

Prezent și perspective în diagnosticul rapid molecular al tuberculozei și al MDR- TB

(partea a doua)

Mihaela Tănăsescu¹,
Cristian Didilescu²,
Constantin Marica³

1. Institutul de Pneumologie
„Marius Nasta”, București;

2. Universitatea de Medicină
și Farmacie Craiova;

3. Universitatea de Medicină
și Farmacie „Carol Davila”,
București

Correspondence:
Dr. Mihaela Tănăsescu
Institutul de Pneumologie
„Marius Nasta”
Șos. Viilor 90, sector 5, București
e-mail: mihaeleta@yahoo.co.nz

Abstract

Present and expectations for rapid molecular diagnosis of TB and MDR-TB

Tuberculosis is still one of the diseases with a major medical and social impact, and in terms of early diagnosis (which would imply a fair treatment and established at the time), difficulties related to the delay bacilli isolation in culture, decreased susceptibility testing methods to antituberculosis drugs, lack of methods for differentiation of *M. Tuberculosis* complex germs of non-TB *Mycobacteria*, may have important clinical implications. Traditional testing of anti-TB drug susceptibility on solid Löwenstein-Jensen medium (gold standard) or liquid media can only be performed using grown samples. Determining the time it takes up to 42 days on solid media and 12 days for liquid media. For MDR/XDR TB cases it is absolutely essential to reduce the detection time. In these cases rapid diagnostic methods prove their usefulness. Automatic testing in liquid medium, molecular hybridization methods are currently recommended by the current WHO guidelines. Rapid diagnosis of MDR-TB is extremely useful for the early establishment of an effective treatment tailored more accurately on the spectrum of sensitivity of the resistant strain (thus reducing the risk of developing additional resistance to other drugs) and control the spread of these strains. Genetic diagnostic methods, approved and recommended by the WHO, can reduce the time of diagnosis of TB case and, importantly, the case of MDR-TB. They do not replace the current standard diagnostic methods and resistance profile, but complete them in selected cases.

Keywords: tuberculosis, MDR-TB, *Mycobacterium tuberculosis*, molecular diagnosis

Rezumat

Tuberculoza este încă una dintre afecțiunile cu un important impact medical și social, iar din perspectiva diagnosticului precoce (ce ar implica un tratament corect și instituit la timp), dificultățile legate de întârzierea izolării bacililor în cultură, sensibilitatea scăzută a metodelor de testare la drogurile antituberculoase, lipsa metodelor de diferențiere a germenilor aparținând complexului *M. Tuberculosis* de micobacteriile non-TB pot avea implicații importante în clinică. Testarea tradițională a sensibilității la droguri anti-TB pe mediul solid Löwenstein-Jensen (standardul de aur) sau pe medii lichide poate fi efectuată numai prin utilizarea de eșantioane cultivate. Timpul de determinare durează până la 42 de zile pe medii solide și până la 12 zile pe medii lichide. Pentru cazurile de MDR/XDR TB este absolut esențială reducerea timpului de detectare. În aceste cazuri își dovedesc utilitatea metodele rapide de diagnostic. Testarea în sisteme automate în mediul lichid și metodele moleculare de hibridizare liniară sunt în prezent recomandate de ghidurile OMS actuale. Diagnosticul rapid al cazurilor de MDR-TB este extrem de util pentru instituirea precoce a unui tratament eficient, adaptat cât mai fidel spectrului de sensibilitate al tulpinii rezistente (reducând astfel și riscul de dezvoltare a rezistenței suplimentare la alte droguri) și în controlul răspândirii acestor tulpini. Metodele genetice de diagnostic, aprobate și recomandate de OMS, pot reduce timpul de diagnostic al cazului de TB și, foarte important, al cazului de MDR-TB. Acestea nu înlocuiesc metodele actuale standardizate de diagnostic și al profilului de rezistență, dar le completează în cazuri selecționate.

Cuvinte-cheie: tuberculoză, MDR-TB, *Mycobacterium tuberculosis*, diagnostic molecular

Metodele de identificare genetică

Se bazează pe metodele genotipice și au fost utilizate inițial în laboratoarele de cercetare, ulterior fiind folosite în diagnosticul de laborator, prin utilizarea unor kit-uri comerciale de diagnostic pentru identificarea micobacteriană.

Determinarea enzimei de restricție prin PCR

Determinarea enzimei de restricție prin PCR (PRA) se bazează pe amplificarea secvenței 441-bp a genei *hsp65* prin PCR, urmată de digestia produsului de amplificare cu ajutorul a două enzime: BstEII și

HaeIII^{12,23,24}. Produșii reacției de digestie sunt apoi separați și vizualizați prin electroforeză pe gel agar. Pattern-ul restrictiv astfel obținut este comparat cu un algoritm preexistent. Metoda PRA poate fi aplicată unei suspensii bacteriene prelucrate, obținute prin creștere pe mediu solid sau lichid.

Este o metodă alternativă la numeroase alte metode de identificare costisitoare^{1,12}. Metoda a mai fost utilizată pentru identificarea micobacteriei, apelându-se la amplificarea genetică și a altor secvențe localizate la nivelul unor gene ca *rpoB* și *gyrB*, cu rezultate bune²³.



Figura 1. Spoligotiparea – Locus cromozomial cu regiunile DR (fragment). Secvențele spacer utilizate în spoligotipare

Sondele ADN

Reprezintă una din cele mai de succes metode moleculare.

- AccuProbe

Sistemul precursor AccuProbe a fost dezvoltat în urmă cu 20 de ani. Este singurul sistem care nu necesită amplificarea anterioară a secvenței-țintă. Sonda este reprezentată de un polimer al ADN monocatenar – oligonucleotidă, complementară unei secvențe scurte specifice aparținând unei regiuni hipervariabile a ADN-ului ribozomal 16S. Este marcată cu un ester, o moleculă chemoluminiscentă, care generează lumină când este excitată adecvat²³.

