

## Komentarz do prac

Oddajemy w ręce Czytelników numer poświęcony wybranym zagadnieniom mikrobiologii chorób infekcyjnych. Mikrobiologia chorób zakaźnych, chociaż należy do bardzo młodych dziedzin nauk medycznych rozwinęła się w ostatnich dwóch dekadach z ogromną dynamiką, głównie dzięki zastosowaniu badań molekularnych w diagnozowaniu czynników etiologicznych chorób ludzi i zwierząt. Obecnie klasyczne metody hodowania mikroorganizmów zostały uzupełnione szybkimi testami genetycznymi potwierdzającymi procesy chorobowe i ważniejsze funkcje mikroorganizmów. Epidemiologia molekularna pozwala na identyfikowanie dróg transmisji choroby, określanie czynników ryzyka tej transmisji, może charakteryzować interakcje zachodzące pomiędzy gospodarzem i patogenem, wykrywać mikroorganizmy, których nie udaje się wyhodować *in vitro*, pozwala lepiej rozumieć patogenezę mikroorganizmów na poziomie molekuł.

Oddając w ręce lekarzy artykuły omawiające nowoczesne badania w niektórych działach mikrobiologii chorób infekcyjnych mamy nadzieję, że przyczynią się one do zrozumienia wielu kierunków obecnie prowadzonych badań naukowych, a nowoczesna diagnostyka jaką dysponujemy przyniesie korzyści w procesie opieki nad chorymi.

Pomimo, że żyjemy w XXI wieku, prace dotyczące chorób wywołanych przez bakterie z rodzaju *Mycobacterium* należą ciągle do istotnych problemów zdrowotnych wśród innych chorób zakaźnych. Dwa główne gatunki – *Mycobacterium leprae* i *Mycobacterium tuberculosis*, jedne z najstarszych bakterii na świecie powodują wciąż śmierć wielu milionów ludzi.

Artykuł poglądowy na temat *Mycobacterium leprae* przypomina, że trąd stanowi ciągle ważny, światowy problem zdrowotny występując nie tylko w krajach trzeciego świata, ale w wielu krajach rozwiniętych w tym również w Europie. WHO szacuje liczbę ludzi dotkniętych trądem na 10-12 mln. Pomimo swojej wielowiekowej historii, diagnostyka trądu jest bardzo trudna, przede wszystkim z powodu występowania choroby w wielu formach i odmianach klinicznych, ale również z powodu braku metod hodowania bakterii *in vitro*. Wiele zjawisk związanych z przeżywaniem prątków poza organizmem człowieka, przypuszczalnej transmisji pomiędzy ludźmi i zwierzętami, a może i ze środowiska, gdzie bakterie przeżywają, jest stale niewyjaśnionych. Długotrwałe leczenie dapsonem w monoterapii doprowadziło do wystąpienia form opornych na leki i dopiero zarekomendowane przez WHO w latach 80. XX w. leczenie wielolekowe zaczęło przynosić pożądane efekty. Poznanie w latach 90. XX w. genomu *M. leprae* spowodowało odkrycie wielu nieznanych dotąd cech przeżywania bakterii w środowisku człowieka, wprowadzenie molekularnej diagnostyki mikrobiologicznej do praktyki klinicznej, umożliwiło identyfikację specyficznych białek, dając szansę na rozwój testów immunodiagnostycznych, a w przyszłości opracowanie nowych leków i szczepionek.

Inna choroba wywołana *Mycobacterium tuberculosis* gruźlica należy do grupy największych zabójców ludzi. Zgony spowodowane gruźlicą zajmują po HIV i AIDS drugie miejsce, zabijając każdego roku około 3 mln ludzi. Gruźlica, chociaż znana jako choroba od wieków, a od ponad 100 lat znany jest jej czynnik przyczynowy i dostępne są leki do jej leczenia, nie wygasa, a nawet przeciwnie, w wielu regionach świata narasta. Znaczne pogorszenie się sytuacji epidemiologicznej gruźlicy w świecie stało się faktem i nie można już traktować tej choroby jako „choroby przeszłości”. Światowa Organizacja Zdrowia uznała w końcu ubiegłego wieku gruźlicę jako zagrożenie dla zdrowia ludności w skali całego Globu. Do rozprzestrzeniania się choroby i jej transmisji pomiędzy ludźmi przez kontynenty przyczyniają się niepokoje etniczne, konflikty wojenne, również łatwe turystyczne i zarobkowe przemieszczanie się ludzi po świecie. Szybkie diagnozowanie chorych i włączanie leczenia przeciwprątkowego, te dwa elementy należą do najważniejszych metod walki z gruźlicą. Gruźlica oporna na leki, a szczególnie jej odmiany MDR-TB i XDR-Tb stanowią poważny problem zagrażający zdrowiu i zwalczaniu choroby w wymiarze globalnym. Podczas gdy gruźlica lekowrażliwa jest chorobą całkowicie wyleczalną w standardowym czasie 6 miesięcy, leczenie form opornych wymaga często 2 i więcej lat, a wyleczenie uzyskuje się zaledwie u połowy chorych nowo wykrytych i około 1/3 wcześniej leczonych. Również wskaźnik umieralności jest wysoki. Zbieranie danych o częstości występowania gruźlicy lekoopornej u chorych nowo wykrytych (lekooporność pierwotna) i wcześniej leczonych (lekooporność nabyta) stała się obowiązkiem narzuconym przez WHO w latach w 90. XX w. Artykuł zamieszczony w niniejszym numerze omawia wyniki 4 kolejnych badań prowadzone wg protokołu WHO w Polsce.

