

Diagnostyka zajmuje się rozpoznaniem chorób. Dawniej diagnozę stawiano wyłącznie na podstawie występujących objawów. Jednak często następowało to w zbyt zaawansowanym, a tym samym niemożliwym do wyleczenia stadium choroby. Obecnie, dzięki metodom immunologicznym i molekularnym, można diagnozować chorobę jeszcze przed wystąpieniem pierwszych jej objawów. Zwiększa to znacznie szanse na wyleczenie, ponieważ moment diagnozy odgrywa istotną rolę w leczeniu wielu chorób.

■ Klasyczne metody diagnostyczne

Pierwsze metody wykrywania i identyfikacji patogenów wiążą się z wynalezieniem i zastosowaniem **mikroskopu**. Za jego pomocą rozpoznawano gatunek bakterii m.in. na podstawie ich kształtu. Stosowano ponadto różne rodzaje barwienia, aby odróżnić od

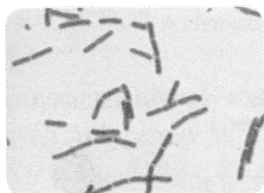
siebie gatunki bakterii o podobnym kształcie. Klasyczna diagnostyka zaczęła się rozwijać w XIX w., po odkryciu **metod hodowli bakterii** w laboratorium. Hodowle na specjalnie dobranych podłożach, tzw. **posiewy**, pozwalały na określenie nie tylko gatunku bakterii, lecz także ich fizjologicznych cech, np. wrażliwości na niektóre leki. Klasyczne metody wykrywania patogenów stosuje się również dzisiaj. Mają one zastosowanie np. przy wyborze odpowiedniego antybiotyku do zwalczania danej infekcji (ryc. 3.20.).

■ Immunologiczne metody diagnostyczne

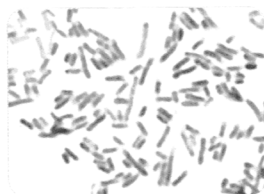
Wraz z rozwojem medycyny doskonały się metody wczesnego wykrywania w organizmie obecności czynników chorobotwórczych. Jedną z grup tych metod są **immunologiczne metody diagnostyczne**.

Metoda barwienia Grama

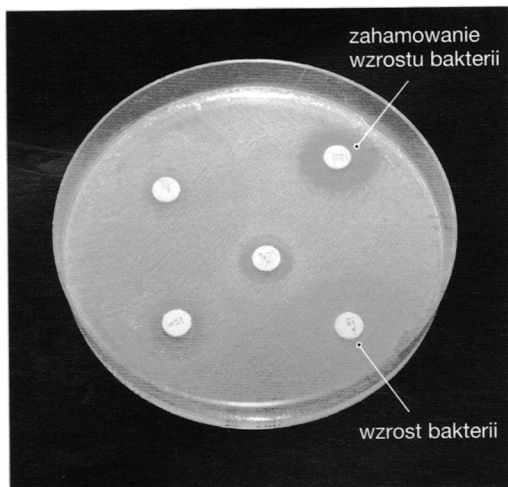
Metoda opracowana w 1884 r. przez Hansa Grama polega na barwieniu bakterii przy użyciu fioletu kryształicznego. Pozwala ona podzielić bakterie na dwie grupy: Gram-dodatnie oraz Gram-ujemne.



Bakterie Gram-dodatnie w barwieniu Grama trwale barwią się na fioletowo. Należą do nich bakterie o grubej ścianie komórkowej, m.in. paciorkowce i gronkowce.



Bakterie Gram-ujemne w barwieniu Grama nie barwią się trwale na fioletowo. Są to bakterie o cienkiej ścianie komórkowej, m.in. pałeczki z rodzaju *Salmonella*.



Ryc. 3.20. Antybiogram to wynik badania wrażliwości bakterii na antybiotyki. Wyhodowane z materiału pobranego od pacjenta (np. śliny) bakterie przenosi się na podłoże, na które nanosi się krążki zawierające różne antybiotyki. Następnie obserwuje się, czy następuje wzrost wielkości oraz liczności bakterii.

