

Marta Boruń, Irena Pawłowska,
Zofia Zwolska, Adam Jaworski

1. Wstęp. 2. Mikrobiologiczne metody diagnozowania gruźlicy. 3. Nowe metody hodowli *Mycobacterium tuberculosis* complex. 4. Immunodiagnostyka gruźlicy. 5. Techniki chromatograficzne w identyfikacji *M. tuberculosis* complex. 6. PCR w diagnostyce gruźlicy. 7. Testy komercyjne w diagnostyce gruźlicy. 8. Diagnostyka gruźlicy w oparciu o LCR, SDA i Q β replikazę. 9. Podsumowanie

Novel methods for diagnosis of tuberculosis

Abstract: Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by bacterial species belonging to *Mycobacterium tuberculosis* complex: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* and *M. microti*. *M. tuberculosis* is the most important member of the genus in terms of clinical importance. Data of World Health Organisation (WHO) show that one-third of world population is latently infected with *M. tuberculosis*. Early detection of infection with *M. tuberculosis* is of major importance in the control of tuberculosis. An absolute bacteriological diagnosis of TB continues to rely on the microscopic examination of acid-fast bacilli in patient's specimens, isolation of *M. tuberculosis* and its subsequent identification by phenotypic and biochemical testing. Serological techniques may be useful in some clinical situations, but both the sensitivity and specificity of these tests are unsatisfying. Great progress has been made in reducing the time required to detect growth of *Mycobacterium* by measuring the radioactivity of carbon dioxide, produced as a result of utilisation of ¹⁴C labelled growth substrate by *Mycobacterium* in a highly selective growth medium (BACTEC system). The polymerase chain reaction (PCR) is an *in vitro* method for the specific amplification of target nucleic acid sequences through repeated cycles of thermal denaturation, oligonucleotide primer annealing and primer extension by a thermostable DNA polymerase. Reports of studies based on the amplification of many sequences for the successful identification of *M. tuberculosis* complex (e.g. 65 kDa, *mtp40*, SOD genes, and IS6110 insertion sequence) have been published. PCR and similar amplification strategies (transcription-mediated amplification, ligase chain reaction, Q β replicase and strand displacement amplification) are expected to have a significant impact on infectious disease diagnosis especially for infections involving agents that are difficult, slow-growing or impossible to culture *in vitro*.

1. Introduction. 2. Microbiological methods for diagnosis of tuberculosis. 3. New methods of cultivation of *Mycobacterium tuberculosis* complex. 4. Immunodiagnosis of tuberculosis. 5. Chromatographic techniques for identification of *M. tuberculosis* complex. 6. PCR in diagnosis of tuberculosis. 7. Commercial test in diagnosis of tuberculosis. 8. LCR-, SDA-, Q β replicase- based diagnosis of tuberculosis. 9. Summary

1. Wstęp

Rodzaj *Mycobacterium* podzielony jest na dwie grupy prątków: wolno- i szybko rosnących. Wśród nich znajdują się prątki chorobotwórcze dla człowieka i zwierząt, a także gatunki saprofityczne. Wiele prątków znanych do niedawna jako saprofityczne ma zdolność do wywoływania zakażenia u osób z obniżoną

odpornością lub upośledzonym układem immunologicznym (infekcja HIV) - takie drobnoustroje określa się mianem oportunistycznych [26]. Obecnie wyróżnia się prątki odpowiedzialne za klasyczną postać gruźlicy - *Mycobacterium tuberculosis* complex oraz prątki atypowe będące przyczyną zakażeń o różnej lokalizacji określanych mianem mykobakterioz [49]. Prątkami atypowymi (MOTT - *Mycobacterium* Other Than Tuberculosis) są gatunki, które rzadko i w szczególnych sytuacjach bywają chorobotwórcze, oraz saprofity występujące powszechnie w otoczeniu człowieka. Ich naturalnym rezerwuarem jest gleba i woda, skąd mogą zakażać ludzi, zwłaszcza o osłabionym układzie odpornościowym. Do najczęściej izolowanych prątków nie gruźliczych, chorobotwórczych dla człowieka należą: *Mycobacterium avium-intracellulare* complex, *M. xenopi*, *M. kansasii* [26].

Najważniejszym przedstawicielem rodzaju *Mycobacterium* jest, odkryty w 1882 roku przez Roberta Kocha, prątek gruźlicy - *Mycobacterium tuberculosis*. Należy on do grupy *M. tuberculosis* complex obejmującej ponadto: *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG i *M. microti* [88]. Poszczególne gatunki należące do *M. tuberculosis* complex, za wyjątkiem *M. bovis* BCG, wykazują różną chorobotwórczość w stosunku do człowieka i zwierząt [26].

Szczególną grupę stanowią zakażenia mykobakteryjne występujące u nosicieli wirusa HIV [9, 29, 35, 55]. Mykobakteriozy związane z prątkami atypowymi, głównie z grupy *M. avium-intracellulare* complex i gruźlica poza płucna stanowią kryteria diagnostyczne w czwartej fazie klinicznej AIDS [49]. Przypadki gruźlicy wywołanej przez prątki atypowe wolno- i szybko rosnące (*M. fortuitum*, *M. flavescens*, *M. goodii*) stanowią obecnie także poważny problem kliniczny spowodowany przede wszystkim naturalną opornością tych drobnoustrojów na leki przeciwigruźlicze [26].

2. Mikrobiologiczne metody diagnozowania gruźlicy

Zakażenie prątkiem gruźlicy jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych zakażeń na świecie. Ocenia się, że w latach dziewięćdziesiątych spośród 5,2 mld ludności zamieszkującej kulę ziemską ok. 1,7 mld, to jest co najmniej 30% ogółu ludności, są osoby zakażone prątkami [13]. Według definicji Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) każdy rejestrowany przypadek gruźlicy musi być potwierdzony bakteriologicznie.

Wykazanie obecności prątków kwasoopornych w rozmazach mikroskopowych oraz wyhodowanie prątków na pożywkach to dwa najważniejsze elementy diagnostyki gruźlicy. Wczesne wykrycie i skuteczne leczenie chorych na gruźlicę, pozostaje ze względu na epidemiologiczne i społeczne znaczenie, najbardziej istotnym warunkiem powodzenia realizowanego w Polsce programu zwalczania tej choroby. Najważniejszym etapem programu walki z gruźlicą jest jak najwcześniejsze objęcie leczeniem chorych zakaźnych tj. grupy chorych, u których rozpoznanie potwierdzono wynikiem badania bakteriologicznego [13].

Pierwszy etap badań stanowi badanie mikroskopowe. Metoda polega na wizualnym stwierdzeniu obecności prątków w rozmazach wykonanych z materiału klinicznego barwionych i oglądanych w mikroskopie świetlnym lub fluorescencyjnym [13]. Najczęściej stosowaną techniką barwienia preparatów jest metoda Ziehla-Neelsena Z-N (alkoholowy roztwór fuksyny zasadowej), stosuje się również barwniki fluorochromowe (auramina, rodamina, oranż akrydyny) [13]. Prawidłowe badanie mikroskopowe powinno być wykonane najpierw w świetle fluorescencyjnym, jako badanie przesiewowe, a następnie potwierdzone w mikroskopie świetlnym w preparacie barwionym metodą Z-N [13].

Utrzymanie hodowli prątków na podłożach bakteriologicznych z pobranego materiału jest najbardziej pewnym i obiektywnym dowodem potwierdzającym proces chorobowy.

