

*Monika Kozińska¹, Ewa Augustynowicz-Kopeć¹, Zofia Zwolska¹, Sylwia Brzezińska¹,
Anna Zabost¹, Monika Anielak¹, Magdalena Klatt¹, Agnieszka Napiórkowska¹,
Maria Belzowska², Mirosława Dąbrowska³, Robert Grzesica⁴, Maria Kowalska⁵,
Dorota Krawiecka⁶, Lidia Maciak⁷, Bożena Piskula⁸, Alicja Sankowska⁹, Krzysztof
Słodowski¹⁰, Wioletta Szymkiewicz¹¹, Wojciech Żulikowski¹²*

BADANIE TRANSMISJI *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* WŚRÓD OSÓB BLISKO SPOKREWNIONYCH CHORYCH NA GRUŻLICĘ

1. Krajowe Referencyjne Laboratorium Prątka Gruźlicy,
Zakład Mikrobiologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa
Kierownik: Zofia Zwolska
2. Dolnośląskie Centrum Gruźlicy i Chorób Płuc
3. Samodzielny Publiczny Szpital Wojewódzki, Lublin
4. Specjalistyczny Zespół Chorób Płuc i Gruźlicy, Bystra Śląska
5. Mazowieckie Centrum Leczenia Chorób Płuc i Gruźlicy, Otwock
6. Kujawsko-Pomorskie Centrum Pulmonologii, Bydgoszcz
7. Specjalistyczny Zespół Gruźlicy i Chorób Płuc, Rzeszów
8. Samodzielny Publiczny Wojewódzki Zakład Gruźlicy i Chorób Płuc, Szczecin
9. Pomorskie Centrum Chorób Zakaźnych i Gruźlicy, Gdańsk
10. Specjalistyczny Zespół Gruźlicy i Chorób Płuc, Kowary
11. Specjalistyczny Zespół Gruźlicy i Chorób Płuc, Koszalin
12. Szpital Wojewódzki, Łomża

*W pracy przedstawiono analizę genetyczną szczepów *Mycobacterium tuberculosis complex* wyizolowanych od członków 29 rodzin chorych na gruźlicę. Zastosowano dwie metody molekularne, które umożliwiły porównanie profili DNA prątków oraz wskazały na istnienie transmisji choroby wśród osób blisko spokrewnionych.*

*Słowa kluczowe: dochodzenia epidemiologiczne, transmisja gruźlicy, spoligotyping, IS6110-Mtb1/Mtb2 PCR, *Mycobacterium tuberculosis**

*Key words: epidemiological investigations, tuberculosis transmission, spoligotyping, IS6110-Mtb1/Mtb2 PCR, *Mycobacterium tuberculosis**

WSTĘP

Gruźlica jest chorobą wysoce zakaźną, szerzącą się głównie drogą aerogenną, dlatego obserwacja ludzi mających kontakt z chorymi jest podstawą strategii mającej na celu eliminację rozpowszechniania się choroby (1, 2).

Umiejętność poszukiwania źródeł zakażenia (ang. *case detection*) należy do głównych elementów walki z gruźlicą. Światowe analizy dotyczące rejestracji chorych na gruźlicę wykazały, że w 2000 roku tylko 27% nowych zachorowań na gruźlicę prątkującą wykryto przy użyciu nowoczesnej strategii DOTS, a zaledwie 19% ludzi było wyleczonych (3, 4). W ostatniej dekadzie wzrosło zastosowanie metod molekularnego typowania szczepów w badaniach epidemiologicznych i w nadzorze nad gruźlicą. Typowanie genetyczne dostarczyło wiedzy o zagrożeniu związanym z transmisją zakażenia oraz umożliwiło identyfikację czynnika ryzyka będącego powodem rozprzestrzeniania się szczepów MDR (ang. *multidrug-resistant*), a także szczepów należących do rodziny Beijing (5, 6, 7).

