

# DETECTAREA DIRECTĂ A MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ÎN FORMELE PAUCIBACILARE DE TUBERCULOZĂ CU TEHNICA REAL TIME PCR

## *Direct detection of Mycobacterium Tuberculosis in paucibacillary forms of Real Time PCR tuberculosis*

Maria Zlatev Ionescu<sup>1</sup>, Maria Nica<sup>2</sup>, Olimpia Nicolaescu<sup>1</sup>, Mariana Filip<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Secția Pneumologie 2, Spitalul Clinic de Boli Infecțioase „Dr. V. Babeș“, București

<sup>2</sup>Laboratorul de Bacteriologie Clinică, Spitalul Clinic de Boli Infecțioase

„Dr. V. Babeș“, București

<sup>3</sup>Spitalul Clinic „Sf. Ioan“, București

### REZUMAT

Testul PCR se bazează pe amplificarea unei secvențe unice a genei katG prezentă la membrii complexului Mycobacterium tuberculosis: Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis, Mycobacterium africanum și Mycobacterium microti. Avantajul major este faptul că rezultatele pot parveni în ore și nu după 20-60 zile. În cazul în care suspiciunea clinică de TB este mare, examenul PCR este pozitiv la 80-90% din speciemenle respiratorii testate.

**Cuvinte cheie:** test PCR, genă katG

### ABSTRACT

PCR test is based on the amplification of a unique sequence of katG gene present in members of Mycobacterium tuberculosis complex: Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis, Mycobacterium africanum, and Mycobacterium microti. The major advantage is the fact that the results may come in a few hours and not after 20-60 days. When clinical suspicion of TB is clear, The PCR exam is positive in 80-90% of the respiratory tested specimens.

**Key words:** PCR test, katG gene

### INTRODUCERE

Diagnosticul de laborator al tuberculozei (TB) va trebui să răspundă în viitor numeroaselor schimbări apărute atât în tabloul clinic al infecțiilor micobacteriene, cât și apariției din ce în ce mai frecvente a unor tulpini rezistente la medicația anti-tuberculoasă majoră. În acest sens, s-a impus dezvoltarea unor metode rapide de identificare a micobacteriilor precum și a susceptibilității lor la antibiotice. Progresele realizate în domeniul biologiei moleculare au condus la apariția unor noi metode care ameliorează semnificativ performanțele

celor clasice și remediază în mare măsură handicapul tardivității rezultatului furnizat de metodele convenționale.

Valoarea clinică a unui diagnostic precoce constă în primul rând în inițierea rapidă a tratamentului și ameliorarea evoluției pacienților. Din punct de vedere epidemiologic conduce la reducerea perioadei de contagiozitate, ca urmare a izolării cât mai urgente a surselor. Permite deasemeni diferențierea *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) de micobacteriilenetuberculoase. Evită utilizarea fluoroquinolonelor ca monoterapie în pneumonii și riscul de selecție a tulpinilor de MTB rezistente la fluoro-

Adresa de corespondență:

Dr. Maria Zlatev Ionescu, Spitalul Clinic de Boli Infecțioase „Dr. V. Babeș“, Șos. Mihai Bravu, Nr. 281, Sector 3, București

quinolone. Aceste teste nu înlocuiesc însă testele existente, multe dintre ele fiind numai opțiuni de viitor aflate în diferite stadii de studiu și de aplicabilitate.

Testul PCR se bazează pe amplificarea unei secvențe unice a genei *katG* prezentă la membrii complexului *Mycobacterium tuberculosis*: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum* și *Mycobacterium microti*. Este posibilă astfel detectarea rapidă a ADN-ului complexului *Mycobacterium tuberculosis* în decurs de 24-48 ore de la sosirea probelor în laboratorul la care se face testarea. Testul este pozitiv în condițiile în care există eliminarea de ADN micobacterian din granuloamele cazeoase și diseminarea acestuia în secrețiile sau țesuturile corpului.

Metoda are o valoare predictivă pozitivă mai mare în cazurile cu frotiu pozitiv pentru bacili acido-alcool rezistenți (BAAR), peste 95% în situațiile în care există o incidență mare a micobacteriilor netuberculoase, precum și capacitatea de a confirma rapid prezența de MTB la 50-80% din speciunile respiratorii în care MTB este absent dar cultura este pozitivă. Avantajul major este însă faptul că rezultatele pot parveni în ore și nu după 20-60 zile. În cazul în care suspiciunea clinică de TB este mare, examenul PCR este pozitiv la 80-90% din speciunile respiratorii testate.

CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) recomandă efectuarea testului PCR în cel puțin o probă de secreție respiratorie la toți pacienții cu semne și simptome sugestive pentru o TB pulmonară (tuse persistentă >3 săptămâni fără o cauză evidentă, leziuni radiologice compatibile cu TB), la cei suspecți de TB dar fără diagnostic confirmat precum și în situațiile în care rezultatul testului ar putea modifica managementul cazului sau activitățile de supraveghere ale contactilor (1).

Reacția PCR se desfășoară în 3 etape:

1. denaturarea – separarea ADN în 2 catene;
2. hibridizarea primerilor – primerii se vor atașa complementar la capetele 3' ale celor 2 catene;
3. elongația – ADN polimeraza va extinde primerii atașați în lungul matricei țintă și va produce un *amplicon ADN*. Analizorul va repeta automat acest proces pentru un număr stabilit de cicluri (de obicei 30-35), la fiecare ciclu dublându-se cantitatea de amplicon (copia) ADN.

Amplificarea ADN are 3 faze:

1. exponențială – la fiecare ciclu se dublează cantitatea de amplicon ADN (se admite o eficiență de 100% a reacției);

2. lineară – pe măsură ce componentele reacției sunt consumate, se produce o încetinire a reacției iar produșii PCR încep să se degradeze;
3. platou (end-point) – reacția este stopată, nu se mai formează alți produși de amplificare, iar dacă faza se prelungește mult, produșii PCR vor suferi o degradare importantă.

Metodele PCR tradiționale (convenționale) se bazează pe detecția produșilor PCR în faza de platou a procesului (detecție end-point) în timp ce metodele actuale sunt metode de detecție în faza exponențială (detecție în timp real: *rt PCR*). Avantajele acestora din urmă constau într-o acuratețe mai mare a rezultatelor obținute iar limita inferioară de detecție este mult îmbunătățită (se pot detecta cantități mai mici ale ADN-ului țintă). PCR detectează în condiții ideale chiar 1-10 microorganisme în specimenul clinic. Amplificarea duce la o creștere a numărului de copii ADN sau ARN de la câteva zeci la câteva milioane în câteva ore, în 25 -30 de cicluri. Rezultatele se obțin în câteva ore, în loc de zile sau săptămâni.

Interpretarea trebuie să țină seama de posibilitatea existenței unor rezultate fals pozitive sau fals negative. Rezultatele fals pozitive sunt datorate contaminării prin prezența de specimene provenite de la testările anterioare. Pentru evitarea acestui fenomen este necesară o disciplină strictă la personalul de laborator, tehnică adecvată și utilizarea de PCR *in situ*. Rezultatele fals negative se datorează prezenței de inhibitori. Colectarea și prepararea adecvată a produsului, prezența de inhibitori pentru polimeraza Taq se impun pentru evitarea acestui tip de reacții. Testul Amplicor ROCHE DNA PCR este aprobat pentru determinarea de MTB în spută sau alte specimene respiratorii dacă bolnavii nu au primit tratament antituberculos timp de peste 7 zile sau în ultimele 12 luni (1).

În concluzie, raportul eficiență/avantajele metodei, care deși este foarte costisitoare, duce în final la reducerea costurilor pentru diagnosticul și tratamentul cazurilor de TB.

## PACIENȚI ȘI METODĂ

Am inclus într-un studiu prospectiv desfășurat între septembrie 2009 – februarie 2010 în Spitalul Clinic de Boli Infecțioase și Tropicale „Dr. V. Babeș” București – Secția Pneumoftiziologie II, un număr de 27 de bolnavi suspecți de TB respiratorie. Pentru 13 dintre bolnavii suspecți de TB parenchimotoasă testul PCR s-a efectuat din aspiratul bronșic obținut prin fibrobronhoscopie, în timp ce pentru ceilalți 14,

suspectați de TB pleurală, determinările s-au făcut din lichidul pleural.

Criteriile de includere a bolnavilor în lot au fost: suspiciunea de TB respiratorie pe criterii epidemiologice, clinice și radiologice, BAAR absent la examenul sputei, aspiratului bronșic sau în lichidul pleural, aspecte endobronșice nonsugestive pentru altă etiologie, aspect de exudat limfocitar al lichidului pleural.

Pentru extracția și purificarea ADN s-a utilizat protocolul „Total Nucleic Acids Purification. Master Pure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicentre, Madison Wisconsin)”. Pentru analiza calitativă și cantitativă a genomului TB s-au utilizat Primer Design™ Kit MasterMix și LightScanner 32 instrument (Idaho Technology, Salt Lake City; UT).

