

Mikrobiologiczna diagnostyka gruźlicy oraz zasady ochrony pacjentów i pracowników przed zakażeniami wywołanymi prątkami gruźlicy



**Rekomendacje
Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc ¹
i Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych ²**

^{1,2} Prof. dr hab. Ewa Augustynowicz-Kopeć, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa

¹ Prof. dr hab. Zofia Zwolska, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa

Niniejszy dokument został, za zgodą Prezesa PTCHP, wydzielony z całości wytycznych pt.: „Zalecenia PTCHP dotyczące rozpoznawania, leczenia i zapobiegania gruźlicy u dorosłych i dzieci” wydrukowanych w *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2013, 81, 4325-379.

Autorki rozszerzyły treści związane z mikrobiologiczną diagnostyką gruźlicy i metodami zapobiegania zakażeniom zawodowym w laboratoriach mikrobiologicznych.

Autorki składają serdeczne podziękowanie Pani Prezes Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych dr Elżbiecie Puacz za inspirację w przygotowaniu dokumentu przeznaczonego dla diagnostów laboratoryjnych i jego rozpowszechnieniu.

Spis treści

1. Wprowadzenie	2
2. Biologia prątka gruźlicy	4
3. Niektóre dane epidemiologiczne gruźlicy w Polsce	5
4. Organizacja sieci laboratoriów prątka gruźlicy w Polsce	6
5. Metody mikrobiologiczne stosowane w diagnozowaniu chorych Materiały od chorych do diagnostyki gruźlicy	8
6. Transport i przechowywanie Wykrywanie krzyżowych kontaminacji przedlaboratoryjnych	15
7. i laboratoryjnych	22
8. Dokumentacja. Kwalifikacje personelu	23
9. Zapobieganie transmisji gruźlicy w placówkach opieki medycznej	27
10. Wybrane pozycje piśmiennictwa	35

1. Wprowadzenie

Diagnozowanie gruźlicy oparte o bakteryjny czynnik etiologiczny ma już ponad 100-letnią historię i rozpoczęło się wraz z odkryciem prątków przez Roberta Kocha w 1882 r. Jednak dopiero po II wojnie światowej wraz z odkryciem leków przeciwprątkowych wprowadzono nowoczesną terapię lekową.

Przez dziesięciolecia grupy międzynarodowych specjalistów pracowały nad ustaleniem najskuteczniejszych schematów leczenia a ich wyniki pochodzą z setek tysięcy prac eksperymentalnych na zwierzętach i wynikach leczenia ludzi. Ta dziedzina przestała jednak rozwijać się ponieważ od prawie 50 lat nie wynaleziono żadnego nowego leku przeciwgruźliczego. Niektóre kierunki w gruźlicy rozwijają się jednak dynamicznie. Do najbardziej spektakularnych należą metody mikrobiologiczne, wśród których metody molekularne ugruntowały swoją pozycję i znalazły się w panelu metod diagnostycznych. Ponadto badania nad antygenami prątków dały możliwość wykrywania utajonego zakażenia prątkami gruźlicy, a co za tym idzie lepszego stosowania metod prewencji. Polscy mikrobiolodzy ftyzjatrzy, pneumonolodzy włączyli się w światowe badania już w latach 1960-tych, podążając za kierunkami wskazywanymi przez Światową Organizację Zdrowia, co doprowadziło do usystematyzowania wiadomości o gruźlicy, jej postaciach, metodach zapobiegania i metodach diagnostyki.

Sto lat mikrobiologicznej diagnostyki chorych na gruźlicę pobudza nas do refleksji, jaką drogę przeszliśmy od metod konwencjonalnych, szkiełka, próbówki, płytki aż do molekularnych. Pomimo że w diagnozowaniu chorych podejrzanych o gruźlicę posługujemy się różnymi metodami, wykrycie *M.tuberculosis* w materiale chorego stanowi najbardziej obiektywny dowód procesu chorobowego. Badania mikrobiologiczne w gruźlicy zostały szeroko wprowadzone ponad 60 lat temu w wielu regionach świata i wkrótce stwierdzono, że ich wartość zależy od wielu czynników.

Wartość metod mikrobiologicznych w diagnozowaniu gruźlicy zależy od:

- poprawnej organizacji usług laboratoriów
- edukacji i kompetencji personelu
- prawidłowego wyboru metod diagnostycznych
- poprawnej interpretacji wyników
- dobrej współpracy z klinicystami

W Polsce, od lat 1960-tych sieć laboratoriów prątka wypełnia swoje główne zadania w programie nadzoru nad gruźlicą. Metody mikrobiologiczne są stosowane do wyznaczenia optymalnej terapii i monitorowania leczenia, potwierdzając również wyleczenie chorego.

Obecnie w XXI w. jakość pracy laboratoriów prątka gruźlicy ocenia się na podstawie rocznych odsetków potwierdzeń mikrobiologicznych u chorych klinicz-

nie podejrzanych o gruźlicę. Dla Polski średnie, roczne odsetki mikrobiologicznych potwierdzeń podejrzanych klinicznie gruźlicy wynoszą 68% w zakresie od 45-90%. Należy podkreślić, że kilka polskich laboratoriów osiąga najwyższe odsetki potwierdzeń (> 80%) i tym samym zrównuje się z innymi najlepszymi laboratoriami prątką w Europie.

Niniejszy dokument jest opracowany na podstawie obszernych doświadczeń polskich specjalistów z uwzględnieniem wiedzy zawartej w algorytmach rekomendowanych przez ekspertów międzynarodowych.

Polskie Towarzystwo Chorób Płuc (PTChP) postanowiło opracować zalecenia dotyczące zasad diagnostyki, leczenia i zapobiegania gruźlicy. Przygotował je interdyscyplinarny zespół, w skład którego wchodził pneumonolog, pediatra, mikrobiolog i immunolog. Podstawą tworzenia tego dokumentu była medycyna oparta na faktach – *evidence based medicine*. Zalecenia sformułowano na podstawie najnowszych wyników badań naukowych rzetelnie oceniających przydatność metod diagnostycznych, terapeutycznych i profilaktycznych w praktyce klinicznej, z określeniem siły i jakości dowodów naukowych. Opisuując zalecenia kierowaliśmy się wskaźnikami epidemiologicznymi w naszym kraju oraz dostępnością metod diagnozowania gruźlicy.

Niniejszy dokument zawiera wskazania dotyczące stosowania metod mikrobiologicznych w diagnostyce gruźlicy oraz omawia metody prewencji stosowane w zapobieganiu zakażeniom szpitalnym i laboratoryjnym prątkami gruźlicy.

2. Biologia prątków gruźlicy

Mykobakterie łączą w sobie cechy bakterii i grzybów. Należą do grzybobakterii – rodzina *Mycobacteriaceae* (z greckiego *myces* – grzyb, *bacterium* – pałeczka). Są one spokrewnione z promieniowcami (*Actinomyces*) i maczugowcami (*Corynebacterium*). W języku polskim przyjęto nazywać je prątkami. Są to bakterie tlenowe, wolno rosnące, niemające zdolności do poruszania i niewytwarzające form przetrwalnikowych. Prątki są bogate w substancje tłuszczowe, wykazują cechę kwasooporności w barwieniu fuksyną karbolową, barwią się również fluorochromami, ale nie barwią się metodą Grama. Charakteryzują się polimorfizmem i mają duże wymagania wzrostowe. W zakażonych tkankach ludzi i zwierząt występują w postaci cienkich laseczek, a na pożywkach przybierają formy kokoidalne, rozgałęzione lub w postaci sznurów. Nie są wyposażone w rzęski ani otoczki, nie wytwarzają toksyn. W środowisku zewnętrznym, a także w organizmie człowieka lub zwierzęcia, prątki gruźlicy mogą przeżywać w postaci latentnej przez wiele miesięcy a nawet lat. Prątki patogenne dla ludzi i zwierząt określa się jako *Mycobacterium tuberculosis complex*. W skład tej grupy prątków wchodzi 6 gatunków prątków: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, atenuowany szczep *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canettii* i *Mycobacterium caprae*. Prątki te wywołują gruźlicę nie tylko u ludzi, ale też u wielu gatunków zwierząt hodowlanych i dziko żyjących. Stanowią one niejednorodną grupę pod względem morfologicznym, biochemicznym, różnią się cechami lekooporności, zjadliwości i różnym powinowactwem do rodzaju gospodarza (ludzie, zwierzęta).

Charakterystyczną cechą prątków jest ich wolny wzrost. Czas generacji prątków gruźlicy w optymalnych warunkach hodowlanych wynosi około 24 godzin. Prątki hodowane z materiałów diagnostycznych rosną bardzo wolno (6-10 tygodni). Kolonie mogą być widoczne gołym okiem po około 2-4 tygodniach. Prątki patogenne rosną tylko na pożywkach wzbogaconych białkiem zwierzęcym. W barwieniu metodą Ziehl-Neelsona (Z-N) prątki wykazują cechę kwasooporności. Nazwa „prątki kwasooporne” (ang. *acid fast bacilli*, w skrócie AFB) dla całego rodzaju *Mycobacterium* jest ściśle związana z brakiem reakcji odbarwiania przy pomocy kwaśnego alkoholu komórek zabarwionych uprzednio fuksyną. Prątki wykazują również szczególną oporność na wiele powszechnie stosowanych inhibitorów, środków dezynfekcyjnych, antybiotyków i innych leków. W porównaniu z innymi gatunkami bakterii odznaczają się opornością na szereg czynników destrukcyjnie wpływających na komórki żywych organizmów, takie jak kwasy, zasady lub detergenty. Są one odporne na wysuszenie i mogą bez aktywnego metabolizmu przeżywać wiele lat. Przyczyną tej dużej oporności jest duża zawartość lipidów w komórce, co powoduje hydrofobowy charakter ich ściany komórkowej. Ogranicza to penetrację wodnych roztworów inhibitorów do wnętrza komórki. Prątki wykazują wrażliwość na działanie niektórych czynników chemicznych i fizycznych, takich jak wysoka temperatura i promieniowanie ultrafioletowe.

3. Niektóre dane epidemiologiczne o gruźlicy w Polsce

Według szacunków WHO w 2012 r. na świecie zachorowało na gruźlicę 8,7 mln osób i zmarło z tego powodu 1,4 mln. W Europie sytuacja epidemiologiczna jest zróżnicowana, od bardzo dobrej w krajach zachodnich (5-15/100 tys.), dobrej w krajach Europy Środkowej (15-30/100 tys.), do złej na Wschodzie (>60/100 tys.). Polska ze wskaźnikiem zapadalności na gruźlicę wynoszącym w 2013 roku 18,8/100 tys. należy do krajów o średniej zapadalności, ale powoli zbliża się do grupy z dobrą sytuacją epidemiologiczną. Aktualnie stwierdza się w Polsce około 8 tysięcy przypadków gruźlicy rocznie. Sytuacja epidemiologiczna w 2013 r. była regionalnie zróżnicowana od 23,9/100 tys. w województwie lubelskim do 9,1/100 tys. w województwie wielkopolskim. Zapadalność na gruźlicę w Polsce wzrasta z wiekiem i blisko połowa chorych jest obecnie w wieku 45-64 lat. Gruźlica u dzieci stanowiła 1,6% (116) ogółu zachorowań.

