

©Borgis

*Sylwia Brzezińska¹, Małgorzata Szólkowska², Renata Langfort², Zofia Zwolska¹, Ewa Augustynowicz-Kopec¹

Wykrywanie prątków *Mycobacterium tuberculosis* complex w materiałach tkankowych utrwalonych w parafinie

Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin-embedded tissue specimens

¹Zakład Mikrobiologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa
Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. Ewa Augustynowicz-Kopec

²Zakład Patomorfologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa
Kierownik Zakładu: prof. nadzw. dr hab. med. Renata Langfort

Słowa kluczowe

gruźlica, metody genetyczne, parafina, tkanka, ziarniniaki

Key words

Mycobacterium tuberculosis, molecular methods, paraffin, tissue, granulomas

Streszczenie

Wstęp. Molekularne metody diagnostyczne umożliwiają wykrywanie materiału genetycznego *M. tuberculosis* complex bezpośrednio w materiałach klinicznych. Metody te zastosowano również w diagnostyce materiałów pooperacyjnych, utrwalonych w parafinie. Potwierdzenie bądź wykluczenie obecności materiału genetycznego *Mycobacterium tuberculosis* complex w preparatach histopatologicznych jest szczególnie istotne w przypadku pacjentów, których diagnostyka gruźlicy opiera się wyłącznie na materiałach tkankowych, niepoddanych badaniom mikrobiologicznym.

Cel pracy. Celem przeprowadzonych badań była ocena przydatności metod genetycznych do wykrywania *Mycobacterium tuberculosis* complex, w materiałach klinicznych utrwalonych w parafinie.

Materiał i metody. Analizowano 63 materiały tkankowe, utrwalone w parafinie, uzyskane od chorych z podejrzeniem gruźlicy. Diagnostykę wykonywano według następującego algorytmu: 1. Odparafinowanie preparatów z użyciem ksyłenu, odwodnienie przy użyciu etanolu. 2. Izolowanie DNA za pomocą odpowiedniego zestawu przeznaczonego do materiałów tkankowych utrwalonych w parafinie. 3. BD ProbeTec. Amplifikacja DNA *Mycobacterium*, hybrydyzacja z odpowiednią dla gatunku sondą. Wykrywana jest sekwencja IS6110 charakterystyczna dla *M. tuberculosis* complex. 4. GeneXpert Dx Xpert MTB/RIF oparty na reakcji nested Real-time PCR. Test Xpert MTB/RIF jest stosowany do wykrywania *Mycobacterium tuberculosis* i oporności na RMP.

Wyniki. Analiza molekularna wykazała obecność DNA *M. tuberculosis* w 21 materiałach, przy czym za pomocą barwienia Ziehl-Neelsen potwierdzono ją jedynie w 13 materiałach. Wynik barwienia Z-N był ujemny u 41 pacjentów, u 33 z nich wynik był zgodny z ujemnym wynikiem testu genetycznego.

Wnioski. Metody molekularne pozwalają uzupełnić i zweryfikować wyniki mikrobiologiczne i histopatologiczne.

Summary

Introduction. Molecular methods of diagnosis enabled the detection of *M. tuberculosis* complex directly in clinical materials, now make it possible also in the tissue embedded in paraffin blocks. Use of molecular methods to confirm the presence of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin-fixed material is particularly important for patients whose diagnosis based solely on the tissue and were not microbiologically tested.

Aim. The aim of the research was to evaluate the usefulness of genetic methods to confirm the presence of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical specimens on paraffin.

Material and methods. 63 clinical specimens embedded in paraffin from patients with suspected tuberculosis. 1. Deparaffinization of specimens in xylene and dehydration in 96% ethanol by successive centrifugation. 2. Isolation DNA with the appropriate set to tissues embedded in paraffin blocks. 3. BD ProbeTec: The amplification (in microwell) of *Mycobacterium* DNA, detection of the copied deoxyribonucleic acid in the process of the hybridization with species probe. Detected is insertion sequence IS6110 characteristic for the group *M. tuberculosis* complex. 4. GeneXpert Dx Test Xpert MTB/RIF is based on the reaction of nested real-time PCR. Test Xpert MTB/RIF is used to detect *Mycobacterium tuberculosis* and resistance to RMP.