Dzięki tym metodom wyniki uzyskane dla szczepów w różnych laboratoriach na całym świecie mogą być ze sobą porównywane. Umożliwia to analizę szczepów z różnych terenów geograficznych, pozwala wskazać charakterystyczne dla danego regionu gatunki prątków oraz identyfikuje transmisję źródła zakażenia między różnymi grupami etnicznymi (6, 8).

Wszechstronność metod genetycznych służy nie tylko celom epidemiologicznym. Wykorzystuje się je również do szybkiej identyfikacji błędów laboratoryjnych, kontaminacji i zakażeń wewnątrzszpitalnych (9).

MATERIAŁY I METODY

Analizie poddano 66 szczepów należących do *Mycobacterium tuberculosis* complex. Szczepy wyizolowano z materiałów klinicznych pochodzących od chorych będących członkami 29 rodzin zamieszkujących 9 województw Polski. W tabeli I przedstawiono liczbę analizowanych rodzin zamieszkujących poszczególne województwa.

Tabela I. Liczba analizowanych rodzin i region ich zamieszkania

Table I. Number of families and their geographical location

Liczba rodzin	Województwo
7	zachodnio-pomorskie
5	podkarpackie
4	kujawsko-pomorskie
2	pomorskie
3	lubelskie
3	podlaskie
2	mazowiecki
2	dolnośląskie
1	śląskie

Wśród 66 chorych było 21 kobiet i 45 mężczyzn w wieku od 1 do 63 lat. W badanej grupie było dwoje dzieci płci żeńskiej – 12- miesięczne i 14-letnie, 4 młodocianych w wieku od 16-19 lat (3 kobiety i 1 mężczyzna). Pozostali dorośli - 16 kobiet i 44 mężczyzn - byli w wieku od 20-63 lat (średnia wieku 37 lat). Kryterium włączenia do badania stanowiło zachorowanie na gruźlicę potwierdzoną hodowlą *M.tuberculosis*, wykryte w okresie od 2002 do 2007 roku. Kierownicy laboratoriów mikrobiologii prątków byli proszeni o przysyłanie szczepów prątków wyizolowanych od chorych o jednakowym nazwisku i/lub miejscu zamieszkania.

Wszystkie szczepy były wyhodowane według standardowych metod, miały wykonaną identyfikację gatunkową metodą chromatograficzną HPLC oraz oznaczoną lekooporność (10). Szczepy wzorcowe zastosowane w metodach molekularnych *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv oraz *M. bovis* BCG pochodziły z kolekcji własnej Zakładu Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy Chorób Płuc.

Do analizy genetycznej szczepów wykorzystano 2 metody - *spoligotyping* oraz metodę IS6110-Mtb1/Mtb2 PCR opisane wcześniej w innych artykułach (11, 12).

WYNIKI

Typowanie wyhodowanych prątków metodą analizy kwasów mykologicznych (HPLC) wykazało przynależność wszystkich szczepów do gatunku *Mycobacterium tuberculosis*.

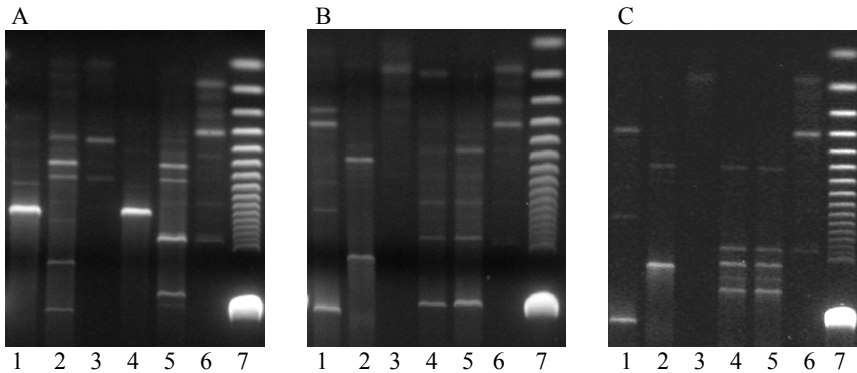
Wyniki w postaci wzorów genetycznych uzyskanych obiema metodami, porównano ze sobą i ustalono stopień pokrewieństwa genetycznego szczepów wyizolowanych od osób należących do poszczególnych rodzin. Szczepy uznawano za identyczne, jeżeli przy jednoczesnym zastosowaniu obu metod, ich profile DNA były takie same. W przypadku, gdy szczepy o tym samym spoligotypie posiadały różny układ produktów PCR w analizie IS6110-Mtb1/Mtb2 PCR, wówczas identyfikowano je jako genetycznie odmienne. Wyniki analizy przedstawiono w tabeli II.