Poważnym mankamentem testów lekooporności prątków gruźlicy poza długim czasem oczekiwania na wynik (4-5 tyg.) jest brak dostępności dobrze wystandaryzowanych metod, co powoduje trudności w klinicznej interpretacji zjawiska lekooporności. Trudności ze standaryzacją antybiogramu prątków gruźlicy są tylko częścią problemów metodycznych dotyczących również innych procedur diagnostycznych, takich jak: wyhodowanie szczepu, bakterioskopia i typowanie *Mycobacterium* do gatunku. Testy lekooporności prątków są badaniem wysoko specjalistycznym i wg zaleceń WHO powinny być wykonywane w laboratoriach III stopnia referencyjności.

Kolejny artykuł omawia ww. problemy i wyniki badań nad oceną nowego, automatycznego, systemu hodowlanego wprowadzonego w Polsce do hodowania i badania lekooporności prątków gruźlicy.

Jak wspomniano wyżej WHO zobligowało wszystkie kraje świata do prowadzenia regularnych badań epidemiologicznych, dotyczących czterech głównych leków przeciwprątkowych. Do grupy leków I rzędu należy również pyrazinamid (PZA), u którego z powodu braku wystandaryzowanej metody przez wiele lat nie wykonywano testów lekooporności. Praca, którą prezentujemy jest częścią pierwszych polskich badań nad występowaniem oporności na PZA wśród prątków gruźlicy u polskich chorych. Z badań wynika, że częstość ta jest niespodziewanie wysoka i dotyczy nie tylko szczepów izolowanych od chorych wcześniej leczonych, ale również nowowyciętych. Wobec powyższego test lekooporności na PZA powinien wejść w Polsce do badań rutynowych.

Nadzór nad gruźlicą, oprócz wczesnego wykrywania chorych prątkujących i ich leczenia, obejmuje również śledzenie dróg transmisji zakażenia, w pierwszym rzędzie u osób z bliskiego otoczenia chorego, w celu wykrycia lub wykluczenia u nich gruźlicy. Oprócz tego dochodzenie epidemiologiczne powinno objąć wszystkie osoby, które miały krótszy lub dłuższy kontakt z chorym. WHO proponuje badać tych ludzi grupując ich w „kręgi epidemiologiczne”, wyznaczone wg czasu trwania oraz bliskości kontaktów z chorym. Pomimo, że od lat wiadomo o narażeniu na zachorowanie u osób z otoczenia chorego, w wielu krajach wykrywanie chorych na gruźlicę wśród „kontaktów” nadal pozostaje na niskim poziomie, co powoduje niekontrolowane rozprzestrzenianie się choroby. Obecnie w dochodzeniach epidemiologicznych w gruźlicy, duże znaczenie mają molekularne metody identyfikacji wzorów DNA prątków. Dzięki nim możliwe jest wskazanie kierunku transmisji pomiędzy chorymi nie powiązanymi epidemiologicznie. Szacuje się, że metody genetyczne mogą zwiększyć o 40% liczbę wykrywanych transmisji niemożliwych do identyfikacji jedynie drogą konwencjonalnych dochodzeń. Autorzy artykułu w molekularnych badaniach własnych potwierdzili transmisję gruźlicy lekoopornej pomiędzy członkami badanych rodzin i zidentyfikowali szczególnie niebezpieczne szczepy prątków z rodziny molekularnej *Mycobacterium tuberculosis* Beijing 1.

Skuteczność i bezpieczeństwo leczenia przeciwprątkowego mogą być zakłócone u ludzi łatwym nabywaniem oporności przez prątki pod wpływem kontaktu z lekiem, w tym szczególnie z dawkami suboptymalnymi. Jednym z czynników, które mogą wpływać na obniżenie stężeń głównego leku przeciwprątkowego izoniazydu (INH) w krwioobiegach jest proces acetytacji, zdeterminowany genetycznie mutacjami w genie NAT2. Różnice w dynamice acetytacji wpływają również na występowanie działań niepożądanych leku, głównie hepatotoksyczności, co pogarsza schematy leczenia. Autorzy prezentują nowoczesne badania nad molekularnym testem wykrywającym polimorfizm genów wpływających na szybkość procesu acetytacji u ludzi leczonych INH, wskazując jego przydatność w monitorowaniu leczenia gruźlicy.

