

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

# DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL TUBERCULOZEI

**Roxana Filip**

**Spitalul Clinic Județean de Urgență Sf. Ioan cel Nou  
Suceava, Laborator TB Biologie Moleculară  
Universitatea Ștefan cel Mare Suceava,  
Facultatea de Medicină și Științe Biologice**

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

În ciuda dezvoltării metodelor de diagnostic, tuberculoza rămâne o problemă majoră de sănătate publică.

## Metodele clasice

- Sensibilitate scăzută;
- Turnaround time 60 zile;
- Risc de contaminare.

# Metodele moleculare

- Redefinirea algoritmului de diagnostic;
- Principala aplicabilitate în detectarea *Mycobacterium tuberculosis* - bacterie cu creștere lentă;
- Utile pentru produsele paucibacilare: ex: LCR, lichid articular, secreție otică, lichid pleural.

# Obiectivele prezentarii

- Când și cum se solicită stabilirea etiologiei tuberculoase?
- Unde se poate realiza diagnosticul și cine plătește?
- Etapele diagnosticului clasic al tuberculozei și timpul necesar.
- Corelarea datelor ex: LCR.

# Prelevare, transport, conservare

- Risc de contaminare pentru personalul medical-  
doza infectantă < 10 BAAR;
- Controlul transiterii prin aerosoli- hotă de  
siguranță;
- Tipuri de produse patologice:
  - Majoritatea sunt respiratorii
  - Țesuturi, fluide normal sterile, urină, aspirat  
gastric
  - LCR.

# Produsul patologic

- reprezentativ;
- necontaminat cu flora indigenă;
- în repetiție (ca număr și în timp);
- în colectoare corespunzătoare, fără conservant;
- corect identificat;
- nu se congelează, dar se păstrează la rece (4-8°C).

# Recipiente de recoltare

- confecționate din material plastic transparent;
- rezistente la șocuri mecanice;
- capacitate adecvată prelevatului;
- închise cu capac filetat, cu fund plat, sterile;
- deschiderea cu diametrul de 3-5 cm;
- posibilitate de etichetare pe corpul flaconului;
- nu trebuie să conțină substanțe care ar putea afecta viabilitatea sau cultivabilitatea micobacteriilor;
- fără conservanți.

# RECOMANDATE



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



# SPUTA

- **Când:** - dimineata  
cel puțin 8 ore între două eșantioane
- **Cum:** supravegheat de personal instruit  
evită contaminarea (camera de recoltare)
- **Câte** esantioane? (PNPSCT, OMS)  
2 pentru diagnostic  
2 pentru monitorizare

# SPUTA

- adulți: sensibilitate 60-90%, specificitate 99%;
- copii: microscopia confirmă 10-15%, cultura 30-40%;
- 3-5 ml;
- SPUTA INDUSA (SI) - bolnavi care nu expectorează;
- în aceeași 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*

