

STRATEGIA RUTYNOWYCH IDENTYFIKACJI ATYPOWYCH MYKOBAKTERII

S. Pattyn

Na sprawę identyfikacji należy spojrzeć z odpowiedniej perspektywy. Identyfikacja jest częścią taksonomii a poprzedza ją klasyfikacja i ustalenie nomenklatury.

ROZWÓJ SYSTEMÓW KLASYFIKACJI

Klasyfikacja ogólna: logiczna (Linneusz), filogenetyczna (Darwin) i liczbowa (Adanson-Sneath).

Tymczasowy podział prątków: Lester (1937), Runyon (1955). 1955—1965 — próby liczbowe (I.W.G.M.T.) analizy łączy klinicznych, ekologicznych i epidemiologicznych.

Nomenklatura i międzynarodowy kod nomenklatury bakterii i wirusów.

Identyfikacja: najbardziej znaczące cechy charakterystyczne w analizie liczbowej.

Klasyfikacja jest czysto intelektualną czynnością, na którą składa się grupowanie idei lub przedmiotów w otoczeniu człowieka. Na klasyfikację, podobnie jak na każdą tego rodzaju czynność umysłową, wpływa doświadczenie osoby klasyfikującej oraz cel jaki jej przyświeca. Twierdzono niejednokrotnie, że każda klasyfikacja jest dobra jeżeli spełnia swój cel. Na przykład książki w bibliotece można sklasyfikować na podstawie ich koloru, rozmiarów, autorów, tytułu itp. Jaki jest cel klasyfikacji bakterii? Był czas, że przy pomocy klasyfikacji starano się wyrazić istotę rzeczy (Arystoteles). Później uważano, że odzwierciedla ona istniejący w przyrodzie boski porządek.

Próby oparcia klasyfikacji na ewolucji, zwłaszcza jeżeli chodzi o bakterie, których skamieliny nie istnieją, nie powiodły się. Prawdziwym celem klasyfikacji jest poznanie identyczności lub podobieństw danej klasy przedmiotów. W tym celu mikrobiologia posługuje się kryteriami morfologicznymi, fizjologicznymi, a nawet kryteriami z zakresu patologii. Na ich podstawie tworzy się systemy dichotomiczne. Decyzja, które cechy należy uważać za pierwszorzędne, a które za drugorzędne, jest

zupełnie subiektywną, a często kwestią osobistej opinii tzw. „autorytetów”. Nowoczesna taksonomia stawia sobie bardziej skromne, demokratyczne i racjonalne cele, które prowadzą w kierunku tzw. adansonowskiej lub liczbowej klasyfikacji.

Metoda ta uwzględnia możliwie największą liczbę cech występujących w badanej grupie i na ich podstawie przeprowadza porównania matematycznymi metodami. Oblicza się podobieństwo w procentach i określa tzw. „średnie organizmy” (Liston i współpr. 1965). Zakłada się, że wszystkie cechy są równoważne i, że im lepiej się je pozna, tym łatwiej będzie można opisać genotyp lub fenotyp. W przeglądaniu skomplikowanych tablic stosuje się maszyny liczące. Mając do dyspozycji wyniki wielokrotnie powtórzonych badań w różnych laboratoriach, można obliczyć ich wzorowe odchylenie i statystyczną zmienność. Granice dzielące grupy lub gatunki można określić w terminach matematycznych, rozstrzygając w ten sposób wiele istniejących dawniej kontrowersji.

Kluyver określił klasyfikację jako „podsumowanie istniejącej wiedzy”. Pierwsze próby sklasyfikowania mykobakterii były oparte na bardzo fragmentarycznej wiedzy o nich. Na przykład Lester w 1937 r. proponowała podział niegruźliczych mykobakterii na trzy grupy: niepigmentowanych, pigmentowanych i szybko rosnących. Po drugiej wojnie światowej Runyon, niezależnie od Lester zaproponował taki sam podział, dołączając jeszcze grupę I tj. mykobakterie fotochromogenne. W tym okresie po prostu nie posiadano dostatecznej liczby kryteriów, żeby różnicować mykobakterie. W latach 1955—1965 wielu autorów opisało dużą liczbę cech i testów. (Gordon, 1955, 1957, 1958; Konno, 1956, Bönicke, 1962, Szabo 1963; Wayne 1964; Käßpler 1965; Kubica, 1966). W 1968 r. powstała „Międzynarodowa Grupa Taksonomii Mykobakterii”, która zorganizowała wiele badań na ten temat, z udziałem ok. 10—12 laboratoriów w 7 krajach. Wyniki analizowano przy pomocy maszyn liczących w oparciu o zasady adansonowskiej klasyfikacji liczbowej. Wyniki dotyczące mykobakterii skotochromogennych zostały już ogłoszone a wyniki dotyczące szybko rosnących mykobakterii są w przygotowaniu do druku. W toku są badania nad grupą I i III oraz kontynuowane są badania nad szczepami szybko rosnącymi i grupą *rhodochrous*.