Adres/address:

*Sylwia Brzezińska
Zakład Mikrobiologii I GiChP
ul. Płocka 26, 01-138 Warszawa
tel./fax +48 (22) 431-21-82
s-brzezinska@wp.pl

Results. The molecular analysis revealed the presence of *M. tuberculosis* complex DNA in 21 samples, whereas acid fast bacilli could be detected by Ziehl-Neelsen staining in only 13 samples. Z-N was negative in 41 of the patients, for 33 of them the result was compatible with the negative genetic test.

Conclusions. Molecular methods are very important to complement and verify the microbiological and pathological results.

WSTĘP

Mikrobiologiczna diagnostyka *Mycobacterium* w znacznym stopniu odbiega od typowej diagnostyki bakteriologicznej. Różnice te wynikają przede wszystkim ze specyficznych cech *Mycobacterium*, takich jak: długi czas wzrostu (komórka prątków dzieli się raz na 24 h), budowa ściany komórkowej, skład, którego nawet w 60% mogą stanowić lipidy. Hydrofobowy charakter ściany komórkowej prątków zapewnia im ochronę przed wysuszeniem, niekorzystnymi wartościami pH oraz podwyższoną temperaturą (1).

Prątki posiadają specyficzne wymagania wzrostowe, w związku z tym pożywki hodowlane muszą zawierać optymalne zestawy wszystkich koniecznych substancji wzrostowych, być wzbogacone białkiem zwierzęcym i pirogronianem lub glicerolem jako źródłem węgla (2).

Czynniki te powodują, że w zależności od zastosowanej metody diagnostycznej czas oczekiwania na wyniki badań trwa od jednego dnia (metody molekularne i rozmaz) do nawet 10 tygodni (uzyskanie hodowli na jajowej pożywce stałej L-J).

Rozwój biologii molekularnej i opracowanie testów opartych na amplifikacji kwasów nukleinowych pozwoliły na skrócenie czasu oczekiwania na wyniki badań diagnostycznych. Wykorzystanie unikalnych sekwencji nukleotydowych *Mycobacterium* umożliwiło wykrywanie obecności prątków w materiale klinicznym z większą czułością niż przy zastosowaniu bakterioskopii i w znacznie krótszym czasie niż w metodach hodowlanych. Badania molekularne znalazły zastosowanie w wykrywaniu materiału genetycznego prątków od chorych z podejrzeniem gruźlicy płuc, a także z podejrzeniem postaci pozapłucnych, u których ze względu na skąpoprątkowy charakter materiałów diagnostycznych trudno jest uzyskać potwierdzenie procesu chorobowego standardowymi metodami mikrobiologicznymi. Testy genetyczne stosowane w rutynowej diagnostyce gruźlicy charakteryzują się wysoką czułością, ponieważ do stwierdzenia obecności prątków wystarczy 5×10^{-10} komórek bakteryjnych w 1 ml materiału, natomiast do uzyskania hodowli na pożywce L-J potrzeba aż 10^3 - 10^4 komórek prątków w 1 ml materiału.

Często materiały skąpoprątkowe (np. fragmenty tkanek lub materiały biopsyjne) od chorego kierowane są tylko do badań patomorfologicznych. Wynik tych badań uzyskuje się w krótszym czasie niż wynik posiewu, co u chorego z podejrzeniem gruźlicy pozwala na szybką weryfikację diagnozy klinicznej, nie gwarantując jednak pewnego rozpoznania choroby (3). W materiale tkankowym, z którego wykonywane są preparaty histopatologiczne, rozpoznanie opiera się na

obecności różnie uformowanych ziarniników, zbudowanych z komórek nabłonkowatych i olbrzymich, często z kwasochłonną martwicą w części centralnej (4). Obraz morfologiczny gruźlicy może być jednak różny, zależnie od stopnia upośledzenia układu odpornościowego. W ciężkich zaburzeniach odporności trudno jest znaleźć typowe ziarniniki (5). Pojawiają się natomiast rozlane obszary martwicy kwasochłonnej, niespecyficzne nacieki zapalne, zawierające histocyty, często o jasnej cytoplazmie, granulocyty obojętnochłonne, pojedyncze komórki olbrzymie i nabłonkowate (4). Jednak tworzenie się ziarniników nie jest specyficzne dla określonej jednostki chorobowej i może występować w stanach patologicznych, takich jak: gruźlica, sarkoidoza, mykobakterioza, bruceloza, choroba kociego pazura, ziarniniakowatość Wegenera czy grzybica (6).