Specyficzną cechą *Mycobacterium tuberculosis* jest przechodzenie mikroorganizmu w stan latencji (LTBI – zakażenia utajonego). WHO ocenia powszechność tego zakażenia na 1/3 ludności Globu. Ze względu na ryzyko progresji od zakażenia utajonego do aktywnej choroby identyfikacja osób z zakażeniem latentnym staje się kluczowym elementem w programach zapobiegania gruźlicy. Wykrywanie utajonego zakażenia prątkami gruźlicy ma również ważne znaczenie w innych schorzeniach, gdy zachodzi konieczność leczenia lekami biologicznymi, które mogą przyspieszyć proces przejścia utajonego zakażenia w aktywny proces gruźlicy.

Autorzy przedstawiają pierwsze porównania w naszym kraju dwóch dostępnych w Polsce testów interferonowych IGRA opartych na antygenach białkowych ESAT-6 i CEP 10, kodowanych w regionie RD1 genomu *M. tuberculosis*, nieobecnych w szczepie szczepionkowym *M. bovis* BCG. Testy IGRA porównują z odczynem tuberkulinowym. Omawiają wady, zalety i niezgodności wyników 3 testów.

Oprócz człowieka, gruźlica jest chorobą wielu gatunków zwierząt. Występuje u bydła, zwierząt wolno żyjących np.: żubrów, jeleni, dzików, rysi, borsuków, frotek i innych. W Polsce każdego roku gruźlica jest wykrywana u zwierząt utrzymywanych w ogrodach zoologicznych oraz na fermach hodowlanych. Zakażeniu sprzyjają kontakty, które zdarzają się na pastwiskach i łąkach. Transmisja gruźlicy może przebiegać w dwóch kierunkach: od zwierząt do ludzi i odwrotnie od ludzi do zwierząt. Dlatego bardzo ważne jest wczesne wykrywanie gruźlicy u zwierząt. Kolejny artykuł omawia identyfikację *post mortem* gruźlicy u żubrów, wskazując jak ważny w nadzorze nad chorobą u ludzi jest również ścisły nadzór nad chorobami zwierząt.

Do rodzaju *Mycobacterium* oprócz bezwzględnych patogenów należą również prątki niegruźlicze (MOTT – inne niż gruźlicze, NTB – niegruźlicze), które mogą być przyczyną nierozróżnialnych klinicznie i radiologicznie schorzeń u ludzi – mykobakterioz. Jednocześnie ich naturalnym miejscem przeżywania jest środowisko człowieka – głównie gleba i woda. Gdy są powodem choroby wymagają leczenia, na ogół dłuższego niż gruźlica i wieloma lekami. Dlatego prace molekularne nad najczęściej występującymi gatunkami prątków – czynników etiologicznych mykobakterioz należą do grupy nowoczesnych badań na świecie. Autorzy prezentują genotypowanie *Mycobacterium kansasii*, gatunku prątków MOTT najczęściej występującego w Polsce zarówno u chorych cierpiących na pylice płuc, POCHP, mukowiscydozę, choroby nowotworowe, AIDS u zakażonych wirusem HIV, jak i w środowisku.

Badania nad *Bacillus anthracis* wywołujących chorobę zakaźną zwaną wąglikiem trwają już ponad 100 lat, tj. od chwili odkrycia jej przez Roberta Kocha. Chociaż głównie wrażliwe na zachorowania są zwierzęta roślino-

żerne, choroba może występować u wszystkożernych, mięsożernych oraz u ludzi. U człowieka w zależności od drogi zakażenia wąglik może przebiegać w trzech postaciach: skórnej, związanej z uszkodzeniem i zakażeniem skóry, płucnej, jako skutek wdychania przetrwalników wąglika lub jelitowej na skutek spożywania zakażonej żywności lub wody. Nad celowością badań nad wąglikiem przemawia możliwość zaimportowania zakażonych produktów z krajów, w tym sąsiadujących z Polską, gdzie wąglik występuje nadal enzootycznie oraz jego naczelną rolą jako czynnika broni biologicznej w aktach bioterrorystycznych. Autorzy zastosowali metody molekularne dla rozpoznawania *B. anthracis* i odróżnienia go od innych występujących w środowisku nie patogennych mikroorganizmów: *B. cereus*, *B. mycoides* i *B. thuringiensis*.

