

Sylwia Brzezińska¹, Anna Zabost¹, Monika Kozińska¹, Grażyna Janicka-Sobierajska, Zofia Zwolska¹, Ewa Augustynowicz-Kopec¹

¹Zakład Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie
Kierownik: prof. nadzw., dr hab. n. med. E. Augustynowicz-Kopec

Molekularne dochodzenia epidemiologiczne wśród polskich więźniów chorych na gruźlicę w latach 2004–2008. Badania wstępne

Molecular analysis of strains from tuberculosis patients in Polish prisons in 2004–2008. Initial analysis of the project

Grant MNiSZW nr N N404 572740

Streszczenie

Wstęp: Więzienia są uznawane za środowisko, w którym szczególnie łatwo dochodzi do transmisji chorób zakaźnych, w tym również gruźlicy. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia częstość ich występowania w środowisku więziennym jest 10–100 razy większa niż w populacji ogólnej. W Polsce w 2008 roku zapadalność na gruźlicę wśród więźniów wynosiła 270 na 100 tys. i była około 10 razy wyższa niż w populacji ogólnej.

Materiał i metody: Badaniu poddano 57 (5%) szczepów gruźlicy wyizolowanych od polskich więźniów w latach 2004–2008. Szczepy *Mycobacterium tuberculosis* identyfikowano za pomocą sondy genetycznej i testu niacynowego. Bakteryjne DNA izolowano za pomocą bromku cetylotrimetyloamoniowego. Szczepy *M. tuberculosis* analizowano dwiema metodami genetycznymi: przesiewową spoligotyping i wysoce różnicującą metodą MIRU/VNTR.

Wyniki: Szczepy od więźniów, klastrujące się w metodzie spoligotyping (33 szczepy), analizowano metodą MIRU/VNTR. Dwie najliczniejsze grupy szczepów reprezentowały spoligotypy T1 53 i H3 50. Analiza ta pokazała, że wszystkie szczepy prątków gruźlicy od osadzonych posiadały różne wzory molekularne w metodzie MIRU/VNTR.

Wnioski:

1. Metoda MIRU/VNTR jest metodą wysoce różnicującą.
2. MIRU/VNTR jest dobrą metodą do poszukiwania źródeł transmisji gruźlicy.
3. Zaplanowano dalszą analizę molekularną w populacji ogólnej, zgodnej z miejscem pochodzenia poszczególnych więźniów. Wyniki tych badań mają na celu ustalenie prawdopodobnego źródła zakażenia, poprzez analizę porównawczą szczepów więziennych i populacji ogólnej.

Słowa kluczowe: gruźlica, więźniowie, transmisja, spoligotypowanie, MIRU/VNTR

Pneumonol. Alergol. Pol. 2012; 80, 3: 209–213

Abstract

Introduction: Correctional facilities are recognised “breeding ground” for infectious diseases. As The World Health Organization reported the incidence of infectious diseases in prison’s population is 10–100 times higher than in general population. The incidence of tuberculosis among correctional inmates in Poland in 2008 was 270/100000, that is around 10 times higher than among non-prisoners.

Materials and methods: The study included 57 *M. tuberculosis* isolates from patients in Polish prisons in 2004–2008 (5% of all diagnosed TB patient in Polish prisons 2004–2008). Primary isolation was performed with Löwenstein-Jensen (L-J) medium, species identification was done with the niacin test and gene probes test. Bacterial DNA was extracted from the L-J medium slants with the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method. *Mycobacterium tuberculosis* strains were analyzed with two methods: screening for epidemiological discrimination of *M. tuberculosis* — spoligotyping and high-throughput — MIRU/VNTR.

Adres do korespondencji: mgr Sylwia Brzezińska, Zakład Mikrobiologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, ul. Płocka 26, 01–138 Warszawa, tel.: (22) 431 21 62 tel./faks: (22) 431 21 82, e-mail: s-brzezinska@wp.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 19.07.2011 r.

