

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" CLUJ-NAPOCA

ȘCOALA DOCTORALĂ

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Diagnosticul bacteriologic în tuberculoza pulmonară

Student Doctorand **Nicolae PETRE**

Conducător de doctorat Prof.Dr. **Carmen Monica POP**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

INTRODUCERE 13

1. Istoricul tuberculozei 15

2. Epidemiologia tuberculozei 22

3. Structura mycobacteriei tuberculoase 25

4. Diagnosticul pozitiv al tuberculozei 28

4. 1. Diagnosticul clinic 28

4. 2. Diagnosticul radiologic convențional 29

4. 3. Diagnosticul imagistic 32

4. 4. Diagnosticul endobronșic 32

4. 5. Diagnosticul bacteriologic al tuberculozei 33

4.5.1. Examenul microscopic 33

4.5.2. Evidențierea mycobacteriilor prin dezvoltarea pe mediile de cultură 35

4.5.3. Antibiograma 36

4.5.4. Reacția de tip PCR 37

CONTRIBUȚII PERSONALE 39

1. Introducere și obiective generale 41

2. Studiul I. Cercetare privind morbiditatea tuberculozei în Valea Jiului 44

2.1. Introducere 44

2.2. Material și metodă 45

2.3. Rezultate 46

2.4. Discuții generale 65

3. Studiul II. Metode de diagnostic în tuberculoza cu aplicație asupra valorii metodei pcr în acest diagnostic 66

3.1. Introducere 66

3.2. Scopul studiului 66

3.3. Material și metodă 66

3.4. Rezultate 81

3.5. Discuții 91

4. Concluzii generale 93

5. Originalitatea și contribuțiile inovatoare ale tezei 94

REFERINȚE 95

ANEXE 105

INTRODUCERE

Tuberculoza pulmonară reprezintă nu doar o boală între multe altele, dar și o stare ce influențează nu doar fizicul ci și psihicul pacientului.

Implicațiile evoluției bolii tuberculoase nu sunt așadar de ordin somatic, ci ele se extind în domeniul vieții profesionale, afectivității, creativității și prezenței istorice a purtătorilor bolii.

Din această perspectiva am structurat partea generală a prezentei teze care exprimă stadiul actual al cunoașterii.

Am acordat o atenție particulară istoricului diagnosticului și tratamentului tuberculozei în România, deoarece din conținutul său se pot degaja elemente care au stat la baza dezvoltărilor ulterioare în domeniul cercetării. Printre acestea se numără dezvoltarea în perioada interbelică al sec. XX a unei infrastructuri care s-a dovedit a fi nu doar un răspuns la o nevoie de moment ci și o contribuție la premisele de dezvoltare a tratamentului antituberculos în perioadele ulterioare[63].

Aceste evoluții interne sunt prezentate ca o consecință istorică și logică a unor evoluții mondiale al căror reper îl reprezintă descoperirea agentului etiologic al tuberculozei de către Robert Koch, descoperirea și utilizarea razelor X în diagnostic consecutiv contribuției geniale ale lui Konrad Roentgen, precum și a descoperirii și introducerii progresive a tuberculostaticelor.

O perspectivă morfologică asupra Mycobacteriei tuberculoase o consider utilă, dar în limitele de înțelegere și de utilitate clinică ale clinicienilor [93].

Aspecte de diagnostic clinic fac parte, de asemenea, din prezentarea generală deoarece ele constituie una din premisele cercetării doctorale.

În legătură cu diagnosticul paraclinic, considerațiile s-au extins cu precădere în domeniul biologic, fără a uita însă de valoarea metodelor de radiologie convențională și a celor de imagistică.

În ce privește diagnosticul biologic ne propunem să prezentăm echilibrat deopotrivă metodele clasice și cele foarte moderne.

Dacă din perspectiva actuală metodele clasice par a fi suverane, și unii dintre noi putem să ne considerăm "supuși" laboratorului bacteriologic, trebuie să acceptăm că evoluțiile merg spre o altă direcție și anume cea a metodelor genetice și moleculare moderne[38].

Având șansa de a face recurs în perioada cercetării doctorale la aceste metode am putut constata anumite avantaje ale acestor metode moderne și progresiv m-am convins de valoarea și utilitatea acestora. A fost momentul în care am făcut "declicul" între o mentalitate statuată dar rigidă și inflexibilă și deschiderea spre performanță pe care o dau metodele moderne.

În ultimele decenii s-au dezvoltat o seamă de tehnici care și-au propus să permită punerea în evidență mai rapidă a Mycobacterium tuberculosis precum testarea producerii de nitrat-reductază, testarea producerii de niacina și multe alte metode.

Începând cu 1980 s-au dezvoltat sisteme automate de cultivare și semnalare a creșterii mycobacteriilor, aceste sisteme de cultivare în mediu lichid fiind și în prezent "Gold standard" pentru diagnostic. Aceste teste se combină în mod organic cu cele imunocromatografice și cu antibiograma creând actualmente condițiile unui diagnostic deopotrivă rapid și fiabil.

În sfârșit trebuie să specificăm asimilarea tehnicilor de biologie moleculară precum folosirea reacției de polimerizare în lanț (PCR).

CONTRIBUȚII PERSONALE

Studiul 1. Își propune să evalueze morbiditatea prin tuberculoză în Valea Jiului.

Considerații generale privind contextul geografic și socio-economic în care am desfășurat studiul sunt făcute ca preambul.

Așa cum am mai arătat studiul s-a efectuat în regiunea geografică a României cunoscută sub numele de Valea Jiului, spațiu delimitat între Munții Retezat și Parâng, prin curgerea râului Jiu. Este o regiune caracterizată prin prezența a numeroase comunități legate de o industrie monocoloră, comunități care în ultimele decenii au fost ridicate la gradul de orașe.

În toate aceste localități activitatea umană principală a fost reprezentată de exploatarea cărbunelui. Cărbunele reprezintă aici o resursă de subsol și este exploatat, așa cum vom arăta mai jos prin întreprinderi miniere care prin specificul activității aduc la suprafață resursele carbonifere ale subsolului.

2.2. Material si metodă

Cercetarea a fost efectuată pe o perioadă de patru ani, respectiv 2010-2013, pe un număr de 528 pacienți. Raportat la populația Văii Jiului, eșantionul cercetat reprezintă 0,44 % [46].

