

METODE RAPIDE DE DIAGNOSTIC A TUBERCULOZEI

MIRELA MITREA¹, ADRIANA RĂDULESCU²

^{1,2}Spitalul de Pneumoftiziologie Sibiu

Cuvinte cheie: tuberculoza, multidrogrezistentă, metode moleculare

Rezumat: Tuberculoza reprezintă o infecție transmisibilă care netratată sau tratată incorect are o mortalitate crescută. În contextul actual, odată cu apariția numeroaselor schimbări în tabloul clinic al infecțiilor micobacteriene (în principal datorită asocierii comorbidităților), și definirii noilor forme multidrogrezistente cu frecvență crescută, se impun modificări majore în diagnosticul de laborator, cu necesitatea implementării metodelor moderne de detectare rapidă a diviziunii micobacteriene și a susceptibilității acestora la antibiotice, crescând eficiența terapiei și scăzând riscul dezvoltării suplimentare a multidrogrezistenței. Metode disponibile la ora actuală în lume sunt sistemul BACTEC 460, BACTEC 9000, metoda MB/BacT, metoda nitrat-reductazei (NRA). Metodele genetice, mai puțin accesibile implicând sondele de hibridizare ADN, reacția lanțurilor de polimerază PCR (Polimerase Chain Reaction) reprezintă opțiuni de viitor.

Keywords: tuberculosis, multidrug resistance, molecular methods

Abstract: Tuberculosis is infection with a high risk fatality when untreated or unfairly treated. Nowadays, when have taken changes in clinical appearance of mycobacterial infections (mainly due to association of comorbidities), and define new multidrug resistant forms with increased frequency, required major changes in laboratory diagnosis. It proves the necessity of implementing modern methods of rapid detection mycobacterial division and their susceptibility to antibiotics, increasing therapy efficiency and decreasing the risk of supplementary developing of multidrug resistance. Methods currently available in the world are BACTEC system 460, BACTEC 9000, MB /BacT method, nitrate reductase method (NRA). The genetic methods, involving DNA hybridization probes, Polymerase Chain Reaction (PCR), less accessible, are options for the future.

ARTICOL ȘTIINȚIFIC DE SINTEZĂ BIBLIOGRAFICĂ

În ultimele decenii, tuberculoza multidrogrezistentă (TB MDR), iar în ultimii ani prin forma sa extensivă (extensive drug resistance, TB XDR), a devenit o amenințare importantă în controlul terapeutic al bolii (20). Se estimează că doar 2% din cazurile de TB MDR în întreaga lume sunt tratate în mod corespunzător, acest lucru datorându-se parțial și serviciilor de laborator încă ineficiente.(1)

Antibiograma pentru *Mycobacterium tuberculosis* este solicitată în special în caz de recădere sau multidrogrezistență (MDR) fiind metoda de referință în detectarea tulpinilor rezistente. În urma testării convenționale pe medii solide este nevoie de două luni sau mai mult pentru a confirma diagnosticul. Examenele bacteriologice în scop diagnostic se vor efectua înainte începerii oricărui tratament antituberculos, astfel prelungind timpul de așteptare până la începerea terapiei țintite conform antibiogramei. În această perioadă, pacienții infectați cu germeni multidrogrezistenți pot răspândi boala în comunitate. Uneori decesul survine înainte obținerii rezultatelor, îndeosebi în cazul pacienților coinfectați HIV.

Progresele realizate în domeniul biologiei moleculare au condus la apariția unor noi metode care ameliorează semnificativ performanțele celor clasice. (3)

A apărut necesitatea utilizării metodelor rapide de cultură, precum BACTEC, sau mai recent metoda sondelor de hibridizare ADN și analiza PRFL (Polimorfism de Restricție a Lungimii Fragmentelor de ADN). În laboratoarele actuale moderne, utilizarea mediilor lichide, cu detectarea radiometrică

a creșterii (de ex. BACTEC-460) și identificarea tulpinilor izolate prin probe pentru acizii nucleici, au înlocuit metodele tradiționale de izolare pe medii solide și de identificare prin teste biochimice. Aceste metode noi au scăzut timpul necesar pentru izolarea tulpinii la 2-3 săptămâni.