Dlatego u chorego z podejrzeniem gruźlicy stwierdzenie ziarniników, nawet z martwicą, nie jest równoznaczne z rozpoznaniem choroby i wymaga diagnostyki mikrobiologicznej, umożliwiającej wykrycie prątków kwasoopornych w obrębie obserwowanych zmian morfologicznych.

W tym celu konieczne jest wykonanie barwienia preparatu metodą Ziehla-Neelsena (Z-N). Zalecane jest barwienie dwóch skrawków mikroskopowych, pobranych z różnych fragmentów materiału, w których obserwuje się ziarniniki z martwicą i rozmiękaniem (4). Metoda Z-N charakteryzuje się jednak niską czułością, ocenianą, w zależności od autorów, na 30-70% (2). Ponadto w badaniu tym nie można odróżnić prątków gruźlicy od prątków atypowych MOTT (ang. *Mycobacterium Other Than Tuberculosis*). W przypadku potwierdzenia, w wyniku barwienia Z-N, obecności prątków w preparatach histopatologicznych, należy wykonać posiew świeżego materiału klinicznego. Dla uzyskanej hodowli niezbędne jest wykonanie testu identyfikacji gatunkowej i lekowrażliwości. Z uwagi na fakt, że nie każdy materiał pooperacyjny jest skierowany do badania mikrobiologicznego, najczęściej jedyną metodą wykrycia prątków *M. tuberculosis* w preparatach histopatologicznych pozostaje badanie genetyczne.

Techniki molekularne umożliwiają szybką (w ciągu kilku godzin) amplifikację wybranych odcinków genomu bakteryjnego w ilości, jaka jest wymagana do hybrydyzacji ze specyficzną sondą genetyczną. W diagnostyce gruźlicy metody te umożliwiają wykrycie *M. tuberculosis* complex bezpośrednio w materiałach klinicznych, a przy wprowadzeniu odpowiednich modyfikacji metodologicznych również w materiałach tkankowych zatopionych w bloczkach parafinowych. Zatem w przypadku chorego z podejrzeniem gruźlicy, dla którego wykonano jedynie badanie histopato-

logiczne, test genetyczny jest kluczowym badaniem umożliwiającym potwierdzenie procesu chorobowego.

CEL PRACY

Celem pracy była ocena przydatności metod molekularnych w wykrywaniu materiału genetycznego prątków w preparatach histopatologicznych, pochodzących od chorych z podejrzeniem gruźlicy oraz określenie korelacji między wynikiem badania genetycznego, histopatologicznego oraz badaniem bakterioskopowym.

MATERIAŁ I METODY

Analizie poddano materiały tkankowe utrzalone w parafinie, uzyskane od 63 chorych z klinicznym podejrzeniem gruźlicy. W opisach wszystkich preparatów histopatologicznych stwierdzono zmiany zapalne, organizujące się ziarniniaki, zwłóknienia bądź inne zmiany charakterystyczne dla procesu zapalnego.

Wykrywanie materiału genetycznego *M. tuberculosis* complex przeprowadzono w systemie ProbeTec i w systemie GeneXpert, dodatkowo określającym oporność prątków na RMP.