Odată cu scăderea temperaturii prin utilizarea undelor sonore, extractul este pus în contact cu sonda, urmând procesul de hibridizare doar în cazul în care există 100% complementaritate. Kit-urile AccuProbe sunt disponibile pentru identificarea micobacteriilor aparținând complexului *M. tuberculosis*, *M. avium* și speciilor *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. avium* și *M. intracellulare*^{12,27}. Pot fi utilizate pe medii de cultură atât solide, cât și lichide. Echipamentul necesar presupune un sonicator pentru lizarea celulară și un dispozitiv luminiscent pentru citirea finală. Conform datelor din literatură, sensibilitatea și specificitatea AccuProbe sunt foarte bune¹².

Spoligotyping (Spoligotiparea)

Se bazează pe polimorfismul ADN-ului micobacterian, structură prezentă într-un locus cromozomial particular (regiunea DR, Direct Repeat) – pus în evidență numai în cadrul tulpinilor aparținând complexului *M. Tuberculosis*⁴⁰.

Prin amplificarea PCR a secvențelor din regiunea DR și utilizarea unei tehnici de hibridizare a secvențelor complementare acestora se realizează un aspect tip „cod de bare” (figura 1). Prin compararea regiunilor DR provenind de la tulpini diferite de *M. Tuberculosis* s-a constatat că ordinea secvențelor spacer este în general aceeași, dar pot apărea deleții/ inserții. Identificarea profilului secvențelor spacer caracteristice pentru complexul *M. Tuberculosis* permite diagnosticul de specie, cât și studierea tulpinii din punct de vedere epidemiologic^{2,9,40}. Metoda este rapidă, specifică și sensibilă.

Spoligotiparea

Polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism)

Utilizează existența unor secvențe ADN repetitive de tipul secvenței de inserție IS 6110 constituită din 1355 de perechi de baze, prezentă exclusiv în genomul

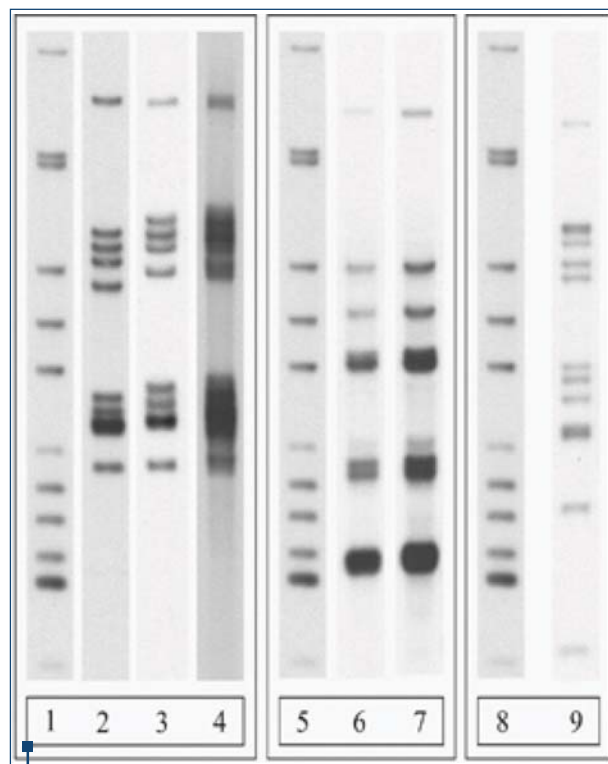


Figura 2. Spectrul fragmentelor de ADN evidențiat prin electroforeză pentru diverse tulpini izolate, comparativ cu tulpini de referință^{1,5,8}

speciilor de *M. Tuberculosis*. În plus utilizează enzime de restricție capabile să recunoască și să decupeze ADN-ul în puncte specifice^{11, 20, 40}.

Secvențele de inserție ADN conțin situsuri de acțiune a enzimelor de restricție, fragmentându-se astfel lanțul ADN în segmente variabile (în funcție de numărul și localizarea IS 6110) caracteristice pentru fiecare tulpină de *M. Tuberculosis*. Spectrul fragmentelor de ADN este evidențiat prin procedee electroforetice, rezultând un aspect caracteristic pentru fiecare tulpină – „fingerprinting” (figura 2). Metoda poate fi folosită în ancheta epidemiologică de filiațiune, putându-se identifica nu doar specia, ci și tulpini individuale^{8,9,13,21}.

Reacția lanțurilor de polimerază - polimorfismul conformației lanțului monocatenar (PCR – SSCP Polymerase Chain Reaction – Single Strand Conformation Polymorphism)

Metodă genică directă de determinare a chimioresistențelor: combină o etapă de amplificare PCR cu o

