

ASUPRA VALORII METODELOR RECENTE DE SERODIAGNOSTIC ÎN DEPISTAREA PRECOCE A INFECȚIUNII TUBERCULOASE

C. C. Opreșcu

Imunitatea antituberculoasă nu recunoaște — spre deosebire de majoritatea celorlalte infecții — un substrat *umoral*, legat de prezența anticorpilor serici, fiind legată cu precădere de *reacții celulare*. *Anticorpicii specifici* din ser nu conferă nici o protecție manifestă față de infecția bacilară virulentă, putînd totuși servi ca „*teste de infecțiozitate*” care, chiar dacă nu au raporturi directe cu potențialul evolutiv al infecției, *traduc fidel existența unei infecții bacilare*, chiar și în cazurile în care testele alergice (tuberculinice) nu sînt îndeajuns de concludente.

Lipsa unei metode care să îngăduie punerea în evidență a „*leziunilor minime evolutive*” înainte ca semnele clinice și radiologice să devină manifeste, face ca testele serologice să întretină speranța că perfecționarea lor ar putea duce la diagnosticul precoce al infecției evolutive.

Deocamdată, căutarea și dozarea anticorpilor antituberculoși, prin metodele serologice prezintă interes pentru:

1. *depistarea precoce* a infecției bacilare oculte, cînd reacțiile tuberculinice nu sînt suficient de concludente (reacții dubioase);
2. în cazurile de „*anergii fiziologice*” (sarcină, bătrînețe înaintată) sau patologice (boli anergizante și tuberculozele foarte avansate);
3. *pentru controlul eficienței vaccinărilor cu B.C.G.*, ca test suplimentar al probelor alergice (tuberculinice);
4. *în diagnosticul diferențial* dintre infecții cu tablou clinic asemănător (grăbulie, tifobaciloză — febră tifoidă — meningite etc.).

Metodele folosite în trecut în scop de serodiagnostic al tuberculozei, ca: dozarea haptoglobinei, reacția Vernes cu rezorcină, și cea cu sulfat de cadmiu, albumino-reacția, tirozinoreacția, reacția cu IK și altele, n-au putut intra în practică din pricina lipsei lor de specificitate, singurele care mai prezintă interes, rămîind tot cele de decelare a anticorpilor umorali, prin: a) reacții de fixare a complementului; b) reacții de hemaglutinare și de hemoliză condiționată; c) reacții de „dublă difuziune în gel”.

Reacțiile de fixare, folosesc ca „antigeni fixatori”, fie antigenul peptonat (B₂) al lui Besredka, preparat din culturi pe mediu cu ou, preconizat de acest autor, dar care dă un procent însemnat de reacții nespecifice (mai ales în cazurile de sifilis, lepră și malarie), fie antigenul metilic al lui Boquet și Nègre, de natură fosfolipidică, și care s-a arătat superior, prin fixitatea și durata lui de conservare, tuturor celorlalte antigene încercate, așa cum se vede în tabelul de mai jos, ce se referă la titrarea anticorpilor dintr-un ser specific (0,1 ml), în prezența unui exces de antigen:

Antigenul încercat	Doze minime fixate	Cantitatea de antigen (ml)
Extract etilic direct	8	0,1
Suspensie B.C.G. (1 mg/ml)	36	1,0
Extract apos peptonat	40	0,1
Extract etilic epuizat cu acetonă	40	0,1
Extract metilic epuizat cu acetonă	60	0,1
Antigen Besredka	60	0,3

Tehnica de elecție a rămas cea recomandată de Calmette și Massol, sintetizată în tabelul nr. 1, care necesită folosirea a trei serii de tuburi; o serie (5 tuburi) cu o cantitate fixă de ser de cercetat inactivat (0,2 ml) și o cantitate fixă de antigen metilic diluat 1:20 (1,0 ml), o a doua serie (3 tuburi) cu o aceeași cantitate de ser (0,2 ml) dar fără antigen metilic, și o a treia (3 tuburi) cu o cantitate fixă de antigen (1,0 ml), servind ca martori.

Tabelul 1.