Metodyka wykonywania preparatów histopatologicznych

1. Pobieranie materiału tkankowego i jego utwalenie. Uniwersalnym i najczęściej stosowanym utwalaczem jest 10% wodny roztwór formaldehydu, zobojętnionego węglanem wapnia. Czas utwalania jest uzależniony od rodzaju utwalacza, tkanki i techniki barwienia i zwykle wynosi ok. 12 h.
2. Odwadnianie i zatapianie preparatu w parafinie. Dzięki procesowi zatapiania fragmentów tkanek w twardym i łatwo skrawalnym materiale, możliwe jest uzyskanie z nich bardzo cienkich skrawków. Proces odwadniania przeprowadzany jest poprzez umieszczanie tkanki w roztworach etanolu o wzrastającym stężeniu, począwszy od alkoholu 50% poprzez 70%, 80%, 90%, 96% do alkoholu absolutnego (99,8%), a następnie w mieszaninie alkohol-ksylen i czystym ksylenu. Jest to tzw. szereg odwadniający. Kolejny etap polega na umieszczeniu tkanki w mieszaninie parafiny z ksylenem i ciekłej parafinie (w temp. 52°C przez kilkanaście godzin). Tak przygotowany materiał umieszcza się we wnętrzu bloczka parafinowego, a następnie kroi za pomocą mikrotomu na skrawki o grubości kilku μm i nakłada na szkiełko podstawowe (silanizowane lub nabiłkowane), utralając w temperaturze 50°C.
3. Barwienie preparatu. Po uprzednim odparafinowaniu preparatów w dwóch zmianach ksylenu poddaje się je procesowi nawodnienia. Nawodnienie przeprowadza się w szeregu alkoholowym, złożonym z roztworów etanolu, począwszy od alkoholu absolutnego do alkoholu 70%. Następnie skrawki poddawane są płukaniu w wodzie i umieszczane w roztworach barwników. Najczęściej używanymi barwnikami są hematoksylina i eozyna.

W badaniu histopatologicznym, mającym na celu wykrywanie *Mycobacterium*, zazwyczaj obserwuje się obecność zmian o charakterze ziarniny. W przypadku obecności w preparacie takich zmian, w celu potwierdzenia obecności prątków, wykonywane jest dodatkowe barwienie (Z-N), wykorzystujące kwasooporność *Mycobacterium*.

Metodyka opracowania preparatu histopatologicznego do badania genetycznego

Izolacja materiału genetycznego prątków z preparatów histopatologicznych została przeprowadzona metodą automatyczną, z zastosowaniem aparatu Maxwell MDx (Promega) oraz metodą manualną.

Izolacja DNA w systemie Maxwell MDx

I deparafinizację materiału utrzalonego w parafinie oraz izolację DNA prątków wykonano z użyciem komercyjnego zestawu Maxwell 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit, zgodnie z instrukcją producenta.

Izolacja DNA metodą manualną

1. Odparafinowanie preparatów za pomocą ksylenu, a następnie odwodnienie w 99,8% etanolu.
2. Izolacja DNA prątków za pomocą odpowiedniego zestawu komercyjnego, przeznaczonego do tkanek utrzalonych w parafinie: trawienie komórek w wysokiej temperaturze (56°C) za pomocą Proteinase K (ok. 12 h), płukanie na minikolumnie przy użyciu szeregu odpowiednich buforów i elucja DNA w 150 μl buforu elucyjnego.

Wykrywanie DNA prątków w systemie BD ProbeTec ET

1. Inaktywacja bakterii w temperaturze 106°C.
2. Rozbijanie komórek w buforze lizującym za pomocą ultradźwięków (sonikator).

W przypadku materiałów utrzalonych w parafinie punkt a i b protokołu wykonania metody pominięto ze względu na izolację DNA przeprowadzoną we wstępnym etapie (pkt. 2).

3. Amplifikacja, czyli powielanie materiału genetycznego prątków, przebiegająca w specjalnych studzienkach.
4. Wykrywanie powielonego fragmentu genomu w procesie hybrydyzacji ze specyficzną sondą. Wykrywanym fragmentem DNA jest sekwencja insercyjna IS6110, charakterystyczna wyłącznie dla grupy *M. tuberculosis* complex. W każdej studzience, w której zachodzi proces powielania DNA, znajduje się wewnętrzna kontrola amplifikacji IAC, pozwalająca na wykrycie inhibitorów znajdujących się w badanym materiale. Enzymem wykorzystywanym w tej reakcji jest polimeraza DNA.