Ogólnoświatowe badania wykazują, że częściej na gruźlicę chorują mężczyźni w porównaniu z kobietami. W Polsce przewaga chorych mężczyzn nad kobietami w grupie 50-59 roku życia jest prawie czterokrotna, a w całej populacji ponad dwukrotna (26, 8 vs 11/100 tys. w 2013 roku).



4. Organizacja sieci laboratoriów prątka w Polsce

Zgodnie z wytycznymi WHO laboratoria prątka dzielą się na 3 główne kategorie, które różnią się od siebie zakresem wykonywanych badań, liczbą personelu specjalistycznego i wyposażeniem.

Laboratoria I rzędu.

Do zadań laboratoriów należy:

- Zbieranie do badań mikrobiologicznych materiałów od chorych i ich rejestrowanie
- Wykonywanie rozmazów i barwienie ich na obecność prątków kwasoopornych (AFB *acid-fast bacilli*)
- Przesyłanie materiałów od chorych wraz z dokumentacją i wynikami AFB do laboratoriów wyższego rzędu w celu założenia hodowli i wykonania dalszych badań diagnostycznych
- Aktywne uczestniczenie w testach kontroli jakości badań mikroskopowych

Uwaga : W Polsce nie ma i nie planuje się otwierania laboratoriów I rzędu.

Laboratoria II rzędu.

Do zadań laboratoriów należy:

- Wykonywanie badań, które stanowią zadania laboratoriów I rzędu
- Zakładanie hodowli i izolowanie szczepów prątków
- Identyfikacja szczepów *M.tuberculosis* complex i wykonanie testów lekowrażliwości na leki podstawowe (INH, RMP, SM, EMB i wg możliwości na PZA)
- Wstępna identyfikacja (do IV Grupy Runyona) prątków MOTT
- Przechowywanie szczepów prątków do późniejszych badań, molekularnych dochodzeń epidemiologicznych i weryfikacji wyników
- Regularne poddawanie się kontroli jakości badań mikroskopowych, lekooporności oraz żywności przygotowanych pożywek jajowych

Laboratoria III rzędu.

Do zadań laboratoriów należy:

Wykonywanie badań, które stanowią zadania laboratoriów I i II rzędu
Identyfikacja ważniejszych (w patogenezie) gatunków mykobakterii
Wykonywanie testów lekowrażliwości dla prątków MOTT
Zdobywanie akredytacji na podstawie jakości i wachlarza badań

Liczba, kompetencje i zakres pracy laboratoriów powinny być dostosowane do populacji własnego kraju. WHO rekomenduje otwieranie jednego laboratorium:

II rzędu na 1 mln mieszkańców

III rzędu na 3-4 mln mieszkańców

Krajowe referencyjne Laboratorium Prątka (KRLP) pełni nadrzędną rolę w sieci laboratoriów prątka w kraju i jego praca jest weryfikowana przez Ponadnarodowe Laboratorium Prątka wyznaczone przez WHO.

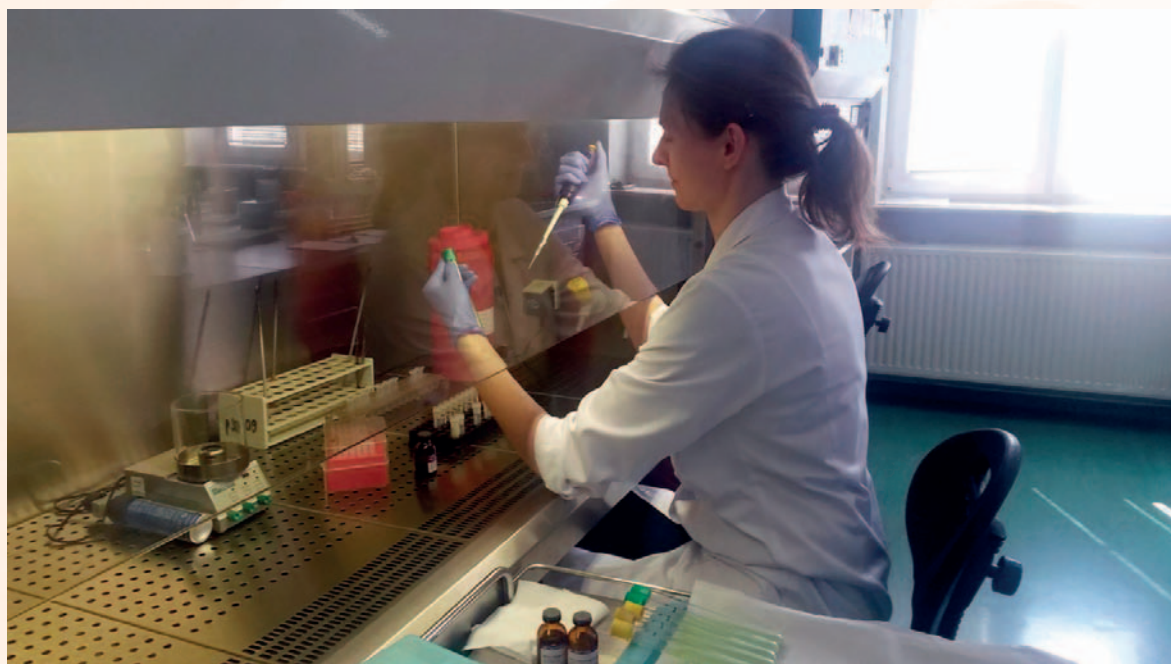
Do głównych zadań KRLP należy:

1. Nadzór nad odpowiednim do potrzeb poziomem badań i prowadzenie kontroli jakości badań wykonywanych w sieci laboratoriów w kraju.
2. Regularne prowadzenie badań dotyczących częstości występowania gruźlicy lekoopornej. Weryfikacje testów lekooporności u szczepów MDR i XDR.
3. Identyfikacja gatunkowa w obrębie *Mycobacterium tuberculosis* complex i MOTT.
4. Prowadzenie badań weryfikujących transmisje w zakładach opieki zdrowotnej, krzyżowe kontaminacje w laboratoriach i współpraca międzynarodowa.

Rekomendacja 1.

Badanie mikrobiologiczne w kierunku gruźlicy można wykonać wyłącznie w laboratoriach prątka nadzorowanych przez Krajowe Referencyjne Laboratorium Prątka (KRLP).

Informację o możliwościach diagnostycznych polskich laboratoriów można uzyskać w Krajowym Referencyjnym Laboratorium Prątka w Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc, 01-138 Warszawa, ul. Płocka 26.



Laboratorium gruźlicze.

5. Metody mikrobiologiczne stosowane w diagnozowaniu chorych

Metody mikrobiologiczne stanowią złoty standard w rozpoznawaniu gruźlicy. W każdym przypadku podejrzenia gruźlicy należy dążyć do otrzymania wyniku bakteriologicznego, wraz z identyfikacją wyhodowywanych prątków i testem lekooporności.

Metody mikrobiologiczne stanowią złoty standard w rozpoznawaniu gruźlicy. W każdym przypadku podejrzenia gruźlicy należy dążyć do otrzymania wyniku bakteriologicznego, wraz z identyfikacją wyhodowywanych prątków i testem lekooporności.

Rekomendacja 2.

W laboratoriach prętka prowadzi się również diagnostykę mykobakterioz wywołanych przez prątki MOTT (prątki niegruźlicze). Ponieważ wyrastają one na pożywkach do hodowli prątków gruźlicy w każdym przypadku otrzymania hodowli należy wykonać identyfikację, aby odróżnić prątki *Mycobacterium tuberculosis complex* od prątków MOTT.

W diagnostyce mikrobiologicznej wykorzystuje się szereg metod, które charakteryzują się różną czułością i swoistością w wykrywaniu prątków gruźlicy oraz czasem niezbędnym do uzyskania wyniku. (Tab. 1). Wynik badania bakterioskopowego wpływa na wybór dalszych metod diagnostycznych.

Rekomendacja 3.

U chorych po raz pierwszy diagnozowanych w kierunku gruźlicy należy wykonać badanie bakterioskopowe, molekularne, posiew na pożywkach płynnych i stałych, identyfikację oraz test lekooporności. U chorych ze wznową gruźlicy należy uwzględnić możliwość wystąpienia lekooporności prątków i poza wymienionymi badaniami wykonać molekularny test w kierunku lekooporności.

Tabela 1. Wartość metod mikrobiologicznych stosowanych w diagnostyce gruźlicy

Metoda	Czas	Czułość	Swoistość	Ograniczenia
Mikroskopowe badanie rozmazu barwionego metodą Ziehl-Neelsena (AFB <i>acid fast bacilli</i>)	1-2 dni	55-90% wzrasta w dobrze wyposażonym laboratorium	90-98% wysoka przy barwieniu metodą typową dla prątków	Wymaga potwierdzenia w hodowli. Nie odróżnia prątków gruźlicy od gatunków saprofitycznych i środowiskowych.
Posiew konwencjonalny: A*-pożywka L-J z glicerolem B*-pożywka L-J z pirogronianem	3-10 tyg.	65-80% duża	>95% Złoty standard w diagnostyce	Wyhodowane gatunki wymagają typowania
Posiew w systemach automatycznych BACTEC, MIGHT 960 itp.	2 dni-6 tyg.	70-85% duża	>95% złoty standard w diagnostyce	Wyhodowane gatunki wymagają typowania
Wykrywanie DNA lub RNA <i>M.tuberc.</i> complex bezpośrednio w materiale od chorego*	1 dzień	85-90% wzrasta przy AFB+	85-95%	Wyizolowane DNA powinno być oczyszczane z inhibitorów reakcji. Wykrywa wszystkie gatunki MTC. PCR nie jest polecany.
Typowanie <i>M. tbc</i> i innych gatunków testem niacynowym	1 dzień		>80% test jakościowy	Odróżnia tylko <i>M. tuberculosis</i> od <i>M.bovis</i> i MOTT Konieczna hodowla
Typowanie gatunków metodą HPLC	1 dzień		>95%	Nie rozróżnia niektórych gatunków prątków Konieczna hodowla
Molekularne typowanie podgatunków MOTT**	3 dni		> 80%	Konieczna hodowla
Molekularne dochodzenie epidemiologiczne***	3 dni		>95% wysoka	Konieczna hodowla
Identyfikacja nop po szczepieniu BCG	3 dni		95 %	Konieczna hodowla

A* i B* pożywki wykorzystywane do hodowli i różnicowania gatunków *Mycobacterium spp.*

* Należy wykonywać tylko w zamkniętych systemach genetycznych.

