

MARCIN WŁODARCZYK, WIESŁAWA RUDNICKA, MAGDALENA DRUSZCZYŃSKA

*Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej
Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki
Banacha 12/16, 90-237 Łódź
E-mail: martini.w@wp.pl*

GRUŻLICA – ZAPOMNIANA CHOROBA, O KTÓREJ WARTO PAMIĘTAĆ

RYS HISTORYCZNY

Gruźlica, znana w przeszłości jako „suchoty” lub „biała plaga”, spośród wszystkich chorób zakaźnych dotyczących człowieka stanowiła i nadal stanowi poważny problem epidemiologiczny na całym świecie (COLLINS 2001, MEHROTRA i BISHAI 2001, SMITH 2003, DUCATI i współaut. 2006, SHARMA i MOHAN 2013).

Zrozumienie etiologii gruźlicy bierze swój początek od badań francuskiego lekarza Théophile Laenneca. W swojej książce pt. *D'Ausculation Mediate* wydanej w 1819 r. objaśnił patogenezę gruźlicy, opisał kliniczne objawy i wprowadził wiele terminów opisujących tę jednostkę chorobową, które używane są do dziś (DANIEL 2006). Około 45 lat później, francuski chirurg Jean-Antoine Villemin wy tłumaczył infekcyjną naturę gruźlicy, zakażając króliki ropną wydzieliną z jamy płuc pacjenta zmarłego na gruźlicę. Trzy miesiące później, podczas autopsji zaobserwował on charakterystyczne dla gruźlicy zmiany w płucach zwierząt (DANIEL 2006).

Nową kartę w historii gruźlicy otworzył 24 marca 1882 r. niemiecki uczone Hermann Heinrich Robert Koch (Ryc. 1), który podczas spotkania Towarzystwa Fizjologów w Berlinie zaprezentował wykład pt. *Die Aetiologie der Tuberculose*, w którym udokumentował, iż odkryte przez niego bakterie są czynnikiem etiologicznym gruźlicy. Wygłosił on również cztery postulaty, które później na jego cześć zostały nazwane postulatami Kocha i po dziś dzień są podstawą identyfikowania czynników

etiologicznych chorób zakaźnych (AUGUSTY-NOWICZ-KOPEĆ i współaut. 2010, SHARMA i MOHAN 2013). Dalsza praca naukowa Kocha skupiała się na próbie znalezienia substancji, która pozwoliłaby uodpornić makroorganizm na zakażenie prątkami gruźlicy, bądź służyć leczeniu choroby wywoływanej przez te bakterie (ZWOLSKA 2010). Zaobserwował



Ryc. 1. Robert Koch (1843-1910) (<http://www.robertkochwolsztyn.pl/>).

on, iż zagaśszczony przesącz zabitej hodowli prątków (późniejsza tuberkulina) mógłby być używany jako ważne narzędzie w diagnozowaniu gruźlicy. Po podaniu uzyskanego preparatu Koch zauważył intensyfikację reakcji zapalnej u zwierząt poddanych wcześniej za-

każeniu prątkami gruźlicy (DUCATI i współaut. 2006). To odkrycie pozwoliło później na opracowanie przez Clemensa von Piquet tuberkulinowego testu skórno, który stał się ważnym narzędziem w diagnozowaniu gruźlicy (DANIEL 2006). W tym samym czasie Koch opracował metodę barwienia prątków, która udoskonalona została następnie przez Paula Ehrlicha i do dziś wykorzystywana jest w bakterioskopii jako barwienie Ziehl-Neelsena (DUCATI i współaut. 2006). W 1905 r. Kapituła Nagrody Nobla przyznała Robertowi Kochowi nagrodę w dziedzinie medycyny lub fizjologii za całokształt prac badawczych nad gruźlicą (ZWOLSKA 2010).

Odkrycia Kocha zachęciły naukowców z całego świata do wzmożonej pracy nad opracowaniem skutecznych metod walki z gruźlicą. W 1896 r. amerykański bakteriolog Theobald Smith wykazał, iż gruźlica bydła nie jest wywoływana przez *Mycobacterium tuberculosis*, lecz przez inny gatunek prątków tj. *M. bovis*, zaś 12 lat później Albert Calmette i Camille-Guérin poddali bydłęce prątki wielokrotnemu pasażowaniu, uzyskując awirulentny szczep, który umożliwił uodpornienie przeciwko wirulentnym *M. tuberculosis*. To odkrycie doprowadziło do opracowania preparatu szczepionkowego znanego dzisiaj jako szczepionka BCG (Bacille Calmette-Guérin) (DANIEL 2006, DUCATI i współaut. 2006, KLEINNIJENHUIS i współaut. 2011, KRYSZTOPA-GRZYBOWSKA i LUTYŃSKA 2014).

Ludzkość musiała czekać ponad 60 lat od odkrycia Roberta Kocha na pojawienie się pierwszego leku na gruźlicę (DUCATI i współaut. 2006, WŁODARCZYK i współaut. 2012, SAVOLAINEN i współaut. 2013). Po raz pierwszy streptomycyna została wyizolowana z promieniowców *Streptomyces griseus* przez Alberta Schatza, Elizabeth Bugie i Selmana Waksmana (DANIEL 2006). Chemioterapia chorych na gruźlicę obejmowała równoczesne podawanie streptomycyny i kwasu para-aminosalicylowego. Taka kombinacja leków zapobiegała pojawianiu się szczepów *M. tuberculosis* opornych na streptomycynę. W 1951 r. dopuszczono do prób klinicznych kolejny chemioterapeutyk, tj. izoniazyd. Obowiązuje w tamtym czasie schematy leczenia określały podawanie, w dowolnych kombinacjach, dwóch z trzech dostępnych leków przeciwgruźliczych przez okres 18-24 miesięcy (SESTER i współaut. 2011). Nieco później na listę chemioterapeutyków stosowanych w leczeniu gruźlicy wpisano kolejno etambutol (1962 r.), rifampicynę (1962 r.) i pirazyamid (1964 r.), a efektywny czas leczenia chorych uległ skróceniu do 6 miesięcy (DANIEL 2006, VILLEMAGNE i współaut. 2012, SHARMA i MOHAN 2013). Obecnie w różnych fazach badań klinicznych znajduje się kil-

ka leków o aktywności przeciwgruźliczej, w tym: delamanid, badequilina, nitorimidazol-oksazyny czy linezolid skuteczny w leczeniu gruźlicy wielolekoopornej (WHO 2014, OLARU i współaut. 2015). Chemioterapeutyki te zyskują na znaczeniu ze względu na swoje bakteriobójcze właściwości w stosunku do szczepów prątków gruźlicy opornych na stosowane obecnie leki, (PALOMINO 2006, KOUL i współaut. 2011, SWINDELLS 2012, ZUMLA i współaut. 2012, SHARMA i MOHAN 2013).

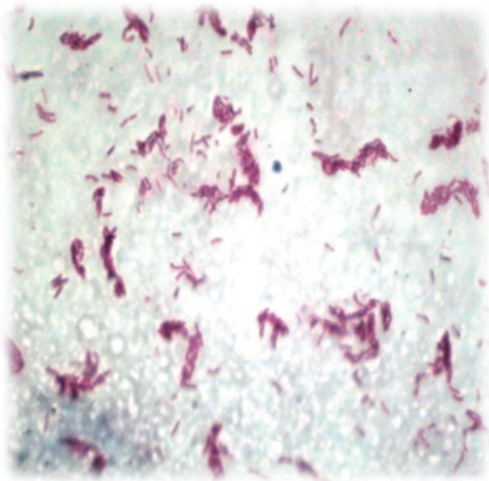
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KOMPENDIUM

Czynnikiem etiologicznym gruźlicy są prątki z grupy *Mycobacterium tuberculosis complex*, do której, poza *M. tuberculosis*, należą również: *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, a także *M. bovis* BCG oraz *M. caprae* i *M. canetti* (DANIEL 2006, DONG i MARTINEZ 2011, GENGEBACHER i KAUFMANN 2012, FORRELLAD i współaut. 2013). Pod względem taksonomicznym rodzaj *Mycobacterium* należy do rodziny Mycobacteriaceae, zaliczanej do rzędu Actinomycetales.