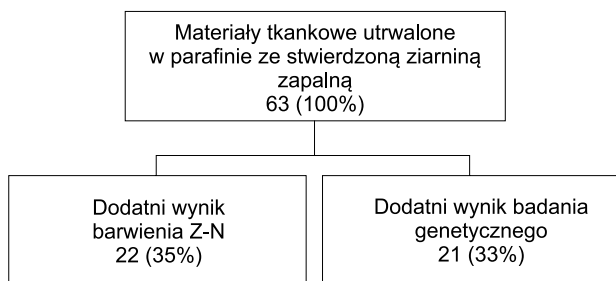
Wykrywanie DNA prątków w systemie GeneXpert MTB/RIF

Test oparty jest na reakcji nested Real-time PCR i składa się z amplifikacji i detekcji sekwencji docelowej,

obecnej w genomie prątków gruźlicy. Test GeneXpert MTB/RIF służy do wykrywania prątków gruźlicy i ich oporności na RMP, posiada on kontrolę przetwarzania próbek (SPC) monitorującą obecność w materiale inhibitorów reakcji PCR.

WYNIKI

Analizie poddano 63 preparaty histopatologiczne, pochodzące od chorych z podejrzeniem gruźlicy, u których w badaniu patomorfologicznym stwierdzono ziarninę zapalną. Wykonano dodatkowe barwienie metodą Z-N oraz badanie molekularne, mające na celu potwierdzenie obecności DNA *Mycobacterium tuberculosis* complex. Dodatni wynik barwienia Z-N uzyskano dla 22 chorych (35%), natomiast badanie genetyczne potwierdziło obecność DNA prątków gruźlicy w materiałach od 21 (33%) chorych (ryc. 1). Dla 42 (67%) materiałów pooperacyjnych uzyskano ujemny wynik badania genetycznego.



Ryc. 1. Korelacja pomiędzy wynikami barwienia metodą Z-N a wynikami badania genetycznego uzyskanymi dla preparatów utrwalonych w parafinie.

Przeprowadzono ocenę korelacji między wynikami barwienia preparatów metodą Z-N a wynikami badań genetycznych.

Dodatni wynik barwienia metodą Z-N uzyskano dla 22 (35%) preparatów histopatologicznych, w 13 (21%) przypadkach potwierdzono badaniem genetycznym. Ujemny wynik barwienia Z-N otrzymano dla 41 (65%) preparatów histopatologicznych, dla 33 (52%) był on zgodny z ujemnym wynikiem badania genetycznego (tab. 1).

Tabela 1. Porównanie wyników uzyskanych metodą barwienia Z-N i metodą genetyczną dla 63 preparatów histopatologicznych.

Barwienie Z-N w preparatach histopatologicznych	Badanie genetyczne	Liczba preparatów histopatologicznych
Dodatni	Dodatni	13 (21%)
Dodatni	Ujemny	9 (14%)
Ujemny	Ujemny	33 (52%)
Ujemny	Dodatni	8 (13%)

W kolejnym etapie przeprowadzonej analizy zestawiono wyniki uzyskane w obu systemach genetycznych ProbeTec i GeneXpert.

Dla 42 (67%) chorych, w obu systemach genetycznych otrzymano wynik ujemny. W 9 (14%) przypadkach dodatni wynik uzyskano tylko w systemie ProbeTec. Natomiast dla 12 (19%) chorych obecność DNA

prątków gruźlicy potwierdzono obiema metodami. Nie otrzymano dodatniego wyniku metodą GeneXpert przy ujemnym wyniku ProbeTec (tab. 2). Dokonano porównania skuteczności wykrywania DNA prątków w obu systemach genetycznych. Dla 86% analizowanych materiałów otrzymano zgodne wyniki w obu badaniach genetycznych. W pozostałych 14% metoda ProbeTec charakteryzowała się wyższą wykrywalnością.

Tabela 2. Porównanie wyników uzyskanych metodami genetycznymi ProbeTec i GeneXpert dla 63 preparatów histopatologicznych.

