



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

## TEHNICI MODERNE IN DIAGNOSTICUL TUBERCULOZEI CU DIFERITE LOCALIZARI

**Roxana Filip<sup>1,2</sup>,**

<sup>1</sup>Spitalul Judetean de Urgenta Sf. Ioan cel Nou  
Suceava, Laborator TB Biologie Moleculara

<sup>2</sup>Universitatea Stefan cel Mare Suceava, Facultatea de  
Medicina si Stiinte Biologice

Roxana Filip: [roxana\\_filip@yahoo.com](mailto:roxana_filip@yahoo.com)

# ROBERT KOCH

Examen microscopic

Cultura

Testarea sensibilitatii

Postulatele lui Koch moleculare

*“Seeq and you will find”*

*“Seq and you will find”*

Timp: 60 zile



## Testele de biologie moleculara

Identifica mutatiile din genomul MTB asociate cu rezistenta la RMP

### Avantaje

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.

**Reduce timpul de confirmare a TB sau/si a TB MDR la 24 de ore**

## 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**



## SPITALUL JUDEȚEAN DE URGENȚĂ „SFÂNTUL IOAN CEL NOU” - SUCEAVA

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.

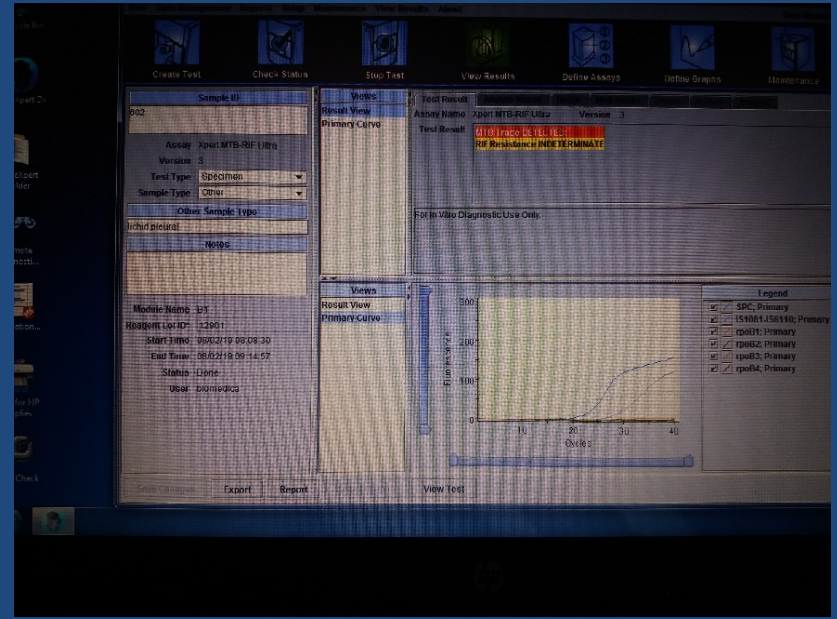
## DESCRIERE

Sistem inchis, complet automatizat pt detect CMTB si RMPPr

Cartus de unica folosinta in platforma specifica de procesare a probei, amplificare si analiza fragmentelor amplificate

Aplicabil in culturi sau sputa, sediment din produse  
Detecteaza simultan MTBC si RMPPr in <2 ore

Rezultatul este generat automat, la terminarea testului.



Roxana Filip: [roxana\\_filip@yahoo.com](mailto: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%

streaza la rece(4-8°C)

## GeneXpert ULTRA

Îmbunătățire a testului Xpert MTB/Rif prin :

- incorporarea a două tinte diferite de amplificare (IS6110 și IS1081) și
- o cameră de reacție a ADN mai mare decât Xpert MTB / RIF (50  $\mu$ l reacție PCR în Ultra, vs 25  $\mu$ l în Xpert MTB / RIF)

Îmbunătățirile multiple în privința compoziției și volumului reactivilor, a reacțiilor care au loc, au contribuit la scăderea limitei de detecție la 16 UFC/ml, comparativ cu 131 UFC/ ml pentru Xpert MTB / RIF.

