



SPITALUL JUDEȚEAN DE URGENȚĂ
„SFÂNTUL IOAN CEL NOU” – SUCEAVA
UNIVERSITATEA ȘTEFAN CEL MARE SUCEAVA

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL TUBERCULOZEI

Roxana Filip^{1,2},

**¹Spitalul Județean de Urgență Sf. Ioan cel Nou
Suceava, Laborator TB Biologie Moleculară**

**²Universitatea Ștefan cel Mare Suceava, Facultatea de
Medicină și Științe Biologice**

Roxana Filip: roxana_filip@yahoo.com

TRIBUTUL ADUS LUI ROBERT KOCH



Misterul TB continua!
Tuberculoza - marele mim al bolilor pulmonare

Roxana Filip: roxana_filip@yahoo.com

- **2019- 10 milioane cazuri de TB la nivel Mondial (Dippenaar et al., 2022); 1.3 milioane de decese in 2021 (OMS)**
- **Una dintre primele 10 cauze de deces la nivel global si principala cauza de deces determinat de un singur agent etiologic**

OBIECTIVELE PREZENTĂRII

- Date despre PNPSCT
- Date epidemiologice despre tuberculoza
- Prezentarea etapelor infecției cu *M. tuberculosis*
- Diferențierea TB latentă de TB activă- rolul laboratorului de microbiologie
- Componentele diagnosticului de tuberculoza: clinic, radiologic, bacteriologic
- Etapele diagnosticului de laborator
- Metode de diagnostic: clasic/ molecular

Obiectivele PNPSCT (2015-2020)

- Tratarea cu succes pana in 2020 a cel puțin 90% din cazurile noi de TB pozitiva in cultura si a cel puțin 85% din toate retratamentele
- Tratarea cu succes pana in 2020 a 75% din cazurile de TB MDR
- Reducerea pana in 2020 a ratei generale a mortalitatii TB la mai puțin de 4.3 la 100 000 locuitori

Strategia Nationala de Control al TB in Romania 2015-2020

Dezvoltarea unui **proces de revizuire** care să asigure că lab respectă standardele și îndeplinesc criteriile de performanță.



Date epidemiologice

Cifre pentru anul 2015:

- 10400000 cazuri (noi si recidive) global
- Din totalul persoanelor, cele cu coinfectie HIV TB reprezinta 11%, adica 1 000 000
- OMS estimeaza ca la nivel global din 580000 persoane eligibile pentru tratamentul TB MDR doar 125000 (20%) au fost inrolate in tratament
- OMS: extinderea accesului la tratamentul profilactic

