

©Borgis

*Monika Kozińska, Katarzyna Wasiak, Magdalena Klatt, Ewa Augustynowicz-Kopeć

Zakażenia krzyżowe w rutynowej diagnostyce w laboratoriach prątków – czynniki ryzyka, wykrywanie i sposoby ich zapobiegania

Cross-contamination in routine diagnostic in the mycobacteriology laboratories – risk factors, detection and prevention

Zakład Mikrobiologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa
Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. Ewa Augustynowicz-Kopeć

Słowa kluczowe

laboratoryjne zakażenie krzyżowe, wyniki fałszywie pozytywne, *Mycobacterium tuberculosis*

Key words

laboratory cross-contamination, false-positive cultures, *Mycobacterium tuberculosis*

Streszczenie

Wstęp. Stwierdzenie obecności prątków należących do *Mycobacterium tuberculosis* complex w materiale klinicznym od chorego jest podstawą mikrobiologicznego potwierdzenia gruźlicy, a wyhodowanie szczepu stanowi pewny dowód aktywnej choroby. Wyniki licznych badań pokazują, że około 0,1-4% uzyskanych hodowli może być wynikiem krzyżowej kontaminacji. Dochodzi do niej najczęściej podczas procedur diagnostycznych – głównie w trakcie opracowania i posiewu materiałów od chorych, rzadziej w wyniku zakażenia w czasie zabiegów medycznych.

Cel pracy. Częstość występowania zakażeń krzyżowych podczas rutynowej diagnostyki gruźlicy w Krajowym Referencyjnym Laboratorium Prątków (KRLP).

Materiał i metody. W latach od 2011 do czerwca 2014 roku KRLP otrzymało 28 308 materiałów klinicznych od chorych z podejrzeniem gruźlicy. Materiał do analizy stanowiło 598 szczepów *Mycobacterium tuberculosis* complex wyhodowanych od 408 chorych. Do badań epidemiologicznych i molekularnych wyselekcjonowano 26 szczepów (4,3%), które wg wytycznych CDC spełniały kryteria podejrzenia zakażeń krzyżowych. Informacjami decydującymi o wyborze szczepów były: taka sama data posiewu i/lub kolejny numer badania w bliskiej odległości czasowej do materiału, z którego również uzyskano hodowlę.

Analizę molekularną szczepów przeprowadzono, wykorzystując metodę spoligotyping oraz MIRU-VNTR.

Wyniki. Zbadano 12 potencjalnych ognisk zakażeń wewnątrzlaboratoryjnych. Ostatecznie kontaminacje potwierdzono w 4 przypadkach. Konsekwencją było uzyskanie 5 (0,8%) fałszywych hodowli *M. tuberculosis* complex z ogólnej puli 598 szczepów.

Wnioski. Wykrywanie wewnątrzlaboratoryjnych kontaminacji materiałów od chorych z podejrzeniem gruźlicy ma znaczenie epidemiologiczne, kliniczne i terapeutyczne. Właściwy system nadzoru i identyfikacji zakażeń krzyżowych wymaga prawidłowego prowadzenia dokumentacji medycznej, wnikliwej analizy wyników badań przez mikrobiologów oraz zastosowania odpowiednich narzędzi biologii molekularnej w analizie porównawczej wzorów DNA badanych szczepów.

Summary

Introduction. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical material from the patient is the basis of microbiological confirmation of TB, and remains gold standard for diagnosis. The results of numerous studies show that about 0.1-4% derived culture may be the result of cross-contamination. It occurs most frequently during processes of collection and processing of clinical samples, as a result of infection during medical procedures.

Aim. Determining the incidence of cross-contamination in the National Tuberculosis Reference Laboratory during 2011-June 2014.

Material and methods. The material for the study were 598 isolates of *Mycobacterium tuberculosis* complex from 408 patients with suspected tuberculosis. For the epidemiological and molecular analysis we selected 26 (4.3%) cultures, which, according to the CDC guidelines, could be potentially false-positive. The information that determined the choice of strains is the same date of inoculation and the sequence number of the study or in close proximity to the material from which the culture was obtained. Molecular analysis of the strains was performed using spoligotyping and MIRU-VNTR methods.

Adres/address:

*Monika Kozińska
Zakład Mikrobiologii IGiChP
ul. Płocka 26, 01-138 Warszawa
tel./fax +48 (22) 431-21-82
m.kozinska@igichp.edu.pl

Results. We examined 12 potential cross-contamination incidents. Finally, contamination was confirmed in 4 cases. The consequence was to obtain 5 (0.8%) false-positive cultures of *M. tuberculosis* complex.

