

Wybrane zagadnienia z epidemiologii i diagnostyki mikrobiologicznej gruźlicy

Selected aspects of the epidemiology and microbiological diagnosis of tuberculosis

Zofia Zwolska, Ewa Augustynowicz-Kopeć

Zakład Mikrobiologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie

Słowa kluczowe: metody mikrobiologiczne, diagnostyka, prątki gruźlicy.

Key words: microbiological methods, diagnosis, *Mycobacterium tuberculosis*.

Streszczenie

Wykrycie *Mycobacterium tuberculosis* w materiale chorego stanowi najbardziej obiektywny dowód procesu chorobowego. Metody mikrobiologiczne stosuje się do wyznaczenia optymalnej terapii i monitorowania leczenia chorego. Mikrobiologiczna diagnostyka gruźlicy charakteryzuje się dużą specyficznością i znacznie odbiega od typowej, powszechnie znanej diagnostyki klinicznej. Otrzymanie prawidłowego wyniku zależy od wielu czynników, w tym wyeliminowania błędów przedlaboratoryjnych oraz niezamierzonych błędów laboratoryjnych. Niestety, niektóre z nich można jedynie ograniczyć, wiąże się one bowiem z obiektywnymi trudnościami wynikającymi z czułości i specyficzności metod, specyficzności materiałów klinicznych przysyłanych do diagnostyki oraz sprawności urządzeń technicznych, jakimi dysponuje laboratorium. Obecnie obserwuje się stałą poprawę w wyposażeniu i wprowadzaniu nowych, bardziej przydatnych metod w diagnostyce. Bliska współpraca klinicystów i personelu laboratorium jest niezbędnym elementem gwarantującym wysoką jakość usług medycznych w opiece nad chorym.

Summary

Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in the materials collected from the patients is the most objective evidence of an existing disease process. Microbiological methods are used to determine the optimal therapy and monitoring of the patient's treatment. Microbiological diagnosis of tuberculosis is very specific in its character, and varies from typical microbiological diagnosis. Obtaining a correct result depends on a number of factors including pre-laboratory errors as well as unwitting laboratory errors. This is due to objective problems coming from sensitivity and specificity of the methods, specificity of clinical specimens which are diagnose and efficiency of technical equipment of a particular laboratory. Some of the errors we are able to limit, some are not. Constant changes connected with equipment and new methodology which is modern and more adaptable to actual necessities can be observed. Close cooperation the clinicians and laboratory is essential for high quality management of tuberculosis patients.

Wstęp

Prątki gruźlicy należą do grupy bakterii najstarszych na Ziemi i wszechobecnych w otoczeniu człowieka. Współcześnie prowadzone badania wykrywania materiału genetycznego bakterii zdeponowanych tysiące lat temu w różnych niszach ekologicznych przyniosły wiele informacji obrazujących zmiany ewolucyjne licznych patogenów na przestrzeni wieków, w tym również *Mycobacterium*. Prowadzone obecnie badania paleobiologów potwierdziły istnienie w szczątkach archeologicznych ludzi i zwierząt materiału genetycznego *Mycobacterium*. W antycznym DNA

(ancien DNA – aDNA) wykryto dwie struktury chemiczne typowe dla prątków gruźlicy: sekwencję inercyjną IS6110 i specyficzne dla ściany komórkowej prętka kwasy mykolowe [1]. Dzięki badaniom aDNA potwierdzono rozpoznania gruźlicy ustalone przez lekarzy w starożytnym Egipcie i Rzymie.

Problem chorób wywołanych przez prątki gruźlicy u ludzi jest stale aktualny. Wynika to z nadal ogromnego rozprzestrzeniania się gruźlicy jako choroby społeczeństw i zwiększania się częstości jej występowania w wielu regionach świata. Definicja rozpoznania gruźlicy wg Światowej Organizacji Zdrowia (*World Health Organization – WHO*)

Adres do korespondencji:

prof. dr hab. Ewa Augustynowicz-Kopeć, Zakład Mikrobiologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, ul. Płocka 26, 01-138 Warszawa,

e-mail: e.kopec@igichp.edu.pl

Praca wpłynęła: 10.06.2013 r.

zakłada konieczność mikrobiologicznego potwierdzenia choroby, tj. wyizolowania czynnika sprawczego – bakterii należących do *Mycobacterium tuberculosis complex*, określenia gatunku i wykonania testu lekowrażliwości.

