

Wykład przedstawiony na Konferencji naukowej „Mikrobiologia 100 lat po Robertcie Kochu”  
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Warszawie w dniach 30–31 sierpnia 2010 r.

Ewa Augustynowicz-Kopec<sup>1\*</sup>, Zofia Zwolska<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zakład Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa ul. Płocka 26

1. Wstęp. 2. Metody bezpośredniego wykrywania *Mycobacterium tuberculosis*. 2.1. Bakterioskopia. 2.2. Metody genetyczne. 3. Hodowla konwencjonalna. 4. Nowoczesne, szybkie i automatyczne systemy hodowli prątków. 5. Identyfikacja w laboratoriach mikrobiologicznych. 5.1. Metody chromatograficzne w identyfikacji prątków. 5.2. Metody genetyczne w identyfikacji prątków. 6. Badania molekularne w epidemiologii gruźlicy. 7. Utajone (latentne) zakażenie prątkami gruźlicy. 8. Podsumowanie

#### Progress in diagnosis and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*

**Abstract:** Mycobacteria are reemerging as important causes of human disease. The increase in mycobacterial infections has prompted the development of more rapid and efficient ways of detection and characterization mycobacteria in the clinical microbiology laboratory. Methods currently in use or under development include more sensitive methods for direct detection, improved techniques for culturing, identification, and susceptibility testing, and the use of nucleic acid probes for identification and epidemiological typing. Broad application of rapid and sensitive methods for detection and characterization of mycobacteria is essential if we are to limit the spread of *Mycobacterium tuberculosis* and provide optimal care for patients infected with TB and other *Mycobacterium* species.

1. Introduction. 2. Methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis*. 2.1. Bacterioscopy. 2.2. Genetic methods. 3. Conventional culture methods. 4. Modern, rapid and automatic system for growing mycobacteria. 5. Identification of microorganisms in microbiological laboratories. 5.1. Chromatographic methods for the identification of mycobacteria. 5.2. Genetic methods for the identification of mycobacteria. 6. Molecular epidemiology of tuberculosis. 7. Latent tuberculosis infection. 8. Summary

**Słowa kluczowe:** bakterioskopia, gruźlica, hodowla, identyfikacja, molekularne dochodzenie epidemiologiczne

**Key words:** bacterioscopy, tuberculosis, culture, identification, molecular epidemiology

## 1. Wstęp

Bieżący numer *Postępów Mikrobiologii* jest redagowany w 100-lecie śmierci Roberta K o c h a – odkrywcy prątków gruźlicy, czynnika etiologicznego tej groźnej, zakaźnej choroby. Przy tej okazji należy wspomnieć jak rozwijały się laboratoryjne metody od „czasów Kocha” do dzisiaj.

Robert Koch jako pierwszy bakteriolog odkrył prątki gruźlicy w barwionych wycinkach tkanek pobranych od chorego człowieka a następnie je wyhodował na pożywce przygotowanej ze ściętej surowicy. Od 1882 r. (128 lat temu), tj. od pierwszego raportu R. K o c h a o czynniku przyczynowym gruźlicy mamy możliwość potwierdzać gruźlicę metodami mikrobiologicznymi – barwić rozmazy wykonane z pobranych próbek od chorego i hodować prątki na pożywkach. Te dwie metody były stosowane w laboratoriach na świecie aż do końca lat 1960-tych. Prócz tego zakażano świnkę morską, materiałem od chorego podejrzanego o gruźlicę. Diagnostyka trwała wiele tygodni, na ostateczny wynik trzeba było oczekiwać około 3 m-cy. Próbę biologiczną stosowano przez wiele lat aż do chwili, gdy nie rozwinięły się systemy hodowlane rejestrujące automatycz-

nie metabolizm prątków gruźlicy. Było to w latach 1980-tych i zbiegło się z pojawieniem wirusa HIV co spowodowało nagły wzrost zapadalności na gruźlicę w wielu częściach świata. W Polsce próba biologiczna była stosowana do 1990 r.

Ponieważ początkowo zakażenie wirusem HIV dotknęło najbogatszy kraj świata USA, właśnie tam rozpoczęto intensywne badania nad metodami przyspieszającymi wzrostu prątków i badaniami nad budową genetyczną *Mycobacterium*. Doprowadziło to w latach 1990-tych do poznania genomu prątków i stworzenia nowoczesnej diagnostyki mikrobiologicznej gruźlicy. Każdego roku opisywane są nowe metody, bardziej specyficzne, dzięki którym można wiele skąpoprątkowych przypadków potwierdzić. W ostatnich latach dokonał się też postęp w rozwoju metod serologicznych, w których stosowane specyficzne antygeny dla prątków gruźlicy są pomocne w diagnostyce latentnego zakażenia i aktywnej choroby.