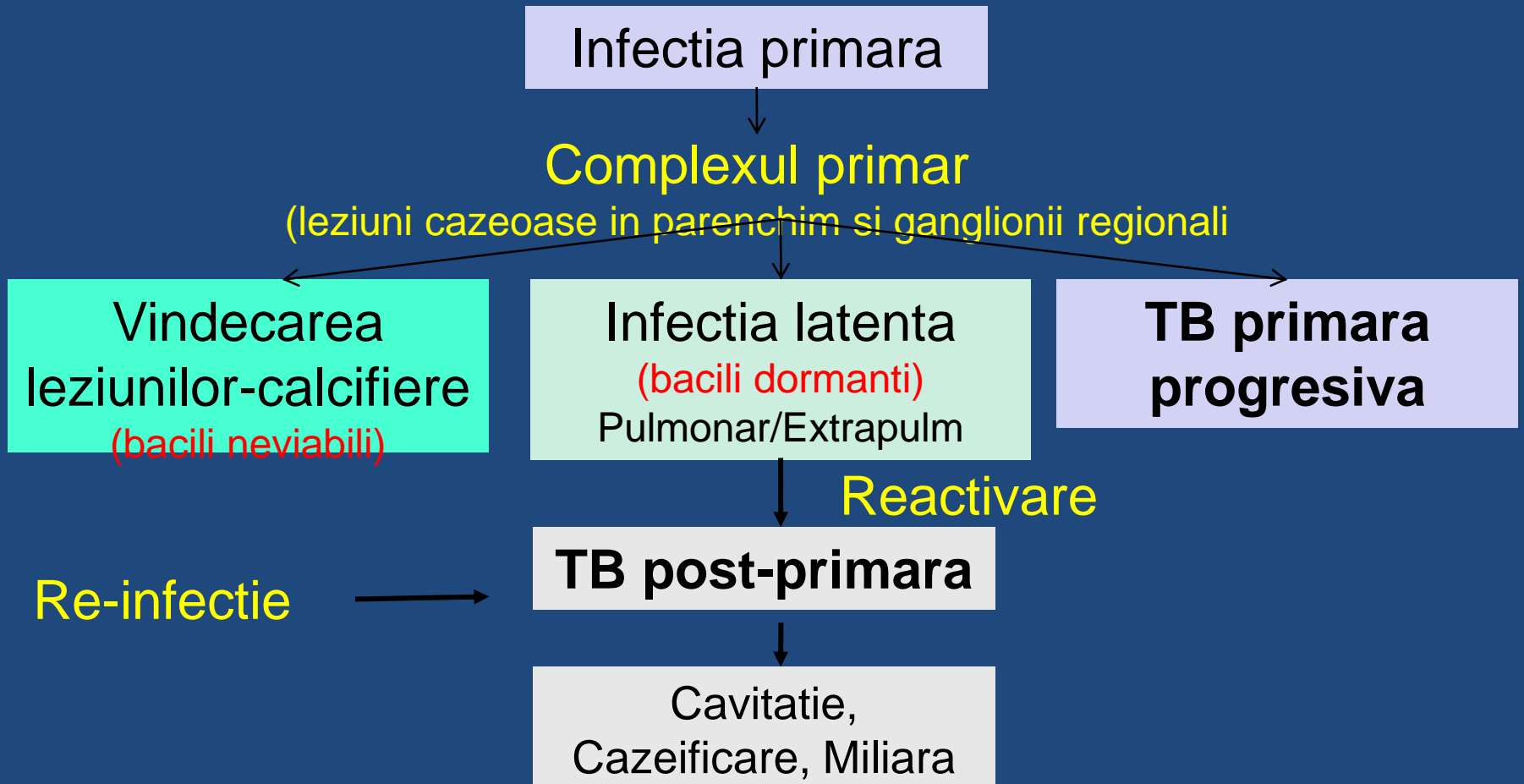
Stadiile infectiei tuberculoase

Primoinfectia TB (infectia primara): **Complexul primar**

- Sancrul de inoculare/**nodulul Ghon**- la 3-8 sapt de la infectare. Vindecare in 2-6 luni prin calcificare (CH)
- Limfangita
- Adenopatia ganglionilor regionali

Diagnostic:

- in general asimptomatica
- viraj tuberculinic



Produsul patologic

- reprezentativ
- necontaminat cu flora indigena
- in repetitie (ca numar si in timp)
- in colectoare corespunzatoare, fara conservant
- corect identificat
- nu se congeleaza dar se pastreaza la rece(4-8°C)

Recipiente de recoltare

- confeționate din material plastic transparent
- rezistent la șocuri mecanice
- capacitate adecvată prelevatului
- închise cu capac filetat, cu fund plat, sterile
- deschiderea cu diametrul de de 3-5 cm
- posibilitate de etichetare pe corpul flaconului.
- nu trebuie să contină substanțe care ar putea afecta viabilitatea sau cultivabilitatea micobacteriilor
- fara conservanti

RECOMANDATE



Roxana Filip: roxana_filip@yahoo.com

SPUTA

□ Cand: -dimineata

cel putin 8 ore intre doua esantioane

□ Cum: **supravegheat** de personal instruit

□ evita contaminarea (camera de recoltare)

□ Cate esantioane? (PNPSCT, OMS)

□ 2 pentru diagnostic

□ 2 pentru monitorizare

SPUTA

- adulti: sensibilitate 60-90%, specificitate 99%
- copii: microscopia confirma 10-15%, cultura 30-40%
- 3-5 ml

SPUTA INDUSA (SI) - bolnavi care nu expectoreaza

- in aceeasi zi- la interval de cel puțin 8 ore sau zile succesive
- SI mai sensibil decat AG**
- Sensibilitate- 90%

*Indian J Med Microbiol 2006;24:249-51 ; ** J Clin Microbiol 2000; 38(1):466

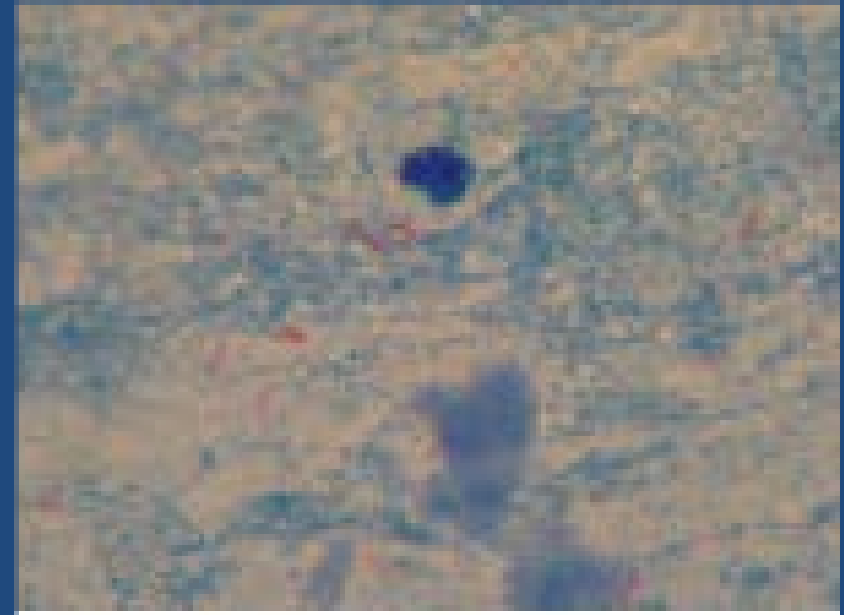
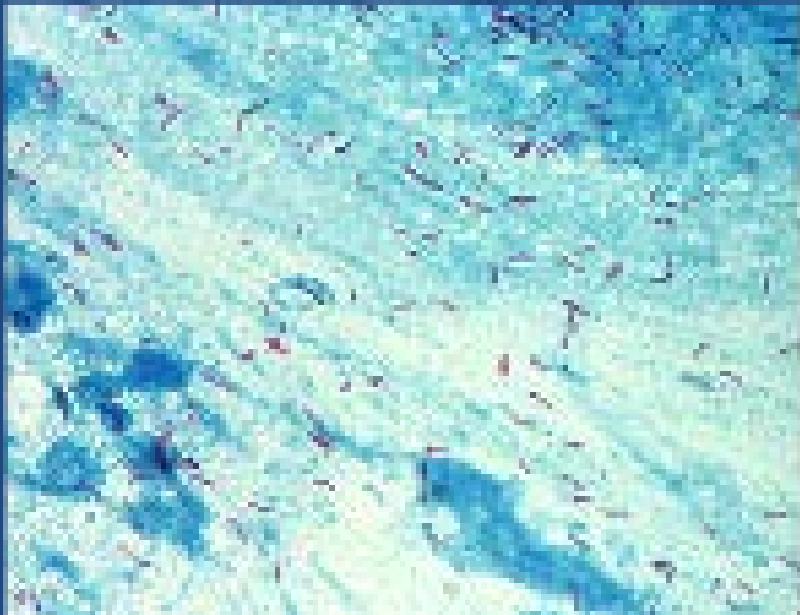
MICROSCOPIA