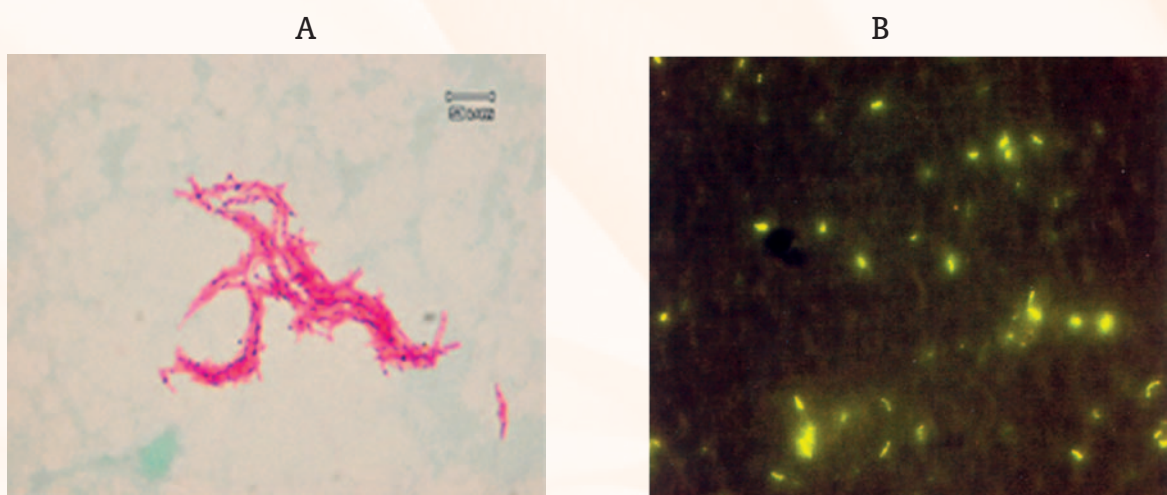
** Test zalecany przy leczeniu mykobakterioz.

*** Zalecane przy kontaktach z chorymi prątkującymi.

Ocenę mikrobiologiczną rozpoczyna się od rozmazu barwionego metodą Ziehl-Neelsena (Z-N). Nie wykonuje się tego badania z moczu, w którym często występują prątki saprofityczne. Obecność prątków w rozmazach mikroskopowych narzuca dalszy tok postępowania. Dodatni wynik bakterioskopii wykrywa chorego obficie prątkującego i wymaga wykonania identyfikacji prątków widocznych w rozmazie metodą genetyczną.

Rekomendacja 4.

Na podstawie wyniku bakterioskopii nie można ani potwierdzić ani wykluczyć rozpoznania gruźlicy, ponieważ w dodatnim rozmazie mogą być obecne prątki środowiskowe. Przy dodatnim rozmazie należy wykonać badanie genetyczne.

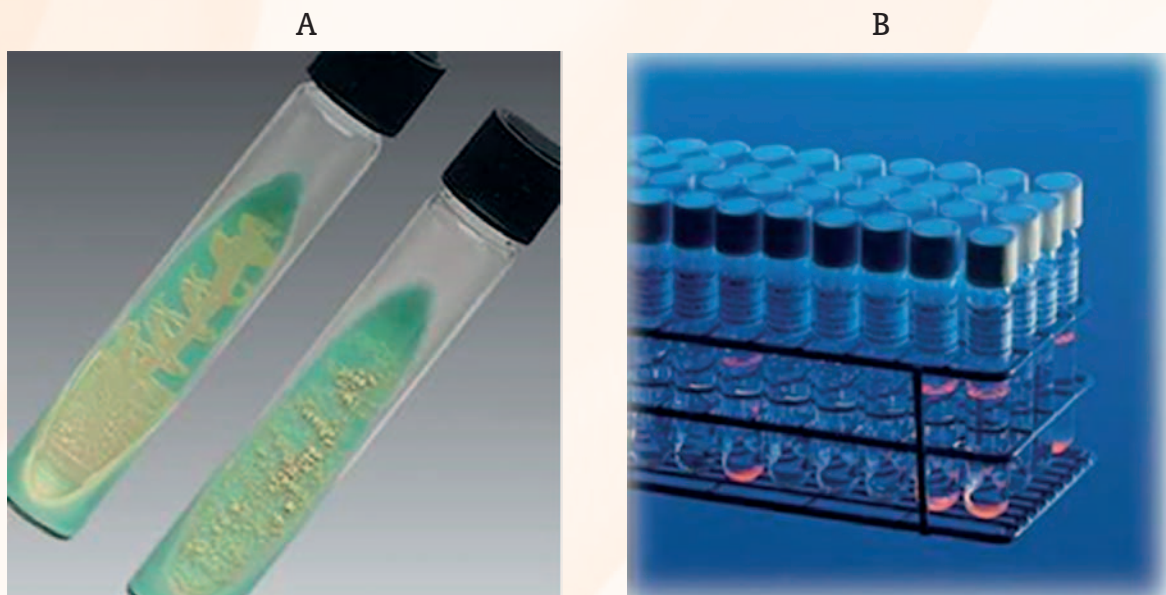


Rycina 1. Barwienie prątków metodą Ziehl-Neelsena (A) i metodą fluorescencyjną (B).

Testy genetyczne nie mogą być wykonywane jako jedyna metoda w diagnostyce gruźlicy ponieważ nie zastępują innych metod bakteriologicznych, a są jedynie ich uzupełnieniem. W przypadku dodatniego wyniku badania genetycznego musi być zawsze wykonany posiew na pożywki hodowlane płynne i stałe.

Rekomendacja 5.

Badanie mikroskopowe i posiew na pożywkach hodowlanych (płynnych i stałych) muszą być wykonane w każdym przypadku podejrzenia gruźlicy, również przy dodatnim wyniku badania genetycznego.



Rycina 2. Hodowla prątków na pożywce LJ (A) próbki do posiewu w automatycznym systemie Bactec MGIT 960 (B).

Rekomendacja 6.

Badania genetyczne w diagnostyce gruźlicy należy wykonywać wyłącznie w zamkniętych systemach, wyposażonych w kontrolę procesów amplifikacji.

Czas wykonania badania genetycznego i rozmazu po uzyskaniu materiału od chorego wynosi 1-2 dni. Metody genetyczne nie są pozbawione wad i mają też swoje ograniczenia. WHO zaleca wykonywanie badań genetycznych wyłącznie w zamkniętych, komercyjnych systemach, wyposażonych w kontrolę procesów amplifikacji. Gdy w badanym materiale od chorego obecne są inhibitory reakcji amplifikacji można uzyskać wyniki fałszywie ujemne. Jeżeli kliniczne podejrzenie gruźlicy u chorego jest bardzo duże, a wynik badania genetycznego ujemny, należy rozważyć konieczność dodatkowego oczyszczenia materiału z inhibitorów. Fałszywie dodatnie wyniki są stwierdzane głównie przy stosowaniu testów opracowanych samodzielnie w laboratoriach badawczych (tzw. *in-house PCR tests*), które nie mają odpowiedniej standaryzacji do pracy z prątkiem gruźlicy.

W przypadku niezgodności wyników otrzymanych z różnych metod wskazane jest powtórzenie badania genetycznego. Uzyskane wyniki badania bakteriologicznego i genetycznego określa dalsze postępowanie w laboratorium .

Rekomendacja 7.

Uzyskane wyniki badania bakterioskopowego i genetycznego określają dalsze postępowanie w laboratorium.

Jeżeli wynik testu genetycznego nie odpowiada wynikom innych badań i objawom klinicznym chorego, należy powtórzyć badanie.

Tabela 2. Interpretacja wyników badań genetycznych

Bakterioskopia AFB	Badanie genetyczne	
	(+)	(-)
(+)	Aktywna gruźlica chory prątkujący	Należy powtórzyć badanie genetyczne (możliwa obecność w materiale inhibitorów). Jeżeli dwa kolejne badania genetyczne nie wykryją inhibitorów a kolejny wynik badań AFB będzie ujemny to znaczy, że materiale nie ma prątków gruźlicy i prawdopodobnie wykryto obecność prątków MOTT.
(-)	Należy powtórzyć badanie genetyczne. Ponowne otrzymanie dodatniego wyniku badania potwierdza rozpoznanie gruźlicy	Należy powtórzyć badanie genetyczne. Powtórnie ujemny wynik świadczy przeciwko rozpoznaniu gruźlicy, o dalszym leczeniu decyduje obraz kliniczno-radiologiczny.

Rekomendacja 8.

Wstępną diagnostykę gruźlicy należy zakończyć po 2 dniach (bakterioskopia i badanie genetyczne), pełną w 21 dni (identyfikacja gatunkowa i test lekooporności).

Wyhodowanie prątków gruźlicy na pożywkach bakteriologicznych z materiału pobranego od chorego jest najbardziej pewnym i obiektywnym dowodem na rozpoznanie gruźlicy. Posiewy wykonuje się na pożywkach jajowych (Loewensteina-Jensena, L-J) i pożywkach płynnych (np. Middlebrooka). Pożywki te mają swoje wady i zalety. Głównym ograniczeniem stałych pożywek jest długi czas oczekiwania na wynik. Pożywki płynne są bardziej odpowiednie do hodowania prątków z uszkodzonym metabolizmem (np. w trakcie leczenia) oraz materiałów w kierunku diagnostyki gruźlicy pozapłucnej. Pożywki płynne są także pomocne w diagnostyce gruźlicy u osób zakażonych HIV oraz w diagnostyce i monitorowaniu gruźlicy o oporności na leki typu MDR i XDR.

Rekomendacja 9.

Wykonanie testu lekowrażliwości na leki główne jest zalecane u wszystkich nowo wykrytych chorych na gruźlicę, u których wyhodowano prątki. Testy na leki dodatkowe są wymagane w przypadkach stwierdzonej wcześniej u chorych lekooporności typu MDR lub XDR oraz gdy chory w przeszłości przyjmował jakikolwiek lek dodatkowy.

Rekomendacja 10.

Szczepy prątków gruźlicy zdiagnozowane w laboratoriach regionalnych jako MDR lub XDR powinny być przed włączeniem leczenia choremu zwerfikowane przez KRLP.

Wykonanie testu lekowrażliwości na główne leki przeciwprątkowe: SM, INH, RMP, EMB i PZA jest wymagane we wszystkich nowych przypadkach zachorowania na gruźlicę, w których prątkowanie potwierdzono metodą hodowli.

Lekooporność powstaje w wyniku selekcji mutantów opornych występujących w każdej populacji prątków, która nigdy nie miała kontaktu z lekami. Lekooporność dzieli się na pierwotną i nabytą (Tabela 3.).

Testy lekooporności wykonywane bez zachowania należytej kontroli jakości mogą dawać błędne wyniki. W Polsce, podobnie jak i w innych krajach europejskich, najczęściej błędnych wyników lekooporności dotyczy streptomycyny i etambutolu.