W niniejszym przeglądzie postaramy się omówić przydatność i celowość stosowania klasycznych i nowoczesnych metod w diagnozowaniu chorych podejrzanym o gruźlicę. Problem chorób wywołanych przez prątki gruźlicy u ludzi jest stale aktualny. Wynika to z nadal

\* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa ul. Płocka 26;  
e-mail: e.kopec@igichp.edu.pl

ogromnego rozprzestrzeniania się gruźlicy jako choroby społeczeństw, a nawet narastania częstości jej występowania w wielu regionach świata. Definicja przypadku gruźlicy wg WHO zakłada konieczność mikrobiologicznego potwierdzenia choroby to jest: wyizolowania czynnika sprawczego – bakterii należących do *Mycobacterium tuberculosis* complex, określenia gatunku i wykonania testu lekowrażliwości [11, 13].

Z powodu zagrożenia, jakie powoduje człowiek prątkujący, ważnym zadaniem służb medycznych jest szybkie jego zidentyfikowanie. Wykrycie przyczyny choroby i zastosowanie właściwego leczenia należy do najważniejszych elementów prowadzonych szeroko na świecie programów walki z gruźlicą. Ponadto mikrobiologiczne metody służą do ustalenia optymalnej terapii zgodnej z antybiogramem i monitorowania procesu leczenia chorego.

Od czasu odkrycia prątków gruźlicy wiele wysiłków włożono w udoskonalanie laboratoryjnych metod potwierdzania gruźlicy. Metody znane 100 lat temu przechodziły ciągłe modyfikacje. Ostatnio wprowadzono szereg nowoczesnych technologii opartych na zdobyciach genetyki lub poznaniu składu chemicznego komórki bakteryjnej prątków. Obecnie w laboratoriach stosuje się metody mikrobiologiczne, które są coraz bardziej czułe i pozwalają wykrywać pojedyncze komórki oraz występowanie różnych struktur chemicznych prątków, takich jak DNA lub RNA, elementów insercyjnych genomu, pojedynczych genów (metody genetyczne) lub kwasów mykologicznych (metody chromatograficzne) to jednak zawsze metody konwencjonalne stanowią pierwszy etap diagnostyki.

Wynik badania mikrobiologicznego jest pochodną wielu czynników na każdym etapie pracy, począwszy od decyzji, jaki rodzaj materiału od chorego należy pobrać, poprzez wszystkie etapy diagnostyczne, aż do ostatecznego wydania wyniku i jego interpretacji. Ten ostatni element pracy laboratoryjnej należy do stałych obowiązków kierownika laboratorium i powinien być wyrazem ścisłej współpracy klinicystów i mikrobiologów.

Badanie bakteriologiczne odgrywa bardzo ważną rolę w diagnozowaniu gruźlicy. Mikrobiologiczne diagnozowanie jest procesem trudnym, a trudności wynikają z cech charakterystycznych *Mycobacterium*. Wiele błędów w diagnostyce mikrobiologicznej gruźlicy jest spowodowanych tzw. czynnikiem ludzkim, do których zalicza się brak podstawowych wiadomości o wymaganiach, jakie należy spełnić, aby prawidłowo zdiagnozować chorego. Ponieważ gruźlica dotyczy wielu narządów człowieka, lekarze wszystkich specjalności powinni znać podstawowe techniki diagnostyczne, ich czułość i specyficzność. Powinni wiedzieć, jaki rodzaj materiału od chorego będzie odpowiedni do diagnozowania konkretnego przypadku i w jakich warunkach należy go transportować do laboratorium.

## 2. Metody bezpośredniego wykrywania *Mycobacterium tuberculosis*

### 2.1. Bakterioskopia

Badania mikroskopowe są pierwszym etapem mikrobiologicznej diagnostyki gruźlicy i są prowadzone we wszystkich laboratoriach na świecie. Badanie to jest proste w wykonaniu, tanie i specyficzne dla *Mycobacterium*, a wynik jest możliwy do uzyskania po kilku godzinach. Stwierdzenie obecności prątków w płwocinie od chorego, przy równoczesnych symptomach klinicznych lub zmianach radiologicznych upewnia szybko lekarza o procesie gruźliczym i masywności prątkowania. Bakterioskopia ma duże znaczenie z epidemiologicznego punktu widzenia, ponieważ szybko informuje lekarza o prątkowaniu badanego, a chorego, że może być zakaźny dla otoczenia [18, 21].