Niektóre dane epidemiologiczne i współczesne zagrożenia

Obecną sytuację epidemiologiczną gruźlicy na świecie charakteryzują następujące wskaźniki: w 2011 r. na gruźlicę zachorowało 8,7 mln osób, w tym 3,9 mln (ponad 60%) obficie prątkowało, a w 2010 r. 1,4 mln chorych zmarło. Sytuacja epidemiologiczna gruźlicy na świecie jest zróżnicowana, jednak większość nowych zachorowań i zgonów przypada na kraje Trzeciego Świata, a wśród nich najwięcej przypadków notuje się u mieszkańców południowo-wschodniej Azji (2,9 mln), państw zachodniego Pacyfiku (2 mln) i Afryki (1,5 mln). W Ameryce Północnej i Europie rocznie choruje ok. 400 tys. ludzi. W Europie obserwuje się znaczne zróżnicowanie w zakresie wskaźników zapadalności w zależności od regionu. Najniższą zapadalność odnotowano w krajach Europy Zachodniej, najwyższą w regionie wschodnim, przy czym najwięcej zachorowań stale odnotowuje się w Rosji [2–4].

W Polsce w ciągu ostatnich 50 lat zapadalność na gruźlicę zmniejszyła się 10-krotnie. W 1957 r. zarejestrowano 82 tys. zachorowań, a w 2010 r. było ich już tylko 7509.

Obecnie Polska ze wskaźnikiem zapadalności na gruźlicę wynoszącym w 2011 r. 22,2/100 tys. należy do krajów o średniej zapadalności. Sytuacja epidemiologiczna jest regionalnie zróżnicowana – od 37/100 tys. w województwie lubelskim do 12,8/100 tys. w województwie wielkopolskim. Zapadalność na gruźlicę w Polsce wzrasta z wiekiem i blisko połowa chorych ma obecnie 45–64 lata [4]. Przewaga zachorowań wśród mężczyzn z porównaniu z zachorowaniami wśród kobiet w grupie wiekowej 50–59 lat jest prawie 4-krotna, a w całej populacji ponad 2-krotna (31,0 vs 14,0/100 tys. w 2011 r.) [2]. Gruźlica u dzieci stanowi niewielki odsetek ogółu zachorowań [5].

Gruźlicę pozapłucną wykrywa się u ok. 10% chorych, zmiany najczęściej dotyczą opłucnej i kolejno: węzłów chłonnych, układu moczowo-płciowego, kości i stawów. W ostatnich latach z powodu gruźlicy umarło w Polsce od 575 do 739 osób, co daje wskaźnik umieralności 1,5/100 tys. (w 2011 r.) [5, 6].

Diagnozowanie gruźlicy na podstawie bakteryjnego czynnika etiologicznego odkrytego przez Roberta Kocha w 1882 r. ma już ponad 100-letnią historię [7, 8]. Nowoczesna terapia rozpoczęła się jednak dopiero po II wojnie światowej wraz z odkryciem i wprowadzeniem do leczenia leków przeciwprątkowych. Niestety, stosowanie leków (głównie nieprawidłowo) wyzwoliło niekorzystne zjawisko, znane również z historii leczenia innych chorób zakaźnych,

tj. pojawienie się lekoopornych prątków gruźlicy. Wpłynęło to negatywnie na sytuację epidemiologiczną gruźlicy na świecie i przekreśliło szansę na jej szybkie zwalczenie. Nagły wzrost zachorowań spowodowanych prątkami gruźlicy typu MDR (*multidrug resistant*) dostrzeżono w wielu zamkniętych środowiskach, tj. w szpitalach, więzieniach, wśród bezdomnych [9].

Poznanie genomu prątków gruźlicy umożliwiło różnicowanie „rodzin molekularnych” poszczególnych szczepów i śledzenie dróg ich transmisji. Wśród nich jednym z najważniejszych i najbardziej niebezpiecznych dla ludzi jest *M. tuberculosis Beijing*. Po raz pierwszy szczepy należące do tej rodziny zidentyfikowano w prowincji Beijing w Chinach i początkowo wiązano je ściśle ze zjawiskiem lekooporności, w tym przede wszystkim z opornością typu MDR [10]. Obecnie wiadomo, że prątki o tym wzorze molekularnym mogą reprezentować zarówno szczepy lekooporne, jak i szczepy wrażliwe. Zasięg występowania prątków należących do rodziny *Beijing* obejmuje wszystkie kontynenty i kraje na świecie, w tym również Polskę. Szczepy te charakteryzuje wysoka patogenność, szybka zdolność do nabywania lekooporności, zdolność do transmisji oraz nieprzewidywalna odpowiedź na leczenie.

