

Molekularna diagnostika tuberkuloze – upanje ali iluzija? Molecular diagnosis of tuberculosis – hope or illusion?

Manca Žolnir Dovč*, Mario Poljak**, Katja Seme***

Ključne besede
tuberkuloza – diagnostika
polimerazna verižna reakcija
RNA bakterijska
molekularna sonda tehnike

Key words
tuberculosis – diagnosis
polymerase chain reaction
RNA bacterial
molecular probe techniques

Izvleček. Tuberkuloza ponovno postaja velik zdravstveni problem, saj število obolelih v svetu v zadnjih letih narašča, povečuje pa se tudi število sevov *Mycobacterium tuberculosis*, odpornih proti več antituberkulotikom. Metode molekularne mikrobiologije vzbujajo največ upanja za izboljšanje in odpravo nekaterih pomanjkljivosti klasične laboratorijske diagnostike tuberkuloze. Med molekularnimi metodami so najbolj razvite in raziskane različne tehnike pomnoževanja majhnih (za določen mikroorganizem) značilnih delcev nukleinskih kislin *in vitro*. Te tehnike v primerjavi s klasičnimi mikrobiološkimi metodami skrajšajo čas do postavitve diagnoze z nekaj tednov na le nekaj ur. Žal njihova občutljivost zaenkrat še zaostaja za klasičnimi metodami. Uporaba molekularnih metod ni omejena le na izboljšanje laboratorijske diagnostike tuberkuloze, temveč obeta tudi hitrejšo in zanesljivejšo identifikacijo mikobakterij in hitrejšo odkrivanje sevov *M. tuberculosis*, odpornih proti antituberkulotikom. Uporabna vrednost molekularnih metod na področju epidemiologije tuberkuloze je že sedaj neprecenljiva. Namen našega prispevka je kratka predstavitev različnih metod pomnoževanja nukleinskih kislin, ki jih uporabljamo za odkrivanje bacilov tuberkuloze, prikaz najpogostejših težav pri uporabi ter predstavitev treh komercialno dostopnih diagnostičnih kompletov, ki temeljijo na verižni reakciji s polimerazo ali na pomnoževanju, posredovanem s prepisovanjem RNA.

Abstract. Tuberculosis represents a great world public health problem due to its increased incidence and the advent of multi-drug-resistant strains. Recent developments in molecular microbiology have raised hopes about the possibilities of new strategies for tuberculosis diagnosis. Nucleic acid amplification of target molecules to a detectable level is the best developed and the best analyzed system for detecting mycobacteria. A variety of different amplification techniques has been described recently. Although these techniques promise to reduce the time for diagnosis from weeks to hours, their main drawback is lower sensitivity in comparison to the culture. Besides their potential value in diagnosis, amplification techniques offer the possibility of a rapid identification and drug susceptibility determination. Their application in other fields such as epidemiology, could benefit the control of tuberculosis indirectly. This article presents a brief overview of the principles of molecular diagnosis of tuberculosis, summarizes some of the application problems, and describes three recently developed commercial amplification tests based on polymerase chain reaction or transcription-mediated RNA amplification.

*Mag. Manca Žolnir Dovč, dipl. biol., Klinični center Ljubljana, Inštitut za pljučne bolezni in tuberkulozo Golnik, 4204 Golnik
**Doc. dr. Mario Poljak, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Korytkova 2, 1000 Ljubljana
***As. dr. Katja Seme, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Zaloška 4, 1000 Ljubljana

Uvod

Naraščanje števila obolelih za tuberkulozo v nekaterih državah sveta kakor tudi zaskrb-ljujoče povečevanje števila sevov bacilov tuberkuloze, odpornih proti več antituberkulotikom, je opozorilo na pomanjkljivosti sedanje laboratorijske diagnostike tuberkuloze (1–3). Klasične mikrobiološke diagnostične metode so namreč dolgotrajne (osamitev bacilov tu-berkuloze), premalo občutljive (mikroskopski pregled kužnine, osamitev bacilov) ali premalo specifične (mikroskopski pregled) (4, 5). Zato je razumljivo, da je vsaka nova metoda, ki bi izboljšala mikrobiološko diagnostiko tuberkuloze, zaželena.

Napredek molekularne biologije in genetike je prinesel pomembne novosti tudi v labo-ratorijski diagnostiki nekaterih mikroorganizmov. Najbolj obetavne so metode pomno-ževanja nukleinskih kislin *in vitro*, s katerimi lahko v nekaj urah pomnožimo značilni manj-ši odsek DNA ali RNA v velikem številu kopij. Metode so zelo občutljive, saj dajejo po-zitiven rezultat že, če je v kužnini le nekaj molekul DNA ali RNA (6). Sedanje izkušnje in predvidevanja kažejo, da bodo te metode pomembno prispevale k hitrejši diagnosti-ki nekaterih virusnih, bakterijskih in parazitarnih bolezni, predvsem tistih, ki jih s seda-njimi metodami težko dokažemo ali je njihovo dokazovanje dolgotrajno (6, 7). Med ome-njene bolezni prav gotovo sodi tudi tuberkuloza.