# RECOMANDATE

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

# Recomandările actuale ale OMS referitoare la folosirea Ultra:

test inițial de diagnostic pentru adulții și copiii cu semne și simptome de TB

testarea extrapulmonară selectată (LCR, ganglioni limfatici și țesuturi)

Cel mai mare beneficiu este în creșterea randamentului dg pentru:

- detectarea MTB în cazurile microscopic negativ-cultură pozitiv
- specimene pediatrice
- specimene extra-pulmonare (LCR)
- cazuri HIV pozitive (specimene frecvent paucibacilare)

## Categorie noua de rezultate TRACE- URME

Cea mai mica cantitate de bacili detectati- sensibilitate imbunatatita

Una sau ambele tinte pt probele multilocus (IS) sunt pozitive cu  $<37\text{Ct}$  si nu mai mult de o proba rpoB are  $<40\text{Ct}$

### Remarci pentru interpretare

La HIV pozitiv, copii si extrapulmonar = se considera adevărat pozitiv = **TB**

Fara risc de HIV sau antecedente de TB= **repetare** cu alt produs

pozitiv la repetare= TB, exceptie cazul cu istorie recentă de TB

negativ la repetare= **reinvestigare clinica, Rx**

## Xpert MTB/Rif vs Xpert MTB/Rif ULTRA

	MTB/Rif	MTB/Rif ULTRA
Identifica	MTBC	MTBC
Rezistenta	RMP rez- surogat pt MDR	RMP rez- surogat pt MDR
Amplificarea ADN	O singura tinta-rpoB-core	Tinte multiple: rpoB-core IS6110 IS1081
Detectarea rezist	Real-time PCR 5 fragmente ale genei rpoB	Melting curve (disociere) 4 fragmente ale genei rpoB
Sputa necesara	2 ml	2 ml
Camera de reactie	25 ul	50ul
Timpul de test	112 min	65-87min
Limita de detectie	131 UFC / ml	16 UFC / ml

---

## ULTRA- Rezultate pentru Rifampicina

### RMP sensibil:

- toate patru probele rpoB au curbe de disociere de tip salbatic (normal)

### RMP rezistent:

- toate patru probele rpoB au curbe identificabile in zona de disociere si cel puțin una are profil mutant
-



## Categorii de rezultate **MTB**

<b>Categorie</b>	<b>MTB/Rif</b>	<b>Xpert Utra</b>	<b>Interpretarea rezultatelor</b>
Not detected	x	x	TB nedetectat
HIGH	x	x	TB detectat
Medium	x	x	TB detectat
Low	x	x	TB detectat
Very Low	x	x	TB detectat
<b>Trace</b>		<b>x</b>	<b>Detectate urme de ADN TB</b>

# Rezultate pentru Rifampicina

Rezultat semicantitativ <b>MTB</b>	<b>MTB/Rif</b> RMP rezistenta	<b>MTB/Rif ULTRA</b> RMP rezistenta
High, Medium, Low	Detectata/ nedetectata	Detectata/ nedetectata/ <b>indeterminata</b>
Very Low	Detectata/ nedetectata/ <b>indeterminata</b>	Detectata/ nedetectata/ <b>indeterminata</b>
<b>MTB trace detected</b>		<b>Rif indeterminata</b>

# ASIGURAREA CALITATII

CIC– obligatoriu pentru fiecare kit nou,  
- Xpert- kit pentru CIC

CEC national

- obligatoriu pentru toate lab care lucreaza testele
- completeaza rezultatele pentru CEC la culturi si

ABG

# IMBUNATATIREA CALITATII

# 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** – (Mycobacterial identification repetitive unit- Variable number of tandem repeats )  
secventele dintre unitatile repetitive / numarul variabil al unitatilor repetitive in tandem.

**WGS**-whole genome sequencing

**NGS**- next generation sequencing

Whole genome sequencing  
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

## **TB- LAMP** Loop-mediated isothermal amplification

Metoda bazata pe amplificarea acizilor nucleici,  
NEFOLOSITA in Romania in acest moment

Kit de detecție Loopamp™ MTBC- Eiken Chemical  
Company Ltd., Japonia- pentru detectarea  
Complexul *M. tuberculosis* direct din sputa de la  
persoane cu semne si simptomele compatibile cu  
TB pulmonara.