Avantaje

- simpla
- rapida
- economica
- Identifica sursele de infectie

Limitari

- BAAR/ml > 5.000-10.000/ml
- Sensibilitate limitata (la HIV +)
- Identifica BAAR dar nu identifica *M. tuberculosis*
- Nu distinge bacilii viabili de neviabili
- Nu diferentiaza BAAR sensibili/ rezistenti



Imagini microscopice ale preparatelor colorate Z - N (microscop optic, oc 10x, ob 100x)

BAAR se disting clar, ca bastonașe roșii, drepte sau ușor încurbate, pe fondul albastru al preparatului microscopic.

EXPRIMAREA SEMICANTITATIVA A REZULTATELOR EXAMENULUI MICROSCOPIC

Ziehl-Neelsen 1000x	<u>Rezultat</u>	Mărirea în examinarea fluorescență		
		250x	450x	
<u>0 BAAR</u>	<u>NEGATIV BAAR</u>	0 BAAR	0 BAAR	
1-9 BAAR/100 CM	Numărul exact de BAAR / 100 CM	Se împarte numărul BAAR observați la 10	Se împarte numărul BAAR observați la 4	
10-99 BAAR / 100 CM	<u>POZITIV BAAR 1+</u>			
1-10 BAAR / CM	POZITIV BAAR 2+			
> 10 BAAR / CM	POZITIV BAAR 3+			

Rezultat fals pozitiv microscopie

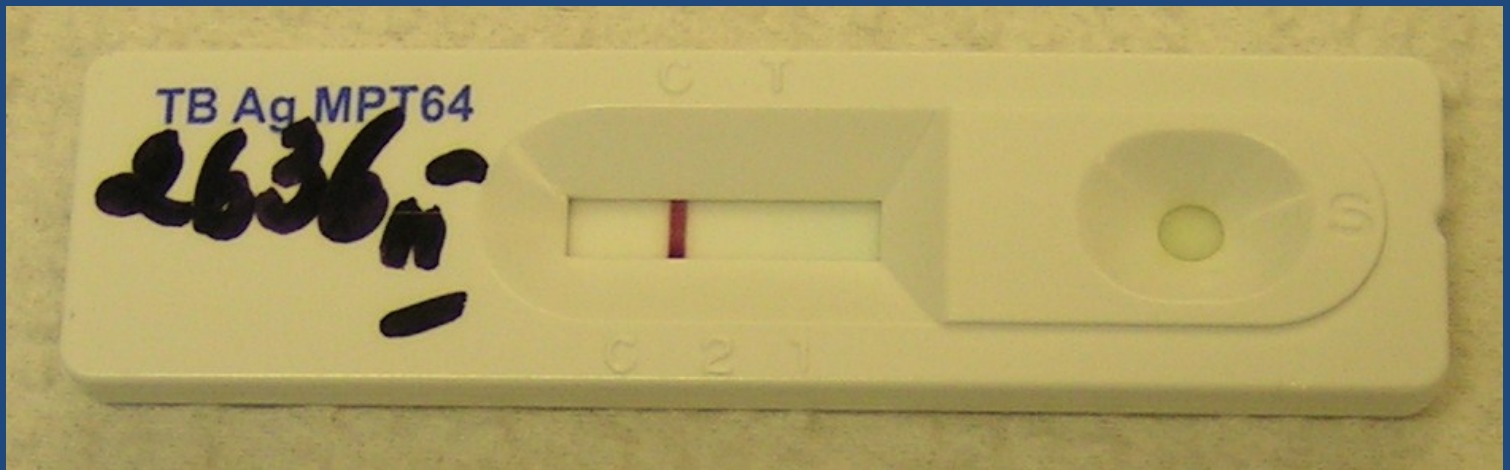
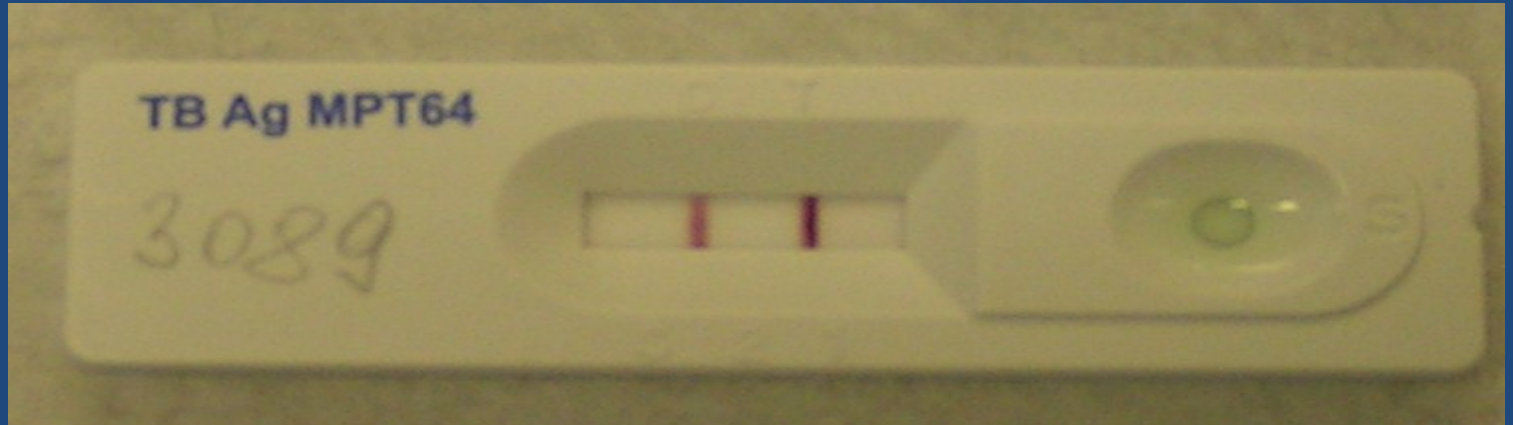
- Inceperea unui tratament inutil
- Irosirea medicamentelor antituberculoase
- Prelungirea inutila fazei intensive a tratamentului
- Pacientul isi pierde increderea in PNPST

