

# Diagnostyka gruźlicy

Dr hab. n. med., prof.  
UM  
**Sylwia Kwiatkowska**

Kierownik Oddziału Klinicznego  
w Klinice Gruźlicy, Chorób  
i Nowotworów Płuc  
UM w Łodzi

Kierownik Kliniki:  
prof. dr hab. med.  
Iwona Grzelewska-Rzymowska

## D I A G N O S T Y K A

### The analysis of selected trees pollen count in 2008.

#### S U M M A R Y

In this paper the pathogenesis of primary and secondary tuberculosis was established. The clinical course as well as radiographic changes on X-ray were presented. Bacteriological criteria of active tuberculosis and new genetic methods were discussed in details. The significance of tuberculin skin test in TB infection and active disease was studied, focused at the end of the review on some new immunological perspectives.

Praca przedstawia przebieg sezonu pylenia leszczyny, olszy, brzozy, dębu, jesionu i grabu wybranych punktach pomiarowych w Polsce w 2008 roku. Badania prowadzono metodą objętościową przy wykorzystaniu aparatów firmy Burkard i Lanzoni. Sezon pyłkowy wyznaczono jako okres, w którym w powietrzu występuje 95% rocznej sumy ziaren pyłku.

Kwiatkowska S.: Diagnostyka gruźlicy. Alergia, 2008, 3: 9-12

Do wystąpienia gruźlicy, jako choroby zakaźnej niezbędne jest, z jednej strony, narażenie na czynnik etiologiczny - prątki gruźlicy, a z drugiej sprzyjająca sytuacja immunologiczna osoby poddanej ekspozycji. Biorąc pod uwagę możliwe do wystąpienia konfiguracje kliniczne można za Amerykańskim Towarzystwem Chorób Klatki Piersiowej (American Thoracic Society - ATS) wyróżnić następujące sytuacje (1):

#### Drogi szerzenia się infekcji

##### • Brak narażenia, brak cech zakażenia – ujemny odczyn tuberkulinowy (OT)

1. Narażenie, brak cech zakażenia - ujemny OT
2. Zakażenie, brak choroby - brak klinicznych, bakteriologicznych i radiologicznych cech choroby, dodatni OT (Latent TB Infection - LTBI)
3. Choroba - czynna gruźlica
4. Gruźlica nieczynna (przebyta) - leczona lub nie w przeszłości, obecnie brak klinicznych i bakteriologicznych cech aktywności choroby, przy stabilizacji zmian radiologicznych
5. Podejrzenie gruźlicy – czas na postawienie właściwego rozpoznania – 3 miesiące

Zainhalowanie prątków przez organizm, który dotychczas nie stykał się z tym drobnoustrojem, po wstępnej fagocytozie przez makrofagi pęcherzykowe, prowadzi

do replikacji wewnątrzkomórkowej mykobakterii. W tym samym czasie drogą limfokrwipochodną może następować rozsiew do różnych narządów: węzłów chłonnych, nerek, wątroby, śledziony, kości oraz innych obszarów płuc. W okresie 8-10 tygodni, gdy populacja prątków osiągnie liczbę 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup>, dochodzi do wytworzenia swoistej odpowiedzi komórkowej oraz formowania ziarniniaków, mających ograniczyć szerzenie się zakażenia. Przy sprawnym układzie immunologicznym rozwój prątków zostaje zahamowany i ograniczony do ich obecności w centrum ziarniniaków (martwica serowata) (2).

Tworzący się zespół pierwotny (biegun płucny+ biegun węzłowy) rzadko jest widoczny na radiogramach i często jedynym objawem zakażenia jest dodatni wynik OT (3). Wśród osób zakażonych u 5 do 10% może dojść do rozwoju choroby w ciągu całego życia, przy czym największe ryzyko istnieje w okresie 2 lat od zakażenia. W odróżnieniu od gruźlicy pierwotnej, gruźlica popierwotna rozwija się u osób z wykształconą swoistą w stosunku do antygenów prętka odpornością komórkową i jest konsekwencją zachwianej równowagi pomiędzy ilością i zjadliwością prątków, a stanem układu immunologicznego ustroju.

Wystąpieniu jej sprzyja współistniejąca cukrzyca, choroby nerek, zakażenie HIV, stosowanie glikokortykosteroidów, infliximabu. Przyczyną choroby mogą być prątki z uczynnionych ognisk gruźlicy pierwotnej (reactivatio endogenes) lub pochodzące z zewnątrz zupełnie nowe szczepy (reinfectio egzogenes).

Główną pulę, z której wywodzą się przypadki czynnej choroby w wieku dorosłym są osoby z LTBI.

W odróżnieniu od gruźlicy wieku dziecięcego zwykle skąpoprątkującej, u osób dorosłych rozwój choroby wiąże się, ze względu na obfite prątkowanie ze znacznie większym zagrożeniem dla zdrowej populacji (ryc. nr 1)

Wynika stąd, iż w opanowaniu gruźlicy na świecie, główną rolę dogrywać będą osoby z LTBI, będące rezerwuarem prętka. W dalszym ciągu nie wiemy jednak czym dokładnie charakteryzują się obecne w ich organizmie prątki, będące w pewnej formie uśpienia o obniżonym metabolizmie (dormant).

