

*Medicinska edukacija/
Medical education*

DIJAGNOSTIKA TUBERKULOZE
PRIMENOM MOLEKULARNIH METODA

Correspondence to:

dr sc. med. Zorica Lepšanović, molekularni biolog, Viši naučni saradnik
Vojnomedicinske akademije i
Medicinskog fakulteta u Beogradu

MOLECULAR METHODS FOR THE
DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS

Zorica Lepšanović

e-mail: zorilep@eunet.rs

Cljučne reči

Mycobacterium tuberculosis,
PCR (polymerase chain reaction),
real-time PCR, DNA microarrays

Key words

Mycobacterium tuberculosis,
PCR (polymerase chain reaction),
real-time PCR, DNA microarrays

Abstract

Tuberculosis is still one of the most wide-spread and serious infectious diseases worldwide. Because of the slow growth rate of *Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent, cultivation, identification, and drug susceptibility testing can take several weeks. During the past twenty years, molecular methods have been developed for detection and drug susceptibility testing of mycobacteria. These highly specific and sensitive methods can potentially reduce the diagnostic time from weeks to days. Commonly used molecular methods are PCR, real-time PCR, and DNA microarrays.

UVOD

Tuberkulozu izazivaju bakterije iz roda *Mycobacterium*. Za čoveka su patogeni sojevi koji pripadaju *Mycobacterium tuberculosis* kompleksu (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* i *M. microti*) i izazivaju tuberkulozu, *M. leprae* i izazivaju lepru, dok je *M. avium* čest uzročnik oportunističkih infekcija kod imunokompromitovanih osoba. Iako je tuberkuloza oboljenje koje je poznato još iz davnih vremena, ona i dalje predstavlja veliki zdravstveni problem u celom svetu. Preko dva miliona ljudi umire od tuberkuloze svake godine. Primenom antibiotske terapije došlo je do smanjenja incidence i smrtnosti od tuberkuloze, što je naročito bilo izraženo nakon Drugog svetskog rata i to u razvijenim zemljama. Krajem osamdesetih godina dvadesetog veka incidenca tuberkuloze je ponovo u porastu najviše u zemljama u razvoju, dok u industrijski razvijenim zemljama uglavnom stagnira ili se blago smanjuje. Jedan od razloga su migracije stanovništva i povećani broj imigranata i izbeglica. U zemljama u razvoju prisutno je siromaštvo, prenaseljenost, slaba ishrana, pušenje, koji su ujedno faktori rizika za infekciju. Porastu tuberkuloze doprinosi i pandemija HIV. Zbog smanjene imunološke odbrane organizma, tuberkuloza je najčešći uzrok smrti kod HIV pozitivnih osoba u zemljama u razvoju. Poseban problem predstavlja i pojava multirezistentnih sojeva *M. tuberculosis*, koji se javljaju najčešće usled neadekvatnog uzimanja lekova (1).

Svetska zdravstvena organizacija je 1993. godine proglasila globalnu opasnost od tuberkuloze i predložila internacionalnu strategiju za kontrolu ovog oboljenja. Za ciljeve je postavila da se uspešno tretira 85% detektovanih ARB+ (acido-rezistentni bacili) slučajeva tuberkuloze i da se detektuje barem 70% svih ARB+ slučajeva. Da bi se to postiglo, potrebno je primeniti tehničke elemente strategije koji obuhvataju direktno nadgledanje hemoterapije kod svih novih ARB+ slučajeva i kod retreatmana, zatim uspostavljanje sistema za kontinuirano snabdevanje antituberkuloticima, uspostavljanje sistema za izveštavanje i dostupnost rezultata tretmana kao i unapređenje detekcije ARB+ uzoraka.

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Laboratorijska dijagnostika mikobakterija se i dalje oslanja na konvencionalne mikrobiološke metode. To je pre svega mikroskopiranje, kojim se detektuju acido-rezistentni bacili (ARB) nakon bojenja po Ziehl-Neelsen-u. Na ovaj način se mikobakterije najbrže detektuju, ali samo ako ih ima najmanje 104 u mililitru uzorka. Kultivacija je osetljivija metoda i predstavlja "zlatni standard" u detekciji *M. tuberculosis*. Granica osetljivosti je 10-100 bacila u mililitru uzorka. Međutim, *M. tuberculosis* raste vrlo sporo, pa na Löwenstein-Jensen podlozi kultivacija traje 4-6 nedelja, a na tačnim podlogama u sistemima BACTEC, MB/BacT, MGIT i dr., oko 14 dana. Mikroskopiranje i kultivacija imaju i taj nedostatak što su nedovoljno specifične metode i ne mogu diferencirati *M. tuberculosis* od atipičnih mikobakterija, koje mogu izazvati oboljenje kod imunokompromitovanih osoba. Zbog toga ove metode ne zadovoljavaju potrebe za brzom, osetljivom i specifičnom detekcijom *M. tuberculosis*.

