

## TEHNICI DE IMUNITATE CELULARĂ ÎN DIAGNOSTICUL TUBERCULOZEI LA OM ȘI BOVINE

IOANA GHIGOLEA<sup>1</sup>, POP MONICA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Spitalul de Pneumoftiziologie Aiud

<sup>2</sup>UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca

### Rezumat

*Tuberculoza este o boală endemică, bacteriană, specifică, transmisibilă, cu evoluție cronică și cu o largă răspândire în populație. Netratată sau tratată incorect, are o fatalitate importantă. Aceasta reprezintă o problemă importantă de sănătate. OMS a raportat 9 milioane de cazuri noi de tuberculoză anual și aproximativ 2 milioane de decese cauzate de această boală la nivel mondial în 2009. De asemenea, tuberculoza este una dintre zoonozele majore a cărei incidență este în creștere la animale și ar putea reprezenta o problemă majoră de sănătate publică, atunci când se transmite la om. Aceste date impun creșterea eficienței diagnosticului tuberculozei umane și bovine prin teste de imunitate celulară, cum ar fi: dozarea gama interferonului (Quantiferon TB GOLD test la om, BOVIGAM test la bovine), testul de transformare blastică, testul de inhibare a migrării leucocitelor in vitro, testul fagocitozei, dozarea imunoglobulinelor și complexelor imune circulante, ce reprezintă metode imunologice de vârf, cu aplicabilitate la nivelul laboratoarelor cu dotare medie.*

**Cuvinte cheie:** tuberculoza, diagnostic, tehnici de imunitate celulară.

### CELLULAR IMMUNITY TECHNIQUES IN HUMAN AND BOVINE TUBERCULOSIS DIAGNOSIS

#### Abstract

*Tuberculosis is an endemic, bacterial, specific, transmissible, widespread disease. It evaluates chronically, leading to significant fatality rates if incorrectly treated. WHO reports in 2009 close to 9 million new cases and 2 million deaths attributable to tuberculosis worldwide. Animal tuberculosis is a major zoonosis. Its incidence is increasing and poses a major public health threat to humans. These data make the need for more efficient diagnostic tools vital. New cellular immunity tests for human and bovine tuberculosis are available, such as: gamma interferon (Quantiferon TB GOLD in humans and BOVIGAM test in bovines), the blastic transformation test, the in vitro leukocyte migration inhibition test, the phagocytosis test, immunoglobulin and circulating immune complexes dosing. These tests are applicable to all average equipped laboratories.*

**Keywords:** tuberculosis, diagnostic, cellular immunity techniques.

### INTRODUCERE

Tuberculoza umană are agenți etiologici grupați în complexul *Mycobacterium tuberculosis*, format din speciile: *M. Tuberculosis*, *M. Bovis* și *M. Africanum*. Dintre subiecții infectați, 80-90% nu se vor îmbolnăvi niciodată de tuberculoză; cei 10-20% care vor face boala sunt indivizii

la care mecanismele de apărare antiinfecțioase sunt serios compromise [2].

După anul 1985, incidența globală a tuberculozei umane a avut o evoluție constant ascendentă până în anul 2002 când a atins valoarea maximă de 142,2‰ [1]. În anii următori s-a înregistrat o tendință de stabilizare și chiar de ușoară scădere a valorilor acestui indicator. Conform statisticilor OMS din anul 2004, privind tuberculoza, România se situa pe locul 3 din 52 de țări europene, după numărul de cazuri noi și recidive (după Federația Rusă și Ucraina). După incidență, România se clasa pe locul 2 în

Articol intrat la redacție în data de: 12.07.2011

Primit sub formă revizuită în data de: 01.08.2011

Acceptat în data de: 29.08.2011

Adresa pentru corespondență: f\_ioana20@yahoo.com

Europa (după Kazakhstan) și pe locul 42 din 211 țări din întreaga lume [3].

Incidența tuberculozei la bovine a fost în continuă scădere după anul 1990.

## DIAGNOSTICUL TUBERCULOZEI PRIN METODE CLASICE

### Tuberculoza umană

Testul cutanat la tuberculină convențional este metoda curentă utilizată pentru depistarea infecției cu *Mycobacterium tuberculosis*. Singurul test acceptat în scop diagnostic și epidemiologic este IDR Mantoux. Acesta este utilizat în scop diagnostic pentru evidențierea sensibilizării la tuberculină în cazul unei suspiciuni de infecție tuberculoasă la copiii simptomatici sau la cei din focare de tuberculoză (simptomatici sau nu) cu ocazia anchetei epidemiologice. O reacție intens pozitivă este marker al infecției tuberculoase, dar nu certifică tuberculoza activă. Ca dezavantaje ale acestui test se citează: erori de tehnică și interpretare, necesită personal experimentat, nu discriminează între infecția naturală și cea postvaccinală, nu stabilește diagnosticul de tuberculoză activă, reacții fals-pozitive sau fals-negative [4,5].

