

Kako danas dijagnosticirati i pratiti tuberkulozu u Hrvatskoj

Ljiljana Žmak, Mihaela Obrovac, Vera Katalinić-Janković

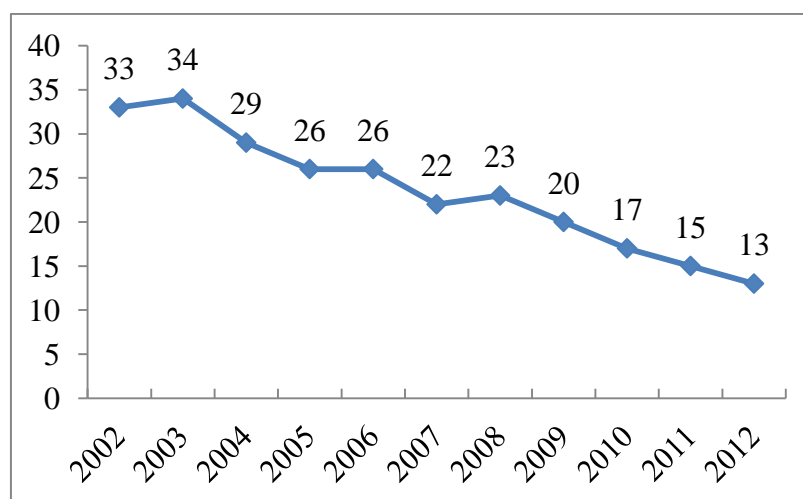
Hrvatski zavod za javno zdravstvo

Sažetak Tuberkuloza je kao bolest u Hrvatskoj prisutna već stoljećima. Uz kliničara i epidemiologa u kontroli bolesti ključna je i uloga laboratorija te mikrobiologa koji mora u što kraćem vremenu javiti pozitivan nalaz. Uz laboratorijske metode stare i preko sto godina, kao što je bojanje po Ziehl-Neelsenu, danas nam je na raspolaganju cijeli niz novih tehnika; od kultivacije na tekućim podlogama pa sve do niza brzih molekularnih testova za detekciju mikobakterija i otkrivanje rezistencije. Jedan od najvažnijih testova novije generacije je GeneXpert, automatizirani sistem koji omogućuje otkrivanje bacila direktno u uzorku za manje od dva sata. Postoji napredak i u obuhvatu kontakata u vidu IGRA testova koji imaju značajno bolju osjetljivost i specifičnost od do sada korištenog PPD testa. Kao pomoć epidemiološkom praćenju prijenosa tuberkuloze osobito je korisna MIRU-VNTR metoda kojom možemo potvrditi, odbaciti ili ukazati na mogućnost prijenosa infekcije.

Ključne riječi. Tuberkuloza, GeneXpert, IGRA testovi, molekularna epidemiologija

Vizija Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) i Globalnog programa za tuberkulozu je Svijet bez tuberkuloze te da u budućnosti niti jedna osoba ne umre od posljedica tuberkuloze. Od toga smo cilja još daleko budući da *M. tuberculosis* danas u svijetu uzrokuje oko 8,6 milijuna novih slučajeva tuberkuloze te oko 1,5 milijuna smrti na godinu (1). Ove brojke svrstavaju tuberkulozu na drugo mjesto uzroka smrti među zaraznim bolestima, odmah nakon infekcije HIV-om. Problem je tim veći što se procjenjuje da je u 3 milijuna ljudi propušteno postaviti dijagnozu bolesti, a među 450.000 bolesnika s rezistentnom tuberkulozom čak je 94.000 s multirezistentnim (rezistencija najmanje na izoniazid i rifampicin) oblikom bolesti (2). U Hrvatskoj se situacija s tuberkulozom mijenja na bolje iz godine u godinu (Slika 1.). Dok je sredinom prošloga stoljeća bilo oko 20 000 novootkrivenih bolesnika godišnje, danas je ta brojka značajno niža pa je u 2012. godini prijavljeno 556 novooboljelih što daje incidenciju od 13/100.000 stanovnika (3).

Slika 1. Incidencija tuberkuloze u Hrvatskoj od 2002 do 2012. godine.



Vrlo je značajan i podatak da je u 2012. godini kod 79% bolesnika mikrobiološki potvrđena tuberkuloza, što je najviše do sada. Od ukupnog broja prijavljenih slučajeva oko 90%

otpada na plućni oblik tuberkuloze, dok 10% čine izvanplućne manifestacije (pleura, limfni čvorovi, urinarni trakt, meninge).

