METODE NOI ŞI VECHI ÎN DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL TUBERCULOZEI ŞI ÎN DEPISTAREA REZISTENȚELOR LA MEDICAȚIA ANTITUBERCULOASĂ

Old and new methods for the laboratory diagnosis of tuberculosis and for the detection of resistant strains to antibuberculous drugs

Dr. Adriana Moisoiu
Institutul de Pneumoftiziologie „Marius Nasta“, Bucureşti

REZUMAT

Tuberculoza (TB) rămâne şi în secolul XXI o mare problemă de sănătate publică şi cea mai mare cauză de decese datorate unui singur agent infecţios la nivel mondial. Cu toate că numărul de cazuri de TB este în scădere în ultimii ani în România, ele sunt tot mai dificil de tratat atunci când apare rezistenţa la medicamentele antituberculoase. Este nevoie de o mai rapidă detecţie a Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis) în laborator şi de testare a rezistenţei sale la medicamentele antituberculoase. Din acest motiv metodele de testare în laboratoarele de micobacteriologie se dezvoltă continuu. Chiar dacă metodele clasice de microscopie şi cultură sunt considerate standard de aur în bacteriologia TB, progresele recente ale biologiei moleculare şi o mai bună înţelegere a bazelor moleculare ale rezistenţei la medicaţia antituberculoasă au determinat apariţia unor noi instrumente pentru un diagnostic rapid. Scopul noilor metode este acela de a creşte sensibilitatea şi specificitatea abordării terapeutice şi de a determina o scădere a timpul necesar diagnosticului.
Acest articol este o trecere în revistă a metodelor de laborator mai noi şi mai vechi ce pot servi unui diagnostic rapid şi pus cu acuratete în infecţiile micobacteriene, ceea ce ar putea permite administrarea unui tratament corect şi instituit la timp de către clinician.

Cuvinte cheie: tuberculoză (TB), *Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis)*, diagnostic molecular

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) remains even in the XXI century a major problem of public health and one of the major causes of death from a single infectious agent worldwide. Although the number of cases continues gradually to decrease in Romania in last years, cases get more difficult to threat, specifically those that are multidrug-resistante.
The rapid detection of Mycobacterium tuberculosis(M. tuberculosis) in laboratory and the tests of susceptibility to antituberculous drugs become a necessity. In light of this, the laboratory testing in the mycobacteriology field is continuously developing. Recent advances in molecular biology and a better understanding of the molecular basis of drug resistance in tuberculosis have provided new tools for rapid diagnosis.
The aim of this article is to focus on current old and new methods useful for an accurate and rapid laboratory diagnosis of mycobacterial infections.

Keywords: tuberculosis (TB), *Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis)*, molecular diagnosis

Diagnosticul de laborator al TB se face în mod clasic prin microscopie şi cultură. Acestea sunt însă procedee inadecvate pentru un control efectiv al TB, pentru că sunt mari consumatoare de timp.

Diferenţierea *M.tuberculosis* de alte micobacterii reprezintă şi ea o importantă problemă de sănătate, ştiut fiind că doar TB se transmite de la persoană la persoană. Diferenţierea micobacteriilor tuberculoase

Adresă de corespondenţă:
Dr. Adriana Moisoiu, Institutul de Pneumoftiziologie „Marius Nasta“, Şos. Viilor 90, Bucureşti
E-mail: amoisoiu55@gmail.com

de cele netuberculoase este necesară, dar şi utilă, în vederea stabilirii unei scheme adecvate de tratament.

Necesitatea scurtării timpului de diagnostic, precum şi necesitatea diferenţierii micobacteriilor tuberculoase de cele netuberculoase, au determinat în ultimii ani apariţia metodelor moleculare de diagnostic.

METODE CLASICE DE DIAGNOSTIC

Identificarea fenotipică a complexului *Mycobacterium tuberculosis* (MTC)

1.1. Microscopia

Microscopia specimenului clinic în coloraţie Ziehl-Neelsen este cea mai rapidă şi mai ieftină metodă de identificare a micobacteriilor. Principalul dezavantaj al acestei metode este acela că este o metodă cu sensibilitate redusă, pragul pozitivităţii fiind de 5.000-10.000 bacili/ml de prelevat clinic. Colorarea fluorescentă a lamelor (ex. cu auraminarodhamina) este superioară coloraţiei Ziehl-Neelsen, ea ducând la scăderea timpului de examinare a unei lame. Dar nici ea nu poate face diferenţa între bacilii viabili şi cei neviabili din respectivul specimen clinic şi nici nu poate face diferenţa între diversele specii de micobacterii. De aceea este obligatoriu ca examinarea microscopică a unui specimen clinic să fie urmată de cultivarea sa.

1.2. Cultura

Cultura este o metodă net superioară microscopiei în depistarea *M. tuberculosis*. Ea poate fi efectuată pe medii solide (Lowenstein-Jensen, Middlebrook 7H10 sau 7H11) sau pe medii lichide (Youmans, Dubos, Middlebrook 7H9). Pe mediile solide se poate observa foarte bine morfologia coloniilor de *M. tuberculosis*. Coloniile dintr-o primă cultură de *M. tuberculosis* obţinute pe mediul Lowenstein-Jensen au o textură caracteristică. Ele apar rugoase, conopidiforme, de culoare alb-crem (Fig. 1). La examinarea microscopică a unui frotiu dintr-o astfel de colonie se observă numărul foarte mare de corzi formate de celulele bacteriene, ceea ce face posibilă diferenţierea lor de alte specii micobacteriene. Conversia morfologică a coloniilor de *M. tuberculosis* la colonii netede pare a fi un semn de creştere a patogenicităţii determinată de modificări în compoziţia peretelui celular.

Rata de creştere pentru micobacterii este definită ca fiind timpul necesar pentru apariţia unor colonii vizibile cu ochiul liber pe un mediu solid. Micobacteriile ce cresc în mai puţin de 7 zile sunt denumite cu creştere rapidă, în timp ce apariţia coloniilor la mai mult de 7 zile de la inoculare defineşte micobacteriile cu creştere lentă.

FIGURA 1. *Aspectul coloniilor de M. tuberculosis pe mediul Lowenstein-Jensen*

Micobacteriile aparţinând MTC sunt cu creştere lentă. Temperatura lor optimă de creştere este de 35-37°C şi sunt noncromogene (au o culoare alb-crem ce nu se schimbă după expunerea la lumină).

M. tuberculosis creşte extrem de încet în laborator, necesitând 3-8 săptămâni de creştere pe mediile solide şi cel puţin 2 săptămâni pe medii lichide. Această creştere lentă determină o mare întârziere în diagnosticul TB. Pe de altă parte, s-a observat că la aproximativ 30% dintre pacienţii cu TB aceasta nu poate fi confirmată prin cultura pe mediu solid.