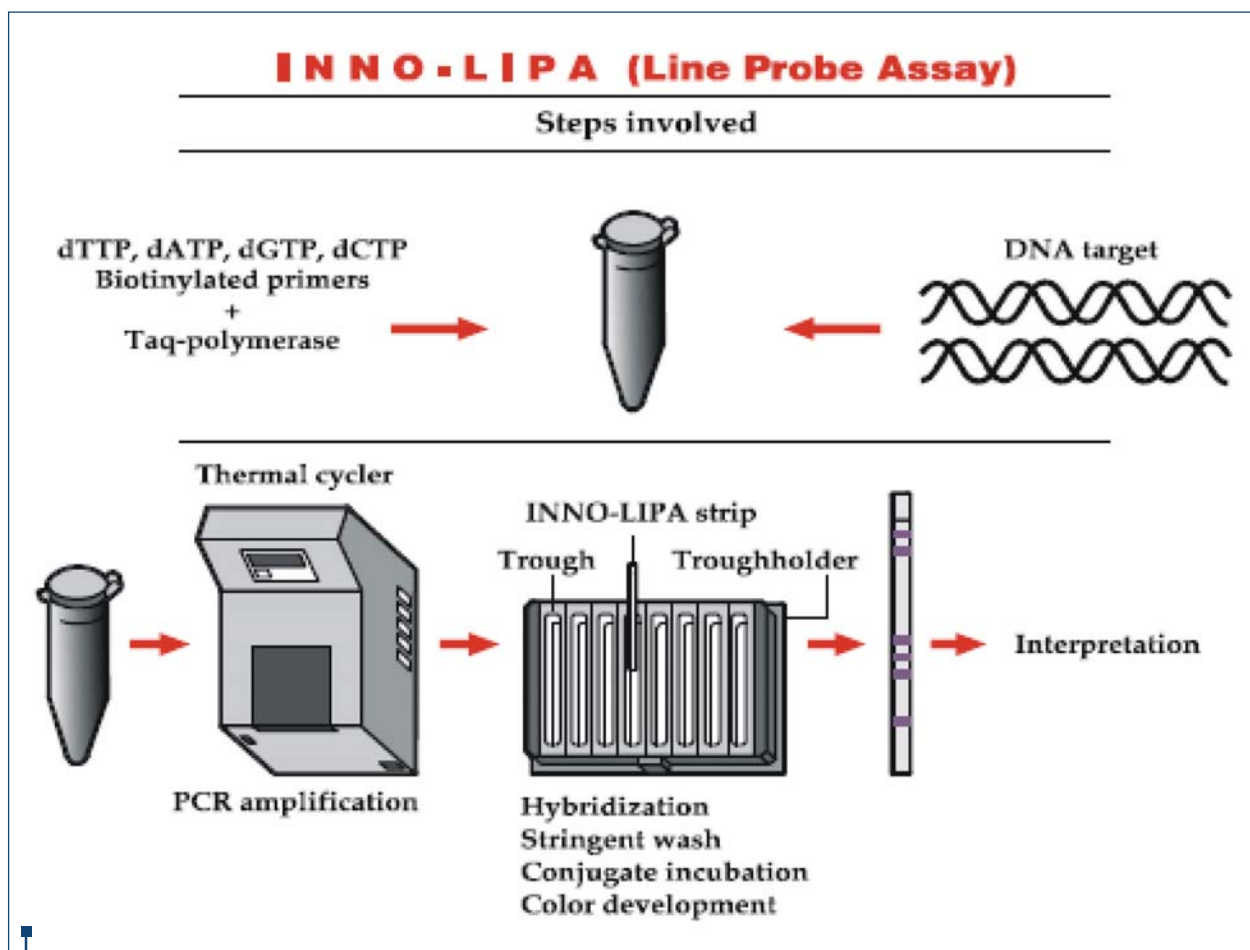


Figura 3. Etapele de lucru ale testului INNO-LiPA Rif TB

etapă de denaturare prin caldură a celor două lanțuri complementare de ADN. Lanțurile monocatenare capătă o conformație caracteristică.

Prezența unei mutații (ca, de exemplu, cea care determină fenotipic chimiorezistența) determină modificarea conformației, având drept consecință migrarea diferită electroforetic a acestor lanțuri, comparativ cu lanțul izolat cu sensibilitate păstrată. PCR-SSCP este o metodă fiabilă și rapidă de detecție a rezistenței la RMP¹⁹. Metoda poate fi utilizată pentru culturile BACTEC pentru detecția directă și rapidă (24 de ore) a rezistenței în spute intens pozitive⁴⁰.

Se poate utiliza și pentru mutațiile genelor implicate în rezistența și la alte tuberculostatice: HIN, SM, fluorochinolone. Sensibilitatea metodei pentru acestea din urmă este mai mică, din cauza implicării și altor mecanisme în chimiorezistență decât cele genetice (90% pentru RMP; 78% pentru HIN; 60% pentru SM).

GeneXpert MTB/RIF (Cepheid GeneXpert System, Sunnyvale)

Este un sistem închis, complet automatizat, pentru detectarea și identificarea simultană a complexului *M. tuberculosis* și a rezistenței la RMP ce utilizează reacția de polimerizare în lanț în timp real (Real Time PCR).

Sistemele bazate pe „real time” și PCR cantitativ înregistrează amplificarea și polimerizarea pe măsură ce acestea se desfășoară, spre deosebire de PCR clasic în care rezultatele sunt colectate la sfârșitul reacției^{10, 41}.

Avantajul major al tehnicii „real time” PCR îl constituie rapiditatea obținerii rezultatului și riscul mic de contaminare. Dezavantajul îl constituie costul crescut al echipamentelor și necesitatea personalului instruit. Sistemul GeneXpert dispune de cartușe de unică folosință în platforma specifică pentru procesarea produselor și analizarea fragmentelor genetice amplificate. Poate fi folosit pentru culturi sau pentru spută, cu generarea rezultatului în mai puțin de două ore, comparativ cu metoda clasică, unde rezultatul se obține, în medie, în două săptămâni^{10,19}.

Este aplicabil singur, având ca scop inițierea tratamentului doar în zonele în care prevalența TB MDR este mai mare de 15%. Dacă prevalența TB MDR este mai mică de 5%, este necesară confirmarea rezultatelor prin orice alt test pentru diagnosticul definitiv al rezistenței la RMP¹⁹.

Comparată cu ABG fenotipică pentru detectarea rezistenței la RMP, sensibilitatea metodei variază între 99,2 și 100% în cazul produselor pozitive la exa-

