

METODY DIAGNOSTYCZNE STOSOWANE W IDENTYFIKACJI PRĄTKÓW KWASOOPORNYCH W POLSCE

Mieczysław Janowiec

Instytut Gruźlicy w Warszawie
Dyrektor: doc. dr J. Leowski

Zagadnienie identyfikacji szczepów kwasoopornych izolowanych od chorych na gruźlicę było wielokrotnie tematem doniesień w piśmiennictwie krajowym, głównie były to doniesienia z Zakładu Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy w Warszawie, Kliniki Gruźlicy i Chorób Płuc Śl. Akademii Medycznej w Zabrze, Kliniki Gruźlicy i Chorób Płuc Akademii Medycznej we Wrocławiu, Sanatorium Przeciwgruźliczego w Górnem, Sanatorium Przeciwgruźliczego im. dr T. Chałubińskiego w Zakopanem, Szpitala Specjalistycznego w Nowym Dębem i Przychodni Przeciwgruźliczej w Tarnobrzegu.

Metodyka badań stosowana w tych ośrodkach była dobierana dowolnie w myśl ogólnie przyjętych zasad stosowanych dla badań tego typu w ośrodkach zagranicznych.

Paryski, jako jeden z pierwszych autorów krajowych, wprowadza swój własny model identyfikacji izolowanych przypadków chorobowych szczepów kwasoodpornych, wzorowany na klasyfikacji Runyona, Taqueeta, Freerksena, Meissner uwzględniając również zasady numerycznej klasyfikacji stosowanej przez Käßplera czy Tsukamurę.

Zespół pracowników Zakładu Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy w zbiorczej publikacji z lat 1964—1965 ocenił wartość i przydatność diagnostyczną dla badań rutynowych najczęściej stosowanych metod identyfikacji izolowanych z przypadków chorobowych szczepów kwasoopornych sugerując, że dla celów klinicznych określenie izolowanych szczepów jako: 1) szczepy zjadliwe, 2) szczepy zbliżone do zjadliwych, 3) szczepy saprofityczne i 4) szczepy zbliżone do saprofitycznych jest wystarczające. Kontynuowanie tych badań w latach następnych pozwoliło na dokładne opracowanie tego zagadnienia i przedstawienie na obecnym sympozjum wstępnych wyników naszych badań, co częściowo zostało już dokonane.

Badania dotyczące identyfikacji izolowanych od chorych na gruźlicę mykobakterii prowadzone są w 10 ośrodkach terenowych, różniących się

warunkami środowiskowymi zamieszkałych na tych terenach mieszkańców. Badaniom podlegają wszystkie izolowane na dobranych terenach szczepy prątków kwasoopornych. Chorzy wydalający szczepy atypowe są poddani wszechstronnym badaniom klinicznym dla stwierdzenia bezpośredniego związku między izolowanymi szczepami a stanem zdrowia chorych, szczególnie chorych wydalających szczepy atypowe. Badania te kontynuowane będą przez 3 kolejne lata. Ostateczne wyniki umożliwią wyciągnięcie wstępnych wniosków epidemiologicznych oraz pozwolą na stwierdzenie, czy występowanie tych szczepów w naszym kraju może być dla klinicytów w latach następnych problemem i w jakiej skali.

Przyjęty w naszym zespole system identyfikacji, izolowanych z materiałów diagnostycznych, pobranych od chorych na gruźlicę szczepów kwasoopornych oparty jest o dwustopniową identyfikację: wstępną — wykonywaną w ośrodku prowadzącym badania terenowe i wtórną — wykonywaną w centralnym ośrodku w Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy w Warszawie.

Wstępna identyfikacja oparta jest o testy możliwe do wykonania w każdym terenowym laboratorium, a więc przede wszystkim o testy oparte o morfologię komórki i kolonii bakteryjnej, czas i rodzaj wzrostu i wstępne badania enzymatyczne dotyczące aktywności niacyny, aktywności katalazowej i peroksydazowej oraz testu fotoindukcji.

Szczepy po wstępnej identyfikacji przekazywane są do dalszych badań mikrobiologicznych, których zakres obrazują tabele 1 i 2.

Tabela 1

Model wstępnej identyfikacji szczepów kwasoopornych, izolowanych z materiałów diagnostycznych

Szczepy	Rodzaj wzrostu			Czas wzrostu		Test niacynowy	Pigment
	R	S	Ś1	szybki	wolny		
Ludzkie	+	—	—	—	+	+	—
Bydłęce	—	+	—	—	+	—	—
Ptasie	—	—	+	—	+	—	—
Fotochromogenne	—/+	+/-	—	—/+	+/-	—	po naświetleniu
Skotochromogenne	—	+	+/-	+/-	—/+	—	+
Niefotochromogenne	—	+	—	—	+	—	—
Szybko rosnące	+	+/-	—	+	—	—	+

R = wzrost szorstki, S = wzrost gładki, Ś1 = wzrost śluzowy, + = odczyn dodatni, — = odczyn ujemny

Jak wynika z tabeli 3 z 504 404 materiałów diagnostycznych uzyskanych od 108 226 chorych na gruźlicę w 1970 r. izolowano ogółem 32 694 szczepy kwasoodporne. Wśród izolowanych szczepów w 97,8⁰/100 stwierdzono szczepy ludzkie, w 0,1⁰/100 szczepy bydłowe i w 2,1⁰/100 szczepy atypowe.