Conclusions. Detection of cross-contamination of materials from patients with suspected tuberculosis has epidemiological, clinical and therapeutic significance. Proper system of monitoring and identification of false positive cultures requires reliable medical documentation and using appropriate genotyping methods.

WSTĘP

Błędne rozpoznanie gruźlicy będące konsekwencją krzyżowej kontaminacji (ang. *cross-contamination*) podczas procedur diagnostycznych w laboratoriach prątko jest zjawiskiem znanym i opisywanym, a częstość jego występowania szacuje się na ok. 0,1-4% hodowli (1-5).

Jak udowodniono, główną przyczyną kontaminacji w laboratoriach prątko jest aerozol powstający podczas opracowywania materiałów od chorych z dodatnim wynikiem AFB (ang. *Acid-Fast Bacilli*) (2, 6). Fałszywie pozytywne wyniki mogą być również spowodowane zakażeniem materiałów klinicznych podczas procedur medycznych – bronchoskopii czy gastrokopii (7). Szybkie wykrycie i potwierdzenie zakażenia krzyżowego wymaga od mikrobiologa wnikliwej analizy pozytywnych wyników badań w kierunku gruźlicy. W tej sytuacji istotne znaczenie odgrywa szczegółowo prowadzona dokumentacja mikrobiologiczna umożliwiająca dokładne odtworzenie drogi, jaką przebył materiał kliniczny od momentu pobrania i dostarczenia do laboratorium, do etapu zakończenia diagnostyki i wydania wyniku.

Kryteria, na podstawie których można przypuszczać, że doszło do kontaminacji krzyżowej, zostały zdefiniowane i opisane przez CDC (3, 8). Zgodnie z zaleceniami, szczególną uwagę należy zwrócić na sytuacje, kiedy:

- hodowlę prątków uzyskano od chorego, u którego objawy, obraz i przebieg kliniczny choroby nie odpowiadają gruźlicy,
- hodowlę uzyskano tylko z jednego spośród wielu materiałów klinicznych gruźlicy przesłanych do diagnostyki,
- hodowlę uzyskuje się z materiałów opracowywanych tego samego dnia,
- czas wzrostu podejrzanej hodowli jest bardzo długi i skąpy bądź uzyskano wzrost jedynie kilku kolonii na pożywce stałej, przy braku hodowli na pożywkach płynnych,
- wzór DNA prątków wyizolowanych z podejrzanej/fałszywej hodowli jest identyczny ze wzorem potencjalnej hodowli źródłowej, przy jednoczesnym braku powiązania epidemiologicznego pomiędzy chorymi.

Ostateczne potwierdzenie fałszywie dodatniego wyniku badania wymaga zastosowania dochodzeń molekularnych. Uważa się, że uzyskanie identycznych profili DNA dla badanych szczepów *Mycobacterium tuberculosis* w sytuacji podejrzenia zakażenia krzyżowego jest dowodem kontaminacji. Wśród rekomendowanych metod

genotypowania najlepsza wydaje się metoda MIRU-VNTR – szybka, z wysokim potencjałem różnicującym (9). Analiza IS6110-RFLP nie jest zalecana w wykrywaniu kontaminacji laboratoryjnych ze względu na czasochłonne wykonanie opóźniające uzyskanie odpowiedzi i podjęcie kluczowych decyzji dla chorego (10).

CEL PRACY

Celem pracy było zbadanie częstości występowania zakażeń krzyżowych podczas rutynowej diagnostyki gruźlicy w Krajowym Referencyjnym Laboratorium Prątko, wskazanie czynników ryzyka oraz metod wykrywania i zapobiegania.

MATERIAŁ I METODY

Od wielu lat KRLP prowadzi molekularne dochodzenia epidemiologiczne umożliwiające monitorowanie prawidłowego wykonywania procedur opracowywania materiałów klinicznych i identyfikowania fałszywych hodowli *M. tuberculosis* complex. **W latach od 2011 do połowy 2014 roku Zakład Mikrobiologii otrzymał do analizy 28 308 materiałów klinicznych od chorych z podejrzeniem gruźlicy z całej Polski. Wyhodowano 598 szczepów *Mycobacterium tuberculosis* complex od 408 chorych. W oparciu o kryteria CDC, rozpatrzono 12 przypadków podejrzenia kontaminacji wewnątrzlaboratoryjnej.** Szczegółowej analizie epidemiologicznej i molekularnej poddano 26 (4,3%) szczepów prątków gruźlicy.