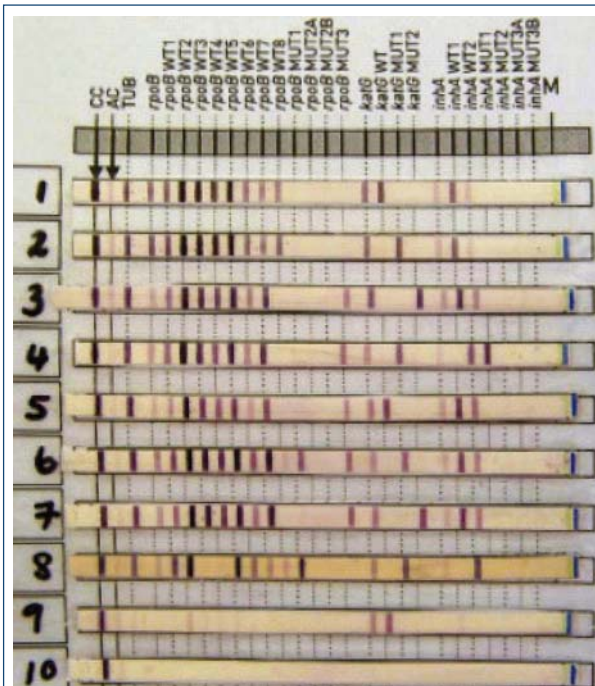


Figura 4. Exemplu de strip GenoType MTBDRplus

1. *M.tuberculosis* sensibil la INH și RMP;
2. *M.tuberculosis* monorezistent la INH- mutația katG S315T1
3. MDRTB, mutația rpoB S351L și katG S315T2
4. MDRTB, mutația rpoB S351L, katG S315T1 și inhA C15T
5. *M.tuberculosis* monorezistent la RMP- mutația rpoB în regiunea 530- 533
6. MDRTB, mutația rpoB D516V și katG S315T1
7. MDRTB, mutația rpoB S351L și katG S315T2
8. MDRTB, mutația rpoB D516V, katG S315T1 și mutația inhA -15/ -16
9. Test neinterpretabil
10. Test negativ de control

menul microscopic și între 72,5% și 84,6% în cazul produselor negative la examenul microscopic, dar care se dovedesc a avea culturi pozitive. Specificitatea este de 99,2-100% în cazul testării culturilor^{16,18,43}.

Line probe assay (Metodele de Hibridizare Liniară)

Metoda utilizează tehnologia revers hibridizării cu diferite sonde ADN specifice imobilizate în linii paralele pe stripuri de hârtie.

Secvența-tintă de ADN este amplificată PCR utilizând primeri biotinilați și, în final, incubată cu stripul. Sonda de hibridizare se evidențiază sub forma unei benzi colorate, care se constituie după adăugarea unei enzime marcate cu streptavidin și a unui substrat cromogen³⁰. Specificitatea sondei de hibridizare este indicată de poziția benzii colorate pe strip.

În 2008, OMS a aprobat și recomandat ca metodele de hibridizare liniară să fie aplicate direct la toate sputele pozitive la examenul microscopic pentru a detecta rapid rezistența la RMP, și prin urmare a MDR TB (RMP rezistența putând fi considerată indicator de MDR)^{10,30,43}. Au avantajul rapidității și al standardizării^{43,44}. Nu elimină necesitatea folosirii culturii și ABG convenționale, cu atât mai mult, cu cât ABG convențională este necesară pentru testarea substanțelor anti-TB de linia a doua^{14,16,43}.

Există trei metode comerciale disponibile; INNO-Lipa MYCOBACTERIUM, GenoType Mycobacterium și GenoType MTBC.

1. INNO Lipa Mycobacteria

Sondele INNO Lipa Mycobacteria sunt secvențe

specifice de specie care aparțin unei regiuni de transcripție (ITS) interpusă între genele ARN ribozomal 16S și 23S. Sistemul include o sondă specifică de gen *Micobacterium*, două sonde complexe specifice (*M. Tuberculosis* și *M. Avium*) și 23 de alte sonde compatibile pentru identificarea a 18 specii și câteva variante specifice.

Testul INNO-LiPA Rif TB (Innogenetics, Ghent, Belgia) (figura 3), care poate detecta simultan complexul *M. Tuberculosis* și mutațiile în gena rpoB, deci rezistența RMP. Este aplicabil pe culturi în mediul solid sau lichid, dar poate fi aplicat și produselor patologice. Sensibilitatea și specificitatea variază între 82 și 100%, respectiv 92-100%^{19,36,39}. Limita acestui test constă în faptul că nu poate detecta și rezistențe la alte substanțe anti-TB^{10,19}.

2. GenoType Mycobacterium

Sondele utilizate în această metodă sunt secvențe ale genei ARN ribozomal 23S aparținând mai mult decât unei specii. În acest caz, identificarea nu se bazează pe specificitatea unei singure linii, ci pe diferitele combinații de benzi multiple care caracterizează fiecare specie. Sistemul comercial dispune de două variante: GenoType CM identifică, cel mai des, specii de micobacterium cu ajutorul a 17 sonde, în timp ce GenoType AS include 18 sonde care pot detecta și cele mai puțin comune specii³².

3. GenoType MTBC

Este un sistem de revers hibridizare menit a identifica speciile aparținând complexului *M. Tuberculosis* care nu pot fi diferențiate prin analiza oricărei regi-

uni, dintre cele mai frecvent investigate (ADN ribozomal 16S, ADN ribozomal 23S)³⁵.

Sunt prezente 11 sonde pe strip: una se adresează ADN-ului ribozomal 23S, altele regiunilor de la 9 la 4 situate pe gena *gyrB*, iar altele regiunilor marginale ale RD1. Sonda specifică ADN ribozomal 23S se utilizează pentru confirmarea izolatelor aparținând complexului *M. Tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum* tipul I, *M. bovis*, *M. caprae* și *M. microti*; dar nu poate distinge *M. Tuberculosis* de *M. Africanum* tipul II și de „*M. Canettii*“)^{17,31,35}. Acest sistem poate realiza diferențierea *M. bovis* contactat prin metode naturale de cel inoculat o dată cu vaccinul BCG⁴².

Testul GenoType MTBDR plus (HAIN Lifescience, GmbH, Nehren, Germany) este îmbunătățit și poate detecta mutațiile comune din gena *rpoB* (responsabilă pentru rezistența RMP), genele *katG* și *inhA* (responsabile pentru rezistența INH). Sensibilitatea și specificitatea pentru detectarea rezistenței la RMP sunt 98%, respectiv 98,7% și mai scăzute pentru detectarea rezistenței la INH, adică 84,3%, respectiv 99,5%. Timpul mediu pentru test este de două zile atunci când se aplică direct sputei pozitive. Folosind bandetele corespunzătoare (GenoType MTBDRsl) testul poate determina rezistența față de substanțe anti-TB de linia a doua (aminoglicozide - capreomycina/AK/Km și fluoroquinolone), evidențiind mutațiile din genele *rrs* și *gyrA*^{10,28,43}.