Sistemul BACTEC 460 este un sistem de detecție radiometric, pe când metoda MB/BacT monitorizează colorimetric multiplicarea micobacteriilor incubate pe medii lichide. Pozitivarea culturilor poate apărea începând de la 4 zile. Detecția respirometrică BACTEC necesită 7-25 de zile. (11)

BACTEC este un sistem de detecție radiometric ce folosește medii care conțin acid palmitic marcat cu ¹⁴C, care este catabolizat de *Mycobacterii*, eliberând ¹⁴CO₂, cuantificat cu ajutorul sistemului automat (ex. BACTEC 460) pe o scară etalonată de la 0 la 999. Numărul citit precizează indicele de creștere = growth index (GI), care este direct proporțional cu rata de creștere a micobacteriilor. Sistemul utilizează un mediu de tip Middlebrook, suplimentat sau nu cu o soluție antibiotică ce conține polimixină B, azlocilină, acid nalidixic, trimetoprim și amfotericina B (PANTA). (2) Tuburile speciale BACTEC se citesc de 2 ori săptămânal în primele 3 săptămâni și săptămânal în următoarele 3-4 săptămâni înainte de a fi declarate negative. Timpul necesar pozitivării culturii în acest sistem este mult mai mic comparativ cu cel necesar folosirii unui mediu solid. Pentru unele micobacterii non-tuberculoase pozitivarea poate apărea în mai puțin de 7 zile, iar pentru *M. tuberculosis* în 4-25 de zile. Cu ajutorul sistemului BACTEC se testează și sensibilitatea la chimioterapice, iar timpul necesar scade la mai puțin de 10 zile,

¹Autor Corespondent: Mitrea Mirela, str. Oașa nr. 10, ap. 7, Sibiu, România; e-mail: mirela_m_mitrea@yahoo.com; tel +40-00731322178
 Articol intrat în redacție în 28.05.2011 și acceptat spre publicare în 24.10.2011
 ACTA MEDICA TRANSILVANICA Decembrie 2011; 2(4)140-141

REFERATE

comparativ cu 3 săptămâni în cazul antibiogrammei convenționale. În sistemul BACTEC 9000 se elimină riscul utilizării unor substanțe radioactive. (5)

Metoda MB/BacT monitorizează colorimetric multiplicarea micobacteriană eliminând dezavantajele radiometriei. Tuburile cu mediu lichid au un detector colorimetric, a cărui culoare virează de la verde închis la galben, pe măsura acumulării CO₂ produs în cursul metabolismului micobacterian. Atunci când multiplicarea bacteriană atinge o densitate de 10⁶-10⁷ germeni/ml., aparatul semnalează optic și sonor pozitivitatea culturii. Mediului de cultură i se adaugă în prealabil o soluție cu factori care stimulează multiplicarea germeilor („soluție de reconstituire”), iar în cazul produselor patologice o mixtură de antibiotice în scopul prevenirii supraînfectării culturii. În cazul tuberculozei pulmonare, rezultatul pozitiv se obține în medie cu 10 zile mai repede decât în cazul folosirii mediilor solide clasice. În 20-25% din cazuri, semnalul pozitiv poate apărea în 5-7 zile. (5) (9) (4)

Altă metodă simplă, rapidă și accesibilă propusă a fi introdusă este **metoda nitrat-reductazei (NRA) (directă și indirectă)**, comparată cu metoda standard a proporțiilor în determinarea antibiogrammei *M.tuberculosis*, în scopul evaluării eficienței și utilității acesteia ca metodă de screening. Metoda este rapidă și ieftină, putând fi aplicată direct probelor biologice de spută, aducând un mare beneficiu pentru Programele Naționale de Control al Tuberculozei, conferind o monitorizare rapidă a pacienților pasibili de TB-MDR (1). Metoda valuează sensibilitatea *M. tuberculosis* la antibiotice, folosind mediul Löwenstein-Jensen. Se bazează pe capacitatea *M. tuberculosis* de a reduce nitratul la nitrit, prin acțiunea enzimei nitrat-reductază, semnalată prin virajul de culoare după adăugarea reactivului Griess. NRA permite detectarea rapidă a creșterii micobacteriilor, cu rezultate rapide în 10-14 zile față de 42 zile prin metoda proporțiilor. (7) Sensibilitatea și specificitatea înregistrate prin NRA directă sunt de ca. 75% și 100% pentru rifampicină, respectiv 75% și 98,4% pentru izoniazidă. În cazul metodei indirecte acestea sunt de 77,7% și 92% pentru rifampicină, respectiv 85,7% și 85,2% pentru izoniazidă. (8)

