

ZAGROŻENIE EPIDEMIOLOGICZNE GRUŹLICĄ – PRZEGLĄD MIKROBIOLOGICZNYCH METOD STOSOWANYCH W DIAGNOSTYCE GRUŹLICY DAWNIEJ I DZIŚ

Człowiek i Zdrowie, nr 2 (VI), 2012

Agnieszka Pacek, Maria Kozioł-Montewka, Jolanta Paluch-Oleś

Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Streszczenie: Według opinii WHO, gruźlica pozostaje wciąż istotnym problemem zdrowotnym w skali globalnej. Zgodnie z danymi opracowanymi przez Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie w roku 2011 zarejestrowano 8479 zachorowań na gruźlicę w Polsce. Współczynnik zapadalności na 100 tysięcy ludności wyniósł 22,0, co sprawia, że Polska według klasyfikacji WHO zostaje zaliczona do krajów o średnim zagrożeniu gruźlicą a w porównaniu do krajów Unii Europejskiej jest to wskaźnik bardzo wysoki. Istotną rolę przypisuje się między innymi działaniom na rzecz doskonalenia metod diagnostyki mikrobiologicznej, dlatego dokonano przeglądu metod od najprostszych, które stosowano już w latach 50-tych XX wieku, kiedy zagrożenie w Polsce było wielokrotnie wyższe, do metod wysoce specyficznych w tym molekularnych stosowanych w chwili obecnej.

Słowa kluczowe: gruźlica, diagnostyka mikrobiologiczna, diagnostyka molekularna

Wstęp

Według opinii WHO, gruźlica pozostaje wciąż istotnym problemem zdrowotnym w skali globalnej, co skłoniło Organizację do wystosowania apelu do instytucji zajmujących się zdrowiem ludzkości aby skierować wszystkie możliwe środki do działań strategicznych w zakresie profilaktyki, diagnostyki i leczenia gruźlicy. W 2010 roku na całym świecie na gruźlicę zachorowało 8,8 mln osób, a 1,4 mln zmarło na tę chorobę. Zgodnie z danymi opracowanymi przez Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie w roku 2011 zarejestrowano 8479 zachorowań na gruźlicę w Polsce. Współczynnik zapadalności na 100 tysięcy ludności wyniósł 22,0, co sprawia, że Polska według klasyfikacji WHO zostaje zaliczona do krajów o średnim zagrożeniu gruźlicą a w porównaniu do krajów Unii Europejskiej jest to wskaźnik bardzo wysoki. Według Raportu Głównego Inspektoratu Sanitarnego utrzymują się różnice w zapadalności na gruźlicę między poszczególnymi województwami, w 2011 roku najwyższą zapadalność stwierdzono w województwach: lubelskim, łódzkim i świętokrzyskim. Do najważniejszych czynników, które negatywnie wpływają na sytuację epidemiologiczną gruźlicy w Polsce jak i na całym świecie należą: niski poziom wykrywalności przypadków choroby, występowanie lekoopornych szczepów *Mycobacterium tuberculosis*, współwystępowanie zakażenia *Mycobacterium tuberculosis* oraz HIV szczególnie istotny w krajach Afryki, wzmożony wpływ imigrantów z krajów o wysokiej prevalencji gruźlicy, złe warunki socjoekonomiczne, a także niewydolność programów zwalczania gruźlicy. Istotną rolę przypisuje się działaniom na rzecz doskonalenia metod diagnostyki mikrobiologicznej i obrazowej - badanie radiologiczne oraz profilaktyki gruźlicy w zakresie poradni przeciwgruźliczych, zasady opieki nad chorymi w tym schematy terapeutyczne oraz edukacja społeczeństwa.

Przegląd metod diagnostycznych

Mając na względzie istotne znaczenie diagnostyki mikrobiologicznej we wczesnym wykryciu gruźlicy, dokonano przeglądu metod od najprostszych które stosowano już w latach 50-tych XX wieku, kiedy zagrożenie w Polsce było wielokrotnie wyższe, do metod wysoce specyficznych w tym molekularnych stosowanych w chwili obecnej.

Metoda bakterioskopii

Badanie mikroskopowe było i jest obecnie pierwszym etapem mikrobiologicznej diagnostyki gruźlicy. Badanie to jest proste w wykonaniu, tanie i szybkie, a wynik jest możliwy do uzyskania już nawet po kilku godzinach (Augustynowicz-Kopeć 2010). Jednakże już w latach sześćdziesiątych ubiegłego wieku zwracano uwagę na fakt małej czułości metody (w materiale musi znajdować się kilkadziesiąt tysięcy prątków, aby mogły zostać wykryte). Zauważono również, że metodą bakterioskopii można było wykryć nie tylko prątki odpowiedzialne za proces gruźliczy, ale również te, które pozostały w starym, nieczynnym ognisku, a uwolnił je inny nieswoisty proces chorobowy. Poza tym pod mikroskopem można było stwierdzić prątki kwasooporne saprofityczne, które są wszechobecne (Buraczewska 1964). Preparaty mikrobiologiczne wykonuje się metodą bezpośrednią lub pośrednią. Częściej stosowaną metodą jest metoda bezpośrednia, która polega na wybraniu odpowiednich fragmentów materiału

i roztarciu ich pomiędzy dwoma szkiełkami lub wykonaniu rozmazu za pomocą ezy. Preparaty mikroskopowe po wyschnięciu i utrwaleniu barwi się metodą Ziehl-Neelsena (Andrzejczuk 1974).