Copyright © 2012 Via Medica

ISSN 0867–7077

Results: Isolates that are grouped in clusters (33 isolates) were analyzed by means of MIRU/VNTRs. In MIRU/VNTRs all strains showed different genetic patterns. Most isolates of the prisoners were grouped into two clusters: T1 53 and H3 50.

Conclusions:

1. MIRU/VNTR is a high-throughput method.
2. MIRU/VNTR is a promising method to diagnose TB transmission in Polish jails.
3. To identify the probable source of transmission, molecular analysis of strains from patients of the general population is needed.

Key words: tuberculosis, prisoners, transmission, spoligotyping, MIRU/VNTR

Pneumonol. Alergol. Pol. 2012; 80, 3: 209–213

Wstęp

Środowisko więzienne przyczynia się do poważnych problemów zdrowotnych w wielu krajach. Na całym świecie osadzonych jest ponad 10 milionów ludzi. Szacuje się, że średnio przypada około 145 więźniów na 100 tys. mieszkańców, z czego największy odsetek notuje się w Stanach Zjednoczonych — 756 na 100 tys. mieszkańców [1]. Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) częstość występowania chorób zakaźnych w populacji więziennej jest 10–100 razy większa niż w populacji na wolności. Dotyczy to zarówno czynnej gruźlicy (TB, *tuberculosis*), w tym wielolekoopornej, jak i zakażenia wirusem niedoboru odporności (HIV) [2].

Odsetek zachorowań na gruźlicę wśród więźniów jest trudny do porównania z populacją ogólną, ze względu na brak powszechnej dostępności danych dotyczących chorych osadzonych. W wielu krajach dane te są rejestrowane sporadycznie lub pochodzą z wybranych ośrodków penitencjarnych. W licznych badaniach wykazano jednak, że współczynniki zapadalności są wyższe w grupie więziennej [3]. Analiza przeprowadzona w 2002 roku w krajach Europejskiego Regionu WHO pokazała, że średni wskaźnik zachorowalności na gruźlicę wśród więźniów wynosił 232 nowe przypadki na 100 tys. i był około 80 razy wyższy niż w populacji ogólnej. Badania te obejmowały 22 kraje, w tym najwyższe wskaźniki zanotowano w Kazachstanie 17808,2 na 100 tys. i Azerbejdżanie 4000 na 100 tys., natomiast najniższe (0 na 100 tys. w Republice Czeskiej, Holandii i Portugalii) [4]. W badaniach przeprowadzonych w 13 krajach Europy Zachodniej w 2003 roku wskaźnik ten wynosił 90/100 tys. [1]. W Stanach Zjednoczonych w 2003 roku wskaźnik zachorowalności wynosił 29,4/100 tys. wśród więźniów i 6,7/100 tys. w populacji ogólnej [1]. W Polsce w tym samym roku wartości te wynosiły odpowiednio 238,7/100 tys. i 26,5/100 tys. W 2003 roku wśród polskich więźniów zarejestrowano 408 chorych na gruźlicę. Większość z nich (93%) wykryto przy przyjęciu do więzienia,

jedynie 7% pacjentów zostało zdiagnozowanych w trakcie odbywania kary [5].

W 2008 roku w Polsce zarejestrowano wśród chorych nowo wykrytych 236 więźniów, stanowili oni 2,7% ogółu przypadków zarejestrowanych w Polsce [6]. Zapadalność na gruźlicę w tej grupie chorych wynosiła około 270 przypadków na 100 tys., co stanowiło wskaźnik 10 razy wyższy niż w populacji ogólnej [7].

Zbliżoną wartość wskaźnika zapadalności na gruźlicę 260/100 tys. odnotowano również w 2010 roku. Zarejestrowano wówczas 215 chorych przebywających w aresztach śledczych i zakładach karnych [8].