În funcție de localitatea de domiciliu, pacienții provin din Aninoasa în număr de 20 pacienți, care, raportat la numărul de locuitori stabili, respectiv 4.360 locuitori, reprezintă 0,46%, din Lupeni în număr de 115 pacienți, care, raportat la numărul de locuitori stabili, respectiv 23.390 locuitori, reprezintă 0,49%, din Petrila în număr de 91 pacienți, care, raportat la numărul de locuitori stabili, respectiv 22.692 locuitori, reprezintă 0,40%, din Petroșani în număr de 152 pacienți, care, raportat la numărul de locuitori stabili, respectiv 37.160 locuitori, reprezintă 0,41%, din Uricani în număr de 40 pacienți, care, raportat la numărul de locuitori stabili, respectiv 8.972 locuitori, reprezintă 0,45%, din Vulcan în număr de 107 pacienți, care, raportat la numărul de locuitori stabili, respectiv 24.160 locuitori, reprezintă 0,44%, ceilalți pacienți, în număr de 3 fiind din alte localități.

2.3. Rezultate

Analiza distribuției populaționale arată că populația luată în studiu în Valea Jiului este în continuare predominant ocupată cu mineritul. Ca urmare prin extrapolare putem aprecia că peste 3/4 din locuitori sunt membri ai familiilor a căror sursă de existență o reprezintă încă mineritul.

Cercetarea a fost efectuată în perioada 2010-2013, evoluția anuală fiind descrescătoare, cu 189 cazuri în anul 2010, 124 cazuri în anul 2011, 108 cazuri în anul 2012, respectiv 107 cazuri în anul 2013.

Studiul morbidității prin tuberculoză la grupul populațional al Văii Jiului arată variații între 3,79 și 28,79%. Aceste variații nu pot fi explicate prin existența unui fenomen natural al tuberculozei, ci exprimă mai degrabă o dinamică a adresabilității la un anumit centru. Această remarcă se susține și prin constatarea că diferitele centre medicale ale Văii Jiului au cunoscut modificări de substanță în ce privește volumul și conținutul lor. Aceasta a făcut ca pacienții dintr-o anumită zonă să trebuiască în mod fortuit să se adreseze unui alt centru medical decât cel al localității de reședință.

Analiza dinamicii suferinței tuberculoase cunoaște o regresie care se înscrie corelativ cu fenomenul consemnat la nivel național. O analiză a relației dintre riscul profesional și riscul de contactare a tuberculozei în perioada luată în studiu e greu de făcut. Informațiile de tip documentare tehnică privitoare la condițiile de lucru din această perioadă vorbesc despre o ameliorare a statusului profesional al minerilor care nu mai poate fi corelată în opinia noastră cu dinamica infecției tuberculoase.

Din totalul de 528 pacienți, un număr de 415 (78,60%) pacienți sunt bărbați și 113 (21,40%) pacienți sunt femei. Predominanța sexului masculin este facil explicabilă prin condițiile predispozante pentru tuberculoză precum etilotabagismul frecvent la populația minerească, predominantă de sex masculin.

Datorită specificului urban al zonei, Valea Jiului fiind o salbă de localități urbane, cu 3 orașe și 3 municipii, majoritatea pacienților provin dintr-o zonă urbană, cu un număr de 525 pacienți ceea ce reprezintă 99,43%, din mediul rural provenind doar un număr de 3 pacienți, respectiv 0,57%.

Analizând vârstă pacienților, constatăm că cele mai multe cazuri apar la persoane cuprinse între 41-50 de ani, numărul fiind mai mic în cazul persoanelor tinere sau a celor în vârstă de peste 70 de ani.

O analiză privind raportul mediu urban/mediu rural e greu de făcut datorită unor particularități „artificiale” geografice. Localitățile luate în studiu sunt clasificate în mod nefiresc după opinia noastră în municipii și orașe (conform unei tradiții din epoca comunistă) chiar dacă modul de viață conține încă o seamă de componente rurale.

Dacă analizăm pacienții din eșantionul studiat după locul de muncă, observăm o prezență mare a persoanelor care muncesc (72 persoane subteran și 5 suprafață) sau au muncit (112 persoane subteran și 7 suprafață) în mediul minier. De asemenea, un număr mare de pacienți sunt fără ocupație (121 persoane) sau șomeri (7 persoane).

Pacienții afectați provin în imensa majoritate din grupul celor cu activitate în mediul subteran. O corelație cu această particularitate a mediului profesional este încă dificil de făcut în condițiile unei economii monoculare în care o altă preocupare a populației active decât mineritul nu există decât în mică măsură.

Dintre pensionari asistați medical, în număr de 173 persoane, un număr 150 persoane sunt de sex masculin, iar dintre aceștia, cea mai mare parte au muncit în cadrul exploatărilor miniere, în subteran, respectiv 112 persoane.

Patologia tuberculoasă se prelungește în grupul pensionarilor și evident al celor de sex masculin exprimând atât o cronizare a bolii la acești pacienți cât și o susceptibilitate crescută chiar și după întreruperea efectului noxelor favorizante.

Dacă ne referim la pacienții care desfășoară, sau au desfășurat, activitate în mediul minier, atât la subteran cât și la suprafață, constatăm că din numărul total de pacienți, un procent de 37,12%, respectiv 196 persoane, provin din acest mediu.

O constatare în continuare îngrijorătoare o reprezintă diagnosticarea în intervalul luat în studiu a prezenței bolii la 1/3 din subiecți.

Dacă analizăm pacienții după studii, constatăm că un număr de 7 (1,33%) pacienți sunt fără studii, 35 pacienți, reprezentând 6,63%, au studii primare, 84 pacienți, reprezentând 15,91%, au studii gimnaziale, 218 pacienți, reprezentând 41,29%, au școală profesională, 154 pacienți, reprezentând 29,17%, au studii liceale, 5 pacienți, reprezentând 0,95%, au studii postliceale, iar un număr de 25 pacienți, reprezentând 4,73%, au studii superioare.

Se constată că cei mai mulți au studii medii și profesionale, ceea ce corespunde cu baremul profesional a meseriei minerești.

În funcție de diagnostic: TBC pulmonar – 461 pacienți, respectiv 87,31%, Pleurezie – 47 pacienți, respectiv 8,90%, TBC ganglionar – 7 pacienți, respectiv 1,33%, TBC renal și Spondilodiscită cu câte 2 pacienți, respectiv 0,38% și TBC osos, TBC intestinal, TBC aparat genito-urinar, TBC peritoneal, TBC bronșic, Tuberculoame intracraniene, Emfizem, Peritonita cu ascită probabil specifică respectiv Pericardită cu câte 1 pacient, ceea ce reprezintă 0,19%.