Osamdesetih godina prošlog veka za detekciju i tipizaciju mikroorganizama počinju da se primenjuju metode molekularne biologije, koje se baziraju na detekciji specifičnih redosleda nukleotida genoma (2). Jedna od tih metoda je PCR ili lančana reakcija polimeraze, a *M. tuberculosis* je jedan od prvih organizama za čiju detekciju je ova metoda primenjena. Kod PCR se određeni fragment genoma umnožava uz pomoć enzima DNK polimeraze i specifičnih oligonukleotida koji su komplementarni nukleotidima na krajevima fragmenta koji se umnožava. Nakon umnožavanja fragment se detektuje elektroforezom ili pomoću obeleživača koji su vezani za oligonukleotide.

Osetljivost PCR bazira se na umnožavanju dela genoma, što omogućava da se detektuju bacili kojih je bilo nekoliko desetina u uzorku. Specifičnost zavisi od redosleda nukleotida koji se koriste za umnožavanje. Razvijene su brojne "in-house" PCR metode za dijagnostiku tuberkuloze, kod kojih izvođač sam pravi reakcionu smešu za umnožavanje od pojedinačnih komponenti, kao i različiti komercijalni testovi sa već formiranim reakcionim smešama. Prednost komercijalnih

testova je što su standardizovani pa se rezultati mogu upoređivati između laboratorija i što je broj manipulacija sveden na minimum, a time i opasnost od unakrsne kontaminacije uzoraka i dobijanja lažno pozitivnog rezultata. Za umnožavanje se primenjuju različiti parovi oligonukleotida, a najčešće oni specifični za insercioni element IS6110 koji je prisutan samo u genomu *M. tuberculosis* kompleksa ili za površinski protein.

Umnožavanje uzorka primenom PCR traje 3-4 sata, tako da je za detekciju *M. tuberculosis*, uključujući obradu uzorka i pripremu za PCR, potrebno najviše 2 dana. Kombinovanjem PCR hemije i detekcije umnoženog produkta pomoću fluorescentne probe, razvijena je "real-time" PCR metoda kod koje se rezultat umnožavanja dobija za još kraće vreme. Osim brzine, prednost u odnosu na konvencionalni PCR je i u tome što se umnožavanje i detekcija odvijaju u istoj epruveti, čime se smanjuje broj manipulacija, a time i mogućnosti unakrsne kontaminacije uzoraka. Pored toga, dinamika umnožavanja se može kontinuirano pratiti pa ova metoda može da bude i kvantitativna.

Osim pulmonarna, tuberkuloza može biti i ekstrapulmonarna i pogoditi skoro svaki organ. Zbog toga kliničke manifestacije mogu biti vrlo raznovrsne, što uzrokuje dodatne teškoće u postavljanju dijagnoze i njeno odlaganje. Samo dobijanje materijala za kultivaciju i detekcija mikobakterija je teža kod ekstrapulmonarne nego kod pulmonarne tuberkuloze. Molekularne metode su u ovim slučajevima od velike koristi jer omogućavaju izolaciju DNK iz bilo kojeg kliničkog uzorka, pa se PCR uspešno primenjuje za detekciju *M. tuberculosis* i kod ekstrapulmonarne tuberkuloze. Osetljivost PCR je nešto niža kada se primenjuje na nerespiratorne uzorke jer u njima češće ostaju inhibitori DNK polimeraze nakon obrade (3). Zbog toga se intenzivno radi na prilagodavanju protokola za pripremu ovih uzoraka za umnožavanje, a komercijalni testovi se za sada preporučuju samo za respiratorne uzorke.

