

*Andrzej Zieliński, Grażyna Cholewińska, Barbara Wondolowska,
Elżbieta Bąkowska, Ewa Kopicz-Kamińska, Jadwiga Zajączkowska,
Natalia Zalewska-Schonthaler, Joanna Baran, Andrzej Lipniacki,
Wojciech Woźny, Andrzej Horban, Ewa Burkacka*

WSTĘPNE BADANIA ZASTOSOWANIA TECHNIKI
REAKCJI ŁAŃCUCHOWEJ POLIMERAZY (PCR)
W DIAGNOSTYCE GRUŻLICY W POPULACJI PACJENTÓW
CENTRUM DIAGNOSTYKI I TERAPII AIDS

Centrum Diagnostyki i Terapii AIDS w Warszawie
Dyrektor: dr n. med. *A. Horban*
Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie
Dyrektor: prof. dr hab. *K. Roszkowski*

Wyniki uzyskane w badaniach i przedstawione w pracy potwierdzają specyficzną i czułość techniki PCR jako szybkiego i wiarygodnego testu, bardzo użytecznego w diagnostyce gruźlicy u osób zakażonych HIV

WSTĘP

Rozprzestrzenienie się infekcji HIV zmieniło radykalnie sytuację epidemiologiczną gruźlicy w świecie. Kraje rozwinięte, które jak się wydawało, miały już opanowany problem gruźlicy, obserwują znowu wzmożoną dynamikę nowych zakażeń. W najbardziej dotkniętych epidemią HIV krajach afrykańskich gruźlica jest najczęstszą przyczyną zgonów spośród chorób zakaźnych (1, 2, 3, 8). Rozpowszechnienie gruźlicy sprawia, że w tych krajach zgony osób zakażonych HIV następują często zanim rozwinię się pełnobjawowy AIDS.

Obniżenie odporności komórkowej stanowi najistotniejszy z czynników zwiększających prawdopodobieństwo uaktywnienia się gruźlicy utajonej oraz przyspieszających rozwój tej choroby zarówno w obrębie płuc jak też innych narządów i układów (8).

Również częściej niż w populacji ogólnej występuje u osób z HIV kolonizacja układu oddechowego prątkami atypowymi. Najczęściej nie są one patogenami płucnymi, choć w przebiegu AIDS mogą dawać ciężkie uogólnione infekcje. W związku z tym, że czas oczekiwania na identyfikację gatunku prątka w wyniku hodowli wynosi kilka tygodni, konieczne jest wprowadzenie szybkich, ale podobnie czułych i specyficznych metod diagnostycznych, z których reakcja łańcuchowa polimerazy jest w chwili obecnej rozwiązaniem najbardziej obiecującym, mimo że bywa niekiedy krytykowana z powodu swej nadczułości (7).

Niżej przedstawiona została wstępna analiza wyników zastosowania metody PCR w diagnostyce gruźlicy w Centrum Diagnostyki i Terapii AIDS w zestawieniu ze służącymi jako punkt odniesienia metodami poszukiwania prątków w preparatach bezpośrednich i w hodowli.

MATERIAŁ I METODY

Badania popłuczyn oskrzelowych lub indukowanej płwociny w kierunku obecności materiału genetycznego prątków gruźlicy przeprowadzono metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) testami Amplicor Mycobacterium Tuberculosis Test firmy Roche u 180 osób HIV+ pozostających pod opieką Poradni Profilaktyczno-Lecznicznej Centrum bądź hospitalizowanych w oddziałach szpitalnych Centrum. Badania te są rutynowo wykonywane u wszystkich osób hospitalizowanych w Centrum, a także u tych pacjentów ambulatoryjnych Poradni, którzy z racji trybu życia (bezdolność, uzależnienie od środków odurzających) są szczególnie zagrożeni zakażeniem gruźlicą lub u których występują objawy budzące u lekarza prowadzącego podejrzenie infekcji gruźliczej. Ograniczone środki finansowe nie pozwalają jak dotąd na objęcie tymi badaniami wszystkich osób będących pod opieką Centrum.