Tabela 3. Definicje lekooporności :

Typ lekooporności <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Definicja
Lekooporność pierwotna	Gruźlica wywołana prątkami gruźlicy z kompleksu <i>tuberculosis</i> opornymi na leki przeciwprątkowe.
Lekooporność nabyta	Oporność prątków na jeden lub więcej leków, która powstała w trakcie leczenia.
Lekooporność na jeden lek	Oporność pierwotna lub nabyta na jakikolwiek jeden lek.
Lekooporność polilekowa	Oporność pierwotna lub nabyta na więcej niż jeden lek, ale ze wzorami innymi niż MDR.
Lekooporność całkowita	Oporność na leki będąca sumą oporności wszystkich wzorów oporności.
Lekooporność MDR	Oporność na INH+RMP, także w połączeniu z opornością na inne leki.
Lekooporność XDR	Oporność MDR + oporność na fluorochinolon + amikacynę lub kanamycynę.

Rekomendacja 11.

Testy lekooporności muszą być wykonywane w komorach laminarnych zapewniających trzeci poziom bezpieczeństwa biologicznego.



Rycina 3. Komora laminarna III poziom bezpieczeństwa biologicznego.

Testy lekooporności wykonuje się z gęstych zawiesin prątków, używając dużej masy bakteryjnej. Przy przygotowaniu zawiesin i posiewie wytwarza się zakaźny aerozol, który zagraża zdrowiu personelu. Ponadto, w takich warunkach istnieje zwiększone ryzyko krzyżowej kontaminacji pomiędzy próbkami, co generuje wyniki fałszywie dodatnie.

Potwierdzenie gruźlicy jest procesem trudnym. Lekarz, analizując wszystkie wyniki badań opiera się na kryteriach opisanych przez WHO.

Tabela 3. Kryteria rozpoznania gruźlicy stosowane po zakończeniu badań diagnostycznych klinicznych i laboratoryjnych wg WHO.

Potwierdzenie gruźlicy u chorego	Wyniki badań
Pewna gruźlica u chorego	Wyhodowanie szczepu prątków gruźlicy lub Dodatni wynik badania bakterioskopowego i wykrycie DNA/ RNA prątków lub Stwierdzenie ziarniniek w badaniu histologicznym i wykrycie DNA/ RNA prątków
Prawdopodobna gruźlica u chorego	Dodatni wynik badania bakterioskopowego lub Wykrycie DNA/ RNA w materiale klinicznym lub Stwierdzenie ziarniniek w badaniu histologicznym i obecność prątków w barwionych wycinkach tkanek
Możliwa gruźlica u chorego	Objawy kliniczne odpowiadające gruźlicy i badania obrazowe sugerujące gruźlicę. Brak potwierdzeń laboratoryjnych.

6. Materiały od chorych do mikrobiologicznego diagnozowania gruźlicy. Transport i przechowywanie

Transport materiału do badań

Transport materiałów biologicznych podlega jednolitym w skali świata wymaganiom prawnym. „Transport próbek diagnostycznych (kwalifikowanych jako „towar niebezpieczny”) regulowany jest umową międzynarodową pt. „Umowa europejska dotycząca międzynarodowego przewozu drogowego towarów niebezpiecznych” (powszechnie znana jako umowa ADR) opublikowana w Dz. U. z 2005 r. Nr 178, poz. 1481. a aktualne zasady pakowania i oznakowania zawarte są w Shippers Program 2013 (WHO). Wymagania prawne dotyczące lotniczego transportu materiałów o charakterze „potencjalnie zakaźny” określone są w podpisanych przez Polskę międzynarodowych przepisach ICAO (Organizacja Międzynarodowego Lotnictwa Cywilnego) i IATA (Międzynarodowe Stowarzyszenie Przewoźników Powietrznych) w Instrukcjach pakowania (Packaging Instructions-PI) 602 i 650.

- Warunki i czas transportu materiałów pobranych do badania muszą być zgodne z zaleceniami laboratorium wykonującym test diagnostyczny.
- Materiał do badań laboratoryjnych jest transportowany i dostarczany do medycznego laboratorium przez upoważnione osoby. Materiał jest transportowany w zamkniętych próbkach, w zamkniętym opakowaniu zbiorczym, oznakowanym „materiał zakaźny” zgodnie z opisanymi poniżej zasadami.

Zalecenia dotyczące pakowania materiałów biologicznego

Ze względu na zakaźny charakter próbek materiału klinicznego obowiązują następujące zasady pakowania próbek: Pojemniki z materiałem do analizy powinny być zapakowane zgodnie z ogólną zasadą pakowania wymaganą dla czynników biologicznych wywołujących choroby ludzi. Obowiązuje zasada potrójnego opakowania:

- naczynie zasadnicze zawierające materiał kliniczny
- wtórne opakowanie wodoszczelne, odporne na uszkodzenia mechaniczne zabezpieczające opakowanie zasadnicze oraz w przypadku uszkodzenia opakowania zasadniczego uniemożliwiające skażenie środowiska; w przypadku materiałów płynnych pomiędzy opakowaniem zasadniczym a opakowaniem wtórnym powinien znajdować się materiał wchłaniający płyny w ilości wystarczającej do wchłonięcia całej próbki klinicznej
- opakowanie zewnętrzne, na którym powinna znajdować się informacja umożliwiająca szybki kontakt z klientem zlecającym badanie

W stosunku do poszczególnych opakowań obowiązują następujące zasady:

A. Materiał do analiz należy umieścić w pojemnikach, które powinny być:

- jednorazowe, z nietłukącego tworzywa sztucznego, odporne na zgniecenie;
- zamykane nakrętką z dodatkową uszczelką zapobiegającą wyciekowi materiału;
- otwierane i zamykane w nieskomplikowany sposób;

B. Opakowanie wtórne powinno być wykonane z odpornych na zgniecenie materiałów i hermetycznie zamknięte. Dopuszcza się możliwość umieszczenia w jednym opakowaniu wtórnym kilku naczyń zasadniczych z materiałem klinicznym pod warunkiem ich jednoznacznego oznakowania. Opakowanie wtórne musi mieć wymiary umożliwiające otwarcie go w boksie laminarnym (wymaganie BHP). Przed umieszczeniem w opakowaniu transportowym powierzchnia opakowania wtórnego powinna być wyjałowiona. Dokumentacja dołączona do próbek nie może być umieszczana w opakowaniu wtórnym.

C. Opakowanie transportowe w przypadku transportu materiałów w warunkach specjalnych (suchy lód, lód) powinno być odporne na dany czynnik. Musi być oznakowane i opisane w sposób identyfikujący klienta i umożliwiający nawiązanie z nim szybkiego kontaktu w przypadkach uszkodzenia próbek czy innych zdarzeń losowych.

Dokumentację dołączoną do badań należy umieścić oddzielnie w zamkniętych kopertach przytwierdzonych do opakowania zewnętrznego

Przyjmowanie materiału do badań

- Medyczne laboratorium opracowuje, wdraża i stosuje procedury przyjmowania, rejestrowania i oznakowania materiału do badań oraz udostępnia je zleceniodawcom, którzy potwierdzają pisemnie zapoznanie się z nim.
- Medyczne laboratorium sprawdza zgodność danych ze zlecenia z oznakowaniem materiału oraz przydatność materiału do badania.
- W przypadku stwierdzenia przez medyczne laboratorium niezgodności otrzymanego materiału z wymaganiami dotyczącymi pobierania, transportu lub innych nieprawidłowości powodujących, że materiał nie może być wykorzystany do badania, pracownik zgłasza ten fakt kierownikowi laboratorium lub osobie przez niego upoważnionej, którzy w razie potwierdzenia niezgodności mogą zakwalifikować materiał jako niezdatny do badania i odmówić wykonania badania.

Odmowę wykonania badania odnotowuje się w dokumentacji. Dalsze postępowanie medyczne laboratorium uzgadnia ze zleceniodawcą.

Medyczne laboratorium prowadzi dokumentację, dotyczącą przechowywanego materiału przed i po wykonaniu badania, z uwzględnieniem:

- miejsca,
- czasu,
- temperatury,
- danych osób odpowiedzialnych za przechowywanie materiału,
- metod badawczych.

Jakość materiału przesłanego do pracowni mikrobiologicznej podlega wstępnej ocenie przez przeszkolonego pracownika laboratorium przyjmującego materiał do badań.

Ogólne zasady dotyczące pobierania i przesyłania materiału do badania mikrobiologicznego:

1. należy dołożyć starań, aby pobrać materiał zawierający potencjalny czynnik chorobotwórczy bez drobnoustrojów kolonizujących i zanieczyszczeń.
2. objętość materiału powinna być możliwie duża. Szczególnie dotyczy to płynu z opłucnej, moczu, BAL-u.
3. pojemniki z materiałem powinny być czytelnie opisane i przesłane wraz z dokładnie wypełnionym skierowaniem (wzory w odpowiednim rozdziale)
4. laboratorium warto uprzedzić (np. telefonicznie) o przesyłaniu materiału nie-standardowego.
5. w razie wątpliwości co do sposobu pobrania lub przesyłania materiału należy zasięgnąć porady w pracowni mikrobiologicznej.

Rekomendacja 12

Wszystkie próbki materiału należy zawsze traktować jak zakaźne i postępować zgodnie z odpowiednimi przepisami dotyczącymi pobierania, przechowywania i przesyłania materiału zakaźnego. Próbkę materiałów diagnostycznych w laboratorium mikrobiologicznym przed przekazaniem ich do odpadów gospodarczych powinny podlegać autoklawowaniu.

Największe szanse wykrycia prątków istnieją, gdy materiał diagnostyczny jest pobrany z ogniska chorobowego, lub jego najbliższych okolic. Czasami, przy podejrzeniu gruźlicy układu oddechowego, gdy istnieją trudności w odkrztuszaniu płwociny, choremu zaleca się pobranie do diagnostyki innego materiału np. moczu. Taka praktyka jest nieracjonalna i nie powinna być stosowana.

Ponieważ około 85% przypadków gruźlicy dotyczy układu oddechowego, głównym materiałem od chorych jest płwocina. Należy pamiętać, że w płwocinie jednego dnia mogą być obecne prątki, innego natomiast nie. W przypadku trudności w odkrztuszaniu płwociny lub np. w skąpych objętościach można choremu zalecić zbieranie płwociny do odpowiedniego naczynia w ciągu doby lub przez 2-3 dni. Zbierany materiał powinien być przechowywany w lodówce w celu zahamowania wzrostu bakterii szybkożyjących. Jeżeli wykonuje się bronchosko-

pię i pobiera wydzielinę, popłuczyny lub BAL, po zabiegu dobrze jest zalecić choremu przez kolejne 2-3 dni oddanie również płwociny.

Dla prawidłowej diagnostyki chorego diagnozowanego po raz pierwszy, należy zawsze wysyłać do laboratorium 3 płwociny. Płwociny nie powinny być łączone. Należy je wysyłać do laboratorium jako oddzielne badania. W przypadku sprawdzenia efektywności leczenia (odprątkowanie po skończonym leczeniu) wystarczy przesłać do badania 2 płwociny.