**Tabela 1** Podział prątków atypowych według Runyona

Grupa prątków atypowych	Przedstawiciele
I. – prątki fotochromogenne – wytwarzające barwnik pod wpływem światła	<i>M. kansasii</i>
II. – prątki skotochromogenne – wytwarzające barwnik w każdych warunkach	<i>M. aquae</i> <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. marinum</i> <i>M. goodii</i>
III. – prątki niefotochromogenne – nie wytwarzające barwnika	<i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i>
VI. – prątki szybko rosnące	<i>M. fortuitum</i> <i>M. phlei</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. vaccae</i>

## Diagnostyka

Diagnostyka gruźlicy opiera się na kryteriach klinicznych, radiologicznych oraz najbardziej obiektywnych- kryteriach bakteriologicznych.

Wśród klinicznych manifestacji choroby, niezależnie od jej lokalizacji, dominują objawy toksemii.

Najczęstszym jest

- podwyższona temperatura, zwykle w godzinach wieczornych. W postaciach ostrych (ostra prosówka, serowate zapalenie płuc) może dochodzić do 39-40°C, towarzyszą jej zlewne nocne poty.
- chorzy skarżą się na postępujące osłabienie, spadek masy ciała.
- w badaniach dodatkowych zaznaczyć się może niedokrwistość, nieznacznie

podwyższona leukocytoza, przyspieszony odczyn opadania krwinek czerwonych, zaburzenia gospodarki wapniowej (hiperkalcemia) i sodowej (hiponatremia).

**Tabela 2** Odsetek dodatnich wyników w różnych metodach hodowli

	MB/BacT	Bactec 460	L-J
M. tuberculosis complex	84,5	91,2	70,9

Podobnie jak objawy ogólne, również dolegliwości narządowe nie są patognomiczne dla gruźlicy.

W przypadku najczęstszej postaci – gruźlicy układu oddechowego

- najbardziej charakterystyczny jest kaszel, początkowo suchy, a następnie z odkrztuszaniem
- duszność pojawia się w postaciach zajmujących znaczne obszary miąższu płucnego (serowate zapalenie płuc), przebiegających z niewydolnością oddechową (prosówka płuc) lub związana jest z gromadzeniem się płynu w jamie opłucnej (gruźlicze zapalenie opłucnej)
- ból w klatce piersiowej towarzyszy zwykle gruźliczemu zapaleniu opłucnej, krwioplucie, choć nie jest charakterystyczne, może występować zarówno w postaciach ostrych, jak i przewlekłych (gruźlica płuc włóknisto-jamista).

## Obraz radiologiczny

Jednak klinika dopiero z obrazem radiologicznym zmian płucnych, nasuwać może podejrzenie gruźlicy.

Gruźlicy płuc zwykle towarzyszą objawy radiologiczne. Wyjątkiem mogą być zmiany wewnątrzoskrzelowe, które we wczesnych stadiach nie prowadzą jeszcze do zaburzeń wentylacyjnych.

Gruźlica pierwotna charakteryzuje się obecnością zmian naciekowych w polach środkowych i dolnych, ze współistniejącą węzłowo powiększoną jednostronnie wnęką (policykliczny zarys wnęki), co tworzy charakterystyczny obraz zespołu pierwotnego (complexus primarius). Postępujący proces swoisty może prowadzić do niedodmy, na skutek ucisku dużego oskrzela przez powiększony węzeł chłonny.



Gruźlica popierwotna w odróżnieniu od pierwotnej, najczęściej lokalizuje się w polach górnych i częściowo środkowych, natomiast u osób starszych obserwuje się nietypową lokalizację w polach dolnych.

Zmiany najczęściej mają charakter owalnych bądź nieregularnych nacieków, wśród których łatwo dochodzi do rozpadu z wytworzeniem jam, widocznych na radiogramach jako ogniska przejaśnienia w otoczce cieniowej. Mogą mieć kształt okrągły lub owalny we wczesnych stadiach choroby, bądź też nieregularny, zatokowaty w postaciach przewlekłych. W gruźlicy popierwotnej nie obserwuje się odczynów węzłowych. Wraz z postępowaniem choroby dochodzi do rozsiewów drogą odoskrzelową do pozostałych

obszarów mięszu płucnego (średnio i gruboplamiste cienie dające obraz odoskrzelowego serowatego zapalenia płuc) oraz drogą naczyniową (krwio- lub limfopochodną), dając rozsiewy drobno i średnioplamiste typowe dla postaci rozsianych (np. ostrej prosówki płuc).

W gruźlicy popierwotnej mogą występować też zmiany o charakterze cieni okrągłych: naciek podobojczykowy Assmanna (cień o średnicy około 1 cm zlokalizowany w polu górnym, pod obojczykiem o słabym stopniu wysycenia) oraz guzy gruźlicze: gruźliczak i serzak – cienie okrągłe o średnicy do kilku cm, dobrze wysyczone i odgraniczone od otoczenia. Natomiast cienie smużaste oraz dobrze wysyczone cienie guzkowe (o średnicy kilku mm) świadczą najczęściej o przebyłym, nieczynnym już procesie swoistym. Należy podkreślić, iż, choć większość obrazów radiologicznych gruźlicy płuc jest dość charakterystyczna, to jednak wnioskowanie tylko na tej podstawie o chorobie może okazać się błędne.