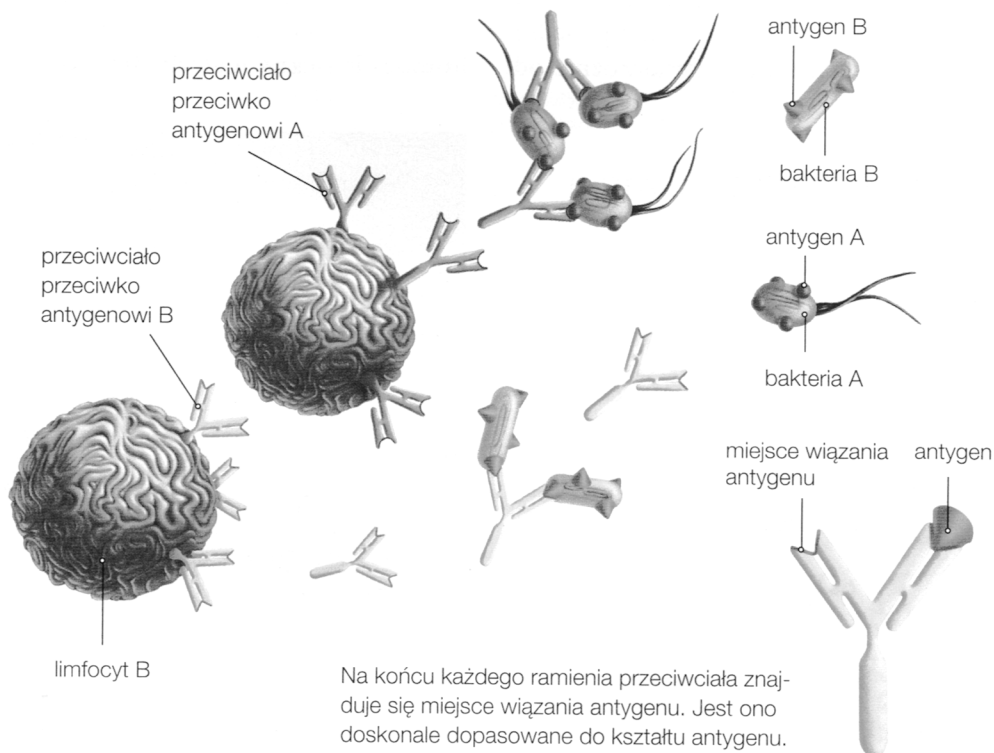
Wykorzystuje się w nich wiedzę o zjawiskach zachodzących w organizmie człowieka podczas reakcji odpornościowej, kiedy patogen zostaje rozpoznany jako obcy. Istotne znaczenie ma w tym wypadku pojawianie się we krwi specyficznych białek nazywanych **przeciwciałami**, których zadaniem jest rozpoznanie, a następnie unieszkodliwienie patogenu. Białka te są wytwarzane przez wyspecjalizowane komórki krwi – limfocyty B. Przeciwciała rozpoznają patogeny poprzez połączenie się z nimi. Dzieje się to dzięki dopasowaniu przestrzennemu fragmentów przeciwciała oraz fragmentu wirusa lub bakterii, zwanego **antygenem**. W organizmie

człowieka kontakt antygeny z przeciwciałem wywołuje reakcję odpornościową, która prowadzi do zwalczania patogenu.

Najistotniejszą cechą przeciwciał jest ich **specyficzność**, która oznacza, że każde przeciwciało rozpoznaje tylko jeden określony antygen. Z drugiej strony każdy antygen wywołuje powstanie w organizmie przeciwciał charakterystycznych tylko dla niego. Przeciwciała te zostają w organizmie człowieka nawet wtedy, gdy patogen został wyeliminowany (a więc nie ma już antygeny). Jeśli więc we krwi badanej osoby wykryjemy odpowiednie przeciwciała, to znaczy, że jej organizm musiał się zetknąć z określonym