Jeżeli chory ma trudności w odkrztuszaniu, czasami wykonuje się indukcję płwociny. Płwocina indukowana może wyglądać jak ślina i aby nie zdyskwalifikować takiego materiału, należy opisać go „płwocina indukowana”.

Osoby badane powinny otrzymać od personelu medycznego jasne, pisemne instrukcje dotyczące prawidłowego pobierania i przechowywania zbieranego w domu materiału.

Rekomendacja 13.

Materiał do diagnostyki mikrobiologicznej gruźlicy powinien być prawidłowo pobrany i szybko dostarczony do laboratorium. W każdym przypadku konieczności przechowywania materiału zaleca się temp. 4°C. Czas przechowywania płwociny nie powinien przekroczyć 3 dni.

Tabela 4. Warunki pobierania próbek do badania bakteriologicznego w kierunku prątków.

Miejsce i warunki pobrania próbek klinicznych	Przychodnia, szpital, dom itp. Chory powinien być dokładnie poinformowany o sposobie pobrania i materiału do badań i zakaźności prątków gruźlicy. Należy poinformować chorego o konieczności przepłukania jamy ustnej wodą mineralną co zapobiega kontaminacji płwociny prątkami środowiskowymi z wody wodociągowej. Płwocina musi być pobierana rano na czczo.
Liczba próbek	3 płwociny pobrane w różnych dniach Minimum 5 próbek moczu. Materiały zabiegowe zwykle pojedyncze. W przypadkach trudnych diagnostycznie, (o ile to możliwe), należy przysłać do diagnostyki więcej próbek.
Objętość próbek	Płwocina 3-5 ml Mocz 200-300 ml. Po porannej toalecie należy zebrać cały mocz oddany w czasie mikcji. W celu zagęszczenia moczu w pęcherzu, w dniu poprzedzającym badanie zaleca się nie przyjmowanie płynów od godz. 19. Ponieważ na rynku nie ma naczyń o odpowiednich pojemnościach, do zbiórki należy użyć jałowe naczynie przygotowane w domu (np. wygotowany słoik twist 300 ml.) Płyn opłucnowy, osierdziowy, mózgowo-rdzeniowy i BAL w całej uzyskanej objętości. Inne materiały zależnie od możliwości. Wymazy (np. krtaniowe, z oka pobrane w gabinecie okulistycznym, z ropni i inne) pobiera się na pożywki transportowe.

Zaleca się wykonanie rozmazu i hodowli z trzech kolejnych plwocin pobranych od chorego. Ślina, wydzielina z nosa i wymaz z gardła nie nadają się do diagnostyki gruźlicy. W wyjątkowych przypadkach, gdy nie ma kontaktu z chorym można pobrać wymaz krtaniowy lub popłuczyny żołądkowe. W gruźlicy pozapłucnej materiał do badań bakteriologicznych powinien być pobierany w możliwie jak największych objętościach. Aseptycznie pobrane wycinki powinny być umieszczone w sterylnych pojemnikach bez konserwantów i utrwalczy a następnie szybko dostarczone do laboratorium.

Nie wolno zanurzać wycinków w formalinie.

W przypadku długotrwałego transportu należy zapobiegać wysuszeniu materiału przez dodanie sterylnej soli fizjologicznej. Transport powinien odbywać się w temperaturze od 4°C do 15°C.

Rekomendacja 14.

Popłuczyny żołądkowe z powodu niskiego pH muszą być dostarczone do laboratorium w ciągu 1-2 godz. od pobrania.

Jeżeli czas dostarczenia popłuczyn żołądkowych wynosi >4 godz. Należy po pobraniu natychmiast je zneutralizować (niskie pH), dodając jałową solą fizjologiczną *ana partes*, ponieważ kwaśne środowisko uszkadza lub zabija komórki prątków.

Nie należy wykonywać rozmazu barwionego Z-N z próbek moczu, gdyż często wykrywane są prątki saprofityczne kolonizujące układu moczowo-płciowy.

Rekomendacja 15.

Wybór materiałów klinicznych wysyłanych do badania bakteriologicznego należy uzależnić od lokalizacji zmian, gruźlica płuc i pozapłucna. Przy podejrzeniu gruźlicy pozapłucnej należy również zbadać plwocinę.

Rekomendacja 16.

Przy diagnozowaniu gruźlicy pozapłucnej u dorosłych i dzieci należy stosować metody molekularne i hodowle na pożywkach stałych i płynnych.

Materiały do potwierdzania gruźlicy pozapłucnej należy diagnozować w laboratoriach o najwyższym stopniu referencyjności, które wykonują: bakterioskopię, posiew na pożywkach stałych i płynnych i badania genetyczne. W razie potrzeby konsultacji lekarza w sprawie wyboru materiału do diagnostyki zaleca się kontakt z kierownikiem laboratorium.

Tabela 5. Materiały do mikrobiologicznej diagnostyki gruźlicy

Lokalizacja zmian	Materiał do diagnostyki mikrobiologicznej
Układ oddechowy	Plwocina, wydzielina i popłuczyny oskrzelowe lub żołądkowe, płyn z BAL, wycinki z płuc, wymazy krtaniowe
Oplucna	Płyn z opłucnej, wycinki
Układ moczowo-płciowy	Mocz, nasienie, krew miesięczkowa, wyskrobiny z macicy, wycinki
Węzły chłonne	Wycinki, punk taty
Ośrodkowy układ nerwowy	Płyn mózgowo-rdzeniowy
Kości i stawy	Szypik kostny, płyn stawowy, ropne wydzieliny z przetok, wycinki
Układ krążenia	płyn osierdziowy, wycinki
Skóry	Wycinki, ropa
Jelita	Wycinki*
Narządu wzroku	Wydzielina ropna, wymazy

*kał nie jest odpowiednim materiałem do badania bakteriologicznego w kierunku gruźlicy

Plwocina może być zbierana najdłużej przez 3 dni i przechowywana w lodówce.

Nie wolno umieszczać w cieplarni żadnego materiału przeznaczonego do badań bakteriologicznych w kierunku gruźlicy.

Naczynia do pobierania materiałów do diagnostyki.

- Próbkę materiałów klinicznych powinny być pobierane do czystych, jałowych naczyń (butelek), wolnych od parafiny oraz innych związków tłuszczowych. Takie przypadkowe zanieczyszczenie może następnie znaleźć się w rozmazie jako artefakt lub wejść w reakcję z innymi gatunkami bakterii, mylnie nadając im „cechę kwasooporności”.

- Naczynia powinny być przeźroczyste, aby można było sprawdzić, czy zawierają materiał w odpowiedniej objętości i jakości. Czasami zdarza się, że do laboratorium przesyłane są pomyłkowo puste probówki opisane nazwiskiem chorego. Jeżeli zostanie to przeoczone w laboratorium, chory może otrzymać fałszywie ujemny wynik.
- Należy dostarczyć chorym probówki, typu *Falcon* które w kolejnych etapach pracy mogą być wstawiane bezpośrednio do wirówki.
- Posiadają one wymaganą objętość – 50 ml, mają skośne dno i pasują do wielu rodzajów wirówek. Probówki są dobrze zamykane i zakręcane wieczkiem plastikowym, co redukuje ryzyko wylania się zawartości podczas transportu. Probówki *Falcon* są do jednorazowego użytku.



Rycina 4. Probówka Falcon

7. Wykrywanie krzyżowych kontaminacji przed- i laboratoryjnych

Wyniki badań laboratoryjnych należy zawsze interpretować z uwzględnieniem stanu klinicznego pacjenta i wyników innych badań. Niekiedy stwierdza się fałszywie dodatnie wyniki badań bakteriologicznych, które wynikają z błędów przed- i laboratoryjnych:

- krzyżowej kontaminacji, która może zdarzyć się na oddziałach i w laboratoriach
- błędnie opisanej próbki materiału pobranego od chorego

Rekomendacja 17.

Jeżeli dodatni wynik bakteriologiczny nie jest zgodny z objawami klinicznymi i wynikami innych badań, należy rozważyć możliwość wystąpienia krzyżowej kontaminacji i wdrożyć molekularne dochodzenie epidemiologiczne. Laboratoria powinny opracować własny system nadzoru w celu szybkiego wykrywania wyników fałszywie dodatnich z próbek od pacjentów, którzy nie mają klinicznych objawów gruźlicy.

Krzyżowe zakażenia należy podejrzewać jeżeli:

1. Wynik mikrobiologiczny nie odpowiada stanowi klinicznemu chorego.
2. Wyhoduje się w laboratorium prątki gruźlicy z materiałów posianych:
 - tego samego dnia,
 - pobranych od chorych z tego samego oddziału,
 - leczonych na tym samym piętrze lub w tym samym szpitalu,
 - jeżeli hodowle prątków gruźlicy z jednego oddziału (np. chorzy po przeszczepach, dializowani, leczeni przeciwnowotworowo i z innymi rodzajami immunosupresji) są w znacząco większej liczbie niż spotykane do tej pory.
3. Szczególną uwagę należy zwrócić na zabiegi endoskopowe. Szczepy prątków gruźlicy wyhodowane z materiałów od chorych po zabiegach wykonywanych w tym samym lub zbliżonym czasie powinny być sprawdzone metodami molekularnymi dla wykluczenia krzyżowej kontaminacji.
4. Informacja o podejrzewanej kontaminacji jest obowiązkiem kierownika laboratorium prątka. Musi on informować o wyżej wymienionych zagrożeniach ordynatora oddziału i komitet zakażeń szpitalnych.

Rekomendacja 18.

Przy poszukiwaniu źródła zakażenia – u osób z kontaktu (członków rodzin, znajomych, w szkołach, żłobkach, przedszkolach, domach opieki społecznej u więźniów, itp.), po wyhodowaniu szczepu należy przeprowadzić molekularne dochodzenie epidemiologiczne w Krajowym Referencyjnym Laboratorium Prątka.

8. Dokumentacja badania. Kwalifikacje personelu

Laboratorium opracowuje, wdraża i stosuje procedurę zlecania badania laboratoryjnego oraz udostępnia ją zleceniodawcom, którzy potwierdzają zapoznanie się z tą procedurą. Wszyscy zleceniodawcy zlecają wykonanie badań przez laboratorium zgodnie z tą procedurą.

Procedura zlecenia określa w szczególności formularz zlecenia badania laboratoryjnego.