Mniej istotne z punktu widzenia pomyłki diagnostycznej jest rozpoznanie choroby u osoby ze zmianami nieczynnymi (leczonymi, bądź nie w przeszłości). Znacznie dramatyczniejsze jest włączanie leczenia przeciwprątkowego u chorych na raka płuca.

Przeprowadzone w naszym kraju przez Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w latach 90- tych badania wykazały, że u około 11% chorych z rozpoznaną gruźlicą płuc, bez potwierdzenia bakteriologicznego, diagnoza co do etiologii była błędna.

## Potwierdzenie bakteriologiczne

Najbardziej obiektywnym i pewnym elementem w diagnostyce gruźlicy jest - od czasu wykrycia przez Roberta Kocha w 1882 roku prątków gruźlicy - uzyskanie potwierdzenia bakteriologicznego. Choć wydaje się to oczywiste, w naszym kraju, na początku XXI wieku jest to możliwe jedynie w około 50 procentach. Od wielu lat nie udaje się zwiększyć tego odsetka do akceptowalnej liczby 80%. Z publikowanych co roku przez Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc danych wynika, iż w 2007 roku udało się w skali kraju potwierdzić etiologię swoistą jedynie u 64% ogółu chorych leczonych z powodu gruźlicy.

Gruźlicę wywołują prątki należące do *Mycobacterium tuberculosis complex*:

*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. canetti* oraz forma atenuowana *M. bovis* BCG.

Pozostałą grupę stanowią prątki atypowe, określane również jako prątki niegruźlicze (MOTT – *Mycobacterium other than tuberculosis*), które dzieli się, przyjmując klasyfikację podana przez Runyona na 4 grupy (Tabela nr 1).

O ile wykrycie prątków należących do *M. tuberculosis complex* zawsze świadczy o czynnej gruźlicy, o tyle stwierdzenie w materiale biologicznym prątków atypowych nie przesądza jeszcze o chorobie. Duża bowiem część prątków atypowych, które powszechnie występują w wodzie oraz glebie ma właściwości saprofityczne.

Zważywszy na fakt, iż gruźlica najczęściej, bo w 90% dotyczy układu oddechowego, prątków poszukujemy w takich materiałach, jak: plwocina, odkrztuszona w sposób spontaniczny lub indukowana poprzez nebulizację hipertonicznego (3-15%) roztworu soli, popłuczyny krtaniowe czy żołądkowe. Gdy zawodzą te metody sięgamy po specimeny uzyskane w trakcie bronchoskopii: bronchoaspirat, materiał z cewnikowania, szczoteczki lub oligobiopsji błony śluzowej oskrzeli oraz popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe (BALF - bronchoalveolar lavage fluid). Natomiast w przypadku gruźlicy opłucnej, zaliczanej obecnie do gruźlicy pozapłucnej, badaniu bakteriologicznemu poddaje się płyn uzyskany z jamy opłucnej lub wycinek opłucnej ściennej, pobrany w trakcie pleurobiopsji. Badany materiał powinien być jak najszybciej dostarczony do laboratorium prątków. Gdy jest to niemożliwe, specimeny przechowuje się w lodówce, bez dodawania jakichkolwiek środków konserwujących..

Wszystkie procedury związane z diagnostyką gruźlicy przeprowadzane są w specjalnie

do tego przygotowanych laboratoriach diagnostyki prątków. .

## Metody wykrywania prątków gruźlicy

### Bakterioskopia.

Podstawową metodą, stosowaną najczęściej w diagnostyce gruźlicy, najprostszą i zarazem najtańszą oraz szybką jest metoda bakterioskopii, czyli bezpośredniego badania płwociny metodą rozmazu. Wynik uzyskuje się już po kilku godzinach. Płwocinę od danego pacjenta badamy co najmniej 3-krotnie.

Preparat po utrwaleniu barwi się na gorąco roztworem fuksyny karbolowej w metodzie Ziehl-Neelsena i ogląda w mikroskopie świetlnym. Barwienia można także dokonać barwnikami fluorochromowymi, takimi jak: auramina, rodamina czy oranż akrydyny i oglądać w mikroskopie fluorescencyjnym. Wynik podaje się w zależności od ilości prątków w danym preparacie:

+ - pojedyncze prątki w preparacie

++ - pojedyncze prątki w poszczególnych polach widzenia

+++ - liczne prątki w poszczególnych polach widzenia

Metoda bakterioskopii charakteryzuje się małą czułością i swoistością. Dzięki niej prątki wykrywa się tylko wtedy, gdy jest ich co najmniej 10<sup>4</sup> w 1 ml płwociny (4). Czułość metody bakterioskopowej zawiera się w szerokich granicach od 22 do 78% (5,6).