W trakcie opracowywania i posiewu materiałów klinicznych stosowano procedury obowiązujące we wszystkich laboratoriach prątko. Dla każdego materiału wykonywano preparat i posiew na pożywkę stałą L.-J. (ang. *Lowenstein-Jensen*), Stonebrink i płynne Middlebrook. Identyfikację wyhodowanych szczepów prątków wykonywano metodami molekularnymi (11). Genotypowanie szczepów przeprowadzano z zastosowaniem spoligotypowania (ang. *spoligotyping*) oraz analizy MIRU-VNTR (ang. *mycobacterial interspersed repetitive units-variable number tandem repeats*) (12, 13).

W dochodzeniach epidemiologicznych obserwacji poddano następujące parametry:

- mikrobiologiczne: data posiewu, numer badania, wynik bakterioskopii (AFB), czas i obfitość wzrostu szczepu na pożywkach, wyniki badań innych materiałów chorego w kierunku gruźlicy,
- molekularne: spoligotyp i wzór MIRU-VNTR wyhodowanego szczepu,
- epidemiologiczne: miejsce pobytu chorego – jednostka zlecająca badanie.

WYNIKI

Na podstawie analizy danych epidemiologicznych i mikrobiologicznych uzupełnionych o wytyczne CDC, spośród 598 szczepów *M. tuberculosis* complex wyselekcjonowano 26 (4,3%) hodowli podejrzewanych o pochodzenie z kontaminacji krzyżowej (3, 8). Wybrane szczepy należały do dwunastu niezależnych epizodów homogenizacji i posiewu materiałów klinicznych. Genotypowanie prątków potwierdziło zakażenie krzyżowe w 4 przypadkach (A-D) dla 10 materiałów diagnostycznych uzyskanych od 9 chorych. W pozostałych 8 sytuacjach wyhodowane szczepy posiadały indywidualne wzory molekularne, co ostatecznie wykluczyło je z grupy szczepów „fałszywych”. **Na podstawie uzyskanych wyników, częstość występowania zakażeń krzyżowych w laboratorium, w czasie objętym analizą, oszacowano na 0,8%.**

W tabeli 1 przedstawiono dane (nr badania, data posiewu, rodzaj materiału klinicznego, wiek, płeć chorego) dotyczące 4 przypadków krzyżowej kontaminacji wewnątrzlaboratoryjnej (A-D).

Tabele 2 i 3 zawierają, odpowiednio, wyniki badań mikrobiologicznych i molekularnych dla 9 chorych, od

których wyhodowano 10 szczepów poddanych szczegółowej analizie molekularnej.

W ognisku kontaminacji „B”, od jednego chorego, obficie prątkującego, wyhodowano 2 szczepy *M. tbc* (nr 4892, 4893). Jeden z nich był źródłem zakażenia krzyżowego dla materiału od chorego nr 4894.

Przypadek A – plwocina obficie prątkującego chorego (AFB+++) jako źródło kontaminacji popłuczyn oskrzelowych nieprątkującej kobiety (AFB-)

Przypadek dotyczył kobiety (58 l.) i mężczyzny (61 l.), od których pobrano popłuczyny oskrzelowe (nr badania 3776) i plwocinę (nr badania 3774). Materiały przesłano do IGiChP tego samego dnia i opracowywano w tym samym czasie (27.05.2011 r.). Mężczyzna obficie prątkował w badaniu bakterioskopowym (AFB+++), a po 15 dniach od posiewu na pożywkę stałej L.-J. uzyskano obfity wzrost (+++) *M. tuberculosis* complex. Obecność prątków gruźlicy u chorego stwierdzono również w innych materiałach diagnostycznych przesłanych do IGiChP. Popłuczyny oskrzelowe (nr badania 3776) pobrane od kobiety były

Tabela 1. Dane o chorych i materiałach klinicznych, z których wyhodowano szczepy należące do 4 przypadków kontaminacji krzyżowej.

Ognisko kontaminacji krzyżowej	Nr badania	Data posiewu	Płeć	Wiek	Rodzaj materiału	Miejsce pobytu chorego/ jednostka zlecająca badanie
A	3774	27.05.2011	M	58	Plwocina	Spoza IGiChP
	3776	27.05.2011	K	61	Popłuczyny oskrzelowe	
B	4892*	02.08.2012	M	34	Plwocina	Spoza IGiChP
	4893*	02.08.2012	M	34	Plwocina	
	4894	02.08.2012	K	64	Plwocina	IGiChP
C	7511	15.11.2013	M	81	Popłuczyny oskrzelowe	Spoza IGiChP
	7512	15.11.2013	K	33	Popłuczyny oskrzelowe	
D	562B	23.01.2014	M	48	Plwocina	Spoza IGiChP
	571	23.01.2014	M	76	Popłuczyny oskrzelowe	
	573	23.01.2014	K	66	Popłuczyny oskrzelowe	

*Materiały od tego samego chorego

Tabela 2. Wyniki badań mikrobiologicznych szczepów prątków pochodzących z 4 kontaminacji wewnątrzlaboratoryjnych.