De consemnat faptul că producătorul a pus la dispoziție testul **GenoType MTBDRsl** pentru detecția rapidă a rezistenței față de fluoroquinolone, etambutol și aminoglicozide prin testarea genelor *gyrA*, *embB* și *rrs*, utilizat pentru identificarea rapidă a pacienților cu XDR-TB (figura 4). Pentru validarea metodei mai sunt necesare studii suplimentare¹⁰.

Specificitatea și sensibilitatea sunt înalte: 70-80%. Singurele reacții încrucișate raportate până în prezent privesc existența unor micobacterii cu ritm foarte rapid de creștere sau speciile nedescrise la momentul la care sondele au fost dezvoltate.

O limită a GenoType este prezența unui număr de modele de hibridizare echivoce care sunt împărțite de două sau mai multe specii, cauzate de variabilitatea moderată a ADN-ului ribozomal 23S^{28,30}.

Microarray

Principiul metodei are la bază regula complementității bazelor din mostrele de ADN cunoscut cu cele din ADN-ul de identificat^{17,22}. Metoda presupune folosirea unui sistem de spoturi pe membrane absorbante. Un kit conține mii de spoturi și are, de obicei, sub 200 de microni. Spoturile-mostră sunt fixate pe suport solid (lamelă de sticlă de microscop, disc de silicon sau membrană de nylon)²².

Acestea pot fi constituite din ADN, cADN sau oligonucleotide, folosite pentru legarea complementară a secvențelor necunoscute și permit analiza paralelă a identificării și expresiei genelor^{17,22}. Analiza unui singur fragment de ADN poate furniza informații simultane despre mii de gene. Tehnica Microarray își

găsește utilitatea mai mult în detectarea tulpinilor rezistente de *M. Tuberculosis*, decât în detectarea *M. Tuberculosis* din diverse prelevate clinice.

TB Biochip (trusa cu oligonucleotide) este cea mai folosită dintre tehnicile microarray în detecția rezistenței la izoniazidă și rifampicină¹⁹.

TB-Biochip microarray pentru detecția *M. tuberculosis* rezistent la RMP.

Este o trusă cu oligonucleotide destinată pentru detectarea și identificarea substituțiilor codonului 29 și deleția unui anumit codon din alte 10 poziții (507, 511, 512, 513, 515, 516, 522, 526, 532, 533) în cadrul regiunii determinante pentru rezistența la rifampicină (RRDR)¹⁹. Fiecare element al trusei conține un oligonucleotid a cărui secvență se potrivește cu aceea a tulpinii sălbatică sau a celei care conține mutația RRDR.

Folosirea unui suport din gel de acrilamid amplifică reacția de hibridizare. Utilizarea ulterioară a țințelor ADN marcate fluorescent conduc la un pattern al intensității fluorescenței compatibil cu eficiența hibridizării ADN-ului marcat ale diverselor probe de oligonucleotide.

Intensitățile fluorescenței corespunzătoare secvențelor aparținând tipului sălbatic sau secvențelor mutante pentru fiecare codon sunt analizate și comparate automat, folosind un sistem informatizat computer asistat, fiind înregistrate într-un dispozitiv de tip cameră^{19,20}.

Folosind componenta corespunzătoare din trusă, izolatele sunt considerate a avea sensibilitate la RMP, dacă fluorescența acestora este mai mare decât a celor care corespund elementelor mutante. În virtutea aceluiași principiu, utilizând cealaltă componentă a trusei, izolatele apreciate a avea rezistență la RMP au un grad de fluorescență mai mare decât cele corespunzătoare tipului sălbatic.

Într-un studiu recent publicat de Gryadunov și col., folosind truse microarray cu oligonucleotide pentru detectarea rezistențelor, acesta menționează detectarea în timp de 12 ore a rezistențelor din prelevate clinice, cu o sensibilitate de 95% pentru rifampicină și 80% pentru izoniazidă.

Secvențierea ADN-ului *M. Tuberculosis*

Determinarea secvenței nucleotidice a ADN-ului ribozomal 16S permite diferențierea majorității speciilor micobacteriene cunoscute în prezent. La nivelul acestei gene, secvențele universale întâlnite la toate organismele vii coexistă cu secvențe specifice de gen comune organismelor aparținând aceluiași gen (ex. genul *Micobacterium*) și secvențe specifice de specie care fac diferența între specii^{25,33}.

După amplificarea secvenței-țintă folosind metoda PCR, produsul de amplificare obținut este denaturat, ulterior suferind o nouă amplificare în care secvențele țintă din pozițiile 3' și 5' se vor asocia cu nucleotide standard și nucleotide speciale dispuse în pozițiile terminale ale lanțului elongat. Producții amplificați, fiecare marcați cu fluorocrom specific pentru nucleo-

tida terminală, se dispun în ordinea lungimii prin electroforeză în câmp.

Componenta de detecție a secvențiatorului identifică compuşii fluorescenți ce marchează nucleotidele terminale ale fiecărui fragment. Fiecare dintre fragmente este cu un nucleotid mai lung decât precedentul, putând fi astfel determinată secvența genetică a regiunii. O dată secvența determinată, este necesară comparația sa cu secvențe cunoscute, updatate permanent.

Reprezintă metoda de referință în zilele noastre, nu numai pentru micobacterii, dar și pentru toate celelalte microorganisme, iar ADN-ul ribozomal 16S rămâne cea mai importantă secvență țintă. Succesiunea de baze a secvenței finale 5' (aproximativ 500 baze) furnizează rezultatul final pentru marea majoritate a membrilor genului *Micobacterium*²⁵.

Determinarea genei complete este necesară pentru distingerea unui număr important de specii din genul *Micobacterium*: *M. peregrinum* și *M. septicum*, *M. marinum* și *M. ulcerans* sau *M. novocastrense* și *M. flavescens*. Există și specii care nu pot fi diferențiate prin intermediul ADN-ului ribozomal 16S, cum ar fi: *M. kansasii* de *M. gastri*, *M. mucogenicum* de *M. phocaicum*, *M. abscessus*, *M. massiliense* de *M. Bolletti*^{27,29}.