Suspiciunea de tuberculoză pulmonară la om este ridicată de prezența următoarelor manifestări clinice: tuse cronică peste 3 săptămâni, hemoptizii, durere toracică, dispnee, inapetență, scădere ponderală nejustificată, febră, astenie fizică inexplicabilă, transpirații nocturne, amenoree nejustificată. Însă simptomele și semnele clinice din tuberculoza pulmonară a adultului nu sunt nici specifice tuberculozei și nici obligatoriu prezente la toți bolnavii, mulți dintre aceștia fiind oligosimptomatici sau asimptomatici [4,5].

Diagnosticul radiologic al tuberculozei pulmonare (leziunile infiltrative, ulceratii, leziuni cavitare, leziuni fibrotice) are sensibilitate mare, dar specificitate redusă și nu este patognomonic pentru tuberculoză. Diagnosticul pozitiv nu se stabilește pe baza examenului radiologic, ci doar pe baza celui bacteriologic. Modificările radiologice sunt utilizate ca argumente pentru diagnosticul tuberculozei pulmonare neconfirmate bacteriologic [3].

Diagnosticul bacteriologic este singurul patognomonic și stabilește diagnosticul pozitiv al tuberculozei. Este efectuat, în majoritatea cazurilor, din sputa expectorată spontan, dar se pot folosi și alte produse patologice [3].

### Tuberculoza bovină

În ceea ce privește bovinele, testul de hipersensibilizare se bazează pe punerea în evidență a stării de alergie ce se instalează în organisme infectate cu bacilii tuberculozei. Tehnica constă în inocularea intradermică a unui derivat proteic purificat cu citirea și interpretarea modificărilor locale și generale la 72 de ore [6]. Fidelitatea testului tuberculinic (intradermic) la bovine, este exprimată, în principal, prin sensibilitate (Se), reprezentând capacitatea de a detecta corect animalele bolnave (infectate) de tuberculoză și prin

specificitate (Sp), respectiv proprietatea de a detecta corect animalele care nu au această boală (infecție).

În prezent, în România tuberculinarea intradermică la bovine se aplică după două procedee: testul unic (TU) și testul comparativ simultan (TCS). Diferența dintre cele două constă în faptul că în cazul TCS reacțiile apărute după 72 de ore la tuberculina bovină se compară cu reacția la tuberculina aviară. **Testul de hipersensibilizare cutanată** are o aplicabilitate mai largă în cazul efectivelor de bovine, datorită modului de execuție și ușurință în citirea rezultatelor. **Datorită reacțiilor pseudo- sau paraalergice**, dar și a subiectivității la citirea reacțiilor locale și a necesității repetării testului în caz de dubiu, se prelungesc timpii de așteptare și se menține potențiala sursă de infecție în efectiv. **Erorile testului tuberculinic sunt exprimate fie prin lipsa (anergie) sau diminuarea reacțiilor la animale infectate (hipoergie), fie printr-o creștere a reactivității (hiperergie).**

Testul "Stormont", test similar testului unic, constă în reinocularea tuberculinei PPD de tip bovin, după 7 zile, în același loc și în aceeași doză. Reacția se consideră pozitivă, în situația în care, după 24 ore de la a doua inoculare, se înregistrează o îngroșare a pliului cutanat cu cel puțin 5 mm. La animalele infectate cu *M. avium* nu apar reacții pozitive. Testul Stormont este mai sensibil ca testul unic, dar necesită manopere mai complexe [7].

Testul intravenos (TIV) a fost aplicat numai cu aprobarea Autorității Naționale Sanitar Veterinare, ca metodă complementară de diagnostic al animalelor anergice, în vederea scurtării perioadei de asanare, după 7-10 zile de la citirea testului intradermic, la animalele tuberculino-negative la recontrolul prin TCS din efectivele contaminate și la 12 luni după eliminarea ultimului caz din efectivele contaminate.

Testele tuberculinice intradermice se pot repeta după un interval de cel puțin 45 zile, iar testul intravenos se poate repeta după un interval de cel puțin 90 de zile. Intervalul de repaus după un test intravenos, pentru aplicarea următorului TCS, este de 60 de zile [8,9].