Badanie rozmazu mikroskopowego nie jest wolne od wad. Podstawową wadą jest jego mała czułość, oceniana w zależności od autorów na 30–70%. Aby zobaczyć pojedyncze prątki w rozmazie barwionym metodą Ziehl-Neelsena próbka materiału klinicznego musi zawierać 5000–10000 komórek prątków w 1 ml. Ponadto w badaniu nie można odróżnić prątków patogennych od saprofitycznych, występujących często, jako naturalna flora bakteryjna organizmu, pochodzących ze środowiska człowieka lub od chorych na mykobakteriozy [26]. Dlatego w nowoczesnym algorytmie postępowania proponuje się przy dodatkowej bakterioskopii wykonać badanie genetyczne, które przyspieszy rozpoznanie prątków gruźlicy [12, 28].

### 3.2. Metody genetyczne

Możliwość wykrycia *M. tuberculosis* w klinicznych próbkach przy pomocy metod molekularnych zmieniło całkowicie klasyczne metody diagnostyki mikrobiologicznej. Techniki te umożliwiają szybką (w ciągu zaledwie kilku godzin) amplifikację wybranych odcinków genomu bakteryjnego, aż do takiej ilości, jaka jest wymagana do hybrydyzacji ze specyficzną sondą genetyczną.

Jak wspomniano wyżej w nowoczesnym algorytmie proponuje się, aby z bakterioskopowo dodatniego materiału, wykonać badanie molekularne z typową dla *M. tuberculosis* complex sondą. Badanie to trwa 1 dzień i pozwala odróżnić prątkowanie chorego od kontaminacji materiału prątkami środowiskowymi. Tak, więc w ciągu 2 dni można przeprowadzić i zakończyć dwa najważniejsze badania w diagnostyce mikrobiologicznej gruźlicy: wykrycie i identyfikację prątków bezpośrednio w materiale chorego [25]. Najczęściej amplifikowanymi sekwencjami są wstawki insercyjne IS6110, IS986, gen kodujący białko 65kDa i antygeny HPB70

i HPB64 [19]. Według rekomendacji WHO badanie należy wykonywać wyłącznie w zamkniętych, komercyjnie dostępnych systemach genetycznych wyposażonych w kontrole procesów amplifikacji [11].

Testy genetyczne nie powinny nigdy zastępować innych metod, powinny natomiast stanowić ich uzupełnienie. Ponieważ charakteryzują się najwyższą czułością często wyniku dodatniego nie można odnieść do innych metod np. hodowli. Należy wtedy wynik testu genetycznego konfrontować z obrazem klinicznym chorego. Poza tym nie należy zlecać badania genetycznego do laboratorium, które nie ma zaplecza klinicznego, jak również nie dysponuje innymi metodami diagnostycznymi.

Metody genetyczne mogą znacznie przyspieszyć diagnostykę gruźlicy płuc i postaci pozapłucnych. Zgodnie z rekomendacjami CDC diagnostyka *Mycobacterium tuberculosis* powinna być zakończona w ciągu 21 dni od przysłania do laboratorium materiału od chorego. Trudno dzisiaj sobie wyobrazić, aby to kryterium czasu było spełnione przez laboratorium bez stosowania metod amplifikacji kwasów nukleinowych [27].

Większość badań publikowanych obecnie, porównujących czułość i swoistość nowych systemów w diagnozowaniu gruźlicy opiera się na ich porównaniach z hodowlą prątków. Wnioskowanie z takich porównań jest bardzo trudne, ponieważ czułość metod genetycznych jest dużo wyższa niż wszystkich innych metod, w tym również hodowli prątków. Tylko nieliczne prace prezentują przydatność metod genetycznych odnosząc otrzymane wyniki do ostatecznej diagnozy klinicznej chorego wraz z decyzją włączenia leczenia przeciwpłatkowego.

Dlatego wyniki testów genetycznych należy konfrontować z aktualnym stanem klinicznym pacjenta. Decydujące słowo zawsze należy do klinicysty, a badania genetyczne są tylko pomocą w postawieniu diagnozy.