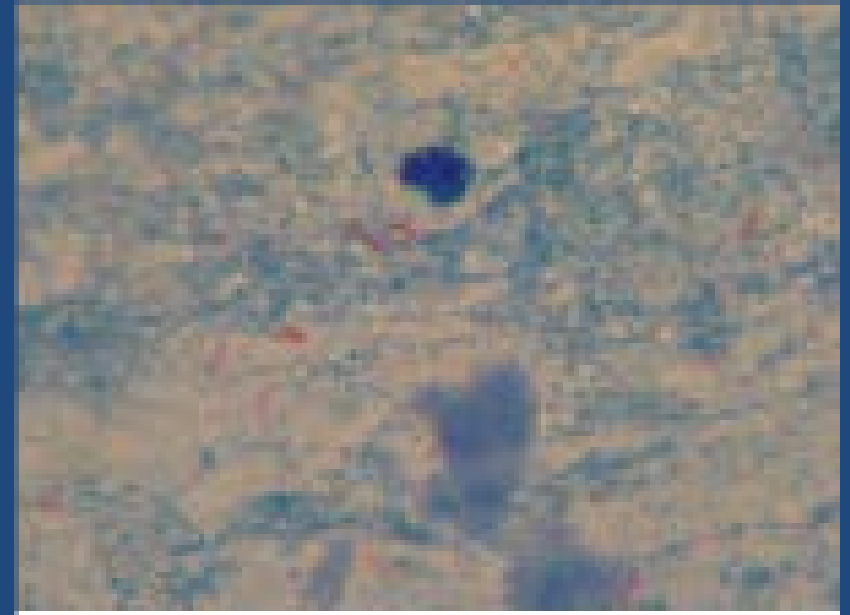
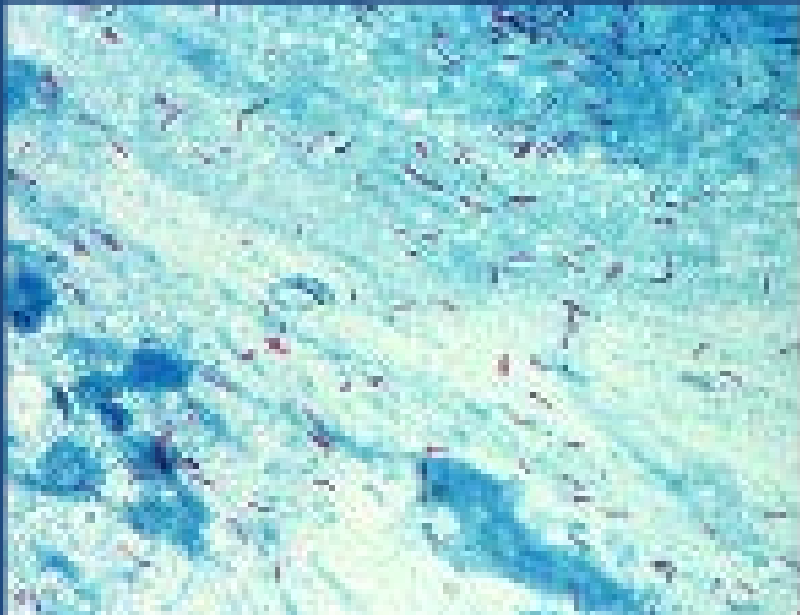
# MICROSCOPIA

## ➤ Avantaje

- simplă
- rapidă
- economică
- identifică sursele de infecție.

## ➤ Limitari

- BAAR/ml > 5.000-10.000/ml
- sensibilitate limitată (la HIV +)
- identifică BAAR, dar nu identifică *M. tuberculosis*
- nu distinge bacilii viabili de neviabili
- nu diferențiază BAAR sensibili/ rezistenți.



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 SEMICANTITATIVĂ A REZULTATELOR EXAMENULUI MICROSCOPIC

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

# Rezultat fals pozitiv microscopie

- începerea unui tratament inutil;
- irosirea medicamentelor antituberculoase;
- prelungirea inutilă a fazei intensive a tratamentului;
- pacientul își pierde încrederea în PNPSCT.