Skala problemów zdrowotnych dotyczących więźniów jest bardzo szeroka. Jest to spowodowane wieloma czynnikami, takimi jak: zła sytuacja społeczna, zbyt duża liczba więźniów przebywających w jednej celi, pochodzenie populacji więziennej z tak zwanych grup zmarginalizowanych, co w efekcie skutkuje większą zachorowalnością na gruźlicę [9].

Przyczyniają się do tego również uzależnienia od alkoholu, narkotyków oraz współistniejące choroby, takie jak wirusowe zapalenie wątroby czy zakażenie wirusem HIV [10].

Tylko odpowiednio szybka i skuteczna diagnostyka może wpłynąć na zapobieganie i ograniczenie transmisji chorób zakaźnych (w tym gruźlicy) w tej grupie. Dodatkowe trudności w śledzeniu dróg transmisji gruźlicy w zakładach karnych wynikają z faktu, że w polskich więzieniach przebywają również imigranci. W tej sytuacji trudno jest ustalić kontakty osadzonego zarówno przed przyjęciem do aresztu, jak i po wyjściu z niego [9].

Przeprowadzone przez autorów pracy wstępne dochodzenia molekularne miały na celu określenie, czy i w jakim stopniu w polskich więzieniach dochodzi do transmisji gruźlicy.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiło 57 szczepów od chorych osadzonych, z potwierdzoną bakteriologicznie gruźlicą. Chorzy pochodzili z następują-

cych województw: mazowieckiego, łódzkiego, lubelskiego, kujawsko-pomorskiego, zachodniopomorskiego, świętokrzyskiego, małopolskiego, warmińsko-mazurskiego, dolnośląskiego i śląskiego. Zostali oni zdiagnozowani podczas odbywania kary w polskich więzieniach w latach 2004–2008. Analizowana w niniejszej pracy grupa 57 (5% chorych z potwierdzoną mikrobiologicznie gruźlicą przebywających w zakładach karnych w latach 2004–2008) więźniów była leczona na trzech oddziałach przeciwgruźliczych więziennej służby zdrowia — w Potulicach, Łodzi i Gdańsku.

Identyfikację szczepów prątków przeprowadzono za pomocą testu niacynowego i sondy genetycznej (AccuProbe; GenProbe, San Diego, CA) [11].

Izolację genomowego DNA prątków, ze szczepów wyhodowanych na pożywce Löwenstein-Jensen (L-J), wykonano przy użyciu metody z bromkiem cetylotrimetyloamoniowym (CTAB). Wyizolowane DNA poddano analizie molekularnej metodą *spoligotyping* i *mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem repeat* (MIRU/VNTR) [11].

Spoligotyping

Metoda ta jest stosowana standardowo jako przesiewowa w dochodzeniach epidemiologicznych gruźlicy. Analizę *spoligotyping* wykonano przy użyciu komercyjnego zestawu (ISOGEN Bioscience BV), zgodnie z instrukcją producenta (ryc. 1). Otrzymane wzory hybrydazyjne porównywano z międzynarodową bazą spoligotypów (SpolDB4) (www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/spolddb4). Szczepy posiadające takie same wzory molekularne łączono w klastery. Pojedyncze wzory hybrydazyjne określano jako unikatowe [11].

MIRU/VNTR

W następnym etapie analizy zastosowano metodę MIRU/VNTR, która opiera się na identyfikacji 15 najbardziej polimorficznych sekwencji mikrosatelitarnych (o długości 55–72 nukleotydów) w genomie *M. tuberculosis* [12]. Przeprowadza się 15 reakcji amplifikacji przy użyciu par starterów komplementarnych do regionów sąsiadujących z sekwencjami MIRU. Produkty PCR rozdzielane są w 2-procentowym żelu agarozowym i porównywane ze wzorcem. Wyniki przedstawiano jako układ liczb oznaczających liczbę powtórzeń sekwencji MIRU — tak zwany kod MIRU [13].