Stosując metodę bakterioskopii, można jedynie wykazać obecność prątków kwasoopornych, bez określenia czy są to prątki należące do *M. tuberculosis complex*, czy prątki atypowe (MOTT). Na dokładniejsze zróżnicowanie pozwoli metoda posiewu. Hodowla

Metoda hodowli prątków na odpowiednich podłożach uważana jest za złoty standard w diagnostyce bakteriologicznej gruźlicy. Z nią porównuje się wszystkie inne metody wykrywania prątków, nawet te najbardziej nowoczesne (genetyczne). Czułość hodowli wynosi 80-85%, a swoistość sięga 98-100%.

Cechy hodowli prątków:

- metoda hodowli jest bardziej czuła niż metoda bakterioskopii, pozwala na wykrycie około 10 prątków w 1 ml
- uzyskany metodą hodowli wzrost prątków umożliwia ich dokładną identyfikację
- wyhodowanie prątków umożliwia przeprowadzenie testów lekowrażliwości
- uzyskanie hodowli prątków umożliwia za pomocą metod genetycznych prześledzenie łańcucha epidemiologicznego

Badany materiał diagnostyczny po uprzednim opracowaniu (homogenizacja, dekontaminacja, zagęszczenie) wysiewa się na podłoża stałe: Lowensteina-Jensena (L-J), Ogawy lub Stonebrinka. Prątki rosną wolno, w temp 37oC i w odpowiedniej wilgotności. W przypadku materiałów bogatoprątkowych wzrost można uzyskać już w 3 tygodniu, zaś na ujemny wynik posiewu czekamy 8-10 tygodni. Tak więc, o wydalaniu przez pacjenta prątków („prątkowaniu”) można niekiedy przekonać się dopiero po 2 miesiącach.

Podobnie jak w metodzie bakterioskopowej również wynik posiewu podawany jest w zależności od intensywności wzrostu prątków.

Ocena nasilenia prątkowania

(+) do 20 kolonii – wynik podawany jest liczbą

+ liczba kolonii 20-100

++ 100-200 kolonii – wzrost policzalny

+++ masywny wzrost >200 kolonii, zlewny, niepoliczalny

Do niedawna uważano, że znaczenie epidemiologiczne mają tylko chorzy wydalający prątki, ujawniane w badaniu bakterioskopowym, czyli obficie prątkujący. Obecnie wiemy, że również pacjenci wydalający mniejsze ilości prątków, które stwierdzane są jedynie

metodą posiewu stanowią ważne ogniwo w łańcuchu epidemiologicznym, a więc są chorymi zakaźnymi (ryc. nr 2). Przeprowadzone w latach 90-tych w San Francisco badania materiału genetycznego prątka wykazały 71 grup o identycznych szczepach prątka (7). W każdej z tych grup jeden pacjent określony został jako źródło zakażenia, natomiast kolejne 183 osoby scharakteryzowano jako zakażenia wtórne w łańcuchu epidemiologicznym. Chorych będących źródłem zakażenia podzielono na dwie grupy: 1) potwierdzenie bakteriologiczne uzyskano metodą bakterioskopii, 2) potwierdzenie bakteriologiczne wykazano jedynie metodą hodowli. W grupie 2 było 28 (39%) chorych i 50 (27%) wtórnych zachorowań, z których liczba rzeczywistych zakażeń od pacjentów skąpo prątkujących wynosiła 17%.

Choć obecne w formie szczątkowej wcześniej, od lat 60-tych, tj od czasu wprowadzenia do leczenia gruźlicy rifampicy, nasiliło się zjawisko obecności prątków widocznych nierosnących – bacillus visibles non viables. Polega ono na stwierdzeniu prątków w badaniu mikroskopowym, przy ujemnych wynikach hodowli. Osłabione w wyniku stosowania silnie bójących leków prątki nie są zdolne do wzrostu na odpowiednich podłożach. Tak więc obecność prątków visibles non viables łączy się zwykle ze skuteczną chemioterapią i poprzedza odprątkowanie.

Należy podkreślić, iż istnieją pewne, dość znaczne odrębności pomiędzy stwierdzeniem metodą hodowli prątków należących do *M. tuberculosis complex* a MOTT.

Obecność w materiale biologicznym prątków atypowych świadczyć może o asymptomatycznym zakażeniu, czyli kolonizacji, co nie wymaga chemioterapii, a jest szczególnie częste u pacjentów z chorobami płuc (przebyta gruźlica, POChP).

Rozpoznanie mykobakteriozy, czyli choroby wywołanej przez prątki atypowe wymaga spełnienia ściśle określonych kryteriów (8)

1. klinicznych – obecne dolegliwości najczęściej ze strony układu oddechowego
2. radiologicznych – obecność zmian przypominających gruźlicę np. naciek z rozpadem w górnych polach płucnych często z rozsiewem w najbliższej okolicy bądź bez rozpadu oraz zmiany guzkowe rozsiane w polach dolnych i środkowych z towarzyszącymi w 90% rozstrzeniami oskrzeli (potwierdzonymi w HRCT).
3. mikrobiologicznych
  - a. co najmniej 2x dodatni wynik hodowli
  - b. co najmniej 1x dodatni wynik hodowli z bronchoaspiratu lub BALF
  - c. hist-pat zmiany ziarniniakowe + co najmniej 1 dodatni posiew (bronchoaspirat, plwocina)
4. wykluczenie innych chorób

O ile w przypadku gruźlicy dodatnie kryterium bakteriologiczne stanowi wystarczającą podstawę do włączenia leczenia przeciwprątkowego, to w przypadku diagnozy mykobakteriozy nie jest to tak jednoznaczne. Zważywszy na trudności chemioterapii: długi okres leczenia, lekowrażliwość *in vitro* nie równa się wrażliwości *in vivo*, skuteczność około 40-50%, należy w każdym przypadku rozważyć indywidualne korzyści i ryzyko odpowiedniego leczenia.