Nr badania	Data posiewu	Wyniki badań mikrobiologicznych				Wyniki badań dla innych materiałów klinicznych		
		AFB	Posiew na pożywkę stałą/ obfitość/czas wzrostu	Posiew na pożywkę płynną/czas wzrostu	Badanie genetyczne z materiału od chorego			
A	3774	27.05.2011	+++	+++ /15 dni	NW	NW	+	
	3776	27.05.2011	-	+ /13 dni	NW	NW	NW	
B	4892*	02.08.2012	++	++ /18 dni	+ /7 dni	NW	NW	+
	4893*	02.08.2012	+++	+++ /18 dni	NW	NW	NW	+
	4894	02.08.2012	-	+ /79 dni	NW	NW	NW	-
C	7511	15.11.2013	-	+ /18 dni	+ /12 dni	+	NW	NW
	7512	15.11.2013	-	+ /46 dni	+ /19 dni	NW	NW	NW
D	562B	23.01.2014	+++	+ /18 dni	+ /18 dni	NW	NW	+
	571	23.01.2014	-	Brak wzrostu	+ /19 dni	NW	NW	NW
	573	23.01.2014	-	Brak wzrostu	+ /26 dni	NW	NW	NW

NW – nie wykonywano, P – pozytywny, N – negatywny

*Materiały od tego samego chorego

Tabela 3. Wyniki genotypowania metodą spoligotyping i MIRU-VNTR.

Nr badania	Wyniki genotypowania szczepów		
	Spoligotyping	MIRU-VNTR	
A	3774	T4_CEU1 39	352633232433335
	3776	T4_CEU1 39	352633232433335
B	4892*	H1 47	323634233232425
	4893*	H1 47	323634233232425
	4894	H1 47	323634233232425
C	7511	T2 52	353625232433538
	7512	T2 52	353625232433538
D	562B	T1 53	333634242232125
	571	T1 53	333634242232125
	573	T1 53	333634242232125

*Materiały od tego samego chorego

ujemne w bakterioskopii (AFB-), a po 13 dniach od posiewu na pożywce L.-J. zaobserwowano wzrost kilkunastu kolonii prątków. U chorej nie wykonano innych badań w kierunku gruźlicy. Szczepy wyhodowane od obojga chorych posiadały te same spoligotypy i wzory MIRU-VNTR. Na podstawie obfitości wzrostu prątków na pożywce L.-J. i wyników innych badań mikrobiologicznych tych chorych stwierdzono, że popłuczyny oskrzelowe (nr badania 3776) zostały skontaminowane w trakcie procedury diagnostycznej prątkami obecnymi w płwocinie (nr badania 3774).

Przypadek B – materiały chorego obficie prątkującego (AFB+++ /++) jako źródło kontaminacji płwociny pobranej od nieprątkującej kobiety (AFB-)

Kolejny przypadek podejrzany o zakażenie krzyżowe dotyczył trzech płwocin oznaczonych kolejnymi numerami badań (nr 4892, 4893, 4894), pozyskanych od dwojga chorych i opracowywanych tego samego dnia (02.08.2012 r.). Materiały nr 4892 i 4893 należały do 34-letniego mężczyzny – pacjenta jednej z warszawskich przychodni. Obie płwociny miały dodatni wynik bakterioskopii (AFB+++ /++) i z obu po 18 dniach inkubacji na pożywce L.-J. wyhodowano szczepy *M. tuberculosis* complex. Dodatkowo z płwociny nr 4892 po 7 dniach uzyskano hodowlę prątków na pożywce płynnej. W trzech materiałach pobranych od tego chorego w innym czasie również stwierdzono obecność prątków gruźlicy. W trakcie procedur laboratoryjnych materiałem znajdującym się w bezpośrednim sąsiedztwie z płwocinami chorego obficie prątkującego (nr 4892 i 4893) była płwocina (nr 4894) pacjentki z IGiChP, ujemna w bakterioskopii (AFB-). Wzrost kilkunastu kolonii *M. tuberculosis* complex z materiału od tej chorej uzyskano po 79 dniach inkubacji na pożywce stałej L.-J. Poza badanym materiałem, od chorej 5-krotnie pobierano płwocinę, za każdym razem otrzymując ujemne wyniki badań mikrobiologicznych w kierunku gruźlicy.

Analiza molekularna szczepów nr 4892, 4893 i 4894 potwierdziła ich pokrewieństwo na poziomie

genomu. Przeprowadzona analiza wyników badań mikrobiologicznych wykazała kontaminację materiału nr 4894 prątkami obecnymi w płwocinach chorego z AFB+++.