Namen našega prispevka je kratka predstavitev različnih metod pomnoževanja nuklein-skih kislin, ki jih uporabljamo za odkrivanje bacilov tuberkuloze, prikaz najpogostejših težav pri uporabi teh metod ter predstavitev treh komercialno dostopnih diagnostičnih kompletov, ki temeljijo na veržni reakciji s polimerazo ali na pomnoževanju, posredo-vanem s prepisovanjem RNA.

Klasična laboratorijska diagnostika tuberkuloze

Mikroskopski pregled kužnine

Mikroskopski pregled kužnine (razmaz) je osnovna in najmanj zahtevna bakteriološka metoda za odkrivanje mikobakterij v kužnini, saj z njo hitro in poceni odkrijemo osebe, ki izločajo velike količine bacilov tuberkuloze in so najpomembnejši vir okužbe. Razmaz lahko pripravimo iz kužnine neposredno ali po predhodnem homogeniziranju in centri-fugiranju. Razmaze najpogosteje barvamo s karbolnim fuksinom po Ziehl-Neelsenu ali po Kinyounu (8). Bolj občutljiva je različica barvanja razmazov z avramin ali rodamin flou-rokromi (8). Glavna pomanjkljivost navedenih metod je slaba občutljivost, saj je rezul-tat preiskave pozitiven le, če je v 1 ml kužnine prisotnih več kot 5.000–10.000 bacilov (9). Toliko mikobakterij ima v kužnini le približno polovica novoodkritih tuberkuloznih bol-nikov v Sloveniji (10). Naslednja pomanjkljivost mikroskopskega pregleda razmaza kužnine je, da je njegova specifičnost odvisna predvsem od epidemioloških razmer na določenem geografskem področju (2). Z mikroskopskim pregledom namreč dokazuje-mo le prisotnost acido- in alkoholorezistentnih bacilov v kužnini oz. bacilov, ki se s ki-slinami in alkoholi ne razbarvajo. Na ta način seveda ne moremo določiti mikobakterij-ske vrste.

Osamitev bacilov tuberkuloze

Poskus osamitve (izolacija, kultivacija) je osnovna metoda laboratorijske diagnostike tuberkuloze, ki je trenutno med vsemi preiskavami najbolj občutljiva in specifična (2, 4, 5, 11). Še vedno velja kot »zlati standard«, po katerem opredeljujemo zanesljivost drugih laboratorijskih metod. Njena edina, a zelo pomembna pomanjkljivost je dolgotrajnost. Za tvorbo makroskopsko vidne bakterijske kolonije namreč potrebujejo bacili tuberkuloze v povprečju 3–8 tednov. Osnovni vzrok za počasno rast bacilov tuberkuloze na gojiščih je posebna zgradba celične stene, ki je zaradi velike vsebnosti maščob slabo prehodna za številne hranljive snovi (5).

Za osamitev mikobakterij uporabljamo v laboratoriju različna trdna (jajčna ali agarska) in tekoča gojišča (gojišče po Baniču, gojišče Middlebrook 7H9®) ali gojišča, ki so sestavljena iz obeh faz (Septi-Chek AFB System®, Becton Dickinson, Sparks, ZDA). Trdna in tekoča gojišča, v katera smo zasadili kužnino, inkubiramo pri temperaturi 37 °C do tri mesece, s tem da enkrat tedensko izločamo vsa gojišča z vidno rastjo. Če po 6-tedenskem inkubiranju na gojiščih ni vidnih kolonij, izdamo negativen rezultat. Kljub temu vsa negativna gojišča inkubiramo še nadaljnih 6 tednov, saj nekateri bacili mikobakterij zrastejo šele v 12 tednih.

Za osamitev bacilov tuberkuloze je na voljo tudi komercialni avtomatiziran radiometrični sistem BACTEC® (Becton Dickinson, Sparks, ZDA), s katerim je osamitev mikobakterij nekoliko hitrejša kot na klasičnih bakterioloških gojiščih, vendar kljub temu traja najmanj 7–20 dni (2). Glavne pomanjkljivosti tega sistema so radioaktivni reagenti in visoka cena.

Vsak sev mikobakterij moramo po osamitvi identificirati. Identifikacija največkrat temelji na mikroskopskih in makroskopskih značilnostih kolonij ter biokemičnih lastnostih posameznih vrst mikobakterij (8). V zadnjem času se v identifikaciji mikobakterij vse bolj uveljavljajo tudi metode, ki temeljijo na hibridizaciji nukleinskih kislin (12). Ponekod v svetu si pri identifikaciji mikobakterij pomagajo s plinsko-tekočinsko kromatografijo (angl. *gas-liquid chromatography*) ali tekočinsko kromatografijo z visoko ločljivostjo (angl. *high-performance liquid chromatography*) (13, 14).

Dodatne metode za odkrivanje bacilov tuberkuloze

Poleg mikroskopskega pregleda kužnine in poskusa osamitve bacilov tuberkuloze so v številnih laboratorijih za diagnostično uporabo preizkusili še vrsto drugih metod. Določanje značilne tuberkulostearinske kisline v kužninah s plinsko-tekočinsko kromatografijo ali s tekočinsko kromatografijo z visoko ločljivostjo je primerno predvsem za odkrivanje bacilov tuberkuloze v primarno sterilnih kužninah, kot je na primer likvor (15). Kljub visoki specifičnosti metodi nista dovolj občutljivi za rutinsko neposredno dokazovanje mikobakterij v kužninah iz dihal. Poleg tega sta tehnično zahtevni in precej dragi. Zato se uporabljata le za identifikacijo mikobakterij v nekaterih vrhunskih specializiranih laboratorijih (2, 9).