Wyniki badań genetycznych		Liczba preparatów histopatologicznych
ProbeTec	GeneXpert	
Dodatni	Dodatni	12 (19%)
Dodatni	Ujemny	9 (14%)
Ujemny	Ujemny	42 (67%)
Ujemny	Dodatni	0

DYSKUSJA

Zastosowanie metod molekularnych w mikrobiologicznej diagnostyce gruźlicy nie tylko znacznie skraca czas oczekiwania na wynik, ale również pozwala na wykonywanie rutynowych badań w kierunku gruźlicy z materiałów utrwalonych w parafinie. W badaniach przeprowadzonych przez Johansena i wsp. (7) dokonano analizy preparatów histopatologicznych, ze stwierdzoną obecnością ziarniniaków, często ze zmianami martwiczymi. Analizie poddano 47 materiałów histopatologicznych, z tkanek pobranych od chorych w trakcie diagnostyki klinicznej, i 19 preparatów od chorych diagnozowanych wcześniej, których materiał został zarchiwizowany w postaci bloczków. Materiał genetyczny prątków gruźlicy wykrywano w systemie ProbeTec. Badając prospektywnie 47 chorych, u 20 (42%) zdiagnozowano gruźlicę na podstawie obrazu klinicznego, u 18 (38%) w badaniu genetycznym. Swoistość uzyskanych wyników oceniono na 100%. Ci sami autorzy w badaniach retrospektywnych wykonanych z preparatów należących do 19 chorych, u 15 rozpoznali klinicznie i zgłosili do rejestru gruźlicę. Dla 6 (40%) z nich uzyskano potwierdzenie obecności DNA prątków w preparatach histopatologicznych. Czułość i specyficzność metody genetycznej dla tej grupy chorych oceniono odpowiednio na 40 i 100% (7). W przeprowadzonej przez nas analizie dla preparatów histopatologicznych, uzyskanych od 63 chorych z podejrzeniem gruźlicy, również oceniono korelację między wynikami barwienia metodą Z-N a wynikami badań genetycznych. Dodatni wynik barwienia metodą Z-N uzyskano dla 22 (35%) preparatów histopatologicznych, w 13 (21%) przypadkach potwierdzony on został wynikiem badania genetycznego (tab. 1). Ujemny wynik barwienia Z-N uzyskano dla 41 (65%) preparatów histopatologicznych, w 33 (52%) przypadkach był on zgodny z ujemnym wynikiem badania genetycznego.

Możliwość retrospektywnej weryfikacji skrawków tkanek z bloczków parafinowych opisał Zink, poddając

analizie wyniki badań 49 preparatów histopatologicznych. W puli tej w materiałach od 20 (41%) chorych stwierdzono obecność DNA prątków, a dla 8 (16%) chorych jednocześnie uzyskano dodatni wynik barwienia Z-N (8). DNA wyizolowane z 49 materiałów poddano również genotypowaniu metodą spoligotyping. W ostatnich latach metoda spoligotyping stała się jedną z powszechnie stosowanych metod genetycznych, z udowodnioną przydatnością zarówno w wykrywaniu prątków, jak i identyfikacji gatunkowej *Mycobacterium tuberculosis* complex oraz analizie epidemiologicznej (9).

Michałowska-Mitczuk i wsp. w 2011 roku opisali przypadek kliniczny 72-letniego mężczyzny leczonego w 2007 roku z powodu raka pęcherza moczowego. Z fragmentu najądrza nie wykonano badania mikrobiologicznego w kierunku gruźlicy, a opis histopatologiczny sugerował zmiany ziarniniakowe z kwasochłonną martwicą. Wyizolowane z preparatu DNA poddano analizie metodą spoligotyping, potwierdzając obecność materiału genetycznego *M. tuberculosis* (rodzina molekularna T1 53) w tkance utrwalonej w parafinie. Na podstawie uzyskanych wyników u chorego zdiagnozowano gruźlicę prawego najądrza, a w wywiadzie zanotowano przebytą w przeszłości gruźlicę płuc (10).