Dotychczasowe badania wykazały, że mykobakterie można podzielić na grupy, w skład których wchodzi szczepy o najwyższym stopniu podobieństwa między sobą. Szczepy tworzące grupę skupiają się dokoła dawniej znanych i opisanych gatunków, niekiedy dokoła dwóch lub więcej szczepów, których nazwy w tym wypadku okazują się synonimami.

Zaletą takiej klasyfikacji jest obiektywny charakter, gdyż żadnej cechy nie uważa się *a priori* za wcześniejszą od innych. Zdecydowano się jedynie na przeprowadzenie badań w ramach grup Runyona. Być może w wyniku współpracy będzie można w przyszłości połączyć wyniki róż-

nych autorów i stworzyć numeryczną klasyfikację całego rodzaju *Mycobacterium*.

Dotychczas uważano pigmentację i szybkość wzrostu za cechy pierwszorzędne, a wszystkie inne cechy za drugorzędne. Natomiast cecha „kwasooporności” sprawia dużo kłopotu gdyż mamy do czynienia z mykobakteriami, które „straciły swoją kwasooporność”. Częste przenoszenie szczepów z gatunku *Mycobacterium* do *Nocardia* i z powrotem jest przykładem tego co się dzieje gdy usiłujemy przypisać większe znaczenie jednej cesze *a priori*. Dalsze badania są konieczne.

Nomenklatura nie powinna stwarzać dużych trudności gdyż istnieje Międzynarodowy System Nomenklatury Bakterii i Wirusów, którego jasno sprecyzowane zasady i reguły powinny obowiązywać przy nadawaniu nazw. Oczywiście, reguły te w razie potrzeby można zmieniać.

Identyfikacja jest następnym problemem. Należy sobie najpierw zadać pytanie jaki jest cel identyfikacji, gdyż istnieją dwie możliwości. Z jednej strony, może nas interesować taksonomiczna pozycja badanego szczepu. W tym wypadku musimy poznać liczne cechy szczepu i ocenić ilościowo ogólne podobieństwo do dawniej znanych i opisanych gatunków względnie grup. Częściej jednak, celem identyfikacji jest określenie klinicznego znaczenia danego szczepu. Musimy wówczas tylko rozpoznać, tj. zidentyfikować badany szczep jako należący do znanego i posiadającego nazwę gatunku, o którym wiemy że jest gatunkiem saprofitycznym, chorobotwórczym lub potencjalnie chorobotwórczym. Jest to bakteriologia stosowana dla celów klinicznych i dlatego musi dostarczyć klinicyście żądanych informacji jak najszybciej. W tym celu należy znać najmniejszą liczbę cech wystarczających dla rozpoznania gatunku badanego szczepu.

STRATEGIA IDENTYFIKACJI

Cel: (warunki optymalne) prosty, ekonomiczny i szybki,

- schematy łączone z kontrolami,
- badania adoptowane do lokalnych możliwości,
- testy najbardziej przydatne,
- zastosowanie kliniczne, epidemiologiczne, ekologiczne.

Jeżeli posługujemy się klasyfikacją opartą na matematycznie opracowanych danych, łatwo możemy określić które cechy posiadają największą różnicującą wartość i wystarczającą dla zidentyfikowania nowego szczepu. Najbardziej odpowiednimi będą takie cechy, które różnicują gatunek w 100%. Dla celów rutynowej identyfikacji byłoby stratą czasu i energii badanie cech, które powtarzają się (jako dodatnie lub ujemne) w różnych lub wszystkich gatunkach. Na przykład wszystkie szybko rosnące szczepy rozkładają glukozę wytwarzając kwas, więc tej cechy nie należy badać. Jeżeli 40% szczepów gatunków *A* rozkłada jakiś węglowodan, a 60% szczepów gatunku *B*, cecha ta również nie nadaje się dla celów identyfi-

kacji. Test hydrolizy Tween i test aktywności fosfatazy prątków dają identyczne wyniki, nie muszą więc być dublowane.

