

Olesiejuk Ryszard¹⁾, Maciak Lidia²⁾, Milanowski Janusz³⁾

ze Specjalistycznego Zespołu Gruźlicy i Chorób Płuc w Rzeszowie

¹⁾ z Oddziału Pulmonologii. Ordynator : dr med. R. Olesiejuk

²⁾ z Pracowni Mikrobiologii, Kierownik : mgr L. Maciak

³⁾ z Kliniki Chorób Płuc i Gruźlicy A. M. w Lublinie, Kierownik: prof. dr hab. med. J. Milanowski

ZNACZENIE METODY RADIOMETRYCZNEJ BACTEC DLA WPROWADZENIA LECZENIA PRZECIWPĄTKOWEGO

MEANING OF THE RADIOMETRIC METHOD BACTEC 460 TB
FOR THE APPLICATION OF ANTITUBERCULOSIS THERAPY.

Summary: Retrospective analysis of 143 patients without AFB in sputum in direct bacteriological examination was performed. In 84 patients tuberculosis was suspected on the basis of chest x-ray picture, positive tuberculin skin test and pleural fluid analysis (lymphocytes > 50%). Bacteriological analysis of sputum, BAL and pleural fluid by BACTEC and L-J culture allowed to recognise tbc in 55 patients: 41/84 patients suspected of tbc and in 14/55 – not previously suspected of tbc. Generally tuberculosis was diagnosed in 82 pts. In 16 of 55 patients antituberculous treatment was introduced according to BACTEC results. It was especially important in 10 patients not suspected of tbc.

Key words: BACTEC 460TB, antituberculosis therapy.

PNEUMONOL. ALERGOL. POL., 2002, 70, 1-2, 5-11

Wstęp Skuteczna eliminacja gruźlicy zależy od szybkiego wykrywania oraz efektywnego leczenia osób chorych [1]. Skrócenie czasu potrzebnego do uzyskania potwierdzenia bakteriologicznego jest jednym z podstawowych elementów strategii postępowania w gruźlicy. Jedną z metod jest radiometryczny system hodowlany BACTEC 460 Tb. Zastosowano go po raz pierwszy w 1980r. w Brompton Royal Hospital [14]. Liczne doniesienia potwierdzają użyteczność tej metody [4,7,14,15].

Celem pracy jest określenie przydatności wykrywania prątków gruźlicy metodą BACTEC 460 Tb w aspekcie wczesnego rozpoczęcia leczenia przeciwprątkowego wśród chorych na gruźlicę układu oddechowego.

Materialy i metody

1. Grupa badana

Analizą objęto chorych hospitalizowanych w oddziałach szpitalnych Specjalistycznego Zespołu Gruźlicy i Chorób Płuc w Rzeszowie między 1.12.1996r. a 30.05.1999r.

Do badania zakwalifikowano 143 chorych, kolejno przyjmowanych do szpitala, którzy nie prątkowali bezpośrednio (plwocinę badano 3 razy) oraz wyrazili zgodę na pobieranie materiału podczas bronchofiberoskopii lub nakłucia

jamy opłucnowej. Chorych podzielono na 3 grupy. Kwalifikację do poszczególnych grup przeprowadzono na podstawie wywiadu, badania fizykalnego oraz wykonanych badań dodatkowych. Spośród badań dodatkowych brano pod uwagę: a/ badanie radiologiczne klatki piersiowej (zmiany zlokalizowane w polach górnych lub szczytowym segmencie płata dolnego traktowano jako podejrzane o etiologię gruźliczą) [13,17], b/ wielkość odczynu tuberkulinowego (OT) (naciek o średnicy 6-9 mm traktowano jako wynik wątpliwy, poniżej 6mm jako wynik ujemny, powyżej 10mm jako dodatni, pozakaźny, poszczepienny) [11], c/ limfocytozę w płynie opłucnowym (wartości > 50% traktowano jako sugerującą etiologię gruźliczą) [9].

