

Stefania Giedrys-Kalemba

Mikrobiologia i jej udział w rozwoju medycznej diagnostyki laboratoryjnej

Studia Ecologiae et Bioethicae 8/2, 335-340

2010

Artykuł został opracowany do udostępnienia w internecie przez Muzeum Historii Polski w ramach prac podejmowanych na rzecz zapewnienia otwartego, powszechnego i trwałego dostępu do polskiego dorobku naukowego i kulturalnego. Artykuł jest umieszczony w kolekcji cyfrowej bazhum.muzhp.pl, gromadzącej zawartość polskich czasopism humanistycznych i społecznych.

Tekst jest udostępniony do wykorzystania w ramach dozwolonego użytku.

Prof. Stefania GIEDRYS-KALEMBA

Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii
Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie

Mikrobiologia i jej udział w rozwoju medycznej diagnostyki laboratoryjnej

Mikrobiologia jest dziedziną wchodzącą w skład nauk biologicznych i zajmuje się zagadnieniami związanymi z mikroorganizmami (z greckiego: *micro* – mały, *bios* – życie, *logos* – nauka). Należą do nich bakterie, wirusy, grzyby i pasożyty. Drobnoustroje te są szeroko rozpowszechnione w przyrodzie. Występują w różnych środowiskach – w wodzie, glebie, powietrzu, kolonizują rośliny, ptaki, zwierzęta i ludzi. Wiele z nich to organizmy samożywne (autotrofy – samodzielnie wytwarzają związki organiczne, potrzebują do tego wody, dwutlenku węgla i energii słonecznej), inne są cudzożywne (heterotrofy – nie mają zdolności chemo – i fotosyntezy, pobierają gotowe związki organiczne), wśród których występują saprofity – odżywiające się martwą materią, komensale – pozostające w symbiozie z innym organizmem i drobnoustroje patogenne – zdolne wywoływać choroby.

Biorąc pod uwagę różnorodność drobnoustrojów, ich chorobotwórczość i znaczenie dla kształtowania środowiska i istnienia wyższych form życia powstało szereg działów mikrobiologii, takich jak: mikrobiologia środowiskowa, rolna, gleby, przemysłowa, sanitarna, weterynaryjna, lekarska (medyczna).

Mikrobiologia lekarska

Podstawowym zadaniem mikrobiologii lekarskiej (medycznej) jest wykrywanie drobnoustrojów chorobotwórczych dla człowieka i o ile jest to możliwe, określanie najskuteczniejszych sposobów leczenia chorób zakaźnych. Mikrobiologia jest zatem jednym z działów medycznej diagnostyki laboratoryjnej.

Czynnikiem etiologicznym chorób infekcyjnych człowieka mogą być wszystkie mikroorganizmy: bakterie, wirusy, grzyby i pasożyty. Wśród nich są drobnoustroje bytujące tylko u ludzi (wywołują zakażenia określane jako antroponozy), jak również występujące i wywołujące zakażenia u zwierząt czy ptaków (antropozoonozy) lub wywodzące się z rezerwuarów znajdujących się w środowisku naturalnym człowieka (sapronozy). Ze względu na znaczne różnice w morfologii, fizjologii i uwarunkowaniach środowiskowych poszczególnych mikroorganizmów, wymagających odpowiednich procedur diagnostycznych i identyfikacyjnych w zakresie gatunku, w ramach mikrobiologii lekarskiej powstały obecnie dalsze działy, takie jak: bakteriologia, wirusologia, mikologia i parazytologia.

Zadania mikrobiologa

Wobec wszechobecności drobnoustrojów w naturze, do zadań specjalisty w zakresie mikrobiologii lekarskiej (lekarz) lub mikrobiologii medycznej (diagnosta laboratoryjny) należy nie tylko umiejętność wykrycia czynnika etiologicznego choroby zakaźnej (trzeba wiedzieć, jaki materiał kliniczny i jak należy go pobrać, jak wyizolować i zidentyfikować drobnoustroj) oraz określenie *in vitro* możliwości optymalnego leczenia (antybiogram, mykogram), ale także znajomość zasad współżycia mikroorganizmów z człowiekiem (komensalna flora fizjologiczna, nosicielstwo, zakażenie, zakażenie oportunistyczne, toksemia), zagadnień związanych z epidemiologią zakażeń (możliwe źródła, wrota i drogi przenoszenia zakażeń, zakażenia epidemiczne, endemiczne, sporadyczne, szpitalne, pozaszpitalne) oraz metod zapobiegania zakażeniom (szczepienia profilaktyczne, dezynfekcja, sterylizacja, izolacja, kontrola zakażeń szpitalnych). Ponadto, wynik badania mikrobiologicznego materiału pobranego od pacjenta często wymaga komentarza i klinicznej interpretacji – wyhodowany drobnoustroj może być czynnikiem etiologicznym zakażenia, ale też składnikiem flory fizjologicznej, objawem kolonizacji lub nosicielstwa czy też florą przypadkową pochodzącą ze środowiska.