Tabela II. Zestawienie wyników uzyskanych metodą *spoligotyping* oraz IS6110-Mtb1/Mtb2 PCR dla analizowanych szczepów

Table II. The genotyping results for all strains by *spoligotyping* and IS6110-Mtb1/Mtb2 PCR methods

L.p.	Region pochodzenia chorych na gruźlicę	Liczba rodzin z danego regionu/ liczba osób	Wyniki typowania molekularnego prątków gruźlicy			Gruźlica wywołana jednakowymi szczepami
			1	2	3	
			Spoligotyping + IS6110-Mtb1/Mtb2 PCR +	Spoligotyping + IS6110-Mtb1/Mtb2 PCR -	Spoligotyping - IS6110-Mtb1/Mtb2 PCR -	
1	Zachodnio – pomorskie	7/14	4 rodziny	1 rodzina	2 rodziny	4 rodziny
2	Podkarpackie	5/10	5 rodzin	-	-	5 rodzin
3	Kujawsko – pomorskie	4/14	4 rodziny	-	-	4 rodziny
4	Pomorskie	2/4	1 rodzina	1 rodzina	-	1 rodzina
5	Lubelskie	3/6	3 rodziny	-	-	3 rodziny
6	Podlaskie	3/6	2 rodziny	-	1 rodzina	2 rodziny
7	Mazowieckie	2/5	2 rodziny	-	-	2 rodziny
8	Dolnośląskie	2/5	2 rodziny	-	-	2 rodziny
9	Śląskie	1/2	-	1 rodzina	-	-
Razem		29/66	23 rodziny	3 rodziny	3 rodziny	23 rodziny

Szczepy prątków gruźlicy wyizolowane od 60 osób - członków 26 rodzin (90 %) posiadały jednakowe wzory molekularne w technice *spoligotyping*. Przy zastosowaniu następczej metody IS6110-Mtb1/Mtb2 PCR identyczne wzory molekularne stwierdzono wśród 23 rodzin (80%). U członków pozostałych 6 rodzin (20%) stwierdzono gruźlicę wywołaną szczepami posiadającymi różne profile DNA. Spośród tych 6 rodzin, 3 zakażone były prątkami, których różnice genetyczne zidentyfikowano obiema metodami. W pozostałych 3 przypadkach szczepy posiadały te same spoligotypy, a zróżnicowanie genetyczne ujawniła analiza IS6110-Mtb1/Mtb2 PCR. Wyniki przedstawia **rycyna 1**.



Ryc. 1. Wyniki typowania metodą IS6110-Mtb1/Mtb2 PCR szczepów *M. tuberculosis* izolowanych od członków wybranych rodzin (ścieżki: **1-2, 4-5**) oraz szczepu wzorcowego *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ścieżki: **3,6**) - analiza przy użyciu dwóch kombinacji starterów: IS1-IS2-Mtb2 (ścieżki: **1-3**) oraz IS1-IS2-Mtb1 (ścieżki **4-6**). **A** - rodzina z woj. pomorskiego, **B** - rodzina z woj. zachodnio-pomorskiego, **C** - rodzina z woj. śląskiego; ścieżka 7 - wzorec wielkości.

Fig. 1. The IS6110-Mtb1/Mtb2 PCR typing results for *M. tuberculosis* strains isolated from patients from selected families (lines: **1-2, 5-6**) and for reference strain *M. tuberculosis* H₃₇Rv (lines: **3,6**) - analysis using IS1-IS2-Mtb2 (lines: **1-3**) and IS1-IS2-Mtb1 (lines **4-6**) primer combinations. **A** - family from Pomeranian voivodeship, **B** - family from West Pomeranian voivodeship, **C** - family from Silesian voivodeship; line 7 - molecular weight marker.