Na podstawie wyników w/w badań wyróżniono trzy grupy chorych: I – podejrzenie wznowy gruźlicy -12 osób, II – podejrzenie gruźlicy świeżej -72 osoby, III – bez podejrzenia gruźlicy – 59 osób. Do badania nie kwalifikowano chorych, u których stwierdzono prątki w bezpośrednim badaniu bakterioskopowym trzykrotnie pobieranej płwociny.

Od pacjentów zakwalifikowanych do badania pobierano materiał, w zależności od charakteru zmian chorobowych: płwocinę, popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe (BAL), płyn opłucnowy wycinki z błony śluzowej oskrzela i sporadycznie biopaty opłucnowe.

2. Opracowanie materiałów klinicznych do badania i ocena bakterioskopowa.

Wszystkie pobrane od chorego materiały przekazywano do Pracowni Izotopowej Laboratorium Mikrobiologicznego Specjalistycznego Zespołu Gruźlicy i Chorób Płuc w Rzeszowie. Płyn opłucnowy i aspirat BAL wstępnie zagęszczano poprzez wirowanie przez 30 min. przy 3000obr./min. Płwocinę oraz uzyskane po odwirowaniu osady zalewano w stosunku 1:1 roztworem zawierającym NaOH, cytrynian sodowy oraz N-acetylocysteinę. Substancje te umożliwiają dobre upłynienie materiałów, zabicie flory towarzyszącej i nie zmieniają składu podłoża użytego do hodowli w systemie BACTEC.

Mieszankę inkubowano przez 25 min. w temp. 37°C, a następnie neutralizowano wodą destylowaną w stosunku 1:1 i wirowano przez 30 min. przy 3000obr./min. Tak uzyskany osad zawieszano w 1-1,5ml 0.9% NaCl, a następnie 1 ml wstrzykiwano do podłoża używanego w metodzie BACTEC. Pozostały materiał w objętości ok.0,3 – 0,5ml wysiewano na podłoża tradycyjne Lowensteina – Jensena (L-J) i Stonebrinka. Ostatnią czynnością było wykonanie preparatu. Hodowle inkubowano w cieplarni w temp 37°C do chwili uzyskania wzrostu. Ocenę mikroskopową preparatu przeprowadzano po uprzednim zabarwieniu go metodą Ziehla-Neelsena (Z-N). Przeglądano nie mniej niż 100 pól widzenia [5].

3. Hodowla za pomocą metody radiometrycznej BACTEC 460 Tb.

Aparat BACTEC 460 Tb jest czytnikiem radioaktywności. Jednorazowy wsad do aparatu to 60 butelek z podłożem płynnym. Pożywki te zawierają substancje wzrostowe niezbędne dla życia prątka. Używano podłoża Middlebroock'a 7H12 (12B). Przed posiewem do podłoża 12B dodawana jest PANTA (zestaw pięciu antybiotyków zabezpieczający przed kontaminacją). Źródłem węgla radioaktywnego ¹⁴C jest kwas palmitynowy zawarty w podłożu. Prątki są bakteriami tlenowymi. W czasie procesów metabolicznych zużywają radioaktywny substrat, a następnie wydają ¹⁴CO₂ do przestrzeni nad pożywką. Ilość wydalonego ¹⁴CO₂ jest mierzona przez aparat w postaci radioaktywności, w skali 0-999. Radioaktywność mierzono przez 6 tygodni obserwacji lub do chwili uzyskania hodowli dodatniej. Za wartość graniczną kwalifikującą do codziennych pomiarów hodowli przyjęto indeks wzrostu (GI) 30. Pomiar radioaktywności

BACTEC a leczenie gruźlicy

wykonywano wówczas codziennie. Dzienny indeks wzrostu jest proporcjonalny do wzrostu prątków w podłożu.

Z pożywki hodowlanej sporządzano preparat bezpośredni barwiony metodą Z-N oraz wykonywano posiew na agarze Columbia z dodatkiem krwi baraniej. Brak wzrostu na podłożu krwawym i obecność prątków w preparacie bezpośrednim upoważniały do rozpoczęcia testu identyfikacji. W systemie BACTEC, test ten przeprowadza się za pomocą substancji NAP (p-nitro-acetylamino-hydroxy-propiofenone) – [12]. Hamuje ona wzrost mikobakterii należących do Tuberculosis complex (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*), a umożliwia wzrost pozostałym prątkom kwasoopornym należącym do MOTT.