Metode, ki temeljijo na hibridizaciji nukleinskih kislin, so se izkazale kot premalo občutljive za neposredno dokazovanje mikobakterij v kužninah. Zato tudi te uporabljamo izključno za hitrejšo identifikacijo predhodno osamljenih mikobakterij (4, 12).

Tudi aglutinacijske in encimsko-immunske metode, s katerimi odkrivamo prisotnost mikobakterijskih antigenov oz. značilnih antimikobakterijskih protiteles, niso uporabne za rutinsko diagnostiko, saj so se v številnih raziskavah izkazale kot premalo občutljive in specifične (9).

Metode pomnoževanja delcev nukleinskih kislin

Silovit razvoj molekularne mikrobiologije v preteklem desetletju, predvsem odkritje metod za pomnoževanje delcev nukleinskih kislin, je vneslo pomembne spremembe tudi v laboratorijsko diagnostiko tuberkuloze (5). Dokazovanje bacilov tuberkuloze s temi metodami temelji na treh osnovnih postopkih: osamitvi nukleinskih kislin iz kužnine, *in vitro* pomnoževanju specifičnega majhnega odseka osamljenega dednega materiala in dokazovanju specifičnosti pomnoženega genomskega odseka (6).

Po odkritju verižne reakcije s polimerazo leta 1983 so do danes razvili približno 20 različnih metod za pomnoževanje delcev nukleinskih kislin *in vitro* ter skoraj dvakrat več njihovih različic. Zaradi obsega zdravstvenega problema tuberkuloze so skoraj vse najprej preizkušali na tem modelu.

Med vsemi razvitimi metodami pomnoževanja nukleinskih kislin sta se zaradi določenih prednosti, ugotovljenih s primerjalnimi študijami več različnih metod, ter zaradi razvoja komercialno dostopnih in standardiziranih diagnostičnih kompletov pri odkrivanju bacilov tuberkuloze najbolj uveljavili dve: verižna reakcija s polimerazo in pomnoževanje, posredovano s prepisovanjem RNA, ki ju bomo tudi podrobneje predstavili.

Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) je najstarejša in največkrat uporabljena metoda pomnoževanja nukleinskih kislin *in vitro*. Glavni predpogoj za uspešno pomnoževanje je poznavanje nukleotidnega zaporedja vsaj dela tarčnega genoma, ki ga želimo pomnožiti. To nam omogoča pravilno izbiro dveh kratkih značilnih odsekov nukleinskih kislin, t. i. začetnih oligonukleotidov (angl. *primers*), komplementarnih z mejnima deloma specifičnega odseka tarčnega genoma. Začetna oligonukleotida se spajata z nasproti ležečima vijačnicama tarčnega odseka genoma in sta usmerjena tako, da tvorba nove DNA poteka v prostoru med njima. Zato je velikost novo nastalih delcev DNA odvisna od njune medsebojne razdalje. S PCR je mogoče v nekaj urah dobiti več kot milijon kopij določenega odseka tarčnega genoma (6, 7).

Za razliko od kasneje razvitih metod za pomnoževanje uporabljamo en sam encim – temperaturno obstojno DNA-polimerazo. Metodo izvajamo tako, da osamljeni DNA dodamo reakcijsko mešanico, ki poleg omenjenega encima vsebuje deoksinukleotidtrifosfate, par začetnih oligonukleotidov, soli in detergent v določenih koncentracijah. Mešanico za kratek čas inkubiramo pri treh točno določenih temperaturah, kar pomeni en ci-

klus PCR. Pri temperaturi 95 °C dvovijačna molekula vzorca preide v dve enovijačni molekuli DNA. Druga temperatura, ki je največkrat izbrana med 45 in 75 °C, pogojuje spajanje začetnih oligonukleotidov s komplementarnima deloma vzorčne DNA. Podaljševanje začetnih oligonukleotidov oz. tvorba nove komplementarne molekule DNA v smeri od 5'-konca proti 3'-koncu se odvija med tretjo inkubacijo pri temperaturi 72 °C. Novi molekuli DNA sta med seboj komplementarni in sposobni v novem ciklusu s tremi inkubacijami vezati enake začetne oligonukleotide. Vsak naslednji temperaturni cikel podvojuje količino tarčnega dela DNA. Navadno je PCR sestavljen iz 25- do 40-kratnega zaporednega ponavljanja določenega ciklusa. Končni rezultat dogajanja je eksponentno kopičenje značilnih tarčnih delov DNA (6, 7).

V preteklih petih letih so razvili več kot 20 raziskovalnih različic PCR za dokazovanje bacilov tuberkuloze in jih preizkusili v različnih kužninah (sputum, plevralna tekočina, likvor, urin, kri) (2, 16, 17). Podobno kot pri klasičnih laboratorijskih metodah se je za najprimernejšo kužnino izkazal sputum. Pomnoževanje so izvajali na različnih odsekih DNA bacilov tuberkuloze. V začetku devetdesetih let so največkrat pomnoževali odseke genov, ki vsebujejo zapise za mikobakterijske beljakovine: beljakovino 65 kDa (18–20), beljakovino b (21), beljakovino MPB 64 (22) ter beljakovino 32 kDa (23). V zadnjem času pa najpogosteje pomnožujejo odseke DNA mikobakterij, ki so v genomu prisotni v več kopijah, oz. odseke t. i. insercijskih zaporedij (angl. *insertion sequence*), največkrat IS 6110 (24–26) ali IS 986 (27).