Znaczny postęp w hodowli prątków pojawił się wraz z dostępnością płynnych podłoży, umożliwiających szybszy wzrost mykobakterii. Do takich nowych zautomatyzowanych systemów należy Bactec 460, MB/BacT, MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube), wykorzystujące do detekcji prątków metody radiometryczne bądź kolorymetryczne. Wzrost prątków w powyższych metodach występuje już w 1-3 tygodniu, podczas gdy na podłożach stałych wydłuża się do 3-8 tygodni. Jedną z najczęściej wykorzystywanych w naszym kraju metod, a jednocześnie charakteryzującą się wysoką czułością jest radiometryczna metoda Bactec 460.

Jest to system zautomatyzowany, w którym prątki hoduje się na podłożu płynnym Middlebrooka 7H12, zawierającym kwas palmitynowy znakowany przy pomocy węgla radioaktywnego  $^{14}\text{C}$ . Aby zahamować rozwój innych drobnoustrojów do podłoża dodaje się zestaw antybiotyków i chemioterapeutyków PANTA, na który składa się polimyksyna, amfoterycyna, kwas naldyksowy oraz trimetoprim. Jeśli w badanym materiale obecne

są prątki, to zużywają one do wzrostu znajdujący się w podłożu kwas palmitynowy, a uwalniany przez nie CO<sub>2</sub> ze znakowanym węglem gromadzi się w górnej części butelki hodowlanej. Całość inkubuje się w cieplarni w temperaturze 37°C i kilka razy w tygodniu odczytuje się wzrost prątków poprzez pomiar radioaktywności w aparacie Bactec. Indeks wzrostu ocenia się w skali od 000 do 999 (ryc. nr 3). Pierwszy wzrost prątków może wystąpić już przed końcem pierwszego tygodnia. Kolejny tydzień potrzebny jest do oceny lekowrażliwości prątków na leki przeciwpłatkowe, takie jak INH, RMP, PZA, SM i EMB. Metoda Bactec 460 jest szczególnie użyteczna w wykrywaniu prątków w materiałach skąpopłatkowych np. w płynie z jamy opłucnej, płwocinie od chorych z niewielkimi zmianami w płucach, płynie mózgowo-rdzeniowym. W systemie Bactec można również stosując podłoże Middlebrooka 7H13 ocenić wzrost prątków z krwi.

#### Metoda MB/BacT

Jest to również metoda w pełni zautomatyzowana, która w odróżnieniu od metody radiometrycznej nie wymaga specjalnych pracowni izotopowych. Prątki rosną na podłożu Middlebrooka 7H9, a wytwarzany przez nie dwutlenek węgla powoduje zmianę zabarwienia sensora umieszczonego na dnie butelki z barwy zielonej na żółtą. Sygnał detekcyjny przekazywany jest w sposób ciągły do komputera, który rejestruje intensywność wzrostu prątków. Podobnie jak w systemie radiometrycznym, prątki z materiałów bogato prątkowych mogą wyrosnąć już po upływie 1 tygodnia. W badaniach wielośrodkowych porównujących systemy Bactec 460 i MB/BacT z hodowlą na podłożu Lowensteina-Jensena stwierdzono, że odsetek dodatnich wyników w kierunku *M. tuberculosis complex*, uzyskanych ze specimenów pochodzących z układu oddechowego był różny (tabela nr 2) (9). Jednak, należy podkreślić, że odsetek kontaminacji jest większy w systemie MB/BacT niż Bactec 460. Natomiast czas wzrostu prątków w obu systemach jest podobny.

## Metody serologiczne

W immunopatologii gruźlicy główną rolę odgrywa odpowiedź komórkowa i nadwrażliwość typu opóźnionego, jednak pojawia się w niej także odpowiedź humoralna. Rola jej jest jednak drugorzędna i nie ma charakteru protekcyjnego.