W obecnych czasach mikroskopowe badanie płwociny nie różni się od badania przeprowadzanego ponad 50 lat temu. Barwienie metodą Ziehl-Neelsena jest wciąż stosowane w laboratoriach prątka, często jest poprzedzane przez barwienie metodą fluorescencyjną. Wykorzystywane są barwniki takie jak: rodamina, auramina czy oranż akrydyny. Następnie ogląda się preparat pod mikroskopem fluorescencyjnym, co pozwala na szybkie przejrzanie wielu pól widzenia preparatu, ponieważ ogląda się go pod obiektywem powiększającym 40 razy (Thibert 1993).

Hodowla prątków gruźlicy

Metoda hodowli pozwala na częstsze wykrywanie prątków gruźlicy w materiale od chorego (zwiększyła liczbę dodatnich wyników). Zaleca się posiewać każdy materiał podejrzany o obecność prątków. W ten sposób uzyskuje się potwierdzenie wyniku ujemnego bakterioskopii, bądź też uzyskuje się wyizolowanie szczepu, który poza do-wodem prątkowania służy do dalszych badań.

Podłożem najczęściej stosowanym do izolacji prątków gruźlicy od lat jest pożywka stała Löwensteina-Jensena. Skład pożywki przedstawia się następująco: sole mineralne, asparagina, skrobia, gliceryna, jaja, zieleń malachitowa. Dzięki zawartości asparaginy uzyskuje się wzrost nawet przy małej liczbie prątków. Natomiast dodatek zieleni malachitowej pozwala zmniejszyć odsetek kontaminacji hodowli florą nieswoistą (Andrzejczuk 1974).

Kolonie obserwuje się przez okres od 2 do 6 tygodni a czasami znacznie dłużej biorąc pod uwagę szybkość wzrostu i zdolność do tworzenia pigmentu. Większość szczepów prątka gruźlicy wyrasta w okresie od 4 do 6 tygodni (Pendzich 2011) Prątki gruźlicy rosną na podłożach w postaci wypukłych grudek, czasami okrągłych, pomarszczonych, z zagłębieniem w środku. Wzorcowa barwa kolonii to żółto-kremowa, a konsystencja twarda i woskowata. Wzrost typowy dla *M. tuberculosis* to obfity nalot składający się z dobrze rozwiniętych, szorstkich kolonii. Natomiast wzrost charakterystyczny dla *M. bovis* jest słaby z małymi, płaskimi i gładkimi koloniami (Andrzejczuk 1974). W latach sześćdziesiątych do wykrywania prątków w materiałach od pacjentów stosowana była również metoda hodowli szkiełkowej. Została ona wprowadzona po raz pierwszy przez Pryce'a. Korzyścią tej metody była możliwość uzyskania wyniku już po kilku dniach. Jednakże z powodu niebezpieczeństwa zakażenia pracowników laboratorium, częstych kontaminacji, pracochłonności i niecałkowitej zgodności wyników z makrohodowlą – metoda ta nie była często stosowana (Buraczewska 1964).

Próba biologiczna

Przed wprowadzeniem do leczenia izoniazydu, niektórzy badacze uznawali próbę biologiczną za najlepszą metodę wykrywania prątków gruźlicy. Najczęściej stosowano do niej świnki morskie, które chorują na gruźlicę i padają po zakażeniu nawet małą liczbą prątków. Pojawienie się w materiałach od chorych prątków opornych na izoniazyd, obniżyło wartość diagnostyczną próby biologicznej. Było to spowodowane tym, że prątki odporne na izoniazyd miały zmniejszoną zjadliwość w stosunku do świnek morskich. W latach sześćdziesiątych zalecano stosowanie próby biologicznej w przypadku materiałów skąpoprątkowych, przy minimalnych zmianach gruźliczych, dla potwierdzenia wyleczenia oraz dla ustalenia chorobotwórczości szczepu. Próba biologiczna polegała na zakażeniu dwóch tuberkulinowo-ujemnych świnek morskich próbką materiału diagnostycznego. Po okresie 5-6 tygodni od wstrzyknięcia wykonywano śródskórnie próbę tuberkulinową. Po 6 tygodniach usypiano jedną świnkę, drugą natomiast po okresie 3 miesięcy, gdyż niektóre szczepy wywoływały zmiany gruźlicze stosunkowo późno. Potwierdzeniem obecności prątków gruźlicy w badanym materiale było wykrycie ognisk gruźliczych w narządach oraz znalezienie prątków kwasoodpornych w preparatach z tych narządów. W przypadku wyników wątpliwych wykonywano posiewy z wyizolowanych prątków. W latach sześćdziesiątych do badań nad chorobotwórczością prątków zaczęto używać myszy. Związane to było ze spostrzeżeniem, że prątki atypowe (NTM), które bywają przyczyną gruźlicy u człowieka, mogą być niechorobotwórcze dla świnek morskich, a są chorobotwórcze dla myszy.

Próby biologiczne celem różnicowania typu prątków

Ze względu na to, że za pomocą morfologii hodowli można było tylko z pewną dozą prawdopodobieństwa odróżnić prątki gruźlicy ludzkiego typu od prątków ptasich i bydłych, stosowano także próby biologiczne dla określenia typu prątka. Prątki typu ludzkiego wrażliwe na izoniazyd i prątki bydłowe w organizmie świnki morskiej wywoływały gruźlicę i powodowały śmierć zwierzęcia. Aby odróżnić prątki bydłowe od ludzkich wstrzykiwano je królikowi. W przypadku prątków bydłych występował szereg zmian w wielu narządach i królik padał w ciągu kilku miesięcy. Kiedy natomiast miano do czynienia z prątkami ludzkimi, dochodziło do zmian regresywnych (podczas sekcji, po upływie trzech miesięcy, zmian można było nie stwierdzić). Z kolei gdy podejrzewano, że prątki mogły być typu ptasiego, wstrzykiwano prątki do organizmu kury. Obserwowano wówczas uogólnioną gruźlicę i śmierć zwierzęcia (Krakówka 1988, Buraczewska 1964).