Au apărut însă mediile lichide selective, în care detecţia creşterii *M. tuberculosis* se poate face în 1-2 săptămâni, în funcţie de numărul bacililor tuberculoşi din specimenul clinic. Există mai multe tipuri de aparate automate pentru cultura micobacteriilor pe medii lichide selective: BACTEC TB 460, BACTEC MGIT 960, BacT/Alert3D, Versa TREK.

BACTEC TB 460 utilizează mediul Middlebrook 7H9 în care acidul palmitic este marcat radioactiv cu 14C. Dacă există micobacterii viabile în prelevatul clinic introdus în flaconul de cultură, acestea vor metaboliza acidul palmitic radioactiv, eliberând CO_2 radioactiv. Rata de producere a CO_2 radioactiv este direct proporţională cu rata de multiplicare a micobacteriilor.

BACTEC MGIT 960 (Mycobacteria Growth Indicator Tube) este un sistem automat ce utilizează un mediu Middlebrook 7H9 modificat cu indicator de creştere fluorescent (film siliconat cu sare de ruteniu). Multiplicarea micobacteriilor poate fi citită prin vizualizarea precipitatelor ce apar în partea inferioară a tubului sau prin utilizarea unui emiţător portabil de lumină UV.

BacT/Alert3D utilizează mediul Middlebrook 7H9 în tuburi ce au în partea lor inferioară un detector colorimetric ce-şi schimbă culoarea de la verde închis la galben pe măsura acumulării de CO_2 produs de creşterea micobacteriilor. Cu ajutorul unui dispozitiv reflectometric este semnalată optic şi acustic pozitivarea culturii.

Versa TREK este un sistem automat ce utilizează flacoane speciale care conţin un burete cu structură alveolară. Mediul de cultură este Middlebrook 7H9 îmbogăţit cu substanţe antibacteriene. Detecţia creşterii micobacteriilor se face prin monitorizarea consumului de O_2 şi măsurarea presiunii din flacon cu ajutorul unui manometru. Flacoanele în care se constată scăderea presiunii de O_2 sunt raportate pozitive şi semnalate vizual şi acustic de către aparat.

Aceste tipuri de aparate ce utilizează mediul lichid pentru detecţia creşterii *M. tuberculosis* sunt în uz în diverse laboratoare de micobacteriologie din România.

1.3. Teste biochimice şi de identificare antigenică

Testele biochimice au fost multă vreme principala modalitate de diferenţiere a micobacteriilor. Dar ele necesită o perioadă lungă de timp pentru efectuare.

Testele uzuale de diferenţiere în cadrul MTC sunt: testul reducerii nitratului, testul acumulării niacinei, creşterea în prezenţa tiofen-2-hidrazidei carboxilice (TCH), testul catalazei la temperatura camerei, testul arilsulfatazei, testul ureazei, testul cu pirazinamidaza, toleranţa la clorură de sodiu, testul reducerii teluritului, testul hidrolizei Tween 80. Diferitele laboratoare folosesc teste diferite de identificare biochimică. De exemplu rezistenţa la TCH este o caracteristică a *M. africanum*, dar concentraţia critică folosită pentru acest test variază între 1 şi 5µg/ml şi această lipsă a standardizării testelor creează ambiguitate în interpretarea rezultatelor. Clasic, în laboratoarele ce utilizează teste biochimice, doar *M. tuberculosis* este considerat a fi rezistent la TCH. Se admite că pentru diferenţierea bacililor din MTC de micobacteriile netuberculoase (MNT) este necesară efectuarea a minimum 4 teste biochimice (1).

Actualmente s-au dezvoltat şi teste rapide de identificare a micobacteriilor, cum ar fi: BBL Taxo TB Niacin – test pe strip pentru detectarea producţiei de niacină; BBL Taxo Nitrite Test Strip – test pe strip pentru reducerea nitratului.

S-au dezvoltat şi teste imunocromatografice ce pot detecta tulpinile de micobacterii aparţinând MTC în mai puţin de 15 minute. Un astfel de test este cel ce pune în evidenţă antigenul specific pentru *M. tuberculosis* (Ag MPT 64). Testul se efectuează în primele 24-48 de ore după pozitivarea culturii pe mediu solid sau lichid, pentru a putea evita falsele reacţii negative. Sensibilitatea testului este de 98,6%, iar specificitatea de 97,7% (2). Programul Naţional de Control a Tuberculozei din România recomandă utilizarea de rutină a acestui test pentru toate culturile de micobacterii obţinute în laboratoarele de micobacteriologie de nivel 2 şi 3.

METODE MOLECULARE DE DIAGNOSTIC

În ultimii ani s-au dezvoltat mai multe metode moleculare pentru detecţia directă a micobacteriilor din prelevalul clinic, identificarea speciilor şi testarea rapidă a sensibilităţii la medicamentele antituberculoase pentru *M. tuberculosis* din culturi bacteriene, metode ce au făcut posibilă scurtarea timpului de diagnostic (3,4).

Totodată, metodele de tipare moleculară au făcut posibilă descrierea unor variaţii ale fenotipurilor de *M. tuberculosis* cum ar fi virulenţa, caracterele de creştere, imunogenicitatea şi transmisibilitatea (5).

Detecţia micobacteriilor din prelevate clinice şi/sau din cultură

Apariţia metodelor de amplificare a acizilor nucleici (AAN) au făcut posibilă punerea în evidenţă a ADN-ului sau ARN-ului micobacterian direct din prelevatele clinice, anterior unui rezultat al culturii produsului respectiv, iar dezvoltarea lor ulterioară le-a făcut accesibile laboratoarelor clinice de micobacteriologie.

Există mai multe metode de AAN: Enhanced *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (E-MTD, Gen-Probe, San Diego, CA); Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* Test (Amplicor, Roche Diagnostic Systems, Inc., Branchburg, NJ); sistemul Geno Type MTBDR*plus* ver 2.0 (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany).

Identificarea genotipică a acizilor nucleici

Se efectuează folosind sonde nucleare (Gen-Probe, AccuProbe Culture Confirmation Test, San Diego, CA, etc). Acurateţea de confirmare este de 100% pentru *M. tuberculosis* (6). AccuProbe pentru MTC poate fi efectuat pe culturi atât din mediu solid, cât şi lichid şi detectează prezenţa tuturor membrilor MTC. Amplificarea unităţii 16S din ARNr sau elementul de inserţie *IS6110* sunt cele mai obişnuite ţinte utilizate. Alte regiuni folosite pentru amplificare conţin gena *rpoB* care codifică subunitatea *β din ARN polimeraza*, gena *hsp65,*

gena *dnaJ,* gena *recA*, gena *sodA*. Aceste teste se pot efecua uşor, rezultatul se obţine în câteva ore şi au o mare specificitate (7).