Tuburi	Ser inactivat (ml)	Antigen metilic 1/20	Alexină 1/15 (0,1 doză min.)	Ser fiziologic (ml)	Hematii (ml)	Ser hemolitic (5 doze min.)
1	0,2	1,0	0,1	1,2	1	0,1
2	0,2	1,0	0,2	1,1	1	0,1
3	0,2	1,0	0,3	1,0	1	1,0
4	0,2	1,0	0,4	0,9	1	0,1
5	0,2	1,0	0,5	0,8	1	0,1
S ₁	0,2	—	0,1	2,2	1	0,1
S ₂	0,2	—	0,2	2,1	1	0,1
S ₃	0,2	—	0,3	2,0	1	0,1
A ₁	—	1,0	0,1	1,4	1	0,1
A ₂	—	1,0	0,2	1,3	1	0,1
A ₃	—	1,0	0,3	1,2	1	0,1

În general, *serurile tuberculoșilor evoluivi fixează complementul în prezența antigenului metilic, într-o proporție de 85%, a cazurilor* ceea ce denotă o specificitate remarcabilă. Numai serurile sifilitice dau false reacții pozitive cu acest antigen, într-o proporție minimă. În infecțiile bacilare oculute se obțin rezultate pozitive cu doze mici de alexină (1—2 unități), dar dacă fixarea are loc la peste 3—4 unități alexice, concomitent cu o RBW negativă, există o mare probabilitate pentru existența unei baciloze evolutive. În aprecierea rezultatelor trebuie însă avut în vedere că:

— serurile vechilor bacilari pot conține vreme îndelungată anticorpi specifici, chiar după vindecarea clinică a bolii;

— unii bolnavi cu leziuni active pot prezenta, în unele perioade din evoluția bolii o lipsă completă de anticorpi fixatori;

— anticorpii fixatori, spre deosebire de cei hemaglutinanți, tind să dispară din ser în perioada terminală a bolii.

Reacțiile de hemaglutinare, atât de mult cercetate în ultimii ani se bazează pe proprietatea hematiilor care au „adsorbit” în prealabil un extract bacilar — de regulă de natură polizaharidică — de a fi aglutinate în prezența serurilor provenite de la organisme infectate cu bacili tuberculoși. Propuse încă în 1948 de către *Middlebrook* și *Dubos*, aceste reacții au constituit un remarcabil progres în serologia tuberculozei, prin gradul înalt de *sensibilitate* și de *specificitate* în decelarea anticorpilor umorali anti-tuberculoși. Excepiind prepararea antigenelor necesare, tehnica reacției este relativ foarte simplă.

Antigenele folosite în reacție sînt, în general, extracte bacilare de natură *polizaharidică*. Extractele bacilare de altă natură: tuberculo-proteine sau tuberculolipide, ca și *tuberculina brută*, s-au arătat inactice, sau cu o activitate sensibilizantă redusă. Tuberculinele, care conțin un procent relativ ridicat de polizaharizi, nu pot fi folosite din cauza glicerinei hemolizante pe care o conțin. Prin reducerea proporției de glicerină, se obțin tuberculme active, cum sînt preparatele „*O. T. Lederle 4x*”, sau „*J. P. 48*”.

Noi preparăm 2 polizaharizi bacilari: unul obținut din mediul de cultură sintetic Santon, în care s-au dezvoltat bacili tuberculoși virulenți, și altul obținut chiar din corpii bacilari după cum urmează.