PCR je v svoji osnovi precej enostavna metoda. Vsaj teoretično je za uspešno pomnoževanje zadostna prisotnost ene same kopije genoma bacila tuberkuloze v kužnini, katere značilni odsek lahko v nekaj urah pomnožimo več kot milijonkrat. Toda v praksi naletimo na številne težave (7). Največja so lažnopolitivni rezultati, ki so največkrat posledica kontaminacije s PCR-pridelki, nastalimi v predhodnih pomnoževanjih. Nič manjša težava niso lažnonegativni rezultati, ki so večinoma pogojeni z nekakovostno osamitvijo nukleinskih kislin, prisotnostjo zaviralcev pomnoževanja v kužninah ter z nepravilno izbiro pogojev pomnoževanja (6, 7, 16, 28–30). Na srečo so za odpravljanje omenjenih problemov razviti številni specifični in nespecifični ukrepi (6, 7). Kljub temu prevladuje splošno mnenje, da je navedene težave mogoče odpraviti šele z uvedbo standardiziranih diagnostičnih kompletov (4, 7, 16, 30).

V začetku leta 1994 se je na tržišču končno pojavil tudi prvi komercialno dostopni test za diagnostiko tuberkuloze, ki temelji na uporabi metode PCR – Amplicor *M. tuberculosis* Complex Test®. Diagnostični komplet je razvila družba Roche Molecular Systems (Branchburg, ZDA). Namenjen je za odkrivanje mikobakterij iz sklopa *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) izključno v kužninah iz dihal (sputum, aspirat iz bronha, bronhoalveolarni izpirek). Test je sestavljen iz več procesov: osamitve DNA iz kužnine, pomnoževanja specifičnega odseka mikobakterijske DNA s pomočjo z biotinom označenih začetnih oligonukleotidov, hibridizacije PCR-pridelkov s specifično DNA-lovko, vezano na dno mikrotitracijske ploščice, in biotin-avidin-peroksidaznega testa za dokazovanje nastalega hibridizacijskega kompleksa. Tarčni odsek bakterijske DNA je 584 baznih parov dolg odsek gena, ki vsebuje zapis za 16S rRNA. Začetni oligonukleotidi so izbrani tako, da lahko pomnožijo omenjeni genomski odsek vseh mikobak-

terij, medtem ko je hibridizacijska lovka specifična le za mikobakterije iz sklopa *M. tuberculosis*. Test vključuje tudi poseben postopek za zmanjševanje možnosti nastanka lažno-pozitivnih rezultatov zaradi kontaminacije s pridelki predhodnih reakcij PCR (t. i. N-uracil-glikozilazni postopek) (31).

Pomnoževanje, posredovano s prepisovanjem RNA

Pomnoževanje, posredovano s prepisovanjem RNA (angl. *transcription-mediated amplification*, TMA) je druga najbolj uporabljena metoda v molekularni diagnostiki tuberkuloze (4, 16). Za razliko od PCR ni raziskovalnih različic TMA, ampak obstajata samo standardizirana diagnostična kompleta, ki temeljita na tej metodi. Prvi diagnostični komplet – MTD[®] (Amplified *M. tuberculosis* Direct Test) je konec leta 1993 razvila družba Gen-Probe (San Diego, ZDA). Podobno kot test Amplicor[®] je tudi test MTD[®] namenjen za dokazovanje mikobakterij iz sklopa *M. tuberculosis* izključno v kužninah iz dihal (32). Podoben komercialni test kot test MTD[®] je konec leta 1995 po hudih bojih na evropskih in ameriških sodiščih tržiču ponudila tudi družba Organon Teknika (Boxtel, Nizozemska) pod imenom NASBA[®] (angl. *nucleic acid sequence based amplification*) (33, 34). Ker oba diagnostična kompleta temeljita na metodi TMA, si družbi namreč očitata krajo licenčnih pravic. Ker ima test MTD[®] v ZDA že dovoljenje *Food and Drug Administration* (FDA) za uporabo v diagnostične namene, je prodaja in uporaba testa NASBA[®] v diagnostiki tuberkuloze tam prepovedana. Za razliko od ZDA, v Evropi ni tako strogih licenčnih zakonov in se zaenkrat oba testa uporabljata v diagnostične namene.