Przypadek C – niezidentyfikowane źródło kontaminacji materiałów bronchoskopowych pobranych od dwojga nieprątkujących chorych (AFB-)

Analizie poddano wyniki badań 81-letniego mężczyzny i 33-letniej kobiety – chorych przebywających w jednym z warszawskich szpitali. Popłuczyny oskrzelowe pozyskane od chorych opracowywano tego samego dnia (15.11.2013 r.), nadając im odpowiednio numery: 7511 i 7512 – co oznaczało, że w trakcie wszystkich czynności laboratoryjnych znajdowały się w bezpośrednim sąsiedztwie. Wyniki bakterioskopii dla obu materiałów były ujemne (AFB-). Z materiału od chorego nr 7511 po 12 dniach inkubacji uzyskano wzrost szczepu na pożywce płynnej, a po 18 dniach zaobserwowano wzrost kilkunastu kolonii na pożywce stałej L.-J. Ponadto w popłuczynach oskrzelowych potwierdzono obecność DNA prątków gruźlicy w badaniu genetycznym. Z popłuczyn od chorej nr 7512 po 19 dniach na pożywce płynnej otrzymano hodowlę *M. tuberculosis* complex, a po 46 dniach wzrost kilkunastu kolonii na pożywce L.-J. W przypadku obojga chorych opisane materiały były jedynymi przysłanymi do diagnostyki w kierunku gruźlicy do laboratorium.

Szczepy poddano analizie molekularnej, która wykazała zgodność wzorów DNA w obu zastosowanych metodach. Analiza wyników badań mikrobiologicznych w tym przypadku nie wskazała jednoznacznie, który materiał był źródłem kontaminacji.

Przypadek D – płwocina chorego obficie prątkującego (AFB+++) jako źródło kontaminacji popłuczyn oskrzelowych pobranych od dwojga chorych nieprątkujących (AFB-)

Analizie poddano 3 szczepy *Mycobacterium tuberculosis* uzyskane z materiałów klinicznych pobranych 23.01.2014 r. od dwóch mężczyzn (46 l.

i 76 l.) i kobiety (66 l.), przebywających w różnych warszawskich placówkach służby zdrowia. W płwocinie (nr badania 562B) należącej do jednego z mężczyzn (46 l.) w preparacie bezpośrednim stwierdzono prątki (AFB+++), a po 18 dniach uzyskano hodowle prątków gruźlicy na pożywce stałej i płynnej. Ponadto obecność prątków u tego chorego potwierdzono w badaniu płwociny pobranej innego dnia.

Pozostałe dwa materiały (popłuczyny oskrzelowe nr 571 i 573) w trakcie procedur laboratoryjnych nie znajdowały się w bezpośrednim sąsiedztwie z płwociną nr 562B. Materiał nr 571 należał do drugiego z mężczyzn (76 l.). Wynik bakterioskopii i posiewu na L.-J. był ujemny, natomiast po 19 dniach inkubacji na pożywce płynnej uzyskano hodowlę *M. tuberculosis complex*. Kolejny analizowany materiał nr 573 pobrano w trakcie bronchoskopii od 66-letniej kobiety. Bakterioskopia oraz posiew na pożywkę L.-J. dały wyniki ujemne, natomiast na pożywce płynnej po 26 dniach uzyskano hodowlę prątków.

Genotypowanie wykazało, że spoligotypy oraz wzory MIRU-VNTR badanych szczepów (nr 562B, 571 i 573) są identyczne. Potwierdziło to podejrzenie kontaminacji wewnątrzlaboratoryjnej prątkami znajdującymi się w płwocinie chorego 562B obficie prątkującego (AFB+++), w wyniku której uzyskano fałszywe hodowle z materiałów od dwóch pozostałych chorych.

DYSKUSJA

Nadzór nad wykonywaniem badań laboratoryjnych pozwala na zminimalizowanie ryzyka kontaminacji krzyżowych, jednak ich całkowicie nie eliminuje. Dlatego istotne jest monitorowanie prawidłowego przebiegu czynności diagnostycznych i wnikliwa analiza wyników badań mikrobiologicznych. Takie postępowanie umożliwia szybkie wykrycie podejrzenia o krzyżową kontaminację i rozpoczęcie procedury dochodzeń epidemiologicznych. W przeprowadzanych badaniach ważnym elementem jest porównanie wyników badań mikrobiologicznych z danymi demograficznymi i klinicznymi o chorych. Większość laboratoriów nie dysponuje tymi danymi, zatem identyfikacja potencjalnego źródła kontaminacji powinna opierać się przede wszystkim na rzetelnej obserwacji i dokumentacji rutynowych czynności diagnostycznych.