Formularz zlecenia badania laboratoryjnego zawiera w szczególności pola:

- 1) dane pacjenta:
 - a) imię i nazwisko,
 - b) data urodzenia,
 - c) miejsce zamieszkania/oddział szpitalny,
 - d) płeć,
 - e) numer PESEL, a w przypadku osoby nieposiadającej numeru PESEL – nazwa i numer dokumentu potwierdzającego tożsamość,
 - f) numer identyfikacyjny pacjenta (podawany przy braku innych danych);
- 2) pieczęć i podpis lekarza zlecającego badanie lub imię i nazwisko oraz nazwa i numer dokumentu potwierdzającego tożsamość innej osoby upoważnionej do zlecenia badania;
- 3) dane jednostki zlecającej badanie;
- 4) miejsce przesłania sprawozdania z badania lub dane osoby upoważnionej do odbioru wyniku lub sprawozdania z badania;
- 5) rodzaj materiału i jego pochodzenie;
- 6) zlecone badanie;
- 7) data i godzina pobrania materiału do badania;
- 8) dane osoby pobierającej materiał do badania;
- 9) data i godzina przyjęcia materiału do medycznego laboratorium diagnostycznego;
- 10) istotne kliniczne dane pacjenta, w szczególności: rozpoznanie, występujące czynniki ryzyka zakażenia, w tym wcześniejsza antybiotykoterapia, wcześniejsza hospitalizacja, choroby towarzyszące, zabiegi chirurgiczne.

Zlecenie może być wystawione w formie elektronicznej, z zachowaniem ww. wymagań. Na jednym formularzu może być zlecone więcej niż jedno badanie.

Dokumentacja medyczna w laboratorium, w tym zlecenie badań laboratoryjnych, jest prowadzona, przechowywana i przetwarzana zgodnie z przepisami dotyczącymi dokumentacji medycznej

Kwalifikacje personelu wykonującego badania

Badania wykonuje tylko personel, który przeszedł udokumentowane szkolenie z danej dziedziny diagnostycznej.

Za nadzór i autoryzację wyników odpowiada diagnosta laboratoryjny posiadający odpowiednią specjalizację (mikrobiologia, mikrobiologia medyczna) lub lekarz, posiadający wiedzę i umiejętności w zakresie wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej uzyskanych w ramach specjalizacji zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia i posiadają udokumentowane co najmniej dwuletnie doświadczenie w diagnostyce laboratoryjnej gruźlicy.

Formułowanie i wydawanie wyników

Rekomendacja 19.

Zaleca się aby wynik był autoryzowany przez diagnostę laboratoryjnego posiadającego tytuł specjalisty (mikrobiologia, mikrobiologia medyczna) lub lekarza posiadającego wiedzę i umiejętności w zakresie wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej uzyskanych w ramach specjalizacji.

Specjalizacje lekarzy muszą być zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 11.12.2012 roku w sprawie wykazu specjalizacji uprawniających lekarza do samodzielnego wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej w medycznym laboratorium diagnostycznym [Dz.U. 2012 poz. 1420] i co najmniej dwuletnie doświadczenie w diagnostyce laboratoryjnej gruźlicy.

Formularz sprawozdania z badania laboratoryjnego może być przekazany w formie elektronicznej z zachowaniem wymagań wskazanych w rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 23.03.2006 roku w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych. [Dz.U. nr 61 poz. 435 z późn. zm.]

Medyczne laboratorium diagnostyczne archiwizuje wyniki przez okres 20 lat zgodnie z przepisami dotyczącymi dokumentacji medycznej – ustawa z dnia 6.11.2008 roku o prawach pacjenta i Rzeczniku Praw Pacjenta. [tj. Dz.U. z 2012 r., poz. 159]

W formularz sprawozdania podana jest metoda diagnostyczna wykonanego badania oraz nazwa producenta testu diagnostycznego.

Zaleca się by formularz sprawozdania z badania laboratoryjnego dla dodatkich badań mikrobiologicznych w kierunku gruźlicy z medycznych laboratoriów diagnostycznych był wydany na kolorowym papierze. Umieszczenie wyniku na kolorowym papierze ma na celu zwrócenie szczególnej uwagi na pozytywny wynik pracownikom laboratorium a przede wszystkim klinicystom.

Zgłaszanie wyników inspekcji sanitarnej

Zakażenie potwierdzone uzyskaniem dodatniego wyniku w kierunku gruźlicy kierownik medycznego laboratorium diagnostycznego ma obowiązek zgłosić

Formularz można pobrać na stronie internetowej
www.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/druki/zgloszenia/Form_ZLB2.doc

Ryc. 5. Formularz zgłoszenia dodatniego wyniku.

Materiał do diagnostyki gruźlicy musi być dostarczony do laboratorium w odpowiednich naczyniach wraz ze skierowaniem. Poniżej załączony druk przedstawia schemat zlecenia lekarskiego do laboratorium prątków (ryc. 6.).

pieczęć zleceniodawcy, nr telefonu

ZLECENIE NA BADANIE W KIERUNKU GRUŻLICY

..... -- -- ---- Płeć: K/M
Nazwisko i imię Data urodzenia

Adres zamieszkania (kod, miejscowość, ul., nr domu, gmina, województwo)

PESEL -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- narodowość..... nr kartoteki.....

Istotne dane kliniczne.....
Objawy kliniczne, choroby towarzyszące, stosowane antybiotyki, gruźlica w wywiadzie, stan odporności, itp.

.....

METODA BADANIA *

☐ Badanie mikrobiologiczne w kierunku gruźlicy

☐ Wykrywanie materiału genetycznego *M. tuberculosis*

☐ Wykrywanie utajonego zakażenia prątkami gruźlicy

.....

CEL BADANIA *

☐ potwierdzenie gruźlicy

☐ wykluczenie gruźlicy

☐ kontrola podczas leczenia

☐ potwierdzenie/wykluczenie zakażenia

TRYB BADANIA*

☐ Cito ☐ Zwykły

Sposób pobrania i transportu materiału jest mi znany.

Rodzaj materiału	Data i godzina pobrania materiału	Dane osoby pobierającej materiał	Wypełnia laboratorium			
			Data i godzina przyjęcia materiału	Uwagi	Numer i kod badania	Podpis

- w przypadku niezaznaczenia metody badania , wyboru dokona diagnosta w oparciu o dane kliniczne i rodzaj materiału
- w przypadku niezaznaczenia trybu badania zostanie ono wykonane trybem zwykłym
- z wszystkich próbek będzie wykonane badanie bakterioskopowe AFB (wyjątek: mocz, krew)
- w przypadku dodatniej bakterioskopii AFB zostanie wykonane badanie genetyczne w kierunku DNA MTBC
- w przypadku dodatniej hodowli zostanie wykonana identyfikacja gatunkowa i lekowrażliwość

Dane osoby upoważnionej do odbioru wyników.....
Jeżeli nie mają być dostarczone do Zleceniodawcy

Data..... Pieczęć i podpis lekarza zlecającego

Ryc. 6. Formularz skierowania na badanie w kierunku gruźlicy.

9. Zapobieganie transmisji gruźlicy w placówkach opieki medycznej

Gruźlica jako zakażenie szpitalne dotyczy zarówno chorych, jak i personelu medycznego i może być transmitowana z jednych na drugich. Literatura światowa ocenia ryzyko zakażenia się prątkami i zachorowania na gruźlicę u personelu medycznego na 5-100 razy wyższe u personelu zatrudnionego w placówkach pulmonologicznych niż w populacji ogólnej danego kraju. Ryzyko zachorowania na gruźlicę wśród personelu zwiększa się wraz z liczbą przyjmowanych do placówki medycznej chorych prątkujących. Im wyższe są wskaźniki zapadalności w populacji ogólnej danego kraju, tym większe jest ryzyko narażenia na gruźlicę personelu medycznego.

Źródła zakażenia

Źródłem zakażenia prątkiem gruźlicy mogą być wydzieliny lub wydaliny chorych. Wśród dróg zakażenia wyróżnia się: wziewną, pokarmową, płciową, postać wrodzoną i bezpośrednie przeniesienie prątków. W warunkach szpitalnych najczęściej do zakażenia prątkiem gruźlicy dochodzi drogą kropelkową, gdy chorzy kaszlą, kichają lub rozmawiają. Brak odpowiedniej wentylacji w pomieszczeniach użytkowych, złe warunki higieniczne i nieodpowiednie nawyki chorych mogą znacząco zwiększyć transmisję bakterii. Bezpośrednie przeniesienie prątka gruźlicy może być spowodowane zakłuciem igłą lub przez skaleczenie zakażonymi narzędziami medycznymi podczas operacji lub pracy w prosektorium oraz w czasie leczenia stomatologicznego, szczególnie przy użyciu maszyn szybkoobrotowych. Zagrożenie stwarza również niewłaściwa utylizacja odpadów szpitalnych i laboratoryjnych.

Instrumenty medyczne. Endoskopy

Duże znaczenie w transmisji zakażenia prątkami gruźlicy mają endoskopy, w szczególności bronchoskopy, które stanowią podstawowe narzędzie w diagnostyce chorób płuc. Zasiedlaniu endoskopów sprzyja tworzenie się biofilmów, na których przeżywają prątki gruźlicy i MOTT.

Żywotność prątków gruźlicy

Prątki gruźlicy należą do bakterii zachowujących żywotność przez długi czas (kilkadziesiąt lat), nawet w bardzo niekorzystnych warunkach. Żywe prątki były stwierdzane na maskach anestezjologicznych, w wodzie wodociągowej, w lodzie sporządzonym do operacji kardiochirurgicznych w hipotermii, w odczynnikach chemicznych, w środkach dezynfekcyjnych, w płynach dializacyjnych, w odpadach medycznych, na kartkach książek i czasopiśmie używanych przez chorych, na cząstkach kurzu pobranego z sal chorych, w resztkach pokarmów pozostawionych na talerzach chorych.

Strefy największego zagrożenia transmisją prątków gruźlicy

Do stref największego zagrożenia wewnątrzszpitalnej transmisji *M. tuberculosis* należą sale chorych prątkujących, szczególnie zakażonych prątkami wielolekoopornymi, boksy lub pokoje do pobierania wykrztuszonej lub indukowanej płwociny, pokoje badań spirometrycznych, sale bronchoskopowe, sale operacyjne, oddziały intensywnej terapii, sale autopsyjne, szpitalne oddziały ratunkowe i izby przyjęć, w których istnieje potencjalna możliwość kontaktu z chorymi na gruźlicę.

Chory z nierozpoznaną gruźlicą.

Bardzo niebezpiecznym ogniwem transmisji zakażenia może być niezidentyfikowane źródło zakażenia, czyli chory, u którego nie podejrzewa się gruźlicy. Ponieważ wiele form gruźlicy, szczególnie w początkowym stadium, charakteryzuje się lekkim przebiegiem, na różnych oddziałach mogą przebywać chorzy, u których nie rozpoznano lub nawet nie podejrzewa się gruźlicy. Personel nie stosuje wówczas izolacji ani odpowiednich metod ochrony osobistej. Amerykańskie badania oceniają, że chorzy z nierozpoznaną gruźlicą stanowią 0,03-0,3% hospitalizowanych osób. W Polsce także opisano to zjawisko.

Rekomendacja 20.