Teste comerciale

Testul Amplicor MTB

Testul Amplicor (Roche Molecular Systems, Basel, Switzerland) se bazează pe o metodă de protein chain reaction (PCR) prin care ADN-ul micobacterian este amplificat cu primeri biotinaţi formaţi pe baza genei 16S a ARNr.

Amplificarea şi detecţia ADN-ului se efectuează automat cu ajutorul aparatului Cobas Amplicor, în care, fără manevre suplimentare, produsul de amplificare este transferat automat în staţia de detecţie unde va avea loc reacţia colorimetrică de developare şi citire.

Timpul necesar întregului proces este de cca 6-7 ore. Controlul intern al acestui sistem de detecţie a micobacteriilor este un ADN sintetic caracterizat prin secvenţe identice de ţinte micobacteriene; când acesta nu este amplificat semnalează prezenţa inhibitorilor. Există şi kit-uri Amplicor pentru detecţia ADN ului *M. avium* şi *M. intracellulare* din prelevate clinice.

În literatura de specialitate se arată că specificitatea sistemului Amplicor MTB este apropiată de 100%, în timp ce sesibilitatea variază între 90% şi 100% în specimenele clinice pozitive la microscopie. (8) După alţi autori sensibilitatea ţesutului Amplicor (comparativ cu cultura) pentru probele de provenienţă respiratorie este de 79,4-91,9%; specificitatea este de 99,6-99,8%, iar valoarea predictivă pozitivă este de 92,6-96,6 şi valoarea predictivă negativă este de 98,6-98,7% (9).

Sensibilitatea pentru specimenele negative la microscopie este între 40% şi 73,1% comparativ cu cea a E-MTD şi de aceea testul Amplicor a fost aprobat de FDA în SUA doar pentru detecţia directă a *M. tuberculosis* în specimenele respiratorii BAAR pozitive la microscopie.

Sistemul E-MTD

E-MTD (Gen-Probe, San Diego, CA) este un sistem de amplificare izotermă (42°C) ce se bazează pe amplificarea transcripţiei mediate dezvoltată de Kwoh şi colaboratorii, în care ARNr este eliberat din celulele tinţă prin sonicare, după care primer-ul promoter se leagă de ţintele ARNr. Revers transcriptaza este apoi utilizată pentru a copia ARNr pe un hibrid cADN-ARN.

O regiune complex-specifică a genei *16S* a ARN-ului produce un dublu standard de ADN prin acţiunea combinată a revers transcriptazei şi ribonucleazei. În contrapartidă, ARN polimeraza catalizează sinteza ARN-ului ribozomal din ADN-ul ribozomal sintetizat anterior. În acest fel, un nou ciclu va începe în momentul în care noul produs ARN ribozomal iniţiază noi transcripţii prin revers transcriptază.

Ampliconii ARN sunt apoi detectaţi chemiluminiscent cu un ester de acridinium etichetat ADN într-o soluţie de hibridizare. Întreaga procedură de amplificare este izotermă şi se produce într-un singur tub, ceea ce duce la scăderea riscului de contaminare. După efectuarea decontaminării prelevatului clinic, testul E-MTD poate fi finalizat în cca 3 ore. Acest test nu are nevoie de control intern pentru a monitoriza prezenţa sau absenţa inhibitorilor.

Testul E-MTD funcţionează atât în cazul prelevaţelor clinice BAAR pozitive la microscopie, cât şi în cazul celor BAAR negative la microscopie. Sensibilitatea acestui test pentru specimenele clinice respiratorii este de 90,9-95,2%, specificitatea sa este de 98,8-100%, valoarea predictivă pozitivă este de 83,3-100%, iar valoarea predictivă negativă este de 98,4-99,6% (8-10).

Sistemul BD Probe Tec ET

Sistemul BD Probe Tec ET (Becton Dickinson, Sparks, MD) utilizează ADN polimeraza şi amplificarea izotermală pentru a produce multiple copii ale *IS6110,* un element de inserţie unic pentru *M. tuberculosis.*

Anterior introducerii probei în sistemul automat sunt necesare câteva manevre: proba este inactivată iniţial la 105°C şi apoi sonicată pentru a extrage ADN-ul, transferată într-un godeu la 72,5°C şi subsecvent într-un godeu de amplificare la 54°C. În aparatul BD Probe Tec ET microplăcile conţinând probele şi reactivii de amplificare se incubează la 52,5°C şi fluorescenţa emisă este monitorizată în mod continuu. Timpul de finalizare al unei probe cu acest test este de 3,5-4 ore. Testul conţine un control intern caracterizat de aceeaşi secvenţă ca şi ţinta micobacteriană. Când amplificarea nu s-a făcut, acest control este cel ce dă alertă pentru prezenţa inhibitorilor. În literatura de specialitate se descriu rate ale sensibilităţii testului între 98,5% şi 100% pentru probele pozitive la microscopie şi foarte variabile (între 0,33% şi 100%) pentru probele negative la microscopie (8).

Sistemul de hibridizare pe bandă *(line probe assay)*

Există două sisteme comerciale de hibridizare pe bandă: Geno Type Mycobacterium şi INNO LiPA Mycobacteria.

Geno Type Mycobacterium este un sistem de revers hibridizare bazat pe multiplex-PCR, produs

de firma Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germania. Poate detecta atât MTC, cât şi micobacteriile atipice (*M. avium, M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. marinum/M. ulcerans*, complexul *M. tuberculosis* şi *M. xenopi*).

Sistemul se bazează pe detecţia polimorfismului unei singure nucleotide din gena *gyrB* şi pe prezenţa sau absenţa regiunilor de diferenţiere (RD). Diferitele probe specifice de ADN apar imobilizate ca linii paralele pe o bandă şi sunt detectate colorimetric.

Sistemul Geno Type Mycobacterium are mai multe kit-uri:

- *Geno Type MTBDRplus v 2.0*, kit de analiză genetică pentru identificarea complexului *M. tuberculosis* şi identificarea rezistenţei la rifampicină (RIF) şi izoniazidă (INH) din specimen clinic pozitiv şi/sau negativ microscopic şi probe din cultura bacteriană.

Acest test se efectuează de rutină în cele 2 laboratoare naţionale de referinţă din România pentru toate prelevatele clinice pozitive în microscopie.

- *Geno Type MTBC*, kit de diferenţiere a complexului *M. tuberculosis* din culturi, ce diferenţiază următoarele specii aparţinând complexului *M. tuberculosis*: *M. tuberculosis/M canettii*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis* subsp. *bovis*, *M. bovis* subsp. *caprae şi M. bovis* BCG. Acest kit este cea mai fiabilă metodă directă de identificare a membrilor MTC, dar nu poate diferenţia *M. canetii* de alţi membri ai MTC.
- *Geno Type Mycobacterium CM (Common Mycobacteria) ver 1.0*, kit de analiză genetică pentru identificarea celor mai relevante specii micobacteriene cu importanţă clinică din culturi, identifică următoarele specii micobacteriene: *M. avium ssp*. *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. marinum/M. ulcerans*, complexul *M. tuberculosis* şi *M. xenopi*.