4. Analiza statystyczna

Badając relacje między zmiennymi posłużono się testem Chi-kwadrat oraz testem t-Studenta. Jako poziom istotności statystycznej przyjęto $\alpha = 0,05$.

Wyniki

Po wykonaniu badań mikrobiologicznych płwociny, popłuczyn oskrzelowych, płynu z opłucnej i badania histologicznego biopsjatu opłucnej, ostatecznie gruźlicę rozpoznano u 82 chorych. W grupie I pozostało 4 chorych, w grupie II-60, w III gruźlicę rozpoznano u 18 chorych.

Potwierdzenie bakteriologiczne uzyskano u 55 (67%) chorych : u 1 w grupie I, u 40 w II grupie i u 14 chorych w grupie III. Wyniki obu metod hodowlanych były dodatnie u 39 chorych (70%). Potwierdzenie bakteriologiczne wyłącznie metodą BACTEC uzyskano w 14 przypadkach (25,4%) co stanowi 17% ogółu chorych na gruźlicę. Chorzy ci rekrutowali się z grupy II i III (12 i 2 odpowiednio). Potwierdzenie bakteriologiczne wyłącznie metodą L-J uzyskano u 2 chorych (3,6%) z grupy II. tab. I

Tabela I. Udział metody BACTEC w potwierdzeniu gruźlicy
Table I. Participation of BACTEC method in confirmation of tuberculosis

	Grupa I		Grupa II		Grupa III		Ogółem/Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Liczba chorych / Number of pts	n=4		n=60		n=18		n=82	
Gruźlica potwierdzona w hodowli (Bactec i/lub L-J) Tuberculosis confirmed in culture	1	25	40	67	14	78	55	67
Prątki wykryte tylko met. BACTEC AFB recognized only in BACTEC	0	0	12	20	2	11	14	17

U pozostałych 61 badanych rozpoznano inne choroby. W grupie I w 4 przypadkach rozpoznano raka płuca, w 3 – zapalenie płuc, w 1 – grzybnia kropidlakowego płuca. W grupie II rozpoznano u 5 chorych raka płuca, u 3 zapalenie płuc, u 2 mikobakteriozę i po jednym przypadku ziarnicy złośliwej i pylicy krzemowej. W grupie III u 8 chorych rozpoznano raka płuca, u 17 zapalenie płuc, u 8 sarkoidozę, u 2 nieswoiste zapalenie opłucnej, u 2 przewlekłą obturacyjną chorobę płuc i po jednym przypadku rozstrzeni oskrzeli, ropnia płuca, alergicz-

nego zapalenia pęcherzyków płucnych. Jeden chory zrezygnował z diagnostyki, będąc podejrzanym o raka płuca, a uzyskane wyniki badań bakteriologicznych były negatywne.

Leczenie przeciwprątkowe rozpoczęto u wszystkich chorych z grupy I (1 chory) i z grupy II (40 chorych), u których stwierdzono obecność prątków gruźlicy w pobranych materiałach badanych metodą BACTEC lub w hodowli na podłożu L-J (6 chorych z grupy II) oraz u 23 chorych, u których wywiad (np. kontakt z chorym prątkującym bezpośrednio, przebyta gruźlica), badania dodatkowe (w tym histologiczne, obraz RTG, obraz morfologiczny płynu opłucnowego) sugerowały gruźlicę (3 chorych z grupy I i 20 chorych z grupy II).