Procedurą wymagającą kontroli, szczególnie narażoną na powstawanie zakaźnych aerozoli, jest wieloetapowy i bardzo złożony proces homogenizacji i dekontaminacji materiałów diagnostycznych. Czas przygotowania próbek do posiewu nie pozwala na pojedyncze ich opracowywanie, zwłaszcza w laboratorium takim jak KRLP, gdzie każdego dnia do badań przyjmowanych jest ok. 60 materiałów. Dlatego próbki dzielone są na partie i opracowywane z użyciem tej samej wirówki i komory laminarnej. W komorach laminarnych, na skutek tworzenia się aerozolu, zawieszona w powietrzu cząstki kropelkowe zawierające prątki mogą dostawać się do kolejnych próbek. Procedury te sprzyjają kontaminacji materiałów będących w bliskim

sąsiedztwie, niekoniecznie bezpośrednio obok siebie, jak stwierdzono w niniejszej analizie. Zakażeniu mogą ulec pojedyncze próbki lub niekiedy całe partie, gdy skontaminowany odczynnik jest dodawanych z jednego naczynia do wszystkich materiałów (5, 14, 15).

Szczególną uwagę mikrobiolodzy powinni zwracać na sytuacje, gdy z kilku materiałów od tego samego chorego, ujemnych w bakterioskopii, uzyskuje się zaledwie jedną hodowlę. Taki incydent opisano w przypadku B, gdzie z materiałów od chorego tzw. „źródłowego”, obficie prątkującego (AFB+++), uzyskano potwierdzenie gruźlicy w badaniach innych materiałów, natomiast u chorego z AFB- i podejrzeniem „fałszywej hodowli”, wyniki badań innych materiałów były negatywne.

Niezwykle ważnym czynnikiem w śledzeniu błędów laboratoryjnych jest rejestracja w dokumentacji mikrobiologicznej obfitości i czasu wzrostu prątków na pożywkach. W przypadku kontaminacji, zakażenie wewnątrzlaboratoryjne spowodowane jest niewielką liczbą komórek prątków dających wzrost zaledwie kilku kolonii i wymaga dłuższego czasu inkubacji (2, 16, 17). W analizowanych sytuacjach B i C wzrost prątków pochodzących z kontaminacji wydłużył się do 79 i 46 dni, podczas gdy szczepy stanowiące źródło zakażenia wyrastały w ciągu 18 dni.

Należy zwracać również uwagę na sytuacje, w których hodowle uzyskuje się jedynie na pożywkach stałych, a nie obserwuje się ich w czulszych systemach wykorzystujących pożywkę płynną (18).

Jak opisano wyżej, w śledzeniu kontaminacji krzyżowych duże znaczenie mają informacje demograficzne i kliniczne o chorych. W przypadku C opisano dwóch chorych hospitalizowanych w tym samym czasie w jednym z warszawskich szpitali, u których hodowle prątków gruźlicy uzyskano z materiałów pobranych w trakcie bronchoskopii. Analiza dokumentacji w szpitalu zlecającym badania wykazała, że poza opisywanymi chorymi, w tym samym dniu, tym samym bronchoskopem zabiegi wykonano u trzech innych chorych. Wyniki badań tych materiałów w kierunku gruźlicy, wykonane w innym laboratorium, były ujemne. W tym przypadku trudno uzyskać jednoznaczną odpowiedź, czy do kontaminacji krzyżowej doszło na etapie pozyskiwania materiałów w jednostce zlecającej badania, czy w trakcie ich opracowywania w KRLP.

Kontaminacje wewnątrzlaboratoryjne mogą wywołać poważne konsekwencje dla chorych, ich najbliższego otoczenia i społeczeństwa. Prowadzą do niepotrzebnego stosowania leków potencjalnie toksycznych, zbędnych zabiegów medycznych, procedur diagnostycznych i hospitalizacji (17, 19). Oprócz następstw klinicznych, dochodzą lekceważone skutki społeczno-gospodarcze i emocjonalne. Zdiagnozowanie gruźlicy często prowadzi do stygmatyzacji, izolacji społecznej i przerwy w pracy (20). Konsekwencje te nie są ograniczone tylko do chorych, ale dotyczą one również osób, które zostały zidentyfikowane jako „kontakty” i które muszą zostać poddane

określonym procedurom obowiązującym w badaniach przesiewowych. Jest oczywiste, że fałszywie pozytywne wyniki badań mikrobiologicznych powodują moralne obciążenie dla personelu medycznego, zarówno w publicznej służbie zdrowia, jak i w całym sektorze klinicznym, pociągając za sobą nadmierne wydatki na opiekę błędnie zdiagnozowanych chorych (21).