Wśród izolowanych szczepów atypowych występowanie szczepów fotochromogennych stwierdzono w stosunkowo niewielkim odsetku, większość stanowiły szczepy skotochromogenne, niefotochromogenne i szybko rosnące (tab. 3).

Szczepy atypowe izolowano w 1970 r. od 669 chorych, co stanowiło 0,6⁰/100 chorych na gruźlicę. Wśród chorych wydalających szczepy atypowe w 90,5⁰/100 stwierdzano je jednorazowo a w 9,5⁰/100 wielokrotnie (tab. 4).

Dane rozpoznawcze za rok 1970 pozwoliły na dobranie właściwych środowisk badawczych, które w latach następnych zostaną wielokrotnie przekontrolowane w celu wyciągnięcia konkretnych wniosków.

Wstępna analiza tych środowisk przedstawiona w tabelach 5 i 6 pozwala na wyciągnięcie wniosków związanych z występowaniem szczepów atypowych w naszym kraju.

W 1971 r. w 11 ośrodkach badawczych kontroli poddano 554 555 materiałów diagnostycznych uzyskanych od 232 610 chorych na gruźlicę z różnych środowisk. Szczepy kwasoodporne uzyskano w 38 257 przypadkach, w tym ludzkie w 94,46⁰/100, bydłowe w 0,03⁰/100 i atypowe w 3,5⁰/100 przypadków. Szczepy atypowe uzyskano od 1063 chorych (0,4⁰/100), w tym jednorazowo w 90,3⁰/100 i wielokrotnie w 9,7⁰/100.

Wśród analizowanych w 1971 r. szczepów atypowych występowanie szczepów fotochromogennych stwierdzono w 1,2⁰/100, skotochromogennych w 33,0⁰/100, niefotochromogennych w 25,7⁰/100 i szybko rosnących w 40,1⁰/100 przypadków.

Porównując wstępną identyfikację szczepów, wykonaną w Ośrodkach terenowych, z wtórną identyfikacją tych szczepów, dokonaną w placówce centralnej, zgodność wyników uzyskano w 78,3⁰/100 przypadków.

Przedstawione w tabelach wstępne wyniki badań pozwalają na stwierdzenie faktu, że na terenie naszego kraju spotkać można właściwie wszystkie odmiany mykobakterii. Jakkolwiek rozpoczęte badania nie mogą sugerować ostatecznych wniosków, możliwych do uzyskania dopiero po zakończeniu zaplanowanych badań na lata 1974—1975, to jednak wielokrotnie potwierdzają nasze spostrzeżenia, a mianowicie, że zagadnienie występowania szczepów atypowych w naszym kraju w chwili obecnej nie jest jeszcze problemem klinicznym. Odsetek izolowanych szczepów atypowych, podobnie jak w latach ubiegłych, sięga rzędu 2,1—3,5⁰/100 wszystkich izolowanych szczepów kwasoodpornych, a więc jest stosunkowo niski.

Gatunek mykobakterii	Kod dla identy										
	Wzrost w 25°C	Wzrost w 37°C	Wzrost w 45°C	Test fotosyntezy	Pigment	Odbarwienie podłoża Wagoner-Mitscherlicha	Wzrost głębinowy w agarze Lebeke	Czerwień obojętna, test na podłożu Beeukwesa	Wzrost na podłożu z dod. 0,2% PAS-u	Wzrost na podłożu z dodatkiem 2% Fe-citr.	Wzrost na podłożu z dod. 500 j hydroksylaminy
<i>M. tuberculosis</i>		+				+		+			
<i>M. bovis</i>		+					+	+			
<i>M. microti</i>		+						+			
<i>M. kansasii</i>	+	+		+				+			
<i>M. scrochromogenis</i>	+	+	+		+						
<i>M. avium</i>	+	+	+		+						+
<i>M. batlei</i>	+	+	+		+						+
<i>M. xenopeii</i>		+	+		+						+
<i>M. gastri</i>		+	+								+
<i>M. terrae</i>		+	+								+
<i>M. "radish"</i>	+	+									
<i>M. phlei</i>	+	+	+		+						
<i>M. smegmatis</i>	+	+	+		+					+	
<i>M. fortuitum</i>	+	+						+	+	+	+
<i>M. pseudofortuitum</i> "A"	+	+							+		+
<i>M. pseudofortuitum</i> "B"	+	+							+	+	+

M. Janowiec

DIAGNOSTIC METHODS FOR THE CLASSIFICATION OF ACID-FAST STRAINS IN POLAND

Summary

Standard methods classifying acid-fast strains isolated from diagnostic materials from tuberculous patients used in Poland and the development of a mass survey by the use of these methods are described. The methods is based on two-step classification. The first step is carried out by the local laboratories which isolated the strain, and the second step at the Central Laboratory of the Microbiological Department of the Institute of Tuberculosis in Warsaw.