Metody serologiczne w wykrywaniu gruźlicy odgrywają rolę pomocniczą i to zwłaszcza w gruźlicy pozapłucnej i wieku dziecięcego. Wykazano bowiem, że częstość wyników dodatnich rośnie wraz ze stopniem zaawansowania zmian. Główną metodą stosowaną w badaniach serologicznych w gruźlicy jest metoda immunoenzymatyczna (ELISA – Enzyme-linked Immunosorbent Assay). W ostatnim dziesięcioleciu poszukiwano rekombinowanych antygenów prątka, które byłyby najbardziej swoiste w diagnostyce gruźlicy. Założenie to spełniają antygeny 38kDa i A60. W badaniach prowadzonych w Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie przy użyciu zestawów komercyjnych, dostępnych w naszym kraju: Pathozyme TB complex (wykrywa IgG przeciwko antygenowi 38kDa) i Immunozym (wykrywa przeciwciała przeciwko antygenowi A60) swoistość badania wynosiła ponad 95% (10). Jednak czułość według różnych autorów wahała się od 30% do 70% i wzrastała w zmianach przewlekłych, zaawansowanych, potwierdzonych bakteriologicznie. A w takich sytuacjach klinicznych postawienie właściwego rozpoznania nie stwarza problemów. W gruźlicy opłucnej zarówno w płynie opłucnowym, jak i w surowicy czułość metody ELISA w stosunku do antygeny A60 wynosi do 50%, co jest wynikiem zadawalającym, zważywszy, że prątki metodami tradycyjnymi wykrywa się w około 30% przypadków. Podobnie w materiale z BAL u chorych z zaawansowaną, potwierdzoną bakteriologicznie gruźlicą płuc częstość wyników dodatnich wynosiła od 60% do 80%. Jednak w takich przypadkach nie ma większych trudności diagnostycznych.

## Metody genetyczne

Sonda genetyczna W 1998 roku poznano dokładnie budowę całego genomu prątka. Wprowadzone do diagnostyki gruźlicy nowe metody genetyczne opierają się na naturalnej zdolności kwasów nukleinowych (DNA i RNA), a właściwie ich pojedynczej nici do hybrydyzacji z komplementarnym łańcuchem polinukleotydowym. Pozwoliło to na opracowanie sond genetycznych, obejmujących określonej długości, ściśle zdefiniowany odcinek genomu prątka. Sondy są oligonukleotydowe (od kilkunastu do 50 nukleotydów) oraz polinukleotydowe (do 500 nukleotydów). W roku 1987 po raz pierwszy uzyskano sondy genetyczne dla *M. tuberculosis* oraz *M. avium-intracellulare*. Początkowo znakowano je izotopami fosforu i jodu ( $^{32}\text{P}$ ,  $^{125}\text{I}$ ), a obecny w badanym materiale zhybrydyzowany odcinek kwasu nukleinowego identyfikowano przy pomocy licznika scyntylicyjnego. Później, ze względu na uciążliwość pracy z izotopami, sondy identyfikowano w reakcjach barwnych z użyciem fosfatazy alkalicznej lub biotyny, bądź za pomocą fluorescencji stosując oranż akrydyny. Stosując sondy genetyczne można poszukiwać prątków w materiałach pobranych od chorego. Wadą jednak tej metody jest jej mała czułość. Wykrywa ona prątki, gdy jest ich co najmniej 10<sup>4</sup> w badanych materiałach.

Innym zastosowaniem sondy genetycznej jest identyfikacja poszczególnych gatunków prątków, wcześniej wyhodowanych. Obecnie dostępne są sondy dla *M. tuberculosis complex*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*. Metoda ta jest prosta, a wynik otrzymuje się w ciągu 4 godzin.

## Reakcja łańcuchowa polimerazy ( PCR – Polymerase Chain Reaction)

W ostatnim dziesięcioleciu największym postępem w diagnostyce gruźlicy było wprowadzenie metody PCR. Polega ona na wielokrotnej amplifikacji wybranych odcinków genomu prątka. Warunkiem jej przeprowadzenia jest znajomość sekwencji otaczającej powielany fragment, tak aby można było dokonać syntezy jego komplementarnego odcinka. Są to tzw. startery (primery) wielkości około 20 nukleotydów. Cały proces przebiega w następujących etapach

- denaturacja w temp 95°C 1-3 min z uzyskaniem pojedynczej nici DNA
- dołączenie w temp 50-72°C starterów (0,5 – 3 min)
- synteza DNA przy pomocy termostabilnej polimerazy Taq w temp 72°C (0,5-3 min)

Liczba zsyntetyzowanych fragmentów w cyklu wzrasta w sposób wykładniczy – 2<sup>n</sup>, a liczba cykli zawiera się pomiędzy 30 i 40. Powielenie określonego fragmentu DNA kilka milionów razy jest istotne zwłaszcza w przypadku niewielkiej liczby prątków w badanym materiale. Otrzymany w ten sposób materiał genetyczny identyfikuje się odpowiednimi sondami. Najczęściej powielanym fragmentem genomu prątka jest sekwencja insercyjna IS 6110 (Insertion sequence), występująca zwykle w kilkunastu kopiach w genomie *M. tuberculosis complex*. Obok IS 6110, w metodzie PCR wykorzystuje się IS 986, gen kodujący białko szoku termicznego HSP 65kDa.