Metoda TMA se v svoji osnovi popolnoma razlikuje od PCR. Osnovne razlike med obema metodama so v tem, da pri TMA pomnožujemo RNA, da pomnoževanje poteka pri eni sami temperaturi (izotermalno) in, da za pomnoževanje uporabljamo več encimov (32–34). Tako so v test NASBA[®] vključeni trije encimi in sicer T7 RNA-polimeraza (bakteriofagna DNA-odvisna RNA-polimeraza, ki na dvojnovičajni DNA-matrici, ki vsebuje značilni bakteriofagni promotor, naredi več kopij enovijačne RNA), reverzna transkriptaza (RNA- ali DNA-odvisna DNA-polimeraza) in RN-aza H (encim, ki razgrajuje vijačnico RNA v dvojnovičajnem RNA-DNA-kompleksu) (34). Reverzno transkriptazo in RN-azo H v testu MTD[®] nadomešča posebna reverzna transkriptaza, ki ima poleg osnovne prepisovalne aktivnosti tudi aktivnost RN-aze H. Za pomnoževanje uporabljamo pri obeh testih podobno kot pri PCR dva začetna oligonukleotida: P1 in P2. Medtem ko je P1 povsem navaden začetni oligonukleotid, je P2 prirejen tako, da ima na 5'-koncu zaporedje promotorja T7 RNA-polimeraze. Oba diagnostična kompleta vsebujeta začetna oligonukleotida, komplementarna značilnim odsekom 16S rRNA vseh mikobakterij. Postopek pomnoževanja se začne s prileganjem začetnega oligonukleotida P2 na komplementarno zaporedje vzorčne RNA. Sledi podaljševanje začetnega oligonukleotida z reverzno transkriptazo ter nastanek komplementarne kopije DNA (cDNA) vzorčne RNA. Nato RN-aza H (ali v testu MTD[®] posebna reverzna transkriptaza) v nastalem dvojnovičajnem cDNA-RNA-kompleksu razgradi verigo RNA. Na enovijačno cDNA nato prileže začetni oligonukleotid P1, ki ga podaljša reverzna transkriptaza. Na ta način nastane dvojnovičajnica DNA-DNA, katere sestavni del je tudi aktivni promotor T7 RNA-polimeraze. T7 RNA-polimeraza nato naredi nekaj sto enovijačnih RNA-kopij tarčne nuklein-

ske kisline. Novi ciklus pomnoževanja se spet začne s prileganjem začetnega oligonukleotida P2 na vse kopije vzorčne RNA, nastale v predhodnem ciklusu. Na ta način v vsakem naslednjem ciklusu pomnoževanja nastaja vse več in več kopij vzorčne RNA oz. v slabih dveh urah nastane nekaj milijard kopij. Po končanem pomnoževanju specifičnost nastalih produktov pomnoževanja dokazujemo s hibridizacijo z DNA-lovkami, značilnimi za 16S rRNA mikobakterij iz kompleksa *M. tuberculosis*. Hibridizacijske komplekse v testu NASBA® dokazujemo z elektrokemiluminiscentno metodo in v testu MTD® s kemiluminiscentno metodo (32–34).

Uporabnost metod pomnoževanja delcev nukleinskih kislin

Vse do sedaj opravljene primerjalne raziskave več različnih nestandardiziranih metod pomnoževanja delcev nukleinskih kislin so nedvomno pokazale, da le-te zaradi velikega števila lažnopoziitivnih in lažnonegativnih rezultatov niso primerne za rutinsko odkrivanje bacilov tuberkuloze (4, 16, 28). Podobne raziskave so pokazale, da so v te namene uporabni le standardizirani komercialno dostopni diagnostični kompleti. V preteklih nekaj letih je bilo objavljenih več kot 30 raziskav uporabnosti standardiziranih diagnostičnih kompletov. Pregled rezultatov najpomembnejših tovrstnih raziskav je prikazan v tabeli 1 (17, 26, 27, 30, 35–43). Iz tabele je razvidno, da sta trenutni različici obeh diagnostičnih kompletov MTD® in Amplicor® manj občutljivi kot poskus osamitve bacilov tuberkuloze iz kužnine ter da je njuna občutljivost sorazmerna odstotku mikroskopsko pozitivnih vzorcev, vključenih v določeno raziskavo. Manjšo občutljivost molekularnih testov iz mikroskopsko negativnih kužnin v primerjavi z mikroskopsko pozitivnimi kužninami pojasnjujejo z relativno majhnim številom bacilov tuberkuloze prisotnih v mikroskopsko negativnih kužninah in z njihovo nehomogeno porazdelitvijo v kliničnem vzorcu. Zato je večina raziskav, ki so trenutno v teku, usmerjena predvsem v izboljšanje metod za osamitev nukleinskih kislin iz kliničnih vzorcev z majhnim številom bacilov tuberkuloze. Specifičnost obeh diagnostičnih kompletov je zelo visoka in zadovoljliva. Iz navedenega sledi, da lahko v primeru bolnika s kliničnim sumom na tuberkulozo, pri katerem z molekularnimi metodami dokažemo prisotnost bacilov tuberkuloze, z zelo veliko verjetnostjo potrdimo klinični sum. Nasprotno je v primeru negativnega rezultata molekularnega testa pri takšnem bolniku treba počakati še na rezultate klasičnih mikrobioloških metod.

Kljub naštetim pomanjkljivostim trenutnih različic diagnostičnih kompletov imajo standardizirani molekularni testi tri pomembne prednosti pred poskusom osamitve bacilov tuberkuloze:

- so hitri, saj dajejo rezultate v nekaj urah, medtem ko za osamitev potrebujemo vsaj tri do šest tednov;
- z njimi neposredno v kužnini ločimo bacile tuberkuloze od netuberkuloznih mikobakterij, kar je pomembno pri bolnikih z veliko možnostjo okužbe z netuberkuloznimi mikobakterijami (npr. imunosuprimirani bolniki, bolniki z aidsom);
- z njimi lahko nesporno dokažemo prisotnost bacilov tuberkuloze pri nekaterih bolnikih, pri katerih tuberkuloze iz več razlogov ne moremo dokazati z nobeno klasično laboratorijsko metodo (17, 30).