## Rezultat fals negativ

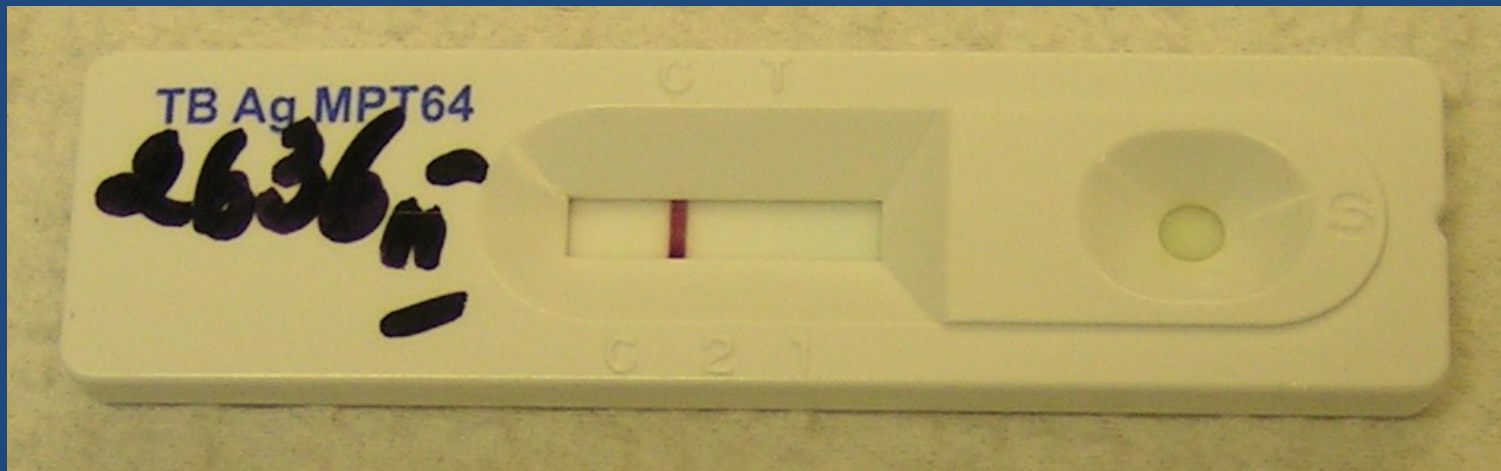
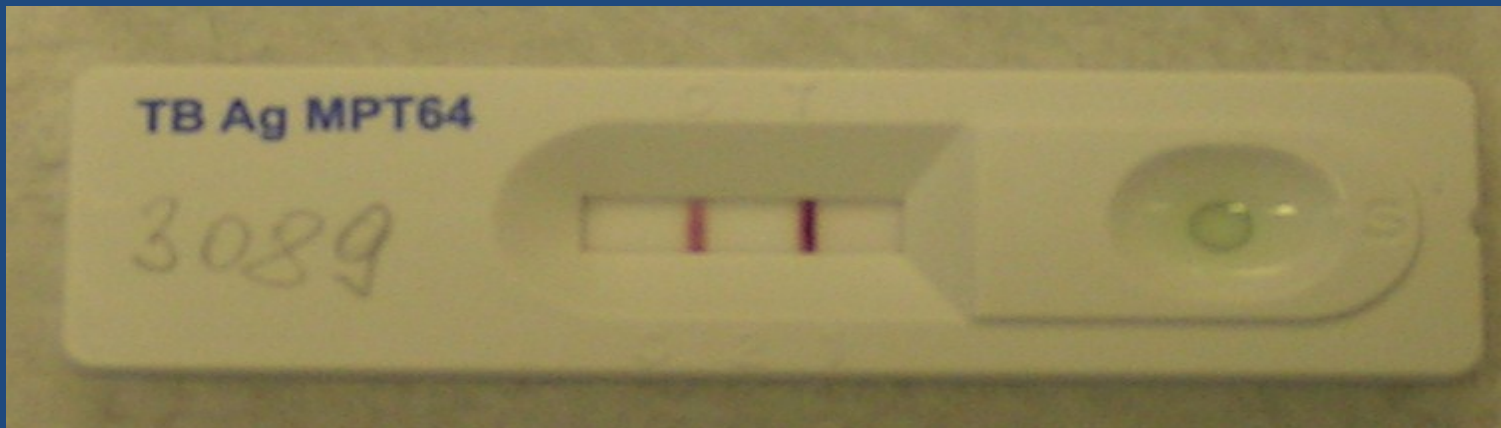
- netratarea bolnavului cu tbc, care suferă, răspândește boala și poate muri;
- neprelungirea fazei intensive a tratamentului;
- pacientul își pierde încrederea în PNPSCT.