Niezależnie od standardowego sprawdzania stosowanej techniki PCR na hodowlach wzorcowych wykonano cztery badania na materiale pochodzącym od czterech pacjentów z Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc. Trzech z potwierdzonym tam rozpoznaniem gruźlicy płuc oraz jednego z rozpoznaniem MAC (*Mycobacterium avium complex*). We wszystkich trzech przypadkach gruźlicy uzyskano wynik dodatni, a w przypadku MAC wynik ujemny.

Materiał, badany techniką PCR w kierunku obecności materiału genetycznego *Mycobacterium tuberculosis* był również badany w Pracowni Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc techniką preparatów bezpośrednich oraz hodowli na podłożach Bactec lub Septi-Chek.

WYNIKI BADAŃ

Wyniki badań płwociny w kierunku obecności materiału genetycznego prątków gruźlicy techniką PCR wykonano u 180 pacjentów HIV (+) pozostających pod opieką Centrum. Średnia wieku zbadanych pacjentów wynosi 32,1 lat i nie różni się istotnie od średniej wieku podgrupy osób u których wykryto zakażenie prątkiem gruźlicy (34,5 l.).

W zbadanej grupie wyniki dodatnie PCR wskazujące na obecność materiału genetycznego prątków gruźlicy w indukowanej płwocinie lub w popłuczynach oskrzelowych stwierdzono u 6 osób, co stanowi 3,33%. Spośród tych osób trzy miały potwierdzoną gruźlicę w hodowli prątków, u jednej osoby hodowla jest w toku, a w dwu przypadkach posiew dał wynik ujemny. W jednym z tych sześciu przypadków gruźlica miała charakter uogólniony: potwierdzone badaniem PCR ropnie gruźlicze w wątrobie i zmniejszające się po leczeniu przeciwpłukowym zmiany w mózgu. W pięciu przypadkach u pacjentów z dodatnim wynikiem PCR stwierdzono obecność prątków w płwocinie w preparacie bezpośrednim. W jednym przypadku dodatni

wynik PCR nie znalazł potwierdzenia ani w preparacie bezpośrednim, ani w hodowli jednak ze względu na obecność objawów ogólnych jak poty nocne i stany gorączkowe lekarz prowadzący zdecydował się na podjęcie leczenia przeciwpłatkowego, po którym wyżej wymienione objawy ustąpiły, a powtórzone po dwóch miesiącach badanie PCR dało wynik ujemny. Z pozostałych pięciu osób jedna wypadła z obserwacji Centrum przechodząc pod opiekę rejonowej przychodni przeciwegruźliczej, natomiast u pozostałych czterech zostało podjęte leczenie przeciwgruźlicze po którym obserwowano poprawę kliniczną i w przypadkach zmian płucnych poprawę radiologiczną. Ponadto u wszystkich pacjentów pozostających pod opieką Centrum, u których stwierdzono dodatni wynik PCR i podjęto leczenie przeciwpłatkowe, ponownie wykonane po kilku tygodniach leczenia badanie PCR dawało wyniki ujemne.

Spośród jedenastu pacjentów Centrum, u których stwierdzono ujemny wynik PCR, a u których w preparacie bezpośrednim indukowanej płwociny lub BAL wykryto obecność prątków kwasoopornych, u czterech wyhodowano prątki atypowe (w dwóch przypadkach *M. xenopii*, w jednym *M. gordonae*, a w jednym *Mycobacterium avium complex*), natomiast u pozostałych siedmiu hodowle prątków były ujemne. Nie stwierdzono ani jednego przypadku, w którym dodatni wynik PCR współwystępowałby z potwierdzonym zakażeniem prątkami atypowymi. A także nie stwierdzono żadnego przypadku, w którym znalezienie prątków kwasoopornych w preparacie bezpośrednim i potwierdzenie MTB w hodowli współwystępowałoby z ujemnym wynikiem PCR.

W trzech przypadkach gruźlicy rozpoznanej i leczonej przez ponad dwa miesiące przed wprowadzeniem badań PCR wyniki tego badania były ujemne. Ujemne wtedy również były preparaty bezpośrednie i hodowle prątków. Nie zaobserwowano też objawów nawrotu choroby.