Wyniki

Analizie poddano 57 szczepów prątków gruźlicy wyizolowanych od chorych przebywających



Rycina 1. Wzory spoligotypów

Figure 1. Spoligotyping pattern

w zakładach penitencjarnych. Wszystkie szczepy zidentyfikowano jako *M. tuberculosis*. Wśród 57 szczepów badanych metodą *spoligotyping* zidentyfikowano 31 profili genetycznych, w tym 11 wzorów niezarejestrowanych w międzynarodowej bazie SpolDB4.

Wzory molekularne szczepów prątków *M. tuberculosis* od chorych z zakładów penitencjarnych podzielono na dwie grupy, w jednej znajdowały się 24 (42%) szczepy nieklastrujące się — z unikatowymi wzorami genetycznymi. Pozostałe 33 (57,9%) szczepy należały do 7 zarejestrowanych w bazie rodzin molekularnych, zawierających 2–13 szczepów w klastrze oraz 3 szczepy posiadające ten sam spoligotyp, niezarejestrowany dotąd w bazie SpolDB4 (tab. 1).

Szczepy, które metodą *spoligotyping* zaliczono do rodzin molekularnych (33 szczepy klastrujące się): T1 53 (22,8%), H3 50 (8,7%), T1 278 (5,3%), H1 47(5,3%), T1 612 (3,5%), T3 37 (3,5%), H3 511(3,5%), 177777677760771 (5,3%) poddano analizie metodą bardziej różnicującą — MIRU/VNTR.

W metodzie MIRU/VNTR dla każdego z 33 szczepów uzyskano inny 15-cyfrowy kod genetyczny (tab. 2). Otrzymane wyniki nie dowiodły więc występowania transmisji gruźlicy w obrębie badanej grupy więźniów i mogą być wykorzystane do dalszych analiz.

Tabela 1. Wyniki analizy spoligotyping szczepów uzyskanych od polskich więźniów

Table 1. Results of spoligotyping analysis of strains from polish prisoners

Spoligotyp Spoligotyping	Liczba pacjentów Number of patients	% pacjentów % of patients
T1 53	13	22,8
H3 50	5	8,7
T 1278	3	5,3
H1 47	3	5,3
T1 612	2	3,5
T3 37	2	3,5
H3 511	2	3,5
17777677760	3	5,3

Omówienie

Analiza molekularna obejmowała szczepy *M. tuberculosis* pochodzące od 57 chorych na gruźlicę, przebywających w zakładach penitencjarnych w Polsce i leczonych w trzech oddziałach szpitalnych w latach 2004–2008. Nie wykazała ona pokrewieństwa genetycznego w badanej grupie pacjentów. Każdy ze szczepów analizowanych metodą MIRU/VNTR posiadał inny wzór molekularny. Przeprowadzone wstępne badania z dużym prawdopodobieństwem wykluczają więc wspólne źródło zakażenia wśród 57 więźniów chorych na gruźlicę. W pracy Rasolofu-Razanamparany i wsp. oceniono prawdopodobieństwo transmisji gruźlicy w więzieniu, porównując wzory genetyczne szczepów *M. tuberculosis* od chorych przebywają-

Tabela 2. Wzory numeryczne szczepów pochodzących od polskich więźniów uzyskane metodą MIRU/VNTR