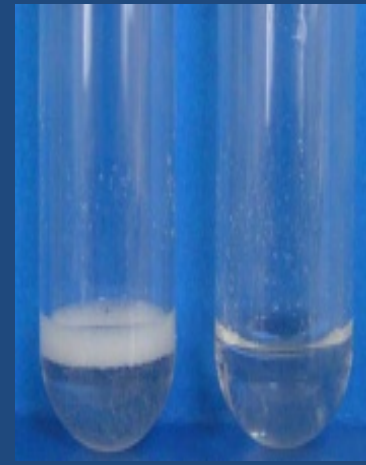
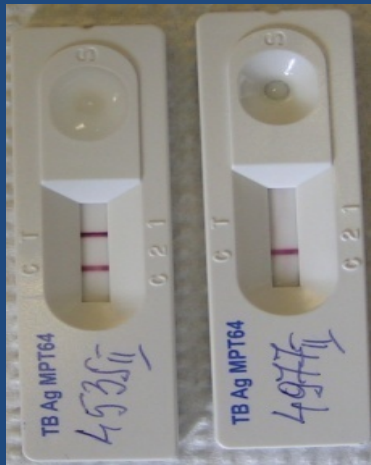
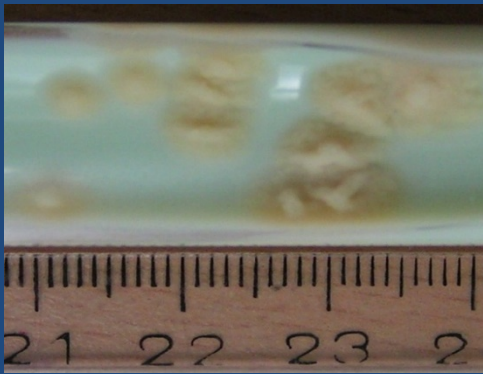
Rezultat fals negativ

- Netratarea bolnavului cu tbc, care sufera, raspandeste boala si poate muri
- Neprelungirea fazei intensive a tratamentului
- Pacientul isi pierde increderea in PNPST



Roxana Filip: roxana_filip@yahoo.com





Testarea sensibilitatii la tuberculostatice- metoda concentratiilor absolute



Roxana Filip: roxana_filip@yahoo.com

Interpretarea rezultatelor, met conc absolute

Sensibilitate – absenta cresterii sau mai putin de 20 colonii pe tuburile cu anti-TB

Rezistenta – crestere pe tubul cu anti-TB asemanatoare cu cea de pe martor.

Neinterpretabil - pe tubul martor cresc <50 col. sau >200 col.

Contaminare - au crescut microbi de contaminare care altereaza rezultatele (denota deficienta de tehnica)

Surse de eroare

- tulpini mai vechi de 21-30 zile
- etalonarea incorecta
- concentratii necorespunzatoare a subst anti TB
- Inactivarea/inomogenitatea subs anti-TB
- insamantare incorecta
- temperatura de incubare cu variatii

Citirea antibiogramei met.concentrațiilor absolute

Prima citire se face după 28 de zile de la însămânțare. Se începe cu citirea rezultatelor pentru tulpina *M. tuberculosis* ATCC 25177, H37 Ra pusă în lucru pentru fiecare lot nou de mediu.

La interpretarea rezultatelor tuturor ABG care folosesc același lot se va face referire la această citire.

- Numără coloniile crescute pe tuburile de control corespunzătoare diluțiilor 10^{-3} și 10^{-5} notând media numărului de colonii.
- Numără coloniile crescute pe tuburile test corespunzătoare diluțiilor 10^{-3} și 10^{-5} .
- Scrie numărul exact de colonii în registru și
- calculează proporția dintre numărul coloniilor crescute pe tuburile test și pe tuburile de control cu aceleași diluții. Scrie proporția calculată. În cadrul aceleiași diluții: nr colonii de pe tubul test x 100/ media numărului de colonii de pe tuburile martor.

Interpretarea rezultatelor – 42 zile

- Dacă pe tuburile test creșterea este mai mică < de 1% față de control, se consideră tulpina SENSIBILĂ și se eliberează rezultatul - Sensibil
 - Atentie – pentru rezultat interpretabil, numărul de colonii de pe tuburile control cu inoculul cel mai bogat (10^{-3}) trebuie să fie mai mare de 50, ideal peste 100.
- Dacă creșterea pe tuburile test este mai mare decât 1% din media numărului coloniilor de pe tuburile martor se consideră că tulpina este REZISTENTĂ la acea substanță antituberculoasă.