Cerinte minime de infrastructură de laborator și  
biosiguranta

Propus de WHO ca test rapid alternativ la  
**microscopia** sputei (care ramane test de diagnostic  
primar in zonele cu resurse limitate)

# TB LAMP

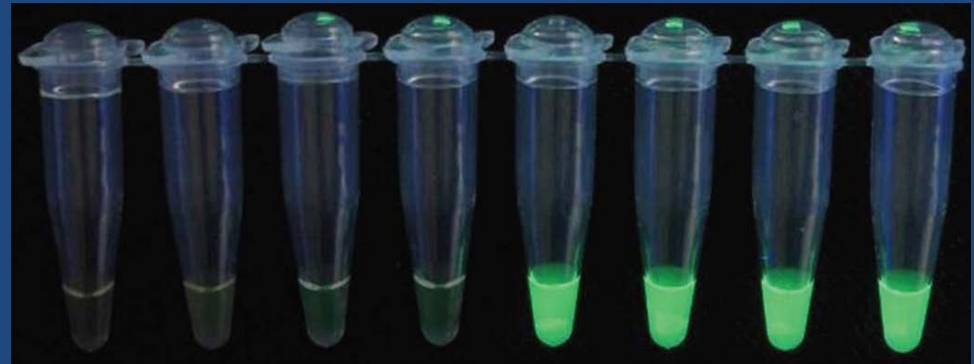
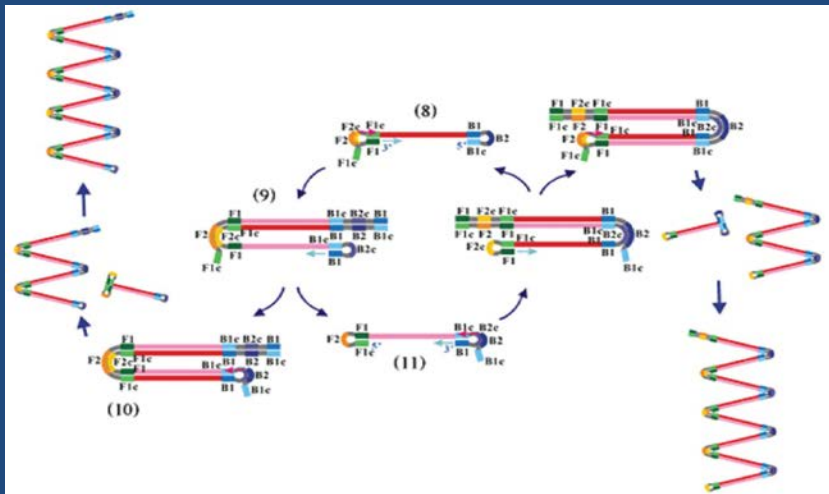
- TB-LAMP nu ar trebui sa inlocuiasca utilizarea testelor moleculare rapide pt detectarea TB si rezistenta la RMP , in special la populatiile cu risc de MDR-TB;
- Dovezi limitate a valorii TB-LAMP la diagnosticul TB la persoanele infectate cu HIV , comparativ cu ex microscopic al sputei

Poate fi folosit ca primul test pentru toate grupurile de pacienti cand sistemul GeneXpert nu este disponibil.



# - TB LAMP

In timpul AAN se genereaza cantitati mari de ampliconi  
Amplificarea devine vizibila cu ochiul liber prin  
marcarea fluorescenta