Badania PCR w kierunku materiału genetycznego *Mycobacterium tuberculosis* w próbkach innych niż płwocina lub BAL wykonano w 12 przypadkach z powodu podejrzenia gruźlicy rozsianej. W jednym wzmiankowanym wyżej przypadku materiał pochodzący z ropnia wątroby dał wynik dodatni. W pozostałych jedenastu wyniki były ujemne. W pięciu przypadkach był to płyn mózgowo-rdzeniowy, w czterech płyn z opłucnej, a w dwóch mocz. W żadnym z tych jedenastu przypadków nie zostało potwierdzone w czasie późniejszej obserwacji rozpoznanie gruźlicy pozapłucnej.

Tabela I. Zestawienie wyników badań PCR płwociny indukowanej lub popłuczyn oskrzelowych u pacjentów HIV(+) leczonych w centrum D i T AIDS

Liczba przebadanych pacjentów	180
W tym liczba osób z dodatnimi wynikami PCR MTB	6
W tym liczba obserwacji prątków w preparacie bezpośrednim	5
W tym liczba potwierżeń MTB w hodowli prątków	3
Liczba osób pozostających poza obserwacją Centrum D i T AIDS	1
Liczba osób leczonych w Centrum D i T AIDS	5
Liczba obserwowanych konwersji PCR po leczeniu przeciwpłatkowym	5
Liczba osób z dodatnimi wynikami preparatów bezpośrednich, a ujemnymi wynikami PCR MTB	11
Liczba potwierżeń MTB w hodowli w tej grupie	0
Liczba pacjentów z klinicznym rozpoznaniem gruźlicy w tej grupie	0
Liczba potwierżeń prątków atypowych w hodowli w tej grupie	3

OMÓWIENIE

Częste występowanie gruźlicy, a także jej ciężki i często nietypowy przebieg u osób HIV(+) wymaga podjęcia wysiłku w kierunku wprowadzenia czułych i specyficznych metod diagnostycznych, które pozwalałyby na stosunkowo szybkie podjęcie właściwego leczenia lub profilaktyki (6).

Istotnym celem prezentowanych tu badań była ocena techniki reakcji łańcuchowej polimerazy w diagnostyce gruźlicy. Jest to nowa technika, która wciąż wymaga weryfikacji klinicznej oraz laboratoryjnej przy zastosowaniu hodowli. W naszym materiale jej wysoka czułość i specyficzność została potwierdzona w pełni. Nie mieliśmy ani jednego przypadku wyniku fałszywie dodatniego w stosunku do prątków atypowych, a wyniki dodatnie w przypadkach pozostających w obserwacji Centrum D i T AIDS potwierdzane były bądź w hodowli w Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc bądź też pośrednio poprzez następującą po leczeniu przeciwprątkowym poprawę kliniczną i konwersję dodatnich wyników PCR na ujemne.

Jednak konieczne są dalsze badania dla wypracowania zasad postępowania przy dodatnich wynikach PCR w warunkach braku potwierdzenia w hodowli i przy niespecyficznych objawach klinicznych. Ma to znaczenie między innymi dlatego, że badanie materiału genetycznego nie rozróżnia prątków żywych od martwych. Rozróżnienia tego można dokonać tylko w hodowli prątka, która nadal pozostaje wzorcem do którego musimy odnosić oceny nowych, szybciej działających metod (5, 6). Zwłaszcza, że niezwykle wysoka czułość metody PCR stwarza niebezpieczeństwo występowania wyników fałszywie dodatnich z powodu zanieczyszczenia znajdującym się w powietrzu materiałem genetycznym prątków (7).

Mimo, że w naszych badaniach nie spotkaliśmy wyniku fałszywie dodatniego, Centrum D i T AIDS nie zaleca podjęcia leczenia lekami przeciwprątkowymi w wypadkach, gdy wynik PCR MTB jest dodatni, a nie występują objawy kliniczne lub radiologiczne stwarzające podejrzenie gruźlicy przy braku potwierdzenia w hodowli prątków. Pacjenci tacy powinni być jednak bardzo dokładnie obserwowani pod względem klinicznym i radiologicznym, a pełne badania płwociny (preparat bezpośredni, hodowla i PCR) należy powtórzyć u nich co najmniej dwukrotnie w odstępach kilkutygodniowych.