- ASIGURAREA calitatii, practic

CIC

- obligatoriu pentru fiecare lot nou de mediu
- tulpina de referinta $H_{37}R_a$ (managementul tulpinii!)
- evidenta data prepararii, expirarii mediului

CEC- national

- obligatoriu pentru toate lab care fac ABG
- efectuat de lab supraordonat-LNR

CEC- international

- efectuat de LSR Stockholm pentru Romania

IMBUNATATIREA CALITATII

Metodele de biologie moleculara

Diagnostic rapid- 60 minute

Identifica mutatiile din genomul MTB asociate cu rezistenta la RMP

Managementul programatic al Tb rezistente pt rapiditate si standardizare

Primul pas in identificarea rapida a TB MDR-RMP rezist e surogat pentru MDR

Aprobata si recomandata de OMS (2008), care a emis ghiduri de introducere la nivel national si standard de folosire.

PRINCIPIU

RT-PCR : amplificare in lant (PCR, PCR in timp real) – GeneXpert

Ultra- versiune imbunatatita a GeneXpert

reduce timpul de confirmare a TB sau/si a TB MDR la < 24 ore

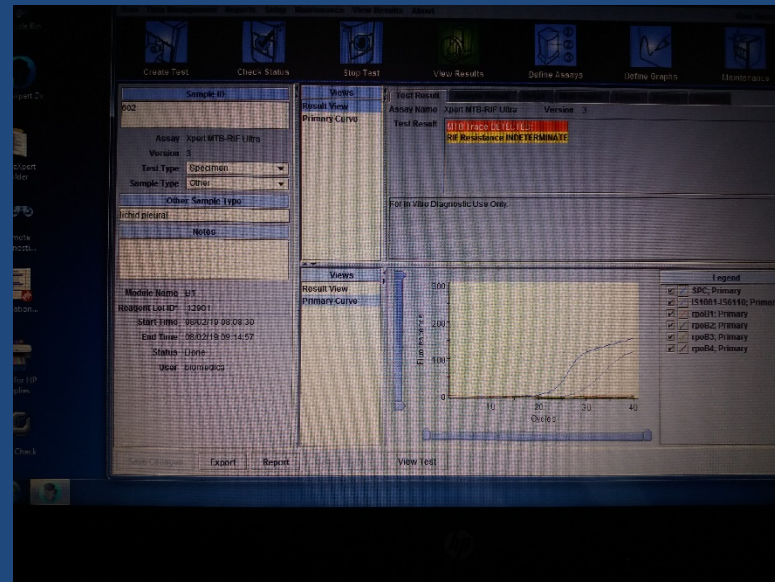
Aprobata de OMS in 2008 pt detectarea MDR
la cazurile M+ sau doar C+

Nu inlocuieste metodele actuale standardizate
pt detectarea CMTB si a profilului de
rezistenta, doar le completeaza.

Utila doar pentru CN- analizeaza ADN

Costisitoare.

GeneXpert



Roxana Filip: roxana_filip@yahoo.com

Aplicabil singur, extensiv pt initierea trat doar in zonele in care prevalenta MDR >15%

Daca MDR < 5%- necesar confirm. prin orice alt test pt dg definitiv al RMPr

Comparata cu ABG fenotipica pt RMPr

Sensibilitatea: 100% - 99,2% M+

84,6% - 72,5% M-, C+

Specificitatea: > 99,2%

GeneXpert ULTRA

Ultra folosește aceleași categorii semi-cantitative de rezultate ca testul Xpert MTB / RIF pentru **CMTB detectat:**

ridicat- High

mediu- Medium

scăzut - Low

foarte scăzut – Very low

plus o categorie nouă semi-cantitativă, TRACE-
"urme" care corespunde celei mai mici cantități
bacilare detectabile

EPIDEMIOLOGIE MOLECULARA

Genomul CMTB unul dintre cele mai stabile.

Metodele EM a TB detecteaza **secvente repetabile si variabile, specie specifice** la nivelul genomului micobacterian, sau **investigheaza intregul genom**, permitand **analiza discriminatorie si reproductibila** a izolatelor clinice.

Perfectionate si standardizate tehnici pentru genotipare

RFLP – polimorfismul lungimii fragmentelor de restrictie

Spoligotiparea- secventele repetabile direct (DR)

MIRU-VNTR -secventele dintre unitatile repetitive /
numarul variabil al unitatilor repetitive in tandem.

WGS-whole genome sequencing

NGS- next generation sequencing

WGS

Analizeaza 95-99% din genom

Ofera informatii detaliate referitoare la:

gradul de inrudire a tulpinilor/intelegerea diversitatii tulpinilor MTB

identifica genele care mediaza rezistenta

indica secventa transiterii TB

suprav epidemiol in 16 state EU, 12 state nu au acces, 3 NA

cluster (grup): 2 sau m. m tulpini cu profil molecular identic

GenoType – LPA

Tipuri de kituri disponibile in Romania

Detectare simultana CMTB resist RMP, INH/ AgI-FQ (LNR)

Identifica specii din Complexul MTBC (LNR)

Identifica specii NTM (CM, AS)/ indirect- direct (LNR)

Identifica specii NTM si markeri de rezistenta la macrolide si aminoglicozide la specii implicate in patologice (LNR)