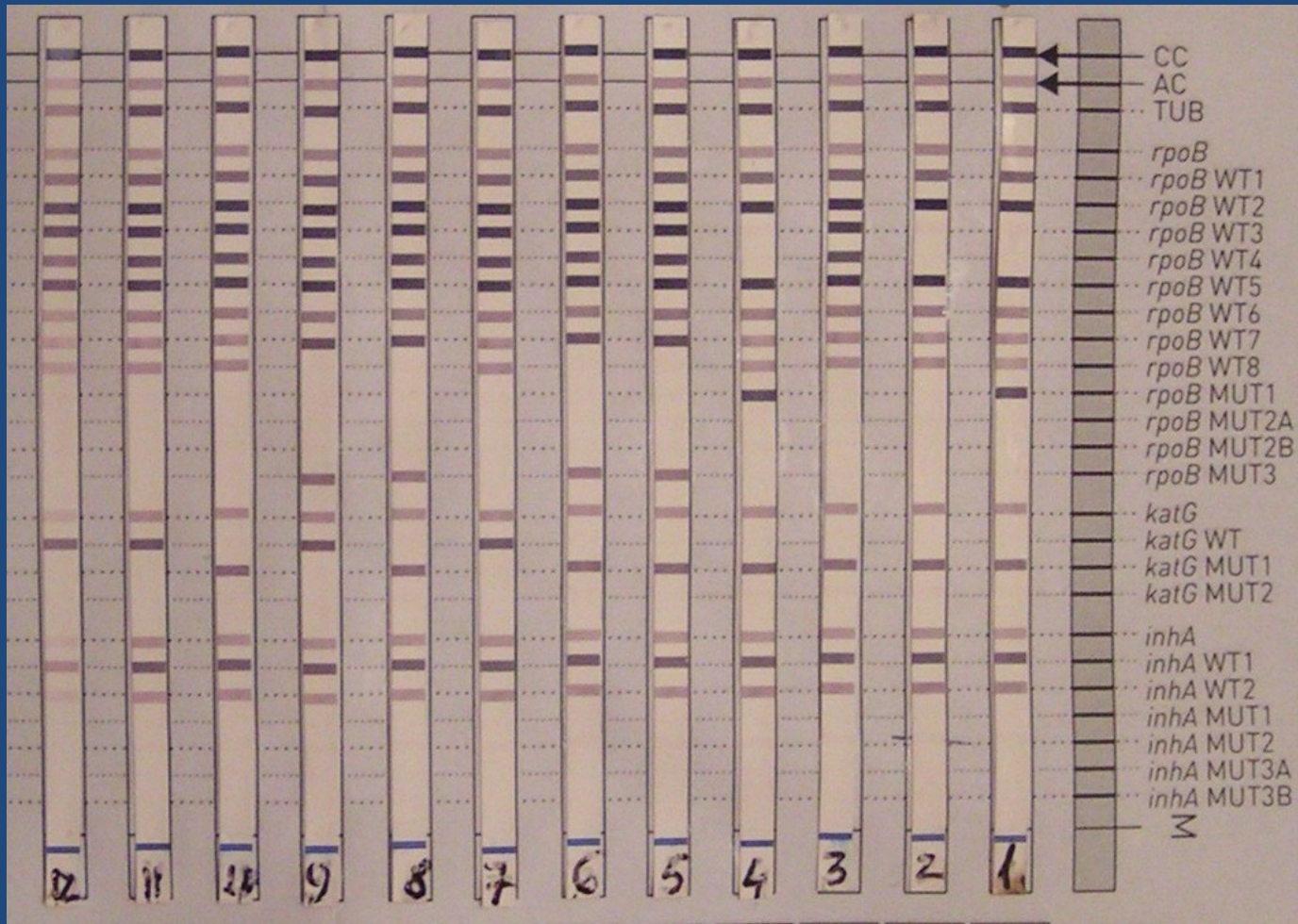
# Limitari

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