Chorzy z podejrzeniem gruźlicy, przebywający w szpitalu powinni być jak najszybciej skierowani do badań diagnostycznych w laboratorium prątka. Do czasu zakończenia badań i otrzymania wyników potwierdzających lub wykluczających gruźlicę chorzy powinni podlegać izolacji.

Rekomendacja 21.

Chorzy z rozpoznaną gruźlicą powinni być izolowani do czasu odprątkowania potwierdzonego metodami mikrobiologicznymi.

Oddziały pediatryczne

Problem transmisji gruźlicy w oddziałach pediatrycznych nie jest dobrze poznany, ale na tych oddziałach proponuje się stosowanie takich samych zasad bezpieczeństwa jakie są rekomendowane dla dorosłych.

Warunki izolowania chorych na gruźlicę.

Chorzy prątkujący nie powinni opuszczać oddziału bez powodu, a gdy konieczne są badania diagnostyczne wykonywane na innych oddziałach, chorzy powinni zakładać na usta i nos maski z filtrami HEPA. Takie same zachowania dotyczą chorych podczas odwiedzin rodzin. W celu ograniczenia wychodzenia poza teren, drzwi powinny być zamknięte, a oddziały chorych powinny być wyposażone w niezbędne książki, gazety, naczynia, telefony itp. Odprątkowanie chorego



powinno być potwierdzone metodami mikrobiologicznymi – ujemną bakterioskopią i ujemnymi hodowlami.

Rekomendacja 22.

W celu uniknięcia szerzenia się zakażenia prątkiem gruźlicy zaleca się odpowiednią wentylację pomieszczeń, w których przebywa chory prątkujący oraz przestrzeganie przez chorych zaleceń sanitarnych, a w szczególności zasłanianie ust przy kaszlu lub kichaniu i odprowadzanie płwociny do szczelnie zamykanych pojemników.

Izolatki dla chorych prątkujących powinny być wyposażone w służę łączącą korytarz z pokojem chorych. W służbie powinny znajdować się czyste fartuchy i rękawice dla personelu medycznego oraz lampy UV. Sale chorych powinny posiadać własne umywalki i WC. Dla zredukowania cząstek zakaźnych konieczna jest odpowiednia wymiana powietrza, minimum 6 wymian na godzinę. Jeżeli chory opuszcza szpital, jego łóżko powinno być prześcielone po uprzednim, 2 godz. naświetlaniu pościeli lampą UV.

Rekomendacja 23.

Efektywność procesu sterylizacji endoskopów powinna być regularnie kontrolowana przez pracownie mikrobiologiczne.

Na oddziałach, na których przebywają chorzy prątkujący podłogi muszą być czyszczone na mokro z użyciem środków dezynfekcyjnych działających przeciwprątkowo.

Poniżej podajemy kilka przykładów środków dezynfekcyjnych o działaniu prątkobójczym.

Tiutol – mycie i dezynfekcja szkła, zakres działania B, V, F, prątki, czas – 60 minut

Mikrozid AF – szybka dezynfekcja małych powierzchni np. blaty, zakres działania B, F, V, WZW, HIV, rota wirusy, prątki, czas działania – 1 minuta

Pera Vir N – szybka dezynfekcja po rozlaniu materiału biologicznego, zakres działania B, F, V, prątki, spory, czas działania 10 minut

Savo Prim – powierzchnie sanitarne (toalety, deski sedesowe, zlewy), zakres działania, B, F, V, prątki, czas działania – 15 minut

Medicarina – dezynfekcja w przypadku awarii urządzeń – zakres działania, B, F, V, prątki, czas działania – 15 minut

Taski Sprint Degerm – mycie podłóg, zakres działania, B, F, prątki, wirusy osłonkowe, HIV, HBV, HCV, czas działania – 15 minut

Do sprzątania nie należy stosować odkurzaczy, ustawiać wentylatorów chłodzących lub ogrzewających pomieszczenia. Należy ograniczyć przyjmowanie leków w aerozolach. Wszystkie te działania mają na celu zapobieganie przenoszenia się zakaźnych aerozoli. Sale chorych powinny być często wietrzone oraz naświetlane lampami UV. Chory powinien opuścić salę na około 2 godz. – może wtedy przebywać na korytarzu – w tym czasie należy wyjaławić pokój przy pomocy przenośnych lamp UV. W podobny sposób należy myć i dezynfekować pokoje diagnostyczne: badań spirometrycznych, sale bronchoskopowe i wszystkie inne wymienione na wstępie rozdziału. Szczególnej uwagi wymagają narzędzia medyczne, które mogą być zakażone wydzielinami i wydalينami chorych. Należy je myć i dezynfekować środkami prątkobójczymi. Resztki pozostające po posiłkach chorych prątkujących powinny być traktowane jako zakaźne.

Należy pamiętać o tworzeniu się biofilmów wewnątrz kanałów bronchoskopowych i przeżywaniu na nich prątków gruźlicy i MOTT. Na podobne niebezpieczeństwa narażone są gastroscopy i kolonoscopy, które mogą być zasiedlane przez prątki pochodzące z połykanej płwociny. W celu zapobieżenia kontaminacji endoskopów należy zredukować do minimum ich kontakt z wodą wodociągową i dotrzymywać warunków (czasu i stężenia środków) dezynfekcji podanych przez producenta. Rekomenduje się regularną, mikrobiologiczną kontrolę procesów dezynfekcji endoskopów.

W niektórych szpitalach w Polsce nie ma możliwości stworzenia izolatek dla tego typu chorych. Proponuje się wtedy ich kohortowanie, czyli oddzielenie od innych chorych. Ten sposób prewencji jest wprawdzie mniej kosztowny, ale i dużo mniej efektywny w redukcji zakażeń szpitalnych.

W pracy laboratoryjnej do stref najwyższego zagrożenia zakażeniem prątkami gruźlicy należą: mikrobiologiczne laboratoria prątka, inne laboratoria, które przyjmują próbki kliniczne od chorych podejrzanych lub chorych na gruźlicę.

Literatura światowa podaje, że ryzyko zakażenia w laboratoriach jest jednym z najwyższych i o 10-100 razy przewyższa ryzyko w ogólnej populacji. Głównym źródłem zakażenia personelu w laboratoriach bakteriologicznych jest aerozol wytwarzany w czasie pracy z materiałami biologicznymi pochodzącymi od chorych lub z pracy ze szczepami prątków.

Rekomendacja 24.

Punkt pobierania plwociny do badania mikrobiologicznego musi być specjalnie wydzielony i wyposażony w lampę ultrafioletową, ściany powinny być szklane, a po wyjściu chorego należy boks zdezynfekować i poddać promieniowaniu UV.

Wszelkie czynności z materiałem biologicznym w laboratorium prątka powinny być wykonywane w komorze laminarnej z wysokowydajnymi drobnocząsteczkowymi filtrami (HEPA). W laboratoriach prątka należy stosować jedynie wirówki z odpowiednimi pokrywami zabezpieczającymi i nietłukące się próbówki.

Zgodnie z ustawą o chorobach zakaźnych prątki gruźlicy, jako bakterie przenoszone drogą kropelkową, wymagają w pracy zastosowania trzeciego poziomu bezpieczeństwa biologicznego, który jest możliwy dzięki zainstalowaniu komór laminarnych. Każde laboratorium, w którym hodzi się szczepy prątków gruźlicy musi być wyposażone w komorę laminarną z wysokowydajnymi filtrami drobnocząsteczkowymi (HEPA). Jeśli w laboratorium poza posiewami wykonywane są testy lekooporności, konieczne jest posiadanie, co najmniej 2 komór laminarnych.

Rekomendacja 25.

Wejścia do laboratorium prątka należy ograniczyć tylko do osób w nim zatrudnionych, o czym powinna informować odpowiednia tablica. Do laboratorium prątka pracownicy muszą przechodzić przez służbę z przestrzeganiem wymogów sanitarnych, takich jak zmiana obuwia i ubrania wierzchniego. Okna muszą być szczelnie zamknięte i zapewniona odpowiednia wentylacja od strefy czystej do zanieczyszczonej.

Żaden materiał zakaźny nie może opuszczać laboratorium z wyjątkiem przeznaczonego do transportu do innego laboratorium. **Transportowany materiał należy odpowiednio zapakować i oznakować.**

Rekomendacja 26.

Personel laboratorium prątko musi być zabezpieczony przy pracy w fartuchu ochronne założone na płócienny strój, powinien ponadto stosować rękawiczki jednorazowego użytku i maskę z filtrami HEPA.

Zaleca się stosowanie maski twarzowej wyposażonej w filtry HEPA, które mają zdolność zatrzymywania drobnych cząstek bakteryjnych, a ich kształt sprawia, że ściśle przylegają do twarzy, obejmując usta i nos. Maseczki chirurgiczne papierowe lub bawełniane nie zabezpieczają przed проникnięciem wilgotnych małych cząstek materiału biologicznego i nie chronią przed zakażeniem gruźlicą.



Rycina 8. Maseczka z filtrem HEPA

Rekomendacja 27.

Do dezynfekcji w zakładach opieki zdrowotnej diagnozujących i leczących chorych na gruźlicę należy stosować czynniki fizyczne, takie jak metody termiczne, promieniowanie ultrafioletowe i wymianę powietrza oraz środki chemiczne o potwierdzonym działaniu przeciwprątkowym.

Do dezynfekcji stosuje się metody fizyczne i chemiczne. Fizyczne sposoby dezynfekcji to: metody termiczne, promieniowanie UV i wymiana powietrza. Metoda termiczna należy do najlepszych sposobów dezynfekcji. Należy ją prowadzić w odpowiednich urządzeniach, w których monitoruje się temperaturę, czas, ciśnienie pary wodnej itp.

Rekomendacja 28.

Wszystkie materiały potencjalnie zakaźne muszą być poddawane procesowi autoklawowania i dopiero potem mogą być przekazywane do spalania lub uznane za odpady gospodarcze.

Prawidłowo prowadzona dezynfekcja z wykorzystaniem lamp UV może być tak wydajna w usuwaniu cząstek infekcyjnych, jak odpowiednia wymiana zakażonego powietrza poprzez systemy wentylacyjne. Promieniowanie UV niszczy 99% cząstek infekcyjnych przenoszących prątki gruźlicy. Skuteczność tej metody zależy jednak od temperatury otoczenia, wilgotności powietrza, intensywności promieniowania UV. Przy dużej wilgotności (>70%) efekt bakteriobójczych lamp UV znacząco się zmniejsza. Promieniowanie UV jest używane również w głównych traktach wentylacyjnych, ale ten sposób dezynfekcji jest mniej skuteczny niż lampy stosowane w salach chorych lub innych pomieszczeniach.

Zgodnie z rekomendacjami WHO i ECDC, w nowych budynkach konieczna jest wymiana powietrza sięgająca 20 wymian/godzinę, a w starych co najmniej 6 wymian/godzinę. Systemy wentylacyjne muszą być wyposażone w filtry HEPA, które zatrzymują bardzo drobne cząsteczki infekcyjne. W nowoczesnych placówkach systemy wentylacyjne połączone są z utrzymaniem ujemnego ciśnienia w wyznaczonych strefach, wewnątrz sal, budynków itp.