## CULTIVAREA Mediul Lowenstein Jensen- 60 zile

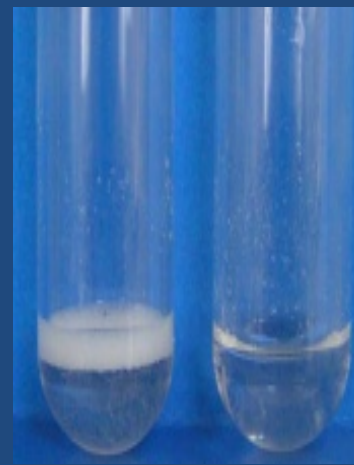
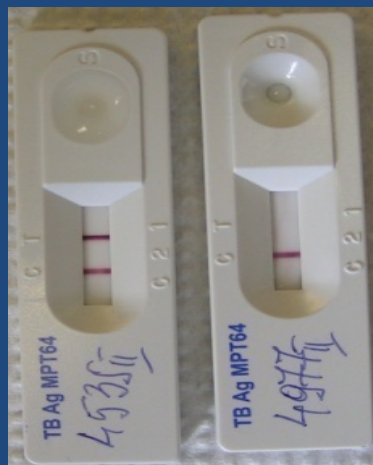
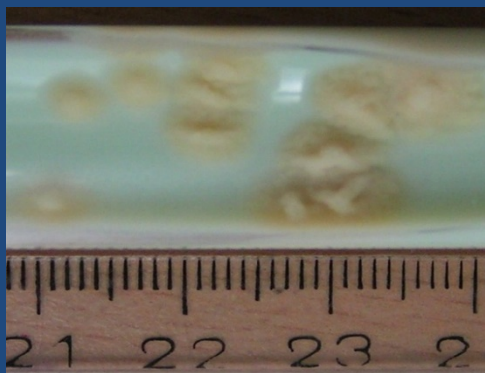


Roxana Filip: [roxana\\_filip@yahoo.com](mailto:roxana_filip@yahoo.com)

## Detectarea antigenica Ag MPT64 din cultura







# Testarea sensibilității la tuberculostatice - metoda concentrațiilor absolute



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

# Interpretarea rezultatelor, metoda concentrațiilor absolute

- **Sensibilitate** – absența creșterii sau mai puțin de 20 colonii pe tuburile cu anti-TB;
- **Rezistență** – creștere pe tubul cu anti-TB asemănătoare cu cea de pe martor;
- **Neinterpretabil** - pe tubul martor cresc <50 col. sau >200 col.;
- **Contaminare** - au crescut microbi de contaminare care alterează rezultatele (denotă deficiență de tehnică).

# Surse de eroare

- tulpini mai vechi de 21-30 zile;
- etalonarea incorectă;
- concentrații necorespunzătoare a substanței anti TB;
- inactivarea/inomogenitatea substanței anti-TB;
- însămânțare incorectă;
- temperatura de incubare cu variații.

# ASIGURAREA calității, practic

## ➤ CIC

- obligatoriu pentru fiecare lot nou de mediu;
- tulpina de referință  $H_{37}R_a$  (managementul tulpinii!);
- evidență data preparării, expirării mediului.

## ➤ CEC- național

- obligatoriu pentru toate laboratoarele care fac ABG;
- efectuat de laborant supraordonat – LNR.

## ➤ CEC- internațional

- efectuat de LSR Stockholm pentru România.

## ➤ ÎMBUNĂTĂȚIREA CALITĂȚII

# Metodele de biologie moleculară

- diagnostic rapid - 60 minute;
- identifică mutațiile din genomul MTB asociate cu rezistența la RMP;
- managementul programatic al TB rezistente pentru rapiditate și standardizare;
- primul pas în identificarea rapidă a TB MDR-RMP rezistent e surogat pentru MDR;
- aprobată și recomandată de OMS (2008), care a emis ghiduri de introducere la nivel national și standard de folosire.