Jedną z hipotez zakłada powstanie rodzaju *Mycobacterium* w jurze, czyli ok. 150 mln lat temu (DANIEL 2006). Według GUTIERREZ i współaut. (2005), przodek *M. tuberculosis* mógł zakażać człowieka już 3 mln lat temu, jednak dopiero udomowienie bydła (ok. 10 000 lat temu) pozwoliło prątkom *M. bovis* na przełamanie bariery zwierzę-człowiek, co przyczyniło się do powstania nowego gatunku prątków *M. tuberculosis* (NEILL i współaut. 2005, DANIEL 2006, GENGEBACHER i KAUFMANN 2012, FORRELLAD i współaut. 2013).

Genom *M. tuberculosis* zawiera 4,4 milionów par zasad i jest jednym z największych genomów wśród bakterii, obejmującym około 4000 genów, z czego ponad 250 uczestniczy w biosyntezie komponentów lipidowych ściany komórkowej (COLE i współaut. 1998, FORRELLAD i współaut. 2013). Funkcja ok. 40% genów nie została jak dotąd poznana i może stanowić klucz w rozwiązaniu zagadkowej interakcji pomiędzy patogenem a gospodarzem (SMITH 2003, KAUFMANN i współaut. 2005).

Prątki gruźlicy są Gram-dodatnimi, lekko wygiętymi pałeczkami tlenowymi lub mikroaerofilnymi, których czas generacji wynosi od 18 do 24 godz. Ściana komórkowa prątków ma budowę dość unikatową w świecie bakterii. Poza peptydoglikanem i polisacharydami, zawiera nietypowe glikolipidy i lipidy, w tym długołańcuchowe kwasy myklowe (COLE i współaut. 1998, EMPADINHAS i współaut. 2008, GENGEBACHER i KAUFMANN 2012, FORRELLAD i współaut. 2013). Taka



Ryc. 2. Prątki *M. tuberculosis* w preparacie barwionym metodą Ziehl-Neelsena (MUDDAIAH i współaut. 2013).

budowa ściany komórkowej prątków warunkuje ich kwasooporność, utrudniając ich barwienie standardową metodą Grama. Według protokołu barwienia metodą Ziehl-Neelsena, 3% roztwór HCl w alkoholu etylowym (tzw. kwaśny etanol), użyty po barwieniu na gorąco fuksyną karbolową, odbarwia wszystkie bakterie poza prątkami, pozwalając na uwidocznienie w preparacie różowo-czerwonych *Mycobacterium* sp. (Ryc. 2).

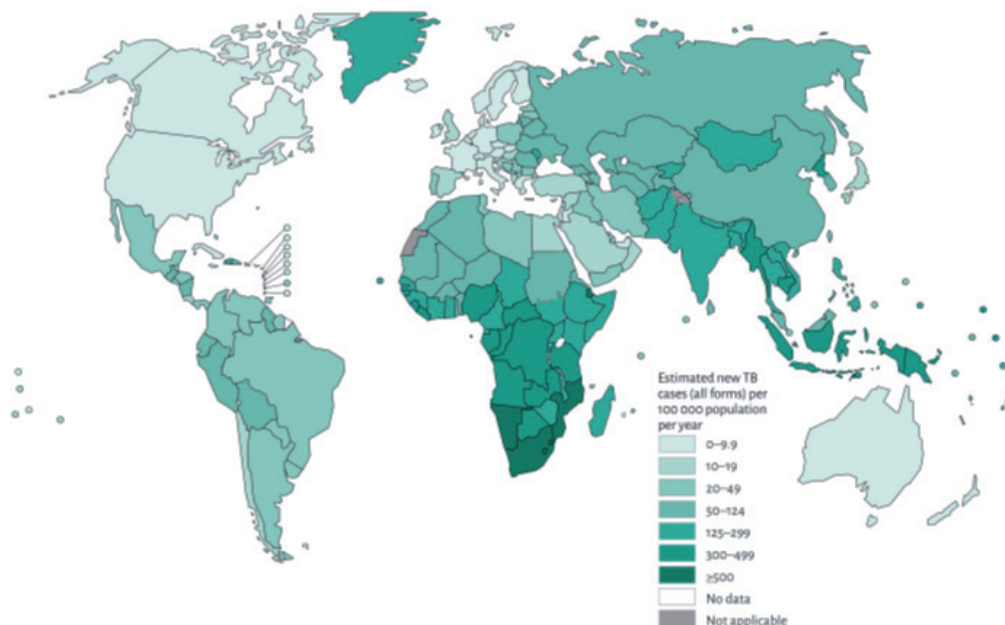
Prątki *M. tuberculosis* nie wytwarzają przetrwalników, ale mają zdolność wchodzenia w stan spoczynkowy, charakteryzujący się obniżoną aktywnością metaboliczną i

opornością na niekorzystne warunki środowiskowe (RUDNICKA 2004, GENGENBACHER i KAUFMANN 2012).

Naturalna oporność prątków na wiele antybiotyków sprawia, iż leczenie gruźlicy jest trudne, a niekiedy nawet niemożliwe. Ta oporność związana jest nie tylko z hydrofobową ścianą komórkową, która tworzy barierę nieprzepuszczalną dla leków, lecz również determinowana jest przez obecność licznych genów lekooporności. Kodują one hydrolityczne enzymy, takie jak β -laktamazy czy transferazy acetylo-aminoglikozydowe, a także złożone systemy transporterowe, które efektywnie usuwają lek z komórki prątka (COLE i współaut. 1998, FLORES i współaut. 2005). Poza tym, tak duża lekooporność prątków potęgowana jest przez liczne mutacje w obrębie genomu, będące konsekwencją nieodpowiedniego leczenia, trwającego zbyt krótko lub przerwano (COLE i współaut. 1998, GENGENBACHER i KAUFMANN 2012).

OBECNA SYTUACJA EPIDEMIOLOGICZNA GRUŻLICY W POLSCE I NA ŚWIECIE

W skali światowej gruźlica wciąż pozostaje ogromnym problemem epidemiologicznym. Według szacunkowych danych WHO w 2014 r. odnotowano 9,6 mln przypadków gruźlicy, w tym 1 mln zachorowań u dzieci i 1,5 mln zgonów na tę chorobę, z czego 37,5% stanowili chorzy ze współistniejącym zakażeniem wirusem HIV (ang. human immunodeficiency virus). Rozkład zapadalno-



Ryc. 3. Zapadalność na gruźlicę na świecie w 2014 r. (współczynnik na 100 000 ludności) (Raport WHO 2015).

wych, hodowli na podłożach bakteriologicznych i wyniku testu tuberkulinowego. Należy podkreślić, że ta standardowa procedura diagnozowania gruźlicy jest często zawodna, a wysoki odsetek chorych z aktywną gruźlicą jest poddawany przeciwprątkowej terapii tylko na podstawie występujących objawów chorobowych i obrazu radiologicznego płuc.

BAKTERIOSKOPIA

Rozmaz płwociny jest podstawowym i najczęściej wykonywanym badaniem diagnostycznym w kierunku gruźlicy. Opiera się on na wykryciu kwasoopornych bakterii uwidocznionych w preparatach barwionych metodą Ziehl-Neelsena (Ryc. 2) (KAUFMAN i VAN HELDEN 2008, SWAI i współaut. 2011, MUDDAIAH i współaut. 2013). Dodatni wynik bakterioskopii jest przyjmowany jako dowód na obecność aktywnej gruźlicy. Pomimo iż test ten jest łatwy, szybki i tani, ma wiele ograniczeń. W metodzie tej barwią się nie tylko prątki *M. tuberculosis*, lecz również inne prątki z grupy *M. tuberculosis complex*, do której zalicza się *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. caprae*, *M. canetti* i *M. microti* oraz liczne inne gatunki mykobakterii, w tym *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. ulcerans* i *M. smegmatis* (NEILL i współaut. 2005, DANIEL 2006, GENGEBACHER i KAUFMANN 2012, FORRELLAD i współaut. 2013). Kolejną niedogodność stanowi fakt, iż dla wykrycia prątków tą metodą wymagana jest obecność co najmniej 5×10^3 komórek bakteryjnych w 1 ml płwociny (KAUFMAN i VAN HELDEN 2008, AUGUSTYNOWICZ-KOPEĆ i współaut. 2010, SWAI i współaut. 2011). Metaanaliza przeprowadzona przez STEINGART i współaut. (2006) określiła czułość i swoistość bakterioskopii na poziomie, odpowiednio 74% oraz ponad 90%. Podkreślenia wymaga również fakt stosowania coraz częściej metod mikroskopii fluorescencyjnej w wykrywaniu prątków w preparatach mikroskopowych. W zależności od wykorzystywanego źródła światła, diody elektroluminescencyjnej czy wysokociśnieniowej lampy rtęciowej, czułość wykrywania tą metodą wzrasta odpowiednio do 83,1% i 82,4% (SINGHAL i MYNEEDU 2015)