Table 2. Results of MIRU/VNTR analysis of strains from Polish prisoners

Lp. SZCZEPU	Wzór MIRU														
1	3	2	4	4	2	3	3	3	5	2	4	4	2	2	1
2	4	3	3	4	2	3	3	3	5	2	4	5	1	2	4
3	4	3	4	4	2	3	2	3	5	2	2	4	2	2	2
4	2	3	7	4	2	3	4	3	5	2	2	4	2	2	1
5	4	3	10	3	2	2	3	3	5	2	2	5	2	2	2
6	3	3	4	4	2	3	3	3	4	2	2	5	2	3	2
7	3	3	10	4	3	3	3	3	5	2	2	5	0	2	1
8	3	3	3	4	2	2	3	3	5	2	2	5	2	2	1
9	4	3	4	4	3	3	3	3	1	1	3	5	0	2	1
10	4	4	4	2	3	2	3	2	5	2	3	5	2	2	0
11	3	3	3	4	2	3	4	3	5	2	4	5	2	2	2
12	1	3	4	4	2	3	3	3	5	2	4	5	2	2	0
13	1	3	10	4	2	2	3	3	5	2	4	5	2	2	3
14	4	3	4	4	2	2	3	3	5	2	2	5	2	3	3
15	4	3	4	4	2	2	3	3	4	2	2	5	2	2	2
16	2	3	4	4	2	3	3	3	5	2	4	4	2	2	1
17	3	2	4	5	3	4	4	2	4	2	3	5	2	2	1
18	2	2	5	5	3	3	4	3	3	2	3	4	2	2	0
19	2	2	5	5	3	4	3	2	4	2	3	5	2	2	1
20	2	2	5	3	3	3	5	3	6	4	3	5	2	3	2
21	5	2	4	3	3	3	4	3	9	4	3	5	2	3	4
22	3	2	4	3	3	3	5	3	7	4	3	5	2	3	4
23	3	3	4	3	3	3	5	3	3	4	3	5	2	3	2
24	2	3	4	3	3	3	4	3	7	4	3	5	2	3	0
25	3	3	4	3	3	3	4	3	5	4	3	5	2	2	1
26	2	3	5	3	3	3	4	3	5	4	3	5	0	2	2
27	2	3	5	3	3	3	4	3	6	4	0	5	2	3	3
28	3	3	10	3	3	3	5	3	5	4	3	5	0	2	2
29	2	0	10	3	3	3	5	3	3	4	3	5	2	3	3
30	3	0	4	3	3	3	5	3	0	4	0	5	2	3	3
31	1	2	4	3	2	1	0	1	3	2	4	5	5	4	1
32	4	3	0	2	1	2	1	0	0	3	5	2	4	4	4
33	2	2	2	1	1	1	3	4	5	0	5	5	4	3	2

Objaśnienia skrótów w tekście

cych w więzieniu i na wolności. Badania molekularne obejmowały szczepki izolowane w latach 1994–1995 od 146 chorych osadzonych i 260 chorych wolnych z Antananarivo (Madagaskar). Odsetek nowych zachorowań był znacznie wyższy wśród osadzonych (58,9%) niż w populacji ogólnej (40%), co dla autorów stanowi dowód, że transmisja zachodziła w większym stopniu w środowisku więziennym [14]. W Polsce więźniowie są szczegółowo badani w momencie przyjmowania do zakładu karnego, a następnie co dwa lata poddawani badaniu RTG klatki piersiowej [5]. Pozwala to na szybką izolację pacjentów, u których stwierdzono gruźlicę przy przyjęciu do ośrodka i zapobieganiu transmisji choroby. Postępowanie takie jest zgodne z wymogami Europejskich Reguł Więziennych. Jednak taki schemat działania podejmowany przy przyjęciu więźnia do ośrodka karnego pozwala na wykrycie u pacjenta jedynie czynnej postaci gruźlicy. W niektórych krajach, na przykład w Hiszpanii w centrum penitencjarnym w Barcelonie opracowano program umożliwiający wykrycie zarówno zakażenia, jak i czynnej gruźlicy w momencie przyjęcia osadzonych, nieposiadających w wywiadzie kontaktu z gruźlicą [15].

Ze względu na obserwowany w Polsce w ostatnich latach wzrost imigracji z krajów byłego Związku Radzieckiego, rejestrowane są przypadki gruźlicy u osadzonych, pochodzących z tych regionów. Może to w przyszłości wpływać na zwiększenie wskaźników zapadalności na gruźlicę w polskich więzieniach.