Powyższe metody diagnostyczne były mało specyficzne, długotrwały okres badania oraz niosące istotne niebezpieczeństwo rozsiewu prątków w środowisku i możliwości zakażenia personelu diagnostycznego, szczególnie podczas próby biologicznej obejmującej zakażenie zwierząt laboratoryjnych.

Współczesne metody diagnostyki zakażenia prątkiem gruźlicy

Szybkie i automatyczne systemy hodowli prątków

Znaczący postęp w hodowli pojawił się wraz z dostępnością płynnych podłoży. Metody te na świecie miały zastosowanie już pod koniec lat siedemdziesiątych, jednakże do Polski ze względu na sytuację gospodarczą, dotarły znacznie później (Mitchison 2005). Do nowych zautomatyzowanych systemów hodowli zalicza się Bactec 460, MB/BacT i MGIT. W systemach tych do detekcji prątków wykorzystuje się metody kolorymetryczne, fluorymetryczne lub radiometryczne. Niezależnie od systemu, materiał od chorego upłynnia się, dekontaminuje poprzez inkubację z 0.5% N-acetylocysteiną w 2% NaOH i zagęszcza. Następnie określoną objętość materiału wprowadza się strzykawką przez korek do szczelnie zamkniętego naczynia hodowlanego z pożywką. W wyniku tlenowego metabolizmu prątków, podczas ich wzrostu wydzielają się CO_2 . Pomiar jego stężenia bądź ubytek tlenu są wykorzystywane do oceny siły wzrostu. Dużą zaletą w powyższych metodach jest fakt, że wzrost prątków występuje już w 1-3 tygodniu. (Grubek-Jaworska 2000, Kwiatkowska 2008).

Najczęściej w naszym kraju stosowana jest radiometryczna metoda Bactec 460. W systemie tym używa się podłoża płynnego Middlebrooka 7H12. Podłoże to w swoim składzie zawiera kwas palmitynowy, który jest znakowany węglem radioaktywnym ^{14}C . W podłożu znajduje się również zestaw antybiotyków oraz chemioterapeutyków PAN-TA (polimksyna, amfoterycyna, kwas nalidyksowy i trimetoprim), aby zahamować rozwój innych drobnoustrojów. Prątki zużywają do wzrostu znajdujący się w podłożu kwas palmitynowy, co powoduje uwalnianie się CO_2 znakowanego radioaktywnym węglem. CO_2 gromadzi się na górze butelki hodowlanej. Pierwszy wzrost prątków może pojawić się już po 6 dniach od założenia hodowli. Kolejne 5 dni konieczne jest dla oceny lekowrażliwości prątków i testy typowania. Metoda ta jest wyjątkowo użyteczna, gdy do laboratorium trafiają materiały skąpoprątkowe czy płwocina od chorych z niewielkimi zmianami w płucach. W systemie tym istnieje także możliwość oceniania wzrostu prątków we krwi (Kwiatkowska 2008, Zwolska 2010).

Inną w pełni zautomatyzowaną metodą jest metoda MB/BacT. Jest to metoda kolorymetryczna wykorzystująca podłoże Middlebrooka 7H9. Prątki podczas wzrostu wytwarzają dwutlenek węgla. Powoduje to zmianę sensora znajdującego się na dnie butelki z koloru zielonego na żółty. Następnie sygnał detekcyjny przykazywany jest w sposób ciągły do komputera, za pomocą którego rejestrowana jest intensywność wzrostu prątków. Prątki mogą wyrosnąć już po upływie 1 tygodnia (Kwiatkowska 2008).

System MGIT 960 oparty jest na metodzie fluorymetrii. W probówkach znajduje się wskaźnik wrażliwy na zmiany stężenia tlenu w pożywce, co związane jest z tlenowym metabolizmem bakterii. Pomiar przeprowadzany jest w sposób ciągły, a część pomiarowa jest integralną częścią komory inkubacyjnej (Williams-Bouyer 2000).

Systemy MB/BacT i MGIT 960 stają się poważną konkurencją dla systemu Bactec 460. Spowodowane jest to tym, że są one tańsze w eksploatacji i mniej szkodliwe dla środowiska. Dodatkowo system MGIT 960 posiada opcję odczytu bez stosowania drogiego, specjalistycznego automatu (Grubek-Jaworska 2000).

Metoda chromatograficzna

Technika wysokosprawnej chromatografii cieczowej pozwala na określenie gatunku prątka. Jest to możliwe dzięki analizie składu kwasów mykologowych, będących składnikami ich ścian komórkowych. Na graficznie przedstawionym wyniku chromatografii poszczególne piki odpowiadają pojedynczym kwasom mykologowym lub też ich grupom. Określenie gatunku polega na porównaniu wyników z wynikami analizy kwasów mykologowych szczepów wzorcowych. Analizy są na tyle precyzyjne i powtarzalne, że w diagnostyce rutynowej posługiwać się można programami automatycznie identyfikującymi gatunki prątków. Analiza wymaga niewielkiej masy prątków - zazwyczaj kolonii o średnicy około 3 mm (Grubek-Jaworska 2000).