Alte regiuni-țintă din genomul micobacterian care pot fi utilizate în cadrul acestei metode sunt: ADN ribozomal 23S, hsp65 și ITS (internal transcribed spacer). Dată fiind marea variabilitate (lungimea între 270 și 400 baze), ITS poate fi utilizat cu succes pentru diferențierea speciilor cu creștere rapidă înrudite de cele cu creștere lentă.

Printre alte secvențe-țintă utilizate pentru identificarea micobacteriană, cele mai importante sunt reprezentate de gena *recA* implicată în repararea ADN, *sodA* care codifică superoxid dismutaza și *rpoB* care codifică subunitatea beta a ARN polimerazei³⁹. Gena *rpoB*, care include regiuni cu o mare variabilitate și este prezentă într-o singură copie în toate micobacteriile, a fost recent propusă standard de aur în diferențierea micobacteriilor cu creștere rapidă^{34,39}.

Pyrosequencing este un test simplu de analiză cantitativă și precisă a secvențelor de ADN. Este descrisă ca o metodă nouă și de perspectivă pentru identificarea rapidă a micobacteriilor, nu numai din culturi pozitive, dar și direct din specimene de spută prelucrate, frotiu pozitiv. Este mai puțin costisitoare și poate oferi rezultate de identificare în timp de 1-3 zile¹⁰.

Testul luciferazei

Metodă rapidă de detecție a chimiorezistențelor, pornind de la infectarea micobacteriilor prin bacteriofagi transportori ai genei luciferazei. Luciferaza este o enzimă care în prezența ATP-ului interacționează cu luciferina, emițând lumină. Bacteriofagul transmite gena luciferazei, care astfel poate fi produsă în interiorul *M. Tb*. În prezența ATP (numai în celulele viabile) se produce lumină detectabilă (sunt necesare cel puțin 500-5000 de micobac-

terii infectate cu bacteriofag). Micobacteriile chimiorezistente (neinactivate sau distruse de tuberculostatice) emit lumină.

Metoda poate fi considerată instrument de screening în cercetările privind noi tuberculostatice, dar și modalitate rapidă (48 de ore) și accesibilă de testare a sensibilității germinilor cultivați^{43,45}.

Metode neconvenționale de diagnostic fenotipic I

Fagocitoza

Reacția de fagocitoză se bazează pe abilitatea *M. Tuberculosis* de a susține multiplicarea fagocitelor infectate. Numărul fagocitelor endogene, reprezentând numărul original al bacililor viabili, se determină comparativ cu o specie cu creștere rapidă (ca, de exemplu, *M. smegmatis*).

FASTPlaque TB (un test comercial bazat pe această tehnologie) a fost utilizat în câteva studii comparative cu diagnosticul bacteriologic clasic (col. Ziehl-Neelsen/auramina pentru microscopie-M și Löwenstein-Jensen pentru C) și a detectat micobacteria în 50-65% din cazurile cu sputa negativă în microscopie, cu o specificitate de 98%, iar la probele pozitive s-a obținut o confirmare de 80-90%^{27,45}. Testul s-a dovedit a avea și imperfecțiuni, unele studii relatând 8% până la 19% rezultate fals pozitive în condițiile în care prin metodele convenționale (M și C) speciile erau negative²⁷.

Metoda microcoloniei

Metoda microcoloniei sau tehnica de cultură în strat subțire pe agar reprezintă o metodă veche de cultivare și identificare a micobacteriei. Permite detecția rapidă a izolatelor prin morfologia caracteristică a micobacteriilor în cultură cu costuri mai reduse comparativ cu mediul Löwenstein-Jensen. Mediul agar Thin Layer 7H11 (TL7H11) permite detecția a mai mult de 60% din probele pozitive în cultură în primele 10 zile și mai mult de 80% din probele pozitive în primele 14 zile, comparativ cu 10% din probele cultivate pe Löwenstein-Jensen^{36,45}.

Tehnica de determinare a sensibilității – identificare microscopică pe mediu lichid, Microscopic observation broth-drug susceptibility assay (MODS)

Metoda se bazează pe observarea caracteristicilor de dispunere în benzi șerpuitoare (determinată de cord factor) a *M. tuberculosis* pe mediu lichid cu ajutorul unui microscop inversat.

Un studiu comparativ al metodei cu cultivarea clasică pe mediu solid și PCR a relevat o sensibilitate apropiată cu acestea (93%), iar timpul de desfășurare este de 9 zile. Metoda a fost propusă ca o metodă rapidă, acceptabilă din punct de vedere al costului, sensibilă și specifică pentru detecția *M. tuberculosis* și sensibilității la medicamente, adecvată pentru utilizarea în țările în curs de dezvoltare (în mod curent în țările din America Latină)^{27,36}. O limitare a metodei o constituie impedimentele legate de procurarea unui microscop inversat.

Test family	WHO endorsed tests in the family	Sens for H	Spec for H	Sens for R	Spec for R
Rapid cultures		100 (if done an smear+)	100 (if done an smear+)	100 (if done an smear+)	100 (if done an smear+)
	Liquid culture and DST				
	Non-commercial rapid cultures				
	MODS	94-99	88-99	94-99	95-100
	NRA	95-98	99-100	95-98	99-100
Molecular assays	Line probe assays (Hain GenoType MTBDRplus)	76-90	97-100	95-99	97-99
	Automated NAAT (Xpert)	NA	NA	94-99	96-99

[after : Ling D et al. ERJ 2008; Minion Jet al. Lancet Infect Dis 2010; Boehme CC et al. NEJM 2010 ; WHO. Policy statement on non-commercial and DST methods, 2010]

Figura 5. Recomandarea Guidelines for the Programmatic Management of MDR TB pentru testarea sensibilității tulpinilor de *M. Tb*

Analiza conținutului de acid micolic din peretele celular micobacterian

Micobacteriile prezintă un conținut crescut de lipide la nivelul peretelui celular. Aceste lipide includ acizi micolici și alți acizi nesaturați și saturați. Acizii micolici sunt nesaturați, acizi grași cu lanț lung care prezintă lungimea maximă la genul *Micobacterium*. Șapte tipuri de acizi micolici sunt combinați variat în peretele celular al diferitelor specii de *Micobacterium* (alfa, alfa', metoxi, keto, epoxi, wax ester și omega' metoxi micolați).