## DIAGNOSTICUL TUBERCULOZEI PRIN TESTE IMUNOLOGICE

Pe lângă metodele clasice de diagnostic a tuberculozei umane și bovine, tehnicile de imunitate celulară au devenit o provocare în diagnosticul rapid al infecției tuberculoase, însă la ora actuală costurile sunt crescute și accesibilitatea este redusă.

**1. Dozarea gamma interferonului la oameni: QuantiFERON-TB Gold.** Este un test nou pentru diagnosticul imunologic rapid, *in vitro*, al infecției latente sau active cu *M. tuberculosis*. Acest test a fost dezvoltat pornind de la principiul răspunsului celular mediat imun la antigene peptidice (proteine micobacteriene). Limfocitele T helper sintetizează interferon gama ( $\gamma$ IFN) la contactul cu antigenele specifice ale *M. tuberculosis* [proteinele: ESAT-6, CFP-10 și TB7.7(p4)], interferon care poate fi

evidențiat și măsurat printr-o reacție de tip Elisa. Aceste antigene peptidice sunt absente din toate sușele BCG și din majoritatea micobacteriilor non-tuberculoză, cu excepția *M. kansasii*, *M. szulgai* și *M. Marinum*. Testul QuantiFERON–TB Gold este util în diagnosticul tuberculozei latente sau active și pentru cazurile bacteriologic negative. Are înaltă sensibilitate 89% și specificitate 98% [10,11]. Testul oferă rezultatul în aproximativ 24 de ore, fiind considerat “standardul de aur” în diagnosticarea infecției tuberculoase la om [12].

**2. Dozarea gamma interferonului la bovine: BOVIGAM.** La bovine, determinarea concentrației  $\gamma$ IFN reprezintă o tehnică modernă, de curând aplicată și în România pentru diagnosticul tuberculozei. Eficiența sa a fost evaluată comparativ cu testele intradermice, care au cea mai largă aplicabilitate pe plan mondial la ora actuală. Testul imunoenzimatic se bazează pe detectarea la bovinele infectate a  $\gamma$ IFN eliberat de limfocitele T sensibilizate în prezența antigenelor micobacteriene (tuberculina PPD de tip bovin și aviar) [13]. Nivelul  $\gamma$ IFN este comparat cu cel al martorilor pozitivi și negativi și a unei probe nestimulate specific. Utilizarea anticorpilor monoclonali anti- $\gamma$ IFN bovin a determinat creșterea semnificativă a performanțelor, testul fiind mai sensibil decât IDR și având o specificitate de 96,2-98,1 % [9].

Testul imunoenzimatic EIAs- $\gamma$  IFN reprezintă o posibilitate de exploatare pentru diagnostic care ar putea elimina un procent însemnat din erorile tuberculinării, evitând sacrificarea unor animale valoroase, neinfectate sau menținerea în efectiv a unor vaci infectate cu *M. bovis*, cu infecție tuberculoasă în stadii incipiente, înainte de invadarea organismului și de răspândirea micobacteriilor patogene în mediu.

**3. Testul de transformare limfoblastică (TTL).** Răspunsul proliferativ al limfocitelor față de mitogene se poate evalua prin testul de transformare blastică, ca probă a măsurii reactivității celulare. Acest test are o sensibilitate de 97,1% și o specificitate de 95,1% [14], deși este insuficient de bine cercetat la animale.

Limfocitele T, efectorii celulari ai sistemului imun specific, reacționează față de mitogene, un grup diversificat de substanțe cu structură chimică variată (proteine, glicoproteine, lipozaharide, etc.) izolate din bacterii, plante sau țesuturi animale. Unele dintre aceste mitogene stimulează numai celulele T (fitohemaglutinina și concavalina A), altele (poke-weed mitogen) activează atât limfocitele T, cât și limfocitele B, în timp ce o a treia categorie (lipopolizaharidul bacterian și proteina A stafilococică) sunt mitogene specifice pentru limfocitele B. Testul se poate efectua folosind fie probe de sânge integral, fie celule separate prin centrifugare, în gradient de densitate. După suspendarea celulelor în mediul de cultură și incubare la 37°C pentru 24-48-72 ore sau chiar mai mult (în funcție de specie), se observă apariția blastilor în prima etapă, iar ulterior numărul mare de mitoze. Procesul este

însoțit de o activitate metabolică și sinteză proteică crescută, reflectată prin utilizarea accentuată a aminoacizilor și reducerea glucozei din mediu. Un răspuns cuantificabil față de mitogeni în cultura de limfocite, apreciat prin diferite metode, semnifică prezența celulelor imunologic competente, respectiv existența unei reacții imune mediate celular.