Gruźlica oporna na leki, a szczególnie jej odmiany MDR-Tb i XDR-Tb (*extensive drug resistant*), stanowi poważny problem zagrażający zdrowiu ludzi i realizacji programów walki z gruźlicą (tab. I). Gruźlica o oporności MDR i XDR jest chorobą w wysokim stopniu śmiertelną, ze wskaźnikiem umieralności 90% [11–13]. Ponadto od 50 lat nie odkryto żadnego nowego leku przydatnego w gruźlicy. Informacje o wzorach oporności szczepów *Mycobacterium tuberculosis* izolowanych od chorych stanowią istotny element nadzoru nad gruźlicą. Badanie i analiza częstości gruźlicy lekoopornej są pomocne w wykrywaniu i monitorowaniu rozprzestrzeniania się szczepów MDR i XDR i obrazują skuteczność nadzoru nad gruźlicą w danym kraju (tab. I).

Transmisja prątków gruźlicy i szerzenie się choroby

Gruźlica jest chorobą przenoszoną głównie drogą kropelkową, co determinuje łatwość jej rozprzestrzeniania się. Wieloletnie badania nad transmisją gruźlicy w otoczeniu chorego wykazują, że ryzyko zakażenia osoby pozostającej w bliskim kontakcie jest bardzo wysokie. Ryzyko transmisji gruźlicy pomiędzy ludźmi zależy od stopnia zakaźności źródła infekcji, czasu trwania ekspozycji, bliskości kontaktu i czynników środowiskowych. Autorzy wielu prac donoszą o transmisji gruźlicy w szpitalach, więzieniach, dużych skupiskach ludzi, wśród bezdomnych [9]. Badania populacyjne opisują przypadki chorych zakażonych tymi samymi szczepami *Mycobacterium tuberculosis*, co przemawia za ich bieżącą transmisją.

Tabela I. Definicje gruźlicy lekoopornej
Table I. Definitions of drug resistant tuberculosis

Oporność <i>Mycobacterium tuberculosis</i> na leki	Typ oporności
INH + RMP INH + RMP + SM INH + RMP + EMB INH + RMP + SM + EMB	MDR
MDR + fluorochinolon + jeden z leków podawanych iniekcyjnie (amikacyna lub kanamycyna, lub kapreomycyna)	XDR
MDR + fluorochinolon lub MDR + jeden z leków podawanych iniekcyjnie (amikacyna lub kanamycyna, lub kapreomycyna)	pre-XDR
INH + RMP + SM + EMB + fluorochinolon + aminoglikozyd + polipeptyd + tioamid + cykloseryna + kwas paraaminosalicylowy	TDR

INH – izoniazyd, RMP – rifampicyna, SM – streptomycyna, EMB – etambutol

Zastosowanie metod molekularnych w badaniach nad gruźlicą pozwoliło lepiej rozumieć dynamikę transmisji gruźlicy. Molekularne metody wspólnie z klasyczną epidemiologią stały się niezwykle użyteczne w nadzorze nad gruźlicą. Tak więc prawie wszystkie przypadki zachorowań są wynikiem powietrznej transmisji prątków gruźlicy, które z łatwością przenoszą się z osoby chorej na inne, podatne na zachorowanie [14, 15].

Źródłem i materiałem zakaźnym jest najczęściej płwocina chorego. Niezdiagnozowani chorzy przebywający w szpitalu, u których nawet nie podejrzewa się gruźlicy, stanowią szczególne niebezpieczeństwo dla innych pacjentów oraz dla personelu. Dane amerykańskie podają, że konwersja skórno-testu tuberkulinowego u pracowników medycznych, na skutek przebywania na oddziałach chorych z nierozpoznaną gruźlicą, waha się od 14% do 36% [16]. Badania prowadzone w 1992 r. przez Centrum Zwalczania i Zapobiegania Chorobom (*Centers for Disease Control and Prevention* – CDC) wykazały, że roczne ryzyko zakażenia u pracowników, mierzone konwersją odczynu tuberkulinowego, było 2-krotnie wyższe w szpitalach, do których przyjmowano 6 lub więcej chorych na gruźlicę (1,2% vs 0,6%) [17].

Należy ponadto pamiętać, że zakaźne mogą być również wydzielinę ran i przetoki powstające niekiedy w przebiegu gruźlicy kostno-stawowej, zmiany w przebiegu gruźlicy skóry, moczu chorych na gruźlicę układu moczowo-płciowego itp. Zdrowy personel może się zakażać od chorych z różnymi formami gruźlicy pozapłucnej [18–21].

Chory, który prątkuje, może zakażać znajdujące się w otoczeniu zwierzęta i odwrotnie – chore zwierzęta (bydło domowe, trzoda chlewna, zwierzęta domowe oraz żyjące dziko i w ogrodach zoologicznych liczne gatunki dzikich zwierząt) mogą stanowić źródło zakażenia dla człowieka.