Analiza conținutului lipidic al peretelui micobacterian a fost utilizată pretutindeni pentru identificarea micobacteriană. Tehnicile variate se bazează pe partiția fizică a celor două faze (fixă și mobilă) a lipidelor prezente în peretele micobacterian^{25,45}.

a) Cromatografia în strat subțire (thin layer chromatography-TLC)

TLC utilizează o placă de siliciu (fază fixă) pe a cărei suprafață acizii micolici extrași din tulpina micobacteriană sunt separați, ca rezultat al afinității diferite pentru solvent (faza mobilă), cu progresie prin capilaritate. O dată ce placa a fost colorată, fiecare specie afișează un model particular proporțional cu conținutul în acizi micolici care poate fi identificat prin comparație cu pattern-uri de referință. Numărul mare de specii micobacteriene, deja peste 130, a determinat scăderea substanțială a relevanței TLC în identificarea micobacteriilor. Cu doar 7 tipuri de acizi micolici și cu o majoritate de micobacterii care includ nu mai mult de 2 sau 3 dintre ei, atribuirea TLC se face mai multor specii de *Micobacterium*.

b) Cromatografia gaz-lichid (GLC)

În GLC, un gaz (faza mobilă) este utilizat pentru transportul probei printr-un lichid (faza fixă) dispus în coloană. O dată ce lipidele extrase din tulpina micobacteriană au fost injectate, temperatura înaltă de operare (aproximativ 300°C) produce clivajul acizilor micolici în esteri saturați cu 22, 24 și 26 atomi de carbon. Producții

de clivaj se determină prin spectrometrie și produc cu acizii grași (ex.: acid tuberculostearic) și alcoolii pattern-uri compatibile cu anumite specii și care fac posibilă diferențierea acestora.

Principala problemă ce privește GLC este reprezentată de limitele de reproductibilitate între laboratoare și ineficiența în discriminarea unui număr mare de specii de *Micobacterium*.

c) Cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC)

HPLC utilizează presiunea înaltă pentru a transporta un lichid (faza mobilă) care conține produsul extras prin faza fixă prezentă sub forma unei coloane. Variatele tipuri de acizi micolici, anterior saponificați, dehidrolizați (rezultând bromofenacil esteri), separați în coloane, sunt îndepărtați prin spălare cu ajutorul unui solvent la intervale diferite de timp.

Pe baza absorbției UV individuale, detectorul separă fracțiunile unice sub forma unor peak-uri dispuse într-un profil. Profilul fiecărei specii este diferit, rezultând astfel identificarea unor specii cu profilul respectiv cunoscut. Un sistem de detecție bazat pe fluorescență poate fi folosit și este mult mai sensibil decât sistemul bazat pe ultraviolete.

Ghidul OMS pentru managementul MDR TB (2011) - Guidelines for the Programmatic Management of MDR TB (update 2011) - menționează că efectuarea testării sensibilității tulpinilor de *M. Tuberculosis* înaintea începerii tratamentului, utilizând tehnicile rapide pentru INH și RMP, sau cel puțin pentru RMP, este cea mai bună strategie pentru a preveni tratamentele inadecvate până la obținerea ABG clasice, prevenind răspândirea tulpinilor rezistente (**figura 5**). Această strategie și-a dovedit eficiența și în populațiile unde există un nivel scăzut al rezistențelor la pacienții TB, datorită specificității și sensibilității crescute^{26,36,43}.

Este menționat însă și riscul rezultatelor fals pozitive, ceea ce poate conduce la irosirea unor resurse (având în vedere costul medicației) și toxicitatea crescută a unui tratament de linia a doua. De aceea, se

recomandă confirmarea și prin metode fenotipice a ABG.

Diagnosticul rapid al cazurilor de MDR-TB este extrem de util pentru instituirea precoce a unui tratament eficient, adaptat cât mai fidel spectrului de sensibilitate al tulpinii rezistente (reducând astfel și riscul de dezvoltare a rezistenței suplimentare la alte

droguri) și în controlul răspândirii acestor tulpini.

Metodele genetice de diagnostic, aprobate și recomandate de OMS, pot reduce timpul de diagnostic al cazului de TB și, foarte important, al cazului de MDR TB până la 24-48 de ore. Nu înlocuiesc metodele actuale standardizate de diagnostic și al profilului de rezistență, dar le completează în cazuri selecționate^{16,43}. ■