**4. Determinarea activității fagocitare.** Stabilirea numărului și morfologia subpopulațiilor leucocitare nu este completă fără asocierea unei evaluări a funcționalității acestor celule. Astfel, estimarea capacității funcționale a eozinofilelor poate aduce date importante în ceea ce privește protecția antiparazitară, iar estimarea capacității funcționale a macrofagelor în monitorizarea prezentării și procesării antigenului. Capacitatea de fagocitoză a celulelor polimorfonucleare poate să fie modificată datorită diverselor stări patologice. Neutrofilele și monocitele reprezintă populațiile cu activitate fagocitară majoritară. În diferitele etape ale fagocitozei (chemotaxia, interacțiunea cu particulele opsonizante, ingestia, dezvoltarea șuntului respirator, distrugerea și digestia microorganismelor) pot interveni diverse perturbări [15]. Acestea apar în cazul unor deficite neutrofile secundare, depistabile prin teste funcționale. S-a constatat că reducerea cantității de particule de carbon într-un amestec de sânge integral și tuș de China, evaluată spectrofotometric, oferă indicii asupra capacității funcționale a fagocitelor circulante [16]. **Macrofagele au capacitatea de a fagocita hematiile sensibilizate prin anticorpi specifici sau celulele levurice învelite în complement.** Celulele fagocitate se pot observa la microscop în interiorul macrofagelor, în urma colorării cu soluție Giemsa sau violet de gențiană. **Indicele fagocitar** se poate calcula numărând macrofagele care conțin una sau mai multe hematii și exprimând raportul procentual între acestea și totalul macrofagelor prezente în câmpurile examinate.

**5. Dozarea imunglobulinelor și complexelor imune circulante.** Nivelul seric al imunoglobulinelor constituie un indicator al reactivității umorale. Parcurgerea unor modificări într-un sens sau în altul semnaleză fie inițierea unui răspuns imun, fie prezența unor stări patologice însoțite de diminuarea reactivității sau areactivitate imunologică sub influența unor factori externi sau/și interni [17]. Ca răspuns față de agresiunea unor microorganisme patogene, la nivelul macroorganismelor se declanșează mecanisme imune complexe. În cadrul răspunsului imun nespecific, se observă adesea și producerea de gammaglobuline cu activitate de anticorpi. Consecutiv acestei reacții imune, apar modificări ale concentrației de imunoglobuline totale. Nivelul imunoglobulinelor este condiționat nu numai de sinteza plasmocitară, dar și de rata de consum a elementelor produse, respectiv de nivelul de constituire a complexelor imune. Complexele imune circulante (CIC) sunt agregate de dimensiuni mari, care pot fi precipitate cu diferiți compuși chimici, utilizân-

du-se în acest scop, în mod particular, polimerii cu greutate moleculară ridicată, cum este polietilenglicolul, chiar la concentrații mici ale complexelor, pe această însușire bazându-se metoda Haskova de determinare a complexelor imune circulante din ser sau plasmă [18].

#### 6. Testul de inhibare a migrării leucocitare.

În cadrul răspunsului imun mediat celular, limfocitele sensibilizate secretă interleukine active față de alte categorii celulare, cu rol atractant al macrofagelor efectoare la locul agresiunii. Una dintre aceste limfokine MIF (factorul de inhibare a migrării macrofagelor) inhibă *in vitro* ieșirea macrofagelor din capilarele în care se efectuează testul, atunci când este prezentă în mediul de reacție. Tehnica poate fi utilizată în scopul depistării stării de sensibilizare a leucocitelor sau a prezenței antigenului.

Ca metodă de lucru, suspensia celulară se absoarbe în capilarele de sticlă, astfel încât în partea superioară a acestora să rămână aproximativ 1 cm spațiu liber, apoi se închid la capătul inferior cu amestecul ceară-plastilină. Capilarele astfel pregătite se centrifughează. Se obține astfel o separare a celulelor de mediul de cultură. Se secționează capilarele la limita de separare dintre depozitul celular și supernatant, în condiții de sterilitate. Fragmentele care conțin depozitul se introduc în camerele de migrare. Se umplu camerele de migrare cu mediu RPMI 1640 conținând 5% ser fetal de vițel, apoi se închid cu lamelele sterile, astfel încât să nu se formeze bule de aer (proba martor). Pentru investigarea sensibilizării față de medicamente sau antigene, acestea vor fi introduse în mediul de migrare. Incubarea se face timp de 18 ore la 37°C, iar apoi se măsoară diametrele zonelor de migrare. Se calculează indicii de inhibare a migrării, raportând diametrul zonei de migrare a probei tratate la acela al probei martor. Indicii sub 0,80 semnifică inhibarea migrării leucocitare, iar cei ce depășesc această valoare demonstrează stimularea migrării leucocitare.