Podstawy diagnostyki mikrobiologicznej

Czynnik etiologiczny zakażenia (bakterie, wirusy, grzyby) lub zarażenia (Pasożyty) można określić na podstawie metod bezpośrednich oraz metod pośrednich.

Metoda bezpośrednia polega na klasycznej izolacji i identyfikacji drobnoustroju. Jest to metoda referencyjna dla wszystkich innych metod, określana jako *gold standard*. Nowoczesne metody bezpośrednie obejmują także wykrywanie antygenów lub materiału genetycznego drobnoustroju w badanych próbkach materiału klinicznego.

Metody pośrednie wykorzystują testy serologiczne, które pozwalają wykryć swoiste przeciwciała powstające jako reakcja odpornościowa makroorganizmu na zakażenie. Najczęściej określa się swoiste przeciwciała klasy IgM, charakterystyczne dla świeżego, aktualnie toczącego się zakażenia lub serokonwersję w klasie IgG (co najmniej 3-4 wzrost miana przeciwciał w dwukrotnie pobranych próbkach krwi). Rzadziej ocenia się poziom swoistych przeciwciał w klasie IgA, pojawiających się w przewlekłym procesie zapalnym. Badania serologiczne dotyczące chorób infekcyjnych często wykonywane są także w laboratoriach analitycznych posiadających wielofunkcyjną aparaturę.

W przypadku wystąpienia zakażeń epidemicznych, szczególnie w warunkach szpitalnych, celem ustalenia zależności epidemiologicznych (źródło zakażenia, drogi przenoszenia) i optymalnego postępowania profilaktyczno-terapeutycznego wymagane są również badania mikrobiologiczne środowiska i personelu.

W diagnostyce większości zakażeń bakteryjnych i grzybiczych niezbędna jest izolacja i identyfikacja mikroorganizmu (przynajmniej do gatunku), co następnie umożliwia określenie jego wrażliwości i mechanizmy oporności na antybiotyki (chemioterapeutyki). Taki wynik badania, uzupełniony o kliniczną interpretację, stanowi podstawę celowanej, racjonalnej antybiotykoterapii.

W zakażeniach wirusowych do podjęcia leczenia, jak również w celach epidemiologicznych czy rokowniczych na ogół wystarcza wykrycie antygeny bądź sekwencji nukleotydowych wirusa lub swoistych przeciwciał. Klasyczna diagnostyka wirusologiczna polegająca na izolacji wirusa jest trudna, kosztowna i czasochłonna i jest wykonywana jedynie w nielicznych ośrodkach w skali kraju.

Tradycyjne badanie bakteriologiczne (mykologiczne) polega przede wszystkim na wykonaniu posiewu odpowiednio pobranego materiału klinicznego na odpowiednie podłoża wzrostowe i inkubacji tych podłoży w odpowiedniej temperaturze i odpowiednich warunkach gazowych (w zależności od rodzaju materiału i spodziewanych drobnoustrojów). W wielu przypadkach ocenia się również odpowiednio przygotowany (barwienie, inna metoda) preparat bezpośredni wykonany z materiału klinicznego a w niektórych sytuacjach stosuje się równoległe testy wykrywające antygeny drobnoustroju w materiale bezpośrednim (np. w płynie mózgowo-rdzeniowym), co pozwala w krótkim czasie wstępnie ukierunkować dalsze postępowanie diagnostyczno-terapeutyczne.