HODOWLA – METODA REFERENCYJNA W DIAGNOSTYCE GRUŻLICY

Hodowla prątków na podłożach bakteriologicznych jest kolejnym narzędziem wykorzystywanym powszechnie w diagnozowaniu gruźlicy (AUGUSTYNOWICZ-KOPEĆ i współaut. 2013). Metoda ta wymaga wcześniejszego opracowania materiału klinicznego (płwociny) w celu eliminacji bakterii saprofitycznych, w tym naturalnej mikroflory górnych dróg oddechowych i zwiększenia gęstości prątków w badanym materiale. Poza wymo-



Ryc. 5. Zdjęcie rentgenowskie klatki piersiowej osoby chorej na gruźlicę. Widoczne wyraźne przejaśnienie w lewym płucu (BURRILL i współaut. 2007).

giem posiadania specjalistycznego zaplecza laboratoryjnego, metoda ta jest dość czasochłonna. Wynika to z faktu, iż czas niezbędny do pojawienia się pojedynczych kolonii, na bogatym w substancje odżywcze podłożu wzrostowym: Löwensteina-Jensena lub Middlebrook'a 7H10, wynosi nawet do 8 tygodni (Ryc. 5) (KAUFMAN i VAN HELDEN 2008, MUDDAIAH i współaut. 2013). Wprowadzenie systemu BACTEC do konwencjonalnej hodowli prątków skróciło czas oczekiwania na wynik badania, z jednoczesną analizą wzorców leukoporności. Zastosowane przez firmę Becton Dickinson systemy te, w zależności od zastosowanego detektora, monitorują fluorescencję hodowli (BACTEC™ MGIT™ 960) lub wykrywają CO_2 z radioaktywnym izotopem węgla (^{14}C) (BACTEC 460TB), który uwalniany jest przez prątki podczas rozkładu obecnego w podłożu hodowlanym (Middlebrook'a 7H12) znakowanego kwasu palmitynowego.

TUBERKULINOWY TEST SKÓRNY

Tuberkulinowy test skórny (ang. tuberculin skin test, TST) jest jedną z najstarszych i wciąż powszechnie używanych metod w diagnostyce gruźlicy, w tym utajonego zakażenia prątkami (AUGUSTYNOWICZ-KOPEĆ i współaut. 2013). Test ten opiera się

na śródskórnym wstrzyknięciu w środkową część przedramienia zazwyczaj 2 jednostek (ang. international unit, IU) tuberkuliny PPD RT23 (ang. purified protein derivative, PPD; Statens Serum Institute). Po 48-72 godzinach mierzy się średnicę stwardnienia (alergii skórnej) powstałego na skutek rozwoju nadwrażliwości późnej na tuberkulinę (ang. delayed-type hypersensitivity, DTH). Immunologiczne podłoże tej reakcji związane jest z napływem limfocytów T i monocytów/makrofagów do miejsca iniekcji oraz produkcją przez „uczulone” komórki mediatorów reakcji zapalnej w tym IL-8 (ang. interleukin-8), IFN- γ (ang. interferon- γ) i TNF- α (ang. tumor necrosis factor- α) (DRUSZCZYŃSKA i współaut. 2012). W populacji szczepionej BCG, w tym w Polsce, za wynik dodatni przyjmuje się naciek nie mniejszy niż 10 mm. Test ten nie znajduje zastosowania w grupie osób z immunosupresją, w tym u osób zakażonych wirusem HIV, a także u osób z kontaktu, które w przeszłości przebyły gruźlicę lub miały dodatnią próbę tuberkulinową (ANDERSEN i współaut. 2000, AUGUSTYNOWICZ-KOPEĆ i współaut. 2013). Ponadto, dużą niedogodnością jest konieczność powrotu pacjenta na odczyt testu po 2-3 dniach. Zaskakująca jest również rozbieżność w pomiarze średnicy stwardnienia, która zależy od doświadczenia osoby odczytującej wynik (KAUFMAN i VAN HELDEN 2008). Najważniejszym ograniczeniem tego testu jest fakt, iż od 10 do 25% osób z aktywną gruźlicą nie odpowiada na śródskórną podaną tuberkulinę, co utrudnia diagnozowanie tej choroby (KAUFMAN i VAN HELDEN 2008, PARIDA i KAUFMANN 2010, DAI i współaut. 2012, WŁODARCZYK i współaut. 2014). Poważnym problemem diagnostycznym jest również występowanie dodatnich wyników próby tuberkulinowej, będących następstwem wcześniejszego szczepienia BCG.

TESTY INTERFERONOWE W DIAGNOZOWANIU GRUŻLICY

Liczne ograniczenia standardowej diagnostyki gruźlicy stały się impulsem do poszukiwania alternatywnych testów diagnostycznych. W ciągu ostatniej dekady pojawiły się dwa komercyjne zestawy tzw. testów interferonowych IGRA (ang. interferon-gamma release assay): QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT, Qiagen) i T-SPOT.TB (Oxford Immunotec,) (PARIDA i KAUFMANN 2010, VASSILOPOULOS i współaut. 2011, DAI i współaut. 2012, RAMOS i współaut. 2012, RANGAKA i współaut. 2012, POLLOCK i współaut. 2013). Testy te opierają się na detekcji IFN- γ produkowanego przez uczulone limfocyty T, CD4(+) i CD8(+) w odpowiedzi na stymulację specyficznymi antygenami mykobakterii: ESAT-6

(ang. early secreted antigenic target-6), CFP-10 (ang. culture filtrate protein-10) i TB 7.7 (p4) (VASSILOPOULOS i współaut. 2011, RAMOS i współaut. 2012, DRUSZCZYŃSKA i współaut. 2013, POLLOCK i współaut. 2013). Antygeny ESAT-6 i CFP-10 kodowane są przez region różnicowania RD1 (ang. region of difference), który występuje w genomie prątków *M. tuberculosis* (MICHAŁOWSKA-MITCZUK 2000, KOCIK i współaut. 2012, WŁODARCZYK i współaut. 2014). Utrata podczas atenuacji regionu RD1 w szczepionkowym szczepie BCG i brak u większości niegruźliczych mykobakterii sprawia, iż testy te są bardziej specyficzne niż TST (MICHAŁOWSKA-MITCZUK 2000, DAI i współaut. 2012, ONUR i współaut. 2012, RANGAKA i współaut. 2012). Jakkolwiek przynajmniej 3 gatunki prątków środowiskowych posiadają RD1, są to między innymi: *M. kansasii*, *M. marinum* i *M. szlugai* (Tabela 1) (MICHAŁOWSKA-MITCZUK 2000, KOCIK i współaut. 2012). W teście QFT mierzony jest immunoenzymatycznie poziom stężenia IFN- γ produkowanego przez limfocyty w pełnej krwi, natomiast test T-SPOT.TB, wykorzystujący jedynie dwa antygeny: ESAT-6 i CFP-10, opiera się na technice ELISpot i ocenia się w nim liczbę limfocytów wytwarzających IFN- γ . Czulość i swoistość testów IGRA zależy od grupy badanych osób: wieku, statusu immunologicznego, chorób towarzyszących i waha się, odpowiednio od 76 do 84 % oraz od 42 do 79 % (CHEN i współaut. 2011, LING i współaut. 2011, SESTER i współaut. 2011, DAI i współaut. 2012, POLLOCK i

Tabela 1. Występowanie specyficznych antygenów stosowanych w teście QuantiFERON-TB Gold Plus wśród bakterii z rodzaju *Mycobacterium* (KOCIK i współaut. 2012)