Pored navedenih prednosti u dijagnostici tuberkuloze, PCR metoda ima i određene nedostatke. Najveći problem predstavlja dobijanje lažno-pozitivnih rezultata zbog unakrsne kontaminacije uzoraka i lažno-negativnih usled prisustva inhibitora DNK polimeraze ili neodgovarajućeg tretmana kliničkog uzorka. Da bi se proverila pouzdanost PCR metode za detekciju *M. tuberculosis*, povremeno se rade

multicentrične studije kontrole kvaliteta (4, 5). Ustanovljeno je da se dobijanje lažno pozitivnih rezultata iz godine u godinu smanjuje, ali da osetljivost kod uzoraka koji su ARB- još nije dovoljno visoka i u poslednjoj studiji je iznosila 61%. PCR detekcija je pouzdanija u laboratorijama koje na adekvatan način rade primarnu obradu kliničkog uzorka i koje imaju duže iskustvo u primeni molekularnih metoda. Preporuka je da se molekularne metode primenjuju paralelno sa mikroskopiranjem i kultivacijom i doprinose povećavanju osetljivosti, specifičnosti i brzini dijagnostike tuberkuloze.

Nukleinske kiseline koje se detektuju PCR metodom u kliničkom uzorku mogu poticati i iz mikobakterija koje su degradirane usled primene lekova i nevidljive su. Pokazano je da PCR rezultat može biti pozitivan 6 meseci nakon terapije, iako se kultivacijom više ne mogu detektovati žive mikobakterije. Zbog toga PCR nije metoda izbora za praćenje efekata terapije.

Kod svakog novootkrivenog slučaja tuberkuloze, nakon kultivacije mikobakterija ispituje se njihova rezistencija na antituberkulotike. Konvencionalnim metodama za to je potrebno još nekoliko nedelja. PCR ima potencijal da detektuje mutacije u *rpoB* i *katG* genima koje koreliraju sa rezistencijom na rifampin i izonijazid (6). Nekoliko grupa autora su, primenom "real-time" PCR i setova proba za poznate mutacije u ovim genima, u odvojenim reakcijama za svaki gen ili u jednoj reakciji za oba, detektovali rezistentne sojeve. Dalji napredak u dijagnostici tuberkuloze omogućila je nova molekularna tehnologija, DNK "microarray". Njenom primenom se istovremeno mogu identifikovati mikobakterije i detektovati mutacije u genima za rezistenciju (7). To je moguće zbog velikog broja različitih DNK proba smeštenih na jednoj staklenoj pločici.

ZAKLJUČAK

Molekularne metode imaju brojne prednosti nad konvencionalnim u identifikaciji mikobakterija i znatno su unapredile dijagnostiku tuberkuloze. Kako za sada nisu poznate sve mutacije koje dovode do rezistencije na antituberkulotike i dalje je neophodno da se pored molekularnih, primenjuju i konvencionalne metode kako bi se detektovali svi rezistentni sojevi.

Apstrakt

Tuberkuloza je i dalje jedno od najraširenijih i najozbiljnijih infektivnih oboljenja u svetu. Zbog sporog rasta *Mycobacterium tuberculosis*, uzročnika ovog oboljenja, kultivacija, identifikacija i ispitivanje osetljivosti može da traje nekoliko nedelja. Poslednjih dvadeset godina razvijene su molekularne metode za detekciju i ispitivanje osetljivosti mikobakterija. Ove metode imaju visoku specifičnost i osetljivost i mogu skratiti dijagnostiku na nekoliko dana. Molekularne metode koje se najčešće koriste su PCR, "real-time" PCR i DNK "microarrays".

LITERATURA

1. Meya DB, McAdam KPWJ: The TB pandemic: an old problem seeking new solutions. *Journal of Internal Medicine* 2007; 261: 309-329.

2. Lepšanović Z: Primena molekularnih metoda u tipizaciji mikroorganizama. *MD Medical Data* 2009; 1, 2: 45-7.

3. Lepšanović Z, Savić D, Tomanović B: Pouzdanost primene Cobas Amplicor PCR testa za detekciju *Mycobacterium tuberculosis* iz res-

piratornih i nerespiratornih uzoraka. *Vojnosanit Pregl*, u štampi

4. Noordhoek GT, van Embden JDA, Kolk AHJ: *Reliability of nucleic acid amplification for detection of Mycobacterium tuberculosis: an international collaborative quality control study among 30 laboratories*. *J. Clin. Microbiology* 1996; 34: 2522-2525.

5. Noordhoek GT, Molder S, Wallace P, van Loon AM: *Multicentre quality control study for detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples by nucleic acid amplification methods*. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004; 10: 295-301.

6. Viedma DG: Rapid detection of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review discussing molecular approaches. *Clin. Microbiol. Infect.* 2003; 9: 349-59.

7. Troesch A, Nguyen H, MiyadaCG, Desvarenne S, Gingers TR, Kaplan PM et al.: *Mycobacterium species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 49-55.