Podłożami najczęściej stosowanymi do hodowli prątków gruźlicy są pożywki jajowe, podłoże Löwensteina-Jensena (L-J) oraz Middlebrooka, Ogawy i Stonbrinka [26]. Z kolonii wyrosłych na pożywkach przygotowuje się preparaty barwione metodą Z-N i potwierdza obecność prątków kwasoopornych.

Kolejny etap diagnostyki stanowi badanie biochemiczne. Najważniejsze ze stosowanych obecnie testów to: redukcja tellurynu, wytwarzanie termostabilnej katalazy, niacyny, redukcja azotanów, hydroliza Tweenu 80 (po 7 i 14 dniach), wytwarzanie ureazy, a ponadto określanie wrażliwości na hydrochlorek hydroksylaminy (500 µg/ml), etambutol (5 µg/ml), kwas p-nitrosalicylowy (2 mg/ml) i p-nitro- α -acetylamino- β -hydroksypropiofenon (NAP) [26].

Czas oczekiwania na hodowlę na podłożu L-J czy agarze Middlebrooka trwa zazwyczaj od 2 do 6 tygodni, identyfikacja biochemiczna i określanie wzoru lekowrażliwości wymaga podobnego czasu inkubacji co oznacza, że pełna diagnostyka trwa ok. 10-12 tygodni [65, 80]. Konsekwencją tego może być opóźniony początek leczenia lub wręcz niewłaściwa terapia skierowana przeciwko *M. tuberculosis* prowadzona u pacjentów zakażonych atypowymi mykobakteriami, na które nie działają klasyczne leki przeciwigruźlicze.

3. Nowe metody hodowli *Mycobacterium*

Obecnie dostępne są systemy do hodowli *Mycobacterium tuberculosis* complex znacznie skracające czas oczekiwania na wzrost tych drobnoustrojów w porównaniu z metodami konwencjonalnymi.

Jednym z pierwszym takich systemów jest BACTEC 460Tb [16, 23, 48, 63, 81] w którym hodowlę prątków z materiałów klinicznych zakłada się w płynnej pożywce Middlebrooka 12B lub 13A zawierającej jako substrat wzrostowy kwas palmitynowy znakowany ^{14}C . W czasie wzrostu prątki zużywają radioaktywny substrat i wydają CO_2 zawierający ^{14}C . Radioaktywność mierzona jest w aparacie BACTEC w skali od 000 do 999. Przyrost ilości wydalanego, znakowanego $^{14}\text{CO}_2$ w czasie trwania wzrostu świadczy o namnażaniu się prątków i jest to tzw. indeks wzrostu [13]. Szczelnie zamknięte butelki hodowlane inkubowane są

w temp. 37°C i wstawiane do aparatu BACTEC dwa razy w tygodniu przez pierwsze 14 dni, a następnie raz w tygodniu [81].

Modyfikacją izotopowego systemu BACTEC 460Tb jest fluorescencyjny system BACTEC 9000MB [85, 93]. Butelki hodowlane stosowane w tym systemie posiadają zatopiony na dnie fluorescencyjny czujnik wrażliwy na stężenie tlenu. Ubytek tlenu podczas hodowli powoduje uruchomienie czujników fluorescencyjnych, a pomiar dokonywany jest automatycznie i zapisywany w komputerze. Hodowla prowadzona jest w płynnej pożywce Middlebrooka 7H9 dwóch rodzajów:

1 – MYCO/SPUTA – przeznaczony do hodowli prątków pochodzących z dróg oddechowych, zawierającej zestaw chemioterapeutyków hamujących wzrost towarzyszącej flory bakteryjnej;

2 – MYCO/F LYTIC – przeznaczony do hodowli prątków z krwi oraz innych materiałów nie wymagających procesu dekontaminacji [85, 93].

Średni czas wzrostu prątków w obu systemach wynosi ok. 10–12 dni, a pierwsze sygnały o namnażaniu się prątków można otrzymać już po 5 dniach. System BACTEC służy także do wykonywania testów wrażliwości prątków na leki oraz ich różnicowania na grupy: *M. tuberculosis* complex i MOTT [13, 81, 85].

Niezotopowym systemem wykorzystywanym do przyspieszonej hodowli prątków gruźlicy jest system Septi-Check AFB, w którym próbki hodowane są na dwóch pożywkach: płynnym zmodyfikowanym podłożu Middlebrooka 7H9 i stałym podłożu Middlebrooka 7H11 zawierającym dodatek jaj [13, 37]. System ten jest szczególnie przydatny do hodowli *M. tuberculosis* z materiałów skąpo-prątkowych [13, 37].

Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) zawiera podobnie jak BACTEC płynne podłoże do hodowli prątków z materiałów klinicznych oraz specjalnie przygotowany i dodany odczynnik fluorescencyjny, który reaguje na stężenie tlenu w pożywce. W czasie namnażania prątków maleje stężenie tlenu wyzwalając reakcję fluorescencyjną, widoczną w świetle UV. Reakcja świetlna, świadcząca o wzroście prątków w podłożu może być widoczna już po 5–6 dniach od założenia hodowli [16, 37]. System MGIT może być także wykorzystywany do hodowli prątków z krwi oraz określenia lekowrażliwości prątków [16]. W handlu dostępna jest także odmiana systemu MGIT, która przystosowana jest do hodowli prątków należących do *M. avium-intracellulare* complex [16].

Właściwości redukcyjne prątków kwasoopornych są wykorzystywane w systemie MB Redox złożonym ze zmodyfikowanej, wzbogaconej surowicą i witaminami pożywki Kirchnera z dodatkami czterech antybiotyków (PACT), które eliminują wzrost towarzyszącej flory bakteryjnej. Zasadą testu jest redukcja soli tetrazolowych, obecnych w podłożu, a zmiana jego barwy jest podstawą oznaczeń jakościowych i ilościowych [92].

Do hodowli *M. tuberculosis* complex dostępne są ponadto dwa w pełni zautomatyzowane układy hodowlane: ESP Culture System II i MB/Bact [63, 75, 81, 90, 94].

Technologia ESP Culture System II oparta jest na ciągłej obserwacji zmian ciśnienia spowodowanych wykorzystywaniem lub produkcją gazu co jest przejawem aktywności metabolicznej drobnoustrojów. Metabolizm prątków z rodzaju

Mycobacterium charakteryzuje się wykorzystaniem tlenu (metabolizm tlenowy), co umożliwia wykrycie tych drobnoustrojów dzięki redukcji ciśnienia w szczelnie zamkniętych butelkach hodowlanych. Butelki hodowlane w systemie ESP zawierają płynne podłoże Middlebrooka 7H9 wzbogacone OADC (kwas oleinowy, albumina, dekstroza, katalaza), dodatkami czynników wzrostowych (MycogS) oraz antybiotyków (Mycos PVNA – polimiksyna B, wankomycyna, kwas nalidyskowy, amfoterycyna B), które hamują wzrost towarzyszącej flory bakteryjnej [81, 85].

System MB/Bact [63, 94] jest systemem kolorymetrycznym, w którym butelki hodowlane zawierają zmodyfikowane płynne podłoże Middlebrooka 7H9 z dodatkami antybiotyków (amfoterycyna B, azocylicyna, kwas nalidyskowy, polimiksyna B, trimetoprim). Wskaźnik kolorymetryczny zmienia barwę pożywki z zielonej na żółtą w miarę wzrostu drobnoustrojów w podłożu i zwiększania stężenia CO₂. Pomiar wskaźnika wzrostu dokonywany jest automatycznie przy pomocy sprzężonego z układem komputera. System ten może także być wykorzystywany do określenia wzoru lekkooporności prątków, a średni czas wzrostu *M. tuberculosis* complex wynosi ok. 11 dni [13].