The preliminary classification is based on: morphology of isolated acid-fast strains on routine diagnostic Loewenstein-Jensen medium, growth on Loewenstein-Jensen medium containing 0,5 mg/ml of sodium salicylate (according to Tsukamura), the niacin test according to Peknice, test of photosynthesis, enzymatic

Tabela 2

fikacji mykobakterii

Oporność dla 10 j. Tb ¹	Oporność dla 10 j. TCH	Oporność dla 3 j. ETB	Oporność dla 10 j. RF	Test redukcji azotanów wg Tsukamary	Test niacynowy w Peknice	Hydroliza Tween 80 wg Wayne'a	Arylsulfataza wg Kubicy	Benzamidaza	Ureaza	Nikotinamidaza	Pyrazinamidaza	Formamidaza	Hyperkatalaza wg Kubicy
	+				+				+	+			
+									+		+		
	+			+	+				+	+	+		
+	+	+	+			+	+		+			+	+
+	+	+	+				+			+	+		
	+	+								+	+		+
	%						+			+	+		+
i	+	+					+			+	+		+
	+		+	+		+	+			+	+		+
+	+	+	+	+		+	+	+		+	+	+	+
+	+		+	+			+		+	+	+	+	+
+		+		+			+		+		+	+	+
+	+	+					+		+	+		+	+
+	+	+							+	+		+	+
+	+	+		+		+	+		+			+	+

activity according to Bogen, and sensitivity to tuberculostatics (according to Pa-ryski).

The secondary classification bases on growth and morphology on Loewenstein-Jensen medium with 0,2% PAS and 2% ferric ammonium citrate and 0,5 mg/ml hydroxylamine, character of growth on Lebek, Beeukwes and Wagener-Mitscherlich media, arylsulfatase according to Kubica, amidase activities according to Bönicke (urease, nicotinamidase, pyrazinamidase and formamidase). Tween hydrolysis according to Wayne, and nitrate reduction according to Tsukamura. Sensitivity of the strains to Tb₁ (10 mcg/ml), ETB (3 mcg/ml), TCH (10 mcg/ml) and RF (10 mcg/ml) is also tested.

The preliminary method permits isolation of so-called atypical strains and differentiation of species as the basis of the secondary classification. All the patients from whom atypical strains are isolated (at least once) are submitted to detailed clinical analysis before final diagnosis and therapy are decided.

The prevalence of so-called atypical mycobacteria in Poland according to various authors in recent years is reported.

Tabela 3

Wstępna klasyfikacja szczepów izolowanych od chorych na gruźlicę w 1970 r.

Ośrodek	Liczba badanych materiałów diagnostycznych	Liczba chorych na gruźlicę	Wskaźnik badań bakterio-logicznych	Wstępna klasyfikacja izolowanych szczepów							
				ogółem		ludzkie		bydłęce		atypowe	
				liczba	%	liczba	%	liczba	%		
Instytut Gruźlicy Warszawa	21 669	3 146	6,8	2 650	96,3	2 549	96,3	55	2,0	46	1,7
DOSP Rabka	8 430	1 774	4,7	241	90,5	218	90,5	1	0,4	22	9,1
WPP Katowice	29 500	9 230	3,2	2 542	98,7	2 509	98,7	—	—	33	1,3
WPP Koszalin	57 220	8 589	6,6	4 107	100,0	4 107	100,0	—	—	—	—
PPG Krosno	8 390	3 168	2,6	857	87,0	745	87,0	—	—	112	1,3
WPP Rzeszów	111 645	22 452	4,8	8 397	100,0	8 397	100,0	—	—	—	—
StPP Warszawa	125 124	21 071	5,9	4 107	95,5	3 920	95,5	—	—	187	4,5
WPP Warszawa	85 645	25 550	3,3	7 699	98,6	7 402	98,6	—	—	297	1,4
MPP Wrocław	56 781	13 286	4,1	2 094	100 0	2 094	100 0	—	—	—	—
Ogółem	504 404	108 226	4,6	32 694	97,8	31 941	97,8	56	0,1	697	2,1