Wśród 18 chorych z grupy III u 10 chorych o rozpoczęciu leczenia decydował dodatni wynik badania mikrobiologicznego. Jedynie u 4 chorych zdecydował obraz histologiczny biopsji z opłucnej, u 2 obraz zwapnień we wnękach płucnych i zmiany drobnoguzkowe widoczne jedynie w badaniu tomokomputerowym oraz bardzo ciężki stan chorych, a w 2 przypadkach ciężki stan chorych i potwierdzony kontakt z osobą chorą na gruźlicę w ciągu ostatnich 2 lat. Wśród wymienionych 8 osób z grupy III, u których wprowadzono leczenie przed uzyskaniem ostatecznego wyniku hodowli, w 4 przypadkach uzyskano ostatecznie potwierdzenie gruźlicy w badaniach hodowlanych.

Mimo wstępnej kwalifikacji do grupy I lub II nie rozpoczynano leczenia przeciwprątkowego u 8 chorych z grupy I i 12 chorych z grupy II, u których w trakcie procesu diagnostycznego i w oczekiwaniu na wynik badania mikrobiologicznego wykryto inną chorobę.

U każdego badanego prześledzono czy metoda uzyskania rozpoznania miała wpływ na podjęcie leczenia przeciwprątkowego. Ze względu na niską liczebność, połączono grupę I z II (grupa I) (podejrzenie gruźlicy) i zestawiono z grupą III (bez podejrzenia gruźlicy). Wykrycie prątków gruźlicy w hodowli metodą BACTEC spowodowało rozpoczęcie leczenia w 16 przypadkach – 29% (u 6 chorych w grupie I i 10 w grupie III). U siedmiorga chorych prątki wykryto wyłącznie metodą BACTEC a u 9 chorych obecność prątków potwierdzono oboma metodami hodowlanymi (BACTEC i następnie L-J) (tab II). Wykrycie prątków metodą L-J w żadnym z przypadków nie wpłynęło na wprowadzenie leczenia.

Tabela II. Wpływ metody BACTEC na wprowadzenie leków przeciwprątkowych z uwzględnieniem wstępnej klasyfikacji chorych.

Table II. Influence of BACTEC method on application of treatment with regard of initial classification.

Chorzy na gruźlicę / Tb patients	Grupa I	Grupa III	p
Ogółem /Total	64	18	
Gruźlica potwierdzona / Tb confirmed	41	14	
Rozpoczęcie leczenia na podstawie wyniku BACTEC / Participation of BACTEC in introduction of treatment	6	10	
BACTEC(+) / gruźlicy ogółem (%) / BACTEC(+) / total tb (%)	9,3	55,6	0,001
BACTEC(+) / gruźlicy potwierdzonej (%) / BACTEC (+) / tb confirmed (%)	14,6	71,4	0,001
grupa I – podejrzenie gruźlicy / suspicion of tb			
grupa III – bez podejrzenia gruźlicy / without tb suspicion			

Stwierdzono, że dodatnie wyniki hodowli metodą BACTEC miały większe znaczenie dla wprowadzenia leczenia w grupie chorych, u których nie podejrzewano gruźlicy (10 osób) w porównaniu z podejrzanymi o gruźlicę. Wśród nich, u 4 osób potwierdzenie bakteriologiczne uzyskano wyłącznie metodą BACTEC, a u 6 metodą BACTEC, a następnie metodą L-J. Wśród 6 chorych z grupy osób podejrzanych o gruźlicę, u których wyniki badania metodą BACTEC spowodował rozpoczęcie leczenia, w 3 przypadkach potwierdzenie gruźlicy uzyskano wyłącznie za pomocą metody radiometrycznej, a w 3 przypadkach metodą BACTEC, a następnie L-J.

W obu grupach (I+II – 6 chorych, III – 10 chorych) jedynie metoda radiometryczna decydowała o rozpoczęciu leczenia.

W każdym przypadku rozpoznania gruźlicy (potwierdzonej i bez potwierdzenia bakteriologicznego), wprowadzono leczenie i uzyskano poprawę kliniczną oraz radiologiczną.

Roczna obserwacja chorych na gruźlicę potwierdziła prawidłowość leczenia.