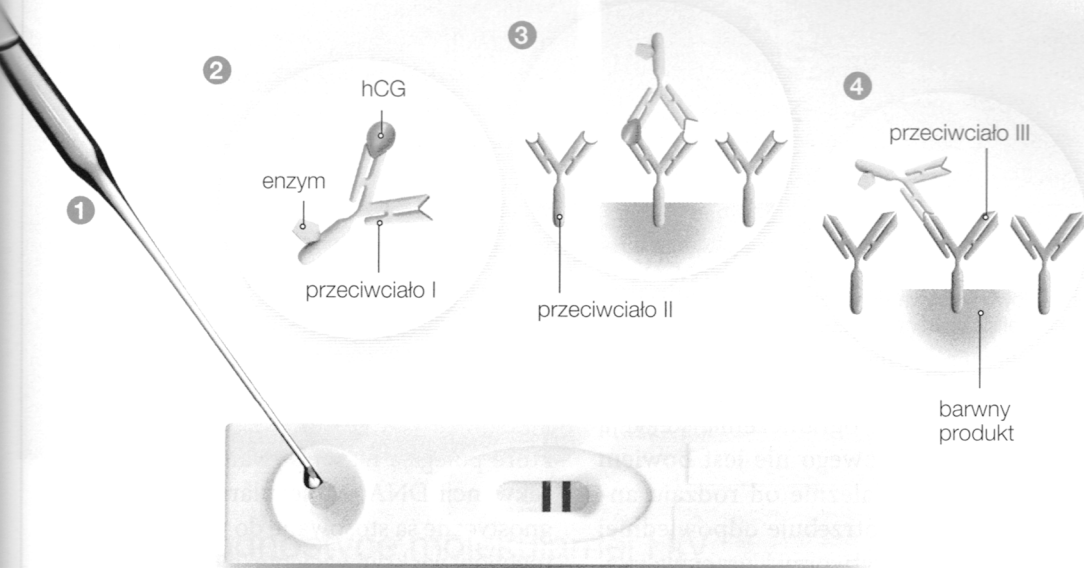
Swoiste działanie przeciwciał

Limfocyty B wytwarzają przeciwciała po otrzymaniu informacji o tym, jakie obce czynniki chorobotwórcze wtargnęły do organizmu. Kształty przeciwciał pozwalają im na połączenie się z czynnikami chorobotwórczymi i ich unieszkodliwienie.



Test ciążowy

Działanie domowego testu ciążowego opiera się na wykrywaniu hormonu białkowego – gonadotropiny kosmówkowej (hCG). Jest ona wytwarzana w początkowym etapie ciąży przez zarodek, a następnie przez łożysko. Standardowy test umożliwia wykrycie ciąży, kiedy stężenie gonadotropiny przekroczy 500 mIU/ml hCG, czyli już ok. 6 dni od zapłodnienia.



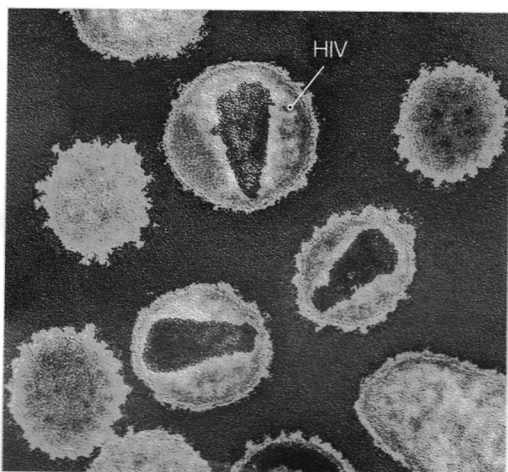
- 1** Próbkę moczu kobiety w ciąży zawiera gonadotropinę kosmówkową (hCG).
- 2** hCG wiąże się z przeciwciałem I zawierającym przyłączony enzym.
- 3** W miejscu testowym hCG (połączone wcześniej z przeciwciałem I) łączy się z przeciwciałem II związanym z podłożem. Podłoże zawiera także substrat dla enzymu. Połączenie hCG i przeciwciał umożliwia enzymowi kontakt z substratem. Powstaje barwny produkt widoczny jako różowa linia.
- 4** W miejscu kontrolnym przeciwciała III związane z podłożem wyłapują przeciwciała I (również te bez hCG). Podłoże zawiera także substrat dla enzymu. Połączenie przeciwciał umożliwia enzymowi kontakt z substratem. Powstaje barwny produkt widoczny w postaci drugiej różowej linii.

antygenem. Wykrywanie we krwi konkretnych antygenów lub przeciwciał jest powszechną formą diagnozowania zakażeń bakteryjnych oraz wirusowych. W takich testach sprawdza się rodzaj antygenów lub przeciwciał, a także ich ilość. Na tej podstawie określa się np.:

- ▶ czy badana osoba była w przeszłości chora na określoną chorobę,
- ▶ czy ta osoba obecnie choruje,
- ▶ jaka jest skuteczność stosowanej terapii.

Czy wiesz, że...