4. Immunodiagnostyka gruźlicy

Metody serologiczne takie jak: aglutynacja lateksu opłaszczanego antygenem specyficznym dla *Mycobacterium*, metoda radioimmunologiczna (RIA) czy immunoenzymatyczna (ELISA) są rzadko stosowane w laboratoriach diagnostycznych ze względu na zbyt małą czułość i specyficzność [13]. Obecnie dostępne są dwa komercyjne testy oparte na metodzie immunoenzymatycznej: Pathozymne TB complex [13] służący do wykrywania przeciwciał IgG skierowanych przeciwko antygenowi 38 kDa (charakterystyczny dla grupy *M. tuberculosis* complex) oraz Immunozytm[®] *Mycobacterium* wykrywający przeciwciała przeciwko antygenowi A60 (charakterystyczny dla całego rodzaju *Mycobacterium*) [13].

Czułość tych testów wynosi 31–69% w zależności od fazy choroby. Najlepsze wyniki uzyskiwano w obu testach w przypadku przewlekłej, potwierdzonej bakteriologicznie gruźlicy. Niska czułość testów można wytłumaczyć faktem, iż odpowiedź immunologiczna w gruźlicy jest klasycznym przykładem odpowiedzi komórkowej, w której udział i znaczenie odpowiedzi humoralnej (produkcja przeciwciał) nie jest do końca poznany [13].

5. Techniki chromatograficzne w identyfikacji *M. tuberculosis* complex

Różny skład ilościowy i jakościowy kwasów mykolinowych stanowi podstawę do różnicowania gatunków a nawet podgatunków prątków w różnych technikach chromatograficznych: cienkowarstwowej [26, 65] oraz wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC) [26, 76]. Dla większości gatunków z rodzaju *Mycobacterium*, zwłaszcza o istotnym znaczeniu w patogenie gruźlicy scharakteryzowano i opisano wzory chromatograficzne kwasów mykolinowych co pozwala na

identyfikację tych drobnoustrojów. Techniki chromatograficzne wymagają użycia do analizy 10^6 – 10^8 komórek bakterii, oznacza to konieczność wcześniejszego wyhodowania szczepu [65, 76]. Ponadto w przypadku HPLC konieczne jest przestrzeganie ściśle wystandardyzowanych warunków reakcji, a to ogranicza stosowanie tej metody do dużych, bardzo dobrze wyposażonych referencyjnych laboratoriów. Czulość metod chromatograficznych wynosi ok. 98% (HPLC), przy specyficzności metody ocenianej na 100% [76].

Szybką metodą identyfikacji prątków są także wprowadzone od 1987 roku sondy DNA [65]. Mechanizm działania sond został opisany w naszym wcześniejszym artykule przeglądowym [65].

6. PCR w diagnostyce *Mycobacterium tuberculosis complex*

Nadrzędnym elementem kontroli gruźlicy jest szybkie i specyficzne wykrycie prątków w badanym materiale klinicznym pobranym od chorego. Konwencjonalne metody diagnostyczne są pracochodne i przed wszystkim czasochłonne (wymagają 4–6 tygodni) [65, 80].

Światowa tendencja systematycznego wzrostu zachorowań na gruźlicę, obserwowana od połowy lat osiemdziesiątych, zmusza do poszukiwania coraz doskonalszych, szybkich i pewnych metod wykrywania czynnika etiologicznego tej choroby. Potrzebę tę potęguje rosnąca liczba przypadków współistnienia gruźlicy i zakażenia wirusem HIV. Bardzo dobrym uzupełnieniem, a często konieczną alternatywą dla tradycyjnych metod jest wykorzystanie w diagnostyce gruźlicy reakcji amplifikacji DNA *in vitro* (PCR – Polymerase Chain Reaction).

Niewielkie ilości DNA prątków mogą służyć w tej metodzie jako matryca do reakcji amplifikacji z wykorzystaniem odpowiednich oligonukleotydowych sekwencji starterowych (primer's) do selektywnego powielenia wybranego fragmentu chromosomu. Proces amplifikacji przeprowadza się cyklicznie obniżając i podwyższając temperaturę reakcji, co umożliwia dobudowywanie nowych fragmentów na matrycy nici DNA rozdzielonej w czasie termicznej denaturacji dupleksu DNA. W standardowych warunkach stosuje się 30–40 cykli, co umożliwia zwielokrotnienie materiału ok. 10^9 razy. Niewątpliwą zaletą metod diagnostycznych wykorzystujących reakcję PCR jest to, że badanie można wykonać w ciągu kilku godzin od pobrania materiału, a czulość metody pozwala na wykrycie jednej lub kilku komórek w badanej próbce [3, 15, 39, 56, 57]. Ponadto technika ta może służyć do wykrywania prątków gruźlicy bezpośrednio w materiałach klinicznych [17, 19, 41, 56, 57, 72, 78]. Należy odnotować jednak kilka problemów i ograniczeń jakie niesie ze sobą ta metoda:

– możliwość uzyskania fałszywie dodatnich wyników spowodowana zanieczyszczeniem badanej próby. Aby tego uniknąć konieczna jest chemiczna modyfikacja zamplifikowanego DNA w celu zapobieżenia jego powielaniu w kolejnych rundach amplifikacji (zastąpienie dTTP-dUTP oraz działanie glikozyazy uracylowej – UDG) [45].

– możliwość otrzymania fałszywie ujemnych wyników spowodowana obecnością inhibitorów reakcji PCR. Naturalnymi inhibitorami polimerazy DNA są dla przykładu hemoglobina, białko, heparyna, SDS [40]. Dlatego duże znaczenie w diagnostyce opartej na reakcji PCR ma wstępne przygotowanie materiału do badań oraz izolacja DNA prątków [7, 41].