Omówienie

W 1969r. Deland i Wagner rozwinęli metodę wykrywania wzrostu bakterii poprzez pomiar $^{14}\text{CO}_2$ uwalnianego do otoczenia w trakcie procesów metabolicznych [8]. W 1980r. amerykański koncern Becton Dickinson wyprodukował obecną wersję systemu radiometrycznego BACTEC. Użyteczność tej metody udowodniono wielokrotnie w aspekcie zwiększenia czułości, skrócenia czasu wzrostu czy oczekiwania na lekowrażliwość, zwłaszcza w porównaniu z klasyczną metodą hodowlaną na podłożu L-J [7,14,15]. Opierając się na powyższych parametrach metody radiometrycznej, niektórzy autorzy podkreślają możliwość szybszego rozpoczęcia leczenia przeciwpłatkowego wśród chorych [1,3,18]. W prezentowanej pracy uzyskano wyniki, które nie w pełni potwierdzają taką zależność.

Celem uzyskania jak największej liczby potwierdzeń bakteriologicznych choroby analizowano różne materiały biologiczne, pochodzące od tego samego chorego [1,2]. W naszym materiale potwierdzenie uzyskano u 55/82 chorych (67,1%). Analiza wpływu dodatniego wyniku hodowli na fakt wprowadzenia leczenia przyniosła zaskakujące rezultaty. Korzyść z dodatniego wyniku hodowli w tym aspekcie odniosło 16/55 (29%) chorych. Wśród tych chorych w 7 przypadkach uzyskano potwierdzenie gruźlicy wyłącznie przy pomocy metody BACTEC, a w 9 za pomocą metody BACTEC i następnie na podłożu L-J. W tej liczbie aż 10/16 (62%) rekrutowało się z grupy bez podejrzenia gruźlicy (grupa III) i to oni odnieśli największą korzyść. Jednocześnie jedynie u 6/41 chorych (14,6%) z grupy podejrzanych o gruźlicę (grupa I+II) dodatni wynik metody BACTEC spowodował rozpoczęcie leczenia.

Analiza historii chorób pozwala stwierdzić, że wcześniejsze wprowadzenie leczenia (przed uzyskaniem ostatecznego wyniku hodowli), zwłaszcza w przypadku podejrzenia o gruźlicę, uzasadniano w takich przypadkach obrazem radiologicznym klatki piersiowej, brakiem poprawy po leczeniu antybiotykami, wywiadem (kontakt z gruźlicą), wielkością odczynu tuberkulinowego, stanem chorego, czy odsetkiem limfocytów w płynie opłucnowym. Uzasadnienie dla takiego postępowania można znaleźć w literaturze [1,9,10,18]. W przypadkach

nie podejrzanych o gruźlicę, o wdrożeniu leczenia decydował przede wszystkim wynik hodowli. Zdarzały się jednak przypadki gdy bardzo ciężki stan chorego, wynik badania histologicznego bioptatu opłucnej czy wynik badania tomokomputerowego klatki piersiowej jak również łączna analiza tych danych powodowały wprowadzenie leczenia jeszcze przed uzyskaniem dodatniego wyniku hodowli.

Warto zaznaczyć, że w żadnym z analizowanych 55 przypadków tradycyjna metoda hodowli prątków na podłożu L-J nie dostarczyła dowodów obecności prątków co mogłoby być bezpośrednim powodem wprowadzenia leczenia. Być może, że zastosowanie szybszych metod, na przykład genetycznych (zwłaszcza wykrywanie rRNA *M. tuberculosis*) będzie mogło przyspieszyć diagnostykę i przyczynić się do szybszego rozpoczęcia leczenia chorych. Metoda PCR przy pomocy której stwierdza się obecność DNA *M. tuberculosis* obarczona jest jednak możliwością wykrywania martwych prątków [7].

Metody hodowlane pozostają zatem nadal podstawowymi w diagnostyce i leczeniu gruźlicy.