	EAST-6	CFP-10	TB 7.7 (p4)
Region różnicowania	RD1	RD1	RD11
<i>M. tuberculosis</i> Complex			
<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+
<i>M. africanum</i>	+	+	+
<i>M. bovis</i>	+	+	+
<i>M. bovis</i> BCG			
Gothenberg	-	-	-
Moreau	-	-	-
Pasteur	-	-	-
Szczepy środowiskowe prątków			
<i>M. avium</i>	-	-	-
<i>M. fortuitum</i>	-	-	-
<i>M. intracellulare</i>	-	-	-
<i>M. kansasii</i>	+	+	-
<i>M. smegmatis</i>	-	-	-
<i>M. marinum</i>	+	+	-
<i>M. szlugai</i>	+	+	-

współaut. 2013). Czulość testów interferonowych próbuje się zwiększyć przez oznaczenie dodatkowych cytokin, produkowanych przez efektorowe limfocyty T rozpoznające antygeny prątków gruźlicy. Amerykańska organizacja Food and Drug Administration (FDA) w 2005 r. zaaprobowała testy interferonowe jako istotne narzędzie wspomagające podstawową diagnostykę gruźlicy, chociaż głównym przeznaczeniem tych testów jest wykrywanie utajonego zakażenia *M. tuberculosis* (AUGUSTYNOWICZ-KOPEĆ i ZWOLSKA 2010, WŁODARCZYK i współaut. 2012) (Tabela 1).

INNE TESTY DIAGNOSTYCZNE GRUŻLICY

Badanie radiologiczne

W porównaniu do klasycznych metod diagnozowania gruźlicy, badanie radiologiczne ma na celu detekcję zmian wywołanych przez bakterie w zakażonym organizmie (KAUFMAN i VAN HELDEN 2008). W obrazie radiologicznym gruźlicy naciekowej, najczęstszej postaci gruźlicy płuc, obserwuje się nieostro odgraniczone zacienienie z przejaśnieniem (Ryc. 5) (MICHAŁOWSKA-MITCZUK 2000, BURRILL i współaut. 2007). Podobny obraz towarzyszy nowotworom płuc i zmianom zapalnym o etiologii innej niż gruźlica, tj. infekcjom gronkowcowym czy mykoplazmowym (MICHAŁOWSKA-MITCZUK 2000). W krajach wysoko rozwiniętych badanie radiologiczne uzupełniane jest, rzadko zastępowane, tomografią komputerową (ang. high resolution computer tomography, HRCT), służącą wybiórczemu obrazowaniu tkanki płucnej. Badanie to wykonywane jest w przypadkach klinicznych, gdzie zawodzą standardowe metody radiologiczne (KAUFMAN i VAN HELDEN 2008).

Testy molekularne

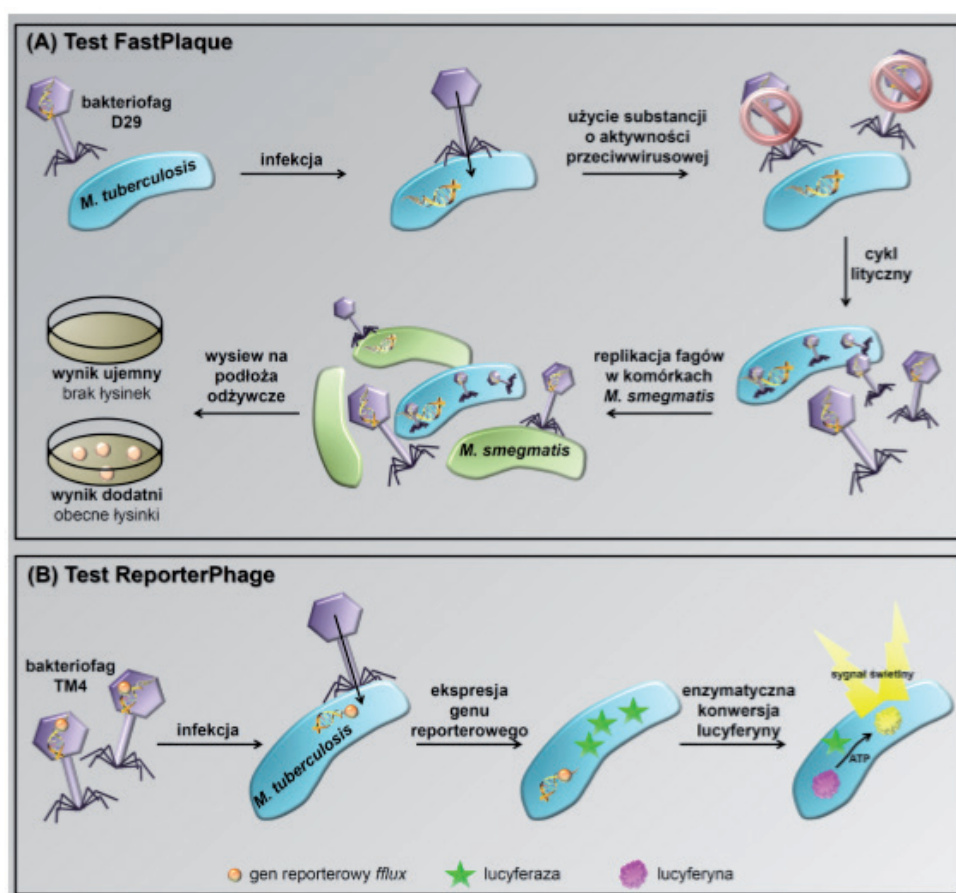
Do diagnostyki gruźlicy pod koniec lat 90. XX w. wprowadzono wysoce czuły test molekularny, wykrywający prątki gruźlicy obecne w badanym materiale (KAUFMAN i VAN HELDEN 2008). Test AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* (Roche Diagnostics, Szwajcaria) oparty jest na amplifikacji kwasów nukleinowych (ang. nucleic acid amplification, NAA). Pod koniec 2009 r. test ten został jednak wyparty przez nowopowstały system Xpert MTB/RIF (Cepheid, Stany Zjednoczone), w którym wykorzystano reakcję łańcuchową polimerazy (ang. polymerase chain reaction, PCR), z analizą przyrostu produktu w czasie rzeczywistym (ang. real time PCR, RT-PCR). W teście tym zastosowano sondy o powinowactwie do genu *rpoB*, umożliwiające tym samym nie tylko identyfikację *M. tuberculosis*, ale również wykrycie szczepów opornych na rifampicy-

nę (SAFIANOWSKA i współaut. 2012). Mutacja w wysoce konserwatywnym genie *rpoB*, kodującym podjednostkę β polimerazy RNA, warunkuje oporność prątków na rifapicynę (SUN i współaut. 2009, SAFIANOWSKA i współaut. 2012, STEINGART i współaut. 2013). Po 5 latach od dopuszczenia testu do rutynowej diagnostyki gruźlicy przez ECDC (ang. European Centre for Disease Prevention and Control) oceniono jego swoistość i czulość na poziomie, odpowiednio 99,5% i 81,8% (SAFIANOWSKA i współaut. 2012).

Bakteriofagi w diagnostyce gruźlicy

Test FastPlaque (Biotec Laboratories Ltd., UK) jest szybkim testem komercyjnym, służącym do wykrywania prątków *M. tuberculosis* bezpośrednio w płwocinie (Ryc. 6A) (BARMAN GADRE 2007, KAUFMAN i VAN HELDEN 2008). Wykorzystuje się w nim zdolność mykobakteriofagów do wnikania i replikowania się w wolnorosnących wirulentnych szczepach *M. tuberculosis* i *M. ulcerans* oraz szybko-rosnących prątkach *M. smegmatis* (BARMAN i GADRE 2007). Bakteriofag D29 stosowany w tym teście należy do dsDNA (ang. double-stranded DNA) fagów (JAFARI i LANGE 2008). Opracowaną standardowymi metodami płwocinę inkubuje się z bakteriofagami, które atakują żywe komórki prątków. Dodanie w kolejnym etapie substancji o aktywności przeciwwirusowej powoduje eliminację wirionów znajdujących się poza docelową komórką bakteryjną. Następnie, taką próbę miesza ze środowiskowymi szczepami *M. smegmatis*, po czym wysiewa na sztuczne podłoża hodowlane. Zainfekowane przez bakteriofagi prątki gruźlicy obecne w płwocinie, ulegają lizie, uwalniając nowe cząstki wirusowe zdolne do wnikania do szybko-rosnących *M. smegmatis*. Pojawienie się przynajmniej 20 łysinek na podłożu świadczy o pozytywnym wyniku testu (PALOMINO 2006, BARMAN i GADRE 2007, JAFARI i LANGE 2008, KAUFMAN i VAN HELDEN 2008). Zaletą tego testu jest fakt, iż wynik uzyskuje się po 48 godz. Dodatkowo, test ten wykrywa już 100–300 komórek mykobakteryjnych w 1 ml płwociny, co czyni go znacznie czulszym niż standardowa metoda bakterioskopii (JAFARI i LANGE 2008).