#### CONCLUZII

OMS apreciază că o treime din populația globului este infectată cu *Mycobacterium tuberculosis*, indicând o problemă majoră de sănătate publică și economică. Programele de prevenție și tratament ale infecției și bolii tuberculoase vizează: controlul transmiterii infecției, vindecarea indivizilor simptomatici și prevenirea bolii la cei cu infecție latentă. Ținta finală a acestor eforturi este eradicarea bolii.

Controlul optim al infecției tuberculoase necesită teste diagnostice precise. Pentru prevenție sunt necesare teste screening cu sensibilitate crescută, în timp ce pentru tratamentul celor la risc sunt necesare teste înalt specifice. Până recent, testul imunologic standard era intradermo-reacția la tuberculină. Utilizat pentru întâia oară în 1889, testul evaluează reacția de hipersensibilitate întârziată la tuberculină. Testului îi lipsește precizia diagnostică, datorită

ratei ridicate de rezultate fals-negative, a imposibilității diferențierii între infecția latentă și imunizarea cu BCG sau infecția cu alte micobacterii. Cea mai mare problemă rămâne însă corectitudinea inoculării intradermice și citirea rezultatului.

Aplicarea tehnicilor moderne de imunitate celulară ar crește acuratețea și rapiditatea diagnosticului tuberculozei, atât la om, cât și la bovine. Îmbunătățirea acestor tehnici prin estimarea concomitentă a reactivității celulelor limfoide față de extractele tuberculinice de tip bovin și uman vor permite diferențierea stării de sensibilizare față de un tip infectant sau altul de micobacterie, reprezentând o etapă superioară în diagnostic și totodată în întreruperea lanțului epidemiologic și, astfel, în menținerea stării de sănătate a populației.

#### Bibliografie

1. World Health Organization. Global tuberculosis control: a short update to the 2009 report, Geneva.
2. Didilescu C, Marica C. Tuberculoza - trecut, prezent, viitor. Editura Universitară "Carol Davila", București, 2004.
3. Programul Național de Control al Tuberculozei, 2007-2011.
4. Macri A, Moldovan O, Olar V, et al. Ghid de diagnostic al tuberculozei. Editura Matrix Rom, București, 2006.
5. Zamora CD, Pop M. Ftiziologie manual. Ed. Casa Cărții de Știință, Cluj-Napoca, 2003.
6. Whelan AO, Coad M, Peck ZA, et al. Influence of skin testing and overnight sample storage on blood-based diagnosis of bovine tuberculosis. Vet Rec, 2004; 155(7):204-206.
7. Radostits MO, Blood CD, Gay CC. Veterinary Medicine. 8<sup>th</sup> Edition, Bailliere, 1994.
8. Perianu T. Bacterioze. În: Perianu T (ed.) Boli infecțioase ale animalelor, vol. I. Editura Venus, Iași, 2003.
9. Vasiu C. Bacterioze la animale. Editura Mega, 2007.
10. Yotsumoto H. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis infection. Rinsho Byori, 2008; 56(11):1026-1033
11. Mazurek GH, Jereb J, LoBue P, et al. Guidelines for Using the QuantiFERON®-TB Gold Test for Detecting Mycobacterium tuberculosis Infection. Recommendations and Reports, 2005; 54:49-55. Available from: URL: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5415a4.htm>.
12. Andersen P, et al: Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. Lancet, 2000; 356(9235):1099-1104.
13. Orme IM, McMuray DN, Belisle JT. Tuberculosis vaccine development: recent progress. Trends. Microbiol, 2001; 9(3):115-118.
14. Moga-Mânzat R. Bacterioze. În: Boli infecțioase ale animalelor. Ed. Brumar, Timișoara, 2005.
15. Tizard IR. Veterinary immunology. 8<sup>th</sup> Edition, Saunders, 2009.
16. Pop M. Tuberculosis. Ed. Medicală Universitară „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca, 2002.
17. Roitt I. Essential Immunology. 7<sup>th</sup> Edition, Blackwell Scientific Publication, 1991.
18. Ghergariu S, Pop AL, Kadar L, et al. Manual de laborator clinic veterinar, Editura All Medical, București, 2000.