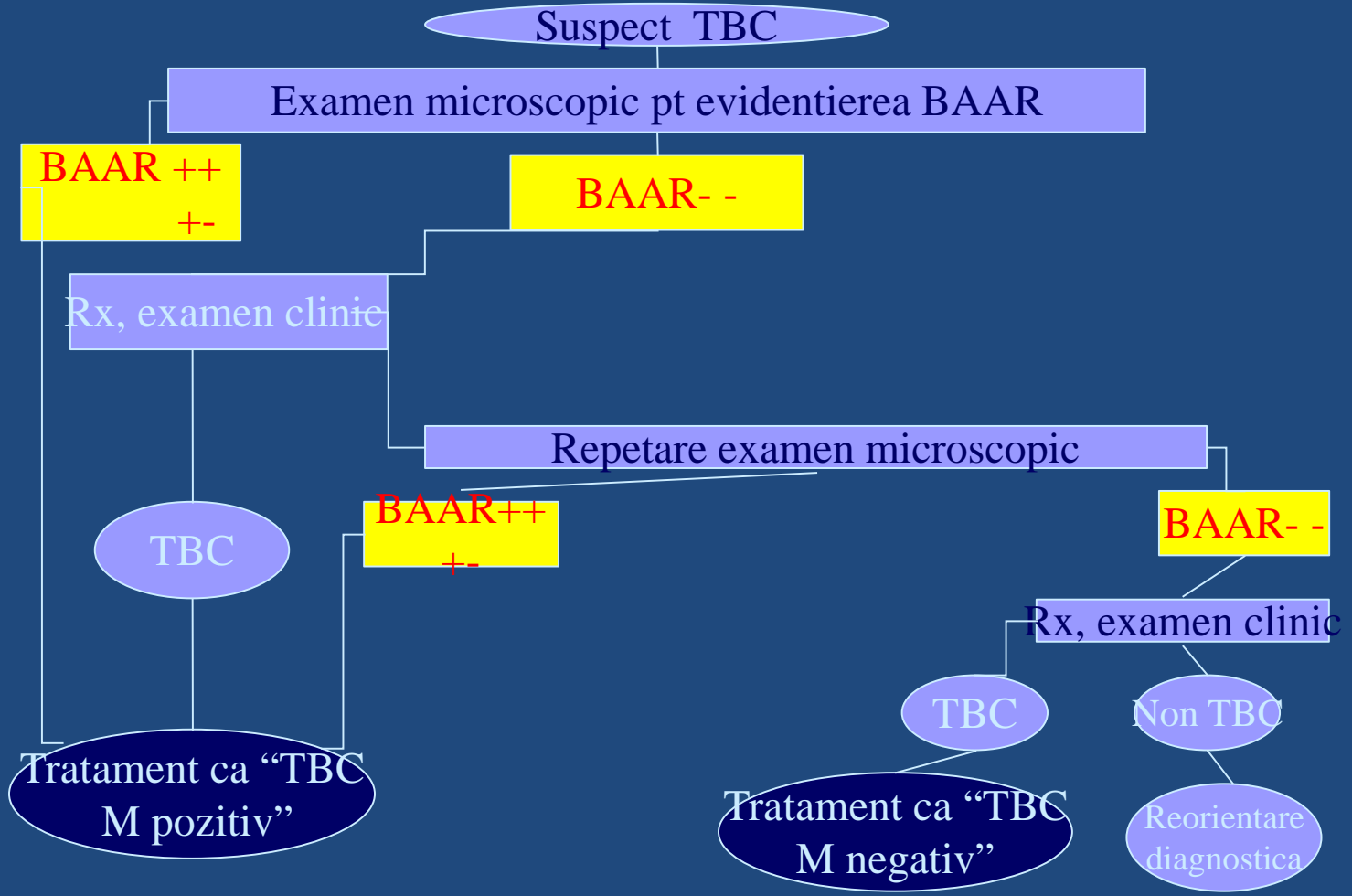
Cultura conventionala este necesara pentru monitorizarea tratamentului cazurilor MDR.