În cazul în care criteriul de reprezentare este în funcție de localizare, putem spune că avem 461 pacienți cu TBC pulmonar, ceilalți, în număr de 67 prezentând diagnostic tuberculoză extrapulmonară[129].

Marea majoritate a acestor pacienți se încadrează în profiul habitual al bolii reprezentând localizarea pulmonară, procentul localizărilor extrapulmonare fiind concordând cu datele din literatură.

În pofida expunerii la noxe majore precum pulberile și umezeală și al consumului exagerat de alcool și tutun trebuie să constatăm că în rândul pacienților studiați de noi nu am înregistrat forme recrudescențe de tip MDR.

În ceea ce privește factorii de risc, constatăm că un număr de 374 pacienți, reprezentând 70,83% sunt fumători, un număr de 227 pacienți reprezentând 43,18% consumă băuturi alcoolice și un număr de 404 pacienți, reprezentând 76,52% consumă în mod regulat cafea.

În ceea ce privește modul de viață trebuie să remarcăm persistența obiceiului de a consuma băuturi alcoolice chiar dacă atât în termeni proporționali cât și cantitativi fenomenul este în recul. Rămâne în continuare îngrijorător nivelul tabagismului care se exprimă și prin comorbiditățile pe care le-am constatat la pacienții noștri.

Relația dintre riscul de îmbolnăvire și consumul excesiv de alcool respectiv tutun a fost studiată sub raportul semnificației statistice prin utilizarea testului chi pătrat[97].

Testul chi pătrat compara o distribuție de frecvențe absolute observate cu o distribuție teoretică (așteptată) de frecvențe absolute pe baza distribuției de probabilitate chi pătrat.

Este o distribuție continuă, simetrică și se bazează pe aproximația normală a distribuției binomiale. Distribuția chi pătrat cu 1 grad de libertate este identică cu distribuția pătratului raportului critic.

Testul chi patrat este folosit pentru a compara o distribuție observată cu o distribuție teoretică sau compară 2 sau mai multe distribuții observate.

$T_{\text{calculat}} > T_{\text{tabelar}} \rightarrow H_0$ se respinge \rightarrow există o legătură între prezența tuberculozei și fumatul excesiv.

$T_{\text{calculat}} < T_{\text{tabelar}} \rightarrow H_0$ se acceptă \rightarrow nu există nicio legătură între prezența tuberculozei și consumul excesiv de alcool.

2.4. Discuții generale

Analiza fenomenului tuberculos în Valea Jiului ne arată 2 categorii de elemente de caracterizare. Pe de o parte o primă categorie este cea pozitivă și dătătoare de optimism și care constă într-o diminuare a incidenței tuberculozei în regiunea geografică luată în studiu în cadrul unui proces concordant cu cel de la nivel național. Printre explicațiile acestui fenomen se numără și atitudinea proactivă adoptată de structurile sanitare din zonă care au făcut eforturi de a se încadra în standardele și normativele perioadei actuale [121].

Cealaltă categorie de factori sunt cei favorizanti reprezentați deopotrivă de noxele profesionale și de consumul de toxice.

O problemă interesantă ivită pe parcursul elaborării acestei teze o reprezintă cea a predictibilității viitorului în condițiile în care evoluțiile planetare sunt în defavoarea exploatării energiilor fosile și din această perspectivă este greu de spus care va fi impactul pe termen mediu și lung asupra acestei regiuni actualmente aproape exclusiv dependentă de exploatarea carboniferă.

3. Studiul al II-lea. Metode de diagnostic biologic în tuberculoză cu aplicație asupra valorii metodei PCR în acest diagnostic

3.1. Introducere

Încă din partea generală am subliniat valoarea enormă a metodelor diagnostice în tuberculoză, începând cu punerea în evidență a germenului și terminând cu cele mai sofisticate metode de diagnostic calitativ și cantitativ. În România aceste metode sunt accesibile într-o măsură variabilă și dintre ele 2 îndeplinesc condițiile pentru încadrarea în categoria celor utilizabile în centrele de referință. La polul opus se află încă din păcate structuri sanitare care nu dispun în mod direct de unități de diagnostic și trebuie să facă apel la eșaloane superioare. Marea majoritate a centrelor medicale dispun de un laborator convențional care funcționează făcând recurs la metodele de bacteriologie clasice credibile dar din păcate necesitând un timp îndelungat pentru obținerea rezultatelor.

Contextul actual, atât cel național, cât și internațional obligă la un diagnostic mai rapid și la determinări calitative, care, trebuie să vizeze în primul rând identificarea germenilor cu multiple rezistențe, astfel încât măsurile terapeutice să fie introduse cât mai rapid și să fie din categoria celor de maximă eficiență.

Am dorit să vedem în ce măsură recursul la metodele moderne și rapide este benefic pentru activitatea unui centru de nivel județean și care trebuie să fie în consecință îmbunătățirile ce trebuie aduse pentru a apropia activitatea acestor centre de standardele optime.

3.2. Scopul studiului

Studiul își propune să compare eficiență metodelor convenționale așa cum sunt ele practicate într-un centru de diagnostic de nivel județean cu cele care sunt folosite în laboratoarele de referință [52].

3.3. Material și metodă

Au fost luați în studiu un număr de 528 de pacienți care au fost diagnosticați în ansamblul Centrelor medicale din Valea Jiului, dintre care cei mai mulți au fost repertoriați la Spitalul de Urgență Petroșani[77,79].

Distribuția pe grupe de vârstă arată deopotrivă afectarea subiecților de vârstă tânără dar și a celor de vârstă avansată.

Cei mai mulți dintre aceștia provin din mediul urban, dar trebuie remarcată o particularitate comportamentală legată de specificul activității minierești caracterizată de consumul de alcool și tutun.

Expunerea la aceste toxice precum și noxele profesionale au făcut ca în antecedentele grupului prim luat în studiu să consemnăm un număr de 126 purtători de boli asociate, în principal BPCO și silicoză.

Așa cum arată documentele medicale situația revelatoare pentru suferința bacilară a reprezentat-o sindromul de impregnare bacilară.

I. METODE MICROSCOPICE

II. A. Tehnica frotiului direct [47]

III. B. Tehnica frotiului obținut după omogenizare-concentrare

Interpretarea rezultatelor examenului microscopic al sputei prin colorație ZIEHL-NIESEN sau cu fluorocromi.