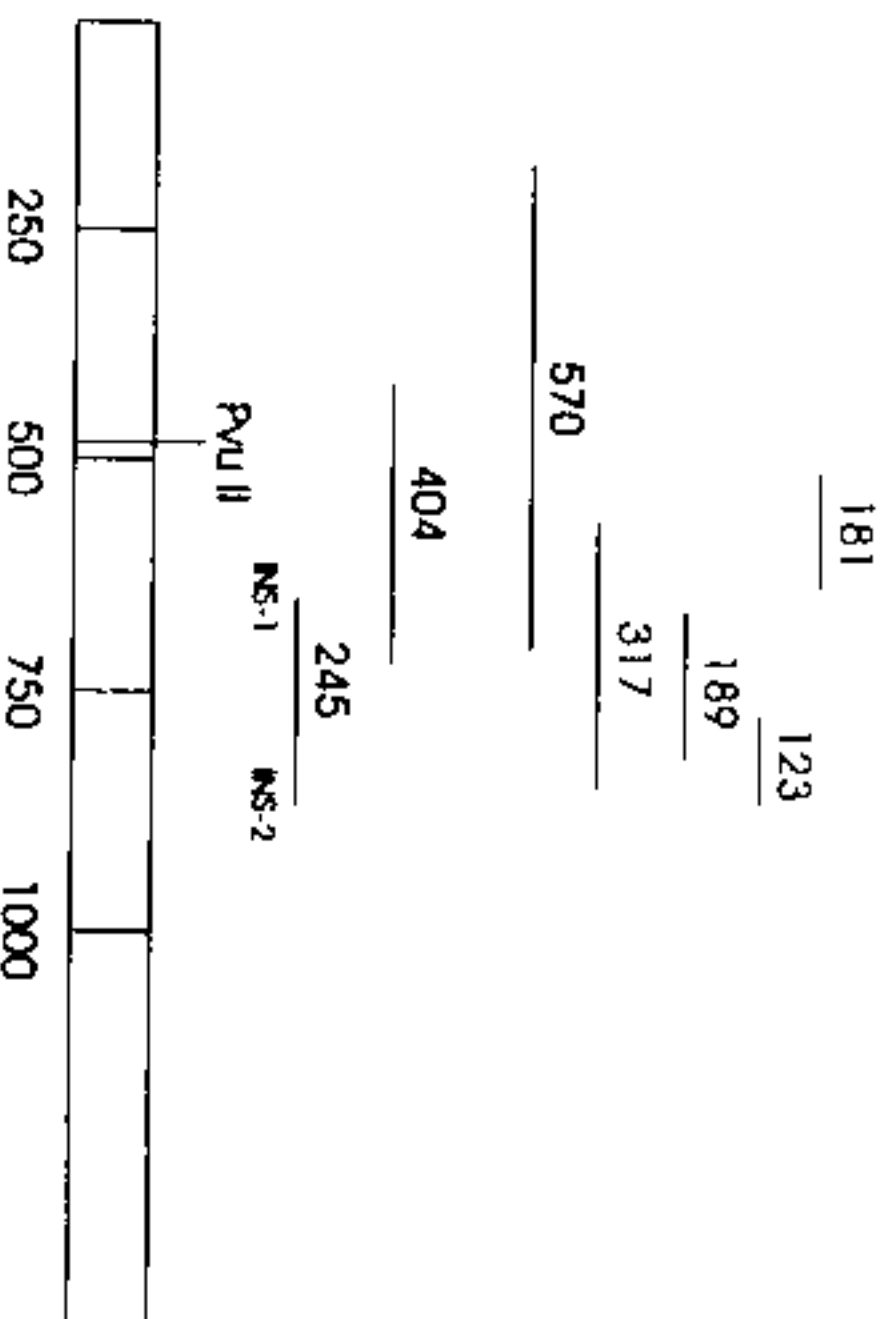
– niedogodnością reakcji PCR jest również fakt wykrywania produktów amplifikacji DNA pochodzących zarówno z żywych jak i martwych komórek [47].

Pomimo tych ograniczeń technika amplifikacji DNA *in vitro* otwiera nowe możliwości przed diagnostyką chorób bakteryjnych, zwłaszcza w przypadku patogenów trudnych do hodowli lub wolno rosnących.

Zastosowanie reakcji PCR do wykrywania *M. tuberculosis complex* w dużym stopniu zależy od wyboru właściwej sekwencji docelowej ulegającej powielaniu, która powinna być charakterystyczna i unikalna dla genomu tej grupy drobnoustrojów.

W diagnostyce gruźlicy opartej na reakcji amplifikacji DNA wykorzystywano jako sekwencje docelowe fragmenty następujących genów: *hsp60* – genu kodującego białko szoku termicznego o masie cząsteczkowej 65 kDa [26, 73], które jest charakterystyczne dla całego rodzaju *Mycobacterium, dnaJ* [1], fragment genu kodującego białko antygenowe o masie cząsteczkowej 38 kDa, (antygen b – Pab) [1, 14], genu dysmutazy nadlenkowej (SOD) [26], genu kodującego białko MPB 64 [1]. Zmodyfikowane produkty będące fragmentami ww. genów były w opisanych układach analizowane w żelach agarozowych, a potwierdzenie swoistości otrzymanych produktów uzyskiwano poprzez hybrydyzację typu „Southern” z sondą komplementarną do namnożonej sekwencji. Duże nadzieje wiązano z zastosowaniem jako matrycy w reakcji PCR genu *mip40* kodującego białko o masie cząsteczkowej 13,8 kDa [34, 89]. Obecność tego genu początkowo stwierdzono tylko w genomie *M. tuberculosis* [19] i wykorzystywano go także do odróżniania tego gatunku od *M. bovis*, w genomie którego brak było genu *mip40* [33]. Ostatnio wykryto jednak szczepy *M. tuberculosis*, których genom nie zawierał *mip40*, a ponadto zidentyfikowano ten gen w dwóch izolatach *M. bovis* [89]. Warto odnotowania jest fakt, że szczepy *M. tuberculosis* bez genu *mip40* są z reguły szczepami wielokopijnymi. Stąd wykorzystanie genu *mip40* jako matrycy do reakcji PCR może okazać się przydatne we wczesnej diagnostyce szczepów wielokopijnych [46].

Najczęściej wykorzystywaną sekwencją docelową, powielaną w reakcji PCR, do wykrywania *M. tuberculosis complex* jest sekwencja insercyjna IS6110. Sekwencja ta długości 1355 pz. została odkryta w genomie *M. tuberculosis* [32, 77], a następnie stwierdzono jej obecność także w genomach pozostałych gatunków *M. tuberculosis complex* [12, 31, 82, 91]. Element insercyjny IS6110 jest najlepiej dotychczas opisaną sekwencją insercyjną obecną w genomie prątków z grupy *M. tuberculosis complex*. Ponadto osiągnięto międzynarodowe porozumienie dotyczące zastosowania techniki RFLP, z użyciem sekwencji insercyjnej IS6110 jako sondy, do typowania szczepów *M. tuberculosis* w badaniach epidemiologicznych [82]. Sekwencja insercyjna IS6110 występuje w genomie prątków gruźlicy w 5–16 kopiach co znacznie zwiększa czulość reakcji amplifikacji.



Rys. 1. Lokalizacja fragmentów sekwencji IS6110 wykorzystywanych w diagnostyce *M. tuberculosis* complex w oparciu o reakcję PCR [wg 68]

W celu detekcji prątków gruźlicy bezpośrednio w materiałach klinicznych z wykorzystaniem reakcji PCR, zaproponowano szereg sekwencji starterowych amplifikujących fragmenty IS6110 o różnej długości (Rys. 1) [1, 22, 38, 40, 50, 58, 71].

Element insercyjny IS6110 wykorzystano także jako matrycę w tzw. „wewnętrznym” PCR (nested PCR) [14, 52]. W pierwszych cyklach takiej reakcji zachodzi amplifikacja długiego fragmentu DNA z udziałem starterów zewnętrznych. Następny etap to amplifikacja z udziałem starterów wewnętrznych, która prowadzi do powstania produktu o mniejszej długości [14, 52]. Metodą „nested” PCR wykrywano około 20 komórek prątków w materiałach klinicznych [14].