Testele Geno Type sunt relativ uşor de efectuat, sunt uşor de interpretat şi sunt rapide.

Sensibilitatea acestor teste, comparativ cu secvenţa *16S* din gena ARNr este de 97,9-99,3%, iar specificitatea de 92,4-99,4% (8).

Sistemul INNO LiPA Mycobacteria v.2 este bazat pe principiul revers hibridizării. Materialul ADN biotinat este hibridizat cu probe de oligonucleotide specifice imobilizate ca linii paralele pe o bandă. După hibridizare se adaugă streptavidina etichetată cu fosfataza alcalină ce se leagă de orice hibrid biotinat format anterior. Incubarea cu 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfat şi nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT) determină apariţia unui precipitat brun purpuriu. Pentru a lucra testul INNO-LiPA Mycobacteria v.2, trebuie efectuată amplificarea regiunilor spacer 16S-23S din ARNr. Apoi produsul de amplificare este hibridizat folosind o bandă pe care sunt fixate 22 de probe paralele de ADN şi 2 probe de control (Fig. 2).

Apariţia unor linii clar vizibile pe bandă este considerată ca reacţie pozitivă. Rezultatele obţinute se interpretează folosind un şablon furnizat de producător. Pot fi astfel identificate 17 din cele mai frecvent izolate specii micobacteriene: MTC, *M avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. chelonae*, *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. malmoense*, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. smegmatis*, *M. haemophilum*, *M. marinum/M. ulcerans şi M. celatum*. Sensibilitatea este de 100%, iar specificitatea de 94,4%. (8) Dar INNO LiPA Mycobacteria v.2 nu poate fi lucrat decât pe probe din cultură şi nu direct din prelevate clinice.

Alte tehnici de biologie moleculară prin care se pot obţine rezultate rapide şi de mare acurateţe în identificarea speciilor micobacteriene sunt:

Tehnica de secvenţiere a ADN-ului. Ea constă în efectuarea unei amplificări a ADN-ului micobacterian extras din cultura cu primeri genus-specifici, urmată de o secvenţiere a ampliconilor într-un sistem automat. Identificarea ulterioară a tulpinii micobacteriene se face prin compararea secvenţei de nucleotide cu o bază cunoscută de secvenţiere.

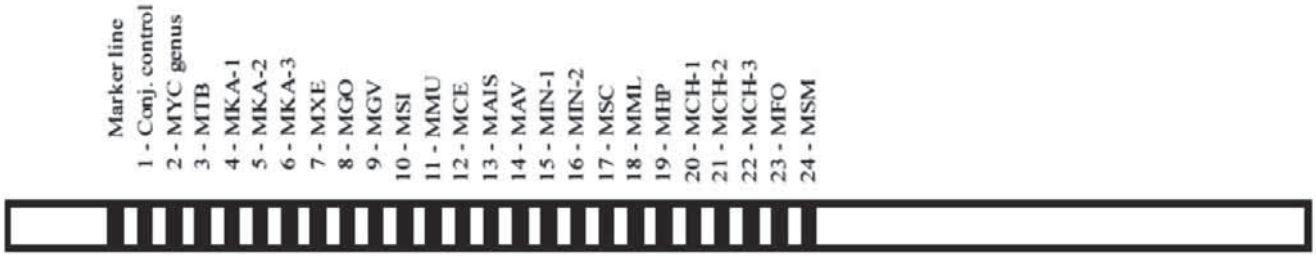

FIGURA 2. *Localizarea diverselor probe pe banda de INNO LiPA Mycobacteria v2.*

Asfel de baze de secvenţiere sunt GenBank, Ribosomal Differentiation of Medical Microsystems Database (RIDOM)(11), European Molecular Biology Laboratory (EMBL). Cea mai utilizată ţintă pentru secvenţiere este *16S* ARN*r*. Instrumentul comercial cu care se poate efectua secvenţierea *16S* ADNr este MicroSeq System (Applied Biosistems, CA). Prin această tehnică nu poate fi diferenţiat *M. canetti* de alţi membri ai MTC, după cum nu pot fi diferenţiate nici alte specii de micobacterii ca *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. immunogenum*. Pentru diferenţierea acestora este necesară o a doua tehnică de analiză a deleţiei.

Reacţia de polimerizare în lanţ şi analiza enzimelor de restricţie pentru identificarea micobacteriilor din cultură

Este o metodă dezvoltată în 1993 de Telenţi şi colaboratorii, ce se bazează pe amplificarea secvenţei 441-bp a genei hsp65 prin tehnica de PCR, urmată de restricţia produsului de amplificare cu ajutorul a două enzime de restricţie BstEll şi Haell. Fragmentele rezultate în urma digestiei cu enzime restrictive sunt apoi analizate prin electrofereza în gel de agaroza şi comparate cu un algoritm preexistent. Testul poate fi finalizat într-o singură zi. (8)

Metodă de genotipare *IS6110* RFLP (Restriction Lenght Fragment Polymorphism) detectează variaţiile generate de inserţia elementului *IS6110*. Acest element de inserţie este capabil de autocopiere şi apoi se poate insera oriunde în genom printr-un proces denumit transpoziţie. Diversele tulpini diferă între ele atât prin numărul de copii al elementului *IS6110*, cât şi prin poziţia acestor copii în ADN-ul bacterian. Aceasta a devenit actualmente cea mai folosită metodă pentru diferenţierea tulpinilor de *M. tuberculosis* izolate. Metoda se poate aplica doar culturilor de micobacterii de 20-40 de zile pentru a putea obţine suficient material ADN. Perioada mare de timp limitează utilitatea metodei de tipare RFLP, în special în studiile de transmisie nozocomială a tuberculozei în unităţi clinice. (12)

Spoligotiparea (spacer oligonucleotide typing), o nouă metodă de selecţie şi tipare a MTC dezvoltată în ultimii ani, este o metodă de hibridizare ce detectează variabilitatea în regiunile direct repetitive (DR) din ADN-ul *M. tuberculosis*. Spoligotiparea este, de fapt, o amplificare a locusurilor DR ce implică o reacţie de PCR, urmată de hibridizarea produşilor de reacţie pe o membrană ce conţine oligonucleotidele corespunzătoare celor 43 de spaceri legaţi covalent (Fig. 3). Fiecare tulpină de micobacterie are un semnal pozitiv sau negativ pentru fiecare spacer. Rezultatul se poate obţine dintr-o cultură de *M. tuberculosis* într-o singură zi. Datele din studii internaţionale de spoligotipare au identificat un număr mare de clade sau genogrupuri (12).