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

### I. Aspirat bronșic

Dintre cei 13 bolnavi suspectați de TB pulmonară, 8 au prezentat *rt PCR* pozitiv, 7 dintre aceștia fiind confirmați și prin culturi pozitive din spută sau/și aspiratul bronșic. Pentru ceilalți 5 bolnavi, cu rezultate negative *rt PCR*, culturile din spută sau și aspiratul bronșic au fost negative în 4 cazuri.

În concluzie, ***rt PCR* în aspiratul bronșic a avut o sensibilitate de 87,5% și o specificitate de 80% iar valoarea predictivă pozitivă (VPP) a fost de 87,5%.**

Am indicat *rt PCR* pentru 9 bolnavi suspectați de TB, dintre care unul cu pericardită și pleurezie minimă, un bolnav cu bronhopneumonie cu leziuni excavate și 3 bolnavi cu opacități macronodulare neomogene confirmate ulterior ca tumori pulmonare.

Rezultatele *rt PCR* au fost fals negative într-un singur caz: bărbat, 40 de ani, fumător, tușitor cronic, expectorează purulent și scade în greutate de 2 luni. Radiografia pulmonară a arătat leziuni nodulare neomogene confluențe în apicalul inferior drept. Primele trei frotiuri din spută au fost negative, la fel și frotiul din aspiratul bronșic. Examenul bacteriologic a fost însă pozitiv, atât prin examenul direct cât și la culturi, din sputa post-bronhosopică. S-a inițiat tratamentul antituberculos și evoluția bolnavului a fost favorabilă.

Rezultatele *rt PCR* au fost fals pozitive tot pentru un singur bolnav: femeie, 24 de ani, internată cu suspiciunea de reactivare TB. Din punct de vedere clinic prezenta tuse productivă cu expectorație mucopurulentă persistentă, neameliorată de tratament

antibiotic nespecific în ambulator. Radiologic pulmonar s-au evidențiat leziuni de intensitate costală neomogene apical drept și mediopulmonar drept. Examenul bacteriologic pentru MTB a fost negativ, atât pe frotiu, cât și în culturi (metoda clasică și metoda rapidă modernă, cu însămânțare pe medii lichide și citire în sistemul MB/BacT). Deși în aspiratul bronșic testul *rt PCR* a fost pozitiv la o valoare de 20 copii/μl, am externat bolnava cu diagnosticul de bronșiectazii posttuberculoase, menținând-o sub supraveghere și neînregistrând până în acest moment semne clinice, radiologice și bacteriologice de recidivă tuberculoasă.

Unul dintre cei 8 bolnavi cu *rt PCR* pozitiv din aspiratul bronșic (bărbat, 23 de ani) a prezentat, în absența leziunilor parenchimotoase pulmonare, pericardită și pleurezie dreaptă. Prezentând în antecedente o pericardită în decembrie 2009, interpretată la acel moment a fi de etiologie virală, remisă, revine în februarie 2010 cu febră, astenie fizică marcată și dureri toracice. Echografia cardiacă a arătat lichid pericardic prezent în cantitate mică de 1,4 cm, cea pleurală fină lamă de lichid bazal stâng de 1,8 cm și cea abdominală splenomegalie. Trei examene au fost *rt PCR* pozitiv din sânge, la valorile de 158 copii/μl, 171 copii/μl și 207 copii/μl. Pozitiv a fost testul și din aspiratul bronșic (164 copii/μl), înregistrându-se pozitivitate din acesta pentru MTB și prin metodele clasice, frotiu și culturi. De subliniat rapiditatea diagnosticului, primul rezultat *rt PCR* din hemocultură înregistrându-se la 2 zile de la internare iar rezultatul *rt PCR* în aspiratul bronșic a doua zi după bronhoscopie.

Conform recomandărilor CDC, pentru această etapă, testului *rt PCR* i se va acorda o valoare în demararea terapiei antituberculoase numai în corelație cu metodele clasice de detectare a MTB, atitudinea fiind destul de flexibilă, lăsând în ultimă instanță la latitudinea unui clinician experimentat decizia finală. Astfel, pentru bolnavii cu frotiu pozitiv și *rt PCR* pozitiv, fie se va considera că pacientul are TB și se va începe tratamentul specific, fie vor fi așteptate rezultatele la cultură pentru confirmarea definitivă a diagnosticului. Pentru cazurile cu frotiu negativ și *rt PCR* pozitiv, în funcție de contextul clinic și celelalte investigații medicul clinician va decide inițierea terapiei antituberculoase. Dacă este nevoie, va fi repetat testul PCR pe o nouă probă sau vor fi așteptate rezultatele la cultură pentru stabilirea definitivă a diagnosticului (1).