Szereg autorów wykorzystujących sekwencje IS6110 w połączeniu z reakcją PCR do detekcji prątków gruźlicy zwracalo uwagę na możliwość występowania fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych wyników [27, 38, 50]. Ostatnio stwierdzono obecność sekwencji homologicznych do IS6110 w genomach mykobakterii innych niż *M. tuberculosis* complex. Obecność takich sekwencji stwierdzono w genomach: *M. avium-intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. malmoense* i *M. xenopi* [38, 50] co może być przyczyną fałszywie dodatnich wyników. Ponadto użycie sekwencji IS6110 do celów diagnostycznych *M. tuberculosis* complex ograniczone jest występowaniem szczepów *M. tuberculosis*, w genie których nie występuje ta sekwencja [66]. Mimo tych ograniczeń sekwencja ta jest najczęściej stosowaną docelową sekwencją matrycową używaną w testach służących do szybkiego wykrycia prątków gruźlicy. Modyfikacje testów diagnostycznych opartych na amplifikacji elementu IS6110 zmierzają do zwiększenia czułości i specyficzności reakcji, tak aby wyeliminować możliwość uzyskania fałszywie dodatnich lub fałszywie ujemnych wyników np. opisana w dalszej części pracy reakcja „capture PCR”.

W większości badań wykorzystujących amplifikację DNA *in vitro*, reakcja PCR opierała się na amplifikacji fragmentu pojedynczego genu (*hsp60*, *mip40*, *SOD*) lub fragmentu sekwencji insercyjnej (IS6110, IS1081) [1, 20, 26, 38, 73, 85, 89]. Takie pojedyncze fragmenty genów, powielone w reakcji PCR, mogą dawać fałszywie ujemne wyniki spowodowane brakiem tego fragmentu DNA w niektórych izolatach *M. tuberculosis* (IS6110, *mip40*) [47, 89]. Dlatego też bardziej wiarygodne wyniki otrzymuje się wykorzystując jako matrycę więcej niż jeden gen lub fragment DNA. Taki rodzaj reakcji PCR, w którym amplifikacji ulega więcej niż jeden odcinek DNA nazwano „multiplexowy” (multiplex PCR) [19, 41, 54]. Podstawą powodzenia tej odmiany techniki PCR jest wybór odpowiednich fragmentów DNA, które mają ulec amplifikacji tak, aby powstałe produkty były różnej długości, co pozwala na ich łatwą analizę w żelach agarozowych. Istotne jest również, aby optymalna temperatura wydziania (annealing) była taka sama dla wszystkich wykorzystywanych par starterów. Multiplexowy PCR [54] zastosowano do wykrywania prątków gruźlicy bezpośrednio w materiałach klinicznych wykorzystując trzy pary sekwencji starterowych. W reakcji tej amplifikowano trzy fragmenty DNA:

- o długości 383 pz będący fragmentem genu *hsp60* obecnego w całym rodzaju *Mycobacterium*,
- o długości 240 pz będący fragmentem genu kodującego białko MPP64 występującego w genie *M. tuberculosis* complex i *M. fortuitum*,
- o długości 131 pz będący fragmentem genu kodującego białko 19kDa, które jest białkiem antygenowym charakterystycznym dla *M. tuberculosis* i *M. scrofulaceum*.

Amplifikacja opisanych wyżej sekwencji docelowych i powstanie trzech produktów reakcji świadczy o obecności w badanej próbce drobnoustrojów należących do *M. tuberculosis* complex [54].

Czułość reakcji amplifikacji DNA *in vitro* wykorzystywanej do wykrywania prątków gruźlicy bezpośrednio w materiałach klinicznych izolowanych od pacjentów jest limitowana poprzez:

- obecność zbyt dużej ilości całkowitego komórkowego DNA w badanej próbce. Niektóre materiały kliniczne (krew, popłuczyny oskrzelowe, biopsje) zawierają liczne komórki układu immunologicznego, które są źródłem dużej ilości DNA [47];
- obecność w materiałach klinicznych inhibitorów reakcji amplifikacji (np. hemoglobina) wpływających na wynik reakcji [47]. Otrzymanie optymalnie czystego DNA z prątków kwasoopornych jest procesem trudnym i skomplikowanym [7, 14, 33], szczególnie dla rutynowych laboratoriów klinicznych analizujących duże ilości materiałów klinicznych.

W celu rozwiązania tych problemów opracowano metodę pozwalającą na specyficzne „wychwycenie” DNA prątków gruźlicy – reakcja pułapkowania DNA („capture” PCR). W metodzie tej zastosowano dodatkowo biotynylowaną sondę komplementarną do fragmentu chromosomalnego DNA *M. tuberculosis* oraz perleki opłaszczone streptawidyną. Pozwala to na otrzymanie i powielanie

w reakcji PCR DNA prątków pozbawionego zanieczyszczeń, potencjalnych inhibitorów reakcji oraz obcego DNA [47]. W metodzie „capture” PCR wykorzystano wymiennie dwie pary sekwencji starterowych amplifikujące odpowiednio fragment sekwencji insercyjnej IS6110 i regiony DR (direct repeat) [47]. Proste powtórzenia (DR) to 36-nukleotydowe odcinki DNA oddzielone nie powtarzającymi się sekwencjami o długości 35–41 pz. Liczba sekwencji DR wynosi 10–50 w różnych szczepach *M. tuberculosis* complex. W metodzie „capture” PCR sekwencje DR wykorzystywano jako matrycę do reakcji amplifikacji w przypadku szczepów *M. tuberculosis* pozabawionych sekwencji IS6110 [47]. Czulość metody oceniono na jeden genom prątka wykrywany w badanym materiale klinicznym (ok. 5fg DNA) [47].

W ostatnich latach zaproponowano także technikę wykrywania prątków gruźlicy będącą połączeniem reakcji PCR, reakcji hybrydyzacji oraz testu immunoenzymatycznego (ELISA) [18, 59]. Technikę tę autorzy nazwali PCR ELISA [59] albo PCR-OSCPH – oligonucleotide-specific capture plate hybridization [18]. Sekwencją docelową ulegającą amplifikacji w reakcji PCR był w obu przypadkach fragment genu kodującego 16S rRNA, a powstający w reakcji amplifikacji produkt znakowany był biotyną [18] lub fluoresceiną [59]. Gen kodujący 16S rRNA jest obecny w genomie wszystkich przedstawicieli rodzaju *Mycobacterium*, a jego sekwencja nukleotydowa z wyjątkiem regionu zmiennego, gatunkowo-specyficznego, jest wysoce konserwatywna [65]. Dlatego też specyficznosc powstającego w reakcji amplifikacji produktu należało w obu przypadkach potwierdzić hybrydyzacyjnie. Sondą stosowaną w reakcji hybrydyzacji był znakowany biotyną oligonukleotyd (capture probe) komplementarny do regionu zmiennego, gatunkowo-specyficznego w obrębie 16S rRNA. Reakcję hybrydyzacji prowadzono w opłaszczonych streptawidyną studzienkach płytki ELISA, a detekcję znakowanego produktu przeprowadzano stosując barwną reakcję immunoenzymatyczną, której intensywność mierzono spektrofotometrycznie. Czulość opisanych metod pozwalała na wykrycie 10–20 fg DNA co odpowiada ok. 2–4 kopiom genomu prątków gruźlicy.

Pomimo wielu badań, jak dotąd, nie udało się znaleźć pojedynczej sekwencji docelowej, której amplifikacja dawałaby 100% czulość detekcji *M. tuberculosis* complex bez ryzyka otrzymania fałszywie dodatnich wyników.

Obecnie w literaturze pojawiła się propozycja wykorzystania nowej sekwencji do czulogo i specyficznego wykrywania grupy *M. tuberculosis* complex [46] w oparciu o reakcję PCR.