Podczas reakcji odpornościowej powstają różne rodzaje przeciwciał – tzw. klasy. Przy zakażeniu pasożytami zwiększa się np. ilość przeciwciał klasy IgA, obecność przeciwciał klasy IgM świadczy natomiast o tym, że zakażenie patogenem nastąpiło niedawno (3–14 dni wcześniej), a obecność przeciwciał klasy IgG – że nastąpiło co najmniej dwa tygodnie wcześniej.



Ryc. 3.21. Diagnozując zakażenie wirusem HIV, standardowo wykrywa się we krwi pacjenta obecność przeciwciał skierowanych przeciwko temu wirusowi.

Immunologiczne metody diagnostyczne mają jednak pewne ograniczenia. Reakcja układu odpornościowego nie jest bowiem natychmiastowa. Zależnie od rodzaju antygeny organizm potrzebuje odpowiedniej ilości czasu, aby wytworzyć przeciwciała. W tym okresie patogen jest już obecny w organizmie człowieka. Jednocześnie badania diagnostyczne nie wykazują jeszcze obecności specyficznych przeciwciał. Okres, jaki upływa między wnikiem antygeny do organizmu człowieka a pojawieniem się specyficznych dla niego przeciwciał, nazywamy **okienkiem serologicznym**.

Przełomem dla immunologicznych metod diagnostycznych było wynalezienie w II połowie XX w. metody otrzymywania w laboratorium dużej ilości identycznych przeciwciał skierowanych przeciwko konkretnemu antygenowi – tzw. **przeciwciał monoklonalnych**. Pozwoliło to na tworzenie przeciwciał „na życzenie” – na podstawie posiadanego antygeny (np. fragmentu wirusa lub bakterii) tworzy się przeciwciała wykrywające ten antygen. Przeciwciała te umieszcza się w teście diagnostycznym, który wykrywa określony antygen, więc i konkretny czynnik zakaźny.

Obecnie immunologiczne metody diagnostyczne są coraz powszechniej wykorzystywane. Dzięki testom tego typu można ustalić np. obecność bakterii, wirusów i grzybów (ryc. 3.21.). Na tej zasadzie opiera się również działanie testów ciążowych oraz wykrywających obecność narkotyków. Za pomocą obecnych w teście przeciwciał monoklonalnych wykrywany jest antygen – hormon wytwarzany tylko podczas ciąży lub substancja narkotyczna.

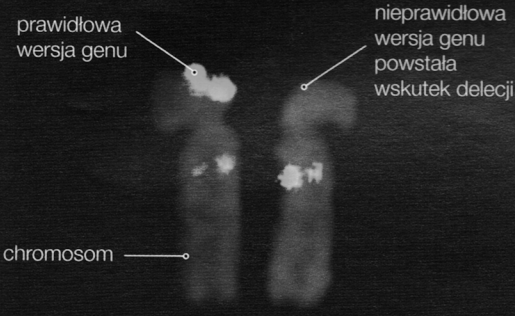
■ Molekularne metody diagnostyczne

Diagnostyka molekularna to termin wprowadzony w ostatnim dziesięcioleciu. Mianem tym określa się metody diagnostyczne oparte na osiągnięciach nowoczesnej biotechnologii. Zwykle stosuje się testy genetyczne, które polegają na wykrywaniu konkretnych sekwencji DNA. Molekularne metody diagnostyczne są stosowane do wykrywania patogenów we krwi pacjenta, a także tych chorób, których podłożem są mutacje w DNA, np. chorób nowotworowych. Do testów genetycznych wykorzystuje się zwykle jedną z dwóch technik inżynierii genetycznej:

- ▶ **łańcuchową reakcją polimerazy (PCR)**, która bazuje na powieleniu wybranego (np. charakterystycznego dla danej bakterii) fragmentu DNA lub RNA. Jeśli bakteria lub wirus występują u pacjenta, to zajdzie reakcja powielenia jego DNA i powstanie produkt (wiele identycznych fragmentów DNA). Natomiast jeśli pacjent nie uległ zakażeniu, nie otrzymamy produktu reakcji;
- ▶ **hybrydyzację DNA**, bazującą na wykrywaniu fragmentu DNA lub RNA o określonej sekwencji dzięki łączeniu się z nim tzw. **sondy molekularnej**. Jest to komplementarna do badanego fragment DNA lub RNA zawierająca znacznik (np. barwnik), dzięki któremu widać miejsce występowania badanej sekwencji.

Hybrydyzacja DNA

Dzięki metodom opartym na hybrydyzacji DNA w badanym materiale można wyszukać fragmenty DNA o znanej sekwencji.