Tabelul XIX.

Colorația ZIEHL-NIESEN	Fluorescență (marire 200-250 x)	Notare semicantitativă
Negativ BAAR	0	0 BAAR
Nr. exact de BAAR/100 câmpuri	se imparte nr. BAAR la 10	1-9 BAAR/100 câmpuri
Pozitiv BAAR 1+		10-99 BAAR/1100 câmp
Pozitiv BAAR 2+		1-10 BAAR /câmp
Pozitiv BAAR 3+		➤ 10 BAAR/câmp

Microscopia directă e o metodă simplă, rapidă, ieftină, ușor repetabilă. În schimb are o sensibilitate relativ redusă, nepermițând identificarea agentului patogen, decât în sputa baciliferă (peste 5.000-10.000 de germeni/ml produs patologic) și nici asupra identității lor (bacili tuberculosi, saprofiți, atipici).

Importanța ei epidemiologică rezidă în posibilitatea pe care o oferă de a descoperi rapid mării eliminatori de bacili, de a-i izola și supune tratamentului specific, reducând astfel pericolul de infecție și îmbolnăvire la contacti. Sensibilitatea microscopiei poate fi crescută de 2 până la 4 ori prin concentrarea și omogenizarea sputei.

ÎNSĂMÂNȚĂRI PE MEDII DE CULTURĂ SPECIFICE

Confirmarea sau infirmarea diagnosticului de tuberculoză activă. În cazul culturilor BK pozitive cu foarte rare colonii confirmarea se poate efectua numai printr-o urmărire bacteriologică a bolnavului timp de 3 luni prin controale lunare a câte minimum 2 (sau după caz se poate crește numărul lor) eșantioane, la care se vor efectua atât examene microscopice cât și culturi. Dacă vor apărea și alte culturi sau examene microscopice pozitive se va confirma diagnosticul. Dacă rezultatele sunt negative, acest diagnostic se va infirma. Explicația primelor rezultate pozitive pot fi găsite în: eroare de diagnostic sau eliminări de bacili viabili din leziuni stabilizate, fără semne de evoluție clinică și radiologică în perioada eliminării și nici ulterior.

Testarea sensibilității la tuberculostatice. Se face testarea *Mycobacterium tuberculosis hominis* la tuberculostaticele existente.

Metode moderne pentru evidențiere *Mycobacteriilor tuberculoase*

Imunocromatografia

Deoarece identificarea prin teste biochimice este greoaie și de durată, se preferă folosirea unei metode rapide, bazate pe compoziția proteinelor *mycobacteriilor* din Complexul M tuberculos.

Dintre proteinele secretate de *mycobacteriile* din Complexul M tuberculos, MPT64 este în cantitate predominantă și se poate găsi doar în cultura acestora încă din stadii timpurii ale creșterii bacteriene, descrescând odată cu învechirea culturii [56].

Principiu:

Anticorpi (Ac) monoclonali de șoarece anti MPT64 sunt imobilizați pe o membrană de nitroceluloză, ca material de captură (test în linie)

Un alt anticorp conjugat cu particule de aur coloidal recunoaște alt epitop al MPT64 din proba de analizat, cu care se combină în godeul pentru probă

Complexul format progresaază spre zona în care sunt imobilizați Ac monoclonali anti MPT64 și se leagă de aceștia rezultând bandă roșie atât în zona test cât și în zona control.

Timpu necesar pentru test este de 20-25 minute, citirea și interpretarea rezultatelor făcându-se la 15 minute după depunerea suspensiei bacteriene în godeul pentru probă. Interpretarea rezultatelor.

Precauții, limite ale testului.

Linia de control trebuie să apară întotdeauna dacă testul este efectuat corect

Se mănuieste material infecțios și toate manevrele trebuie efectuate obligatoriu în condiții de biosiguranță (cabinet de protecție microbiologică, mănuși, mască, colectarea și neutralizarea deșeurilor)

Intensitatea culorii benzii din zona test poate fi diferită, de la roz pal la roșu vișiniu intens în funcție de concentrația antigenului în probă. Odată apărută, această bandă nu dispare

Limita de detecție a testului este considerată la 105 unități formatoare de colonii /ml. [56 bis]

Se testează culturi tinere.

Metoda Bactec MGIT 960 [116]

Constituie standardul de aur pentru antibiogramă în acest moment. Compară creșterea de pe tuburile martor/control cu cea de pe tuburile test, care conțin substanțe anti-TB în concentrații critice standardizate. Rezultatele se pot obține după 5-14 zile de la însămânțare.

Ca și în cazul culturii în sistem MGIT, consumul oxigenului permite fluorescenței care era mascată de acesta să poată fi evidențiată prin iluminare cu UV[76,78].

Dezavantajul testului este costul ridicat și faptul că necesită personal instruit, cu experiență.

Metode genetice de amplificare în lanț și hibridizare liniară [75]

Metodele genetice de amplificare în lanț (PCR, PCR în timp real) și de hibridizare liniară (InnoLipa Rif/TB, HAIN-MTBDRplus, HAIN-MTBDRsl) reduc timpul de confirmare a TB sau/și a TB MDR la 24-48 de ore.

Au fost aprobate și recomandate de către Organizația Mondială a Sănătății în 2008 [44] pentru detecția MDR la cazurile M+ sau doar C+. Nu înlocuiesc însă metodele actuale standardizate pentru detectarea CMTB și a profilului de rezistență, doar le completează, oferind un diagnostic precoce.

Reacția de amplificare în lanț în timp real, cantitativ (Real Time PCR- RT qPCR- PCR cantitativ)

Măsoară amplificarea PCR pe măsură ce aceasta se întâmplă, comparativ cu PCR clasic în care rezultatele sunt colectate la sfârșitul reacției.

PCR digital este o versiune nouă a RT qPCR.

Folosită în:

Genotipare

Detecția germenilor patogeni

Al doilea braț al studiului îl reprezintă un lot de 49 de pacienți care au beneficiat de aportul metodei genetice – PCR într-un laborator de referință. Cea mai mare parte a acestor pacienți au fost îndrumați spre acest laborator din considerente de insuficiență a rezultatelor convenționale de laborator sau datorită unor suspiciuni de gravitate precum MDR [19,140,141,142,143,144,145,146].