Diferiți autori au înregistrat în studiile lor valori variate privind specificitatea și sensibilitatea testului.

Astfel Clarridge a semnalat la bolnavii cu BAAR prezenți în aspiratul bronșic o sensibilitate de 86-95% și o specificitate de 98-100%, iar la cei cu BAAR negativ sensibilitatea a fost de 62-77% iar specificitatea de 98% (3). La bolnavii cu spută negativă pentru BAAR Bogard a comunicat o sensibilitate în aspiratul bronșic de 36-97% (4).

Valoarea testului crește dacă se efectuează din lavajul bronșiolo-alveolar (LBA). În acest sens, Liam comunică o rată de teste pozitive *rt PCR* în LBA la bolnavii suspecți de TB dar cu frotiu negativ, de 80,9% (55 din 68 pacienți) (5). Pentru bolnavii cu frotiu negativ și culturi pozitive *rt PCR* a fost pozitiv în 90% dintre cazuri (190 din 210 pacienți) în spută sau LBA (6).

## II. Lichidul pleural

Opt dintre cei 14 bolnavi au avut *rtPCR* pozitiv dintre care 5 au fost confirmați și prin metoda clasică a culturilor. Șase dintre pacienți au prezentat *rt PCR* negativ, concordant pentru 5 dintre ei cu negativitatea culturală din spută, aspiratul bronșic și lichidul pleural.

***Rt PCR MTB* în lichidul pleural a avut o sensibilitate de 83,3%, o specificitate de 62,5% și o VPP de 62,5%.**

Testul *rt PCR* a fost negativ în exudate limfocitare, fără celule atipice, la următorii bolnavi: o lăuză cu pleurezie provenită din focar TB familial, 2 bolnavi cu insuficiență cardiacă, examen radiologic pulmonar leziuni minime TB, un bolnav cu insuficiență renală și leziuni minime de TB pulmonară, un bolnav cu tumoră gastrică și pleurezie. Toți acești bolnavi au avut frotiu și culturi negative (pe mediu Löwenstein-Jensen și prin metoda MB/BacT) din spută și lichidul pleural. Nu li s-a administrat tratament antituberculos.

Pentru un singur bolnav testul a fost fals negativ: bărbat, 74 ani, internat cu suspiciunea de pleurezie dreaptă. Debutul bolii a fost în urmă cu 2 luni prin dureri toracice drepte, tuse cu expectorație redusă, ușoară scădere ponderală. Radiologic pulmonar prezenta o opacitate omogenă întinsă cu concavitatea în sus bazal drept, aspect sugestiv pentru o pleurezie dreaptă. Lichidul pleural punționat a fost un exudat (proteine 3,8 g/dl) limfocitar (100% limfocite, nu s-au evidențiat celule atipice). Rezultatele examenelor bacteriologice au fost următoarele: frotiu spută matinală spontană BAAR absent, frotiu spută după bronhoscopie BAAR prezenți 9 BAAR/100 cp, frotiu aspiratul bronșic BAAR absent, culturi pozitive în spută și aspiratul bronșic. Testul *rt PCR* a fost pozitiv din aspiratul bronșic (399 copii/μl),

dar negativ din lichidul pleural. Sub tratament anti-tuberculos evoluția a fost favorabilă.

Cei trei bolnavi care au avut *rt PCR* pozitiv, dar nu au fost confirmați ca TB pleurală și prin metodele bacteriologice clasice, au fost trei pacienți cu vârstă de 36, 50 și 82 de ani, cu un context clinic și epidemiologic sugestiv pentru etiologia tuberculoasă a pleureziei, factori favorizanți, absența altei etiologii sistemice evidente. Lichidul pleural a fost un exudat limfocitar fără celule atipice. Atât frotiurile cât și culturile din aspiratul bronșic au fost negative în timp ce *rt PCR* din lichidul pleural a fost pozitiv cu valori cuprinse între 250 – 597 copii/μl. S-a instituit tratament antituberculos la toți cei trei bolnavi, sub care 2 bolnavi au evoluat favorabil, iar unul dintre ei, pacientul în vârstă de 82 de ani, a decedat printr-o altă cauză (accident vascular cerebral, bronhopneumonie de aspirație, insuficiență respiratorie acută).