Mleko i jego przetwory pochodzące od krów chorych na gruźlicę mogą być dla wielu osób, szczególnie dzieci, źródłem infekcji [22–24]. Według danych epidemiologicznych jeden prątkujący chory zakaża rocznie 10–15 osób. W szczególnych sytuacjach jeden prątkujący człowiek może zakażać nawet kilkaset osób z otoczenia. Przerwanie łańcucha transmisji musi się odbywać dwukierunkowo – należy szybko diagnozować chorych prątkujących i poprzez rozpoczęcie u nich leczenia zapobiegać powstawaniu nowych infekcji. Wykrywanie chorych zakaźnych dla otoczenia jest procesem trudnym i odbywa się głównie w sposób pasywny, tj. u ludzi, którzy z objawami chorobowymi zgłaszają się do lekarza. Według Centralnego Rejestru Gruźlicy w Polsce w 2010 r. wykryto gruźlicę na podstawie objawów u 88,7% chorych, na podstawie badania kontaktów u 1,5%, w badaniach profilaktycznych u 3,5% i w innych badaniach u 6,5% osób [6].

Prątki jako przyczyna zakażeń szpitalnych

Gruźlica jako zakażenie szpitalne dotyczy zarówno chorych, jak i personelu szpitalnego, i może być transmitowana pomiędzy tymi grupami. Nierozpoznani chorzy prątkujący stanowią zagrożenie dla innych chorych oraz przebywającego z nimi w tych samych pomieszczeniach personelu medycznego. Ryzyko zakażenia gruźlicą zależy prawie wyłącznie od stężenia cząstek infekcyjnych w powietrzu. Wcześniej rozpoznany i poddany leczeniu pacjent przestaje być źródłem zakażenia. Ryzyko zakażenia prątkiem gruźlicy jest także związane z zakażonymi *M. tuberculosis* narzędziami i aparaturą medyczną.

W przypadku gruźlicy i mykobakterioz (wywoływanych przez prątki inne niż gruźlicze; *Mycobacteria other than tuberculosis* – MOTT) dochodzenie epidemiologiczne jest procesem bardzo trudnym i długotrwałym. Wykrycie źró-

dła zakażenia wymaga sprawdzenia wszystkich etapów diagnostyki, stosowanych odczynników, wody wodociągowej oraz narzędzi diagnostycznych. Stosowanie właściwych środków dezynfekcyjnych o odpowiednim zakresie działania oraz właściwie prowadzona dezynfekcja mogą zapobiec zakażeniom szpitalnym wywołanym przez prątki.

Do dekontaminacji narzędzi coraz powszechniej stosuje się automatyczne myjnie-dezynfektory, lecz ich użytkowanie nie eliminuje ryzyka zakażenia szpitalnego pacjenta, gdyż konieczna jest stała kontrola pracy urządzenia, jakości wody używanej do płukania endoskopu, a także regularna dezynfekcja myjni [25, 26].

Mikrobiologiczne metody diagnozowania gruźlicy

Stwierdzenie prątków gruźlicy w materiale pobranym od chorego jest najbardziej obiektywnym dowodem istniejącego procesu chorobowego. Ponadto mikrobiologiczne metody służą do ustalenia optymalnej terapii zgodnej z antybiogramem, monitorują leczenie i potwierdzają wyleczenie chorego. Metody mikrobiologiczne odgrywają bardzo ważną rolę w nadzorze nad rozprzestrzenianiem się choroby. Wykazanie obecności prątków w barwionych rozmazach płwociny identyfikuje chorych obficie prątkujących, odpowiedzialnych za transmisję zakażenia, u których należy jak najszybciej rozpocząć leczenie przeciwgruźlicze, aby zmniejszyć ich zakaźność [3, 17].

Mikrobiologiczne laboratoria prętka gruźlicy. Według zaleceń WHO wszystkie laboratoria prętka na świecie posiadają strukturę 3-stopniową, najniższą stanowią laboratoria I rzędu, których głównym zadaniem jest przygotowywanie rozmazów, ich barwienie na obecność prątków kwasoopornych (*acid-fast bacilli* – AFB) oraz przesyłanie materiałów wraz z dokumentacją do laboratoriów wyższego rzędu.

Do zadań laboratoriów II rzędu należy wykonywanie badań bakterioskopowych, izolowanie i identyfikowanie szczepów należących do *M. tuberculosis complex*, wykonywanie testów lekowrażliwości dla czterech głównych leków przeciwpłątkowych: INH – izoniazyd, RMP – rifampicyna, SM – streptomycyna, EMB – etambutol. Najwyższy poziom reprezentują laboratoria III rzędu, do których zadań należy wykonywanie badań zarówno podstawowych, jak i molekularnych. Nadrzędną funkcję nad siecią laboratoriów pełni Krajowe Referencyjne Laboratorium Prętka, które współpracuje z WHO. Istnienie krajowego laboratorium referencyjnego i jego praca w strukturach służb laboratoryjnych jest uważane przez ekspertów WHO za bardzo ważny element narodowych programów walki z gruźlicą [3, 10].