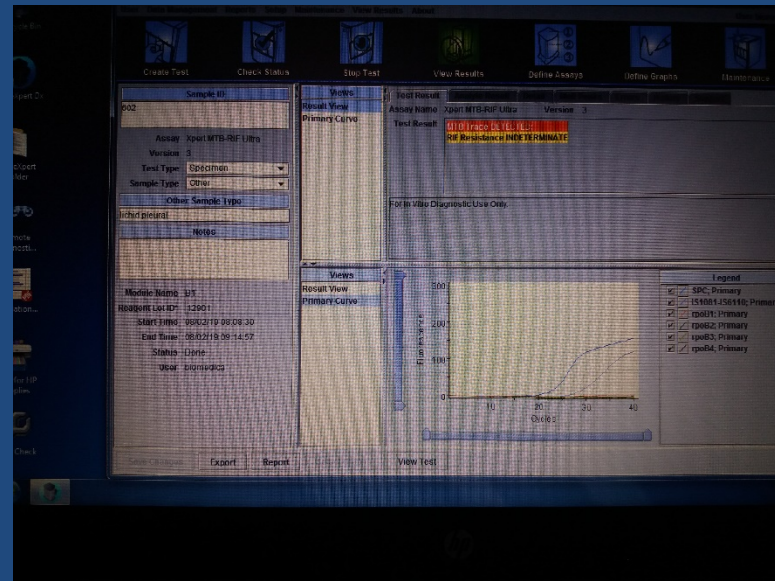
# PRINCIPIU

- RT-PCR : amplificare în lanț (PCR, PCR in timp real) – GeneXpert;
- Ultra - versiune îmbunătățită a GeneXpert;
- **reduce timpul de confirmare a TB sau/și a TB MDR la < 24 ore.**

- Aprobată de OMS în 2008 pentru detectarea MDR la cazurile M+ sau doar C+;
- Nu înlocuiește metodele actuale standardizate pentru detectarea CMTB și a profilului de rezistență, doar le completează;
- Utilă doar pentru CN - analizează ADN;
- Costisitoare.



# GeneXpert



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

- Aplicabil singur, extensiv pentru inițierea tratamentului doar în zonele în care prevalența MDR >15%;
- Dacă MDR < 5% - necesar confirmare prin orice alt test pentru diagnosticul definitiv al RMPr;
- Comparată cu ABG fenotipică pentru 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 MOLECULARĂ

- Genomul CMTB unul dintre cele mai stabile;
- Metodele EM a TB detectează **secvențe repetabile și variabile, specifice** la nivelul genomului micobacterian sau investighează **întregul genom**, permițând **analiza discriminatorie și reproductibilă** a izolatelor clinice.

# Tehnici pentru genotipare perfecționate și standardizate

- **RFLP** – polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție;
- **Spoligotiparea**- secvențele repetabile direct (DR);
- **MIRU-VNTR** – secvențele dintre unitățile repetitive/numărul variabil al unităților repetitive în tandem;
- **WGS**-whole genome sequencing;
- **NGS**- next generation sequencing.

# WGS

- Analizează 95-99% din genom;
- **Oferă informații detaliate** referitoare la:
  - gradul de înrudire a tulpinilor/înțelegerea diversității tulpinilor MTB;
  - identifică genele care mediază rezistența;
  - indică secvența transducerii TB;
  - supraveghere epidemiologică în 16 state EU, 12 state nu au acces, 3 NA;
  - **cluster** (grup): 2 sau mai multe tulpini cu profil molecular identic.

# GenoType – LPA

- Tipuri de kituri disponibile în România;
- Detectare simultană CMTB resist RMP, INH/ Agl-FQ (LNR);
- Identifică specii din Complexul MTBC (LNR);
- Identifică specii NTM (CM, AS)/ indirect - direct (LNR);
- Identifică specii NTM și markeri de rezistență la macrolide și aminoglicozide la specii implicate în patologie (LNR).

# LPA

## Dezavantaje, limitari

- LPA - test direct la CN și test indirect (cultură) pentru monitorizare;
- Necesare condiții de biosiguranță nivel 3;
- Necesare amenajări: cel puțin 3 încăperi diferite;
- Personal instruit.