#### 4. Hodowla klasyczna

Hodowla prątków z materiału klinicznego stanowi niezbędny etap w diagnostyce gruźlicy i powinno być zakończone w czasie od 1 do 8 tygodni. Czas jest zależny od rodzaju użytych pożywek, zastosowanych metod homogenizacji, wybiórczych zapotrzebowań pokarmowych prątków izolowanych z tkanki gospodarza oraz zastosowanych metod. Pożywki do hodowania prątków zawierają optymalne zestawy wszystkich substancji wzrostowych koniecznych do rozmnażania. Mimo to, szczepy izolowane od chorych rosną lepiej na jednych pożywkach, gorzej na innych. Czas ich wzrostu zależy przede wszystkim od ilości i żywotności komórek, z jakiej został on pobrany. Jest to szczególnie ważne w przypadku materiałów skąpopłatkowych, które po-

winny być posiewane kilkakrotnie, aby zwiększyć szansę wyhodowania szczepu [24, 26].

Największe walory hodowlane mają płynne pożywki wzbogacone białkiem zwierzęcym. Należą do nich między innymi pożywki Kirchnera, Dubosa, Youmansa. Ich wadą jest podatność na zanieczyszczenia bakteriami Gram-dodatnimi, Gram-ujemnymi oraz grzybami.

W laboratoriach światowych stosuje się powszechnie pożywki konwencjonalne wzbogacane jajami kurzymi: pożywkę Lowensteina-Jensena lub Ogawy lub z kompleksem albuminowym – pożywki agarowe Middlebrook 7H9, 7H10, 7H11 i 7H12. Wszystkie posiadają dodatki substancji hamujących wzrost bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych oraz grzybów (zieleń malachitowa, PANTA, penicylina), które na ogół zawsze są obecne w materiałach klinicznych.

Wyhodowanie szczepu *Mycobacterium* ciągle jest uznawane za „złoty standard” w diagnostyce. Jest to metoda o wysokiej czułości (blisko 90%) i specyficzności >98%. Wyniki wszystkich innych stosowanych metod są odnoszone do hodowli jako metody referencyjnej. Metoda hodowli jest bardziej czuła niż bakterioskopia i umożliwia wykrycie prątków obecnych nawet w małych ilościach w materiałach klinicznych (około 1000 komórek/ml). Czas uzyskania hodowli na powszechnie stosowanych w laboratoriach pożywkach L-J wynosi około 10 tygodni. Jest on znacznie krótszy w nowych systemach hodowlanych [29].

#### 5. Nowoczesne, szybkie, automatyczne systemy hodowli prątków

We wszystkich automatycznych systemach hodowli wzrost prątków jest rejestrowany jako reakcja biochemiczna np. oddychanie bakterii, pobieranie tlenu lub wydalanie dwutlenku węgla. Proces jest rejestrowany automatycznie i przeliczany na indeks wzrostu. Wszystkie pracujące w polskich laboratoriach systemy hodowlane zawierają płynną pożywkę Middlebrook'a w różnych modyfikacjach i wymagają zakupienia aparatów oraz firmowych zestawów do hodowania, wzbogacania wzrostu, zapobiegających kontaminacji i innych dodatkowych testów [1, 6]. Zaletą tych metod jest możliwość wczesnego wykrycia wzrostu prątków już po 4–6 dniach od założenia hodowli. Testy lekooporności oraz identyfikacji wymagają również tylko kilku dni obserwacji (5–7 dni).

#### 6. Identyfikacja gatunkowa w laboratoriach mikrobiologicznych

Do podstawowych zadań laboratorium prątka należy odróżnienie kompleksów *M. tuberculosis complex* i MOTT. Laboratorium powinno w jak najkrótszym

czasie dać odpowiedź, do jakiego kompleksu należy wyhodowany szczep. Powszechnie stosowane testy różnicujące opierają się na obserwacji cech morfologicznych i wynikach wielu testów biochemicznych i dosyć precyzyjnie identyfikują gatunki. Są jednak pracochłonne i wymagają wielu odczynników, a czas oczekiwania na wynik wynosi około 5–8 tygodni [17, 25].

### 6.1. Metody chromatograficzne w identyfikacji prątków

Różnice w składzie ilościowym i jakościowym kwasów mykologicznych stanowią podstawę identyfikacji gatunków i podgatunków prątków. Techniki chromatograficzne wymagają specjalnego wyposażenia, ściślego przestrzegania warunków reakcji i doświadczenia w pracy laboratoryjnej. Specyficzność metody, użycie której pozwala zidentyfikować prawie wszystkie znane gatunki prątków kwasoopornych (oprócz odróżnienia *M. tuberculosis* od *M. bovis*) ocenia się na 100% [9].

### 6.2. Metody genetyczne w identyfikacji prątków

Sekwencje służące do określenia przynależności gatunkowej prątków pochodzą z regionów kodujących 16SRNA. Są one silnie konserwatywne w obrębie gatunków *Mycobacterium*, a przez to wysoce specyficzne. Opracowano sondy do rozpoznawania zarówno DNA, jak i RNA prątków [20].