Za borbu protiv ove bolesti od iznimne je važnosti timski rad kliničara koji postavljaju sumnju, mikrobiologa koji laboratorijski otkrivaju *M. tuberculosis* te epidemiologa koji prekidaju lanac zaraze. Od strane dijagnostičkog laboratorija vrlo je važno u što kraćem roku otkriti bacile te javiti liječniku nalaz. Mikobakteriološki laboratoriji, osim javljanja rezultata pretraga, sudjeluju i u prijavljivanju mikroskopski pozitivnih bolesnika odnosno rezultata testa rezistencije higijensko-epidemiološkoj službi prema mjestu stanovanja bolesnika. Postoje jasne preporuke o brzini javljanja nalaza pa se prema standardu direktni nalazi mikroskopa moraju javiti u roku od 24 sata od primitka uzorka (4). Kod direktnog mikroskopiranja uzorka na raspolaganju su dvije različite tehnike. Prva je uobičajeno bojanje po Ziehl-Neelsenu kod kojega se preparati gledaju svjetlosnim mikroskopom te bojanje auraminom kod kojega se koristi fluorescentni mikroskop. Obje su tehnike visoko specifične, a detekcija fluorescentnim mikroskopom ima nešto višu osjetljivost nego detekcija svjetlosnim mikroskopom. SZO je 2007. godine preporučila kao standard uz kultivaciju svih uzorka na uobičajene krute podloge i kultivaciju na tekuće podloge MGIT (od engl. Mycobacteria Growth Indicator Tube; BD, SAD), što značajno ubrzava proces javljanja pozitivnih kultura, a povećava i osjetljivost testa. Standard je da se pozitivne kulture javljaju unutar 14 dana od primitka uzorka što je moguće samo ukoliko se svi uzorci nasaduju i na tekuće podloge.

Upotreba tekućih podloga kod kultivacije kao i kod testiranja osjetljivosti soja na antituberkulotske lijekove (ATL) može skratiti dijagnostički algoritam za više od mjesec dana.

Kako svaki mikroskopski pozitivan bolesnik može zaraziti između 10 i 15 kontakata, što raniji početak terapije značajno doprinosi zaustavljanju širenja bolesti.

Osim konvencionalne dijagnostike koja uključuje mikroskopsku analizu uzorka te kultivaciju, danas imamo na raspolaganju čitav niz molekularnih metoda kojima možemo otkriti *M. tuberculosis* direktno u uzorku, identificirati vrste unutar *M. tuberculosis* complexa, razdvojiti *M. tuberculosis* complex od ne-tuberkuloznih mikobakterija (NTM) te odrediti molekularnu osnovu rezistencije na pojedine ATL. Od niza testova za određivanje rezistencije na ATL dostupnih na tržištu, u Nacionalnom referentnom laboratoriju za tuberkulozu pri Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo u Zagrebu koriste se test GeneXpert (Cepheid, SAD) i komercijalni hibridizacijski testovi (Hain Lifescience, Njemačka). Prednost hibridizacijskih testova je brzina i jednostavnost izvođenja, a nedostaci fenotipske i genotipske razlike u određivanju osjetljivosti na ATL te nemogućnost određivanja proporcije rezistentnih bakterija i miješanih sojeva. Test GeneXpert, u upotrebi od 2010. godine, donio je revoluciju u dijagnostici tuberkuloze (5). Radi se o automatiziranom sistemu za direktnu detekciju *M. tuberculosis* u uzorku na principu lančane reakcije polimerazom u realnom vremenu. Test je iznimno brz i jednostavan za rukovanje te je nalaz gotov za dva sata. Uz dokazivanje bacila tuberkuloze otkriva se i rezistencija detektiranoga soja na antituberkulotik rifampicin. Osjetljivost testa je iznimno visoka za mikroskopski pozitivne plućne uzorke te iznosi gotovo 100%, dok je osjetljivost za izvanplućne uzorke nešto niža - oko 75%.

Dostupni su i hibridizacijski testovi za razlikovanje vrsta unutar roda *Mycobacterium* iz kultiviranih uzoraka. Kako se u budućnosti očekuje porast broj izolata NTM, zastupljenost i značaj tih testova zasigurno će biti veći. Naime, u svim razvijenim zemljama smanjenjem

incidencije tuberkuloze raste incidencija NTM, stoga se očekuje kako će i u Hrvatskoj značaj ovih uzročnika s godinama biti sve veći. Takav je trend već vidljiv jer svake godine bilježimo porast broja izolata NTM. Ipak, NTM nisu obligatni patogeni te bolest uzrokuju rijetko. U Hrvatskoj godišnje bilježimo 200 do 400 izolata NTM te oko 20 bolesnika od mikobakterioze. Važno je napomenuti kako se NTM ne prenose s čovjeka na čovjeka te da liječenje mikobakterioza nije isto kao liječenje tuberkuloze. Kao uzročnici bolesti kod nas prevladavaju *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. xenopi* i *M. chelonae*.