DYSKUSJA

Molekularne metody typowania są obecnie podstawowym narzędziem w śledzeniu dróg transmisji zachorowań wywołanych szczepami *Mycobacterium tuberculosis*. Aby zrozumieć patogenezę choroby i podjąć właściwe działania w celu eliminacji ryzyka rozprzestrzeniania się gruźlicy, należy wykorzystywać rozmaite dostępne metody dochodzeń epidemiologicznych w genotypowaniu prątków (14).

W przypadku gruźlicy dochodzenie epidemiologiczne jest procesem niezwykle trudnym i długotrwałym. Czynnikiem, który je opóźnia jest przede wszystkim długotrwała diagnostyka mikrobiologiczna i małe możliwości zastosowania metod biologii molekularnej w wielu krajach. Niedocenianie prątków gruźlicy jako bakterii swobodnie przenoszonych z jednego gospodarza na drugiego stwarza wiele problemów zdrowotnych, do których na-

leżą dobrze udokumentowane zakażenia personelu medycznego przez chorych, jak również zakażenie się pacjentów w szpitalach (15).

Istnieje wiele czynników sprzyjających rozprzestrzenianiu się gruźlicy i utrudniających pomyślną strategię eliminacji choroby. Wiele środowisk jest szczególnie narażonych na zachorowanie i stanowi źródło zakażenia dla ludzi. Przeludnione, źle wentylowane pomieszczenia, bary, szpitale, statki, samoloty i więzienia są sprzyjającym miejscem dla transmisji choroby (16). Często nie udaje się jednak dotrzeć do pierwszego ognia w łańcuchu zakażenia i zjawisko pozostaje niezidentyfikowane przez wiele lat (17).

Przedstawiona analiza wskazuje na wysokie ryzyko zakażenia gruźlicą w gospodarstwach domowych, gdzie znajduje się osoba z aktywną postacią choroby. Takie rodziny są źródłem infekcji i stanowią zagrożenie dla innych ludzi, dlatego kontrola oraz śledzenie kontaktów domowych ma wysoką wartość w identyfikacji nowych przypadków zachorowań oraz umożliwia skuteczne przerwanie łańcucha zakażenia (16). U podstaw strategii eliminacji rozprzestrzeniania się infekcji leży dobór odpowiedniej metody genetycznej, skutecznie wskazującej na istnienie transmisji gruźlicy. Typowanie genetyczne stanowi jasną i obiektywną podstawę do identyfikacji szczepów biorących udział w zakażeniu oraz wyklucza te, które nie są związane z epidemią (18).

Przedstawiono analizę genetyczną 66 szczepów wyizolowanych z materiałów klinicznych od osób należących do 29 rodzin. Analiza *spoligotyping* ujawniła podobieństwo genetyczne wśród szczepów pochodzących od 26 rodzin i wskazała na odmienne spoligotypy w przypadku 3 rodzin. W typowaniu IS6110-Mtb1/Mtb2 PCR uzyskano różne profile restrykcyjne szczepów od 6 rodzin i takie same dla 23 rodzin. Takie wyniki wskazują na odmienny potencjał różnicujący obu wykorzystanych metod typowania i sugerują konieczność weryfikacji wyników *spoligotyping* dodatkową analizą genetyczną (6,19,20).

Metoda *spoligotyping* jest odpowiednia dla wstępnej analizy genetycznej. Jest łatwa, ekonomiczna i umożliwia w krótkim czasie określenie molekularnego pokrewieństwa szczepów *M.tuberculosis*. W przypadku identyfikacji szczepów posiadających takie same profile genetyczne grupuje się je w rodziny molekularne (ang. *clusters*) i każdą analizuje się z wykorzystaniem dodatkowej metody genetycznej. (21). W takim celu wykorzystuje się m.in. technikę IS6110-Mtb1/Mtb2 PCR (2).