Materiały do diagnozowania gruźlicy układu oddechowego. W przypadku podejrzenia gruźlicy układu od-

dechowego do diagnostyki mikrobiologicznej pobiera się płwocinę, wydzielinę lub popłuczyny oskrzelowe, popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe (*bronchoalveolar lavage* – BAL), wymazy krtaniowe – w przypadku chorych bez kontaktu (nigdy wymazy z gardła), płyn z optucnej, wycinki tkanek, popłuczyny żołądkowe pobrane od chorych mających tendencję do połykania płwociny, przeważnie dzieci i kobiet [27, 28].

Chory powinien odkrztusić płwocinę w ilości 3–5 ml pod nadzorem personelu medycznego, a jeżeli jest to niemożliwe, powinien być dokładnie poinstruowany, w jaki sposób wykonać to w domu. Ślina jest w diagnostyce gruźlicy materiałem nieprzydatnym. Badanie cytologiczne płwociny pozwala ocenić, czy pochodzi ona z dolnych dróg oddechowych i może sugerować istniejący tam stan zapalny. W przypadku bakteryjnego stanu zapalnego płwocina wykrztuszona z dolnych dróg oddechowych wykazuje w swoim składzie komórkowym przewagę neutrofilów. Taki materiał jest odpowiedni jakościowo do badań bakteriologicznych. Przewaga komórek nabłonkowych w płwocinie świadczy o dużej domieszce śliny, w której zawsze znajdują się bakterie z górnych dróg oddechowych, co może powodować kontaminację założonej hodowli.

W badaniach własnych cytologicznych, z materiałów przystanych do diagnostyki gruźlicy do Zakładu Mikrobiologii IGiCHP i opisanych na skierowaniu jako „płwocina”, stwierdzono, że 75% płwocin, które uległy kontaminacji, zawierało dużą liczbę komórek nabłonkowych, natomiast 80% płwocin, z których otrzymano hodowlę *M. tuberculosis*, i 77% o dodatnich wynikach bakterioskopii pochodziła z próbek zawierających dużą liczbę neutrofilów [29, 30].

Płyn z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (*bronchoalveolar lavage fluid* – BALF) i wydzielinę oskrzelową pobiera się w szpitalu podczas bronchoskopii. Zwykle materiał uzyskuje się w stosunkowo małych objętościach. Płyn z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego stanowi bardzo dobry materiał diagnostyczny, wymaga jednak szybkiego przekazania do laboratorium i w jak największej objętości. W laboratorium BALF jest poddawany zagęszczeniu, a uzyskany osad jest posiewany na pożywki hodowlane. Zabieg bronchoskopii na ogół ułatwia chorym odkrztuszenie, dlatego zaleca się po bronchoskopii pobrać płwocinę i wysłać ją do laboratorium na badanie. Płyn z optucnej pobrany od chorego powinien być odesłany do laboratorium w maksymalnie dużej objętości i zawsze zagęszczany przez wirowanie. Posiewanie na pożywki osadu znacznie zwiększa szansę wykrycia prątków.

W ostatnim 10-leciu wprowadzono wiele nowoczesnych technologii opartych na lepszej znajomości genetyki lub biochemii komórki bakteryjnej. Wprowadzono do laboratoriów czułe mikrobiologiczne metody, dzięki którym można wykryć pojedyncze komórki *Mycobacterium* lub specyficzne dla prątków substancje chemiczne, a tym samym skrócić

czas badania do kilku godzin. W diagnostyce mikrobiologicznej wykorzystuje się metody, które charakteryzują się różną czułością i swoistością w wykrywaniu prątków gruźlicy oraz czasem niezbędnym do uzyskania wyniku.

Badanie bakterioskopowe. Badanie mikroskopowe jest proste w wykonaniu, tanie i wysoce specyficzne (95–97%), a wynik jest możliwy do uzyskania po kilku godzinach. Prątków nie należy barwić metodą Grama. Niestety, czułość badania mikroskopowego jest bardzo mała, szczególnie w przypadkach diagnostyki mikrobiologicznej gruźlicy pozapłucnej, gruźlicy u dzieci i w większości przypadków mykobakteriozy, gdy przyczyną choroby są prątki niegruźlicze MOTT. U dzieci obfite prątkowanie, które można wykryć w badaniu mikroskopowym, jest bardzo rzadkie i na ogół wykrywa się u nich prątki gruźlicy dopiero w hodowli.