Glede na sedanje epidemiološko stanje okužb z mikobakterijami v Sloveniji in na naše izkušnje menimo, da mora ostati mikroskopski pregled kužnine zaradi enostavnosti in nizke cene še vedno prva preiskava, ki jo je treba narediti v primeru kliničnega suma na pljučno tuberkulozo. Tudi poskus osamitve mora doktrinarno ostati osnovna mikrobiološka metoda v diagnostiki tuberkuloze (44). Teste pomnoževanja delcev nukleinskih kislin kot dodatne metode ob klasični mikrobiološki diagnostiki priporočamo v naslednjih primerih:

- za potrjevanje pljučne tuberkuloze pri bolnikih z močnim kliničnim sumom na pljučno tuberkulozo, pri katerih je mikroskopski pregled kužnine negativen, rezultatov poskusa osamitve bacilov pa še nimamo;
- za potrjevanje pljučne tuberkuloze pri bolnikih s pozitivnim rezultatom mikroskopskega pregleda kužnine in sumom na okužbo z netuberkuloznimi mikobakterijami (imunosuprimirani bolniki, bolniki z aidsom, bolniki, pri katerih smo v preteklosti že osamili netuberkulozne mikobakterije);
- pri bolnikih, pri katerih zaradi kontaminantov, prisotnih v kužnini, poskus osamitve bacilov tuberkuloze ni mogoč.

Na osnovi izkušenj številnih avtorjev in naših lastnih zaenkrat ne priporočamo uporabe molekularnih testov za spremljanje uspešnosti zdravljenja tuberkuloze. Z molekularnimi testi namreč lahko pomnožimo nukleinske kisline mrtvih mikroorganizmov, ki so lahko še prisotni v kužninah tudi po uspešnem zdravljenju. Za spremljanje zdravljenja tuberkuloze je zato še vedno nepogrešljiv poskus osamitve.

Zaradi slabe občutljivosti in velike možnosti lažnonegativnih rezultatov zaenkrat posebej odsvetujemo uporabo molekularnih testov za dokazovanje mikobakterij v kužninah, ki ne izvirajo iz dihal, kot so likvor, plevralni, abdominalni in perikardialni izlivi.

Z razvojem molekularnih metod je prišlo do velikega napredka tudi na področju identifikacije netuberkuloznih mikobakterij (9) in epidemioloških raziskav tuberkuloze. Insercijsko zaporedje IS 6110 se je izkazalo kot najprimernejše področje genoma za tipizacijo bacilov tuberkuloze. Tako je metoda določanja polimorfizma dolžine restrikcijskih odsekov (angl. *restriction fragment length polymorphism*, RFLP) zaporedja IS 6110 že priznana kot standardna epidemiološka metoda za ugotavljanje sorodnosti posameznih sevov bacilov tuberkuloze (45). Metodo uporabljamo predvsem za razjasnitev epidemij tuberkuloze ter za ločevanje relapsa in ponovne okužbe pri ozdravljenih tuberkuloznih bolnikih (11).

Metode pomnoževanja delcev nukleinskih kislin se postopoma uveljavljajo tudi kot način določanja občutljivosti sevov bacilov tuberkuloze na različne antituberkulotike. Glavna pomanjkljivost uveljavljenih metod za določanje občutljivosti osamljenih sevov na antituberkulotike je namreč dolgotrajnost (4–6 tednov), kar močno otežuje zdravljenje zlasti v primeru sevov, odpornih proti več antituberkulotikom. Zato so naporji številnih raziskovalcev usmerjeni v razvoj učinkovitih in hitrih postopkov za odkrivanje sevov bacilov tuberkuloze, odpornih proti antituberkulotikom, ki temeljijo na pomnoževanju delcev nukleinskih kislin (46–48). Rezultati so zaenkrat najboljši pri odkrivanju odpornosti proti rifampicinu (11).

Tabela 1. Pregled pomembnejših raziskav, v katerih so za dokazovanje bacilov tuberkuloze v kačžnih iz dihal uporabili standardizirana testa MTD® in Amplicor®. Učinkovitost in zanesljivost komercialnih testov je primerjana z »latim standardom« v diagnostiki tuberkuloze – poskusom osamitve.

Test	Število vzorcev	Odstotek mikroskopsko pozitivnih vzorcev	Občutljivost (%)	Specifičnost (%)	Pozitivna napovedna vrednost (%)	Negativna napovedna vrednost (%)	Raziskovalna skupina	Leto raziskave	
MTD®	135	71,9	90,6	95,1	85,3	97,0	Abe in sodelavci (27)	1993	
	736	73,9	92,3	95,3	82,4	98,1	Miller in sodelavci (26)	1993	
	515	65,9	92,9	96,2	68,4	99,3	Pfyffer in sodelavci (17)	1994	
	617	–	71,4	98,9	71,4	98,9	Bodmer in sodelavci (35)	1994	
	412	80,3	98,4	98,9	93,8	99,7	Vlaspolder in sodelavci (36)	1995	
	281	82,0	94,3	99,1	94,3	99,1	Žolnir in sodelavci (30)	1995	
	274	46,0	85,0	86,0	73,0	93,0	Hoffner in sodelavci (37)	1996	
	1117	–	86,6	96,4	76,8	98,1	Pfyffer in sodelavci (38)	1996	
	Amplicor®	281	82,0	94,3	99,1	94,3	99,1	Žolnir in sodelavci (30)	1995
		532	93,0	95,4	96,2	83,0	99,1	Breavis in sodelavci (39)	1995
		1009	51,0	83,0	97,0	83,0	97,0	Moore in sodelavci (40)	1995
		504	52,4	70,4	98,7	76,0	98,3	Schirm in sodelavci (41)	1995
		722	–	87,6	99,6	96,6	98,7	Stauffer in sodelavci (42)	1995
956		38,5	79,4	99,6	92,6	98,6	Bergmann in sodelavci (43)	1996	

Sklep

Na Inštitutu za pljučne bolezni in tuberkulozo Golnik Kliničnega centra v Ljubljani smo v sodelovanju z Laboratorijem za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko aidsa Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani v letu 1994 preizkusili več različic klasične PCR-metode za neposredno odkrivanje mikobakterij v različnih kužninah, kakor tudi dva komercialno dostopna diagnostična kompleta: MTD® in Amplicor®. Zaradi vzpodbudnih rezultatov, dobljenih v primerjalnih raziskavah več molekularnih metod (30), smo se v decembru 1994 odločili, da oba standardizirana testa vpeljemo v diagnostiko tuberkuloze kot dopolnilna testa ob dosedanjih klasičnih laboratorijskih metodah. V letu in pol smo testirali že več kot 3000 različnih kliničnih vzorcev. Čeprav imata trenutni različici obeh testov še nekaj pomanjkljivosti, ju na osnovi naših izkušenj priporočamo kot pomembna dodatna testa za razreševanje nejasnih kliničnih primerov.

Razvoj novih in izboljšanje obstoječih molekularnih metod in standardiziranih diagnostičnih kompletov hitro napreduje. Prepričani smo, da lahko že kmalu pričakujemo tako izpopolnjene molekularne metode, ki bodo še bolj korenito posegle v vse nerešene probleme v diagnostiki tuberkuloze.

Literatura

1. Uttley AHC, Pozniak A. Resurgence of tuberculosis. *J Hosp Infect* 1993; 23: 249–53.
2. Crawford JT. New technologies in the diagnosis of tuberculosis. *Semin Respir Infect* 1994; 9: 62–70.
3. Dooley SW, Jarvis WR, Martone JM, Sider DE. Multidrug-resistant tuberculosis. *Ann Intern Med* 1992; 117: 257–9.
4. Doern GV. Diagnostic mycobacteriology: Where are we today? *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1873–6.
5. Schinnick TM, Good RC. Diagnostic mycobacteriology laboratory practices. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 291–9.
6. Poljak M, Avšič-Županc T, Seme K. Verižna reakcija s polimerazo – nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. *Med Razgl* 1994; 33: 379–400.
7. Poljak M, Seme K, Koren S. The polymerase chain reaction: A critical review of its uses and limitations in diagnostic microbiology. *Period Biol* 1996; 98: 183–190.
8. Vestal AL. *Procedures for the isolation and identification of mycobacteria*. Publication no. 77–8230. Atlanta: Center for Disease Control, 1977: 33–90.
9. Kox LFF. Tests for detection and identification of mycobacteria. How should they be used? *Respir Med* 1995; 89: 399–408.
10. Golniški statistični pregled. Epidemiologija in dispanzerska obravnava pljučnih bolnikov v Sloveniji leta 1994. Golnik: Inštitut za pljučne bolezni in tuberkulozo, 1995: 6.
11. Klatser PR. Amplification reactions in mycobacteriology. *J Microbiol Methods* 1995; 23: 74–87.
12. Lebrun L, Espinasse F, Poveda JD, et al. Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2476–8.
13. Tisdall PA, De Yuong DR, Roberts GD, Anhalt JP. Identification of clinical isolates of mycobacteria with gas-liquid chromatography: A 10-month follow-up study. *J Clin Microbiol* 1982; 16: 400–2.
14. Thibert L, Lapierre S. Routine application of high-performance liquid chromatography for identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1759–63.
15. French GL, Teoh R, Chan CY, Humphries MJ, Cheung SW, O'Mahony G. Diagnosis of tuberculous meningitis by detection of tuberculostearic acid in cerebrospinal fluid. *Lancet* 1987; ii: 117–9.

16. Pfyffer GE. Amplification techniques: Hope or illusion in the direct detection of tuberculosis? *Med Microbiol Lett* 1994; 3: 335–47.
17. Pfyffer GE, Kissling P, Wirth R, Weber R. Direct detection of *M. tuberculosis* complex in respiratory specimens by a target-amplified test system. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 918–23.
18. Pao CC, Lin S-S, Wu S-Y, Juang W-M. The detection of mycobacterial DNA sequences in uncultured clinical specimens with cloned *M. tuberculosis* DNA as probes. *Tubercle* 1988; 69: 27–36.
19. Brisson-Noel A, Gicquel B, Lecossier D, Levy-Frebault V, Nassif X, Hance AJ. Rapid diagnosis of tuberculosis by mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet* 1989; ii: 1069–71.
20. Hance AJ, Grandchamp B, Levy-Frebault V, et al. Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. *Mol Microbiol* 1989; 3: 843–9.
21. Sjöbring U, Mecklenburg M, Andersen AB, Miorner H. Polymerase chain reaction for detection of *M. tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2200–4.
22. Manjunath N, Shanker P, Rajan L, Bhargava A, Saluja S, Shrinivas L. Evaluation of a polymerase chain reaction for the diagnosis of tuberculosis. *Tubercle* 1991; 72: 21–7.
23. Soini H, Skurnik M, Liippo K, Tala E, Viljanen MK. Detection and identification of mycobacteria by amplification of a segment of the gene coding for the 32-kilodalton protein. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2025–8.
24. Thierry D, Brisson-Noel A, Vincent-Levy-Frebault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B. Characterization of a *M. tuberculosis* insertion sequence, IS 6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2668–73.
25. Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *M. tuberculosis*. *J Infect Dis* 1990; 161: 977–81.
26. Miller N, Hernandez SG, Cleary TJ. Evaluation of Gen-Probe amplified *M. tuberculosis* direct test and PCR for direct detection of *M. tuberculosis* in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 393–7.
27. Abe C, Hirano K, Wada M, et al. Detection of *M. tuberculosis* in clinical specimens by polymerase chain reaction and Gen-Probe amplified *M. tuberculosis* direct test. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 3270–4.
28. Noordhoek GT, Kolk AHJ, Bjune G, et al. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *M. tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 277–84.
29. Bockstahler LE. Overview of international PCR standardization efforts. *PCR Methods Applic* 1994; 3: 263–7.
30. Žolnir-Dovč M, Poljak M, Seme K, Rus A, Avšič-Županc T. Evaluation of two commercial amplification assays for detection of *M. tuberculosis* complex in respiratory specimens. *Infection* 1995; 23: 216–21.
31. Longo MC, Berninger MS, Hartley LJ. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reaction. *Gene* 1990; 93: 125–8.
32. Jonas V, Alden MJ, Curry JI, et al. Detection and identification of *M. tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2410–6.
33. van der Vliet GME, Schukkink RAF, van Gemen B, Schepers P, Klatser PR. Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) for the identification of mycobacteria. *J Gen Microbiol* 1993; 139: 2433–9.
34. van Gemen B, Kievits T. Transcription based nucleic acid amplification methods like NASBA and 3SR applied to viral diagnosis. *Rev Med Virol* 1995; 5: 205–11.
35. Bodmer T, Gurtner A, Schopfer K, Matter L. Screening of respiratory tract samples for the presence of *M. tuberculosis* by using the Gen-Probe amplified MTD direct test. *J Clin Microbiol* 1994; 6: 1483–7.
36. Vlaspolter F, Singer P, Roggeveen V. Diagnostic value of an amplification method (Gen-Probe) compared with that of culture for diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1995; 10: 2699–703.
37. Hoffner SE, Norberg R, Toro JC, et al. Direct detection of *M. tuberculosis* in sputum samples from Guinea Bissau by an rRNA target-amplified test system. *Tubercle* 1996; 77: 67–70.
38. Pfyffer GE, Kissling P, Jahn M, Welscher HM, Salfinger M, Weber R. Diagnostic performance of amplified *M. tuberculosis* direct test with cerebrospinal fluid and other nonrespiratory and respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 834–841.
39. Breavis KG, Lichty MB, Jungkind DL, Giger O. Evaluation of Amplicor PCR for direct detection of *M. tuberculosis* from sputum specimens. *J Clin Microbiol* 1995; 10: 2582–6.
40. Moore DF, Curry JI. Detection and identification of *M. tuberculosis* directly from sputum sediments by Amplicor PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 10: 2686–91.

41. Schirm J, Oostendorp LAB, Mulder JG. Comparison of Amplicor, in house PCR, and conventional culture for detection of *M. tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1995; 12: 3231–4.
42. Stauffer F, Mutschlechner R, Hasenberger P, Stadlbauer S, Schinko H. Detection of *M. tuberculosis* complex in clinical specimens by a commercial polymerase chain reaction kit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14: 1046–51.
43. Bergman JS, Woods GL. Clinical evaluation of the Roche Amplicor PCR *Mycobacterium tuberculosis* test for detection of *M. tuberculosis* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1996, 34: 1083–1085.
44. Debeljak A, Skralovnik-Štern A, Maček V, Rus A, Mežnar B. Diagnostika tuberkuloze. *Zdrav Vestn* 1992; 61: 448–50.
45. Cave MD, Eisenach KD, McDermott PF, Bates JH, Crawford JT. IS 6110: conservation of sequence in the *M. tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting. *Mol Cell Probes* 1991; 5: 73–80.
46. Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *M. tuberculosis*. *Nature* 1992; 360: 591–3.
47. Honoré N, Cole ST. Streptomycin resistance in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 238–42.
48. Talenti A, Imboden P, Marchesi F, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *M. tuberculosis*. *Lancet* 1993; 342: 647–50.

Prispelo 2. 10. 1996