Najpierw należy wybrać dwie cechy charakterystyczne dla każdego gatunku, celem zastosowania ich jako kontroli identyfikacji. Sprzeczny wynik tych dwóch testów oznacza, że nowy szczep nie należy do tego gatunku, albo że popełniono błąd techniczny w wykonaniu testów (jednym z najważniejszych zadań na przyszłość jest standaryzacja testów). Pożądane jest, żeby oba wybrane testy dawały wynik dodatni gdyż wartość dodatnich wyników jest większa niż ujemnych.

Czynnikiem wpływającym na strategię identyfikacji jest również charakter laboratorium i jego doświadczenie w tej dziedzinie. Niektóre laboratoria są obciążone usługową pracą tj. wykrywaniem prątków gruźlicy i badaniem na lekooporność. Mogą one wykorzystać wyniki oznaczenia lekooporności dla celów identyfikacji. Natomiast w laboratoriach badawczych i naukowych włączenie badań lekooporności wszystkich szczepów jest nieopłacalne.

Testów w oznaczeniu których dane laboratorium ma duże doświadczenie nie należy zmieniać na inne. Strategia identyfikacji będzie zależała więc od przyjętej klasyfikacji, sytuacji lokalnej i doświadczenia.

W naszym laboratorium stosujemy dwie serie pożywek identyfikujących, jedna dla szczepów powoli rosnących i druga — dla identyfikacji szczepów szybko rosnących. Identyfikacji powoli rosnących szczepów dokonuje się na następującej serii pożywek:

- 1) jedna probówka pożywki Loewensteina-Jensena (L-J),
- 2) jedna probówka pożywki L-J zawinięta w czarny papier,
- 3) jedna probówka pożywki L-J z 1 mcg/ml INH,
- 4) jedna probówka pożywki L-J z 5 mcg/ml INH,
- 5) jedna probówka pożywki L-J 25% TCH, hydrazyd kwasu tiofen-dwu-karboksyłowego, Bönicke, 1962),
- 6) jedna probówka pożywki L-J inkubowana w temp. 42°,
- 7) jedna probówka pożywki L-J inkubowana w temp. 44,5°,
- 8) dwie probówki pożywki ściętej w postaci pionowych słupków (Kestle i wsp. 1967),
- 9) jedna probówka pożywki agarowo-oleinowej wg Dubosa (OAA),
- 10) jedna probówka dla testu na fosfatazę (Käppler, 1965) zaszcze-piona bezpośrednio z badanej hodowli, albo dla testu hydrolizy Tween 80,
- 11) jedna probówka skośnie ściętej pożywki peptynowo-agarowej zawierającej 0,5 ml 1% roztworu cytrynianu żelazowo amonowego (Szabo i współpr. 1963).

Wszystkie posiane pożywki z wyjątkiem 6 i 7, inkubuje się w temp. 38°; probówkę 6 i 7 inkubuje się w regulowanych łaźniach wodnych w stałej temperaturze, kontrolując często poziom wody w łaźni.

Wszystkie posiewy przegląda się raz na tydzień, oprócz 5 dni i 1 raz po 10 dniach. Z chwilą ukazania się wzrostu na probówce 1 należy zmie-

nić korki gumowe na korki z ligniny w probówce 1 i 2. Trzy dni później można wykonać z tymi hodowlami testy na fotoindukcję, niacynę (Konno, 1956) i reduktazę azotanową (Virtanen, 1960). Probówkę 8 napowietrzoną w 11 dniu inkubacji używa się 14 dnia w celu sprawdzenia aktywności katalazy w temp. pokojowej oraz po ogrzaniu do temp. 68° przez 20 minut (Kubica i współpr. 1966). Ocenę wyników tej serii posiewów przedstawiono w tabeli 1.

IDENTYFIKACJA SZYBKO ROSNĄCYCH MYKOBAKTERII

Szczepy szybko rosnące, lub rozpoznane na podstawie obserwacji próbówki 11 w pierwszej serii, posiewa się na następującą serię pożywek:

- 1) płytką z pożywką oleinowo-agarową Dubosa (OAA),
- 2) płytką z pożywką McConkeya,
- 3) płytką pożywki agarowej z mączką kukurydzianą (CMA) — Jones współpr. 1965,
- 4) probówka pożywki L-J inkubowana w temp. 37°,
- 5) probówka pożywki L-J zawinięta w czarny papier 37°,
- 6) probówka pożywki L-J inkubowana w temp. 42°,
- 7) probówka pożywki L-J inkubowana w temp. 44,5°,
- 8) probówka pożywki L-J z dodatkiem 5% NaCl,
- 9) probówka pożywki zawierającej: fruktozę na zakwaszenie,
- 10) probówka pożywki z mannitolem również na zakwaszenie,
- 11) probówka pożywki dla zbadania asymilacji cytrynianu,
- 12) probówka pożywki agarowo-peptonowej do której dodano 0,5 ml 1% roztworu cytrynianu żelazowo-amonowego.