Metoda HPLC jest prosta, ale potrzebny jest do niej wysoko specjalistyczny sprzęt, dobrze wyszkolony personel i uprzednio wyhodowane bakterie. Głównie konieczność posiadania wysoko specjalistycznego sprzętu powoduje, że metoda ta stosowana jest jedynie w nielicznych laboratoriach na świecie. Jak wykazano czułość tej metody wynosi 98%, a swoistość 100%. Metody chromatograficzne w połączeniu z metodami molekularnymi znajdują również zastosowanie w ocenie oporności prątków na leki (Pendzich 2011, Thibert 1993).

Metody biologii molekularnej.

Możliwość wykrycia prątków gruźlicy przy pomocy metod molekularnych, zmieniło diametralnie możliwości mikrobiologicznej diagnostyki gruźlicy. Techniki te umożliwiają szybkie zwielokrotnienie wybranych odcinków genomu bakteryjnego, aż do ilości, jaka jest potrzebna do hybrydyzacji ze specyficzną sondą genetyczną. W nowoczesnym algorytmie diagnostyki gruźlicy proponuje się, żeby wykonywać badanie molekularne z typową dla *M.*

tuberculosis complex sondą w przypadku bakterioskopowo dodatniego materiału. Badanie trwa 1 dzień i pozwala odróżnić prątkowanie chorego od kontaminacji ze środowiska (Augustynowicz-Kopeć 2010).

W ostatnich latach wiele firm zaczęło oferować zamknięte systemy do diagnostyki zakażeń gruźlicą. Najczęściej stosowanymi testami komercyjnymi są testy *Mycobacterium Tuberculosis Direct* (MTD) firmy Gen-Probe i ProbeTec firmy Becton Dickinson.

W teście MTD firmy Gen-Probe primer zawiera sekwencję dla polimerazy RNA. Łączy się on ze swoistą sekwencją rRNA (z podjednostki 16S rRNA) i tworzy nić cDNA dzięki działaniu odwrotnej transkryptazy. Pierwotna nić rRNA ulega zniszczeniu, a po przyłączeniu drugiego primera do cDNA następuje syntetyzowanie drugiej nici DNA. W następnym etapie polimeraza RNA przepisuje sekwencję DNA na wiele kopii rRNA, z których każda ponownie przechodzi cały opisany cykl. Produkt wykrywany jest za pomocą reakcji chemiluminescencji po hybrydyzacji z odpowiednio wyznakowaną sondą. Dzięki testowi MTD można wykryć zakażenie *M. tuberculosis complex*, *M. avium complex*, *M. avium sp.*, *M. gordonae*, *M. kansasii* i *M. intracellulare sp.* (Grubek-Jaworska 2000).

System genetyczny ProbeTec firmy Becton Dickinson wykrywa w próbach klinicznych sekwencję insercyjną IS 6110. Sekwencja ta występuje jedynie u *M. tuberculosis complex*, w liczbie od 1 do 20 w genomie. Przebieg reakcji opiera się na amplifikacji z równoczesnym wykrywaniem amplifikowanego produktu za pomocą fluorescencji. ProbeTec pozwala także na identyfikację 3 najbardziej rozpowszechnionych gatunków prątków wywołujących zmiany chorobowe, a więc *M. tuberculosis complex*, MAIC i *M. kansasii* (Augustynowicz-Kopeć 2004).

Podstawową wadą testów komercyjnych jest w chwili obecnej wysoka cena i konieczność posiadania firmowych aparatów do prowadzenia analiz. Problemem jest także ryzyko kontaminacji materiału klinicznego. Z tego powodu poszczególne etapy procedury powinny odbywać się w oddzielonych od siebie pomieszczeniach.

Obecnie zyskują na znaczeniu systemy wykorzystujące technologię real-time PCR. Jednym z najnowszych produktów z zastosowaniem tej technologii jest system Xpert MTB/RIF. Pozwala on na równoczesne zastosowanie 5 sond w reakcji amplifikacji fragmentu genu *rpoB*. Umożliwia to identyfikację *M. tuberculosis* i równoczesne wykrycie większości szczepów opornych na rifampinę. Gen *rpoB* należy do genów wysoce konserwatywnych i koduje podjednostkę β polimerazy RNA. U szczepów wrażliwych enzym ten ulega dezaktywacji przez rifampinę. Z kolei mutacja w regionie *rpoB* nie powoduje utraty aktywności polimerazy, lecz czyni ten enzym niewrażliwym na rifampinę. System Xpert MTB/RIF jest w pełni zautomatyzowany. Wszystkie procesy składające się na reakcję PCR są zintegrowane w jednym elemencie, który zawiera kilka komór reakcyjnych. W systemie tym rozwiązania technologiczne ograniczają do minimum możliwość kontaminacji, wykluczając wyniki fałszywie dodatnie. Z kolei zabezpieczenie przez wynikami fałszywie ujemnymi sprowadza się do kontroli aktywności polimerazy i kontroli stopnia dezintegracji prątków (Safinowska 2012).

Metody stosowane w latach sześćdziesiątych ubiegłego wieku pozwalały na wykrycie prątka gruźlicy i oznaczenie lekowrażliwości w przeciągu około 3 miesięcy. W chwili obecnej przy użyciu metod nowoczesnych czas ten skraca się do około 3 tygodni lub jednego dnia w przypadku metod molekularnych (Zwolska 2010). Jednakże ciągle brakuje na rynku prostego, szybkiego a zarazem niedrogiego testu diagnostycznego (Wallis 2010). Specjalistyczne pracownie diagnostyczne najczęściej są wyposażone w szeroki zakres wystandaryzowanych metod hodowlanych i molekularnych co pozwala na diagnostykę podporządkowaną określonym schematom diagnostycznym dostosowanym do aktualnej sytuacji klinicznej.