LPA

Dezavantaje, limitari

LPA - test direct la CN si test indirect (cultura) pt monitorizare

Necesare conditii de biosiguranta nivel 3

Necesare amenajari: cel putin 3 incaperi diferite

Personal instruit

Extractie- Denaturare



Roxana Filip: roxana_filip@yahoo.com

Amplificare- Hibridizare



Roxana Filip: roxana_filip@yahoo.com

Preparare amestec nucleotide- PNM



Roxana Filip: roxana_filip@yahoo.com

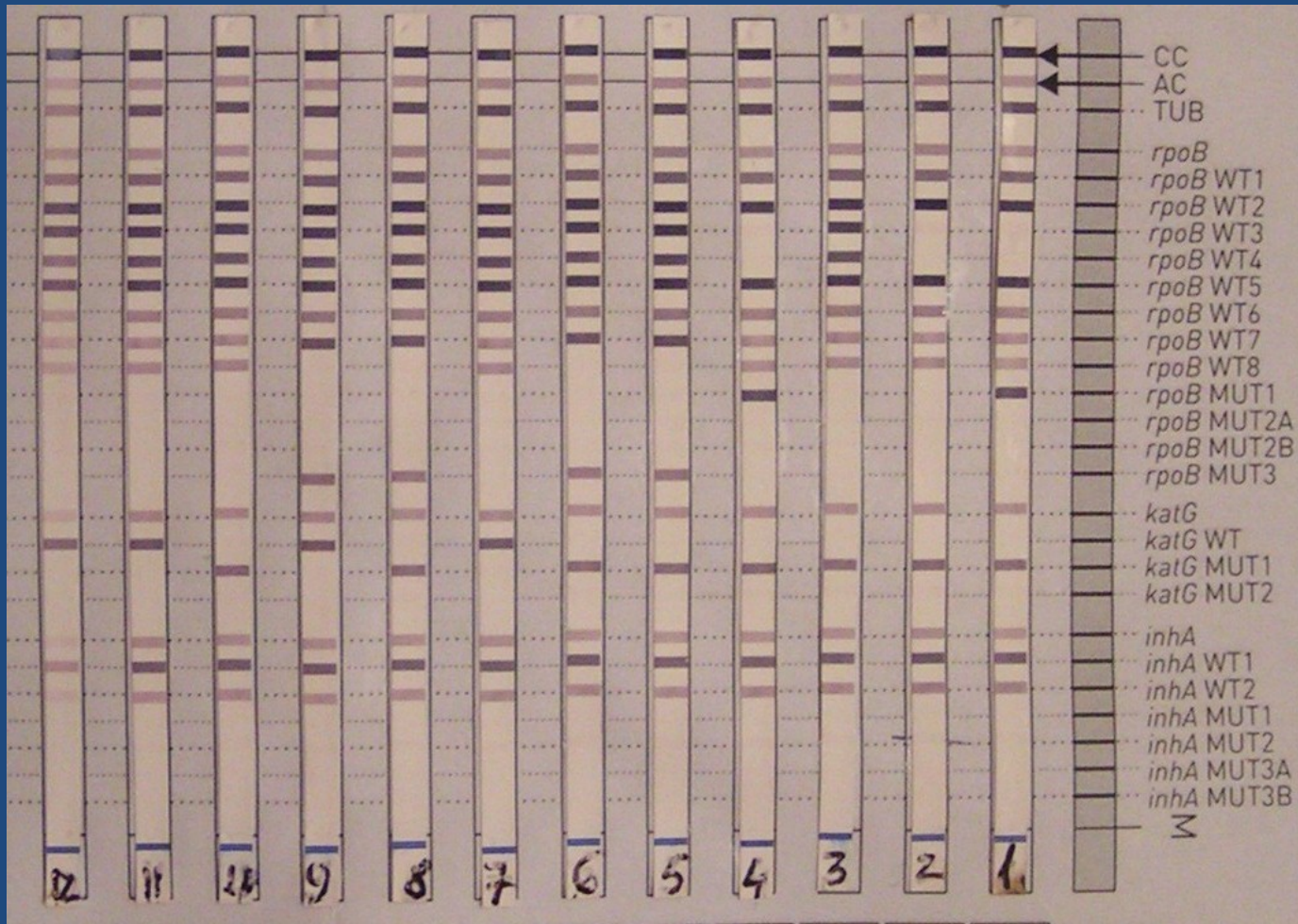
Limitari

Detecteaza doar MDR/XDR, necesara ABG conventionala pt profilul complet de rezistenta.