Sondy molekularne są stosowane m.in. do diagnozowania chorób związanych z delecjami w chromosomach, np. zespołu Smith-Magenis, w którym delecja ulega fragment chromosomu 17.

Czy wiesz, że...

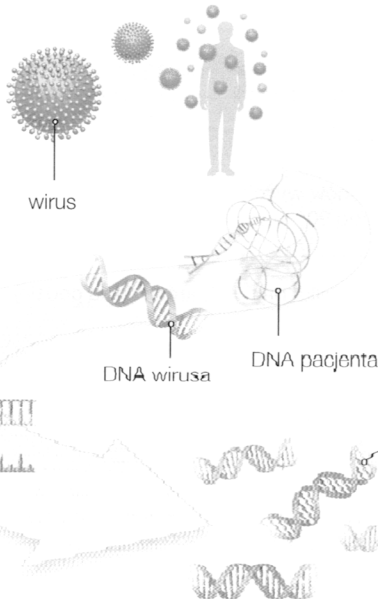
Molekularne testy diagnostyczne pozwalają potwierdzić obecność wirusa, gdy w badanym materiale występuje on w zaledwie 10 kopiach.

Najpowszechniej stosowana jest diagnostyka molekularna **mikroorganizmów chorobotwórczych**. To bezpośredni sposób wykrycia obecności patogenu we krwi pacjenta, znacznie szybszy i o wyższej czułości niż wspomniane wcześniej klasyczne i immunologiczne metody diagnostyczne. W tym wypadku wykrywamy bowiem bezpośrednio obecność DNA lub RNA konkretnej bakterii, wirusa czy grzyba. Dostępne są np. testy wykrywające wirusy zapalenia wątroby (HBV, HCV) albo wirusa brodawczaka ludzkiego.

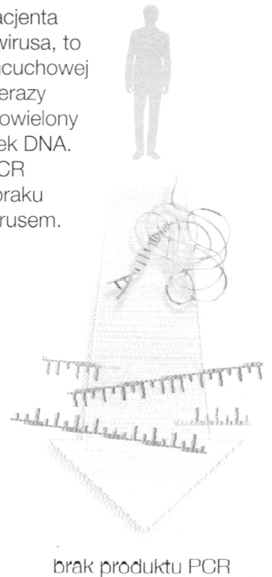
PCR w diagnostyce molekularnej HIV

W diagnostyce molekularnej często wykorzystuje się łańcuchową reakcję polimerazy (PCR), dzięki której można powielić dokładnie ten fragment materiału genetycznego organizmu, np. HIV, dla którego zaprojektowano startery.

Jeśli wirus znajduje się we krwi pacjenta, to jego materiał genetyczny zostaje powielony podczas PCR. Tym sposobem można wykryć wirusa, zanim pacjent wytworzy skierowane przeciwko niemu przeciwciała.



Jeśli krew pacjenta nie zawiera wirusa, to w wyniku łańcuchowej reakcji polimerazy nie zostaje powielony żaden odcinek DNA. Taki wynik PCR świadczy o braku zakażenia wirusem.



Innym przykładem diagnostyki molekularnej jest diagnostyka mutacji chorobotwórczych. Polega ona na wykrywaniu **zmian w materiale genetycznym**, które są związane z występowaniem określonych chorób. W ten sposób wykrywa się m.in. obecność wersji genu *CFTR* odpowiedzialnego za wystąpienie mukowiscydozy. Za pomocą molekularnych metod diagnostycznych można wykryć również wersje genów, których obecność zwiększa ryzyko zachorowania na określoną chorobę. Samo wykrycie takich sekwencji nie oznacza w tym wypadku choroby. Jest jedynie wskazaniem podwyższonego ryzyka zachorowania i powinno prowadzić do wzmoczonych działań profilaktycznych (częstych badań, unikania czynników ryzyka). Tego typu testy pozwalają wykryć np. zwiększone ryzyko zachorowania

na choroby nowotworowe, chorobę Alzheimera, chorobę Parkinsona czy miażdżycę tętnic.