Literatura:

1. Andrzejczuk B. (1974), *Mikrobiologiczne metody diagnostyki laboratoryjnej stosowane w ośrodkach przeciwgruźliczych*. IGIChP, Warszawa.
2. Augustynowicz-Kopeć E., Jaworski A., Zabost A., Janus K., Klatt M., Zwolska Z. (2004), *Ocena wartości nowego systemu genetycznego do diagnozowania gruźlicy*. ProbeTec. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 72: s. 250-270.
3. Augustynowicz-Kopeć E., Zwolska Z. (2010), *Postępy w diagnostyce i epidemiologii molekularnej Mycobacterium Tuberculosis*. *Post Mikrobiol.* 49: 151-156.
4. Buraczewska M., Jaroszewicz W. (1964), *Diagnostyka mikrobiologiczna*. Gruźlica. PZWL, Warszawa: 32-49.
5. Gadre DV., Mahajan M., Singh NR., Agarwal DS., Talwar V. (1995), *Niacin Test for Mycobacteria: A comparative study of two methods*. *Ind. J. Tub.* 42, 225.
6. Krakówka P., Rowińska-Zakrzewska E. (1988), *Gruźlica*. PZWL, Warszawa: 23-30.
7. Kwiatkowska S. (2008), *Diagnostyka gruźlicy*. *Alergia*. 3: 9-12.
8. Mitchison DA. (2005), *The diagnosis and therapy of tuberculosis during the past 100 years*. *Am J Respir Crit Care Med.* 71: 699-706.
9. Pendzich J., Maksymowicz-Mazur W., Kozielski J. (2011), *Postępy we współczesnej diagnostyce laboratoryjnej gruźlicy*. *Diagn Lab* 47.
10. Safinowska A., Walkiewicz R., Nejman-Gryz P., Grubek-Jaworska H. (2012), *Zastosowanie wybranych komercyjnych testów molekularnych w mikrobiologicznej diagnostyce gruźlicy*. *Pneumon Alergol Pol.* 80.1: 6-12.
11. Thibert L., Lapierre S. (1993), *Routine application of high-performance liquid chromatography for identification of Mycobacteria*. *J Clin Microbiol.* 31: 1759-1763.

12. Wallis RS., Pai M., Menzies D., Doherty TM., Walzl G., Perkinst MD., Zumlat A. (2010), *Tuberculosis 4. Biomarkers and diagnostics for tuberculosis: progress, needs, and translation into practice*. Lancet.375:1920-37.
13. Williams-Bouyer N., Yorke R., Lee HI., Woods GL. (2000), *Comparison of the BACTEC MGIT 960 and ESP culture system II for growth and detection of mycobacteria*. J Clin Microbiol. 38: 4167-4170.
14. Zwolska Z., Augustynowicz-Kopeć E. (2010), *Wybrane zagadnienia mikrobiologicznej diagnostyki gruźlicy*. Ziółkowski J, Gruźlica dziecięca. Borgis, Warszawa.

THE RISK OF TUBERCULOSIS EPIDEMICS – A SURVEY OF THE MICROBIOLOGICAL METHODS USED IN TB DIAGNOSTICS TODAY AND IN THE PAST

Human and Health, Issue 2 (VI), 2012

Agnieszka Pacek, Maria Koziół-Montewka, Jolanta Paluch-Oleś

Medical University of Lublin

Summary: According to the WHO, tuberculosis continues to constitute a serious health issue on a global scale. In view of the data produced by the National Institute of Tuberculosis and Pulmonary Diseases in Warsaw, in 2011 there were 8,479 incident cases of TB in Poland. The incidence rate in a group of 100 thousand people was 22.0, which, in line with the classification put forward by the WHO, ranks Poland among medium-burden countries, but compared to other EU Member States, this is a very high result. A significant role is attributed, i.a., to actions targetted at the enhancement of microbiological diagnostics methods, which is why the survey focusses on the analysis of methodology ranging from the simplest methods, as used already in the 1950s, when the prevalence of TB in Poland was at a much higher level, to highly-specialised such as the molecular procedures applied nowadays.

Key words: tuberculosis, microbiological diagnostics, molecular diagnostics

Introduction

The WHO states that tuberculosis remains an urgent health issue globally. This has prompted the Organisation to appeal to human-health-oriented institutions to direct all possible resources towards strategic projects aimed at TB prophylaxis, diagnostics, and treatment. Globally, in 2010, 8.8 mln people contracted tuberculosis, and 1.4 mln patients died. In view of the data produced by the National Institute of Tuberculosis and Pulmonary Diseases in Warsaw, in 2011 there were 8,479 incident cases of TB in Poland. The incidence rate per 100 thousand people was 22.0, which, in line with the classification put forward by the WHO, ranks Poland among medium-burden countries. This, compared to other EU Member States, is a very high score. According to the Report of the Chief Sanitary Inspectorate, discrepancies in terms of TB incidence have continued to exist between individual regions, with the top rate for 2011 being recorded in the Lubelskie, Łódzkie, and Świętokrzyskie voivodeships. The essential factors to adversely impact on the epidemiological situation of TB in Poland and around the world include the low level of the disease-detection ratio, drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains, the co-occurrence of *Mycobacterium tuberculosis* and HIV – particularly relevant for African countries, the increased influx of immigrants from countries burdened with a high prevalence of TB, poor socio-economic conditions, and the inadequacy of TB-control programmes.