Test Reporter Phage wykorzystuje rekombinowane bakteriofagi TM4, D29, L5 i Che12, dzięki którym, metodami inżynierii genetycznej, wprowadzono geny reporterowe, w tym gen kodujący lucyferazę (*fflux*), bądź białka fluorescencyjne: zielone GFP (ang. green fluorescent protein) lub żółte ZsYellow (Ryc. 6B) (HAZBÓN i współaut. 2003, JAFARI i LANGE 2008). Po wnikięciu faga zawierającego reporter lucyferazy (ang. luciferase reporter phage, LPR) do docelowej komórki



Ryc. 6. Schemat wykrywania prątków z wykorzystaniem bakteriofagów w teście FastPlaque (A) oraz ReporterPhage (B).

bakteryjnej, ekspresji ulega materiał genetyczny faga wraz z białkiem reporterowym. Nagromadzona lucyferaza katalizuje w obecności ATP rozkład obecnej w podłożu lucyferyny, czego konsekwencją jest emisja światła (HAZBÓN i współaut. 2003). Zjawisko to zachodzi wyłącznie w aktywnych metabolicznie prątkach i wykorzystywane jest nie tylko do wykrywania ich w materiale biologicznym, ale również do oceny wrażliwości prątków na tuberkulostatyki (HAZBÓN i współaut. 2003, JAFARI i LANGE 2008). Ograniczeniem testu jest zdolność bakteriofagów do zakażania nie tylko prątków *M. tuberculosis*, lecz również *M. bovis*, w tym *M. bovis* BCG, a także *M. marinum*, *M. chelonae*, *M. aurum*, *M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. terrae*, *M. xenopi* i *M. intracellulare*, co znacznie obniża jego specyficzność (JAFARI i LANGE 2008).

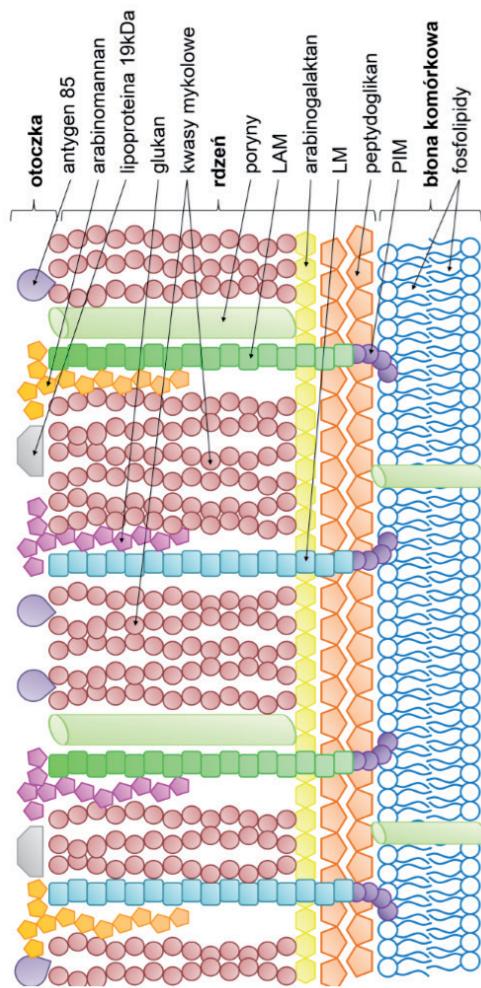
Nowe, alternatywne metody wykrywania zakażenia prątkami gruźlicy

Współczesne trendy badawcze skupiają się na poszukiwaniu nowych metod diagnozowania gruźlicy, co pozwoli na opracowywanie skutecznych schematów terapeutycznych i monitorowanie postępów leczenia

oraz wyznaczanie nowych sposobów swoistej profilaktyki. Wśród kandydatów na biomarkery zakażenia prątkami gruźlicy typuje się wiele komponentów ściany komórkowej tych bakterii (WALLIS i współaut. 2013).

Jednym z nich jest glikolipid – lipoarabino-o-mannan (LAM). Wykrywanie LAM, jako bakteryjnego produktu aktywnych metabolicznie prątków, może mieć potencjalny udział w rozróżnianiu aktywnej postaci gruźlicy od uśpionego zakażenia *M. tuberculosis*, niezależnie od statusu odpornościowego chorych, co wydaje się być istotne w wykrywaniu gruźlicy u osób zakażonych wirusem HIV (BRENNAN 2003, NAKIYINGI i współaut. 2014). Czułość i swoistość komercyjnego testu wykrywającego LAM w moczu (Clearview TB® ELISA, Inverness Medical Innovations, U.S.A.), wśród pacjentów z aktywną gruźlicą płuc, waha się odpowiednio od 13% do 93% i od 87% do 99%, podczas gdy u pacjentów HIV-dodatnich parametry te osiągają odpowiednio wartości 67–85% i 94–100% (LAWN 2012, SAVOLAINEN i współaut. 2013).

Rdzeń ściany komórkowej prątków stanowi peptydyoglikan (PG), z przyłączonym do niego kowalencyjnie arabinogalaktanem



Ryc. 7. Schemat budowy ściany komórkowej *M. tuberculosis*.

estryfikowanym kwasami mykoloowymi. Są to α -alkilowe- β -hydroksy kwasy tłuszczowe, o liczbie atomów węgla wahającej się od 70. do 90., charakterystycznej dla rodzaju *Mycobacterium*. Ponadto, kwasy mykoloowe mają wysoki stopień zróżnicowania pod względem struktury chemicznej, co znajduje przełożenie w taksonomii, pozwalając na odróżnienie prątków *M. tuberculosis* od MOTT (ang. mycobacteria other than tuberculosis) (PLÜDDEMANN i współaut. 2006, GUENIN-MACÉ i współaut. 2009, KOWALSKI i współaut. 2012, LAWN 2012, SZEWCZYK i współaut. 2013). Wykrywanie kwasów mykoloowych metodą chromatografii cieczowej (ang. liquid chromatography, LC) czy elektroforyzy kapilarnej (ang. capillary electrophoresis, CE), w połączeniu z tandemową spektrometrią mas (ang. tandem mass spectrometry, MS/MS), w materiale badanym, uzyskanym od pacjentów z aktywną gruźlicą, pozwala osiągnąć czułość i specyficzność odpowiednio na

poziomie 94% i 95% (KOWALSKI i współaut. 2012).

Spośród wielu prątkowych białek wydzielniczych na uwagę zasługuje białko Ag85. Należy ono do rodziny białek wiążących fibronektynę i zbudowane jest z trzech składowych: Ag85A (32 kDa), Ag85B (30 kDa) i Ag85C (32,5 kDa). Białko Ag85 wykrywa się immunoenzymatycznie w płwocinie pacjentów z aktywną gruźlicą płuc, a także w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów z gruźlicą centralnego układu nerwowego (DRUSZCZYŃSKA i współaut. 2011, KASHYAP i współaut. 2013, PHUNPAE i współaut. 2014). Badania KASHYPA i współaut. (2013) wykazały czułość i swoistość diagnostyczną testów wykrywających kompleks białek Ag85 odpowiednio na ponad 85% i 84%.