Oprócz wielu cech zjadliwości, oporności na antybiotyki, inną ułatwiającą przetrwanie mikroorganizmów w stadium inwazji jest zdolność tworzenia biofilmu. Wiele gatunków mikroorganizmów posiada tę zdolność. Biofilm to przytwierdzona do powierzchni ustrukturowana społeczność komórek bakteryjnych, wykazująca cechy fenotypowe różne od komórek występujących w formie planktonicznej, jak np.: obniżona wrażliwość na leki, większa inwazyjność i inne, co przyczynia się do przedłużania się stanu zapalnego i utrudnia proces gojenia. Ponadto różne gatunki bakterii tworzące biofilm mogą „współpracować” ze sobą pogłębiając problem. Kolejny artykuł omawia zdolność wyizolowanych od chorych szczepów gronkowca złocistego do tworzenia biofilmu i ich analizę genotypową. Artykuł jest poprzedzony obszernym omówieniem tworzenia się biofilmu i jego negatywnej roli w chemioterapii zakażeń.

Kolejny artykuł omawia trudności w klinicznej i mikrobiologicznej diagnostyce badania etiologii wysięków opłucnowych u ludzi. Gdy chodzi o przyczyny infekcyjne, w Polsce brakuje miarodajnych danych o częstotliwości występowania różnych chorób z wysiękiem w jamie opłucnej. Autorzy na podstawie diagnostyki ponad 2500 chorych leczonych na oddziałach zabiegowych i zachowawczych z wysiękiem opłucnowym analizują wyniki posiewów bakteriologicznych i określają wzory lekooporności bakterii w powiązaniu z postawionym rozpoznaniem klinicznym.

W zakażeniach szpitalnych, na które są narażeni chorzy poddani procedurom medycznym ważnym czynnikiem są różne gatunki grzybów. *Candida parapsiliosis*, którą omawiają autorzy kolejnego artykułu jest ważnym czynnikiem drożdżakowatego, odcewnikowego zakażenia łożyska. Zjadliwość jest spotęgowana zdolnością do kolonizacji sztucznych powierzchni i tworzenie biofilmu. Ponadto gatunek, zakażając człowieka, występuje w wielu formach fenotypowych, nie łatwej do mikrobiologicznej identyfikacji, co utrudnia i tak skomplikowaną diagnostykę grzybów. Autorzy zaobserwowali występowanie zmienności genotypowej u około 20% hodowli otrzymanych od chorych. *Candida parapsiliosis* występowała w 4 głównych morfotypach ze zmiennością cech biochemicznych i zróżnicowaną zdolnością do wytwarzania biofilmu. Badania powyższe mają istotne znaczenie w diagnostyce grzybic u chorych.

Wśród licznych we współczesnym świecie zakażeń grzybiczych, najczęstszą ich lokalizacją pozostaje skóra i jej wytwory. Wiele gatunków grzybów bierze udział w tym procesie: dermatofity, grzyby drożdżopodobne oraz pleśniowe. Chociaż w większości przypadków grzybice powierzchniowe nie zagrażają życiu chorych, jednak w wielu przypadkach są uciążliwe i przenoszą się pomiędzy ludźmi. Dla osób z immunosupresją mogą stanowić wrota zakażenia dla grzybic układowych wywołanych przez grzyby pleśniowe. Pomimo ciągłego postępu w rozpoznawaniu i leczeniu powierzchniowych zakażeń grzybiczych stanowią one nadal poważny problem terapeutyczny i społeczny, a z uwagi na możliwość zakażenia innych osób stanowią również problem epidemiologiczny. Autorzy w artykule analizują gatunki grzybów izolowanych od ponad 2000 chorych kierowanych przez lekarzy różnych specjalności z podejrzeniem o grzybicę powierzchniową. Autorzy omawiają metodykę mikrobiologiczną, wywiad prowadzony z chorymi przed wykonaniem badania i analizują gatunki izolowane z różnych okolic ciała, biorące udział w zakażeniach. Przedstawione dane mogą być pomocne w empirycznym stosowaniu leków, w sytuacjach, gdy nie ma możliwości wykonania pełnego badania mikrobiologicznego. Jednak, w każdym przypadku należy dążyć do wykonania takiej diagnostyki.

## PODSUMOWANIE

Celem diagnostyki mikrobiologicznej jest poszukiwanie patogenu i jego identyfikacja. Prawidłowe rozpoznanie zależy od pobrania materiału, sposobu jego transportu i/lub przechowywania oraz interpretacji wyników. Sam wynik bez prawidłowej interpretacji bakteriologicznej nie spełnia swojej roli i może być błędnie rozumiany przez lekarza.

*Prof. dr hab. Zofia Zwolska*  
*Zakład Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc*