

Prínos molekulárnej genetiky pre rýchlu diagnostiku tuberkulózy

Mária Švejnochová, Beáta Gottwaldová, Peter Slezák

Contribution of molecular genetic to rapid diagnosis of tuberculosis

Súhrn

Na Oddelení diagnostiky a typizácie mykobaktérií v NÚTaRCH, bolo v rokoch 1994–1996 vyšetrených 287 mimopľúcnych vzoriek od 261 pacientov s podozrením na tbc infekciu paralelne s Gene Probe MTD-testom a konvenčnou kultiváciou. Získané výsledky zabezpečujú vysokú senzitivitu a špecificitu vyšetrení. Šesť pozitívnych výsledkov z MTD-testu z gynekologických vzoriek bolo hodnotených vo vzťahu ku klinickým záverom. Autori konštatujú spoľahlivosť a rýchlosť diagnostiky tbc pomocou MTD-testu (tab. 2).

Kľúčové slová: Mycobacterium Tuberculosis Direct (MTD) test, laboratórne skúsenosti, klinické závery.

Summary

In 1994–1996 years in the department for diagnosis of mycobacteria in National Institute of TBC and Respiratory Diseases, 287 nonrespiratory specimens obtained from 261 patients at the risk of TBC infection were examined in parallel by the Gene Probe MTD test and by conventional culture. The dates obtained ensure high sensitivity and specificity of examination. Six positive results from gynaecological specimens of this test were evaluated in relation to clinical conclusions. The present results warrant the authors statement, that Gene Probe MTD test is very reliable and rapid means of examination (Tab. 2).

Key words: Mycobacterium Tuberculosis Direct (MTD) Test, laboratory experiences, clinical conclusions

Praktická gynekológia, 4, 1997, č. 1.

Úvod

Údaje WHO dokumentujú niekoľko závažných faktov:

- tretina populácie sveta je v súčasnosti infikovaná tuberkulózou,
- v roku 1990 bolo zaznamenaných 8 miliónov nových tuberkulózných ochorení,
- ročne zomiera na tuberkulózu 2,9 milióna osôb,
- v celosvetovom meradle je tuberkulóza hlavnou príčinou úmrtí v dôsledku infekčných chorôb.

Stále platí, že niet tuberkulózy bez dôkazu etiologického agens, preto sa musí klinik snažiť potvrdiť diagnózu aj bakteriologicky.

Úlohou diagnostického laboratória je uplatňovanie nových moderných diagnostických prístupov na potvrdenie, respek-

tíve vylúčenie klinickej diagnózy. Charakteristické vlastnosti pôvodcov tuberkulózy – acidorezistencia a pomalá reprodukcia limitovali donedávna včasnú bakteriologickú diagnostiku, najmä pri mimopľúcnych formách tuberkulózného ochorenia.

Mikroskopický dôkaz ostáva najrýchlejšou a najjednoduchšou diagnostickou metódou, ktorá je známa viac ako 100 rokov. Treba však uviesť, že má nízku analytickú citlivosť. Mikroskopický dôkaz je vhodný najmä pre diagnostiku respiračnej tuberkulózy zo vzoriek sput pri rozsiahlych rozpadových pľúcnych formách. Pre pozitívny výsledok z mikroskopického vyšetrenia je nevyhnutná prítomnosť najmenej 100 000 mykobaktérií v 1 ml biologického materiálu. Kultivácia je síce rádovo 100-násobne citlivejšia, ale v dôsledku dlhej generačnej doby mykobaktérií časovo náročná (3–9 týždňov). Pre biologické vzorky je pri mimopľúcnej tuberkulóze charakteristický nízky počet mykobaktérií, ktoré najmä pri osteoartikulárnej a urogenitálnej tuberkulóze dokazujeme kultiváciou len veľmi zriedkavo. Požiadavka nových, najmä však rýchlych diagnostických

Národný ústav tuberkulózy a respiračných chorôb v Bratislave
Adresa: MUDr. M. Švejnochová, Národný ústav tuberkulózy a respiračných chorôb, Krajinská 91-101, 825 56 Bratislava - Podunajské Biskupice, Slovensko.

postupov, sa stala mimoriadne naliehavá aj v oblasti tuberkulózných infekcií. Rýchle amplifikačné metódy založené na princípoch molekulárnej genetiky, či už typu polymerázovej reťazovej reakcie alebo génových sond, našli začiatkom 90. rokov vysoko aktuálne uplatnenie aj pri diagnostike tuberkulózy – formou štandardných komerčne dostupných setov. Metódy umožňujú stanoviť genetickú informáciu pôvodcov tuberkulózy (*Mycobacterium tuberculosis* a *Mycobacterium bovis*) už o niekoľko hodín.

Mycobacterium tuberculosis direct test (MTD) je založený na princípe génových sond. Ide v ňom o izotermálnu enzymatickú amplifikáciu ribozomálnej RNA (rRNA) a hybridizáciu amplikónov s akridínom značenou špecifickou DNA-sondou s chemiluminiscenčným dôkazom výsledného produktu DNA-rRNA.

Materiál a metódy

Výrobcom MTD-testu je americká firma Gen Probe, dodávateľom firma Epignost a distribútorom v SR Ados s.r.o., t.č. Nomia. Test predstavuje rýchlu a metodicky jednoduchú amplifikačnú genetickú metódu, ktorá umožňuje detegovať prítomnosť už 1 mykobakteriálnej bunky v 1 ml vzorky, ekvivalentnú koncentráciu 25 fg rRNA. Výsledky testu sú reprodukovateľné za 4 hodiny a definitívna diagnóza môže byť určená za 1 deň. Metodológia MTD-testu má 4 časti:

- a/ príprava vzorky
- b/ izolácia ribozómovej RNA
- c/ amplifikácia
- d/ hybridizácia a detekcia hybridných molekúl DNA-rRNA

Vzorky klinických materiálov sa dekontaminujú s N-acetyl-L-cysteínom a po opakovanej centrifugácii sa zo získaného sedimentu odoberie alikvotná časť pre MTD-test. Zároveň sa založí kultivácia na 4 kultivačné médiá (2 tuhé a 2 tekuté), pri respiračných vzorkách sa zhotoví aj náter pre mikroskopické vyšetrenie.

Proces izolácie rRNA začína ultrasonickou lýzou mykobakteriálnych buniek vo vzorke. Pôsobením ultrazvuku dochádza k disrupcii bunkovej steny mykobaktérií. Každá mykobakteriálna bunka obsahuje približne 2000 kópií rRNA, ktoré iniciujú reakciu a slúžia ako templát pre replikáciu in vitro.

Zahriatím na 95 °C dochádza k inaktivácii bunkového materiálu a k denaturácii rRNA. Na definovaných miestach sa na rRNA naviažu primery a ohraničia terčové sekvencie, špecifické pre komplex *M. tuberculosis*. Pôsobením reverznej transkriptázy nastáva prepis poradia báz v terčovej rRNA a syntéza komplementárnej kópie DNA. Tento medziprodukt je reverznou transkriptázou konvertovaný na dvojvláknovú formu, podľa ktorej sa rRNA amplifikuje za prísne ohraničených časových a teplotných podmienok. Za 2 hodiny sa namnoží až 10 biliónov kópií rRNA.

Detekcia rRNA amplikónov sa vykonáva s použitím akridín-esterom značenej DNA-sondy prostredníctvom hybridizácie nukleových kyselín. Chemiluminiscenčne značená jednovláknová DNA-sonda hybridizuje s amplifikovanými terčovými rRNA do stabilného rRNA-DNA hybridu. Ku špecifickej detekcii výsledného počtu týchto hybridov sa využíva hydrolyza akridín-esteru za vzniku luminiscencie. Intenzita chemiluminiscencie sa meria v luminometri v RLU (relatívna svetelná jednotka). Vzorky so signálom vyšším ako 30 000 RLU sa považujú za pozitívne. Na odporúčenie výrobcu sa vzácne materiály (mimoplúcne vzorky) hodnotia ako pozitívne od RLU 70 000, pretože respiračné vzorky dosahujú pozitivitu až 2 500 000 RLU.

V období od apríla 1994 do mája 1996 bolo paralelne mikroskopicky, kultivačne a s MTD-testom vyšetrených 653 respiračných biologických vzoriek. Hoci producenti testu odporúčajú používať test prevažne pre diagnostiku tuberkulózy zo sputa a z bronchiálnych sekrétov, v súlade s mnohými európskymi a svetovými pracoviskami dokazujeme významné praktické využitie testu aj pre diagnostiku extrapulmonálnej tuberkulózy.

Na naliehavé požiadavky klinikov z iných ako pneumologických oddelení NÚTaRCH sme kultivačne a MTD-testom vyšetřili aj 287 mimoplúcnych biologických materiálov (!).

Výsledky

Z 287 (261 osôb) extrapulmonálnych vzoriek sme pozitívitu MTD-testom zistili u 32 vzoriek (26 osôb), z toho kultivačne bolo overených 9 vzoriek. Hodnotu RLU vykazovali nad 1 200 000, zatiaľ čo kultivačne neoverené vzorky, medzi ktorými sa nachádzali aj vzorky gynekologického materiálu, mali RLU hodnotu medzi 300 000 až 800 000. Senzitivita testu z vyšetreného súboru bola 85,7 % a špecificita 98,2 % (tab. 1).

Tabuľka 1. Porovnanie výsledkov MTD-testu (GP) s kultivačnou pozitivitou u paralelne vyšetrených extrapulmonálnych vzoriek (počet vzoriek 287). Senzitivita testu 85,7 %, špecificita testu 98,0 %.

--	--

3 kultivačne pozitívne vzorky boli MTD-testom falošne negatívne. Išlo o pleurálne výpotky. Sú charakteristické vysokým obsahom enzymového potenciálu, ktorý pôsobí inhibične na priebeh reakcie.

Rozbor jednotlivých druhov biologických vzoriek z paralelne vyšetrených a MTD-testom pozitívnych vzoriek uvádzame v tabuľke 2. 6 gynekologických materiálov tvorili vzorky: pupočníková krv, placenta, endometrium. Všetky boli

Tabuľka 2. Výsledky MTD-testu (GP) - extrapulmonálne vzorky.

Vzorka	Počet vyšetrení	MTD+	Kult.overené
gynekol. materiál	32	6	0
ortoped. materiál	58	4	0
pleurálny punktát	65	3	1
moč	20	3	1
hnis	15	3	1
liquor	15	1	0
operačný materiál	20	4	2
uzlina	55	5	4
per. punktát	7	3	0
Spolu	287	32 (11,1 %)	9 (3,1 %)

kultivačne neoverené. V piatich prípadoch išlo o tehotné ženy s bakteriologicky overenou pľúcnou tuberkulózou už liečenou antituberkulotikami. U ďalšej pacientky liečenej pôvodne hormonálne pre sterilitu, ale v minulosti už s pozitívnym dôkazom BK (Kochov bacil) biologickým pokusom na morčati z kyretu, sa MTD-pozitivita zistila vo vzorkách pu-počníkovej krvi. V čase zistenej MTD-pozitivity sa gyneko-logická tuberkulóza už klinicky nemanifestovala. Pacientka porodila zdravé dieťa bez prítomnosti klinických prejavov tuberkulózy.

Diskusia a závery

Medzi novými diagnostickými metódami v mykobakteriológii majú v súčasnosti amplifikačné genetické postupy dominantné postavenie. Metodika na princípe génových sond – MTD-test, bola prvým komerčne dostupným testom určeným pre rutínne použitie v klinických laboratóriách. Správnosť postupu testu je zabezpečená 6 kontrolami. Pri práci sa vyžaduje prísne dodržiavanie výrobcom stanovených podmienok (dekontaminačných, časových, teplotných a bezpečnostných). Svojou analytickou citlivosťou sa test vyrovná vyšetreniu biologickým pokusom na morčati. Je vysoko špecifický pre dôkaz spécies *Mycobacterium tuberculosis* komplexu. 124 iných, mykobaktériám rodove príbuzných spécies baktérií a kvasiniek je MTD-testom negatívnych. Napriek

tomu, že „zlatým štandardom“ pre dôkaz tuberkulózných bacilov ostáva klasická kultivácia, metódy dôkazu genetickej informácie pôvodcov tuberkulózy sú schopné detegovať aj minimálny počet mykobaktérií v biologických vzorkách, ktoré klasickou kultiváciou bežne neurčíme. Preto je nesmierne dôležité posudzovať pozitívny výsledok z vyšetrení genetikými testami s využitím komplexných diagnostických kritérií, pričom negatívny výsledok nevylučuje prítomnosť tuberkulózneho procesu. Úspešný dôkaz DNA/RNA *M. tuberculosis* priamo závisí aj od druhu, kvantity, ale najmä od kvality biologickej vzorky.

Na základe našich skúseností konštatujeme významný pozitívny prínos zavedenia MTD-testu do praxe. Výhody testu sú:

- rýchla detekcia tuberkulózných pacientov – tým aj začatie cielej liečby,
- skrátenie dlhodobej hospitalizácie, čím dochádza k výraznej redukcii finančných prostriedkov spojených s čakaním na výsledky z kultivačných vyšetrení,
- včasné prijatie zásadných efektívnych epidemiologických opatrení.*

Literatúra

Literatúra u autora.

Do redakcie došlo 20.12.1996.

*Prednesené na vedecko-pracovnej schôdzi SGPS: Tuberkulóza v gynekológii a pôrodnictve, 7.6.1996 v Bratislave.