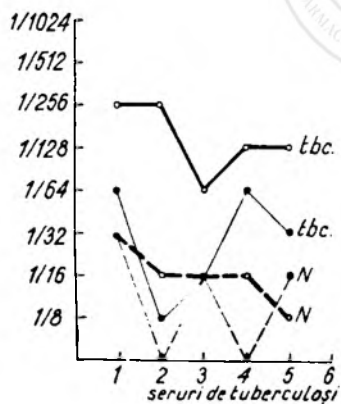
— Culturi de bacili tuberculoși virulenți de tip uman ($H_{37}Rv$) pe mediu Santon, în vîrstă de 6—8 săptămîni, sînt sterilizate prin autoclavare, și apoi filtrate prin hîrtie Chardin și prin filtru Seitz EK. Filtratele obținute sînt concentrate 1:10 din volumul inițial, într-un ventilator electric (40—50° C), după care sînt dializate în saci de celofan (48 ore față de apă curgătoare și 48 ore față de apă distilată sterilă). Soluția dializată se filtrează prin Seitz EK, se reconcentrează (spre a-i reduce cît mai mult din volum), apoi se tratează cu acid tricloracetic q.s.p. 4% (care precipită tuberculoproteinele), iar supernatantul este redializat pînă la îndepărtarea totală a acidului tricloracetic. Soluția apoasă rezultată este evaporată pînă la uscare în ventilator electric (40—40° C), substanța uscată rezultată reprezentînd „polizaharidul total”. Acesta este supus unor fracționări, după cum urmează: 20 g polizaharid total se dizolvă în 100 ml apă distilată, se centrifughează, se filtrează, iar soluția limpede este tratată cu sulfat de amoniu q.s.p. 100%. Se formează imediat un precipitat brun, ce se ridică la suprafața lichidului. Se lasă în repaus 24 ore, precipitatul format este izolat prin centrifugare și spălat cu sulfat de amoniu 100%, apoi este dizolvat în apă bidistilată, dializat, redus în vid (45° C) și evaporat la uscare în vid fosforic. Substanța uscată rezultată („fracțiunea 1”) este îndepărtată, iar supernatantul este tratat cu o soluție 80% acid tricloracetic 4%; se lasă 24 ore în repaus — spre a depune precipitatul format, iar depozitul format (separat de supernatant prin centrifugare) se spală cu sulfat de amoniu 100% și cu acid tricloracetic q.s.p. 4%, se reia în apă bidistilată și se dializează. Soluția apoasă rezultată se concentrează în vid (45° C), apoi se evaporază la vid fosforic, iar substanța uscată („fracțiunea 2”) este îndepărtată. Supernatantul rămas este dializat (pînă la dispariția totală a sulfatului de amoniu), soluția apoasă rezultată este concentrată în vid (45° C) și apoi introdusă — picătură cu picătură și agîtînd continuu — în alcool de 95° (al cărui volum se calculează așa încît concentrația finală a amestecului să fie de 75%). Se lasă în repaus 24 ore, precipitatul alb depus se separă prin decantare și centrifugare, se usucă în vid fosforic, iar produsul uscat obținut reprezintă *polizaharidul activ*.

Polizaharidul endobacilor îl preparăm într-un mod mai simplu.

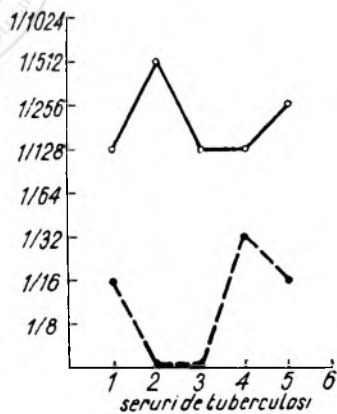
— Se suspendă 10 g corpi bacilari în 100 ml fenol și se lasă timp de 24 ore la 37° C, agîtînd cît mai des suspensiya; apoi se centrifughează, iar depozitul bacilar se spală din nou cu fenol. După îndepărtarea fenolului, germeii se spală cu acetona (pînă la îndepărtarea urmelor de fenol), și se usucă. Corpii bacilari uscați se suspendă în 150 ml ser fiziologic conținînd 20% metanol și se mențin 48 ore la 37° C agîtînd mereu. Corpii microbieni sînt apoi îndepărtați prin filtrare, iar antigenul rămas în soluție este



Fig. nr. 1.



Graficul nr. 1.



Graficul nr. 2.

diabazl 24 ore față de apă curgătoare și 24 ore față de apă distilată, apoi este filtrat prin Seitz EK, și hofilizat. Produsul finit este o pulbere fină, instantaneu solubilă în apă fiziologică, și este format dintr-un complex de polizaharid cu neucleoproteină.