Według różnych autorów metoda bakterioskopii pozwala na stwierdzenie obecności prątków, gdy w 1 ml płwociny znajduje się od 5000 do 10 000 komórek *Mycobacterium* [31]. Nie ma jednoznacznego poglądu na temat, który materiał jest lepszy do diagnostyki gruźlicy: płwocina oddana przez chorego w czasie jego wizyty w placówce służby zdrowia (*spot specimen*) czy pobierana z rana, po nocy (*early morning specimen*). Ponieważ pacjent musi oddać do badania 2–3 próbki płwocin, dla komfortu chorego dopuszcza się oba rodzaje pobrań stosowane naprzemiennie. Na podstawie wyniku bakterioskopii nie można jednoznacznie potwierdzić rozpoznania gruźlicy. Ponadto w badaniu bakterioskopowym nie można odróżnić prątków patogennych od prątków saprofitycznych, występujących często jako naturalna flora bakteryjna organizmu lub pochodzących ze środowiska człowieka. Przy dodatnim rozmazie należy zawsze wykonać badanie genetyczne [30, 32].

Wykrywanie materiału genetycznego prątków gruźlicy. Jedną z najnowocześniejszych technik diagnostycznych we współczesnej biologii jest technika reakcji łańcuchowej polimerazy (*polymerase chain reaction* – PCR), która zmieniła całkowicie klasyczne metody diagnostyki mikrobiologicznej, w tym prątków gruźlicy. Technika PCR umożliwia szybką (w czasie zaledwie kilku godzin) enzymatyczną amplifikację *in vitro* wybranych odcinków genomu bakteryjnego, aż do takiej ilości, jaka jest wymagana do hybrydyzacji ze specyficzną sondą genetyczną [33]. W nowoczesnym algorytmie pracy proponuje się, aby z materiału od chorego, w którym stwierdza się prątki metodą bakterioskopową, wykonać badanie molekularne z typową dla *M. tuberculosis complex* sondą genetyczną. Badanie genetyczne wymaga jednego roboczego dnia pracy i pozwala odróżnić prątkowanie chorego od kontaminacji materiału prątkami środowiskowymi, pochodzącymi głównie z wody wodociągowej. Można więc w czasie dwóch dni przeprowadzić i zakończyć dwa najważniejsze badania w mikro-

biologicznej diagnostyce gruźlicy, a mianowicie wykrycie i identyfikację prątków patogennych w materiale pobranym od chorego [28, 32].

Coraz szerzej stosowana technika polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych DNA (*restriction fragments length polymorphism* – RFLP) polega na identyfikowaniu z określonymi sondami genetycznymi odcinków DNA, wcześniej pociętymi enzymami restrykcyjnymi. Ponieważ układ fragmentów restrykcyjnych jest charakterystyczny dla danego gatunku, można go użyć do identyfikacji gatunku lub nawet szczepu bakterii [34, 35]. Dzięki badaniom molekularnym można wykazać, że w obrębie jednej rodziny wystąpiło zakażenie tym samym szczepem prątków lub prześledzić łańcuch epidemiologiczny zakażenia, np. ze środowiska do człowieka, lub rozprzestrzenianie się prątków drogą zakażeń szpitalnych.

Nowoczesne automatyczne systemy hodowli prątków.

Wyhodowanie prątków z materiału klinicznego stanowi niezbędny etap w diagnostyce gruźlicy. 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 (ok. 1000 komórek/ml). Czas uzyskania hodowli na powszechnie stosowanych w laboratoriach pożywkach jajowych L-J (Lowensteina-Jensena) lub Ogawy wynosi ok. 10 tygodni. Czas uzyskania hodowli prątków z materiału pobranego od chorego z podejrzeniem gruźlicy jest znacznie krótszy w nowych systemach hodowlanych [36].

Podsumowanie

W diagnostyce mikrobiologicznej gruźlicy klasyczne metody zostały uzupełnione o diagnostykę opartą na nowych systemach hodowlanych. W systemach tych materiały diagnostyczne od chorego są posiewane na pożywkach zawierających płynną pożywkę Middlebrooka, na których prątki rosną znacznie szybciej niż na pożywkach stałych agarowych lub jajowych. Nowoczesne systemy hodowlane umożliwiają wyhodowanie w ciągu kilku dni szczepu prątków z materiału klinicznego pobranego od chorego. Czas wzrostu prątków zależy przede wszystkim od liczby komórek bakterii, jakie są zawarte w pobranym materiale. Wynik ujemny wydawany jest po 6 tygodniach inkubacji. We wszystkich automatycznych systemach hodowli wzrost prątków jest rejestrowany jako reakcja biochemiczna, np. oddychanie bakterii, pobieranie tlenu lub wydalanie CO₂. Proces jest rejestrowany automatycznie i przeliczany na indeks wzrostu. Aparat informuje, że butelka hodowlana wykazuje wzrost prątków. Zaletą tych

Tabela II. Kryteria rozpoznania gruźlicy wg WHO
Table II. Criteria for the diagnosis of tuberculosis by WHO