Metoda ta oparta jest na amplifikacji regionu IR (intergenic region) oddzielającego geny kodujące dwuskładnikowy układ SenX3-RegX3 [46, 74]. Region ten zbudowany jest z nowego typu sekwencji repetytywnych nazwanych MIRUs czyli mykobakteryjne rozproszone powtarzające się jednostki (mycobacterial interspaced repetitive units) [46, 74]. Liczbę MIRUs oceniono na ok. 40–50 w genomie *M. tuberculosis*.

Przebadano 116 szczepów *M. tuberculosis* charakteryzujących się odmiennym wzorem IS6110 RFLP, 2 szczepy *M. africanum*, 3 szczepy *M. bovis*, (w tym

2 szczepy *M. bovis* BCG), 1 szczep *M. microti*, 11 gatunków atypowych mykobakterii, szczepy *Streptomyces* sp., *E. coli*, oraz *B. pertussis*. Kolekcja szczepów *M. tuberculosis* zawierała także szczepy w genomie których brak było IS6110 oraz sekwencji *mfp40*, to jest dwóch elementów wykorzystywanych wcześniej w diagnostyce gruźlicy. Autorzy podają, że produkt amplifikacji ze specyficznymi sekwencjami starterowymi pojawił się tylko w przypadku szczepów *M. tuberculosis* complex, co daje 100% specyficznosc reakcji. Specyficznosc tą potwierdzono także hybrydyzacyjnie wykorzystując jako sondę fragment regionu SenX3-RegX3 uzyskując pozytywny wynik (prążek hybrydyzacyjny) tylko w przypadku DNA szczepów *M. tuberculosis* complex [46].

W efekcie procesu amplifikacji regionów IR powstawały produkty o długościach odpowiednio:

- 276 pz dla szczepów *M. bovis* BCG,
- 406 pz dla szczepów *M. bovis*,
- 329 pz dla szczepów *M. tuberculosis* i *M. africanum*,
- 560 pz dla *M. microti* oraz 2 szczepów *M. tuberculosis* nie zawierających w genomie IS6110 [79].

Wielkość powstatego produktu odzwierciedla liczbę kopii MIRUs w regionie SenX3-RegX3 IR. Dodatkową zaletą tej metody wykorzystującej powielanie regionów IR jest to, że pozwala na różnicowanie gatunków w obrębie *M. tuberculosis* complex.

6. Testy komercyjne w diagnostyce gruźlicy

Rozwój metod i technik biologii molekularnej obserwowany w ostatnich latach, zwłaszcza w dziedzinie diagnostyki gruźlicy, zaowocował wprowadzeniem na rynek komercyjnych testów diagnostycznych do wykrywania *M. tuberculosis* complex.

Gotowy zestaw do wykrywania *M. tuberculosis* bezpośrednio w materiałach klinicznych produkowany przez firmę „Gen-Probe” nosi nazwę „Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test” – AMTDT [5, 24, 42, 51, 83, 84]. Mykobakteryjny rRNA ulega amplifikacji w reakcji TMA (transcription – mediated amplification). Detekcję zamplifikowanych sekwencji przeprowadza się przy użyciu sondy DNA znakowanej estrem akrydynowym, specyficznosci dla *M. tuberculosis*.

Dodatni wynik badania mikroskopowego, stwierdzający obecność w badanym materiale prątków kwasoopornych, w połączeniu z ujemnym wynikiem AMTDT może dać wskazówkę o infekcji wywołanej przez atypowe mykobakterie o wiele wcześniej niż wynik hodowli [5, 42]. Wadą AMTDT jest to, że test ten nie może być stosowany do monitorowania pacjenta w czasie leczenia ponieważ pobrany materiał może dać wynik dodatni nawet w przypadku ujemnego wyniku hodowli, ponieważ cząsteczki rRNA są chronione przez specyficzne białka nawet po śmierci komórki [24].

Drugim dostępnym komercyjnie testem opartym na reakcji amplifikacji kwasów nukleinowych jest Roche *Mycobacterium Tuberculosis AMPLICOR PCR Test* (AMPLICOR TB) [6, 11, 21, 28, 36, 61, 62]. Zasadą testu jest amplifikacja fragmentu genu kodującego 16S rRNA, a detekcja produktu następuje w wyniku reakcji immunoenzymatycznej. Wadą testu jest duże ryzyko kontaminacji oraz możliwość detekcji rRNA martwych prątków [10]. Ostatnio na rynku pojawiła się nowa, w pełni zautomatyzowana wersja testu TB AMPLICOR nazwana COBAS AMPLICOR MTB [21, 61, 62].

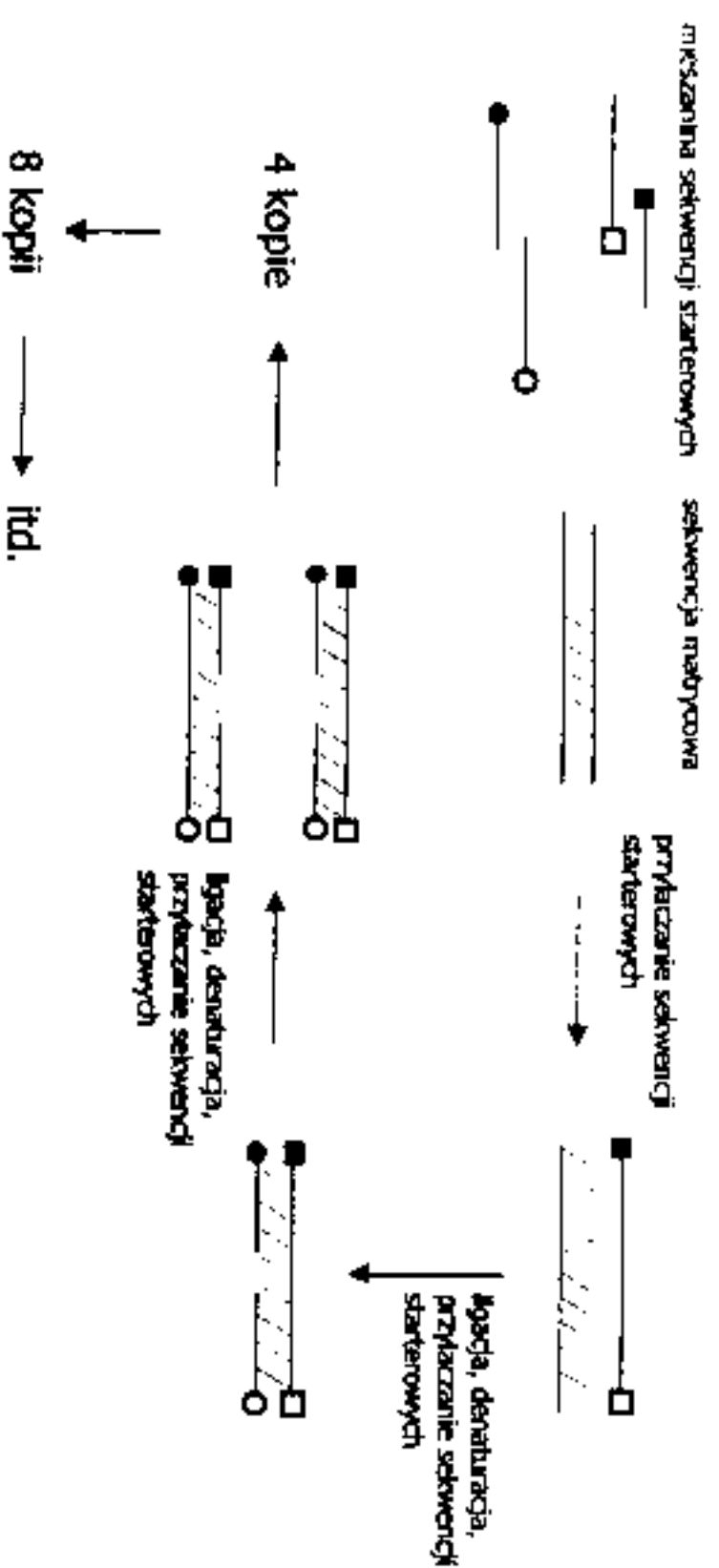
Użyteczność testów komercyjnych do szybkiej diagnostyki gruźlicy jest uzależniona od obrazu klinicznego choroby. W przypadku pacjenta nie zakażonego HIV, z historią choroby wskazującą na kontakt z prątkami gruźlicy, zmianami widocznymi na zdjęciu RTg oraz dodatnim wynikiem mikroskopii, nie ma konieczności przeprowadzania szybkich testów diagnostycznych [8]. Inaczej jest jeśli pacjent zakażony HIV nie wykazuje charakterystycznych dla gruźlicy zmian klinicznych, wynik badania mikroskopowego jest ujemny bądź wątpliwy ale istnieje podejrzenie zakażenia prątkami gruźlicy. W takim przypadku, w oczekiwaniu na wynik hodowli, wskazane jest przeprowadzenie szybkich testów diagnostycznych, które mogą być pomocne dla lekarza w podjęciu decyzji o rozpoczęciu terapii oraz izolacji pacjenta [8].