Identyfikacja przy zastosowaniu specyficznej dla *M. tuberculosis* complex sondy genetycznej jako jedyna metoda pozwala przeprowadzić identyfikację prątków wchodzących w skład kompleksu tuberculosis bezpośrednio w materiale od chorego [5]. Ten test jest bardzo ważny w procedurze laboratoryjnej, ale w Polsce dostępny jest tylko w nielicznych laboratoriach. Wszystkie pozostałe metody biochemiczne i chromatograficzne wymagają wyhodowania szczepu *Mycobacterium*.

## 7. Badania molekularne w epidemiologii gruźlicy

Typowanie genetyczne prowadzi do ustalenia wzorów molekularnych (*fingerprints*) badanych szczepów *Mycobacterium tuberculosis* i umożliwia ich różnicowanie. Ma to kluczowe znaczenie w ustaleniach dochodzeń epidemiologicznych, a przede wszystkim w zdefiniowaniu źródła i dróg transmisji gruźlicy [22]. Pierwszym warunkiem i podstawą programu zapobiegania rozprzestrzenianiu się gruźlicy i kontroli nad nią jest rozpoznanie i leczenie wszystkich osób z aktywną postacią choroby, kolejnym prześledzenie kontaktów chorego w celu znalezienia wszystkich osób, które poprzez kontakt mogą być narażone na zachorowanie.

Przez szereg lat, z powodu braku odpowiednich metod badawczych, wiedza o epidemiologii gruźlicy była bardzo ograniczona, a śledzenia dróg transmisji prątków gruźlicy w środowisku człowieka prawie niemożliwe. Przed wprowadzeniem metod molekularnych dochodzenia epidemiologiczne opierały się na skrupulatnie prowadzonym wywiadzie lekarskim i porównywaniu wzorów oporności izolowanych szczepów *Mycobacterium tuberculosis*. Słaby poziom diagnostyki laboratoryjnej, nieznanostwo genomu prątków gruźlicy, brak metod molekularnych, powodowały, że w przeszłości, w dochodzeniach epidemiologicznych stawiało się zaledwie hipotezy.

Badania nad transmisją gruźlicy w środowisku człowieka oraz rozpoznanie przypadków aktywnej postaci TB w otoczeniu chorych potwierdzają wysokie ryzyko zakażenia wśród osób pozostających w bliskim kontakcie oraz będących członkami rodzin. Ze względu na niebezpieczeństwo zakażenia wynikające z kontaktów z chorymi, dochodzenia epidemiologiczne powinno objąć wszystkie osoby, u których podejrzewa się gruźlicę lub uzyskano potwierdzenie jej aktywnej postaci [3]. Prześledzenie łańcucha transmisji ma na celu identyfikację wszystkich osób, które powinny zostać objęte leczeniem. Takie dochodzenie wymaga wieloetapowej pracy angażującej wyspecjalizowaną grupę lekarzy, klinicystów, mikrobiologów i genetyków.

Badania takie są niezwykle trudne, wymagają systematycznego śledzenia kontaktów rodzinnych i w bliskim otoczeniu pozarodzinnym, określenia czasu trwania ekspozycji, oszacowania stopnia ryzyka i innych parametrów.

Przełomem w badaniach epidemiologicznych gruźlicy było wprowadzenie nowoczesnych metod typowania molekularnego, opartych o polimorfizm wykrywany w genomie prątków [7, 22]. Źródłem polimorfizmu są w znacznej mierze powtórzone sekwencje DNA, w obrębie, których dochodzi do rekombinacji genetycznej, rearanżacji, mutacji insercyjnych i delecyjnych. Ich liczba oraz zmienność sekwencyjna pozwalają na zdefiniowanie markerów epidemiologicznych [8]. Do najczęściej stosowanych należą sekwencja insercyjna IS6110, polimorficzna sekwencja powtórzona, bogata w pary GC (PGRS *polymorphic GC-rich repetitive sequence*), czy też zmienna liczba powtórzeń tandemowych (VNTR *variable number of tandem repeats*). Każda z metod, wykorzystujących właściwości specyficznych markerów genetycznych, prowadzi do uzyskania charakterystycznego dla danego szczepu wzoru genetycznego, który porównuje się ze wzorami otrzymanymi dla innych szczepów i na takiej podstawie formułuje się tezy dochodzenia epidemiologicznego [10, 19]. Jednym z kluczowych elementów tej analizy jest grupowanie (*clustering*) szczepów na podstawie podobieństwa ich wzorów genetycznych. Przypadki gruźli-