The survey of diagnostic methods

An essential role is credited to measures oriented towards the enhancement of microbiological and image diagnostics – X-ray examinations – and TB prophylaxis in the form of clinics, guidelines for patient care – including therapeutic patterns – and the education of the public. Bearing in mind the considerable importance of microbiological diagnostics in the early detection of tuberculosis, this survey examines methods ranging from the simplest methods, as used already in the 1950s, when the prevalence of TB in Poland was at a much higher level, to the highly specialised, such as the molecular procedures applied nowadays.

Bacterioscopy

Microscopic examination has been and continues to be the first stage in the microbiological diagnostics of TB. This examination is not only simple to perform but also inexpensive and gives instant results – available in several hours or so (Augustynowicz-Kopeć 2010). However, already in the 1960s, inadequate sensitivity of this method was pointed out (samples have to contain several thousand mycobacteria to give positive results). It was also observed that bacterioscopy allowed the detection of not only causative agents in tuberculosis development, but also those that had been remaining in old, inactive foci and were released by a nonspecific disease process. With the aid of a microscope it is also possible to confirm the infection with omnipresent, acid-fast saprophytes (Buraczewska 1964). Microscopic slides can be produced using direct or indirect methods. The former procedure is more frequent and consists of selecting suitable material samples and smearing them between two pieces of glass or a smear loop. Having been dried and fixed, microscope slides are stained using the Ziehl-Neelsen staining method (Andrzejczuk 1974).

The present-day microscopic examination of sputum is no different from the one commonly employed over 50 years ago. The Ziehl-Neelsen stain continues to be applied in laboratories investigating mycobacteria, frequently following fluorescent staining. Popular stains and dyes include rhodamine, auramine and acridine orange. Next, the slide is examined under a fluorescence microscope, thus facilitating a quick overview of multiple high-power fields, since it is examined under a magnification of 40x (Thibert 1993).

Mycobacterium tuberculosis cultures

Growing bacterial cultures allows a higher detection rate in respect of *M. tuberculosis* in samples obtained from the patient (it is credited with a higher number of positive results). Any material that can be reasonably suspected of having been infected with the mycobacteria should be tested by growing cultures. This method either confirms negative bacterioscopy or isolates the strain, which, apart from being sputum-positive, serves the purpose of further examination.

The most common growth medium used for isolating TB mycobacteria, has for many years been the Löwenstein-Jensen medium. The usual composition of the medium is: mineral salt solution, asparagine, potato starch, glycerol, eggs, and malachite green. Due to the presence of asparagine, growth is ensured even with a small volume of mycobacteria. Malachite green, on the other hand, helps to reduce the nonspecific flora contamination ratio (Andrzejczuk 1974).

Cultures are kept under observation for 2 to 6 weeks, or much longer, depending on their growth ratio and pigment production capacity. The majority of TB strains grow within 4 to 6 weeks (Pendzich 2011). The strains of tuberculosis grow on the base in the form of irregular clumps, sometimes rounded, creased and with a depression in the centre. The standard colour of the culture is yellow-cream and its consistency is hard, with a waxy coating. Cultures typical of *M. tuberculosis* form copious colonies, consisting of a well-developed, rough mass. The growth typical of *M. bovis* is modest, with small, flat and smooth colonies (Andrzejczuk 1974). Another method, commonly used in the 1960s to test samples against mycobacteria, was petri-dishes culture. It was first introduced by Pryce. The advantage of this method lies in its ability to produce results in a matter of days. However, due to the risk of infecting lab technicians, frequent contaminations, significant work load, and only partial correspondence with the results obtained on the basis of a macro-culture, this method was only used infrequently (Buraczewska 1964).

Biological trials

Before isoniazid was applied to treating practice, some researchers considered biological trials to constitute the best method for TB diagnosis. Most often it was used on guinea pigs, which are prone to TB and die after even a limited exposure. The appearance of strains resistant to isoniazid in specimens obtained from patients reduced the diagnostic value of biological trials. It resulted from the fact that strains resistant to isoniazid exhibited reduced virulence in guinea pigs. In the 1960s, biological trials were recommended for oligobacilleous material with minimum lesions to confirm treatment or determine the pathogenicity of the strain. Biological trials involved the infection of two TB-negative guinea pigs with a diagnostic material sample. Five to six weeks after the injection, the intradermal Mantoux test was used. One pig was put down after six weeks, while the other after three months, as some strains induced tubercular lesions relatively late. The presence of TB mycobacteria in the tested specimen was further confirmed by the detection of tuberculosis foci in body organs and finding acid-fast mycobacteria in slides prepared on the basis of those organs. In the case of indeterminate results, the isolated acid-fast mycobacteria were subjected to inoculation. The 1960s mark the beginning of using mice in studies investigating the pathogenicity of acid-fast mycobacteria. It was connected with the discovery that nontuberculous mycobacteria (NTM), which can cause TB in humans, may not be pathogenic for guinea pigs but are pathogenic for mice.

Biological trials aimed at differentiating mycobacteria type

Since morphological examination of the culture was not decisive in differentiating between human, avian, and bovine strains of tuberculosis, biological trials have also been used to determine the type of mycobacteria. Human strains responding to isoniazid and bovine strains in guinea pigs caused tuberculosis and were fatal for the animals. In order to distinguish between human and bovine strains, sample material was injected into a rabbit. Bovine strains resulted in a number of lesions in multiple organs and the rabbit was dead within a few months. With human strains, however, the symptoms would subside (lesions could be absent during post-mortem examinations three months afterwards). When the strains were suspected to have an avian origin, the infected material was injected into a chicken. The produced outcome was generalised tuberculosis with a fatal course (Krakówka 1988, Buraczewska 1964).