Metody chemiczne stosuje się do dezynfekcji narzędzi i sprzętów, które miały styczność z materiałami biologicznymi: krwią, płynami ustrojowymi, wydzielinami i wydaliniami, a także z przedmiotami z otoczenia chorego. Przy wyborze środka dezynfekcyjnego należy upewnić się czy niszczy on prątki gruźlicy. Nie wolno kierować się działaniem bakteriobójczym środka skierowanym na inne mikroorganizmy, gdyż wiele dostępnych w sprzedaży środków dezynfekcyjnych nie posiada aktywności przeciwprątkowej. Obecnie w Polsce stosuje się dwie metody oznaczania aktywności prątkobójczej: jakościową nośnikową i ilościową rozcieńczeniowo-zawiesinową wg normy europejskiej EN-PN 14348:2005.

Rekomendacja 29.

Pracodawca zobowiązany jest do zapewnienia wszystkim pracownikom bezpiecznej pracy wg 3-stopniowej hierarchii od nadzoru administracyjnego poprzez kontrolę środowiska i osobistą ochronę pracowników.

Nadzór administracyjny jest najważniejszym elementem strategii kontroli zakażeń szpitalnych. Powinien on zawierać zbiór zasad, według których należy postępować dla uniknięcia ekspozycji osób zdrowych na kontakty z chorymi na gruźlicę. W tym celu zaleca się: izolowanie chorych prątkujących, szybką identyfikację osób narażonych, wczesne diagnozowanie i leczenie osób podejrzanych o gruźlicę, edukację pracowników o ryzyku zakażenia i o metodach zabez-

pieczenia, prowadzenie badań przesiewowych u pracowników w celu wykrycia zakażenia lub zachorowania, monitorowanie liczby przyjmowanych chorych na gruźlicę z oddzielną ewidencją chorych na gruźlicę lekooporną.

Na podstawie oceny zagrożenia konieczne jest stworzenie planu nadzoru nad zakażeniami szpitalnymi powodowanymi *Mycobacterium tuberculosis* i uzyskanie merytorycznej oraz finansowej akceptacji dyirekcji jednostki. Projekt ten powinien zawierać: identyfikację stref ryzyka, ewidencję przypadków gruźlicy wśród personelu medycznego, ewidencję zakażeń HIV w populacji chorych, ocenę koniecznych szkoleń potrzebnych personelowi medycznemu, wyszczególnienie stref działania w jednostce medycznej wymagających rekomendacji, określenie czasu wykonania zadań oraz niezbędnych nakładów finansowych (tj. materiałów i kosztów osobowych).

Każdy pracownik powinien otrzymać odpowiednią instrukcję dotyczącą jego stanowiska pracy. Optymalnym rozwiązaniem jest szkolenie przed rozpoczęciem pracy lub wkrótce po jej rozpoczęciu i cyklicznie jego kontynuowanie. Wszyscy pracownicy powinni co najmniej raz w roku przechodzić szkolenie, które uwzględnia: podstawową wiedzę o patogenie gruźlicy i transmisji zakażenia prątkiem, omówienie objawów, które towarzyszą zachorowaniu na gruźlicę, uświadomienie zwiększonego ryzyka zachorowania na gruźlicę u osób zakażonych HIV lub z immunosupresją, podkreślenie osobistej odpowiedzialności każdego pracownika za ograniczenie transmisji prątków gruźlicy, wskazanie stanowisk najbardziej zagrożonych transmisją, omówienie zachowań i stylu wykonywania pracy w sposób zmniejszający możliwość transmisji.

Gruźlica jest chorobą zawodową i podlega rejestracji. Stwierdzenie choroby zawodowej jest decyzją administracyjną, która pozwala pracownikowi korzystać ze specjalnych świadczeń. Od decyzji może być złożone przez pracownika lub pracodawcę odwołanie do Wojewódzkiego Inspektora Sanitarnego. W spornych przypadkach można złożyć skargę do Naczelnego Sądu Administracyjnego.

10. Wybrane pozycje piśmiennictwa

1. Zalecenia Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc dotyczące rozpoznawania, leczenia i zapobiegania gruźlicy u dorosłych i dzieci *Pneumonol. Alergol.Pol.* 2013, 81, 4325-379. Praca zbiorowa.
2. Korzeniewska-Koseła M. Gruźlica i choroby układu oddechowego w Polsce w 2010 r. Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa 2011.
3. Zwolska Z. Diagnostyka mikrobiologiczna gruźlicy i mykobakterioz. W: Choroby wewnętrzne Szczeklika A. (red.) *Med. Prakt.* Kraków 2005: 507-509.
4. Zwolska Z. Identyfikacja głównych patogenów z rodzaju *Mycobacterium*. Postępy pulmonologii i alergologii. Milanowski J., Błędowski J., (red.) *Wojskowa Przychodnia Przeciwgruźlica*, Lublin 1996: 153-166.
5. Zwolska Z., Augustynowicz-Kopeć E.: Diagnostyka mikrobiologiczna chorób dróg oddechowych w: *Wielka Interna* (red.) A. Antczak wyd. Medical Tribune Polska, t.4, str. 16-22, 2010.
6. Zwolska Z. Współczesne problemy j diagnostyki mikrobiologicznej gruźlicy. *Med. Dypl.* 2005; 14(Supl.1.): 49-55.
7. Zwolska Z., Augustynowicz-Kopeć Z.: Diagnostyka gruźlicy i mykobakterioz w: *Choroby Wewnętrzne, Stan wiedzy na 2010*, red. A. Szczeklika (wyd) *Medycyna praktyczna* 2011.
8. Augustynowicz-Kopeć E., Zwolska Z.: Zastosowanie badań molekularnych w diagnostyce gruźlicy. W *Choroby wewnętrzne. Stan wiedzy na 2010*. Red, A. Szczeklika wyd. *Medycyna Praktyczna* Kraków 2010.
9. Drobniewski F.A., Hoffner S., Rusch-Gerdes S., Skenders G., Thomsen V. Recommended standards for modern tuberculosis laboratory services in Europe. *Eur. Respir. J.* 2006; 28: 903-909.
10. Migliori, GB, Zellweger JP., Abbubakar I.: European Union Standards for Tuberculosis. *Eur Respir J.* 2012, 39:807-919.
11. Fitzpatrick L., Braden C, Cronin W. I wsp.: : Investigation of laboratory cross-contamination of *Mycobacterium tuberculosis* cultures. *Clin Infect Dis* 2004, 38, 52-54.
12. Augustynowicz-Kopeć E., Jagielski T., Kozińska M., Kremer K., van Soolingen D., Bielecki J., Zwolska Z.: Transmission of tuberculosis within family-households. 2012, *Journal of Infection*, 64(6), 596-608.
13. Kozińska M., Augustynowicz-Kopeć E.: Genetic methods in molecular epidemiology of tuberculosis. *JP-CCR* 2012: 6(1);1-6.
14. Zwolska Z., Augustynowicz-Kopeć E. Wybrane zagadnienia z epidemiologii i diagnostyki mikrobiologicznej gruźlicy. *Reumatologia* 2013;51,6,:445-451.
15. Jasmer RM., Roemer M., Hamilton J. I wsp : A porospective, multicenter study of laboratory cross-contamination of *Mycobacterium* cultures. *Emerg Infect Dis* 2002, 8,11, 1260-1263.
16. Zwolska Z., Jezierska-Anczuków A.: Transmisja prątków kwasoopornych zagrożeniem dla ludzi chorych i zdrowych. *Nowa Medycyna* 1997;16: 25-29.
17. Zwolska Z.: Transmisja powietrzna prątków gruźlicy zagrożeniem dla pracowników diagnozujących i leczących gruźlicę. Sposoby zapobiegania. *Biuletyn Stowarzyszenia Higieny Lecznictwa* 2001; 4(17): 32-36.
18. Zwolska Z., Augustynowicz-Kopeć E., Domagała-Krzewniak A i wsp.: Ryzyko narażenia na gruźlicę jako chorobę zawodową u personelu medycznego *Zakażenia* 2001; (2): 17-22.
19. Pęcak Wł.: Rola badań mikrobiologicznych w kierunku badania prątków gruźlicy na poziomie leczenia podstawowego oraz oddziałów szpitala spoza pionu przeciwgruźliczego. *Pneum Alerg Polska* 1997, 65 (5-60): 403-412.
20. Zwolska Z. : Zasady bezpieczeństwa biologicznego w laboratoriach prątka gruźlicy. *Higiena w placówkach medycznych* (red). G.Dulny, E.Lejbrandt (wyd). Verlag Dashchofer, Warszawa 2003.
21. Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z.: Prątki jako czynniki zakażeń szpitalnych. Główne metody zapobiegania transmisji. *Twój magazyn Medyczny* 3/2003 – Chirurgia , 107-113.

22. Domagała-Krzewniak A.: Zachorowania zawodowe na gruźlicę wśród personelu medycznego w Polsce i ocena stosowanych metod zapobiegania. Praca doktorska, promotor: Z. Zwolska, Warszawa IGiCHP, 2005.
23. Zwolska Z.: Znaczenie dezynfekcji powietrza w zapobieganiu transmisji gruźlicy w placówkach medycznych. Zakażenia 5/2006, 92-97
24. Zwolska Z.: Zasady bezpiecznej pracy w placówkach diagnozujących i leczących gruźlicę. Zakażenia, 2/2001, 13-16
25. Zwolska Z. Zasady organizacji i bezpiecznej pracy w laboratorium prątki. W Higienas i bezpieczeństwo pracy w laboratorium red. Benczak K i Zborowska H. wyd. Verlag Dashofer, 2008.
26. Wacławik J., Gąsiorowski J. Inglot M. i wsp. : Epidemiology of occupational infectious diseases In health care workers. Med Pr. 2003; 54(6):535-541.
27. Szeszenia-Dąbrowska N., Wilczyńska U., Szymczak W i wsp.: Choroby zawodowe w Polsce. 2003 Med Pr 2004; 55(4), 299-306.
28. Dawidzik L.: Stopień ryzyka narażenia pracowników opieki zdrowotnej na zakażenia. Zakażenia 2001; 2: 3-6.
29. Centers for Disease Control and prevention. Guidelines for preventing the transmission of Mycobacterium tuberculosis in health-care facilities.1994, Morb Mortal Wky Rep 1994; 43(RR13): 1-132.
30. Heidal E., Dahle UR., Sandven P., i wsp. Risk factors for recent transmission of Mycobacterium tuberculosis. Eur Respir J 2003; 22: 637-642.
31. Harries AD, Maher D., Nunn P.,: Practical and affordable measures for the protection of health care workers from tuberculosis in low-income countries. Bull World health Org 1997; 75: 477-89.



Warszawa 2014