cy, w których wzory typowania genetycznego są identyczne lub bardzo do siebie podobne, uznaje się jako transmitowane pomiędzy ludźmi [4, 2]. Gdy przedmiotem analizy są szczepy izolowane od tego samego pacjenta, w różnych okresach choroby, wówczas identyczne wyniki genotypowania stanowią dowód endogennej reaktywacji definiującej wznowę choroby tym samym szczepem prątków [15]. Z kolei różne wzory genetyczne szczepów przemawiają za zewnątrzpochodną infekcją nowym szczepem, co może mieć istotne znaczenie dla programowania leczenia [23]. Niezwykle ważny z klinicznego punktu widzenia jest też problem zakażeń wewnątrzszpitalnych, których szybkie wykrywanie stało się możliwe właśnie dzięki technikom typowania genetycznego. Przyczyną zakażeń krzyżowych może być sprzęt medyczny na przykład endoskopy, pomieszczenia do pobierania płwociny, w laboratoriach to zjawisko może wystąpić podczas opracowywania materiałów, posiewu na pożywki stałe i płynne, nieprawidłowej pracy w komorze laminarnej, kiedy powstają niekontrolowane aerozole prątków. Zakażenie krzyżowe może zdarzyć się nawet w najlepszych laboratoriach. Ocenia, że od 0,4% do 3,5% wszystkich hodowli w laboratoriach prętka może być wynikiem krzyżowej kontaminacji. Badanie tego zjawiska jest w chwili obecnej możliwe tylko w wysokospecjalistycznych laboratoriach, dysponujących odpowiednimi metodami molekularnymi. Tylko laboratoria stosujące odpowiednie metody genetyczne mogą śledzić to zjawisko i posiadać wiedzę o krzyżowych kontaminacjach.

## 8. Utajone (latentne) zakażenie prątkami gruźlicy

Przez dziesięciolecia jedynym testem służącym do rozpoznawania latentnego zakażenia prątkami był odczyn tuberkulinowy. Tuberkulina, która jest wyciągiem białkowym z zabitej hodowli prątków została wykryta przez Roberta Kocha już po odkryciu prątków gruźlicy i miała stanowić lek przeciwko gruźlicy. W roku 1890 Koch po raz pierwszy zreferował wyniki prac nad tuberkuliną na kongresie medycznym w Berlinie [5]. Dostyc szybko okazało się, że tuberkulina nie leczy gruźlicy, ale może stanowić test diagnostyczny wykrywający zakażenie organizmu prątkami. Przez długie lata, gdy gruźlica była chorobą powszechnie występującą, test tuberkulinowy był dobrym narzędziem diagnostycznym o czułości zbliżonej prawie do 100% [6]. Później, po wprowadzeniu szczepień BCG zaczęto dostrzegać wady związane z brakiem specyficzności testu. Tuberkulina składa się z wielu antygenów występujących krzyżowo u prątków wchodzących w skład *Mycobacterium tuberculosis* complex w tym również *M. bovis* BCG – szczepu szczepionkowego i u prątków środowiskowych MOTT. Z tego powodu test ten ma obniżoną czułość i jego wynik dodatni nie może

stanowić testu na wykrywanie zakażenia prątkami gruźlicy, szczególnie u osób szczepionych BCG.

Wyniki fałszywie dodatnie, znacznie obniżające swoistość testu były od wielu lat powodem poszukiwania typowych wyłączeń dla *Mycobacterium tuberculosis* antygenów. W ostatnich latach pojawiły się nowe możliwości rozpoznania utajonego zakażenia. Są to testy IGRA (interferon gamma released assays) QuantiFERON-Tb Gold (Cellestis, Carnegie, Australia) oraz T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Abingdon, Wielka Brytania), które są specyficzne i czułe w wykrywaniu zakażenia prątkami [14].

Zasada działania testów opiera się na pomiarze IFN-gamma wydzielanego przez swoiste limfocyty T stymulowane przez antygeny specyficzne dla *M. tuberculosis*, których nie ma w szczepie szczepionkowym *M. bovis* BCG. Są to: ESAT6 (*early secretory antigen target 6*) oraz CFP10 (*culture filtrate protein 10*), w nowszych testach QuantiFERON-Tb Gold *in tube* znajduje się antygen Tb 7,7 również swoisty dla prątków gruźlicy [16]. Wymienione antygeny kodowane są przez specjalny region w genomie *Mycobacterium tuberculosis* nazwany RD1 (tzw. *Region of Difference 1*), obecny tylko u prątków gruźlicy.