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

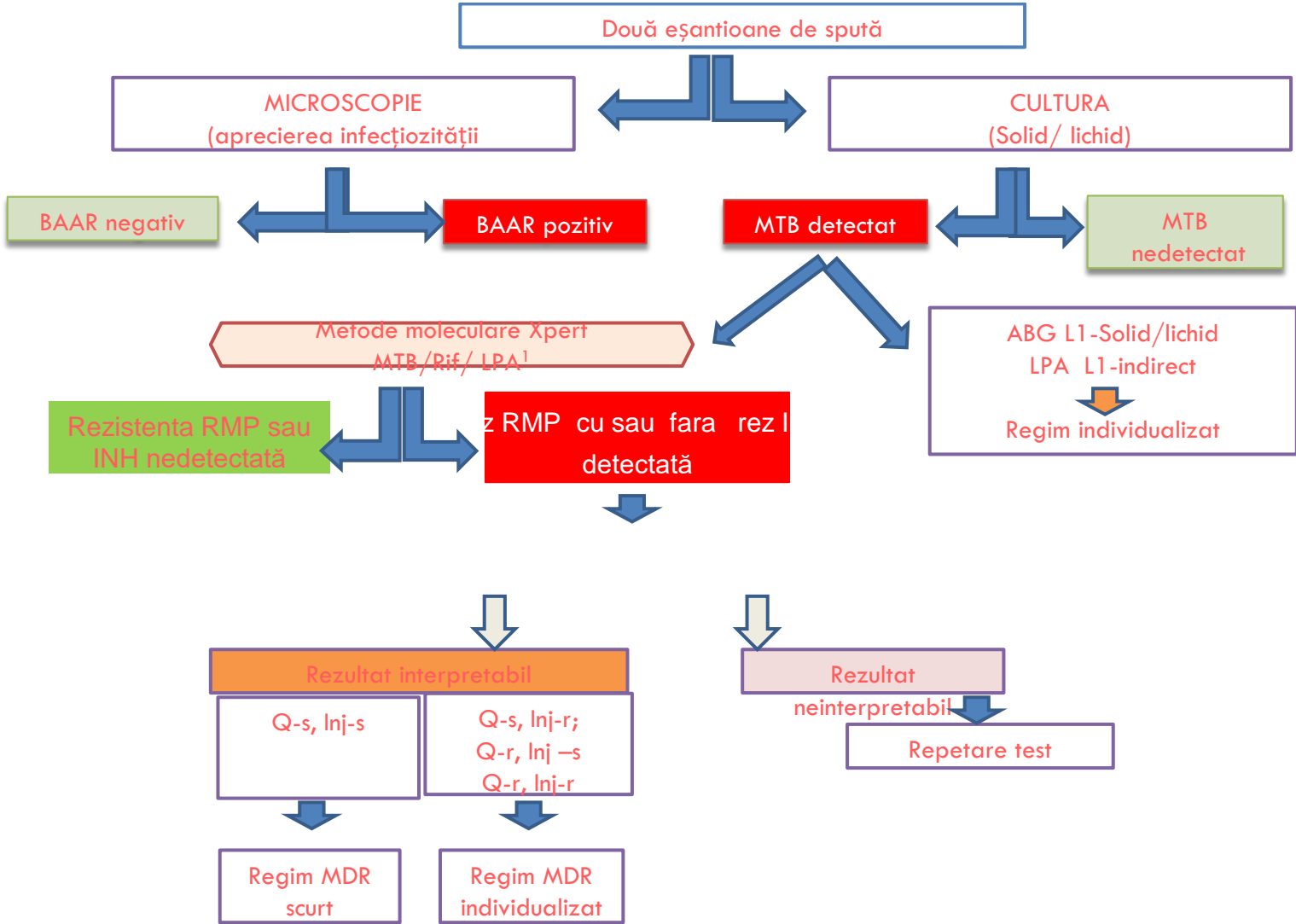
# GenoType MTBDR<sub>plus</sub>



Roxana Filip: [roxana\\_filip@yahoo.com](mailto:roxana_filip@yahoo.com)



Ex microscopic, cultură LJ, cultură lichid





Roxana Filip: [roxana\\_filip@yahoo.com](mailto:roxana_filip@yahoo.com)

Frédéric François Chopin (born Fryderyk Franciszek Chopin; 1810–1849) .

- Pianist de origine poloneza
- 30 spectacole- contributia sa este vasta prin numeroase genuri: balade, studii, impromptu, mazurci, nocturne, poloneze, preludii, scherzo, sonate si valsuri.
- Majoritatea pieselor au fost scrise pentru pian

- Chopin a fost un copil bolnavicios
- Mai tanara sa sora Emilia a decedat la 14 ani de o boala respiratorie severa rapid progresiva
- Atras de Orasul lumina, Chopin s-a mutat la Paris la 21 de ani- a continuat sa fie bolnav suferind de crize respiratorii, limfadenita cervicala,transpiratii nocturne, tuse productiva si mai apoi hemoptizie.
- Medicii lui au avut rezerve in a formula diagnosticul de tuberculoza-un stigmat dar si cel mai probabil diagnostic



In 1885, Félix-Joseph Barrias (1822–1907) a pictat Moartea lui Chopin. Tabloul contine elemente de neoclasicism si romantism. Neoclasicismul- foloseste elemente de arta si cultura din antichitatea Greco romana. Romantismul este caracterizat prin accentul pe emotie, individualism si idelizarea figurilor eroice si a mediului inconjurator, asa cum este si in acest tablou.