Identyfikacja wyhodowanych drobnoustrojów obejmuje ocenę morfologii kolonii i wytwarzania hemolizy, wykonanie preparatu z hodowli, określenie cech biochemicznych a niekiedy także serologicznych, co pozwala na ogół ustalić gatunek lub serotyp/serowar organizmu. W przypadku wyizolowania drobnoustroju uznanego za czynnik etiologiczny zakażenia wykonuje się, zgodnie z aktualnymi w tym zakresie rekomendacjami, antybiogram/mykogram, który w przypadku wykrycia mechanizmów oporności drobnoustroju, wymaga zawsze uzupełnienia wyniku badania o właściwą interpretację kliniczną. Coraz częściej, szczególnie wobec wieloopornych szczepów szpitalnych czy tzw. drobnoustrojów alarmowych (szczepy MRSA – metycylinooporne gronkowce złociste, VRE – wankomycynooporne enterokoki, pałeczki Gram-ujemne wytwarzające betalaktamazy typu ESBL, AmpC, MBL, KPC) określenie wrażliwości na lek wiąże się z podaniem wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC – *minimal inhibitory concentration*), pozwalającej najlepiej przewidzieć kliniczny efekt leczenia danym lekiem.

Nowoczesne metody diagnostyki mikrobiologicznej

Klasyczna diagnostyka (identyfikacja drobnoustroju, antybiogram/mykogram) najczęściej izolowanych tzw. bakterii typowych (gronkowce, paciorkowce, pałeczki Gram-ujemne) oraz grzybów drożdżopodobnych trwa co najmniej 2-5 dni. Obecnie można ją przyspieszyć i ułatwić stosując:

- podłoża chromogenne umożliwiające wykrycie aktywności enzymatycznej wybranych drobnoustrojów (np. szczepów MRSA, VRE) rozkładających odpowiednie substraty chromogenne, co powoduje charakterystyczne wybarwienie rosnących kolonii,
- aparaty do posiewów krwi i płynów ustrojowych (np. Bactec, BacT/ALERT) — pozwalają w krótkim czasie (niekiedy już po godzinie) zasygnalizować dodatni posiew, który następnie wymaga tradycyjnego postępowania identyfikacyjnego,
- aparaty do identyfikacji i oznaczania wrażliwości drobnoustrojów (np. Vitek, Phoenix) skracające w niektórych przypadkach czas wykonania testu do 4-6 godzin,
- szybkie testy identyfikacyjne lateksowe (np. do szybkiej identyfikacji w pierwotnych hodowlach antygenów *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, szczepów *Staphylococcus aureus*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Legionella pneumophila*, serotypów wielocukru C paciorkowców),
- metody genetyczne.

W zakażeniach wirusowych oraz wywoływanych przez bakterie bytujące wewnątrzkomórkowo, nierosnące na podłożach sztucznych czy wytwarzające toksyny rozpoznanie opiera się na ogół jedynie na wykazaniu antygenów (toksyn) sekwencji nukleotydowych drobnoustroju w materiale klinicznym. W tych przypadkach klasyczne metody mikroskopowe (np. wykrywanie ciałek wtrętowych w chlamydiozie czy ciałek Negriego we wścieklicznie) zastępowane są metodami immunologicznymi lub genetycznymi.

Najczęściej stosowane metody immunologiczne są oparte na technikach immunofluorescencji i immunoenzymatycznych (Elisa). Pozwalają one wykryć w materiale klinicznym różne antygeny wirusowe (wirus wściekliczny, grypy, odry, adenowirusy, HSV, VZV, CMV, a także bakteryjne (chlamydie, dwoinki rzeżączki) i szereg pasożytniczych. Niezwykle przydatnym obecnie testem diagnostycznym jest wykrywanie metodą Elisa antygenów *Candida* (mannan) i *Aspergillus* (galaktomannan) w surowicy krwi w przypadkach grzybic uogólnionych lub narządowych, w których klasyczne posiewy często wypadają ujemnie. Chętnie wykorzystywane w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej są także proste w wykonaniu, wysoce swoiste i niewymagające dodatkowej aparatury szybkie testy immunochromatograficzne służące do wykrywania antygenów *Legionella pneumophila* i *Streptococcus pneumoniae* w moczu, paciorkowców gr. A w gardle, *Helicobacter pylori*, Rota i Adenowirusów w kale, a także RSV i chlamydii.