Wysocze konserwatywne białko szoku cieplnego (ang. heat shock protein, Hsp) jest wytwarzane przez prątki w odpowiedzi na reakcje odpornościowe gospodarza i należy do grupy tzw. białek stresowych. Białko Hsp65 z jednej strony pełni funkcję białka opiekuńczego (ang. chaperone), z drugiej strony nasila proces przetwarzania i prezentacji antygenów komórkom odpornościowym (RAJAN i współaut. 2007). Obecność tego białka wykrywano w surowicy pacjentów z klinicznymi objawami gruźlicy płuc, jak i w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych na gruźlicę centralnego układu nerwowego (DUBANIEWICZ i współaut. 2006, RAJAN i współaut. 2007, SINGH i KUMAR 2012). Na podkreślenie zasługuje również fakt, iż białko Hsp65 jest nieobecne w populacji osób zdrowych poddanych szczepieniu *M. bovis* BCG, co dodatkowo podnosi jego wartość diagnostyczną na terenach, gdzie gruźlica występuje endemicznie (RAJAN i współaut. 2007). Czułość i swoistość immunoenzymatycznych testów wykrywających białko Hsp65 szacuje się odpowiednio na 82% i 89% (DUBANIEWICZ i współaut. 2006, RAJAN i współaut. 2007).

PODSUMOWANIE

Gruźlica nadal stanowi globalne zagrożenie zdrowia i życia ludzi. Fakt, iż coraz częściej izolowane są szczepy *M. tuberculosis* odporne na wszystkie leki przeciwprątkowe, spowodował, iż gruźlica powróciła na listę nieuleczalnych chorób zakaźnych. Pomimo wieloletnich badań nad chorobotwórczością prątków *M. tuberculosis*, patologia gruźlicy, towarzyszące jej reakcje odpornościowe pozostają wciąż niezrozumiałe. Skutkuje to ograniczonymi możliwościami diagnozowania choroby, utrudnia opracowywanie skutecznych schematów terapeutycznych i monitorowania postępów leczenia oraz wyznaczania nowych sposobów swoistej profilaktyki.

Streszczenie

Gruźlica wciąż stanowi poważny problem epidemiologiczny na całym świecie. Ponad 130 lat-wyższej pracy naukowców na całym świecie nie przyniosło zapewniającej protekcję szczepionki przeciwgruźliczej, szybkich i pewnych metod diagnozowania tej choroby oraz skutecznych sposobów leczenia gruźlicy wywołanej przez izolowane ze wzrastającą częstością wielolekooporne prątki gruźlicy. Wywołujące gruźlicę prątki *Mycobacterium tuberculosis* są Gram-dodatnimi pałeczkami tlenowymi o unikatowej w świecie bakterii ścianie komórkowej, która zbudowana jest, poza peptydoglikanem i polisacharydami, z nietypowych glikolipidów i lipidów, w tym długocząściowych kwasów mykolowych, będących silnymi modulatorami układu odpornościowego człowieka. Diagnozowanie gruźlicy oparte jest na hodowli prątków na podłożach bakteriologicznych, obok której wykonywane jest badanie bakterioskopowe płwociny, radiologiczna ocena zmian w klatce piersiowej, tuberkulinowy test skórny, czy też testy molekularne (AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* Xpert MTB/RIF) lub metody wykorzystujące mykobakteriofagi (FastPlaque oraz Reporter-Phage). Istotnym problemem epidemiologicznym są uśpione (latente) zakażenia prątkami gruźlicy, które wykrywa się testami interferonowymi (QuantiFERON®-TB Gold Plus oraz T-SPOT.TB). Mimo znacznego postępu wciąż brakuje szybkich, wiarygodnych i tanich testów diagnostycznych gruźlicy.

LITERATURA

- ANDERSEN P., MUNK M. E., POLLOCK J. M., DOHERTY T. M., 2000. *Specific immune-based diagnosis of tuberculosis*. Lancet 356, 1099-1104.
- AUGUSTYNOWICZ-KOPEĆ E., ZWOLSKA Z., 2010. *Postępy w diagnostyce i epidemiologii molekularnej Mycobacterium tuberculosis*. Post. Microbiol. 49, 151-156.
- AUGUSTYNOWICZ-KOPEĆ E., DEMKOW U., GRZELEWSKA-RZYMKOWSKA I., KORZENIEWSKA-KOSELA M., LANGFORT R., MICHAŁOWSKA-MTCZUK D., ROWIŃSKA-ZAKRZEWSKA E., ZIELONKA T., ZIOŁKOWSKI J., ZWOLSKA Z., 2013. *Zalecenia Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc dotyczące rozpoznawania, leczenia i zapobiegania gruźlicy u dorosłych i dzieci*. Pneumonologia i Alergologia Polska 81, 323-339.
- BARMAN P., GADRE D., 2007. *A study of phage based diagnostic technique for tuberculosis*. Indian J. Tuberc. 54, 36-40.
- BRENNAN P. J., 2003. *Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis 83, 91-97.
- BURRILL J., WILLIAMS C. J., BAIN G., CONDER G., HINE A. L., MISRA R. R., 2007. *Tuberculosis: a radiologic review*. Radiographics 27, 1255-1273.
- CHEN J., ZHANG R., WANG J., LIU L., ZHENG Y., SHEN Y., QI T., LU H., 2011. *Interferon-gamma release assays for the diagnosis of active tuberculosis in HIV-infected patients: a systematic review and meta-analysis*. PLoS One 6, e26827.
- COLE S. T., BROSCHE R., PARKHILL J., GARNIER T., CHURCHER C., HARRIS D., GORDON S. V., EIGLMEIER K., GAS S., BARRY C. E., TEKAIA F., BADCOCK K., BASHAM D., BROWN D., CHILLINGWORTH T., 1998. *Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence*. Nature 393, 537-544.
- COLLINS D. M., 2001. *Virulence factors of Mycobacterium bovis*. Tuberculosis 81, 97-102.
- CRUZ A., FRAGA A. G., FOUNTAIN J. J., RANGEL-MORENO J., TORRADO E., SARAIVA M., PEREIRA D. R., RANDALL T. D., PEDROSA J., COOPER A. M., CASTRO A.G., 2010. *Pathological role of interleukin 17 in mice subjected to repeated BCG vaccination after infection with Mycobacterium tuberculosis*. J. Exp. Med. 207, 1609-1616.
- DAI Y., FENG Y., XU R., XU W., LU W., WANG J., 2012. *Evaluation of interferon-gamma release assays for the diagnosis of tuberculosis: an updated meta-analysis*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 31, 3127-3137.
- DANIEL T.M., 2006. *The history of tuberculosis*. Respir. Med. 100, 1862-1870.
- DONG C., MARTINEZ G. J., 2011. *T cells: the usual subsets*. Nat. Rev. Immunol. 11, http://www.nature.com/nri/posters/tcellsubsets/nri1009_tcellsubsets_poster.pdf.
- DRUSZCZYŃSKA M., STRAPAGIEL D., RUDNICKA W., 2009. *Molekularne i komórkowe parametry w gruźlicy*. Nowa Med. 1, 43-47.
- DRUSZCZYŃSKA M., WŁODARCZYK M., FOL M., RUDNICKA W., 2011. *Rozpoznawanie antygenów prątków przez fagocyty*. Post. Hig. Med. Dosw. 65, 28-39.
- DRUSZCZYŃSKA M., KOWALEWICZ-KULBAT M., FOL M., WŁODARCZYK M., RUDNICKA W., 2012. *Latent M. tuberculosis infection-pathogenesis, diagnosis, treatment and prevention strategies*. Pol. J. Microbiol. 61, 3-10.
- DRUSZCZYŃSKA M., WŁODARCZYK M., JANISZEWSKA-DROBINSKA B., KIELNIEWSKI G., ZAWADZKA J., KOWALEWICZ-KULBAT M., FOL M., SZPAKOWSKI P., RUDNICKA K., CHMIELA M., RUDNICKA W., 2013. *Monocyte signal transduction receptors in active and latent tuberculosis*. Clin. Dev. Immunol., doi: 10.1155/2013/851452.
- DUBANIEWICZ A., KÄMPFER S., SINGH M., 2006. *Serum anti-mycobacterial heat shock proteins antibodies in sarcoidosis and tuberculosis*. Tuberculosis 86, 60-67.
- DUCATI R. G., RUFFINO-NETTO A., BASSO L. A., SANTOS D. S., 2006. *The resumption of consumption - a review on tuberculosis*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 101, 697-714.
- EMPADINHAS N., ALBUQUERQUE L., MENDES V., MACEDO-RIBEIRO S., DA COSTA M. S., 2008. *Identification of the mycobacterial glucosyl-3-phosphoglycerate synthase*. FEMS Microbiol. Lett. 280, 195-202.
- FLORES A. R., PARSONS L. M., PAVELKA M. S. JR., 2005. *Genetic analysis of the beta-lactamases of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium smegmatis and susceptibility to beta-lactam antibiotics*. Microbiology 151, 521-532.
- FORRELLAD M. A., KLEPP L. I., GIOFFRÉ A., SABIO Y GARCÍA J., MORBIDONI H. R., DE LA PAZ SANTANGELO M., CATALDI A. A., BIGI F., 2013. *Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex*. Virulence 4, 3-66.
- GENGENBACHER M., KAUFMANN S. H., 2012. *Mycobacterium tuberculosis: success through dormancy*. FEMS Microbiol. Rev. 36, 514-532.
- GUENIN-MACÉ L., SIMÉONE R., DEMANGEL C., 2009. *LIPIDS of pathogenic Mycobacteria: contributions to virulence and host immune suppression*. Transbound. Emerg. Dis. 56, 255-268.
- GUTIERREZ M. C., BRISSE S., BROSCHE R., FABRE M., OMAIS B., MARMIESSE M., SUPPLY P., VINCENT V., 2005. *Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog. 1, e5.