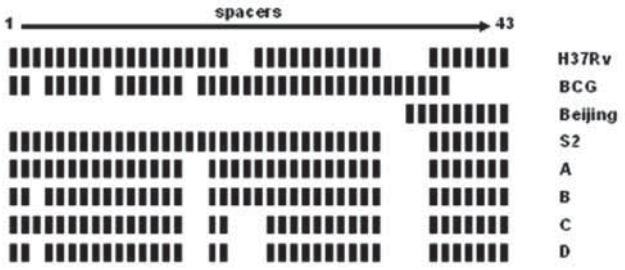

FIGURA 3. *Spoligotiparea – aspectul spacerilor în diverse tulpini micobacteriene (13).*

Recombinarea genetică, rearanjările şi inserţiile/deleţiile asociate acestor elemente, locaţia cromozomală şi numărul de copii au fost utilizate ca markeri specifici epidemiologici pentru tulpinile de *M. tuberculosis*.

Secvenţa de ADN cu cel mai mare potenţial de amplificare este elementul de inserţie *IS6110*. Depinzând de organismul în care a fost caracterizat, acest element este denumit *IS6110* sau *IS986 (M. tuberculosis*) sau *IS987* (*M. bovis* BCG).

Huard şi colaboratorii au investigat profilul DR al MTC şi, bazându-se pe acest profil, au dezvoltat o metodă rapidă şi simplă de tipizare a MTC care utilizează, regiunile cromozomale ale MTC ca regiuni de diferenţiere a deleţiei locilor. Ei au utilizat şapte perechi de primeri PCR pentru a amplifica loci specifici cu care au efectuat un panel de tipare PCR a MTC.

Acest panel nu face doar diferenţierea între subspeciile MTC, ci face şi o diferenţiere a izolatelor MTC de speciile importante de NTM. (14)

Este cunoscut faptul ca diferitele tulpini de *M. tuberculosis* au caractere clinice şi epidemiologice distincte. Unele tulpini de *M. tuberculosis* au o mare capacitate de diseminare şi de a deveni MDR, în timp ce altele tind să aibă doar o limitare locală. De aceea, în ultimul timp a început să se acorde o atenţie sporită identificării tulpinilor de *M. tuberculosis*. Filogenetic, distribuţia specifică a clonelor de *M. tuberculosis* sau a tulpinilor de MDR-TB poate fi urmărită prin metode de tipare moleculară la nivel regional, de ţară sau chiar la nivel global. Instrumentul folosit pentru tiparea epidemiologică a tulpinilor de *M. tuberculosis* este spoligotiparea (15;16).

Există o bază internaţională de date de spoligotipare. Cea mai recentă versiune, cea de-a patra bază de date, SpolDB4 conţine cca 60.000 de modele distribuite în 2 300 SIT.

Metoda de tipare VNTR (Variable Number Tandem Repeat) se bazează pe analiza segmentului de ADN ce conţine secvenţa de „tandem repeat"; numărul de copii al acestei secvenţe variază între tulpini. Metoda constă în calcularea numărului de repetiţii pe baza mărimii produsului de amplificare. Lungimea elementelor repetitive reflectă numărul de copii VNTR amplificate. Rezultatul final este un cod numeric, corespunzător fiecărui locus VNTR. Acest tip de genotipare numerică permite studii comparative intra şi interlaboratoare. În comparaţie cu metodă IS*6110* RFLP, metoda de tipare VNTR este mai rapidă şi virtual potrivită pentru toate izolatele de *M. tuberculosis*, inclusiv pentru acelea cu doar câteva copii. (17)

Toate aceste teste de AAN existente pe piaţă fac posibilă scurtarea perioadei de diagnostic, dar ele nu înlocuiesc examenul microscopic sau cultură.

Pentru că testele nu pot face distincţia între bacilii tuberculosi vii şi cei morţi, ele nu pot fi folosite pentru monitorizarea terapiei antituberculoase. Clinicianul trebuie să interpreteze rezultatul testelor AAN doar în context clinic (9).

Teste pentru identificarea rezistenţei la medicamentele antituberculoase

TB-MDR constituie actualmente o serioasă ameninţare din cauza faptului că există doar un număr foarte limitat de medicamente antituberculoase ce se pot administra în asemenea cazuri.

Testele de sensibilitate la medicamentele antituberculoase se efectuează în mod curent în laboratoarele abilitate prin metodele clasice pe medii solide sau lichide cu medicamente antituberculoase şi prin definirea rezistenţei ca şi creştere a micobacteriei testate mai mare sau egală cu 1% împotriva medicamentului testat. (18)

M. tuberculosis devine rezistent la medicamentele antituberculoase în urma mutaţiilor ce apar la nivelul locilor cromozomali. Mutaţiile punctiforme determină apariţia rezistenţei la un singur medicament, iar acumularea mai multor astfel de mutaţii punctiforme duce la apariţia MDR-TB şi XDR-TB. Apariţia tulpinilor de *M. tuberculosis* rezistente la antituberculoase se produce în special atunci când tratamentul antituberculos este aplicat cu intermitenţă, când el nu este adecvat, când pacientul primeşte un singur antibiotic antituberculos, cand pacientul nu este compliant la tratament, când medicamentele antituberculoase sunt de calitate slabă şi rareori datorită slabei absorbţii la nivel intestinal.

Detecţia tulpinilor de *M. tuberculosis* rezistente la antituberculoase se face în mare parte prin metode fenotipice în urma cultivării pe medii solide cu medicamente antituberculoase (LJ) sau medii lichide în apatate de tip BACTEC TB-460, BACTEC MGIT 960, Bact/Allert 3D sau VersaTrek. Cultivarea micobacteriilor pe medii lichide a determinat o oarecare scurtare a timpului de identificare, dar nu suficientă pentru orientarea clinicienilor în pre-

