomowe może być prowadzone w trybie: dziennym, wieczorowym, zaocznym lub eksternistycznym, na podstawie programów nauczania opracowanych przez zespół ekspertów powołany przez ministra właściwego do spraw zdrowia.

3. Programy nauczania, opracowane na podstawie standardów nauczania dla kierunku analityka medyczna, powinny uwzględniać różnice między treściami programowymi określonymi w standardach kształcenia dla kierunków: farmacja, lekarski, weterynaria oraz biologia, biotechnologia, chemia, zakończonego uzyskaniem tytułu zawodowego magistra albo tytułu zawodowego magistra inżyniera.

4. Egzamin, o którym mowa w art. 7 ust. 1 pkt 2, organizuje jednostka szkoląca, a przeprowadza komisja egzaminacyjna powołana przez kierownika jednostki szkolącej;"

5) w art. 9:

a) ust. 1 pkt 2 otrzymuje brzmienie: "2) dokument stwierdzający spełnienie jednego z wymagań, o których mowa w art. 7 ust. 1 pkt 1-5;"

b) po ust. 1 dodaje się ust. 1a w brzmieniu: "1a. Osoba posiadająca prawo wykonywania zawodu lekarza do wniosku, o którym mowa w ust. 1 pkt 1, dołącza dokument "Prawo wykonywania zawodu lekarza", poświadczający spełnienie przez lekarza warunków, o których mowa w ust. 2 pkt 2, w odniesieniu do osoby niebędącej obywatelem polskim oraz w art. 7 ust. 1 pkt 6 i 7 oraz ust. 2;"

6) art. 10a otrzymuje brzmienie: "Art. 10a. W przypadku podjęcia uchwały, o której mowa w art. 10 ust. 1, w stosunku do osoby, posiadającej prawo wykonywania zawodu lekarza, Krajowa Rada Diagnostów Laboratoryjnych, w terminie 3 miesięcy od dnia podjęcia uchwały, powiadamia o tym właściwą, ze względu na miejsce wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego, okręgową radę lekarską;"

7) w art. 14 ust. 4 otrzymuje brzmienie: "4. Przepisów ust. 1-3 nie stosuje się do osób, które nabyły prawo do wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego w innych niż Rzeczypospolita Polska państwach członkowskich Unii Europejskiej lub państwach

członkowskich Europejskiego Porozumienia o Wolnym Handlu (EFTA) - stronach umowy o Europejskim Obszarze Gospodarczym lub w Konfederacji Szwajcarskiej.";

8) art. 16 otrzymuje brzmienie: "Art. 16. Wykonywanie zawodu diagnosty laboratoryjnego polega na wykonywaniu czynności, o których mowa w art. 2, w laboratorium.";

9) uchyla się art. 18.

Art. 2.

W ustawie z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza denty (Dz. U. z 2005 r. Nr 226, poz. 1943 i Nr 253, poz. 2131) wprowadza się następujące zmiany:

1) w art. 16 po ust. 2 dodaje się ust. 2a w brzmieniu: "2a. Minister właściwy do spraw zdrowia po zasięgnięciu opinii Naczelnej Rady Lekarskiej oraz Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych określa, w drodze rozporządzenia, wykaz specjalizacji uprawniających do samodzielnego wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej w laboratorium uwzględniając odpowiedni poziom wiedzy i umiejętności w zakresie wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej.";

2) w art. 17 po ust. 2 dodaje się ust. 3 w brzmieniu: "3. Minister właściwy do spraw zdrowia po zasięgnięciu opinii Naczelnej Rady Lekarskiej oraz Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych określa, w drodze rozporządzenia, wykaz umiejętności uprawniających do samodzielnego wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej w laboratorium uwzględniając odpowiedni poziom wiedzy i umiejętności w zakresie wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej.".

Art. 3.

Osoby posiadające prawo wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego w dniu wejścia w życie ustawy zachowują to prawo.

Art. 4.

Osoby, które rozpoczęły przed dniem wejścia w życie ustawy kształcenie podyplomowe, o którym mowa w art. 7a ustawy zmieniającej w art. 1, kończą to kształcenie na dotychczasowych zasadach.

Art. 5.

Ustawa wchodzi w życie z dniem ogłoszenia.

OPINIE PRAWNE RADCY PRAWNEGO KIDL

Grażyna Filipowska-Kejna WA 1376

Opinia w sprawie kompetencji samorządu diagnostów laboratoryjnych w zakresie możliwości negocjowania warunków pracy i płacy oraz czynnego uczestniczenia w sporach zbiorowych z pracodawcą.