- HAZBÓN M. H., GUARÍN N., FERRO B. E., RODRÍGUEZ A. L., LABRADA L. A., TOVAR R., RISK A. P. F., JACOBS W. R. JR., 2003. *Photographic and luminometric detection of luciferase reporter phages for drug susceptibility testing of clinical Mycobacterium tuberculosis isolates*. J. Clin. Microbiol. 41, 4865-4869.
- IGiChP, 2016. *Gruźlica w Polsce*. Biuletyn Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc. http://www.igichp.edu.pl/pobierz/Biuletyn_2016.zip.
- JAFARI C., LANGE C., 2008. *Suttons's law: local immunodiagnosis of tuberculosis*. Infection 36, 510-514.
- KASHYAP R. S., SHEKHAWAT S. D., NAYAK A. R., PUROHIT H. J., TAORI G. M., DAGINAWALA H. F., 2013. *Diagnosis of tuberculosis infection based on synthetic peptides from Mycobacterium tuberculosis antigen 85 complex*. Clin. Neurol. Neurosurg. 115, 678-683.
- KAUFMAN S. H. E., PAUL VAN HELDEN., 2008. *Handbook of tuberculosis. Clinics, diagnostics, therapy and epidemiology*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- KAUFMANN S. H., COLE S. T., MIZRAHI V., RUBIN E., NATHAN C., 2005. *Mycobacterium tuberculosis and the host response*. J. Exp. Med. 201, 1693-1697.
- KLEINNIJENHUIS J., OOSTING M., JOOSTEN L. A., NETEA M. G., VAN CREVEL R., 2011. *Innate immune recognition of Mycobacterium tuberculosis*. Clin. Dev. Immunol., doi: 10.1155/2011/405310.
- KOČIK J., BIELECKA A., ROSZKOWIAK A., KUBIAK L., LASOCKI K., NIEMCEWICZ M., TARGOWSKI T., 2012. *Immunodiagnosics of latent tuberculosis among polish armed forces clinical immunology*. Centr. Eur. J. Immunol. 37, 159-163.
- KOUL A., ARNOULT E., LOUNIS N., GUILLEMONT J., ANDRIES K., 2011. *The challenge of new drug discovery for tuberculosis*. Nature 469, 483-490.
- KOWALSKI K., SZEWCZYK R., DRUSZCZYŃSKA M., 2012. *Kwasy mikołowe – potencjalne markery diagnostyki oportunistycznych zakażeń mikroorganizmami z podrzędu Corynebacterineae*. Post. Hig. Med. Dosw. 66, 461-468.
- KRYSZTOPA-GRZYBOWSKA K., LUTYŃSKA A., 2014. *Advances in the development of new vaccines against tuberculosis. 100 years after the introduction of BCG*. Post. Hig. Med. Dosw. 68, 768-776.
- KUNNATH-VELAYUDHAN S., GENNARO M. L., 2011. *Immunodiagnosis of tuberculosis: a dynamic view of biomarker discovery*. Clin. Microbiol. Rev. 24, 792-805.
- LAWN S. D., 2012. *Point-of-care detection of lipoarabinomannan (LAM) in urine for diagnosis of HIV-associated tuberculosis: a state of the art review*. BMC Infect. Dis. 12, 103.
- LING D. I., PAI M., DAVIDS V., BRUNET L., LENDERS L., MELDAU R., CALLIGARO G., ALLWOOD B., VAN ZYL-SMIT R., PETER J., BATEMAN E., DAWSON R., DHEDA K., 2011. *Are interferon-γ release assays useful for diagnosing active tuberculosis in a high-burden setting?* Eur. Respir. J. 38, 649-656.
- MEHROTRA J., BISHAI W. R., 2001. *Regulation of virulence genes in Mycobacterium tuberculosis*. Int. J. Med. Microbiol. 291, 171-182.
- MICHAŁOWSKA-MITCZUK D., 2000. *Rozpoznawanie gruźlicy*. Nowa Medycyna 4, <http://www.czytelniamedyczna.pl/1556,roznawanie-gruzlicy.html>.
- MUDDAIAH R. K., JAMES P. M., LINGEGOWDA R. K., 2013. *Comparative study of smear microscopy, rapid slide culture, and Lowenstein – Jensen culture in cases of pulmonary tuberculosis in a tertiary care hospital*. J. Res. Med. Sci. 18, 767-771.
- NAKIYINGI L., MOODLEY V. M., MANABE Y. C., NICOL M. P., HOLSHOUSE M., ARMSTRONG D. T., ZEMANAY W., SIKHONDZE W., MBABAZI O., NONYANE B. A., SHAH M., JOLOBA M. L., ALLAND D., ELLNER J. J., DORMAN S. E., 2014. *Diagnostic accuracy of a rapid urine lipoarabinomannan test for tuberculosis in HIV-infected adults*. J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. 66, 270-279.
- NEILL S. D., SKUCE R. A., POLLOCK J. M., 2005. *Tuberculosis – new light from an old window*. J. Appl. Microbiol. 98, 1261-1269.
- OLARU I. D., VON GROOTE-BIDLINGMAIER F., HEYCKENDORF J., YEW W. W., LANGE C., CHANG K. C., 2015. *Novel drugs against tuberculosis: a clinician's perspective*. Eur. Respir. J. 45, 1119-1131.
- ONUR H., HATİPOĞLU S., ARICA V., HATİPOĞLU N., ARICA S. G., 2012. *Comparison of quantiferon test with tuberculin skin test for the detection of tuberculosis infection in children*. Inflammation 35, 1518-1524.
- PALOMINO J., 2006. *Newer Diagnostics for tuberculosis and multi-drug resistant tuberculosis*. Curr. Opin. Pulm. Med. 12, 172-178.
- PARIDA S. K., KAUFMANN S. H., 2010. *The quest for biomarkers in tuberculosis*. Drug Discov. Today 15, 148-157.
- PHUNPAE P., CHANWONG S., TAYAPIWATANA C., APIRATMATEEKUL N., MAKEUDOM A., KASINRERK W., 2014. *Rapid diagnosis of tuberculosis by identification of Antigen 85 in mycobacterial culture system*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 78, 242-248.
- PLÜDDEMANN A., MUKHOPADHYAY S., GORDON S., 2006. *The interaction of macrophage receptors with bacterial ligands*. Expert. Rev. Mol. Med. 8, 1-25.
- POLLOCK L., BASU ROY R., KAMPMANN B., 2013. *How to use: interferon γ release assays for tuberculosis*. Arch. Dis. Child Educ. Pract. Ed. 98, 99-105.
- RAJAN A. N., KASHYAP R. S., PUROHIT H. J., TAORI G. M., DAGINAWALA H. F., 2007. *Serodiagnosis of tuberculosis based on the analysis of the 65 kD heat shock protein of Mycobacterium tuberculosis*. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 11, 792-797.
- RAMOS J. M., ROBLEDANO C., MASIÁ M., BELDA S., PADILLA S., RODRÍGUEZ J. C., GUTIERREZ F., 2012. *Contribution of Interferon gamma release assays testing to the diagnosis of latent tuberculosis infection in HIV-infected patients: A comparison of QuantiFERON-TB Gold In Tube, T-SPOT.TB and tuberculin skin test*. BMC Infect. Dis. 12, 169.
- RANGAKA M. X., WILKINSON K. A., GLYNN J. R., LING D., MENZIES D., MWANSA-KAMBAFWILE J., FIELDING K., WILKINSON R. J., PAI M., 2012. *Predictive value of interferon-γ release assays for incident active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Infect. Dis. 12, 45-55.
- RUDNICKA W., 2004. *Molekularne mechanizmy odporności na gruźlicę*. Post. Mikrobiol. 43, 107-127.
- SAFIAŃSKA A., WALKIEWICZ R., NEJMAN-GRYZ P., GRUBEK-JAWORSKA H., 2012. *Zastosowanie wybranych komercyjnych testów molekularnych w mikrobiologicznej diagnostyce gruźlicy*. Pneumonol. Alergol. Pol. 80, 6-12.
- SAVOLAINEN L., KANTELE A., SANDBOGE B., SIRÉN M., VALLEALA H., TUOMPO R., PUSA L., ERKIN-