Po raz pierwszy w Polsce, molekularne dochodzenia epidemiologiczne wśród osób blisko spokrewnionych, chorych na gruźlicę rozpoczęto w Krajowym Referencyjnym Laboratorium Prątko w Warszawie. Początkowo materiał do badań zbierano w sposób pasywny tj. kolekcjonując wyhodowane w laboratoriach szczepy w nieodległym czasie od chorych mieszkających pod jednym adresem i/lub z tym samym nazwiskiem. Otrzymane wyniki pozwalają na stwierdzenie, że w Polsce aktywna transmisja gruźlicy jest zjawiskiem realnym. I chociaż w/w badania nie umożliwiają wskazania rzeczywistego źródła zakażenia (ang. *case source*), to jednak stanowią pierwszy etap w tworzeniu bazy wzorów molekularnych, koniecznych do dalszych badań epidemiologicznych.

Prawidłowo prowadzone dochodzenia epidemiologiczne w gruźlicy powinny mieć charakter aktywnego poszukiwania chorych zakażonych w otoczeniu chorego prątkującego i stanowić jeden z najważniejszych elementów nadzoru nad gruźlicą. Działania te wymagają współpracy wielu służb medycznych począwszy od lekarzy rodzinnych poprzez specjalistów pulmonologów, mikrobiologów, epidemiologów i osób nadzorujących program walki z gruźlicą w kraju.

Prezentowana analiza potwierdza, że typowanie szczepów *M.tuberculosis* complex z wykorzystaniem metody *spoligotyping* oraz IS6110-Mtb1/Mtb2 PCR umożliwia określenie genetycznych podobieństw szczepów i posiada wysoką wartość w śledzeniu dróg transmisji źródeł zakażenia.

WNIOSKI

1. Wśród 29 analizowanych rodzin u członków 23 (80%) stwierdzono zakażenie takimi samymi szczepami *M. tuberculosis*, co świadczy o transmisji gruźlicy.
2. U członków pozostałych 6 rodzin (20%) stwierdzono gruźlicę wywołaną szczepami posiadającymi różne profile DNA, co wskazuje na odmienne pochodzenie źródła zakażenia.
3. Metoda *spoligotyping* oraz IS6110-Mtb1/Mtb2 PCR umożliwiają określenie genetycznych podobieństw szczepów *Mycobacterium tuberculosis* complex i posiadają wysoką wartość w śledzeniu dróg transmisji źródeł zakażenia.

M Kozińska, E Augustynowicz-Kopeć, Z Zwolska, S Brzezińska, A Zabost, M Anielak, M Klatt, A Napiórkowska, M Belzowska, M Dąbrowska, R Grzesica, M Kowalska, D Krawiecka, L Maciak, B Piskula, A Sankowska, K Słodowski, W Szymkiewicz, W Żulikowski

TRANSMISSION OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* AMONG HOUSEHOLD CONTACTS OF PATIENTS WITH TUBERCULOSIS

SUMMARY

Objective. The aim of this study was estimation of usefulness of two molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* typing in the epidemiological research of tuberculosis (TB). We determined molecular patterns of *M.tuberculosis* strains isolated from 66 patients, members of 29 families living in 9 voivodeships of Poland. We also analysed drug susceptibility of the strains as well as some demographic characteristics of the patients.

Methods. The genotype analysis of the 66 clinical isolates was performed by using *spoligotyping* and IS6110-Mtb1/Mtb2 PCR.

Main observations. Of the 29 families examined in this study, in 23 each family member was infected with the same *M. tuberculosis* strain. Three drug-resistant strains and two members of the Beijing family were identified.

Results. We found that strains within each of the 23 families had the same genetic patterns, whereas those of the strains identified in the rest 6 families were different. Among those 6 families, in 3 differentiation of the strains was obtained with both *spoligotyping* and IS6110-Mtb1/Mtb2 PCR analysis, while in another 3 only with *spoligotyping* method.

Conclusions. Based on the results from this study, the two genotyping methods used were demonstrated as an efficient approach for investigating the epidemiological relatedness of TB cases.