Badania molekularne pozwalają nie tylko na przeprowadzenie retrospektywnej analizy utrwalonych i archiwizowanych fragmentów tkanek, pochodzących od chorych z podejrzeniem gruźlicy. Wyniki mają istotne znaczenie dla właściwego rozpoznania procesu chorobowego bez konieczności ponownego pobierania materiału operacyjnego. Ponadto odgrywają decydującą rolę w różnicowaniu pomiędzy gruźlicą wywołaną przez *M. tuberculosis* a mykobakteriozą, spowodowaną przez prątki atypowe (MOTT). W przeprowadzonych badaniach zastosowano metodę wykrywającą sekwencję genomu charakterystyczną wyłącznie dla kompleksu *Mycobacterium tuberculosis*, co oznacza, że ujemny wynik badania genetycznego nie wyklucza obecności w boczku parafinowym prątków atypowych. Fakt ten może uzasadniać wyniki uzyskane przez nas dla 9 (14%) materiałów, w których w barwieniu Z-N stwierdzono obecność prątków, natomiast wynik badania genetycznego był ujemny.

W badaniach przeprowadzonych w Hanyang University Hospital w latach 2001-2011 przebadano 25 chorych z rozpoznaniem mykobakteryjnej infekcji skóry (11). Sekwencjonowanie materiału genetycznego prątków wyizolowanego z tkanek utrwalonych w parafinie pozwoliło na rozróżnienie między gruźlicą i mykobakteriozą. W obrazie histopatologicznym gruźlicy skóry częściej widoczna była martwica, ziarniniaki i komórki ołbrzymie, z kolei w mykobakteriozach obserwowano zwiększone ilości laseczek, neutrofilów i mały stopień proliferacji komórek. Obraz ten często korelował ze stopniem upośledzenia odporności chorego (11). Opublikowane wyniki badań genetycznych wraz z opisem preparatu histopatologicznego i w korelacji ze stanem

klinicznym chorego umożliwiły postawienie właściwej diagnozy przy zmianach skórnych i szczegółowe rozróżnienie między gruźlicą a mykobakteriozą (11).

W kolejnych badaniach, Munkhdelger i wsp. analizowali materiały utrwalone w parafinie pobrane od 119 chorych z podejrzeniem gruźliczego zapalenia węzłów chłonnych. Dla wszystkich chorych wspólnym objawem klinicznym było powiększenie węzłów, a w obrazie histopatologicznym obecność ziarniny (12). Celem badań było określenie czynnika przyczynowego zmian chorobowych. Obecność DNA prątków potwierdzano za pomocą molekularnego testu REBA Myco-ID, umożliwiającego wykrywanie i identyfikację *M. tuberculosis* oraz 19 gatunków prątków MOTT, z jednoczesnym określeniem oporności na RMP i INH. Dla 113 (95%) preparatów uzyskano pozytywny wynik w teście REBA Myco-ID, świadczący o obecności materiału genetycznego *Mycobacterium*. Dla 110 (92%) materiałów potwierdzono obecność DNA prątków gruźlicy, a w dwóch (1,7%) przypadkach prątków MOTT. W jednym (0,8%) materiale stwierdzono koinfekcję wywołaną *M. tuberculosis*/*M. chelonae*. Na podstawie przeprowadzonych badań autorzy wykazali dużą specyficzność oraz czułość testu molekularnego REBA Myco-ID w identyfikacji *M. tuberculosis* oraz wykrywaniu zakażenia mieszanego MTBC i prątków MOTT, stwierdzając ponadto, że główną przyczyną ziarniniakowego zapalenia węzłów chłonnych były prątki gruźlicy (12). Na efektywność procesu izolacji i amplifikacji materiału genetycznego *M. tuberculosis* z preparatów parafinowych ma wpływ wiele czynników. Ważnym elementem w tej diagnostyce jest etap przygotowania preparatu histopatologicznego, głównie rodzaj utrwalacza i czas jego działania na materiał.