Tabela 4

Występowanie szczerpów atypowych u chorych na gruźlicę w 1970 r

Ośrodek	Charakter środowiska	Liczba chorych na gruźlicę	Chorzy wydajający szczerpy atypowe					
			ogółem		jednorazowo		wielokrotnie	
			liczba	%	liczba	%	liczba	%
Instytut Gruźlicy Warszawa	dorośli, mieszany	3 146	53	1,6	48	90,6	5	9,4
DOSP Rabka	dzieci, rolniczo-miejski	1 774	30	1,6	27	88,9	3	11,1
WPP Katowice	dorośli, przemysł (kopalnie)	9 230	7	0,07	2	28,6	5	71,4
WPP Koszalin	dorośli, rolniczo-hodowlany	8 589	—	—	—	—	—	—
PPG Krosno	dorośli, rolniczy, przemysł naftowy	3 168	112	3,5	89	79,5	23	20,5
WPP Rzeszów	dorośli, rolniczy	22 452	—	—	—	—	—	—
StPP Warszawa	dorośli, rolniczo-przemysłowy	25 071	187	0,8	174	92,6	13	7,4
WPP Warszawa	dorośli, rolniczy	25 550	280	1,0	265	94,9	15	5,1
MPP Wrocław	dorośli, przemysłowo-rolniczy	13 286	—	—	—	—	—	—
Ogółem	—	108 226	669	0,6	605	90,5	64	9,5

Tabela 5

Wstępna klasyfikacja szczepów izolowanych od chorych na gruźlicę w 1971 r.

Ośrodek	Liczba badanych		Liczba chorych na gruźlicę	Wskaźnik badań bakteriologicznych	Wstępna klasyfikacja izolowanych szczepów							
	materiałów diagnostycznych	chorych			ogółem		ludzkie		bydłęce		atypowe	
					liczba	%	liczba	%	liczba	%	liczba	%
Instytut Gruźlicy Warszawa	11 096	1 636	6,7	1 315	1 300	98,9	—	—	15	1,5		
WPP Gdańsk	71 605	60 853	1,1	5 638	5 610	99,6	7	0,1	21	0,3		
WPP Katowice	34 000	15 000	2,2	2 900	2 896	98,8	—	—	39	1,2		
WPP Koszalin	47 472	18 000	2,6	3 020	2 989	99,0	—	—	31	1,0		
PPG Krosno	7 472	3 639	2,0	189	109	57,7	—	—	80	42,3		
MPP Łódź	41 735	8 537	4,8	1 898	1 873	98,9	—	—	25	1,1		
DOSP Rabka	8 026	1 171	6,0	399	365	91,6	3	0,7	31	7,7		
WPP Rzeszów	101 611	22 462	4,5	7 784	7 553	97,1	—	—	231	2,9		
StPP Warszawa	108 558	68 415	1,5	8 328	8 025	96,6	—	0,04	281	3,3		
WPP Warszawa	65 354	19 605	3,3	5 960	4 550	93,2	—	—	410	6,8		
MPP Wrocław	57 608	13 292	4,3	826	820	99,6	—	—	6	0,4		
Ogółem	554 555	232 610	2,3	38 257	36 035	96,46	14	0,03	1 170	3,5		

Tabela 6

Występowanie szczepów atypowych u chorych na gruźlicę w 1971 r.

Ośrodek	Charakter środowiska	Liczba chorych na gruźlicę	Chorzy wydalający szczepy atypowe					
			ogółem		jednorazowo		wielokrotnie	
			liczba	%	liczba	%	liczba	%
Instytut Gruźlicy Warszawa	dorośli mieszkani dorośli	1 636	0,9	15	100,0	—	—	
WPP Gdańsk	rolniczo-rybacki dorośli	60 853	0,02	12	85,8	2	14,2	
WPP Katowice	przemysł, kopalnie dorośli	15 000	0,08	5	41,6	7	58,4	
WPP Koszalin	rolniczo-hodowlany dorośli	18 000	0,1	16	88,9	2	11,1	
PPG Krosno	rolniczy, przemysł naftowy dorośli	80	2,9	78	98,5	2	2,5	
MPP Łódź	przemysłowy dzieci	8 537	0,1	10	71,5	4	28,5	
DOSP Rabka	rolniczo-miejski dorośli	1 171	2,0	20	83,4	4	16,6	
WPP Rzeszów	rolniczy dorośli	22 462	0,7	163	98,2	3	1,8	
StPP Warszawa	przemysłowo-rolniczy dorośli	68 415	0,4	261	80,4	64	19,6	
WPP Warszawa	rolniczy dorośli	19 605	2,0	373	95,9	16	4,1	
MPP Wrocław	przemysłowy	13 292	0,04	6	100,0	—	—	
Ogółem	—	232 610	0,4	959	90,3	104	9,7	