PIŚMIENNICTWO

1. Kulkarni S, Sola Ch, Filliol I, i in. Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with pulmonary tuberculosis in Mumbai, India. Res Microbiol 2005;156:588-596.

2. Kotłowski R, Shamputa IC, El Aila NA, i in. PCR-based genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* with new GC-rich repeated sequences and IS6110 inverted repeats used as primers. J Clin Microbiol 2004;42(1):372-377.
3. Begerra MC, Pachao-Torrealblanca IF, Bayona J, i in. Expanding tuberculosis case detection by screening household contacts. Public Health Reports 2005;120:271-277.
4. Dye C, Watt CJ, Bleed D. Low access to a highly effective therapy: a challenge for international tuberculosis control. Bull World Health Organ 2002;80:437-44.
5. Brudney K, Gordon M, Moström P, i in. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Western Sweden. J Clin Microbiol 2004;42(7):3046-3051
6. Kremer K, Arnold C, Cataldi A, i in. Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. J Clin Microbiol 2005;43(11):5628-5638.
7. Kremer K, Kam Yan Au B, Chi Wai Yip P, i in. Use of variable-number tandem-repeat typing to differentiate *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from Hong Kong and comparison with IS6110 restriction fragment length polymorphism typing and spoligotyping. J Clin Microbiol 2004;43(1):314-320.
8. van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, i in. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol 1993;31(2):406-409.
9. Warren RM, Streicher EM, Charalambous S, i in. Use of spoligotyping for accurate classification of recurrent tuberculosis. J Clin Microbiol 2002;40(10):3851-3853.
10. Zwolska Z, Augustynowicz-Kopeć E, Klatt M. Pierwotna i nabyta lekooporność prątków gruźlicy w Polsce. Pneumonol Alergol Pol 1999;67(11-12):536-545.
11. Augustynowicz-Kopeć E, Jagielski T, Kozińska M, i in. Znaczenie metody spoligotyping w dochodzeniach epidemiologicznych gruźlicy. Pneumonol Alergol Pol 2007;75:22-31.
12. Augustynowicz-Kopeć E, Kozińska M, Zabost A, i in. Molekularne dochodzenia epidemiologiczne wśród ludzi blisko spokrewnionych chorujących na gruźlicę płuc. Pneumologia Info 2007;4(3):14-22.
13. Kamerbeek J, Schouls LM, Kolk A, i in. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol 1997;35:907-914.
14. Torrea G, Offredo C, Simonet M, i in. Evaluation of tuberculosis transmission in a community by 1 year of systematic typing of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. J Clin Microbiol 1996;34(5):1043-1049.
15. Zwolska Z, Jezierska-Anczuków A. Transmisja prątków kwasoopornych zagrożeniem dla ludzi chorych i zdrowych. Nowa Medycyna 1997;16:25-29.
16. Wang PD, Lin RS. Tuberculosis transmission in the family. J Inf 2000;41:249-251.
17. Malakmadze N, Gonzalez IG, Oemig T, i in. Unsuspected recent transmission of tuberculosis among high-risk groups: implications of universal tuberculosis genotyping in its detection. Clin Infect Dis 2005; 40:366-73.
18. Narayanan S. Molecular epidemiology of tuberculosis. Indian J Med Res 2004;120:233-247.
19. Goyal M, Saunders NA, van Embden JDA, i in. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism. J Clin Microbiol 1997; 35(3):647-651.
20. Scott AN, Menzies D, Tannenbaum T, i in. Sensitivities and specificities of spoligotyping and Mycobacterial interspersed repetitive unit-variable tandem repeat typing methods for studying molecular epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol 2005;43(1):89-94.
21. Goguet de la Salmoniere YO, Li HM, Torrea G, i in. Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1997;35(9):2210-2214.

Adres autora:

Ewa Augustynowicz-Kopeć

Zakład Mikrobiologii

Krajowe Referencyjne Laboratorium Prątka Gruźlicy

Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc

ul. Płocka 26 01-138 Warszawa