Eliminacja fałszywych hodowli *M. tuberculosis* nie jest całkowicie możliwa. Wydaje się, że rzetelna weryfikacja procedur podczas opracowywania materiałów może wpłynąć na zminimalizowanie ich występowania. Laboratorium ma zatem obowiązek stosować metody, które ograniczą częstość występowania kontaminacji i opracować system kontroli niespójnych i wątpliwych wyników.

Do elementów dobrej praktyki laboratoryjnej, zmniejszających ryzyko wystąpienia kontaminacji krzyżowych należą:

- stałe monitorowanie laminarnego przepływu powietrza w komorach,
- zwrócenie szczególnej uwagi, aby na żadnym etapie diagnostyki naczynia/pojemniki z materiałami diagnostycznymi nie były otwierane jednocześnie,
- zapobieganie tworzeniu się aerozoli podczas procedur,
- używanie jednorazowych pipet dla każdej czynności i każdego materiału,
- zmiana rękawiczek w razie podejrzenia kontaktu z materiałem diagnostycznym.

Szczególnie istotnymi dla wykrywania kontaminacji krzyżowych, poza kryteriami CDC (3, 8), są:

- opracowywanie materiałów wg ściśle ustalonej kolejności,
- opracowywanie materiałów w komorze laminarnej partiami,
- dokumentacja wyników badań dla każdego materiału diagnostycznego.

Według doniesień literaturowych z innych laboratoriów prątka na świecie, najniższą częstość występowania zakażeń krzyżowych (0,1-0,8%) odnotowywano w Afryce i Danii, wyższą (1,5%) w badaniach prowadzonych przez Krajowe Referencyjne Laboratorium w Bilthoven (Holandia), i najwyższą (2,3-13%) we Francji, w Anglii i niektórych regionach USA (2, 3, 22-25).

W przeprowadzonej analizie częstość występowania fałszywie pozytywnych wyników posiewów w odniesieniu do wszystkich potwierdzeń mikrobiologicznych gruźlicy w czasie objętym badaniami oceniono na 0,8%. W związku z wykryciem kontaminacji krzyżowych, w KRLP podjęto działania mające na celu ich zminimalizowanie, obejmujące zmiany w procedurach:

1. Zamiast wspólnego naczynia z buforem fosforowym każdy z materiałów zalewany jest porcją buforu odmierzoną w osobnym pojemniku.
2. Do naczynia służącego do zlewania supernatantu wsypywany jest proszek żelujący, który ma zminimalizować rozpryskiwanie i tworzenie się aerozolu w trakcie usuwania nadsącza.
3. W jednej partii materiałów opracowuje się maksymalnie 24 próbki.

Niezbędnym elementem dochodzeń epidemiologicznych są metody molekularne o wysokiej zdolności różnicowania szczepów (ang. *discriminatory power*). Uzyskując te same profile DNA dla wyhodowanych prątków, przy jednoczesnym braku powiązania epidemiologicznego pomiędzy chorymi, laboratorium jest w stanie śledzić kontaminacje krzyżowe. Mając na uwadze rolę, jaką w takich sytuacjach odgrywa czas potwierdzenia lub wykluczenia kontaminacji uzyskanej hodowli, w pracy zastosowano dwuetapową analizę: spoligotyping oraz MIRU-VNTR. Ostateczny wynik uzyskiwano w ciągu 2 dni od momentu podejrzenia kontaminacji (13, 26).