Bibliografie

- Antognoli MC, Salman MD, Triantis J, Hernandez J, Keefe TA. Onetube nested polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium bovis* in spiked milk samples: an evaluation of concentration and lytic techniques. *J Vet Diagn Invest* 2001; 13:111-6.
- Aranaz A, Liebana E, Mateos A, et al. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2734-40.
- ***Antituberculosis drug resistance worldwide. *Weekly Epidemiol. Rec.* 2000; 75: 95-100.
- Bellamy R. Susceptibility to mycobacterial infections: the importance of host genetics. *Genes Immun* 2003; 4:4-11.
- Cambau E, Jarlier V. Resistance to quinolones in mycobacteria. *Res Microbiol* 1996; 147: 52-9.
- Camacho LR, Ensergueix D, Perez E, Gicquel B, Guilhot C. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol* 1999; 34: 257-67.
- Centers for Disease Control. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs worldwide, 2000-2004. *MMWR* 2006; 55:301-5.
- Chimara E, Ferrazoli L, Cardoso Leao S. *Mycobacterium tuberculosis* Complex Differentiation Using *gyrB* Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99: 745-8.
- Costello E, O'Grady D, Flynn O, et al. Study of restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping for epidemiological investigation of *Mycobacterium bovis*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3217-22.
- Crudu V, Romancenco E. Diagnosticul microbiologic al tuberculozei - GHID, Ministerul Sanatatii din Rep. Moldova, Inst. De Ftiziopneumologie, Lab. National de Referinta in microbiologia tuberculozei, 2012
- Daley C, Kawamura L. The role of molecular epidemiology in contact investigations: a US perspective. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7(12):S458-62.
- Del Portillo P, Murillo LA, Patarroyo ME. Amplification of a species-specific DNA fragment *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2163-8.
- Erlor W, Martin G, Sachse K, L et al. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* isolates from central Europe. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2234-8.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Mastering the basics of TB control: Development of a handbook on TB diagnostic methods. Stockholm: ECDC; 2011. www.ecdc.europa.eu
- European Centre for Disease Prevention and Control. Management of contacts of MDR TB and XDR TB patients. Stockholm: ECDC; 2012. www.ecdc.europa.eu
- Framework for Implementing New Tuberculosis Diagnostics. WHO 2010, July. www.policyframework-july10.
- Garcia-Pelayo MC, Caimi KC, Inwald JK, et al. Microarray analysis of *Mycobacterium microti* reveals deletion of genes encoding PE-PPE proteins and ESAT-6 family antigens. *Tuberculosis* 2004; 84:159-166.
- Garcia de Viedma D, del Sol Diaz Infantes M, Lasala F, Chave F, Alcalá L and Bouza E.- New real-time PCR able to detect in a single tube multiple rifampin resistance mutations and high-level isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 2002, Vol. 40, No. 3, pp. 988-995.
- Garcia de Viedma D. - Rapid detection of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: review discussing molecular approaches. *Clin Microbiol Infect*, 2003, Vol. 9, No.5, pp349-59.
- Garcia de Viedma D, Alonso Rodriguez, N., Andres, S., Ruiz Serrano, M.J., Bouza, E.- Characterization of clonal complexity in tuberculosis by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43, 5660-5664.
- Heidal E, Docker H, Caugant DA, Tverdal A.; Pulmonary tuberculosis in Norwegian patients. The role of reactivation, reinfection and primary infection assessed by previous mass screening data and restriction fragment length polymorphism analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4:300-307.
- Heyman SJ, Brewer TF, Wilson ME. (1999). The need for global action against multidrug-resistant tuberculosis. *JAMA*, Vol. 281, No. 1, pp. 2138-2140.
- Huard RC, Lazzarini LCO, Butler WR, van Soolingen D, Ho JL. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1637-50.
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strains differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 907-14.
- Kaufmann S.H.E., Hahn H - *Mycobacteria and TB, Issues in Infectious Diseases*, vol. 2; 17-46; 97-102.
- Langendam M.W, van der Werf M.J, E. Huitric and D. Manissero. Prevalence of inappropriate tuberculosis treatment regimens: a systematic review. *Eur Respir J* 2012; 39: 1012-1020.
- Marica C, Didilescu C, Murgoci Gh, Tănăsescu M, Arghir O. *Compendiu de tuberculoză*, Ed. Curtea Veche, 2011.
- Marinus Barnard, Linda Parsons, Paolo Miotto, Daniella Cirillo, Knut Feldmann, Cristina Gutierrez, Akos Somoskovi. Molecular Detection of Drug-Resistant Tuberculosis By Line Probe Assay. Laboratory Manual for Resource-Limited Settings. *FIND* 2012.
- Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, et al. Macro-array and bioinformatics analyses reveal mycobacterial "core" genes, variation in the ESAT-6 gene family and new phylogenetic markers for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology* 2004; 150: 483-96.
- Molecular Detection of Drug-Resistant Tuberculosis By Line Probe Assay. Laboratory Manual for Resource-Limited Settings. *WHO-FIND*.
- Mostowy S, Onipede A, Gagneux S, et al. Genomic analysis distinguishes *Mycobacterium africanum*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3594-9.
- Nuri Kiraz, Imran Saglik, Abdurrahman Kiremitci, Nilgun Kasifogluand Yurdanur Akgun. Evaluation of the GenoType *Mycobacteria* Direct assay for direct detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex obtained from sputum samples. *Journal of Medical Microbiology*, 2010, 59, 930-934.
- Pai M, Flores LL, Pai N et al. Diagnostic accuracy of nucleic acid amplification tests for tuberculous meningitis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2003; 3(10): 633-43.
- Ramaswamy S, Musser J. M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 Update. *Tubercle and Lung Disease* (1998) 79(1), 3-29.
- Richter E, Weizenegger M, Anne-Marie Fahr, Rusch-Gerdes S; Usefulness of the GenoType MTBC Assay for Differentiating Species of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Cultures Obtained from Clinical Specimens. *Journal of clinical microbiology*. Sept. 2004, p. 4303-4306.
- Rieder HL, Van Deun A, Kam KM, Kim SJ, Chonde TM, Trebucq A, Urbanczik R. Priorities for tuberculosis bacteriology services in low-income countries. 2nd ed. Paris, France: *International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*, 2007.
- Riska PF, Jakobs WR Jr, Alland: Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4(suppl 1):S4-S10.
- Scarpato C, Piccoli P, Rigon A, et al. Comparison of enhanced *Mycobacterium tuberculosis* amplified direct test with COBASAMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and respiratory and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol* 2000; 38 (4):1559-62.
- Schilke K, Weyer K, Bretzel G, et al. Universal pattern of RpoB gene mutations among multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 7:620-6.
- Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Loch C: Automated high throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on microbacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 2001; 39:3563-3571.
- Torres M J, Criado A, Palomares JC and Aznar J. - Use of real-time PCR and fluorimetry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 2000, Vol. 38, No. 9, pp. 3194-3199.
- Van Pinxteren LA. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 si CFPI0. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 2000; 7(2):155-160.
- WHO. New laboratory diagnostic tools for tuberculosis control. Geneva: World Health Organization, 2008. <http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241597487>.
- WHO. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. WHO/HTM/TB/2010.3. ISBN 978 92 4 159919 1.
- WHO. Noncommercial culture and drug-susceptibility testing methods for screening patients at risk for multidrug-resistant Tuberculosis. Policy statement 2011. (www.who.int).