■ Medycyna molekularna

Dzięki rozwojowi diagnostyki molekularnej wykryto, że w populacji wybranego gatunku występują różne wersje genów. Nie jest to zawsze związane z chorobami genetycznymi, ale zwykle z pewnymi zmianami w metabolizmie danego osobnika. U wirusów, bakterii czy grzybów takie zmiany przekładają się np. na to, że dany patogen jest mniej lub bardziej zdolny do wywołania choroby. Zróżnicowanie genetyczne patogenów powoduje też, że niektóre leki mogą na dany mikroorganizm chorobotwórczy nie działać, podczas gdy inne są bardzo skuteczne. Podobnie bada się wersje genów u pacjenta, gdyż mogą one

Tab. 3.4. Porównanie metod diagnostycznych

Porównywany parametr	Obserwacja mikroskopowa	Posiew	Metody immunologiczne	Metody molekularne
Zasada działania	wyszukiwanie patogenu w próbce materiału pobranego od pacjenta (np. krwi, śliny)	posiewanie pobranego od pacjenta materiału na podłożach mikrobiologicznych i obserwacja wzrostu bakterii	wykrywanie przeciwciał skierowanych przeciwko patogenowi lub charakterystycznych dla niego antygenów	wykrywanie genów charakterystycznych dla patogenu
Czułość metody	niska ($\leq 50\%$)	średnia (50–60%); dla niektórych patogenów wysoka (do 90%)	wysoka (>90%)	bardzo wysoka (nawet do 100%)
Czas oczekiwania na wynik	krótki (kilka godzin)	długi (kilka dni)	krótki (kilka godzin)	krótki (kilka godzin)
Koszt badania	średni	średni	niski do wysokiego w zależności od rodzaju przeciwciał lub antygeny	bardzo wysoki
Ograniczenia	nie wykrywa wirusów, w wypadku materiału zawierającego naturalną florę bakteryjną (np. kału) prowadzi do błędnych wyników	nie wykrywa wirusów oraz niektórych gatunków bakterii (trudnych do hodowli laboratoryjnej)	ograniczona dostępność testów, możliwość fałszywie ujemnego wyniku z powodu istnienia okienka serologicznego	ograniczona dostępność testów

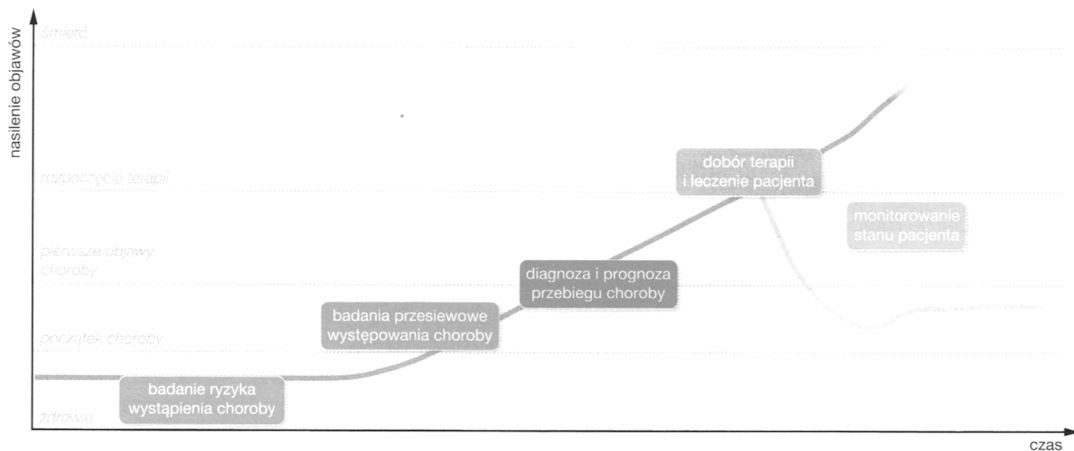
wpływać na skuteczność danego leku. Znając zatem wersje genów patogenu i pacjenta, można próbować przewidzieć, jaka terapia będzie najskuteczniejsza. Zajmuje się tym **medycyna molekularna**. Jest to nowa gałąź medycyny, która dobiera metodę leczenia choroby, bazując na diagnostyce molekularnej. W ten sposób powstają metody terapeutyczne skierowane do konkretnego pacjenta.

Dzięki nowoczesnym metodom diagnostycznym medycyna molekularna w skuteczny sposób **pomaga leczyć choroby**, a ponadto **przewiduje ich pojawienie się**

oraz **zapobiega ich wystąpieniu**. Aby tak się stało, potrzeba wiedzy o tym, jak działają geny – zarówno pojedyncze, jak i w odniesieniu do całego genomu człowieka. Dzięki tej wiedzy naukowcom prawdopodobnie uda się wyjaśnić, dlaczego choroby mają tak odmienny przebieg u różnych osób i dlaczego pacjenci reagują w różny sposób na ten sam lek. Usprawni to działanie opieki zdrowotnej – wzrośnie skuteczność stosowanych terapii, a zarazem zmniejszy się koszt leczenia oraz towarzyszące leczeniu skutki uboczne.