PIŚMIENNICTWO

1. Ruddy M, McHugh TD, Dale JW et al.: Estimation of the rate of unrecognized cross-contamination with mycobacterium tuberculosis in London microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* 2002; 40(11): 4100-4104.
2. Small PM, McClenny NB, Singh SP et al.: Molecular strain typing of *Mycobacterium tuberculosis* to confirm cross-contamination in the mycobacteriology laboratory and modification of procedures to minimize occurrence of false-positive cultures. *J Clin Microbiol* 1993; 31(7): 1677-1682.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multiple misdiagnoses of tuberculosis resulting from laboratory error – Wisconsin, 1996. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1997; 46(34): 797-801.
4. de Boer AS, Blommerde B, de Haas PE et al.: False-positive mycobacterium tuberculosis cultures in 44 laboratories in The Netherlands (1993 to 2000): incidence, risk factors, and consequences. *J Clin Microbiol* 2002; 40(11): 4004-4009.
5. de C Ramos M, Soini H, Roscanni GC et al.: Extensive cross-contamination of specimens with *Mycobacterium tuberculosis* in a reference laboratory. *J Clin Microbiol* 1999; 37(4): 916-919.
6. Wurtz R, Demarais P, Trainor W et al.: Specimen contamination in mycobacteriology laboratory detected by pseudo-outbreak of multidrug-resistant tuberculosis: analysis by routine epidemiology and confirmation by molecular technique. *J Clin Microbiol* 1996; 34(4): 1017-1019.
7. Agerton T, Valway S, Gore B et al.: Transmission of a highly drug-resistant strain (strain W1) of *Mycobacterium tuberculosis*. Community outbreak and nosocomial transmission via a contaminated bronchoscope. *JAMA* 1997; 278(13): 1073-1077.
8. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Misdiagnoses of tuberculosis resulting from laboratory cross-contamination of *Mycobacterium tuberculosis* cultures – New Jersey, 1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2000; 49(19): 413-416.
9. Allix C, Supply P, Fauville-Dufaux M: Utility of fast mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat genotyping in clinical mycobacteriological analysis. *Clin Infect Dis* 2004 Sep 15; 39(6): 783-789.
10. Martín A, Herranz M, Lirola MM et al.: Optimized molecular resolution of cross-contamination alerts in clinical mycobacteriology laboratories. *BMC Microbiol* 2008; 8: 30.
11. Metchock BG, Nolte FS, Wallace Jr RJ: *Mycobacterium*. [In:] Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA et al. (eds.): *Manual of clinical microbiology*. 7th ed. ASM Press, Washington, D.C. 1999; 399-437.
12. Augustynowicz-Kopeć E, Jagielski T, Kozłowska M et al.: The significance of spoligotyping method in epidemiological investigations of tuberculosis. *Pneumonol Alergol Pol* 2007; 75(1): 22-31.
13. Supply P, Mazars E, Lesjean S et al.: Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* 2000; 36: 762-771.

14. Maurer JR, Desmond EP, Lesser MD et al.: False-positive cultures of *Mycobacterium tuberculosis*. Chest 1984; 86(3): 439-443.
15. Van Duin JM, Pijnenburg JE, van Rijswoud CM et al.: Investigation of cross contamination in a *Mycobacterium tuberculosis* laboratory using IS6110 DNA fingerprinting. Int J Tuberc Lung Dis 1998; 2(5): 425-429.
16. MacGregor RR, Clark LW, Bass F: The significance of isolating low numbers of mycobacterium tuberculosis in culture of sputum specimens. Chest 1975; 68(4): 518-523.
17. Burman WJ, Stone BL, Reves RR et al.: The incidence of false-positive cultures for *Mycobacterium tuberculosis*. Am J Respir Crit Care Med 1997; 155(1): 321-326.
18. Hanna BA, Ebrahimzadeh A, Elliott LB et al.: Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. J Clin Microbiol 1999; 37(3): 748-752.
19. Burman WJ, Reves RR: Review of false-positive cultures for *Mycobacterium tuberculosis* and recommendations for avoiding unnecessary treatment. Clin Infect Dis 2000; 31(6): 1390-1395.
20. Kelly P: Isolation and stigma: the experience of patients with active tuberculosis. J Community Health Nurs 1999; 16(4): 233-241.
21. Fryatt RJ: Review of published cost-effectiveness studies on tuberculosis treatment programmes. Int J Tuberc Lung Dis 1997; 1(2): 101-109.
22. Aber VR, Allen BW, Mitchison DA et al.: Quality control in tuberculosis bacteriology. 1. Laboratory studies on isolated positive cultures and the efficiency of direct smear examination. Tubercle 1980; 61: 123-133.
23. Bauer J, Thomsen VO, Poulsen S, Andersen AB: False positive results from cultures of *Mycobacterium tuberculosis* due to laboratory cross-contamination confirmed by restriction fragment length polymorphism. J Clin Microbiol 1997; 35: 988-991.
24. Nitta AT, Davidson PT, de Koning ML, Kilman RJ: Misdiagnosis of multidrug-resistant tuberculosis possibly due to laboratory related errors. JAMA 1996; 276: 1980-1983.
25. Burman WJ, Reves RR: Review of false-positive cultures for *Mycobacterium tuberculosis* and recommendations for avoiding unnecessary treatment. Clin Infect Dis 2000; 31: 1390-1395.
26. Gascoyne-Binzi DM, Barlow RE, Frothingham R et al.: Rapid identification of laboratory contamination with *Mycobacterium tuberculosis* using variable number tandem repeat analysis. J Clin Microbiol 2001; 39(1): 69-74.

otrzymano/received: 30.01.2015
zaakceptowano/accepted: 05.03.2015