W metodach polegających na amplifikacji materiału genetycznego prątka, wykrywa się zarówno prątki martwe, jak i żywe. Był to jeden z głównych zarzutów jaki stawiano tej metodzie w chwili jej wprowadzania. Obawiano się, że metoda, która teoretycznie pozwoli na wykrycie materiału genetycznego jednego prątka w badanym materiale, może dawać wyniki fałszywie dodatnie w przypadku zmian nieczynnych. Obawy te jednak nie potwierdziły się. W ciągu kilkunastu lat stosowania tej metody, wykazano, że czułość jej w różnych materiałach z układu oddechowego, takich jak płwocina, BAL, płyn opłucnowy wynosi od 70% do 100% (11,12). Jednak w materiałach skąpoprątkowych, to jest takich, w których prątków nie wykrywa się metodą bakterioskopii czułość waha się pomiędzy 46% a 70% (13,14). Zarówno w metodzie PCR jak i LCx dolna granica wykrywalności wynosi 10 prątków w badanym materiale.

Wprowadzenie zautomatyzowanych metod PCR i LCx wymaga kosztownej aparatury. W Polsce jest ona dostępna jedynie w kilku ośrodkach, m.in. w Instytucie Gruźlicy



i Chorób Płuc w Warszawie, a w Łodzi – w Zakładzie Wirusologii i Mikrobiologii PAN.

## Metoda chromatograficzna.

W badaniach służących identyfikacji prątków największe znaczenie odgrywa chromatografia płynna wysokociśnieniowa (HPLC – High Pressure Liquid Chromatography). Wykorzystuje ona fakt, iż liczba i rodzaj kwasów mykologicznych jest charakterystyczny dla danego gatunku prątka. Warunkiem przeprowadzenia badania jest uprzednie wyhodowanie danego szczepu prątka. Po ekstrakcji kwasów mykologicznych przeprowadza się ich rozdział na specjalnych kolumnach, a uzyskane wzory elucyjne są swoiste dla danego gatunku prątka. W ten sposób w ciągu kilku minut można zidentyfikować badany szczep. O ile sama metoda jest w miarę prosta, to potrzebny wysoko specjalistyczny sprzęt sprawia, że stosowana jest jedynie w nielicznych laboratoriach na świecie. Jak wykazano czułość tej metody wynosi 98%, a swoistość 100% (15).

## Znaczenie diagnostyczne OT

Skórna reakcja na tuberkulinę jest klasycznym przykładem opóźnionej reakcji nadwrażliwości typu komórkowego. Do jej wykonania używa się w większości krajów europejskich tuberkuliny RT23, będącej odmianą tuberkuliny PPD (Purified Protein Derivative). Stosując śródskórnie 2j tuberkuliny RT23 w grzbietową (najczęściej) lub dłoniową część przedramienia, wynik odczytuje się po upływie 48-72 godzin, mierząc średnicę utworzonego nacieku poprzecznie do długiej osi przedramienia. Warunkiem powstania nacieku jest obecność w badanym organizmie swoście uczulonych w stosunku do antygenów prątka limfocytów T, zwłaszcza CD4+, zdolnych do wytwarzania odpowiednich limfokin, powodujących obrzęk, odkładanie fibryny oraz napływ innych komórek zapalnych.

Dodatni wynik OT, który w naszym kraju uznaje się od 10 mm średnicy, świadczy jedynie o uprzednim kontakcie z prątkami, nie przesądzając o tym, czy są to prątki gruźlicy czy atypowe.

O ile brak jest wyników fałszywie dodatnich, o tyle mogą występować fałszywie ujemne. Z sytuacją taką można mieć do czynienia w przypadku wyniszczenia i starzenia się organizmu, ostrych chorób, nowotworów, zakażenia HIV, stosowania immunosupresji. Dodatkowo interpretację wyniku OT komplikują, powszechnie stosowane w Polsce szczepienia BCG (atenuowany szczep *M. bovis*). Należy podkreślić, iż dodatni wynik OT nie przesądza o czynnym procesie swoistym, a nawet w gruźlicy o ostrym przebiegu (np. ostra prosówka) często wypada ujemnie, ze względu na znaczną supresję odpowiedzi komórkowej pacjenta.

W krajach, gdzie stosuje się szczepienia BCG najbardziej istotnym dylematem jest stwierdzenie, czy dodatni wynik OT jest związany z przebyłą wakcynacją, czy z zakażeniem prątkami gruźlicy. W ostatnich latach diagnostyka gruźlicy poszerzyła się o testy oceniające in vitro produkcję IFN- $\gamma$  przez limfocyty, uzyskane od osób badanych (IGRAs – Interferon Gamma Release Assays). Jednak w odróżnieniu od tuberkuliny, w testach tych do stymulacji używa się protein, choć nie w pełni swoistych dla *M. tuberculosis* (występują także w *M. kansasii*, *M. marinum* i *M. szulgai*), to jednak nie występujących w szczepach *M. bovis* BCG. Są to ESAT-6 (Early Secreted Antigenic Target 6 kDa) i CFP-10 (Culture Filtrate Protein 10 kDa) (16). Obecnie na rynku są dostępne dwa testy; QuantiFERON –TBGold, test oceniający wytwarzanie IFN- $\gamma$  z pełnej krwi metodą ELISA oraz T SPOT-TB, w którym wykorzystując jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMCs) IFN- $\gamma$  ocenia się metodą ELISpot (enzyme-linked immunospot). Jednak ani reakcja skórna na tuberkulinę ani IGRAs nie różnicują

między populacją osób zakażonych prątkami gruźlicy (LTBI) a chorymi na gruźlicę (17,18). Choć testy oceniające produkcję IFN- $\gamma$  przy stymulacji ESAT-6 i CFP-10 pojawiły się przed kilku laty i brak jest jeszcze wystarczających danych, pojedyncze badania wskazują, iż czułość tych testów zmniejsza się wraz z wydłużaniem okresu, który upływa od zakażenia prątkami gruźlicy (19,20).