W krajach byłego Związku Radzieckiego częstość występowania gruźlicy wielolekoopornej typu MDR (*multiple drug resistance*) w grupie osadzonych wynosi 24,6% wśród chorych nowo wykrytych i 92,1% wśród chorych wcześniej leczonych [3]. W zakładach penitencjarnych, ze względu na wymienione już czynniki ryzyka ważny jest odpowiedni program zapobiegania i nadzoru nad gruźlicą.

W celu określenia potencjalnego źródła transmisji wśród chorych na gruźlicę przebywających w polskich zakładach penitencjarnych wykonana zostanie dalsza szczegółowa analiza molekularna, mająca na celu porównanie grupy więźniów i chorych przebywających na wolności w odpowiednich regionach Polski.

Wnioski

Analiza molekularna szczepków wyizolowanych od 57 chorych na gruźlicę więźniów wykazała wysoką użyteczność metody MIRU/VNTR.

Konflikt interesów

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów.

Piśmiennictwo:

1. Fazel S., Baillargeon J. The health of prisoners. *The Lancet* 2011; 377: 956–965.
2. Van't Hoff G., Fedosejewa R., Mihailescu L. Prisons preparedness for pandemic flu and the ethical issues. *Public Health* 2009; 123: 422–425.
3. Portales F., Rigouts L., Bastian I. Addressing multidrug-resistant tuberculosis in penitentiary hospitals and in the general population of the former Soviet Union. *Int. J. Tubercul. Lung Dis.* 1999; 3: 582–588.
4. Aerts A., Hauer B., Vanlin M., Veen J. Tuberculosis and tuberculosis control in European prisons. *Int. J. Tubercul. Lung Dis.* 2006; 10: 1215–1222.
5. Janicka-Sobierajska G. Gruźlica wśród więźniów w latach 1998–2007. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2004; 72: 258.
6. Korzeniewska-Kosela M. Gruźlica i Choroby układu oddechowego w Polsce w 2008 roku. Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa 2009.
7. Lewandowska K. Częstość występowania utajonego zakażenia *Mycobacterium tuberculosis* complex określana przy pomocy odczynu tuberkulinowego i testu wydzielania interferonu-gamma w próbie populacji ogólnej i osadzonych w zakładach karnych województwa mazowieckiego. Praca na stopień doktora nauk medycznych. Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa 2009.
8. Korzeniewska-Kosela M. Gruźlica i Choroby układu oddechowego w Polsce w 2010 roku. Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa 2011.
9. Moller L., Gatherer A., Djara M. Barriers to implementation of effective tuberculosis control in prisons. *Public Health* 2009; 123: 419–421.
10. Watson R., Stimpson A., Hostick T. Prison health care: a review of the literature. *Int. J. Nurs. Stud.* 2004; 41: 119–128.
11. Augustynowicz-Kopec E., Jagielski T., Zwolska Z. Genetic diversity of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates collected in Poland and assessed by spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46: 4041–4044.
12. Supply P., Allix C., Lesjean S. i wsp. Proposal for standardization of optimized *Mycobacterium* Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44: 4498–4510.
13. Alonso-Rodriguez N., Martinez-Lirola M., Herranz M. Evaluation of new advanced 15-loci MIRU-VNTR genotyping tool in *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology studies. *BMC Microbiol.* 2008; 8: 34–34.
14. Rasolofo-Razanamparany V., Menard D., Ratsitorahina M., Auregan G., Gicquel B., Chanteau S. Transmission of tuberculosis in the prison of Antananarivo (Madagascar). *Res. Microbiol.* 2000; 151: 785–795.
15. Martin V., Gonzales P., Cayla J.A., Mirabent J. i wsp. Case — finding of pulmonary tuberculosis on admission to a penitentiary centre. *Tuber Lung Dis.* 1994; 74: 49–53.