Drug (year of discovery)	MIC µg/ml	Gene(s) involved in resistance	Gene function	Role	Mechanism of action	Mutation frequency %
Isoniazid (1952)	0.02–0.2	*kat*G	Catalase-peroxidase	Pro-drug conversion	Inhibition of mycolic acid biosynthesis and other multiple effects	50–95
		*inh*A	Enoyl ACP reductase	Drug target		8–43
Rifampicin (1966)	0.05–1	*rpo*B	β subunit of RNA polymerase	Drug target	Inhibition of RNA synthesis	95
Pyrazinamide (1952)	16–50 (pH 5.5)	*pnc*A	Nicotinamidase/pyrazinamidase	Pro-drug conversion	Depletion of membrane energy	72–97
Ethambutol (1961)	1–5	*emb*B	Arabinosyl transferase	Drug target	Inhibition of arabinogalactan synthesis	47–65
Streptomycin (1944)	2–8	*rps*L	S12 ribosomal protein	Drug target	Inhibition of protein synthesis	52–59
		rrs	16S rRNA	Drug target		8–21
		*gid*B	rRNA methyltransferase (G527 in 530 loop)	Drug target		?
Amikacin/kanamycin (1957)	2–4	*rrs*	16S rRNA 16S rRNA	Drug target	Inhibition of protein synthesis	76
Capreomycin (1960)		*tly*A	2′-O-methyltransferase			
Quinolones (1963)	0.5–2.5	*gyr*A	DNA gyrase subunit A	Drug target	Inhibition of DNA gyrase	75–94
		*gyr*B	DNA gyrase subunit B			
Ethionamide (1956)	2.5–10	*eta*A/*eth*A	Flavin monooxygenase	Prodrug conversion	Inhibition of mycolic acid synthesis	37
		*inh*A		Drug target		56
PAS (1946)	1–8	*thy*A	Thymidylate synthase	Drug activation?	Inhibition of folic acid and iron metabolism?	36

MIC = minimum inhibitory concentration; ACP = acyl carrier protein; PAS = para-aminosalicylic acid.

FIGURA 4. *Mecanismul rezistenţei la medicamentele antituberculoase (19)*

scrierea tratamentului optim. Apariţia metodelor moleculare este cea care a făcut posibilă scurtarea perioadei de detectare a rezistenţei. Zhang şi colaboratorii au sistematizat mecanismele de rezistenţă la medicamente antituberculoase, redate în Figura 4. (19)

Mutaţia cea mai bine studiată este cea care determină rezistenţa *M. tuberculosis* la rifampicina (RIF). RIF este un antibiotic antimicobacterian ce face parte din terapia standard a TB. În 96% din cazurile de rezistenţă la RIF, aceasta se datorează mutaţiilor în segmentul 81-pb al genei *rpoB* ce codează subunitatea β a ARN polimerazei (9,20,21).

Rezistenţa la izoniazidă (INH) este determinată de alterări în mai multe gene, dar mutaţiile în genele *katG şi inhA* s-au găsit în proporţie de 75-85% la tulpinile de *M. tuberculosis* rezistente la INH.

Bazele genetice ale rezistenţei la alte antibiotice antituberculoase sunt mult mai complexe: rezistenţa la streptomicină şi la alte aminoglicozide este determinată de mutaţii în gena 16S ARNr sau pe gena *rpsL*; rezistenţa la pirazinamidă (PYZ) este determinată de mutaţii în gena *pncA;* rezistenţa la ethambutol (ETH) este determinată de mutaţii în gena *embB*(9).

Tehnicile care permit detecţia mutaţiilor ce determină rezistenţa la diverse medicamente antituberculoase sunt:

Secvenţierea ADN-ului prin reacţia de polimerizare în lanţ se bazează pe amplificarea regiunii asociate rezistenţei, după care ampliconii sunt secvenţiaţi pentru a putea determina prezenţa sau absenţa mutaţiilor specifice.

Tehnici de hibridizare pe bandă, cu cele două sisteme comerciale: Inno-LiPA RifTB (Innogenetics, Gent, Belgium) şi Geno Type MDRTB*plus* (HAIN Lifescience, Nehren, Germany) ce detectează rezistenţa la RIF şi/sau INH şi Geno Type MDRTB*sl*, pentru detecţia rezistenţelor la fluoroquinolone, etambutol şi aminoglicozide. Ambele tehnici sunt specifice pentru MTC.

Inno-LiPA RifTB conţine 10 oligonucleotide pe banda de nitroceluloză: una pentru MTC, 5 pentru tulpinile sălbatice (S1-S5) şi 4 (R) pentru probe în vederea detecţiei celor mai frecvente mutaţii ce determină rezistenţa la RIF. Probele R folosite sunt: R2 *Asp615Val*, R4 *His526Tyr*, T4b *His 526Asp*, R5 *Ser531Leu*. O tulpină de *M. tuberculosis* este considerată sensibilă la RIF dacă toate cele 5 probe sălbatice dau un semnal pozitiv şi dacă cele 4 probe pentru rezistenţă sunt negative. Absenţa hibridizării în una sau mai multe din probele S semnifică o mutaţie ce trebuie identificată prin prin una din probele R. Inno-LiPA RifTB se recomandă a fi utilizat numai în probele în care există o cantitate mare de ADN şi nu poate fi utilizată direct în specimenele clinice.

Geno Type MTBDR*plus* identifică simultan MTC şi detectează cele mai comune rezistenţe în gena *rpoB* (rezistenta la RIF), *katG şi inhA* (rezistenţa la INH) (Fig. 5). Rezistenţa la rifampicină este identificată în 98,7% dintre cazuri, iar rezistenţa la HIN în 92% dintre cazuri folosind Geno-Type MTBDR*plus*. Acest test poate fi folosit atât pentru detecţia rezistenţelor la RIF şi INH în tulpinile de *M.tuberculosis* izolate pe medii de cultură solide sau lichide, cât şi direct din produsele patologice pozitive la microscopie (22).

Geno Type MTBDR*sl* pentru detecţia rapidă a rezistenţelor la fluoroquinolone, aminoglicozide de linia a 2-a (amikacină şi kanamicină), etambutol şi peptide ciclice (capreomicină) direct din prelevaţele clinice şi/sau din cultură. Specificitatea şi sensibilitatea sunt între 70-80%. Acest test este foarte util în detecţia rapidă a pacienţilor XDR-TB (23).

PCR-SSCP (protein chain reaction single strand conformation polymophisms) se bazează pe distorsiunea conformaţională pe care substituţia unei nucleotide o poate determina într-un singur fir al unui fragment ADN. Această schimbare conformaţională determină o mobilitate electroforetică diferită de cea a fragmentului unui singur fir al tulpinii sălbatice. Această metodă are o specificitate de 100% pentru rezistenţa la RIF şi INH şi o sensibilitate de 96% pentru RIF şi 87% pentru INH, utilizând 4 regiuni genetice (*rpoB*, *katG*, *inhA* şi *ahpC*). (8)

Metodologia Real-time PCR are o specificitate de 100% atât pentru rezistenţa la RIF, cât şi pentru cea la INH, iar sensibilitatea este de 98% pentru detecţia mutaţiilor responsabile de rezistenţa la RIF şi 85% pentru detecţia mutaţiilor responsabile de rezistenţă la INH.

Metoda Microarray are la bază regula de complementaritate a bazelor din mostre de ADN cunoscute cu cele din ADN-ul de identificat (24). Prin analiza unui singur fragment se pot afla informaţii despre mii de gene. O astfel de tehnică este cea cunoscută sub denumirea de TB-Biochip, prin care se pot depista rezistenţe la RIF şi INH. Tehnica biocipurilor a fost dezvoltată de A.D. Mirzabekov în anii 1980 în Federaţia Rusă şi a fost primul test de genetică moleculară de uz comercial folosit în diagnosticul TB-MDR.