Stosowanie testów na wykrywających latentne zakażenia prątkami gruźlicy, jest przydatne u ludzi kwalifikowanych do leczenia antagonistami TNF z powodu przewlekłych chorób zapalnych o podłożu autoimmunologicznym, głównie reumatoidalnego zapalenia stawów, spondyloartropatii seronegatywnych, młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów, choroby Leśniowskiego i Crohna oraz łuszczycy, u których występuje większe prawdopodobieństwo zachorowania na gruźlicę.

## 9. Podsumowanie

Dostępne w Polsce mikrobiologiczne metody diagnozowania gruźlicy mają swoje wady i zalety. Każda z nich charakteryzuje się innymi wymaganiami aparaturowymi i odmiennymi kosztami. Metody te mogą być ze sobą łączone i mogą się uzupełniać. Zawsze należy przeprowadzić badanie mikroskopowe na obecność prątków kwasoopornych i założyć hodowlę w jednym z automatycznych systemów hodowlanych oraz wykonać badanie genetyczne ze swoistą dla *M. tuberculosis* sondą genetyczną. Te dwa ostatnie badania należą do najbardziej czułych i są szczególnie polecane do diagnostyki chorych podejrzanych o gruźlicę.

W naszym kraju istnieje zorganizowana sieć laboratoriów prętka zajmujących się wyłącznie diagnozowaniem chorych podejrzanych o gruźlicę. Obecnie (w 2010 r.) w Polsce czynnych jest 90 laboratoriów prętka. Tylko kilka z nich dysponuje pełnym panelem badań. Z powodu braku odpowiednich metod nie we

wszystkich laboratoriach można przeprowadzić diagnostykę uznaną za szczególnie trudną, tj z materiałów które są zaliczane do skąpoprątkowych i pochodzą od chorych podejrzanych o gruźlicę pozapłucną, od dzieci, z wycinków po biopsjach, płynu mózgowo-rdzeniowego i innych. Wszystkie laboratoria wykonują dwa podstawowe badania – badanie mikroskopowe i posiew klasyczny, część z nich identyfikuje gatunki prątków i określa ich lekowrażliwość, nieliczne wykonują badania genetyczne. Informację o możliwościach diagnostycznych polskich laboratoriów można uzyskać w Krajowym Referencyjnym Laboratorium Prątka. Należy pamiętać, że nie wszystkie przypadki gruźlicy mogą być potwierdzone badaniem mikrobiologicznym, ale należy dołożyć starań, aby takie potwierdzenie uzyskać. Obecnie w Polsce potwierdza się mikrobiologicznie gruźlicę średnio u 65% (45–90%) chorych.