Pożywki 9—12 opisała Gordon i współpr. (1957, 1959). Probówki 1—5 inkubuje się w temp. 37°. Fotoindukcję bada się na probówkach 4 i 5. Probówki 8—13 inkubuje się w temp. 28°. Wyniki odczytuje się po tygodniu lub w odstępach cotygodniowych przez 1 miesiąc (probówki 9—11). Tabele 2 i 3 przedstawiają sposób oceny wyników i identyfikacji gatunku mykobakterii.

KLINICZNA OCENA WYNIKU

A. GATUNKI SAPROFITYCZNE

M. flavescens (= *M. acapulensis*), *M. thermostabile*, *M. aurum*, *M. gastri*, *M. terrae* (= *M. nonchromogenicum*), *M. novum*, *M. triviale*, grupa „Radish”, *M. diernhoferi*, *M. smegmatis* (= *M. butyricum*), *M. lacticola*, *M. phlei*, *M. vaccae* (= *M. parafortuitum*), większość szczepów *M. gordoniae* (= *M. aquae*), *M. kansasii* (wysoka katalaza).

Tabela 1

Prątki wolno rosnące, nie dające wzrostu na podłożu z peptonem i na podłożu agarowym

Mykobakterie	Pigm	Niac	Nitr	Col Dubos	TH 5j.	33°	37°	42°	44,5	INH			Kat		Szereg amidazo- wy
										I	5	TCH mcg	T	68°C	
<i>M. tuberculosis</i>	—	+	+	R	—	+	+	+	—	S	S	+	—40	—	3,5,6
<i>M. bovis</i>	—	—	—	R	—	+	+	+	—	S	S	—	—40	—	3
<i>M. microti</i>	—	+	—	Oc	—	+	+	+	—	S	S	—	—40	—	3,5,6
<i>M. ulcerans</i>	—	—	—	R	—	+	—	—	—	R	R	+	—40	—	0
<i>M. kansasii</i>	foto	—	+	SmK	+	+	+	+	—	S/R	S	—	—50	+	3,5
<i>M. scrofulaceum</i>	skoto	—	—	SmGy/	—	+	+	+/-	—	R	R	—	>50	+	3,5,6
<i>M. gordonae</i>	skoto	—	—	SmGy/	+	+	+	—	—	R	S/R	—	>50	+	3/0
<i>M. flavescens</i>	skoto	—	+	Ry	+	+	+	+/-	—	S	S	—	>50	+	3,5,6
<i>M. sp. „2”</i>	skoto	—	—	—	+	+	+	+/-	—	R	R	—	>50	+	3
<i>M. avium</i>	—	—	—	SmT	—	+	+	+	+	R	R	—	<40	+	5,6
<i>M. i ntra-cellulare</i>	—	—	—	SmS	—	+	+	+/-	—	R	R	—	<40	+	5,6
<i>M. xenopei</i>	skoto	—	—	Xf	—	+	+	+	+	S	S	—	>50	—	5,6
<i>M. gastri</i>	—	—	—	SmK/R	+	+	+	—	—	S	S	—	>50	—	3,5
<i>M. terrae</i>	—	—	—	—	+	+	+	—	—	R	R	—	>50	+	0
<i>M. nonchromogenicum</i>	—	—	+	—	+	+	+	—	—	R	R	—	>50	+	5,6

Tabela 2

Prątki szybko rosnące

Mykobakterie		OAA	CMA	McC	Pigment
<i>chelonae ranae</i>	<i>M. fortuitum</i>	SmF	Smf Rf	Smf Rf	—
	<i>M. pelegrinum</i>	SmF	Smf Rf	Smf Rf	—
	<i>M. abscessus</i>	R/SmSa	R/SmSa	+	—
	<i>M. borstelense</i>	R/SmSa	R/—	—	—
	<i>M. smegmatis</i>	R/arb	R/arb	—/+	Lgt foto —/beżowy
	<i>M. phlei</i>	R	R	—	—
	<i>M. vaccae</i>	SmKt/Rt	SmKt/Rt	—	foto pomarańczowy
	<i>M. diernhoferi</i>	Sm G	Sm G	—	—
	<i>M. marinum</i>	R/SmK	R/SmK	—	foto żółty