Rezultatele examinărilor au arătat o rată de fiabilitate de aproape 100% ceea ce reprezintă în termeni de sensibilitate și specificitate o performanță optimală a metodei și valoarea se întărește prin faptul că explorările ulterioare au dovedit că bună parte din acești pacienți erau purtători de forme severe.

3. 4. Rezultate [96]

Brațul al doilea al studiului, mult mai mic decât cel dintâi e reprezentat de un lot de 49 de pacienți ale căror probe biologice au fost trimise într-un laborator de referință pentru efectuarea testului gentic PCR. Din rațiuni tehnice studiul a putut fi efectuat doar pe 2 ani din cei 4 propuși inițial, respectiv anii 2010 și 2013 [61].

Metoda are avantajul de a fi extrem de rapidă permițând un diagnostic mult mai rapid, tipizarea precoce și obținerea de informații în legătură cu sensibilitatea/rezistența la medicamentele antituberuloase.

Metodologia de lucru a fost cea prezentată în acest studiu (în partea sa inițială) și a permis obținerea următoarelor rezultate:

1. În ceea ce privește durata obținerii rezultatelor această a variat între 24 și 48 de ore fapt care în opinia noastră recomandă metodă cel puțin din perspectiva comparației cu cele 60 de zile ale metodei pe medii solide Lowenstein Jensen. Corelația dintre fiabilitatea celor 2 metode ne arată în termeni aritmetici, cel puțin, echivalența metodelor. Putem chiar arată că metoda PCR s-a apropiat de 100% pe seria noastră situație care se adaugă rapidității cu care s-a efectuat determinarea.
2. În ceea ce privește tipizarea, a fost posibilă identificarea în proporție de 100 % a tipului de Mycobacterie.
3. Această tipizare a permis identificarea tulpinilor rezistente la HIN, RMP și MDR (rezistență HIN, RMP). Rezistență la RMP 6 cazuri, la HIN 10 cazuri și MDR 6 cazuri. În total din cei 49 de pacienți au fost depistați cu rezistență de diferite tipuri un număr de 22 de pacienți, adică aproape 1/2 din grup.

4. Concluzii generale

Diagnosticul de laborator al tuberculozei a cunoscut în ultima perioada o evoluție spectaculoasă caracterizată prin introducerea metodelor genetice de amplificare în lanț și hibridizare lineară.

Acest diagnostic este deocamdată sistematic accesibil doar laboratoarelor de referință care au fost înființate la nivel național.

Practica curentă precum și studiile efectuate printre care se numără și al nostru au conturat necesitatea imperativă de a extinde metoda PCR la totalul laboratoarelor din țară.

Pe de altă parte am constatat că metodele de diagnostic clasice și în principal cele bacteriologice sunt bine implementate în toate laboratoarele și exploatate cu maximă eficiență.

Diferențele de rapiditate, sensibilitatea extrem de ridicată și posibilitatea depistării precoce a sensibilității/rezistenței la tuberculostatice recomandă în opinia noastră recursul tot mai larg la metodele de amplificare în lanț.

O reală ameliorare a rezultatelor nu se poate obține fără cunoașterea aprofundată a profilului populației tratate, a caracteristicilor modului de viață al acesteia și a evoluțiilor socio-economice care îi influențează comportamentul.

Din perspectiva studiului nostru se conturează ideea corelării opțiunilor tehnice de practică medicală cu interpretările de status al comunității, rezultate din aprofundarea contextului socio-economic în care se consumă actul medical.

Teza noastră este doar o modestă contribuție la acest deziderat, dar sperăm că ea va deschide un culoar de interes pentru cei care ne vor urma.

“IULIU HAȚIEGANU” UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY CLUJ-NAPOCA

DOCTORAL SCHOOL

ABSTRACT OF THE PhD THESIS

Bacteriological diagnosis of pulmonary tuberculosis

Doctoral Student **Nicolae PETRE**

Coordinator of the Doctoral Student Prof.Dr. **Carmen Monica POP**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE

INTRODUCTION	13
1. History of tuberculosis	15
2. Tuberculosis epidemiology	22
3. Structure of the mycobacterium tuberculosis	25
4. Positive diagnosis of tuberculosis	28
4. 1. Clinical diagnosis	28
4. 2. Diagnosis with conventional radiology	29
4. 3. Diagnosis with imaging	32
4. 4. Endobronchial diagnosis	32
4. 5. Bacteriological diagnosis of tuberculosis	33
4.5.1. Microscopic examination	33
4.5.2. Identification of myobacteria using growth media	
4.5.3. Antibigram	35
4.5.4. PCR-type reaction	36
	37
PERSONAL CONTRIBUTIONS	39
1. Introduction and general objectives	41
2. Study I. Research concerning tuberculosis morbidity in the Jiu Valley	44
2.1. Introduction	44
2.2. Material and method	45
2.3. Results	46
2.4. General discussions	65
3. Study II. Diagnostic methods for tuberculosis applicable to the value of the PCR method in this diagnosis	66
3.1. Introduction	66
3.2. Purpose of the study	66
3.3. Material and method	66
3.4. Results	81
3.5. Discussions	91
4. General conclusions	93
5. Originality and innovative contributions of the thesis	94
REFERENCES	95
ATTACHMENTS	105

INTRODUCTION

Pulmonary tuberculosis is not simply one of many diseases, but it is also a condition influencing not only the patient's body, but also his psyche.

Therefore, the implications of the evolution of tuberculosis are not only on somatic level, but they expand to the patient's professional life, emotional state, creativity and historical presence of the disease carriers.

This is the perspective from which we structured the general part of this thesis, which reflects the current level of understanding.

Special attention was given to the history of diagnosis and treatment of tuberculosis in Romania, because its content can reveal the elements that form the grounds for subsequent developments in the field of research. One of these is represented by the development of an infrastructure, in the inter-war period of the XXth century, which proved not only to be an answer to the needs of that time but also a contribution to the prerequisites for the development of the treatment of tuberculosis in the periods that followed [63].

These internal evolutions are presented as a historical and logical consequence of worldwide evolutions, the benchmark of which is the discovery of the etiological agent of tuberculosis by Robert Koch, the discovery and use of X-rays in diagnosis in tandem with the genius contribution of Konrad Roentgen, as well as the discovery and progressive introduction of tuberculostatic drugs.

A morphological perspective over mycobacterium tuberculosis is useful but only within the limits of understanding and clinical utility of clinicians [93].