Jednak w tych wypadkach, w których istnieje uzasadnione kliniczne lub radiologiczne podejrzenie gruźlicy rozpoczęcie leczenia nawet przy braku potwierdzenia w preparacie bezpośrednim jest w pełni usprawiedliwione tym, że u pacjenta z obniżoną odpornością opóźnienie w podjęciu leczenia spowodowane oczekiwaniem na wynik hodowli może mieć poważne konsekwencje.

Innym niezwykle ważnym zastosowaniem metody PCR w diagnostyce mycobacterioz w klinice AIDS są sytuacje w których ujemny wynik PCR współwystępuje z obecnością w tym samym materiale prątków kwasoopornych stwierdzanych w preparacie bezpośrednim. Zazwyczaj, szczególnie w przypadku *Mycobacterium avium*, jest to kolonizacja dróg oddechowych bez istotnych konsekwencji klinicznych i jeśli nie współwystępuje z tym infekcja uogólniona w postaci bakteremii, nie wymaga ona leczenia, a przynajmniej pozwala na odłożenie decyzji o leczeniu do czasu uzyskania wyników hodowli (9). Pozwala to na uniknięcie przewlekłego podawania nieobjętych przeciw leków i na racjonalizację kosztów opieki medycznej.

WNIOSKI

1. Technika PCR ze względu na swą czułość i specyficzność i szybkość uzyskania wyników może stanowić ważne uzupełnienie klasycznych metod diagnostycznych gruźlicy.

2. U osób z AIDS może ona być pomocna dla rozróżnienia pomiędzy zakażeniem prątkami gruźlicy, a kolonizacją płuc prątkami atypowymi.

3. Hodowla prątków pozostaje nadal podstawową, standardową metodą ich identyfikacji, a dalsza ocena przydatności PCR w diagnostyce powinna być weryfikowana poprzez porównywanie z wynikami hodowli.

A. Zieliński, G. Cholewińska, B. Wondolowska, E. Bąkowska, E. Kopacz-Kamińska, J. Zajczkowska, N. Zalewska-Schonthaler, J. Baran, A. Lipniacki, W. Woźny, A. Horban, E. Burkacka

INITIAL ASSESSMENT OF THE USE OF POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)
IN DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS AMONG PATIENTS
OF AIDS DIAGNOSIS AND THERAPY CENTER IN WARSAW

SUMMARY

This initial report on the use of PCR in diagnosis of TB was based on a group of 180 patients observed in the AIDS Diagnosis and Therapy Center in Warsaw. Out of 6 patients with positive results of PCR assay for MTB, five had positive AFB smears in induced sputum or BAL, two had positive MTB cultures. Five of them were treated with tuberculostatic drugs with clinical improvement and had negative sputum PCR MTB results after several weeks. Additional 11 patients with AFB positive sputum or BAL smears and negative PCR MTB were observed. None of them developed pulmonary tuberculosis, and none of them was confirmed by culture as MTB infection.

The results presented in this paper confirm high specificity and sensitivity of polymerase chain reaction (PCR) as a fast diagnostic test very useful in the clinical settings of AIDS. With the increase of collected material further evaluation will be continued.

PIŚMIENNICTWO

1. Gruźlica i choroby układu oddechowego w Polsce w 1993 r. Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc. Zakład Epidemiologii i Organizacji Walki z Gruźlicą. Warszawa 1994. – 2. *Korzeniewska-Kosela M.*: *Klinika*, 1995, 1, 25. – 3. *Clancy L.* i wsp.: *Eur Res J.*, 1991, 4, 1288. – 4. *Narain J.P.* i wsp.: *Tubercle. Lung Dis.*, 1992, 73, 311. – 5. *Bloom BR* rd.: *Tuberculosis*, Washington 1994, 98. – 6. *Crawford J.T.*: *New technologies in the diagnosis of tuberculosis. Semin Respir Infect.*, 1994, 9(2), 62. – 7. *Shaw R.J.*: *Polymerase chain reaction. Clinical Tuberculosis Ed. PDO Davies*, London 1994; 381. – 8. *Shafer R.*: *Tuberculosis. Textbook of AIDS Medicine. Ed. S. Broder i wsp.* Baltimore 1994; 259. – 9. *Young L.S.*: *Atypical Mycobacteria*, tamże 283.

Adres: Centrum Diagnostyki i Terapii AIDS,
Warszawa, ul. Wolska 37