GeneXpert MTB/RIF (Cepheid GeneXpert System, Sunnyvale) este un sistem închis, complet automatizat, cu card, pentru detecţia MTC şi a rezistenţei la RIF. Metoda constă într-o reacţie de

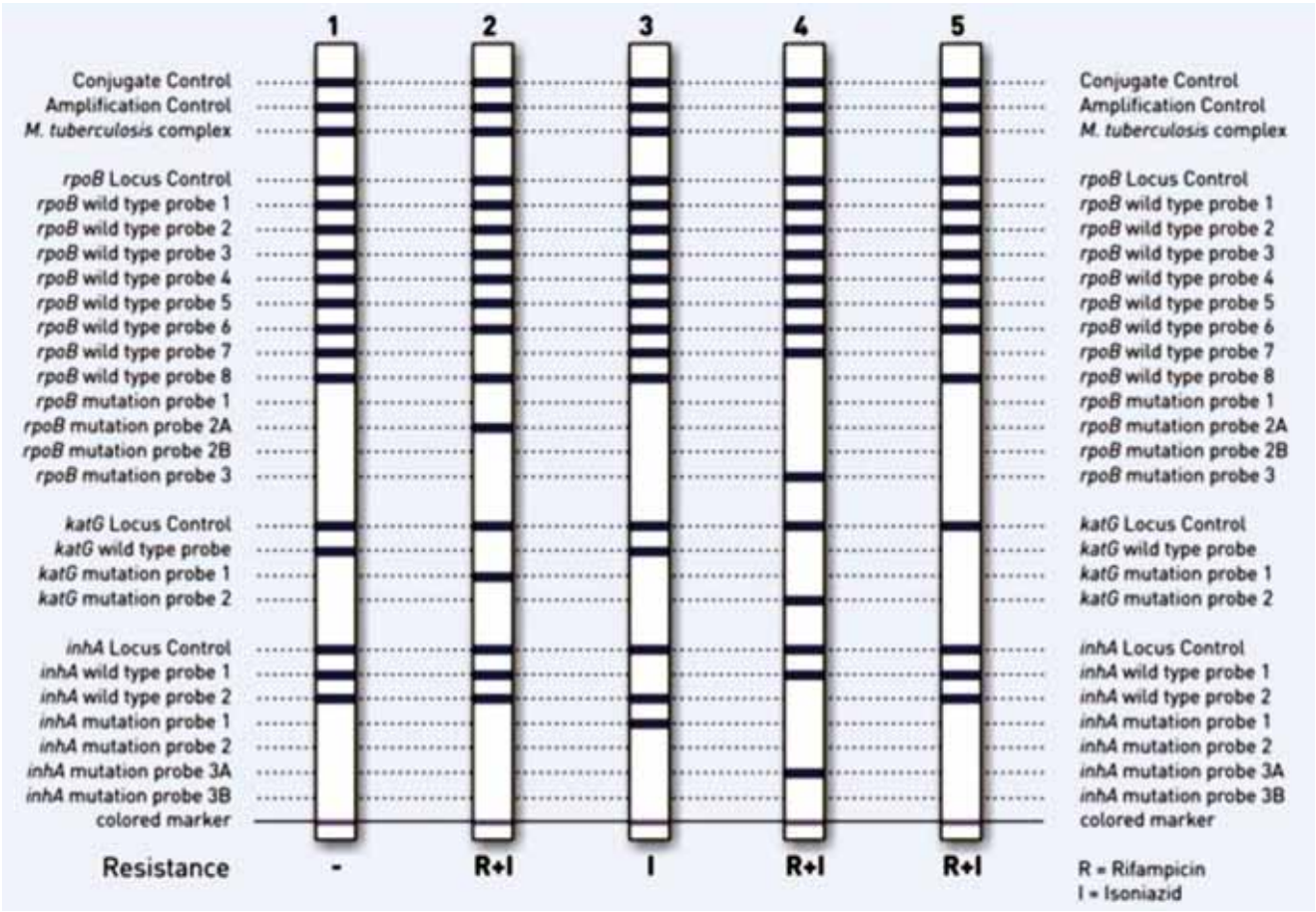

FIGURA 5. *Exemple cu benzi Geno Type MDRTB* ***plus*** *prezentând diverse tipuri de rezistenţe: 1) MT sensibil la RIF şi INH; 2) MT cu rezistenţă la RIF şi INH (MDR-TB); 3) MT cu monorezistenţă la INH; 4) MT cu rezistenţă la RIF şi INH (MDR-TB); 5) MT cu rezistenţă la RIF şi INH (MDR-TB).*

PCR în timp real şi analiza fragmentelor genetice de amplificare. Rezultatul se obţine în decurs de două ore şi riscul de contaminare este foarte mic. Dezavantajul este dat de costul ridicat al echipamentului şi al cardurilor de unică folosinţă.

Prin comparaţie cu antibiograma fenotipică pentru detecţia rezistenţei la RIF, sensibilitatea metodei este de 99,2%, până la 100% pentru prelevatele clinice pozitive la examinarea microscopică şi de 72,5% până la 84,6% pentru prelevatele clinice negative la examinarea microscopică, dar pozitive la cultură (25,26). OMS recomandă încă din anul 2010 utilizarea acestui sistem în ţările cu endemie TB crescută în diagnosticul iniţial al suspecţilor de MDR-TB şi al celor cu asociere HIV/TB, ştiut fiind că în 85% dintre cazuri rezistenţa la RIF se asociază rezistenţei la INH.

Pirosecvenţierea este o metodă relativ nouă de secvenţiere a ADN-ului micobacterian şi de depistare a rezistenţelor la medicamentele antituberculoase şi care s-a dovedit foarte bună. Există studii care au arătat o sensibilitate a metodei de 96,7% şi o specificitatea de 97,3%. (27) Este o metodă mai puţin costisitoare decât GeneXpert, dar rezultatele se obţin în 1-3 zile.

Metoda cromatografiei lichide de înaltă performanţă (HPLC) este o metodă de diferenţiere a micobacteriilor bazată de diferenţele de profil din acidul micolic. Acizii micolici sunt acizi graşi cu greutate moleculară mare ce se pot separa cromatografic, iar cromatograma este apoi interpretată după un model specific pentru fiecare specie de micobacterie. Este o metodă cu mare sensibilitate şi specificitate, dar care necesită o înaltă expertiză în recunoaşterea speciilor şi este greu de aplicat în laboratoarele de diagnostic curent şi nici nu poate fi folosită direct pe prelevatele clinice. (28)

Utilitatea clinică a metodelor moleculare este deosebită, ele scurtând perioada de diagnostic, dar niciuna din aceste metode nu înlocuieşte microscopia frotiului din prelevatul clinic şi cultură. Ele măresc capacitatea de diagnostic în măsura în care sunt corect interpretate, în context clinic şi în concordanţă cu caracteristicile lor de performanţă, dar şi ale laboratorului ce le efectuează.