The aspects related to clinical diagnosis are also part of the general presentation because they form one of the prerequisites of the doctoral research.

In respect of paraclinical diagnosis, the view has extended especially in the biological field, without leaving aside the value of the methods afferent to conventional radiology and imaging.

In what biological diagnosis is concerned, we set out to offer a balanced view of both classical as well as very modern methods.

If from cutuminary perspective, the classical methods seem sovereign and some of us might consider themselves "subjects" of bacteriological laboratory, we must accept that evolution takes another path, namely that of modern genetic and molecular methods [38].

Throughout the period of the doctoral research, being given the change to turn to these methods, we managed to determine certain advantages of these modern methods and progressively we were convinced by their value and utility. There was a moment when we "switched" from a stable but rigid and inflexible mentality to the openness towards performance offered by modern methods.

In the past decades, a number of techniques have been developed, which are aimed at allowing a faster determination of Mycobacterium tuberculosis, as well as testing nitrate-reductase production, testing niacin production and many other methods.

Starting with 1980, automatic systems have been developed for the cultivation and growth signalling of mycobacteria. These growth systems in liquid environment are currently the 'gold standard' for diagnosis. These tests are organically combined with immunochromatographic tests and antibiograms currently creating the conditions for a both fast and reliable diagnosis.

Last but not least, we must mention the assimilation of the techniques afferent to molecular biology, such as the use of polymerase chain reaction (PCR).

PERSONAL CONTRIBUTIONS

Study 1. Is aimed at analysing tuberculosis morbidity in the Jiu Valley.

The general considerations concerning the geographic and socio-economic context in which the study was carried out form the preamble.

As we have already shown, the study was carried out in a geographical region of Romania known as the Jiu Valley, an area demarcated by the Jiu river between the Retezat and Parâng mountains. This is an area characterised by the presence of numerous communities connected by a unicoloured industry, communities which in the past decades have been elevated to the rank of cities.

In all these localities, the main activity of people was represented by coal mining. Here, coal represents an underground resource and it is extracted by mining companies which bring to the surface the soil's carboniferous resources.

2.2. Material and method

The research was carried out over three years, namely 2010-2013 on 528 patients. Reported to the number of inhabitants of the Jiu Valley, the researched sample represents 0.44 % [46].

According to their place of residence, 20 patients come from Aninoasa, which reported to the permanent number of inhabitants, namely 4,360, represents 0.46%; 115 patients come from Lupeni, which reported to the permanent number of inhabitants, namely 23,390, represents 0.49%; 91 patients come from Petrila, which reported to the permanent number of inhabitants, namely 22,692, represents 0.40%; 152 patients come from Petroșani, which reported to the permanent number of inhabitants, namely 37,160, represents 0.41%; 40 patients come from Uricani, which reported to the permanent number of inhabitants, namely 8,972, represents 0.45%; 107 patients come from Vulcan, which reported to the permanent number of inhabitants, namely 24,160, represents 0.44%; the other 3 patients come from other localities.

2.3. Results

The analysis of the population distribution shows that the population from Jiu Valley included in our study still works in mining. Thus, by extrapolation, we can estimate that over $\frac{3}{4}$ of the inhabitants are family members of those whose main source of existence is still represented by mining.

The research was carried out between 2010-2013, with backward evolution, having 189 cases in 2010, 124 cases in 2011, 108 cases in 2012, namely 107 cases in 2013.

The study of tuberculosis morbidity in the group of Jiu Valley inhabitants shows variations between 3.79 and 28.79%. These variations cannot be explained by the existence of a natural phenomenon of tuberculosis, but it rather expresses the dynamics of addressability to a certain centre. This observation is also supported by the determination that various medical centres in the Jiu Valley have known substantial changes in what their volume and content is concerned. For this reason patients from a certain area had to fortuitously turn to another medical centre instead of that available in their place of residence.

The analysis of the sufferance dynamics of tuberculosis is recording a downwards tendency which is in correlation with the phenomenon recorded at national level. It is difficult to make an analysis of the relationship between professional risk and the risk of contacting tuberculosis in the analysed period of time. The information in the form of technical documentation concerning work conditions in this interval highlight an improvement of the professional status of miners, which in our opinion, can no longer be correlated with the dynamics of the infection with tuberculosis.

From the total of 528 patients, 415 (78.60%) are male and 113 (21.40%) female patients. The predominance of male patients can be easily explained by the predisposing conditions for tuberculosis, such as the frequent ethylism and tabagism in the mining population, which is predominantly male.

Due to the urban specifics of the area, Jiu Valley being a string of urban localities, with 3 cities and 3 municipalities, most of the patients come from the urban area, with 525 patients representing 99.43% and only 3 patients from the rural area, representing 0.57%.

Analysing the patients' age we can determine that most cases occur in persons between the age of 41 and 50, with a lower number in case of the younger population or that above the age of 70.

It is hard to perform an analysis of the urban/rural environment ratio because of the "artificial" geographical particularities. The localities included in the study are, in our opinion, unnaturally classified into municipalities and cities (according to a tradition dating back to the communist era), despite the fact that the way of life still comprises a number of rural components.

If we analyse the patients in the studied sample according to their workplace, we can observe a large presence of people who are employed (72 people underground and 5 above the ground) or have been employed (112 people underground and 7 above the ground) in the mining industry. Also, a large number of patients are without work (121 persons) or unemployed (7 persons).

The vast majority of the patients in question come from the group of population employed in underground activity. A correlation with this particularity of the professional environment is still difficult to make given the conditions of a unicoloured economy, in which another preoccupation of the active population with something other than mining is only slightly present.

From the 173 medically assisted retired persons, 150 are male and most of them, namely 112 persons, have worked in underground mining companies.

Tuberculosis extends to the group of retired persons and obviously in that of males and it expresses both a chronification of the disease in these patients, as well as high susceptibility even after the effect of favouring noxious substances had been interrupted.

If we refer to the patients who are employed or have been employed in the mining industry, both underground as well as above ground, we can establish that from the total number of patients 37.12%, namely 196 persons, come from this environment.

A still alarming determination is represented by the diagnosing of the disease in 1/3 of the subjects, in the analysed period of time.

If we analyse the patients according to their education, 7 patients (1.33%) are without any education, 35 patients, namely 6.63%, have graduated from elementary education, 84 patients namely 15.91% from secondary educations, 218 patients namely 41.29% from professional education, 154 patients namely 29.17% from secondary education, 5 patients namely 0.95% from post secondary education and 25 patients namely 4.73% from higher education.