Barcelos i wsp. w swoich badaniach porównali różny czas utrwalania tkanek (4-48 h) oraz wpływ 10% buforowanej i niebuforowanej formaliny na amplifikację określonej sekwencji genomu IS6110 – charakterystycznej dla *M. tuberculosis* complex (13). Badaniom zostały poddane fragmenty tkanek zatopione w parafinie, pochodzące od chorego zmarłego na postać prosówkową gruźlicy. Autorzy w swoich badaniach ocenili również działanie czystej parafiny i mieszaniny parafiny z woskiem pszczelim, stwierdzając brak produktu reakcji amplifikacji przy zastosowaniu do utrwalania tkanek 10% niebuforowanej formaliny i parafiny zawierającej wosk pszczelem (13). Dowiedli, jak dla wiarygodności wyniku badania genetycznego istotne są procedury, jakimi poddawany jest materiał w trakcie badań patomorfologicznych.

WNIOSKI

Badanie mikrobiologiczne z zastosowaniem metod genetycznych umożliwia, zarówno na bieżąco, jak i w odległym czasie, zweryfikowanie opisu histopatologicznego i może stanowić dodatkową metodę w diagnostyce mikrobiologicznej gruźlicy. Autorzy sugerują włączenie badań do algorytmu metod diagnozowania chorego z podejrzeniem gruźlicy.

PIŚMIENNICTWO

1. Fol M, Olek J, Kowalewicz-Kulbat M et al.: Prątki niegruźlicze: *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. xenopi* – krótka charakterystyka drobnoustrojów i zmian klinicznych przez nie wywołanych. *Postępy Hig Med Dośw* 2011; 65: 574-583.
2. Augustynowicz-Kopec W, Zwolska Z: Postępy w diagnostyce i epidemiologii molekularnej *Mycobacterium tuberculosis*. *Post Mikrobiol* 2010; 49(3): 151-156.
3. Hillemann D, Galle J, Vollmer E et al.: Real-time assay for improved detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin-embedded tissues. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; 10(3): 340-342.
4. Tomaszewski JF Jr, Farver CF: Tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections. [In:] Tomaszewski JF Jr, Cagle PT, Farver CF, Fraire AE (eds.): *Dail and Hammar's pulmonary pathology*. 3rd ed. Springer, New York 2008: 316-348.
5. Jagirdar J: Mycobacterial diseases. [In:] Zander DS, Farver CF (eds.): *Pulmonary pathology*. Churchill Livingstone 2008: 204-218.
6. Negi M, Takemura T, Guzman J et al.: Localization of *Propionibacterium acnes* in granulomas supports a possible etiologic link between sarcoidosis and the bacterium. *Mod Pathol* 2012 Sep; 25(9): 1284-1297.
7. Johansen IS, Thomsen V, Forsgren A et al.: Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens with necrotizing granulomatous inflammation by strand displacement amplification. *Journal of Mol Diagn* 2004; 6(3): 231-236.
8. Zink AR, Nerlich AG: Molecular strain identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in archival tissue samples. *J Clin Pathol* 2004; 57(11): 1185-1192.
9. Augustynowicz-Kopec E, Jagielski T, Kozińska M, Zabost A: The significance of spoligotyping method in epidemiological investigation of tuberculosis. *Pneumonol Alergol Pol* 2007; 75(1): 22-31.
10. Michałowska-Mitczuk D, Brzezińska S, Augustynowicz-Kopec E et al.: Granuloma of epididymis of patient treated with intravesical BCG therapy – complication. *Pneumonol Alergol Pol* 2011; 79(4): 305-308.
11. Min KW, Ko JY, Park ChK: Histopathological spectrum of cutaneous tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial infections. *J Cutan Pathol* 2012; 39(6): 582-595.
12. Munkhdelger J, Wang H-Y, Choi Y et al.: Identification of *Mycobacterium* species in FFPE granulomatous lymphadenitis tissue using REBA Myco-ID. *Int J Tuberc Lung Dis* 2013: 1-5.
13. Barcelos D, Franco MF, Leao SC: Effects of tissue handling and processing steps on PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Rev Inst Med Trop S Paolo* 2008; 50(6): 321-326.

otrzymano/received: 30.01.2015
zaakceptowano/accepted: 05.03.2015