7. Diagnostyka gruźlicy w oparciu o LCR (Ligase Chain Reaction), SDA (Strand Displacement Amplification) i Q β replikazę

Wszystkie wcześniej przedstawione techniki amplifikacji wykorzystywały zdolność polimeraz do kopiowania (powielania) docelowych sekwencji DNA lub RNA. Alternatywną techniką amplifikacji sondy jest metoda oparta na zależności od matrycy ligacji sond oligonukleotydowych. W metodzie LCR zastosowano termostabilną ligazę DNA, która łączy dwie pary komplementarnych oligonukleotydowych sond po ich hybrydyzacji do sekwencji matrycowej. Produkt ligacji, będący kopią jednej nici sekwencji docelowej, staje się matrycą do ligacji kolejnych komplementarnych oligonukleotydów. Powtarzanie tego procesu prowadzi do powielania liczby produktów ligacji w postępie geometrycznym (Rys. 2) [25, 43, 44, 53, 79, 80].

Reakcję LCR zastosowano w dostępnym handlowo zestawie służącym do diagnostyki gruźlicy – „LCx MTB Assay” [2, 64, 79]. Powielaną sekwencję stanowi fragment DNA powstały w wyniku połączenia pary sond komplementarnych do białkowego antygenu b (Pab) specyficznego dla *M. tuberculosis complex*. Czulość testu oceniana jest na 15–20 komórek prątków w badanej próbce, a czas potrzebny do jego przeprowadzenia łącznie z opracowaniem materiału wynosi ok. 5 godzin [79, 80]. Ponadto dzięki zdolności ligazy do łączenia sond w miejscu o swoistej sekwencji LCR można wykorzystywać do badania pojedynczych mutacji nukleotydowych.

Kolejna technika amplifikacji sekwencji matrycowej to metoda tzw. „przesuwającej się nici” (Strand Displacement Amplification – SDA). Zasada SDA polega na wykorzystaniu zdolności polimeraz DNA do inicjowania syntezy DNA