Art. 35 ustawy z dnia 27.07.2001 r. o diagnostyce laboratoryjnej /Dz.U nr 141 z 2004 r. poz 1529 ze zm./ określa zadania samorządu diagnostów nadając mu m.in. kompetencje reprezentowania diagnostów oraz ochronę ich interesów zawodowych.

Zapis ten nie jest jednak tak sprecyzowany, jak w art. 4 ust 2 pkt. 2 ustawy z dnia 17.05.1989 r. o izbach lekarskich /Dz. U. nr 30 poz 158/ i w art. 4 ust 2 pkt. 2 ustawy z dnia 19.04.1991 r. o samorządzie pielęgniarów i położnych /Dz. U. nr 41 poz 178 ze zm/, które to zapisy wyraźnie wskazują na uprawnienia samorządu zawodowego do negocjowania warunków pracy i płacy. Regulacja art.35 ustawy o diagnostyce lab. w praktyce sprowadza się do udziału przedstawiciela KRDL w postępowaniu konkursowym na świadczenia zdrowotne określone w art. 35a ustawy o ZOZ /Dz. U. nr 91 poz 408 ostatnia zmiana Dz. U nr 75 z 2006 r. poz 518/ i w rozporządzeniu Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 13.07.1998 r. /Dz. U. nr 93 poz 592/ Rola negocjatora w sprawach warunków pracy i płacy przypada zasadniczo organizacjom związków zawodowych działającym w zakładzie pracy. Ustawa

z dnia 3.05.1991 r. o związkach zawodowych/Dz. U. nr 79 z 2001 r. poz 854/ wskazuje w art. 7 ust 3, że związek zawodowy reprezentuje wszystkich pracowników danego zakładu niezależnie od przynależności związkowej. Interesów pracowników w zakładach, w których nie działa związek zawodowy może bronić na mocy art. 3 ust 4 ustawy z dnia 23.05.1991 r. o rozwiązywaniu sporów zbiorowych /Dz. U. nr 55 poz. 236/ organizacja związkowa, do której zwrócili się pracownicy o ich reprezentowanie w sporze z pracodawcą. Ponadto uprawnienia do negocjowania warunków pracy i płacy posiada Komisja Trójstronna do spraw Społeczno Gospodarczych działająca na podstawie ustawy z dnia 16.12.1994r /Dz. U. nr 1 z 1992 r. poz 2/, składająca się z przedstawicieli naczelnych organów administracji państwowej, związków zawodowych i organizacji pracodawców. Wskazane organizacje związkowe i Komisja posiadają niezbędne przygotowanie w zakresie znajomości przepisów prawa pracy i prawa gospodarczego tak aby negocjacje prowadzone były na właściwym poziomie, zgodnie z zasadami ekonomiki i praw pracowniczych, a nie odbywały się w formie szantażu, naruszającego czasami prawa pacjenta. KRDL nie mając ustawowej delegacji do występowania w sprawach płac diagnostów powinna współdziałać ze związkami zawodowymi, które w danym zakładzie negocjują nowe warunki ale sama nie może organizować żadnych strajków pracowników zoz.

Warszawa dnia 30.06.2006 r.

Opinia w sprawie obowiązku przekazywania KRDL informacji o wszelkich zmianach dot. danych objętych wpisem w ewidencji diagnostów laboratoryjnych prowadzonej przez KRDL.

Zgodnie z art. 8 ust 3 ustawy o diagnostyce laboratoryjnej diagnosta obowiązany jest zawiadomić KRDL o wszelkich zmianach dotyczących danych wpisanych do ewidencji diagnostów laboratoryjnych a w szczególności zmiany imienia, nazwiska, nr PESEL, nr dowodu osobistego lub innego dokumentu potwierdzającego tożsamość, adresu zamieszkania. KRDL po uzyskaniu informacji dokonuje zmian w ewidencji a w uzasadnionych przypadkach wydaje nowy dokument stwierdzający prawo wykonywania zawodu diagnosty z aktualnymi danymi. Poprzednio wydany dokument podlega zwrotowi do KRDL w dniu wydania nowego dowodu. KRDL na podstawie art. 47 pkt 11 ustawy o diagnostyce laboratoryjnej pobiera od diagnosty opłaty określone w jej uchwale dot. dokonania zmian w ewidencji i prawie wykonywania zawodu. Diagnosta, który samowolnie dokonuje w prawie wykonywania zawodu zmian danych objętych wpisem do ewidencji podlega odpowiedzialności karnej na podstawie art. 270 Kk.

Warszawa dnia 29.06.2006 r.

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

- ✓uzyskali specjalizację,
- ✓zmienili adres zamieszkania,
- ✓zmienili dowód osobisty,
- ✓zmienili zakład pracy,
- ✓zmienili stan cywilny,

aby w trybie pilnym przesłali 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 z późn. zm.).

Sekretarz KRDL
Czesław Główniak