Franz Liszt- care a asistat la moartea lui Chopin a descris scena: Contesa Potocka plangea si statea imbracata in alb, asemeni unui inger

Chopin i-a cerut sa cante, ca sa-l aline suferinta. Ce frumos! a exclamat el

Sora sa mai mare Ludwika i-a respectat dorinta ca inima sa-l fie dusa in Polonia natala- a conservat inima cel mai probabil in cognac. In 2014 o echipa de la Academia Poloneza, facultatea de Medicina din Varsovia, IML au examinat inima: Epicardita fibrinoasa, hialinizare epicardica, dilatare ventriculara , insuficienta cardiaca, pericardita cu fibroza, noduli albiciosi- tuberculoame miocardice.

Diagnostic: Infectie tuberculoasa cronica

# EMERGING INFECTIOUS DISEASES<sup>®</sup>



World TB Day

March 2023



## **Caz clinic**

**Copil de 6 ani se interneaza in Clinica de BI pentru  
-febra**

- **Cefalee**
- **greturi,**
- **Fotofobie, diplopie, strabism convergent ochi drept**
- **In urma cu 10 zile externat de la un spital judetean  
cu dg de meningita virala**

**AP: primul nascut, vaccinari cf**

**Nu a calatorit in ultimele 6 luni**

**In colectivitatea de unde provine au fost cazuri de  
meningita**

# Examen obiectiv la internare

- Febra 38.5
- G 28Kg
- Orientat TS
- Strabism convergent ochi drept, redoare ceafa
- Kerning I pozitiv, ROT prezente simetric bilateral
- Limba saburala, faringe difuz hiperemic

# DIAGNOSTIC PREZUMTIV?

- Anamneza- meningita virală
- Punctie lombară- LCR clar, Pandy +++, pleiocitoză cu 800 elemente, 96% limfocite, 4% neutrofile
- Proteinoză 646 mg/l
- Glicoză 13mg/dl
- Clorură 96 mmol/l

# INVESTIGATII SUPLIMENTARE

- Antigene bacteriene *Neisseria meningitidis*,  
*H.influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*
- Insamnatore pe mediile: Lowenstein Jensen,  
Sabouraud
- Frotiu colorat ZN
- GeneXpert RifTB
- Quantiferon Gold
- IDR
- HLG,VSH,RX,CT

# REZULTATE

- Latex aglutinare- negativ N.m, H.i,S.p
- LCR tus China *Cryptococcus*- negativ
- Frotiu ZN- negativ
- Cultura LJ LCR- pozitiv la 3 saptamani
- Idr tuberculina- negativ
- Quantiferon Gold LCR- pozitiv
- VSH 67 mm/h
- GeneXpert pozitiv



# REZULTATE

- RX thoracic- fara focare sugestive
- Aspirat gastric BK- negative
- CT cranian- edem cerebral biemisferial
- RMN cranian- prize de contrast in ggl bazali-  
sustine dg de meningita TB

S-a reluat anamneza familiala- matusa cu numeroase consulturi pneumologice, idr negativ- sputa BK pozitiv

# Diagnostic pozitiv

## Meningita acuta tuberculoasa

-date epidemiologice- contact familial cu pacienti cu TB

- Date clinice
- - date de laborator

## Tratament

- 9 luni regim 7/7 apoi HIN si RIF 2/7
- - intre 9-12 luni

# Particularitatea cazului

- Debut atipic, sindrom febril prelungit
- Initial meningita virală- apoi proteinorahie crescută și glicorahie scăzută, Quantiferon pozitiv, cultura pozitivă *M. tuberculosis* diagnostic pozitiv
- *Biochimia LCR*-confuzie cu meningita virală sau bacteriană decapitată
- Idr la 2 UI PPD a fost negativ, dar nu trebuie să descurajeze continuarea investigațiilor, iar tratamentul tuberculostatic trebuie instituit precoce

## Bibliografie (selectie)

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

**“ Seeq and you will find  
Seq and you will find”  
ECCMID 2023 Copenhagen  
Towards diagnostic stewardship**

Roxana Filip: [roxana\\_filip@yahoo.com](mailto:roxana_filip@yahoo.com)