37	42	45	52	NaCl	Fr	Suc	Mtol	Citr	Nitr	Niac	FeNH ₄ Citr	TH	
												5j	10j
+	+	—	—	+	+	—	—	+	+	—	+		V
+	—	—	—	+	+	—	+	+	+	—	+		V
+	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
+	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—/+	—	—	—
+	+	+	—	+	+	—	+	+	+	—	+	+	+
+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	—	+	+	+
+	+	—	—	+	+	+	+	+	—/+	—	+	+	+
+	—	—	—	—	+	—	+	—	+	—	+	+	+
—	—	—	—	—/+	—	—	—	—	—	—	—	+	+

Tabela 3

Szybko rosnące prątki *M. marinum*, dające wzrost na podłożu z peptonem i na podłożu agarowym

<i>marinum</i>	<i>chelonae</i>		<i>ranae</i>		<i>smegm.</i>	<i>phlei</i>	<i>diernh.</i>	<i>vaccae</i>
	<i>abscessus</i>	<i>borstel.</i>	<i>fort.</i>	<i>pereg.</i>				
FeNH ₄ citr —		FeNH ₄ citr +						
Fructose —		Fructose +						
		sucrose —						sucrose +
		McC +			McC —			
foto +	TH —	TH —	45° —	45° +	45° +	45° —		
TH +	McC +	McC —	McC +	McC	NaCl —	NaCl +		
33 37°	NaCl +	NaCl —	CMA:Smf Rf	+ / —	R	SmG		
	40° +	40° —	42 +	42 —	R arb	522 +		
			Mtol —	Mtol +	lgt foto		poma- rańczo- wy foto	

B. GATUNKI CHOROBOTWÓRCZE I POTENCJALNIE CHOROBOTWÓRCZE

M. tuberculosis, *M. bovis*, *M. microti*, *M. ulcerans*, *M. kansasii* (w płucach, gruczołach limfatycznych, skórze), *M. scrofulaceum* (= *M. marianum*), *M. paraffinicum*, *M. gordonae* (rzadko), *M. avium* (= *M. brunense*), *M. intracellulare* (*Battey bacilli*), *M. xenopei* (rzadko), *M. marinum* (= *M. balnei*), *M. platypocilus*, *M. ranae* (= *M. fortuitum*), *M. minetti*, *M. salmoniphilum*, *M. giae*, *M. chelonei* (= *abscessus*), *M. borstelense*, *M. runyonii*.

Klinicznie można wyróżnić cztery rodzaje zakażeń przez atypowe mykobakterie:

a) zmiany skórne i ropnie: *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. ranae*, *M. chelonei*, *M. kansasii* (rzadko), *M. scrofulaceum* (rzadko), *M. avium* (bardzo rzadko),

b) zapalenie węzłów limfatycznych szyjnych: *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. ranae*,

c) schorzenia płuc: *M. kansasii*, *M. avium*, *M. intracellulare* oraz *M. ranae*, *M. xenopei*, *M. scrofulaceum* i *M. gordonae* (bardzo rzadko),

d) uogólnione zakażenia (u chorych w stanach immunosupresji): *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*, *M. ranae*.

Zakażenia dróg moczowych przez atypowe mykobakterie dotychczas nie stwierdzono.

S. Pattyn

STRATEGY OF ROUTINE IDENTIFICATION OF ATYPICAL MYCOBACTERIA

Summary

Greatly as a result of the activities of the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy, some agreement between different laboratories has been reached on species identity and identification among atypical mycobacteria.

Reference laboratories receiving unknown strains are thus faced with the problem of setting up rational identification schemes. Such identification schemes should be as simple (and inexpensive) as possible, and their results as precise as possible.

For this reason it is necessary to use a battery of tests which are able to precise those characters that are "necessary and sufficient" to identify the different mycobacterial species, furthermore the procedure should be adapted to the working circumstances of each laboratory.

The procedure should include positive as well as negative characters and through the use of at least two characters for the identification of one species, controls are inbuilt in the identification scheme. This basic philosophy will be illustrated with the identification schemes in use in our own laboratory and the results of identifications performed with it.

The practical clinical importance of species identification resides in the possibility to precise the clinical importance of an isolate. Since the known mycobacterial species can be classified into 3 groups of: pathogens, saprophytes and pathogenic species, identification of mycobacterial species is now fulfilling its practical purpose better than some years ago.