The above diagnostic methods were too non-specific and time-consuming. They also carried the risk of spreading mycobacteria in the immediate environment, possibly infecting the diagnostic personnel, particularly during biological trials which involved the infection of lab animals.

Modern TB-diagnostics methods

Fast and automatic strain culture systems

Considerable progress in culture growing came with the appearance of liquid media. Although these methods were used globally as far back as in the late 1970s, they reached Poland much later, due to its economic situation (Mitchison 2005). New, automated culture-growing systems include Bactec 460, MB/BacT and MGIT. For the detection of mycobacteria, these systems employ colourimetry-, fluorimetry- or radiometry-based techniques. Regardless of the system employed, the specimen from the patient is liquefied, decontaminated via incubation with a 0.5% solution of N-acetylcysteine in 2% NaOH and condensed. Then, a certain volume of the material is injected through a cork to a hermetic vessel with a suitable medium. Oxygen metabolism in mycobacteria produces CO₂ during their growth. The concentration of CO₂ or the reduction in oxygen volume are used to determine the growth ratio. The major advantage of the above-mentioned methods is the fact that the growth of the bacteria can be observed as early as in weeks 1-3. (Grubek-Jaworska 2000, Kwiatkowska 2008).

The method that has found most widespread application in Poland is the radiometry-based method employed in the Bactec 460 system. It uses the Middlebrook 7H12 liquid medium. This medium contains palmitic acid, which is labelled with radiocarbon (¹⁴C). Additionally, the medium comprises a set of antibiotics and an antimicrobial supplement, PANTA, (polymyxin, amphotericin, nalidixic acid, and trimethoprim) to inhibit the development of other microbes. Mycobacteria use palmitic acid in the medium, which causes the release of CO₂ labelled with radioactive coal. CO₂ accumulates in the upper area of the culture bottle. The first growth of the mycobacteria can appear as early as after 6 days from the culture establishment. The following 5 days are necessary to establish their drug-sensitiveness and conduct type testing. This method is particularly useful when the examined sample comprises oligobacilleous material or the sputum of patients with minor pulmonary lesions. This system is also capable of assessing mycobacteria growth in blood (Kwiatkowska 2008, Zwolska 2010).

Another fully-automated method is MB/BacT. It is a colourimetric technique employing the Middlebrook 7H9 medium. Mycobacteria produce carbon dioxide during their growth, which causes the sensor located at the bottom of the bottle to change from green to yellow. This, in turn, sets off a detection signal, transmitted in a continuous manner to the computer, which records the growth intensity. Mycobacteria can grow already after a week (Kwiatkowska 2008).

The MGIT 960 System is based on fluorimetry. The test tubes contain a marker that is sensitive to oxygen concentration in the medium, which corresponds to the aerobic metabolism in the bacteria. Oxygen levels are measured continuously and the measurement part forms an integral component of the incubation chamber (Williams-Bouyer 2000).

MB/BacT and MGIT 960 systems come out as serious challengers to the Bactec 460 instrument. This is due to the fact that their operation is cheaper and less harmful to the environment. Also, MGIT 960 has a reading feature that dispenses with the need to use an expensive specialist device (Grubek-Jaworska 2000).

The chromatographic technique

The high-performance liquid chromatography technique allows the determination of mycobacteria strain. It takes place by way of analysing mycolic acids, the constituting building materials for the mycobacterial cell wall. In the graphic representation produced via chromatography, individual peaks correspond to particular mycolic acids or their groups. The identification of the strain requires the comparison of the test results with the analysis of the mycolic acids in model strains. These assessments offer such precision and repeatability that regular diagnostics can take advantage of programmes which allow automatic identification of mycobacteria strains. This analysis does not require large volumes of mycobacteria – usually a colony only 3mm in diameter is enough (Grubek-Jaworska 2000).

The HPLC technique is simple, but it depends upon highly-specialist equipment, well-trained personnel and previously-cultured bacteria. It is principally the indispensability of highly-specialised equipment that makes this method rarely applied in laboratories around the world. Its sensitivity has been confirmed to be 98% and specificity 100%. Chromatography-based techniques combined with molecular methods are also deployed in evaluating the drug resistance of mycobacteria (Pendzich 2011, Thibert 1993).

Molecular biology techniques

The successful detection of mycobacterium tuberculosis with molecular methods has completely overturned the perception of microbiological potential in TB diagnostics. These techniques facilitate the rapid multiplication

of selected sequences in bacterial genome to achieve the amount requisite for hybridisation with a specific genetic probe. Modern procedures for diagnosing tuberculosis advise that in the case of bacterioscopically-positive material, molecular examination be performed with a probe conventionally used for *M. tuberculosis complex*. The test is completed within a day and makes it possible to distinguish between mycobacteria infection in the patient and environmental contamination (Augustynowicz-Kopeć 2010).

In recent years, many companies have started marketing closed systems for TB diagnostics. Most popular commercial tests include Mycobacterium Tuberculosis Direct (MTD) by Gen-Probe and ProbeTec by Becton Dickinson.

The primer for the MTD test by Gen-Probe comprises an RNA polymerase gene sequence. It merges with a specific rRNA sequence (from the 16S rRNA subunit) and forms a cDNA strand as a result of reverse transcriptase. The original rRNA strand is destroyed and, following the merging of the second primer with cDNA, the second DNA strand undergoes synthesis. In the next stage, RNA polymerase transcribes the DNA sequence onto multiple copies of rRNA, and each of these goes through the entire cycle again. The product is detected by chemiluminescence, following hybridisation with a properly-labelled probe. The MTD test can detect *M. tuberculosis complex*, *M. avium complex*, *M. avium sp.*, *M. gordonae*, *M. kansasii* and *M. intracellulare sp.* infections (Grubek-Jaworska 2000).