Thus, most of them have secondary and professional education, which corresponds with the professional scale afferent to the mining profession.

According to diagnosis: pulmonary TB – 461 patients, namely 87.31%, pleurisy – 47 patients, namely 8.90%, ganglionic TB – 7 patients, namely 1.33%, renal Tb and spondylodiscitis with 2 patients each, namely 0.38% and bone TB, intestinal TB, TB of the genitourinary apparatus, peritoneal TB, bronchial TB, intracranial tuberculomas, emphysema, peritonitis with ascites probably specific, namely pericarditis with 1 patient each, representing 0.19%.

If the representation is carried out according to localization, we can say that we have 461 patients with pulmonary TB, while the other 67 patients exhibit extrapulmonary tuberculosis [129].

The vast majority of patients fall in the habitual profile of the disease representing pulmonary localisation, while the percentage of extrapulmonary localisation coincides with the numbers in the specialised literature.

Despite the exposure to major noxious substances and humidity and the excessive exposure to alcohol and tobacco, we can establish that in the analysed patients there have been no MDR recrudescence forms.

In what the risk factors are concerned, we determined a number of 374 patients, representing 70.83%, who are smokers, 227 patients representing 43.18% who consume alcoholic beverages and 404 patients, representing 76.52% who regularly drink coffee.

In what the way of life is concerned, we must observe the persistence of the habit of consuming alcoholic beverages, regardless of the fact that both in terms of proportion as well as in terms of quantity the phenomenon is in regression. The level of tabacosis, which is expressed also in the co-morbidities established in our patients, is still alarming.

The relationship between the risk of becoming sick and the excessive alcohol and tobacco consumption has been studied under the ratio of statistic significant using the chi square test [97].

The chi square test compares a distribution of observed absolute frequencies with a theoretical (expected) distribution of absolute frequencies based on the chi square probability distribution.

It is a continual, symmetric distribution and it is based on the normal approximation of binominal distribution. Chi square distribution with 1 degree of freedom is identical with the distribution of the square of the critical report.

The chi square test is used to compare an observed distribution with a theoretical distribution or to compare 2 or more observed distributions.

$T_{\text{calculated}} > T_{\text{tabular}} \rightarrow H_0$ is rejected \rightarrow there is a connection between the presence of tuberculosis and excessive smoking

$T_{\text{calculated}} < T_{\text{tabular}} \rightarrow H_0$ is accepted \rightarrow there is no connection between the presence of tuberculosis and excessive alcohol consumption

2.4. General discussions

The analysis of tuberculosis in the Jiu Valley shows 2 categories of characterization elements. On one hand, a positive category which offers optimism and which consists in a reduction of the incidence of tuberculosis in the geographical area in discussion, in a process similar to that adopted at national level. One of the explanations for this phenomenon lies in the proactive attitude adopted by the medical structures in that area, which have made great efforts to comply with current standards and norms [121].

The other category of factors includes the favouring ones, represented both by professional noxious substances and the consumption of toxic substances.

An interesting problem that we faced while drafting this thesis was predictability of the future, given that planetary evolutions are not in favour of exploiting fossil energies and from this perspective it is hard to determine the medium-term and long-term impact on this area, which is currently almost exclusively dependent on coal mining.

3. Study II. Biological diagnostic methods for tuberculosis applicable to the value of the PCR method in this diagnosis

3.1. Introduction

We have already underlined in the general part of the thesis the enormous value of the diagnosis methods for tuberculosis, starting with the highlighting of the germ and up to the most sophisticated methods of qualitative and quantitative diagnosis. In Romania, these methods are accessible to a variable extent and from the two they fulfil the conditions required for being included in the category of those usable in reference centres. Unfortunately, at the other end, lie the medical structures which do not have direct access to diagnosis units and must turn to superior ranks. The vast majority of medical centres have conventional laboratories which work using credible classical bacteriological methods, but unfortunately require long time for obtaining results.

The current context, both the national and international one, compels to a faster diagnosis and qualitative determination which must first of all target the identification of multiple drug resistant germs, so that therapeutic measures can be quickly introduced and be the most efficient ones.

We would like to see the extent to which turning to modern and faster methods is beneficial for the activity of a county-level centre and which are the afferent improvements that should be made to bring the activity of these centres closer to optimal standards.

3.2. Purpose of the study

The study is intended to make a comparison between conventional methods, as these are used in a county-level diagnosis centre and the ones used in reference laboratories [52].

3.3. Material and methods

528 patients diagnosed in the hospitals in Jiu Valley, have been included in the study, most of them being recorded at the Petroșani Municipal Hospital [77, 79].

Age distribution shows that both young and elder subjects have been affected,.

Most of the subjects come from urban areas, but a behavioural feature connected to the specifics of the mining activity should be observed, namely the consumption of alcohol and tobacco.

Because of the exposure to these toxic substances, as well as to professional noxious agents, an analysis of the personal history of the first analysed group revealed a number of 126 bearers of associated diseases, mainly COPD and silicosis.

As shown in the medical files, the revealing situation for the bacillary sufferance was represented by the bacillary impregnation syndrome.

IV. MICROSCOPIC METHODS

V. A. The direct smear technique [47]

VI. B. The post homogenisation-concentration smear technique

Interpreting the results of the microscopic examination of sputum by ZIEHL-NIESEN stain or with fluorochromes.

Table XIX.

ZIEHL-NIESEN stain	Fluorescence (size 200-250 x)	Semi-quantitative notation
Negative BAAR	0	0 BAAR
Precise no of BAAR/100 fields	the no. of BAAR is divided by 10	1-9 BAAR/100 fields
Positive BAAR 1+		10-99 BAAR/100 field
PositiveBAAR 2+		1-10 BAAR / field
PositiveBAAR 3+		> 10 BAAR/ field

Direct is a simple, easily method. shows

microscopy fast, cheap, repeatable However, it relatively low

sensitivity and it allows the identification of pathogen only in the bacilliferous sputum (over 5.000-10.000 germs/ml pathogenic product) and their identity cannot be determined (tuberculosis, saprophyte, atypical bacilli).

Its epidemiological significance lies in the possibility it provides to faster discover the great bacilli eliminators, to isolate them and start the specific treatment, thus reducing the danger of infection and catching the diseases. Microscopy sensitivity can be increased by 2 up to 4 times though the concentration and homogenization of the sputum.