Osobiti problem predstavlja obuhvat kontakata bolesnika s tuberkulozom, osobito onih koji su direktno mikroskopski pozitivni na acidorezistentne bacile u uzorku. Do unatrag nekoliko godina, jedini način testiranja izloženosti kontakata bacilu tuberkuloze i otkrivanja latentne infekcije s *M. tuberculosis* bio je kožni PPD (purificirani proteinski derivat) test koji ima iznimno nisku osjetljivost i specifičnost. Napredak u obuhvatu kontakata učinjen je uvođenjem IGRA (od engl. Interferon (IFN)- γ Release Assay) testova. Ovi se testovi baziraju na detekciji IFN- γ koji luče periferni limfociti u krvi, a osjetljivost i specifičnost bolji su nego kod kožnog testa. U Hrvatskoj je danas u upotrebi test Quantiferon-TB Gold (Qiagen, Njemačka). Napredak u odnosu na kožni test je u tome što postoji mogućnost testiranja pozitivne i negativne kontrole u dvije zasebne epruvete. Pomoću negativne kontrole se može detektirati nespecifičnu stimulaciju krvnih stanica te posljedično otkriti mogući lažno pozitivan nalaz. S druge strane, pozitivnom kontrolom se testira sposobnost stanica da luče IFN- γ te je moguće otkriti stanje anergije kod bolesnika koje bi dovelo do lažno negativnog rezultata. U trećoj, testnoj epruveti, periferni limfociti dovode se u kontakt s tri antigena koji su specifični za *M. tuberculosis* i ne nalaze se kod BCG (od engl. **Bacillus Calmette–Guérin**) soja i većine NTM. Ovo je osobito važno u slučaju BCG-irane

populacije, kao što je to u Hrvatskoj. Potrebno je naglasiti kako nedavno testiranje PPD-om može dovesti do lažno pozitivnoga nalaza testa Quantiferon-TB Gold. Stoga, ukoliko se planira učiniti test na latentnu infekciju iz krvi, mora se napraviti ili unutar tri dana ili šest tjedana nakon testiranja PPD-om.

Ne treba zaboraviti ni važnost genotipizacije sojeva *M. tuberculosis* koja pomaže u otkrivanju obrazaca prijenosa infekcije, razlikovanju reinfekcije od reaktivacije bolesti te olakšava otkrivanje laboratorijske kontaminacije. U Hrvatskoj se svi sojevi izolirani u novoboljelih bolesnika od 2005. godine genotipiziraju metodom MIRU-VNTR (od engl. Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number of Tandem Repeats). Tom se metodom informacije pohranjene u genomu bacila prevode u numerički oblik koji je pogodan za intra- i interlaboratorijsko uspoređivanje. Rezultati genotipizacije od osobitog su značaja za ispitivanje prijenosa infekcije te daju naznake o obrascima prijenosa tuberkuloze u određenoj državi. Tako je analizom sojeva *M. tuberculosis* genotipiziranih od 2009. do 2011. godine utvrđeno da je više od 60% izolata u Hrvatskoj dio nekog od ukupno 236 klastera (klaster čine dva ili više sojeva istog genotipa). Nadalje, udio klasteriranja od 43% govori o mogućnosti da je gotovo polovica naših bolesnika zaražena recentnim prijenosom infekcije, a ne reaktivacijom infekcije stečene ranije u životu. Ovi podaci naglašavaju potrebu za aktivnijim pristupom u otkrivanju novih bolesnika te epidemiološkoj kontroli širenja bolesti.

Trenutno se radi na velikom broju potencijalnih novih testova za dijagnostiku tuberkuloze. Uz upotrebu sekvencioniranja cijeloga genoma mikroorganizma u cilju dijagnostike i praćenja prijenosa infekcije, najviše se očekuje od POC (od engl. Point of Care) testova koji bi se trebali koristiti već kod prvog susreta bolesnika s liječnikom. U centru zanimanja su metode

otkrivanja volatilnih markera izdisajnim testom te dokaza specifičnih antigena u urinu. Pravi značaj ovih testova nalazi se u brznoj, osjetljivoj, jeftinoj te stoga svima dostupnoj dijagnostici koja bi značajno trebala pridonijeti promptnoj detekciji infekcije s *M. tuberculosis*.

Literatura

1. Raviglione M, Marais B, Floyd K, i sur. Scaling up interventions to achieve global tuberculosis control: progress and new developments. *Lancet* 2012; 379(9829): 1902-13.
2. WHO Global tuberculosis report 2013. World Health Organisation, Geneva, Switzerland.
3. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2012. godinu. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, 2013.
4. Naputak za suzbijanje i sprečavanje tuberkuloze. Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, lipanj 2010.
5. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, i sur. Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance, *N Engl J Med* 2010; 363: 1005-1015.