Recomandările CDC privind instituirea terapiei antituberculoase țin seama din nou de interpretarea *rt PCR* raportată la testele bacteriologice clasice, și de experiența medicului. Astfel, în cazul unui examen microscopic pozitiv și test *rt PCR* negativ, dacă testul PCR s-a validat corect (control intern în limitele acceptate) și s-au obținut 2 rezultate negative pe 2 probe diferite, se poate presupune că pacientul are o infecție cu mycobacterii non-tuberculoase. Medicul clinician va decide inițierea terapiei specifice în cazurile speciale în care suspiciunea clinică de TB este mare, chiar dacă PCR este negativ; în același timp însă vor fi așteptate rezultatele la cultură pentru stabilirea definitivă a diagnosticului. În cazul unui examen microscopic negativ și al unui test *rt PCR* deasemeni negativ diagnosticul de TB nu poate fi exclus în totalitate. Și în această situație, medicul clinician este cel care va decide inițierea terapiei specifice în cazurile speciale în care suspiciunea clinică de TB este mare, chiar dacă examenul microscopic și testul PCR au dat rezultate negative. Vor fi așteptate de asemenea rezultatele la cultură pentru stabilirea definitivă a diagnosticului (1).

Datele din literatura de specialitate confirmă faptul că *rt PCR* din lichidul pleural este o metodă rapidă de diagnostic în contextul în care examenul microscopic pentru MTB în lichidul pleural are o sensibilitate redusă. În plus, deși testul are o sensibilitate mai redusă pentru lichidul pleural decât pentru aspiratul bronșic, specificitatea sa este mai mare. În acest sens, Babu, pe 20 de probe din lichidul pleural, confirmă o sensibilitate de 70% și o specificitate de 100% (7). Lemaître a efectuat un studiu pe un lot mai mare de pacienți, 45 cu TB

confirmată prin culturi și 24 cu TB extrapulmonară (3 lichide pleurale, 8 ganglioni tuberculoși, alte țesuturi 4, lichid sinovial 3, abcese 3, urină 3 produse), cu un lot martor de 55 de persoane fără TB. *Rt PCR* a avut o sensibilitate de 90% și specificitate de 100%, pentru speci­me­nele respiratorii, și de 80 și respectiv 100% pentru speci­me­nele extrarespiratorii. Sensibilitatea mai redusă s-a înregistrat la produsele cu frotiu negativ, 67%, deoarece și numărul de bacili este mai mic (8).

## CONCLUZII

- Conform Programului Național de Control al Tuberculozei 2007-2011 diagnosticul de TB nu poate fi stabilit definitiv decât prin

metodele clasice: frotiu și culturi din speci­me­nele respiratorii și extrarespiratorii.

- Metoda PCR, în particular *rt PCR*, are avantajul unui diagnostic rapid iar tratamentul se instituie în contextul de suspiciune clinică.
- Sensibilitatea *rt PCR* de peste 80% cu o valoare predictivă pozitivă între 62,5 și 87,5% și specificitatea de 60 – 80% din laboratorul nostru, fac din această metodă un mijloc util pentru diagnosticul precoce al tuberculozei în cazuri selecționate neconfirmate prin alte metode.
- Datele de mai sus, în favoarea metodei, impun continuarea studiului pe un număr mai mare de cazuri.

## BIBLIOGRAFIE

1. **CDC:** Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis, *MMWR*, Jan. 2009, 58(01), 7-10.
2. **KatochVM:** *Ind J Med Res* 2004.
3. **Clarridge JE:** Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2049–2056.
4. **Bogard M:** Multicenter study of a commercial, automated polymerase chain reaction system for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in routine clinical practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20: 724–731.
5. **Liam C:** Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in bronchoalveolar lavage from patients with sputum smear-negative pulmonary tuberculosis using a polymerase chain reaction assay, *Respirology* 1998 Jun; 3(2):125-9.
6. **Tueller C:** Value of smear and PCR in bronchoalveolar lavage fluid in culture positive pulmonary tuberculosis. *Eur Respir J* 2005; 26: 767–772.
7. **Babu SN, Shobha S, Surinder KJ, Sunil KA:** Evaluation of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pleural fluid. *Chest* 2001; 119; 1737-1741.
8. **Lemaître N, Armand S, și al:** Comparison of the real-time PCR method and the genprobe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and nonpulmonary specimen *JCM*, 2004, 4307–4309 Vol. 42, No. 9