INOCULATION ON SPECIFIC GROWTH MEDIA

Confirmation or invalidation of the active tuberculosis diagnosis. In BK cultures with very rare colonies confirmation can take place only if the patient is subjected to bacteriological monitoring for 3 months with monthly examinations of at least 2 samples (their number can increase as appropriate), which will undergo both microscopic examinations and cultures. If other positive cultures or microscopic examinations will occur, then the diagnosis is confirmed. If the results are negative, this diagnosis is invalidated. An explanation for the first positive results can be: diagnostic error or elimination of viable bacilli from stabilised lesions, without signs of clinical and radiological evolution in the elimination period or afterwards.

Testing the sensitivity to tuberculostatic drugs. Mycobacterium tuberculosis hominis testing is performed for the existing tuberculostatic drugs.

Modern methods for revealing mycobacterium tuberculosis

Immunochromatography

Since the identification using biochemical testing is laborious and time taking, the use of a fast method, based on the composition of mycobacteria proteins in the M tuberculosis complex, is preferred.

From the proteins secreted by the mycobacteria in the M tuberculosis complex, MPT64 is in prevailing quantity and can be found only in the culture of those which are still in the early bacterial growth stages and it decreases as the culture ages [56].

Principle:

Mouse monoclonal anti-MPT64 antibodies (Ab) are immobilised on a nitrocellulose membrane, as capture material (line testing).

Another antibody interlinked with colloidal gold particles recognises another epitope of MPT64 from the analysed sample with which it is combined in a bucket as sample.

The formed complex progresses towards the area in which the monoclonal anti-MPT64 antibodies are immobilised and connects to these and this generates a red strip both in the test zone and in the control zone.

The time required for the test is 20-25 minutes, the results being read and interpreted 15 minutes after the bacteria suspension is placed in the bucket as sample. Result Interpretation .

Precautions, test limitations.

The control line must always appear if the test is correctly carried out.

Infectious material is being manipulated and all the manoeuvres must be carried out in conditions of bio safety (microbiological safety cabinet, gloves, mask, waste gathering and neutralization).

The colour intensity of the strip in the test zone can vary from pale-pink to cherry-red, depending on the antigen concentration in the sample. Once it appears, this strip does not disappear anymore.

The detection limit of the test is 105 colony-forming units / ml. [56 bis]

Young cultures are tested.

The Bactec MGIT 960 method[116]

Currently represents the golden standard for antibiogram. It compares the growth on witness/control tubes with that on test tubes, which contain anti-TB substance in standardized critical concentrations. Results can be obtained in 5-14 days after inoculation.

Just like in the case of the MGIT system cultures, oxygen consumption allows the fluorescence masked by these to be highlighted using UV light [76, 78].

The disadvantage of this test is high cost and that trained, experienced personnel is required to perform it.

Genetic methods for chain amplification and linear hybridization [75]

Genetic methods for chain amplification (PCT, real time PCR) and linear hybridization (InnoLipa Rif/TB, HAIN-MTBDRplus, HAIN-MTBDRsl) reduce the confirmation time for TB or/and MDR TB to 24-48 hours.

These were approved and recommended in 2008 by the World Health Organisation [44] for MDR detection in M+ cases or only in C+. However, these do not replace current standardized methods for the detection of CMTB and of the resistance profile, they only complement these by providing an early diagnosis.

Real time, quantitative chain amplification reaction (*Real Time PCR- RT qPCR- quantitative PCR*)

Measures PCR amplification as it occurs, in comparison with the classic PCR in which the results are gathered at the end of the reaction.

Digital PCR is a new version of RT qPCR.

Used in:

Genotyping

Detection of pathogenic bacteria

The second branch of the study is represented by a group of 49 patients who have benefited from the PCT genetic method in a reference laboratory. Most of the patients have been guided towards this laboratory because of the insufficiency of the conventional laboratory results or suspected severity such as MDR [19,140,141,142,143,144,145,146].

The results of the examinations have shown a reliability rate of almost 100%, which in terms of sensitivity and specificity represents an optimal performance of the method and its value is consolidated by the fact that later research has shown that a large number of these patients had experienced severe forms of the disease.

3. 4. Results[96]

The second branch of the study, much smaller than the first one, represented a number of 49 patients the biological samples of which have been sent to a reference laboratory to undergo genetic PCR testing. For technical reasons, the study could only be performed for 2 out of the 4 years initially planned, namely 2010 and 2013 [61].

The advantage of this method is that it is extremely fast and allows a much faster diagnosis, early typing and it provides information referring to sensitivity/resistance to anti-tuberculosis medication.

The work methodology was the one presented in this study (in its initial part) and it provided the following results:

1. The time required for obtaining the results varies from 24 to 48 hours, which in our opinion recommends this method, at least in comparison with the 60 days required by the Lowenstein Jensen method on solid medium. The correlation between the reliability of the two methods shows, in arithmetic terms, at least an equivalence of the methods. We can even show that the PCT method was close to 100% for our batch and this is added to the speed with which the determination had been performed.
2. In what typing is concerned, the type of mycobacteria could be identified in 100%
3. This typing allowed the identification of HIN, RMP and MDR (HIN, RMP resistance) resistant stems. Resistance to RMP in 6 cases, to HIN in 10 cases and MDR in 6 cases. In total, out of the 49 patients 22, representing almost ½ of the group, have been detected with different types of resistance.

4. General conclusions

Lately, laboratory diagnosis of tuberculosis has known a spectacular evolution characterised by the introduction of genetic methods for chain amplification and linear hybridization.

For the time being, this diagnosis is systematically accessible only to reference laboratories established at national level.

Current practice, as well as the studies carried out, including ours, have outlined the imperative need to extend the PCR method to all the laboratories in the country.

On the other hand, we determined that the classic diagnosis methods and especially the bacteriological ones, are well implemented in all laboratories and exploited with maximum efficiency.

In our opinion, the differences in speed, extremely high sensitivity and the possibility for early detection of sensitivity/resistance to tuberculostatic drugs recommend the ever-increasing use of chain amplification methods.

A real improvement of the results cannot be achieved without deep knowledge of the treated population's profile, of the characteristics of lifestyle and socio-economic development influencing the population's behaviour.

Our study outlines the idea of correlating the technical options of medical practice with the community status interpretations resulting from a deeper knowledge of the socio-economic context in which medical care is provided.

Our thesis is merely a modest contribution to this desideratum, but we hope that it will open a new path of interest for the ones coming after us.