Zastosowanie medycyny molekularnej

Medycyna molekularna może być stosowana na każdym etapie choroby. Pozwala przewidzieć ryzyko wystąpienia choroby, zdiagnozować ją i prognozować jej przebieg, a także dobrać i monitorować odpowiednią formę terapii.



Zastosowanie medycyny molekularnej w chorobie nowotworowej

badanie ryzyka wystąpienia choroby	badania przesiewowe występowania choroby	diagnoza rodzaju nowotworu	ocena zaawansowania nowotworu	prognoza przebiegu choroby	dobór terapii	monitorowanie przebiegu terapii	obserwacja stanu pacjenta po zakończeniu terapii
Czy jestem w grupie ryzyka zachorowania na nowotwór?	Czy istnieje ryzyko, że obecnie choruję na nowotwór?	Na jaki rodzaj nowotworu choruję?	Czy nowotwór się rozprzestrzenił?	Czy choroba nowotworowa postępuje?	Jaka jest najskuteczniejsza i najbezpieczniejsza dla mnie terapia?	Czy moja terapia działa?	Czy nowotwór może powrócić?

Czy wiesz, że...

U niektórych osób (1–2% populacji) podanie kodeiny w standardowej dawce (stosowanej w lekach przeciwkaszlowych) powoduje efekty uboczne w postaci zaburzeń czynności ośrodka oddechowego. Jest to spowodowane występowaniem u tych osób więcej niż dwóch kopii genu dla enzymu uczestniczącego w metabolizmie kodeiny. Osoby te powinny bezwzględnie unikać stosowania leków z kodeiną.

Medycyna molekularna jest dziedziną stosunkowo nową i dopiero zaczyna być stosowana w leczeniu na szeroką skalę. Badania

z zakresu diagnostyki molekularnej wciąż pozostają relatywnie drogie, dlatego medycyna molekularna rozwija się powoli. Najchętniej wykorzystuje się ją w wypadku chorób, których koszt leczenia jest wysoki, np. chorób nowotworowych. Szuka się też nowych sposobów finansowania leczenia. Przykładowo w Niemczech planuje się wprowadzenie rozwiązania zakładającego przeniesienie kosztu leczenia chorób nowotworowych w pierwszym okresie terapii na produkującą lek firmę farmaceutyczną. Dopiero po potwierdzeniu skuteczności działania leku – np. po rocznej terapii – jej finansowanie przejęłoby państwo.

Podsumowanie

- Klasyczne metody wykrywania patogenów polegają na wykrywaniu obecności drobnoustrojów poprzez obserwację mikroskopową oraz selektywną hodowlę.
- Immunologiczne metody diagnostyczne polegają na wykrywaniu przeciwciał lub antygenów świadczących o zakażeniu patogenem w materiale pochodzącym od pacjenta. Wykorzystują do tego celu wiązanie antygeny ze specyficznym przeciwciałem.
- Molekularne metody diagnostyczne to zwykle testy genetyczne wykrywające określone sekwencje DNA. Dzięki nim można stwierdzić obecność czynników chorobotwórczych nawet wtedy, gdy te występują w organizmie w śladowych ilościach. Pozwalają również wykrywać mutacje w DNA związane z występowaniem chorób, np. genetycznych lub nowotworowych.
- Medycyna molekularna wykorzystuje diagnostykę molekularną w celu ustalenia najskuteczniejszego sposobu leczenia. Można ją również wykorzystać do przewidywania choroby oraz zapobiegania jej wystąpieniu.

Pytania i zadania

1. Wyjaśnij, w jaki sposób doskonalenie metod hodowli drobnoustrojów otworzyło drogę rozwoju nowoczesnym metodom diagnostycznym.
2. Porównaj skuteczność znanych Ci metod wykrywania patogenów.
3. Podaj po jednym przykładzie chorób, do których diagnozy warto zastosować metody klasyczne, immunologiczne oraz molekularne.
4. Wymień po dwa argumenty przemawiające za stosowaniem medycyny molekularnej oraz przeciw jej stosowaniu.