## Piśmiennictwo

1. Augustynowicz-Kopeć E.: Nowoczesne diagnozowanie gruźlicy w systemie izotopowym Bactec 460Tb. Postępy Pulmonologii i Alergologii, red. Milanowski J., Błędowski J. Lublin 1996, 167–78
2. Augustynowicz-Kopeć E., Jagielski T., Kosińska M., Zabost A., Klatt M., Zwolska Z.: Molecular analysis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates collected in central Poland. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**, 605–607 (2008)
3. Augustynowicz-Kopeć E., Jagielski T., Kosińska M., Zabost A., Zwolska Z.: Znaczenie metody spoligotyping w epidemiologicznych dochodzeniach gruźlicy. *Pneumonol. Alergol. Pol.* **75**, 22–3 (2007)
4. Augustynowicz-Kopeć E., Jagielski T., Zwolska Z.: Genetic diversity of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Poland, assessed by spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 4041–404 (2008)
5. Augustynowicz-Kopeć E., Jaworski J., Zwolska Z.: Wykrywanie prątków gruźlicy w materiałach klinicznych metodą genetyczną Gen-Probe Amplified Direct Test. *Pneumonol. Alergol. Pol.* **70**, 359–367 (2002)
6. Augustynowicz-Kopeć E., Zwolska Z.: Przydatność metody fluorescencyjnej Bactec MGIT 960 w mikrobiologicznym diagnozowaniu gruźlicy. *Pneumonol. Alergol. Pol.* **70**, 450–457 (2002)
7. Barnes P.F., Cave M.D.: Molecular epidemiology of tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* **349**, 1149–56 (2003)
8. Braden C.R., Crawford J.T., Schable B.A.: Quality assessment of *Mycobacterium tuberculosis* genotyping in a large laboratory network. *Emer. Infect. Dis.* **8**, 11 (2002)
9. Butler W.R., Jost K.C., Kilburn J.O.: Identification of mycobacteria by high-performance liquid chromatography. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 2468–2472 (1991)
10. de Boer A., Borgdorff M.W., de Haas P.E.W., Nagelkerke N.J.D., van Embden J.D.A., van Soolingen D.: Analysis of rate of change of IS6110 RFLP Patterns of *Mycobacterium tuberculosis* based on serial patient isolates. *J. Infect. Dis.* **180**, 1238–44 (1999)
11. De Kantor I., Kim S.J., Frieden T., Laszlo A., Luelmo F., Norval P.Y., Rieder H., Valenzuela P., Weyer K.: Laboratory services in tuberculosis control. Culture, 1998, Part III. WHO/TB/98.258
12. Drobniewski F.A. i wsp.: Recommended standards for modern tuberculosis laboratory services in Europe. *Europ. Respir. J.* **28**, 903 (2006)
13. Health Protection Agency. *Investigation of specimens for Mycobacteria species*. London, Evaluations and Standards Laboratory, 2006, National Standard Method, BSOP40 Issue 5.
14. Korzeniewska-Koseła M.: Zapobieganie gruźlicy u chorych leczonych antagonistami czynnika martwicy nowotworów. *Reumatologia*, **48**, 4–13 (2010)
15. Lambregts-van Weezenbeek, C.S., Sebek M.M., van Gerven P.J., de Vries G., Verver S., Kalisvaart N.A., van Soolingen D.: Tuberculosis contact investigation and DNA fingerprint surveillance in The Netherlands: 6 years' experience with nation-wide cluster feedback and cluster monitoring. *Int. J. Tub. Lung Dis.* **7** 12 suppl. 3, S463–S470 (2003)
16. Mack U., Migliori G.B., Sester M.: L.T.B.I. latent tuberculosis infection or lasting immuneresponse to *M. tuberculosis*? A TBNET consensus statement. *Eur. Respir J.* **33**, 956–973 (2009)
17. Master R.N.: Mycobacteriology. P. 3.01–3.1.6.4. In: Henry D. Isenberg (ed.), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Volume 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1992
18. Mixides G., Shende V., Teeter L.D., Awe R., Musser J.M., Graviss E.A.: Number of negative acid-fast smears needed to adequately assess infectivity of patients with pulmonary tuberculosis. *Chest*, **128**, 108–115 (2005)
19. Smittipat N., Billamas P., Palittapongarnpim M., Thong-On A., Temu M.M., Thanakijcharoen P., Karnkawinpong O., Palittapongarnpim P.: Polymorphism of variable-number tandem repeats at multiple loc in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 5034–5043 (2005)
20. Somerville W., Thibert L., Schwartzman K., Behr M.A.: Extraction of *Mycobacterium tuberculosis* DNA: a Question of Containment. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2996–2997 (2005)
21. Steingart KR., Ng V., Henry M. i wsp.: Sputum processing to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.* **6**, 664–674 (2006)
22. van der Zanden A.G.M., Kremer K., Schouls L.M., Caimi K., Cataldi A., Hulleman A., Nagelkerke N.J.D., van Soolingen D.: Improvement of differentiation and interpretability of spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4628–4639 (2002)
23. van Soolingen D.: Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J. Inter. Med.* **249**, 1–26 (2001)
24. Zwolska Z.: Zakażenia wywołane przez prątki. W: Choroby zakaźne i pasożytnicze. Cianciara J., Juszczyk J. (red.) Wyd. Czelej, Lublin 2007, s. 711–715
25. Zwolska Z.: Diagnostyka mikrobiologiczna gruźlicy i mykobakterioz. W: Choroby wewnętrzne Szczeklik A., (red.) Med. Prakt. Kraków 2005, s. 507–509.
26. Zwolska Z.: Mikrobiologiczne diagnozowanie gruźlicy. *Nowa Klin.* **1**, 10–14 (1995)
27. Zwolska Z.: Mikrobiologiczne metody diagnozowania gruźlicy. W: Gruźlica u dzieci Ceglecka-Tomaszewska K., (red.) PZWL Warszawa, 1996; s. 27–45
28. Zwolska Z.: Współczesne problemy j diagnostyki mikrobiologicznej gruźlicy. *Med. Dypl.* **14**, Supl. 1. Wyd. spec., 49–55 (2005)
29. Zwolska Z.: Wybrane zagadnienia mikrobiologii gruźlicy. W: Choroby infekcyjne układu oddechowego u dzieci Chmielewska-Szewczyk D., (red.). Via Medica Gdańsk, 2001; s. 237–261.