Wnioski

1. U 29% chorych na gruźlicę, rozpoczęto leczenie w wyniku stwierdzenia obecności prątków metodą BACTEC.
2. Największą korzyść z badania mikrobiologicznego odnoszą chorzy na gruźlicę, u których wstępnie nie podejrzewano tej choroby. U 71,4% z nich (z potwierdzeniem bakteriologicznym) leczenie włączono jedynie w oparciu o wynik badania radiometrycznego metodą BACTEC. Jest to szczególnie korzystne z epidemiologicznego punktu widzenia.

Piśmiennictwo

1. American Thoracic Society : Control of tuberculosis in the United States. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1992, 146, 1623-1633.
2. American Thoracic Society : Diagnostic standards and classification of tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1990, 142, 725-735.
3. American Thoracic Society : Treatment of tuberculosis and tuberculosis infection in adults and children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1994, 149, 1359-1374.
4. Anargyros P., Astill D.S.J., Lim I.S.L. : Comparison of improved BACTEC and Lowenstein-Jensen media for culture of mycobacteria from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1990, 28, 1288-1291.
5. Andrzejczyk Z., Gumienna H., Halweg H. i wsp. Mikrobiologiczne metody diagnostyki laboratoryjnej stosowane w ośrodkach przeciwegruźliczych. Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc Warszawa 1974.
6. Boruń M., Rybczyńska M., Pawłowska I. : Wykrywanie prątków gruźlicy w materiałach klinicznych przy pomocy metody genetycznej (PCR) w porównaniu z metodą hodowli na podłożu Lowensteina –Jensena. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2000, 68, 131-137.
7. Casal M., Gutierrez J., Vaquero M. : Comparative evaluation of the mycobacteria growth indicator tube with the BACTEC 460 Tb system and Lowenstein-Jensen medium for isolation of mycobacteria from clinical specimens. *Int. J. Tuberc. Dis.* 1997, 1, 81-84.
8. Deland F.H., Wagner H.N. Early detection of bacterial growth with carbon-14 labelled glucose. *Radiology* 1969, 92, 154-155.
9. Ferrer J. : „Pleural tuberculosis”. *Eur. Respir. J.* 1997, 10, 942-947.
10. Katz I., Rosenthal T., Michaeli D. : Undiagnosed tuberculosis in hospitalized patients. *Chest* 1985, 6, 770-774.
11. Krakówka P., Wierzbicka M.: Gruźlica płuc, red. Rowińska –Zakrzewska E., Kuś J. : Choroby układu oddechowego, PZWL, Warszawa 1997, 238-261.
12. Laszlo A., Siddiqi S.H. : Evaluation of rapid radiometric differentiation test for the myco-

BACTEC a leczenie gruźlicy

- bacterium complex by selective inhibition with p-nitro-alfa-acetyloamino-beta-hydroxy-propiofenone. *J. Clin. Microbiol.* 1984, 19, 694-698.
13. Mc Adams H.P., Erasmus J., Winter J.A. : Radiologic manifestations of pulmonary tuberculosis. *Radiol. Clin. North Am.* 1995, 33, 655-677.
 14. Middleton A.M., Chadwick M.V., Gaya H. : Evaluation of commercial radiometric system for primary isolation of mycobacteria over a fifteen-year period. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1997, 16, 166-170.
 15. Morgan M.A., Horstmeier C.D., DeYoung D.R. i wsp. : Comparison of a radiometric method (BACTEC) and conventional culture media for recovery of mycobacteria from smear-negative specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1983, 18, 384-388.
 16. Siddiqi S.H. : BACTEC Tb system. Becton Dickinson Towson, Maryland, USA, 1989.
 17. Wilcke J.T.R., Askgaard D.S., Jensen B.N. i wsp. : Radiographic spectrum of adult pulmonary tuberculosis in developed country. *Respir. Med.* 1998, 92, 493-497.
 18. Wilcke J.T.R., Kok-Jensen A. : Diagnostic strategy for pulmonary tuberculosis in a low incidence country. Results of X-ray and sputum cultured for mycobacterium tuberculosis. *Respir. Med.* 1997, 91, 281-185.

Wpłynęła: 15.01.2001 r.

Adres: Specj. Zespół Gruźlicy i Chorób Płuc w Rzeszowie, ul. Rycerska