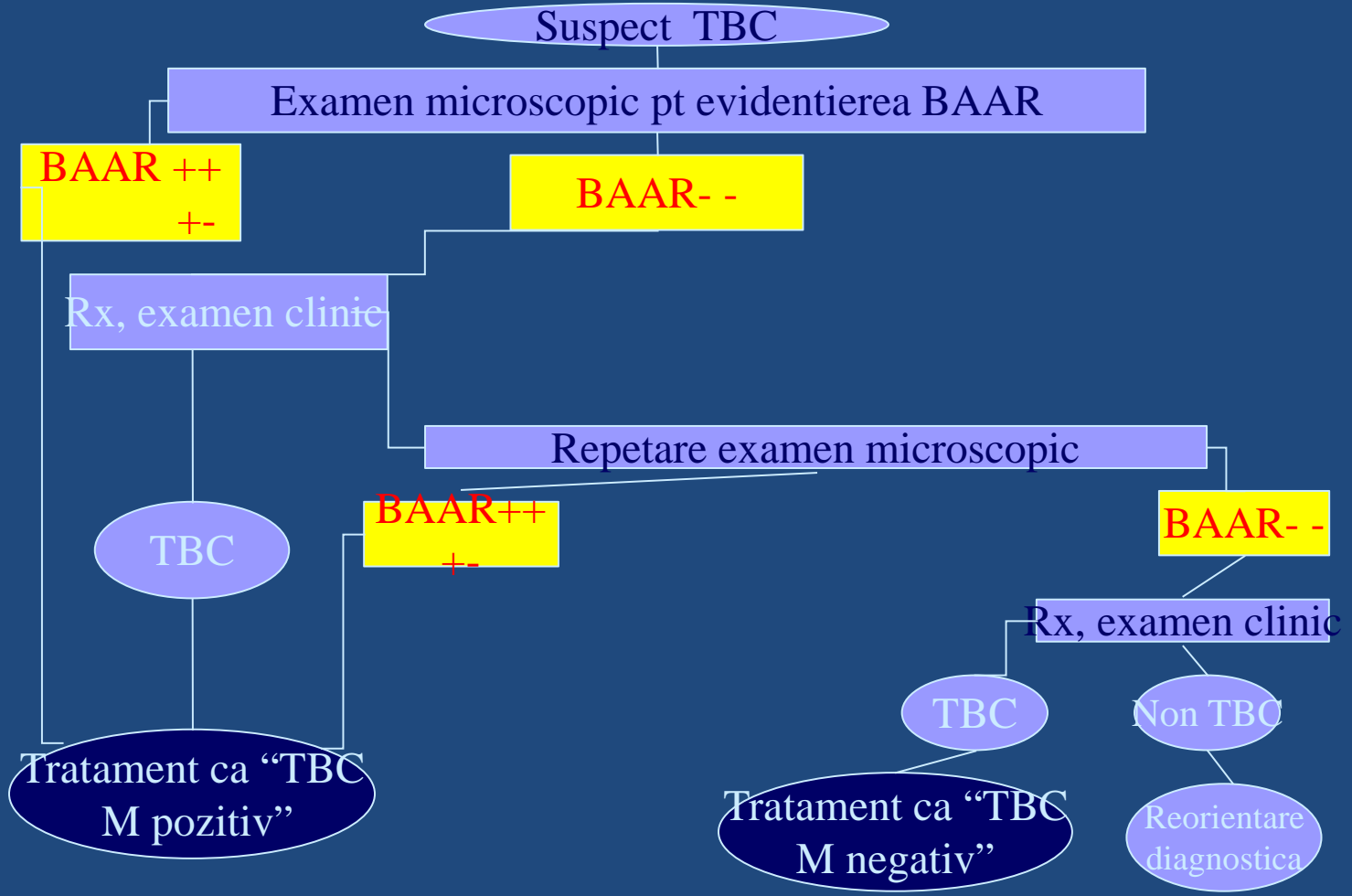
Cultura conventionala este necesara pentru monitorizarea tratamentului cazurilor MDR.

Potrivite pt folosire la nivel central si regional, cu potential de descentralizare, cu asigurarea infrastructurii corespunzatoare