Metody biologii molekularnej są obecnie coraz częściej stosowane w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej, a także w badaniach naukowych. Służą one różnym celom:

- identyfikacji sekwencji nukleotydowych różnych drobnoustrojów w materiale klinicznym *in situ* lub w hodowli, np. gatunki *Mycobacterium*, *Mycoplasma*

pneumoniae, Chlamydia trachomatis, Chlamydia pneumoniae, Neisseria gonorrhoeae, Borrelia burgdorferi, Legionella pneumophila, Clostridium difficile, Ehrlichia, Candida, HBV, HCV, CMV, HSV, BK

- identyfikacji genów oporności na antybiotyki, np. *mecA, katA, rpoB*
- genów kodujących czynniki wirulencji, np. toksyny *Streptococcus pyogenes, Clostridium difficile, Escherichia coli, Bacillus anthracis, Helicobacter pylori*
- ustaleniu taksonomii drobnoustrojów, analizy ewolucyjnej i filogenetycznej
- do typowania genetycznego drobnoustrojów dla celów epidemiologii szpitalnej (ustalenie pokrewieństwa w obrębie gatunku celem określenia źródła zakażenia, dróg transmisji itp.).

W badaniach molekularnych wykorzystuje się najczęściej metody oparte na polimerazowej reakcji łańcuchowej – PCR (*polimerase chain reaction*). Należą do nich m.in. metody:

- Multiplex-PCR służąca np. do wykrywania genów zjadliwości *Staphylococcus aureus*
- RT-PCR (z udziałem odwrotnej transkryptazy) pozwala wykryć np. mRNA wirusa RSV
- Real-Time PCR umożliwia monitorowanie ilości materiału genetycznego drobnoustroju w próbce: prątki, chlamydie, mykoplazmy, CMV, BKV, EBV, RSV, *Aspergillus, Pneumocystis yirovecii*
- PCR/hybrydyzacja wykorzystywana np. do wykrycia genotypów HPV
- do oznaczenia z materiału klinicznego w ciągu 70 minut MRSA, VRE, GBS, *Clostridium difficile*
- wieloparametrowy system fluorescencyjno-laserowego odczytu na mikrosferach (Luminex) pozwalający na oznaczanie szeregu parametrów (antygeny, przeciwciała, cytokiny) w zakażeniach bakteryjnych i wirusowych i procesach autoimmunologicznych

Podsumowanie

Wszystkie metody stosowane w diagnostyce mikrobiologicznej mają swoje zalety i ograniczenia. Należy jednak pamiętać, że nierzadko można uzyskać wynik fałszywie ujemny lub fałszywie dodatni, mimo wykonania badania zgodnie z procedurą. Istotnym czynnikiem, wpływającym na ostateczny wynik są także tzw. błędy przed-laboratoryjne, związane z prawidłowym pobraniem i transportem próbki. Materiał na badanie mikrobiologiczne a szczególnie celem wyhodowania drobnoustroju stanowi żywy i dynamiczny układ, stale podlegający wpływom środowiska i interakcji z czynnikami obronnymi gospodarza i bezwzględnie wymaga zastosowania odpowiedniej metody pobrania i transportu próbki. Niezwykle ważna jest również kliniczna interpretacja wyniku badania – wyhodowany drobnoustrój może być czynnikiem etiologicznym zakażenia, ale też

objawem kolonizacji, nosicielstwa lub składnikiem flory fizjologicznej. Metody genetyczne z kolei mogą dać wynik fałszywie dodatni, niekoniecznie świadczący o aktualnie toczącym się procesie chorobowym, a jedynie o przypadkowej obecności materiału genetycznego w próbce.

Biorąc pod uwagę szereg uwarunkowań związanych z szeroko pojętym badaniem mikrobiologicznym (różne drobnoustroje i ich wymagania wzrostowe, różne metody diagnostyczne: hodowla, badania serologiczne, immunologiczne, genetyczne, inne) i miejscem ich wykonywania, wynik badania mikrobiologicznego, tj. związanego z chorobą infekcyjną powinien być autoryzowany przez specjalistów z mikrobiologii lekarskiej lub medycznej.

Bibliografia

1. Zaremba M., Borowski J. Mikrobiologia lekarska, PZWL, Warszawa, 1997.
2. Szewczyk E., Diagnostyka bakteriologiczna, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2005.
3. Kasztelewicz B., Dzierżanowska-Fangrat K., Nowe możliwości wykrywania i monitorowania zakażeń wirusowych. (W:) Postępy Mikrobiologii, 47 (3), 407-414, 2008.
4. www.kordl.edu.pl
5. www.eucast.org
6. Dzierżanowska D., Profilaktyka, terapia wyprzedzająca i empiryczna inwazyjnych zakażeń grzybiczych. (W:) Zakażenia, 8 (2), 54-61, 2008.
7. www.cepheid.com
8. www.biomedica.pl



Goryczka