Jak wspomniano uprzednio, jednym z głównych elementów strategii w walce z gruźlicą jest identyfikacja osób zakażonych (LTBI), będących potencjalnym źródłem choroby w przyszłości. Dotychczas brak było testu o charakterze złotego standardu w diagnostyce LTBI, który pomógłby wyselekcjonować tę grupę, liczącą sobie w skali globu 2 miliardy ludzi (1/3 ogólnej populacji).

Duże nadzieje wiąże się z nowym antygenem mykobakterii wiążącym heparynę o ekspresji hemaglutyninowej HBHA (heparin-binding hemagglutinin). Jest to powierzchniowa proteina, biorąca udział w wiązaniu się z komórkami nabłonka i prawdopodobnie mająca wpływ na rozsiew pozapłucny. W teście IGRA przy stymulacji HBHA udało się uzyskać aż 92% czułość i 94% swoistość w wykrywaniu LTBI (21).

Natomiast u chorych na gruźlicę produkcja IFN- $\gamma$  przy zastosowaniu HBHA jest wyraźnie obniżona. Jak wykazano jest to związane z działaniem regulatorowych limfocytów T reg (CD4+CD25+FOXP3+), które poprzez TGF- $\beta$  i IL-10 wpływają supresyjnie na odpowiedź komórkową pacjentów chorych na gruźlicę (22).



#### Piśmiennictwo:

- American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1376-1395. 2. Dannenberg AM. Roles of cytotoxic delayed - type hypersensitivity and macrophage-activating cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunobiol* 1994; 191: 461-473. 3. Dannenberg AM. Immune mechanism in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Rev Infect Dis* 1989; 11: S369-S378. 4. Hobby GL, Holman AP, Iseman MD i wsp. Enumeration of tubercle bacilli in sputum of patients with pulmonary tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1973; 4: 94-104. 5. Burdesh NM, Manos JP, Ross D i wsp. Evaluation of acid-fast smear. *J Clin Microbiol* 1976; 4:190-191. 6. Lipsky BA, Gates J, Tenover FC i wsp. Factors affecting the clinical value of microscopy for acid-fast bacilli. *Rev Infect Dis* 1984; 6: 214-222. 7. Behr MA, Warren SA, Salamon H i wsp. Transmission of Mycobacterium tuberculosis from patients smear-negative acid-fast bacilli. *Lancet* 1999; 353: 444-449. 8. American Thoracic Society Documents. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 367-416. 9. Piersimoni C, Scarparo C, Callegaro A i wsp. Comparison of MB/BacT ALERT 3D system with radioelectric BACTEC system and Lowenstein-Jesen medium for recovery and identification of mycobacteria from clinical specimens; a multicenter study. *J Clin Microbiol* 2001;39:651-657. 10. Demkow U, Zielonka TM, Michałowska M, Mitczuk D i wsp. Ocena przydatności testów serologicznych w diagnostyce gruźlicy. *Pneumonol Alergol Pol* 1998; 66 (suppl.2):10. 11. Abe C, Hirano K, Wada M i wsp. Detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical specimens by polymerase chain reaction and Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test. *J Clin Microbiol* 1993;31:3270-3274. 12. Chin DP, Yajko DM, Hadley WK i wsp. Clinical utility of a commercial test based on polymerase chain reaction for detecting Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151:1872-1877. 13. Kwiatkowska S, Marczak J, Zięba M i wsp. Clinical utility of a commercial ligase chain reaction kit for the diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999;3:421-425. 14. Jouvesshomme S, Cambau E, Trystram D i wsp. Clinical utility of an amplification test based on ligase chain reaction in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158:1096-1101. 15. Thibert L, Lapierre S. Routine application of high-performance liquid chromatography for identification of Mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1993;31:1759-1763. 16. Andersen P, Munk ME, Pollock JM i wsp. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000; 356: 1099-1104. 17. Richeldi L. An update on the diagnosis of tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 736-742. 18. Menzies D, Pai M, Comstock G. Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. *Ann Intern Med* 2007; 146:340-354. 19. Kang YA, Le HW, Yoon HI i wsp. Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon  $\gamma$  assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. *JAMA* 2005; 293: 2756-2761. 20. Porsa E, Cheng L, Seale MM i wsp. Comparison of a new ESAT-6/CFP-10 peptide-based gamma interferon assay and a tuberculin skin test for tuberculosis screening in a moderate-risk population. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 53-58. 21. Hougardy JM, Schepers K, Place S i wsp. Heparin-binding-hemagglutinin-induced IFN- $\gamma$  release as a diagnostic tool for latent tuberculosis. *PLoS ONE* 2007; 2, e926. 22. Hougardy JM, Place S, Hildebrand M i wsp. Regulatory T cells depress immune responses to protective antigens in active tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 409-416.

Zamknij

Drukuj