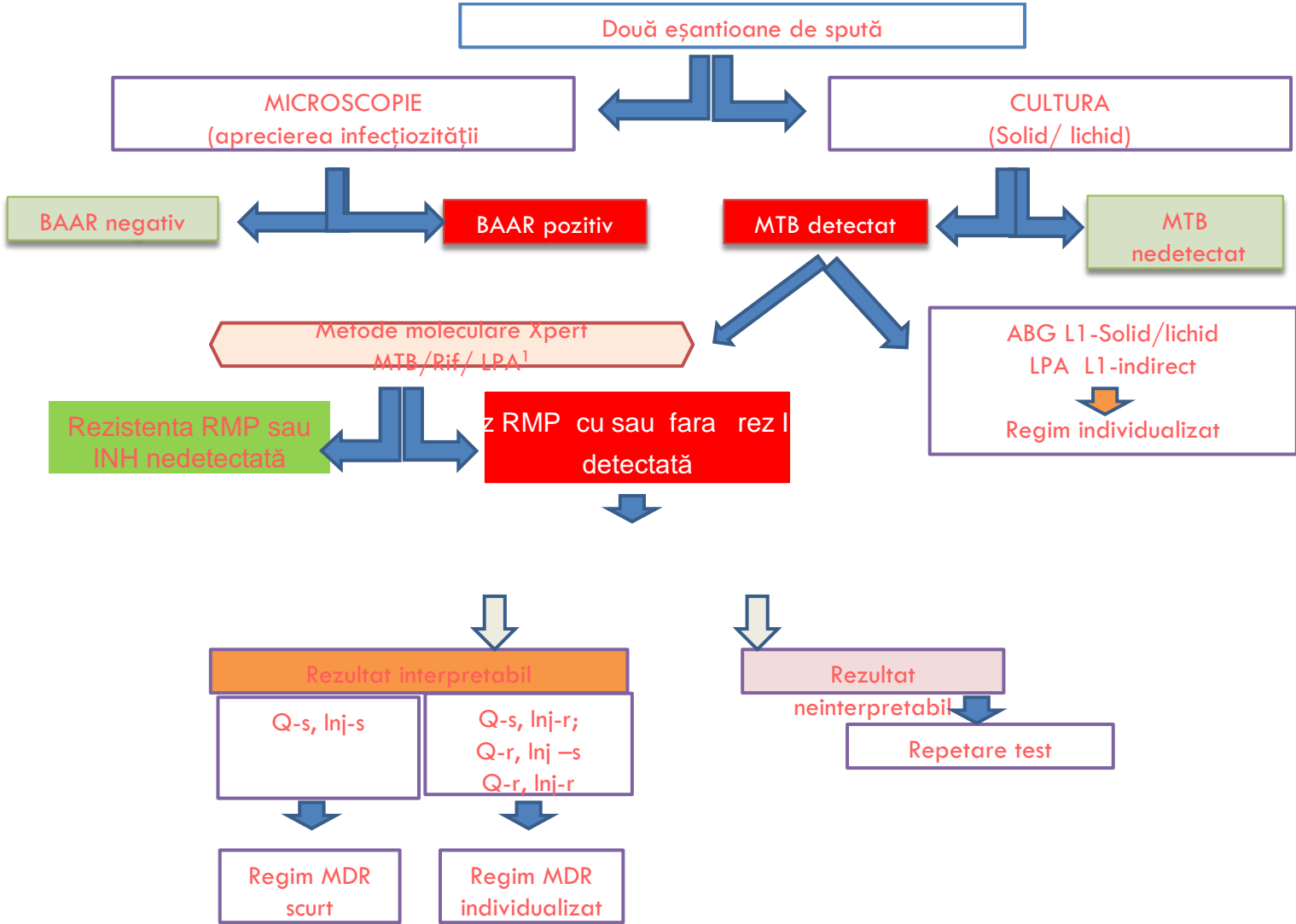
GenoType MTBDR_{plus}



Roxana Filip: roxana_filip@yahoo.com



Ex microscopic, cultură LJ, cultură lichid



Succesul diagnosticului depinde de calitatea produsului prelevat

Proba de sputa

- Personal instruit pentru obtinerea probei corespunzatoare
- Cateva minute de instruire a personalului si educarea pacientului
- Proba IDEALA pentru imbunatatirea diagnosticului

SPUTA

Mucoasa

Purulenta

**Contine polinucleare
neutrofile (celule
inflamatorii)**

SALIVA

Clara, apoasa

Spumoasa

**Contine celule
epiteliale**

CULTURA

- Insamantare pe mediul special Lowenstein Jensen
- Durata mare pana la obtinerea rezultatului (60 zile)
- Riscul contaminarii
- Pozitivare prea tardiva pentru pacient

Metode moleculare gene Xpert - diagnostic in 2 ore

Repertorio *Emile Tavan*

La Traviata

di
G. Verdi

Due Trascrizioni
per Pianoforte
dalla Grande Fantasia per Orchestra
di
Emile Tavan

118748 Prima Trascrizione
118749 Seconda Trascrizione



G. RICORDI & C.
Editori - Stampatori
MILANO
ROMA - NAPOLI - PALERMO - LONDRA - LIPSIA - BUENOS-AIRES - NEW-YORK
PARIS - SOCIÉTÉ ANONYME DES ÉDITIONS RICORDI - PARIS
18, Rue de la Pépinière, 18
Dépositaire avertisseur de dépôt et des brevets internationaux. Révisé par les Tribunaux
Tutti diritti di esecuzione, riproduzione e trascrizione sono riservati.
All rights of execution, reproduction and transcription are strictly reserved.
(Copyright MCMXXII, by G. Ricordi & Co.)
Printed in Italy

Roxana Filip: roxana_filip@yahoo.com



Roxana Filip: roxana_filip@yahoo.com



Roxana Filip: roxana_filip@yahoo.com



Roxana Filip: roxana_filip@yahoo.com

Tuberculoza nu discrimineaza.

Ea afecteaza:

- Regi: cel puțin 3 regi francezi au fost afectați
- Politicieni: **Nelson Mandela, Eleanor Roosevelt**
- Oameni de știință: **Bell, Mendeleev**
- Muzicieni: **Chopin, Tina Turner**
- Scriitori: **Balzac**
- Filosofi: **Kant**

Tuberculoza a influentat tendintele in moda si machiaj in secolul 19

- In 1800 facea ravagii in Europa si America
- Nu se descoperisera tuberculostaticile si oamenii se stingeau incet
- Victorienii au romantizat efectele bolii: pielea palida, parul fin si matasos, ochi stralucitori cu pupile dilatate, obrazii imbujorati si buzele rosii devenisera un nou standard de frumusetate
- Simptomele starii febrile au dictat tendintele in machiaj

Tuberculoza a influențat tendințele în moda și machiaj în secolul 19

- femeile purtau fuste largi care accentuau talia subțire (slăbită de boală)
- decolteul era generos și pune în evidență pielea translucidă a bolnavei
- după ce în 1882 Koch a determinat cauza bolii au fost declanșate campanii de sănătate publică la scară largă care au vizat inclusiv moda feminină :
 - ✓ fustele largi adună mizeria de pe străzi și o aduce în case;
 - ✓ corsetele au fost atacate pentru că limitau mișcările respiratorii

Tuberculoza poate fi comparata cu o doamna batrana inteleapta:

- Ea nu se grabeste nicaieri.
- Daca ar muri, ar lasa prin testament o suma considerabila omenirii.
- Dar, ca multe alte batrane rele refuza sa moara.

- se considera ca a aparut atunci cand *Homo sapiens* au iesit din Africa acum 40 000 de ani
- o fosila de 500 000 de ani continea *Homo erectus* cu tuberculoza.
- cand oamenii au invatat sa scrie au descris-o; egiptenii au creat primul azil pentru tuberculosi, grecii antici au denumit-o phtisis

Tuberculoza loveste atunci cand esti deja la pamant

Loveste persoanele

- Sarace
- Care stau in conditii igienice precare
- Stresate fizic sau psihic
- Malnutriti
- Alcoolici
- Cu boli asociate

- Eradicarea tuberculozei este foarte complicata, in ciuda suprastandardizarii diagnosticului si tratamentului
- Este usor sa dai un tratament dupa standard dar nu chiar atat de usor
- Este mai greu sa ridici starea sociala a unei populatii incat sa nu o mai faci vulnerabila la imbolnavire
- Asteptam cu totii momentul in care OMS va declara Romania "tuberculosis free"

Bibliografie (selectie)

1. **B.Mahler et al . (2018) Aderenta pacientului la tratamentul TB.**
2. **Daniela Homorodean (2018). Curs POCU, Instrumente structurale 2014-2021**