Una dintre tehnicile de diagnostic cele mai promițătoare implică amplificarea și detectarea segmentelor specifice de ADN prin reacția de polimerizare în lanț - **Polimerase Chain Reaction (PCR)**. PCR poate fi de utilitate maximă în diagnosticul formelor paucibacilare de tuberculoză pulmonară sau extrapulmonară. Datorită costurilor ridicate, această metodă nu este accesibilă de rutină.

CONCLUZII

Metodele moleculare de identificare și determinare a susceptibilității germeilor la antibiotic sunt extrem de valoroase în cazul germeilor cu creștere lentă pe medii artificiale, precum cazul *M. tuberculosis*.

Diagnosticul TB depinde de izolarea și identificarea *M. tuberculosis* iar controlul eficient al TB MDR depinde de rapiditatea și sensibilitatea rezultatelor de laborator.

Metoda BACTEC (sistemul BACTEC 460TB, BACTEC 9000, MB/BacT) sau sistemul NRA au avantajul rapidității rezultatului față de metodele convenționale și reduc cheltuielile de timp și lucru reclamate de aceste metode.

Recunoașterea precoce a cazurilor de TB MDR/XDR, prin folosirea metodelor rapide de detecție a rezistenței, ar reduce considerabil durata terapiei convenționale ineficiente, promovând administrarea terapiei adecvate conform rezistenței individuale, reducând semnificativ costurile de diagnosticare și de tratament.

Utilizarea largă a acestor metode sensitive și rapide este necesară și ar aduce mari beneficii în viitor în lupta pentru

identificarea, tratarea și eradicarea TB și în special a formelor rezistente de boală.

BIBLIOGRAFIE

1. Affolabi D, Odoun M, Martin A, Palomino J C, Anagonou S, Portaels F – Evaluation of direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* rifampin resistance by a nitrate reductase assay applied to sputum samples in Cotonou, Benin. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2123–2125;
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Approved Guideline M29-A3. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 3rd ed. CLSI, Wayne, Pa;
3. Cristian Didilescu, Olimpia Nicolaescu. Tuberculoza pulmonară. Ghid de diagnostic și tratament. P. 161-162;
4. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC). Official Journal L262, 17/10/2000, p. 0021-0045;
5. Garner, J.S. 1996. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for isolation precautions in hospitals. *Infect. Control Hospital Epidemiol.* 17: 53-80;
6. Kent, P.T., and G.P. Kubica. 1985. Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA.
7. Martin A, Montoro E, Lemus D, et al – Multicenter evaluation of the nitrate reductase assay for drug resistance detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol Methods* 2005; 63: 145–150;
8. Testarea sensibilității *Mycobacterium Tuberculosis* prin metoda Nitrat-reductazei. Dr. Violeta Melinte, Dr. Maria Nica, Dr. Tatiana Biolan, Dr. Amalia Dascălu, *REVISTA ROMÂNĂ DE BOLI INFECȚIOASE – VOLUMUL XIII, NR. 4, AN 2010, 210;*
9. U.S. Department of Health and Human Services. 2007. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC), 5th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C;
10. World Health Organization The WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance. Antituberculosis drug resistance in the world, report no. 3. WHO/ HTM/TB/2005.349. Geneva, Switzerland: WHO, 2004;
11. <http://www.esanatos.com/boli/bolile-infecioase/Diagnosticul-de-tbc-la-copil-m21596.php>, Accesat la 20 sept. 2011.