Tehnica efectuării reacției de hemaglutinare este următoarea:

a) se dizolvă 200 mg polizaharid din mediu (sau 2,0 mg de polizaharid endobacilar) în 10 ml ser fiziologic (0,85%);

b) se adaugă acestei soluții, 0,5 ml hematin de oaie (grup O₇₅), spălate în prealabil de trei ori cu apă fiziologică. Dacă se folosesc hematin de oaie, este necesară absorpția aglutininelor naturale de specie din serurile de cercetat, prin două contacte succesive de câte 20 minute, cu câte 0,1 ml hematin normale pentru fiecare ml ser de cercetat (diluat 1:2); se agită bine;

c) se incubează amestecul timp de două ore într-o baie marină menținută la 37° C, agitând cât mai des (pentru a menține hematinile în suspensie);

d) după acest termen, suspensia se centrifughează, supernatantul este îndepărtat (dar nu se aruncă, el fiind capabil să „sensibilizeze” un nou volum de hematin normale), iar depozitul de hematin se spală de 2—3 ori cu ser fiziologic, după care se suspendă în 1/2 ml soluție izotonică. Din această suspensie (0,5%) se adaugă la fiecare diluție de ser, câte 0,5 ml;

e) la fiecare diluție de ser (0,5 ml), se adaugă câte 0,5 ml suspensie de hematin sensibilizate (antigen). Concomitent, se prepară câte două tuburi-martori: unul cu 0,5 ml diluție 1:8 ser de cercetat + 0,5 ml suspensie hematin normale (nesensibilizate), și al doilea cu 0,5 ml ser fiziologic + 0,5 ml suspensie hematin sensibilizate (antigen). Se incubează totul timp de două ore la 37° C (termostat), după care se face critica reacției.

Din cercetările noastre, rezulta că un titru hemaglutinant superior la 1:64 indică în 80% o reacție pozitivă. Prin reacții de hemaglutinare cu polizaharid endobacilar se pot distinge nu numai organismele infectate de cele indemne, dar și *tipul* de micobacterii (uman sau bovin) (grafice 1 și 2).

O modificare interesantă a reacției de hemaglutinare, capabilă să-i mărească semnificativ sensibilitatea, este așa-numita „*reacție de hemoliză condiționată*”, prin adăugarea de ser de cobai saturat (alexină). Alexina se diluează 1:3 cu ser fiziologic apoi se adaugă hematiile de oaie în proporție de 1:15 din volumul obținut. Se lasă în contact 10 minuate la +4°C și se centrifughează repetindu-se încă odată operația. Pentru titrarea alexinei se pot folosi două procedee:

a) cu un ser-etalon (ser pozitiv cu titru cunoscut) în două diluții: una (A) care dă o hemoliză totală sau subtotală, și alta (B), de două ori mai mare, care dă o hemoliză slabă sau nulă; se lasă o oră la 37° C (baie-marină), agitând la fiecare sfert de oră; valorile diluției de folosit corespund unei doze minime hemolitice;

b) cu un ser hemolitic antioaie: se lasă o jumătate de oră la 37° C (baie-marină), agitând la fiecare sfert de oră; valorile diluției de folosit corespund la cinci doze minime hemolitice (diluția optimă este de cele mai multe ori de 1:3). Alexina titrată se adaugă în fiecare tub sub un volum de 0,05 ml; se lasă o oră la baie-marină (37° C) agitând din când în când, apoi se citește: reacția este considerată pozitivă dacă se produce hemoliză la o diluție de cel puțin 1:8.

Ambele reacții se completează reciproc. În *clinica umană*, reacția de hemoliză condiționată s-a arătat superioară celei de hemaglutinare (Gernez-Rieux și Tacquet; antigen: O.T. purif. I.P.48), așa cum se vede din tabelul de mai jos:

Felul reacției	Reacții pozitive %	
	sănătoși	tuberculoși
Hemaglutinare	10	61,3
Hemoliză cond.	12	82,4

Recent (1958—1962), autori japonezi (*Takahashi* și col.) au arătat că în serul organismelor infectate cu bacili tuberculoși se elaborează de fapt trei categorii distincte de anticorpi specifici, corespunzând la trei antigene bacilare diferite: *antituberculoproteinici*, *antipolizaharidici* și *antifosfatidici*. Cei mai interesați sînt aceștia din urmă, întrucît *elaborarea lor este în funcție de potențialul evolutiv al leziunilor specifice*. Ei pot fi decelați cu ajutorul unui antigen format din hematii sensibilizate cu fracțiunea fosfatidică a bacilului tuberculos.