Potwierdzenie gruźlicy u chorego	Wyniki badań
przypadek pewny	1) wyhodowanie szczepu prątków gruźlicy lub 2) dodatni wynik badania bakterioskopowego i wykrycie DNA/RNA prątków lub 3) stwierdzenie ziarniników w badaniu histologicznym i wykrycie DNA/RNA prątków
przypadek prawdopodobny	1) dodatni wynik badania bakterioskopowego lub 2) wykrycie DNA/RNA w materiale klinicznym lub 3) stwierdzenie ziarniników w badaniu histologicznym i obecność prątków w barwionych wycinkach tkanek
przypadek możliwy	1) objawy kliniczne odpowiadające gruźlicy i badania obrazowe sugerujące gruźlicę; brak potwierdzeń laboratoryjnych

metod jest możliwość wczesnego wykrycia wzrostu prątków już po 4–6 dniach od założenia hodowli.

Warto przypomnieć, jak ważna dla prawidłowego i szybkiego zdiagnozowania chorego w kierunku gruźlicy jest ścisła współpraca personelu klinicznego (lekarzy i pielęgniarek) z personelem laboratorium (bakteriologami, laborantami, rejestratorami). Może ona przynieść więcej korzyści niż zastosowanie najbardziej nowoczesnych technologii, dostępnych obecnie w wielu laboratoriach na świecie. W algorytmie pracy laboratorium uwzględnia się, czy chory jest diagnozowany po raz pierwszy, czy jest to wznowa gruźlicy. W przypadku chorych nowo wykrytych przy pierwszym badaniu mikrobiologicznym, oprócz bakterioskopii i posiewów na pożywkach stałych i płynnych, należy zlecić badanie genetyczne na obecność DNA lub RNA prątków gruźlicy. Testy genetyczne nie mogą być wykonywane jako jedyna metoda diagnostyczna, ponieważ nie zastępują innych metod bakteriologicznych, a są jedynie ich uzupełnieniem. W grupie chorych wcześniej leczonych z uwagą na ryzyko lekooporności związane ze wznową choroby, oprócz badań wyżej wymienionych należy dodatkowo zlecić wykonanie molekularnego testu wykrywającego lekooporność prątków bezpośrednio w materiale klinicznym pobranym od chorego. Laboratoryjne kryteria rozpoznania gruźlicy zależą od wyników wielu badań bakteriologicznych i histopatologicznych. Kryteria te przedstawiono w tabeli II.

Autorki deklarują brak konfliktu interesów.

Piśmiennictwo

- Spigelman M, Lemma E. The use of polymerase chain reaction (PCR) to detect *Mycobacterium tuberculosis* in ancient skeleton. *Int J Osteoarcheol* 1993; 3: 137-147.

- WHO. Global Tuberculosis Report 2012. World Health Organization, Geneva 2012.
- Lonnroth K, Castro KG, Chakaya JM, et al. Tuberculosis control and elimination 2010-50: cure, care, and social development. *Lancet* 2010; 375: 1814-1829.
- Jagielski T, Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z. Epidemiologia gruźlicy w perspektywie świata, Europy i Polski. *Wiad Lek* 2010; 63: 230-246.
- Gruźlica i choroby układu oddechowego w Polsce w 2011 roku. Korzeniewska-Koseła M. (red.). Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa 2012.
- Gruźlica i choroby układu oddechowego w Polsce w 2010 roku. Korzeniewska-Koseła M. (red.). Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa 2011.
- Zwolska Z. Robert Koch twórca bakteriologii chorób zakaźnych. *Via Medica*, Gdańsk 2006.
- Daniel TM. Robert Koch and the pathogenesis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 11: 1181-1182.
- Janicka-Sobierajska G. Gruźlica wśród więźniów w latach 1999-2003. *Pneumonol Alergol Pol* 2004; 72: 258.
- Zwolska Z, Augustynowicz-Kopeć E. Gruźlica lekooporna. *Pol Merk Lek* 2011; 30: 179: 5-9.
- Augustynowicz-Kopeć E. Gruźlica lekooporna w Polsce. Analiza epidemiologiczna, mikrobiologiczna i genetyczna. Rozprawa habilitacyjna. Akademia Medyczna w Warszawie, 2007.
- Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. WHO/HTM/TB/2010.3. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej*. L159 z 18.06.2008.
- Kozińska M, Brzostek A, Krawiecka D i wsp. Gruźlica lekooporna typu MDR, pre-XDR i XDR w Polsce w latach 2000–2009. *Pneumonol Alergol Pol* 2011; 79: 278-287.
- Riley RL. Transmission and environmental control. In: Tuberculosis. A comprehensive international approach, Reichman LB, Hershfield ES, (eds.) Marcel Dekker, New York 2000; 123-136.
- Zwolska Z. Znaczenie dezynfekcji powietrza w zapobieganiu transmisji gruźlicy w placówkach medycznych. *Zakażenia* 2006; 5: 92-97.