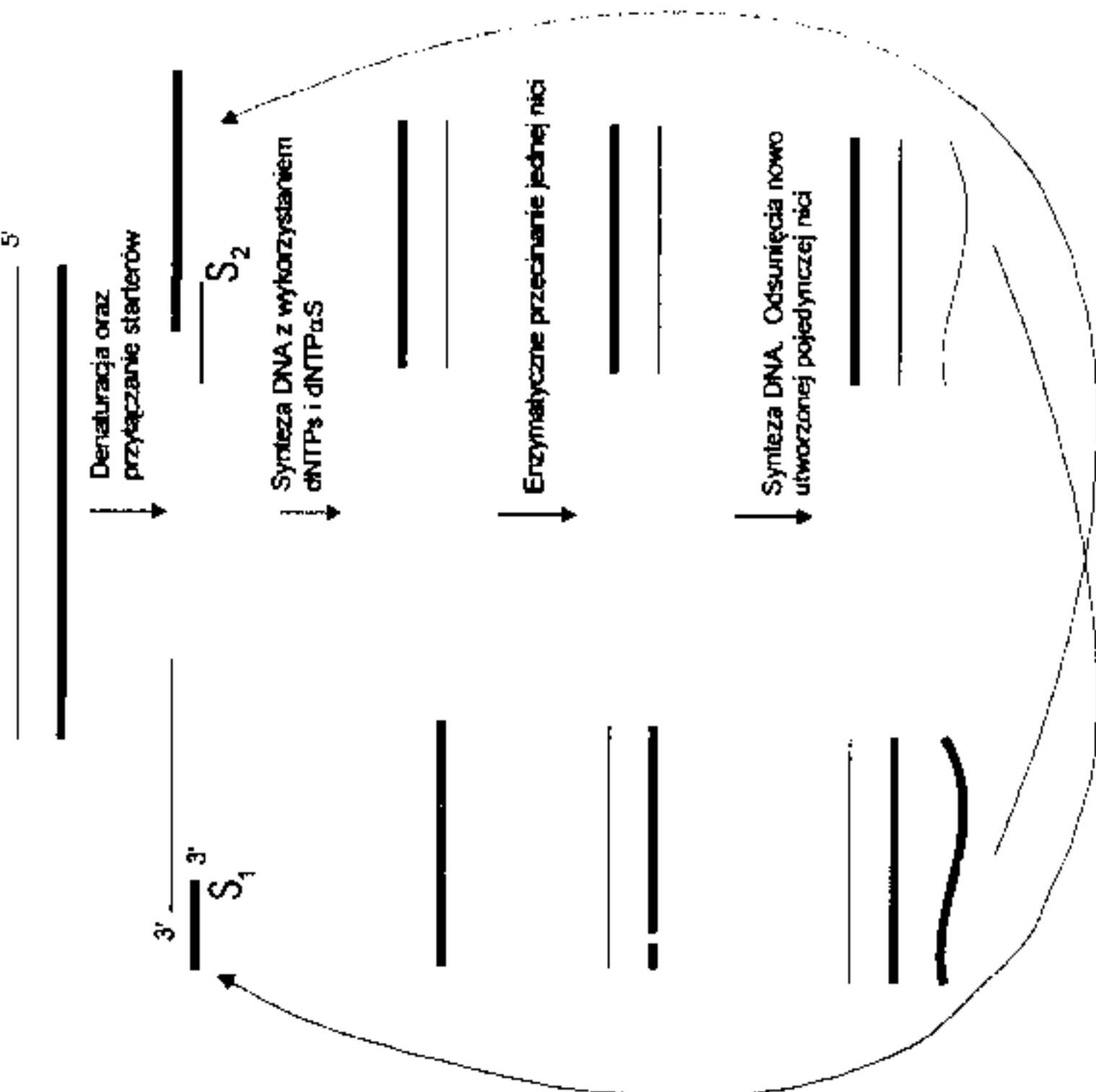


Rys. 2. Schemat reakcji LCR. Objasnienia w tekście

w miejscu pęknięcia jednej nici w obrębie cząsteczki docelowej i odsuwanie tej nici podczas syntezy DNA. Odsunięte jednoniciowe cząsteczki są substratem w kolejnych reakcjach przecinania i przesuwania, co prowadzi do akumulacji dwu- i jednoniciowych kopii sekwencji matrycowej. Startery stosowane w reakcji SDA składają się z dwóch regionów: homologicznego z sekwencją matrycową o długości 15–20 oligonukleotydów oraz sekwencji rozpoznawanej przez odpowiednią endonukleazę restrykcyjną. Po inkubacji z DNA matrycy dodawana jest polimeraza pozbawiona aktywności 3'–5' egzonukleazy oraz trójfosforany deoksynukleotydów (dGTP, dCTP, dTTP i dATP) 5'- α -tio-trójfosforan deoksyadenozyny). Prowadzone przez polimerazę wydłużanie 3' końców startera i sekwencji matrycowej prowadzi do syntezy nici zawierającej tiopochodne deoksynukleotydów, która jest chrońiona przed działaniem endonukleazy restrykcyjnej. Jednocześnie zachodzi reakcja wydłużania startera na matrycy sekwencji docelowej. Po przecięciu tej nici przez endonukleazę restrykcyjną polimeraza rozpoczyna na syntezę DNA na utworzonym końcu 3', co powoduje odsunięcie nowo utworzonej pojedynczej nici. Odsunięte nici o przeciwnawnej orientacji biorą udział w nowym cyklu przecinania i odsuwania co prowadzi do powielania sekwencji matrycowej (Rys. 3) [87].

W diagnostyce gruźlicy reakcję SDA zastosowano do amplifikacji fragmentu sekwencji insercyjnej IS6110 [20, 30, 36, 86, 87]. Pierwszym komercyjnym testem wprowadzonym do diagnostyki prątków gruźlicy w materiałach z dróg oddechowych, wykorzystującym reakcję SDA jest BP ProbeTec MTB Test [4]. Półautomatyczny system oparty jest na termofilnej wersji SDA enzymatycznie replikującej sekwencję matrycową do poziomu umożliwiającego ich detekcję. Czulość testu oceniono na 100% a specyficzność na 99,2% [4].

Q β replikaza jest polimerazą RNA zależną od RNA i odpowiedzialna jest za replikację genomowego RNA bakteriofaga Q β . Charakterystyczną cechą tego enzymu, składającego się z licznych podjednostek jest to, że rozpoznaje on unikalną strukturę przestrzenną RNA (strukturę drugorzędową), która powstaje wskutek



Rys. 3. Schemat reakcji SDA [wg. 151]. Objasnienia w tekście

wewnątrz cząsteczkowego parowania zasad w genomie faga Q β . Enzym ten rozpoznaje również cząsteczki RNA zawierające niewielkie wstawki jako sondy i dlatego może być stosowany w reakcji amplifikacji sygnałów hybrydyzacyjnych poprzez powielanie cząsteczki samej sondy. Właściwości Q β replikazy wykorzystano także do wykrywania *M. tuberculosis* complex w oparciu o sekwencję 23S rRNA [60, 67–70].

9. Podsumowanie

Nowoczesne metody i techniki biologii molekularnej zrewolucjonizowały w ostatnich latach badania diagnostyczne i epidemiologiczne chorób zakaźnych. Szczególnie cennym osiągnięciem jest możliwość wykrywania drobnoustrojów chorobotwórczych bezpośrednio w materiałach klinicznych. Jest to bardzo ważne szczególnie w detekcji patogenów trudnych do hodowli i wolno rosnących (*M. tuberculosis* complex).

W dobie ogromnego wzrostu liczby zakażeń powodowanych przez drobnoustroje z rodzaju *Mycobacterium*, zwłaszcza u nosicieli HIV, ważne jest zagłębienie diagnostyki laboratoryjnej o najnowsze, szybkie metody molekularne i genetyczne dla wykrywania i pewnej identyfikacji prątków gruźlicy i innych atypowych prątków z rodzaju *Mycobacterium*.

Pismienictwo

- Andersen A.B., Thybo S., Godfrey-Fausset P., Stoker N. G.: Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum. *Eur. J. Clin. Infect. Dis.* 12, 922–927 (1993)
- Ausina V., Gamboa F., Gazapo E., Manterola J.M., Lopez J., Matas L., Manzano J.R., Rodrigo C., Cardona J.-P., Padilla E.: Evaluation of the semiautomated Abbot LCx *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1996–2002 (1997)
- Bennedson J., Thomsen O.V., Pfyffer G.E., Funke G., Feldmann K., Beneké A., Jenkins P.A., Heggenbotham M., Fahr A., Hengstler M., Cleator G., Klapper P., Wilkins E.G.L.: Utility of PCR in diagnosis pulmonary tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1407–1411 (1996)
- Bergmann J., Woods G.L.: Clinical evaluation for the BDProbe Tec strand displacement amplification assay for rapid diagnosis of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2766–2768 (1998)
- Bodmer T., Möchel E., Mühlemann K., Matter L.: Improved performance of Gen-Probe Amplified Mycobacterium Direct test when 500 instead of 50 microliters of decontaminated sediments is used. *J. Clin. Microbiol.* 34, 222–223 (1996)
- Bonington A., Strang J.J.G., Klapper P.E., Hood S.V., Robombora W., Penny M., Willers R., Wilkins E.G.L.: Use of AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* PCR in early diagnosis of tuberculous meningitis. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1252–1254 (1998)
- Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M.E., van der Noordaa J.: Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28, 495–503 (1990)
- Bradley S., Reed S., Catanzaro A.: Clinical efficiency of the Amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Care Med.* 53, 1606–1610 (1996)
- Brudney K., Dobkin J.: Resurgent tuberculosis in New York City, human immunodeficiency virus, homelessness and the decline of tuberculosis control programs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144, 745–749 (1991)
- Carpentier E., Drouillard B., Dailloux M., Moinard D., Valler E., Dutilh B., Maugain J., Bergogne-Berezin E., Carbonnelle B.: Diagnosis of tuberculosis by AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* test: a multicenter study. *J. Clin. Microbiol.* 33, 3106–3110 (1995)
- Cartuyvels R., de Ridder C., Jonckheere S., Verbist L., van Eldere J.: Prospective clinical evaluation of AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* PCR test as a screening method in a low-prevalence population. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2001–2003 (1996)
- Cave M.D., Eisanach K.D., McDermott P.F., Bates J.H., Crawford J.T.: IS6110: conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilisation in DNA fingerprinting. *Mol. Cell. Probes.* 5, 73–80 (1991)
- Ceglecka-Tomaszewska L., Miller M., Zwolska Z.: Gruźlica u dzieci. Wydawnictwo Lekarskie PZWL Warszawa 1996, s. 11–60
- Chan M., Yuen K.Y., Yam K.S., Yim K.H.M., Ng W.F., Ng M.H.: Single tube nested PCR in diagnosis of tuberculosis. *J. Clin. Pathol.* 49, 290–294 (1996)
- Clarridge III J.E., Shwarz R.M., Shinnick T. M., Plikaytis B.B.: Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in routine mycobacteriology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 31, 2049–2056 (1993)