Reacțiile de „dublă difuziune“ în gel, introduse în imunologie de *Ouchterlony* și *Oudin* sînt reacții de precipitare extrem de sensibile, care se produc la contactul dintre antigen și anticorp, după o prealabilă difuziune a acestora prin geloză neutră. În infecția tuberculoasă, aceste reacții au servit pentru studiile asupra raporturilor antigenice dintre micobacterii, prin detectarea anticorpilor umorali specifici față de diferite atigene micobacteriene (*Parlett* și *Youmans*, 1956—1958), și pentru punerea înt evidență a acestor anticorpi în serul animalelor infectate (iepuri), folosind ca antigene suspensii de micobacterii vii. de diferite tipuri (*Parlett* și *Youmans*, 1958. *Rheims*. *Burell* și *Birkeland*, 1956). Prin această tehnică s-au putut obține mininunșase inele de precipitare diferite, corespunzînd la șase categorii de anticorpi umorali diferiți față de *Mycobaterium tuberculosis*. Reacția a fost cercetată și la om.

Tehnicile folosite pentru efectuarea acestei reacții în serologia tuberculozei sînt: a) fie *tehnica lui Ouchterlony*, în plăci Petri cu geloză (2,5%), în care serul de cercetat și antigenele se depun în mici cupule tăiate în agar; fie după metoda *Oakley*, modificată de *Parlett* și *Youmans* și simplificată pentru uzul curent de *Greene* și col., și pe care o recomandăm și noi. Iată tehnica reacției.

— Într-o serie de tuburi înguste, foarte bine spălate în prealabil și avînd diametrul interior de 3 mm (3 mm × 10 cm) și pe al căror perete intern se depune în prealabil un strat (film) subțire de agar 1—2%, se introduce antigenul pe o distanță de 3 cm de la fund. Antigenul este reprezentat de un filtrat de cultură în mediu sintetic (Sauton) de bacili tuberculoși virulenți de tip uman, concentrat prin evaporare 1 : 10 și sterilizat prin ultrafiltrare. El se amestecă în prealabil (în părți egale și în proporție de 2 : 1, pentru eliminarea reacțiilor fals negative) cu agar 1—2% (în tampon-barbital, pH=7,4, în baie-marină la 50° C, după care este introdus cu o pipetă sterilă, în tub. După solidificare, se introduce deasupra un strat de 0,5 cm agar 2% (în tampon-barbital), peste care se mai adaugă un al treilea strat (3 cm) din serul de cercetat. Tuburile cu amestec sînt introduse într-un recipient curat și acoperit, și se lasă la 37° C timp de 5 zile, cercetîndu-le la fiecare 24 ore.

Citirea reacției se face la întuneric, pe un fond negru, lăsînd raza de lumină de la sursă să cadă oblic din spate. Notarea benzilor de precipitare apărute se face zilnic, însemnînd fiecare bandă cu un + și lipsa de benzi cu 0 (fig. 1).

Metoda este, după cum se vede, simplă, și nu necesită material greu de procurat. Ea permite o detectare a anticorpilor tuberculoși, într-o proporție mai însemnată decît a tuturor celorlalte reacții serologice folosite în acest scop, cu o *sensibilitate* și o *specificitate* remarcabile. Titrul anticorpilor serici astfel detectați este direct proporțional cu intensitatea inelelor de precipitare formate. *El este în totdeauna mai ridicat în serurile provenite de la cazuri de tuberculoză evolutivă, decît la cele provenite de la cazuri de infecții clinice inaparente.*

Sosit la redacție: 18 iunie 1962.

Bibliografia la autor.