BIBLIOGRAFIE

1. **Cornaglia G., Courcol R., Herrmann J.-L., Kahlmeter G., Peigue-Lafeuille H., Vila J.** – European Manual of Clinical Microbiology, first edition, ESCMID, 2012
2. **WHO** – New laboratory tools for tuberculosis control. 2009.
3. **A. Somoskovi, Z. Bartfai, C. Kodmon, I. Hutas** – Routine direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* with a rapid test of polymerase chain reaction applied to a Hungarian patient population. *Orv Hetil,* 2001. 142 (38): 2085-2090.
4. **A. Somoskovi, Judit Mester, Yvonne M. Hale, Linda M. Parsons, M. Salfinger, MD.** – Laboratory diagnosis of nontuberculous mycobacteria. *Clin Chest Med*, 2002. 23 (3): 585-597.
5. **S. Narayanan** – Molecular epidemiology of tuberculosis, *Indian J Med Res* 120, October 2004, p.233-247.
6. **Lebruni L, Espinasse F., Poveda J.V. Vincent-Levy-Frebault** – Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol*. 1992; 30: 2476-2478.
7. **Karen L. Kaul** – Molecular Detection of Mycobacterium tuberculosis; Impact on Patient Care, *Clinical Chemistry*, 2001, vol.47, No.8, 1553-1558.
8. **Sharma N, Sharma V, Singh PR, Jawed B, Babu V, Kandpal J, Nautiyal SC, Singh RK** – Tuberculosis and Molecular Diagnosis, *WebmedCentral Biotechnology* 2013; 4(2):WMC003992.
9. **Hanna Soini and James Musser** – Molecular Diagnosis of Mycobacteria, 2001. *Clinical Chemistry* 47:5, p. 809-814.
10. **Bergman JS, Youh G, Fish G, Woods GL.** – Clinical evaluationof the enhanced Gen-Probe amplified Mycobacterium tuberculosis direct test for rapid diagnosis of tuberculosis in prison inmates, *J Clin Microbiol* 1999; 37:1419-1425.
11. **Dag Harmsen, Jorg Rothgange, Matthias Frosch, and Jurgen Albert** – RIDOM: Ribosomal Differentiation of Medical Micro-organisms Database, *Nucleic Acids Research*, 2002, January 1; 30(1):416-417.
12. **Andrea Gori, Alessandra Bandera, Giulia Marchetti, Anna Degli Esposti, Lidia Catozzi, Gian Piero Nardi, Lidia Gazzola, Giulio Ferraio, Jan D.A. van Embden, Dick van Soolingen, Mauro Moroni, and Fabio Franzetti** – Spoligotyping and *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Infectious Diseases*, vol.11, No.8, August 2005.
13. **ECDC/WHO Regional Office for Europe** – Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe, Stockholm: *ECDC* 2013.
14. **Richard C. Huard, Luiz Claudio de Oliveira Lazzarin, W. Ray Butler, Dick van Soolingen, and John L. Ho.** – PCR-Based Method To Differentiate the Subspecies of the *Mycobacterium tuberulosis* Complex on the Basis of Genomic Deletion, 2003. *J Clin Microbiol*, p. 1647-1650.
15. **E.M. Streicher, T.C. Victor, G. van der Spuy, C. Sola, N. Rastogi, P. D. Van Helden, and R. M. Warren** – Spoligotype Signatures in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *J Clin Microbiol*, 2007, p.237-240.
16. CDC http://cdc.gov/tb/programs/genotyping/
17. **Philip Supply** – Multilocus Variable Number Tanden Repeat Genotyping for *Mycobacterium tuberculosis*. *Technical Guide*.2005. Institute de Biologie/Institute Pasteur de Lille.
18. **G. Canetti, S. Froman, J. Grosset, P. Hauduroy, Miloslava Langerova, H. T. Mahler, Gertud Meissner, D. A. Mitchinson, and L. Sula.** – Mycobacteria: Laboratory Methods for Testing Drug Sensivity and Resistance. *Bull WHO*. 1963, 29: 565-578.
19. **Zhang Y, Yew W. W.** – Mechanism of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. 2009. *Int J Tuberc Lung Dis,* 139(11):1320-1330.
20. **M. Syaifudin** – Molecular Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and Analysis of Its Resistance to Rifampin in Sputa From Tuberculosis Suspected Patients, *Atom Indonesia*, vol.36, no.2(2010), 51-58.
21. **Morgan M., Kalantri S., Flores L., and Pai M.** – A commercial line probe assay for the detection of rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis: a systematic review and meta-analysis: *BMC Infect. Dis*, 2005, 5: 62.
22. **Somoskovi A., Dormandy J., Mitsani D., Rivenburg J., Salfinger M.** – Use of smear-positive samples to assess the PCR-based genotype MTBDR assay for rapid, direct detection of the Mycobacterium tuberculosis complex as well as its resistance ti isoniazid and rifampin, 2006, *J. Clin. Microbiol,* 44, 4459-4463.
23. **Crudu V., Romancenco E.** – Diagnosticul microbiologic al tuberculozei – GHID. Ministerul Sanatatii din Rep. Moldova. Institutul de Ftiziopneumologie. Lab. National de Referinta in microbiologia tuberculozei, 2012.
24. **Heyman S.J., Brewer T.F., Wilson M.E.** – (1999). The need for global action against multiresistant tuberculosis. *JAMA*, vol 281, No.1, 2138-2140.
25. **Sandgren A., Hollo V., Huitric E., Kodmon C.** – Epidemiology of tuberculosis in EU/EEA in 2010 – monitoring the progress towards tuberculosis elimination. *Euro Surveill.*2012;17(12):pii=20124.
26. **WHO** – New laboratory diagnostic tools for tuberculosis control. Geneva: World Health Organization, 2008. http://whqlibdoc.who.int/publication/2008/9789241597487.
27. **Lulette Tricia C. Bravo, Marion J. Tuohy, Concepcion Ang, Raul V. Destura, Myrna Mendoza, Gary W. Procop, Steven M. Gordon, Geraldine S. Hall, and Nabin K. Shrestha.** – Piroquencing for Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* Resistance to Rifampin, Isoniazid, and Fluoroquinolones. *J Clin Microbiol*, 2009, p. 3985-3990.
28. **N. Esther Babady and Nancy L. Wengenack.** – Clinical Laboratory Diagnostics for *Mycobacterium tuberculosis* (2012), Understanding Tuberculosis – Global Experiences and Innovative Approaches to the Diagnosis, Dr. Pere-Joan Cardona(Ed).