- JUNTTI-PEKKANEN R., KNUUTILA A., KU C. L., CHI C. Y., VASANKARI T., TUUMINEN T., 2013. *Modification of clear view tuberculosis (TB) enzyme-linked immunosorbent assay for TB patients not infected with HIV*. Clin. Vaccine Immunol. 20, 1479-1482.
- SESTER M., SOTGIU G., LANGE C., GIEHL C., GIRARDI E., MIGLIORI G. B., BOSSINK A., DHEDA K., DIEL R., DOMINGUEZ J., LIPMAN M., NEMETH J., RAVN P., WINKLER S., HUITRIC E., SANDGREN A., MANISSERO D., 2011. *Interferon-γ release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis*. Eur. Respir. J. 37, 100-111.
- SHARMA S.K., MOHAN A., 2013. *Tuberculosis: From an incurable scourge to a curable disease - journey over a millennium*. Indian J. Med. Res. 137, 455-493.
- SINGH A., KUMAR V., 2012. *Specific and rapid detection of Mycobacterium tuberculosis complex in clinical samples by polymerase chain reaction*. Interdiscipl. Persp. Infect. Diseases 2012, doi:10.1155/2012/654694.
- SINGHAL R., MYNEEDU V. P., 2015. *Microscopy as a diagnostic tool in pulmonary tuberculosis*. Int. J. Mycobacteriol. 4, 1-6.
- SMITH I., 2003. *Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence*. Clin. Microbiol. Rev. 16, 463-496.
- STEINGART K. R., NG V., HENRY M., HOPEWELL P. C., RAMSAY A., CUNNINGHAM J., URBANCZIK R., PERKINS M. D., AZIZ M. A., PAI M., 2006. *Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review*. Lancet Infect. Dis. 6, 664-674.
- STEINGART K. R., SOHN H., SCHILLER I., KLODA L. A., BOEHME C. C., PAI M., DENDUKURI N., 2013. *Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults*. Cochrane Database Syst. Rev. 1, doi: 10.1002/14651858.CD009593.pub2..
- SUN A. H., FAN X. L., LI L. W., WANG L. F., ANS W. Y., YAN J., 2009. *Rapid detection of rpoB gene mutations in rif-resistant M. tuberculosis isolates by oligonucleotide microarray*. Biomed Environ Sci 22, 253-258.
- SWAI H. F., MUGUSI F. M., MBWAMBO J. K., 2011. *Sputum smear negative pulmonary tuberculosis: sensitivity and specificity of diagnostic algorithm*. BMC Res Notes 4, 475.
- SWINDELLS S., 2012. *New drugs to treat tuberculosis*. F1000 Medicine Reports 4, 12.
- SZEWICZYK R., KOWALSKI K., JANISZEWSKA-DROBINSKA B., DRUSZCZYŃSKA M., 2013. *Rapid method for Mycobacterium tuberculosis identification using electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of mycolic acids*. Diagn Microbiol Infect Dis 76, 298-305.
- VASSILOPOULOS D., TSIKRIKA S., HATZARA C., PODIA V., KANDILI A., STAMOULIS N., HADZIYANNIS E., 2011. *Comparison of two gamma interferon release assays and tuberculin skin testing for tuberculosis screening in a cohort of patients with rheumatic diseases starting anti-tumor necrosis factor therapy*. Clin Vaccine Immunol 18, 2102-2108.
- VILLEMAGNE B., CRAUSTE C., FLIPO M., BAULARD A., DÉPREZ B., WILLAND N., 2012. *Tuberculosis: the drug development pipeline at a glance*. Eur J Med Chem 51, 1-16.
- WALLIS R. S., KIM P., COLE S., HANNA D., ANDRADE B. B., MAEURER M., SCHITO M., ZUMLA A., 2013. *Tuberculosis biomarkers discovery: developments, needs, and challenges*. Lancet Infect Dis 13, 362-372.
- WALLIS R. S., KIM P., COLE S., HANNA D., ANDRADE B. B., MAEURER M., SCHITO M., ZUMLA A., 2013. *TUBERCULOSIS biomarkers discovery: developments, needs, and challenges*. Lancet Infect Dis 13, 362-372.
- WHO, 2014. *Global tuberculosis report 2014*. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809_eng.pdf
- WHO, 2015. *Global tuberculosis report 2015*. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf
- WŁODARCZYK M., RUDNICKA W., JANISZEWSKA-DROBINSKA B., KIELNIEWSKI G., KOWALEWICZ-KULBAT M., FOL M., DRUSZCZYŃSKA M., 2014. *INTERFERON-GAMMA ASSAY in combination with tuberculin skin test are insufficient for the diagnosis of culture-negative pulmonary tuberculosis*. PLoS One 15, e107208.
- WŁODARCZYK M., DRUSZCZYŃSKA M., JANISZEWSKA-DROBINSKA B., KIELNIEWSKI G., ZAWADZKA J., RUDNICKA W., 2012. *TEST INTERFERONOWY I TUBERKULINOWY U PACJENTÓW Z AKTYWNA GRUŻLICĄ PŁUC POTWIERDZONĄ I NIEPOTWIERDZONĄ BAKTERIOLOGICZNIE ORAZ U CHORYCH Z OSTRYM NIEPRAŁKOWYM ZAKAŻENIEM UKŁADU ODDECHOWEGO*. Sepsis 5, 213-221.
- ZUMLA A., HAFNER R., LIENHARDT CH., HOELSCHER M., NUNN A., 2012. *Advancing the development of tuberculosis therapy*. Nat Rev Drug Discov 11, 171-172.
- ZWOLSKA Z., 2010. *Koch i jego dokonania - rys historyczny*. Post Mikrobiol 49, 139-150.

KOSMOS Vol. 66, 2, 313–325, 2017

MARCIN WŁODARCZYK, WIESŁAWA RUDNICKA, MAGDALENA DRUSZCZYŃSKA

Department of Immunology and Infectious Biology, Institute of Microbiology, Biotechnology and Immunology, The Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Łódź, E-mail: martini.w@wp.pl

TUBERCULOSIS – THE FORGOTTEN DISEASE WORTH TO REMEMBER

Summary

Tuberculosis (TB) remains a serious epidemiological problem throughout the world. More than 130 years of hard work of scientists around the world has not delivered fully protective vaccine for TB, fast and reliable methods for diagnosing and effective treatment of tuberculosis caused by multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB), isolated recently with an increasing incidence. MDR- TB are Gram-positive, aerobic bacilli with the unique bacterial cell wall, which is built not only of peptidoglycan and polysaccharides, but also of unusual glycolipids and lipids, including long-chain mycolic acids, which are potential modulators of the human immune system. Diagnosis of tuberculosis is based on the culture of mycobacteria on bacteriological media, alongside which are carried out: bacterioscopy of sputum, radiographic assessment of changes in the chest, tuberculin skin test, or molecular test (AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* Xpert MTB/RIF), and tests with mycobacteriophages (Fast-Plaque and ReporterPhage). The important epidemiological issue are dormant (latent) mycobacterial infections, which can be detected by interferon- γ release assays (QuantiFERON®-TB Gold Plus and T-SPOT.TB). Despite considerable progress we are still lacking high-speed, reliable and low-cost diagnostic tests for tuberculosis.

Key words: BCG, diagnosis, interferon- γ release assays, TB, tuberculosis