16. Ehrenkrantz NJ, Kicklighter JL. Tuberculosis outbreak in a general hospital: evidence for air-bone spread of infection. *Ann Intern Med* 1972; 77: 377-382.
17. Raitio M, Tala E. Tuberculosis among health care workers during three recent decades. *Eur Respir J* 2000; 15: 304-307.
18. Counsell SR, Tan JS, Dittus RS. Unsuspected pulmonary tuberculosis in a community teaching hospital. *Arch Intern Med* 1989; 149: 1274-1278.
19. Pęczak W. Rola badań mikrobiologicznych w kierunku badania prątków gruźlicy na poziomie leczenia podstawowego oraz oddziałów szpitala spoza pionu przeciwegruźliczego. *Pneumonol Alergol Pol* 1997; 65: 403-412.
20. D'Agata E, Wise S, et al. Nosocomial transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from an Extrapulmonary site. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001; 22: 10-12.
21. Lundin AP, Adler AJ, Berlyne GM, et al. Tuberculosis in patients undergoing maintenance hemodialysis unit. *Am J Med* 1979; 67: 597-602.
22. Zwolska Z. *Mycobacterium bovis* stary i nowy problem w gruźlicy zwierząt i ludzi. *Nowa Klinika. Medycyna Zakażeń* 2010; 17: 340-346.
23. Augustynowicz-Kopeć E, Krajewska M, Zabost A i wsp. Characterisation of *Mycobacterium bovis* strains isolated from farm and wild animals in Poland. *Bull Vet Pulawy* 2011; 55: 385-389.
24. Hlavsa MC, Moonan PK, Cowam LS, et al. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the United States, 1995-2005. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 168-175.
25. Wróblewska M, Augustynowicz-Kopeć E, Jezierska-Anczuków A i wsp. Endoskopy jako potencjalne źródło zakażeń szpitalnych. *Magazyn Medyczny* 2002; 8: 17-23.
26. Zwolska Z, Augustynowicz-Kopeć E, Domagała-Krzewniak A i wsp. Ryzyko narażenia na gruźlicę jako chorobę zawodową u personelu medycznego. *Zakażenia* 2001; 2: 17-22.
27. Zwolska Z, Augustynowicz-Kopeć Z. Diagnostyka gruźlicy i mykobakterioz. W: *Choroby wewnętrzne. Stan wiedzy na 2010*. Szczeklik A (red.). *Medycyna Praktyczna*, Kraków 2011.
28. Drobniowski FA, Hoffner S, Rusch-Gerdes S, et al. Recommended standards for modern tuberculosis laboratory services in Europe. *Eur Respir J* 2006; 28: 903-909.
29. Zwolska Z. Struktura i organizacja sieci laboratoriów prątków gruźlicy w Polsce. W: *Higiena w placówkach opieki medycznej*. Dulny G, Leibrant E (red.). *Verlag Dashofer* 2002; 7: 6.
30. Zwolska Z, Augustynowicz-Kopeć E, Kostrzewa E i wsp. Czułość metody bakterioskopowej w wykrywaniu prątków gruźlicy i MOTT na podstawie analizy 22 218 badań diagnostycznych przeprowadzonych w Zakładzie Mikrobiologii IGiCHP w okresie 1998-2001. *Pneumonol Alergol Pol* 2002; 70: 368-377.
31. Rieder HL, Chonde TM, Myking H, et al. The public Health Service National Tuberculosis Reference Laboratory and the National Laboratory network. Minimum requirements, role and operation in a low-income country. Edition I Paris: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 1998.
32. Zwolska Z, Augustynowicz-Kopeć E. Wybrane zagadnienia mikrobiologicznej diagnostyki gruźlicy. W: *Gruźlica dziecięca*. Ziolkowski J (red.). *Borgis*, Warszawa 2010; 43-97.
33. Supply P, Allix C, Lejean S, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *M. tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4498-4510.
34. Augustynowicz-Kopeć E, Jagielski T, Zwolska Z. Genetic diversity of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates collected in Poland and assessed by spoligotyping. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 4041-4044.
35. Kosińska M. Badanie źródeł transmisji gruźlicy w środowisku rodzinnym. W: *Walka z gruźlicą u ludzi i zwierząt w Polsce. Stulecie pierwszego polskiego laboratorium prątków*. Rudka 1912-2012. Dusińska H, Zwolska Z (red.). *Wyd. Kawdruk*, Warszawa 2012; 221-231.
36. Hepple P, Novoa-Cain J, Cheruiyot C, et al. Implementation of liquid culture for tuberculosis diagnosis in a remote setting: lessons learned. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011; 15: 405-407.