The Becton Dickinson ProbeTec system can detect IS 6110 insertion sequence in clinical trials. This sequence is *M. tuberculosis complex*-specific, with 1 to 20 per genome. The reaction course is based on amplification with concurrent detection of the amplified product via fluorescence. Moreover, the ProbeTec test is able to identify the three most widespread mycobacteria strains leading to lesions, i.e. *M. tuberculosis complex*, MAIC and *M. kansasii* (Augustynowicz-Kopeć 2004).

The major drawbacks of commercial tests are their high prices, coupled with the brand-name instruments requisite for material analysis. Another issue is the risk of clinical material contamination. Consequently, the individual stages in the procedure should take place in separate rooms.

Currently, systems based on real-time PCR technology are taking the lead. One of the most advanced products to employ this technology is the Xpert MTB/RIF system. It allows five probes to be used simultaneously in the amplification of the *rpoB* gene segment. This facilitates the identification of *M. tuberculosis*, while also detecting the majority of rifampicin-resistant strains. The *rpoB* gene is ranked among the highly-conservative genes and encodes the β subunit of bacterial RNA polymerase. In sensitive strains this enzyme is deactivated through rifampicin. Mutation in the *rpoB* region, in turn, does not trigger the loss of polymerase activity, but makes this enzyme insusceptible to rifampicin. The Xpert MTB/RIF system is fully automated. All processes forming the PCR are integrated under one element, which contains several reaction chambers. Technological solutions employed in this system reduce the possibility of contamination to the minimum while also eliminating false-positive results. Protection against false-negative results, on the other hand, comes down to monitoring the activity of polymerase and controlling the mycobacteria disintegration levels (Safinowska 2012).

Methodologies employed in the 1960s could detect *Mycobacterium tuberculosis* and determine its drug-sensitiveness within c.a. three months. The state-of-the-art techniques applied nowadays have reduced the waiting time to approx. three weeks, or even one day in the case of molecular methods (Zwolska 2010). Nevertheless, the market has yet failed to provide a straightforward and quick, but inexpensive diagnostic test (Wallis 2010). Specialist laboratories are frequently equipped with a wide range of standardised culture and molecular methods, which allows them to tailor the diagnostic process to suit the specific diagnostic patterns relevant to the current clinical conditions.

References:

1. Andrzejczuk B. (1974), *Mikrobiologiczne metody diagnostyki laboratoryjnej stosowane w ośrodkach prze-ciwgruźliczych*. IGIChP, Warszawa.
2. Augustynowicz-Kopeć E., Jaworski A., Zabost A., Janus K., Klatt M., Zwolska Z. (2004), *Ocena wartości nowego systemu genetycznego do diagnozowania gruźlicy*. ProbeTec. Pneumonol.Alergol.Pol,72: s. 250-270.
3. Augustynowicz-Kopeć E., Zwolska Z. (2010), *Postępy w diagnostyce i epidemiologii molekularnej Mycobacterium Tuberculosis*. Post Mikrobiol. 49: 151-156.
4. Buraczewska M. Jaroszewicz W. (1964), *Diagnostyka mikrobiologiczna*. Gruźlica. PZWL, Warszawa: 32-49.
5. Gadre DV., Mahajan M., Singh NR., Agarwal DS., Talwar V. (1995), *Niacin Test for Mycobacteria: A comparative study of two methods*. Ind.J.Tub. 42,225.
6. Krakówka P., Rowińska-Zakrzewska E. (1988), *Gruźlica*. PZWL, Warszawa: 23-30.
7. Kwiatkowska S. (2008), *Diagnostyka gruźlicy*. Alergia.3: 9-12.
8. Mitchison DA. (2005), *The diagnosis and therapy of tuberculosis during the past 100 years*. Am J Respir Crit Care Med. 71: 699-706.
9. Pendzich J., Maksymowicz-Mazur W., Kozielski J. (2011), *Postępy we współczesnej diagnostyce laboratoryjnej gruźlicy*. Diagn Lab 47.
10. Safinowska A., Walkiewicz R., Nejman-Gryz P., Grubek-Jaworska H. (2012), *Zastosowanie wybranych komercyjnych testów molekularnych w mikrobiologicznej diagnostyce gruźlicy*. Pneumon Alergol Pol.80.1:6-12.

11. Thibert L., Lapierre S. (1993), *Routine application of high-performance liquid chromatography for identification of Mycobacteria*. J Clin Microbiol. 31:1759-1763.
12. Wallis RS., Pai M., Menzies D., Doherty TM., Walzl G., Perkinst MD., Zumlat A. (2010), *Tuberculosis 4. Biomarkers and diagnostics for tuberculosis: progress, needs, and translation into practice*. Lancet.375:1920-37.
13. Williams-Bouyer N., Yorke R., Lee HI., Woods GL. (2000), *Comparison of the BACTEC MGIT 960 and ESP culture system II for growth and detection of mycobacteria*. J Clin Microbiol. 38: 4167-4170.
14. Zwolska Z., Augustynowicz-Kopeć E. (2010), *Wybrane zagadnienia mikrobiologicznej diagnostyki gruźlicy*. Ziółkowski J, Gruźlica dziecięca. Borgis, Warszawa.