# Extracție - Denaturare



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

# Amplificare - Hibridizare



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

# Preparare amestec nucleotide - PNM



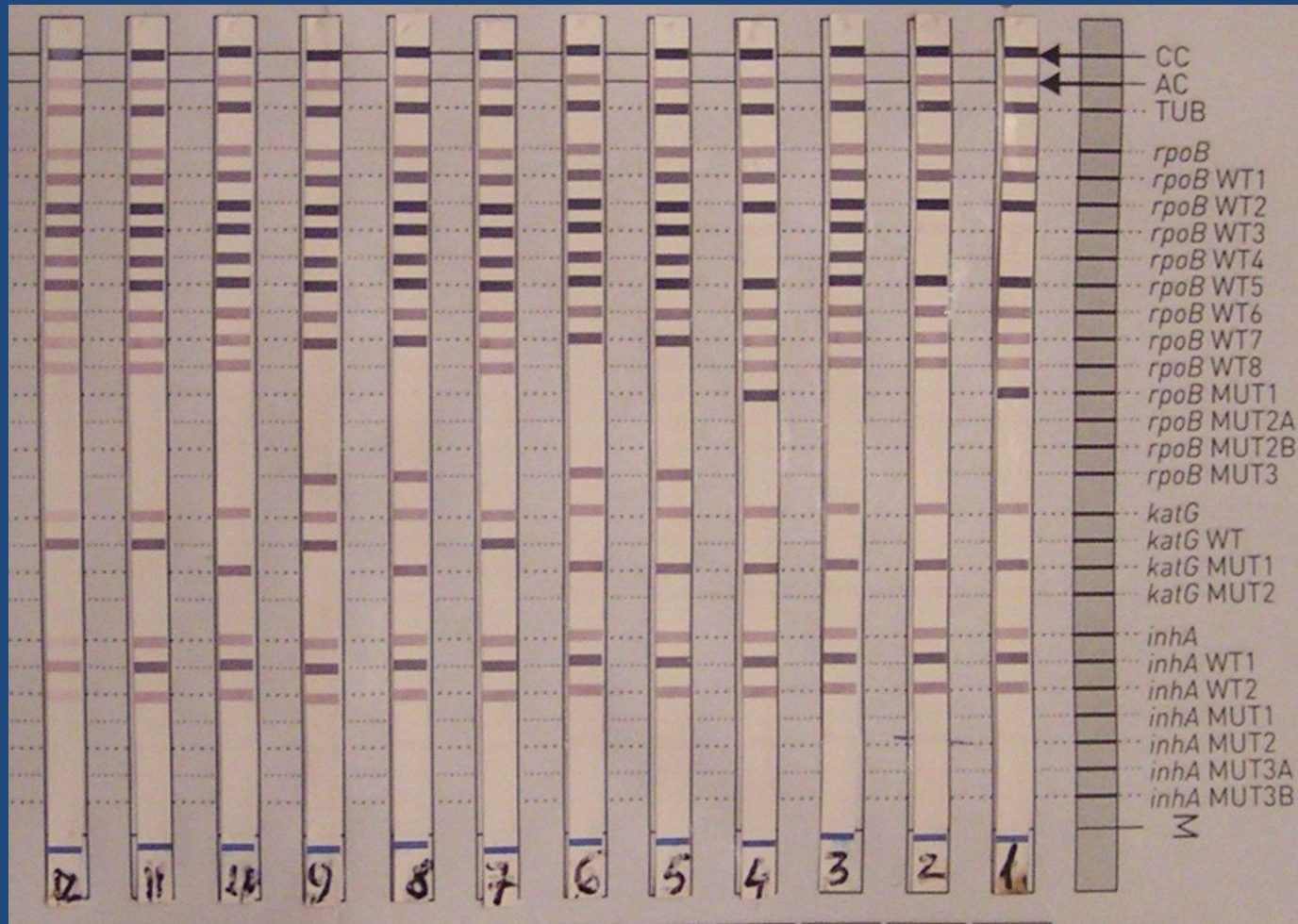
Roxana Filip: [roxana\\_filip@yahoo.com](mailto:roxana_filip@yahoo.com)

# Limitări

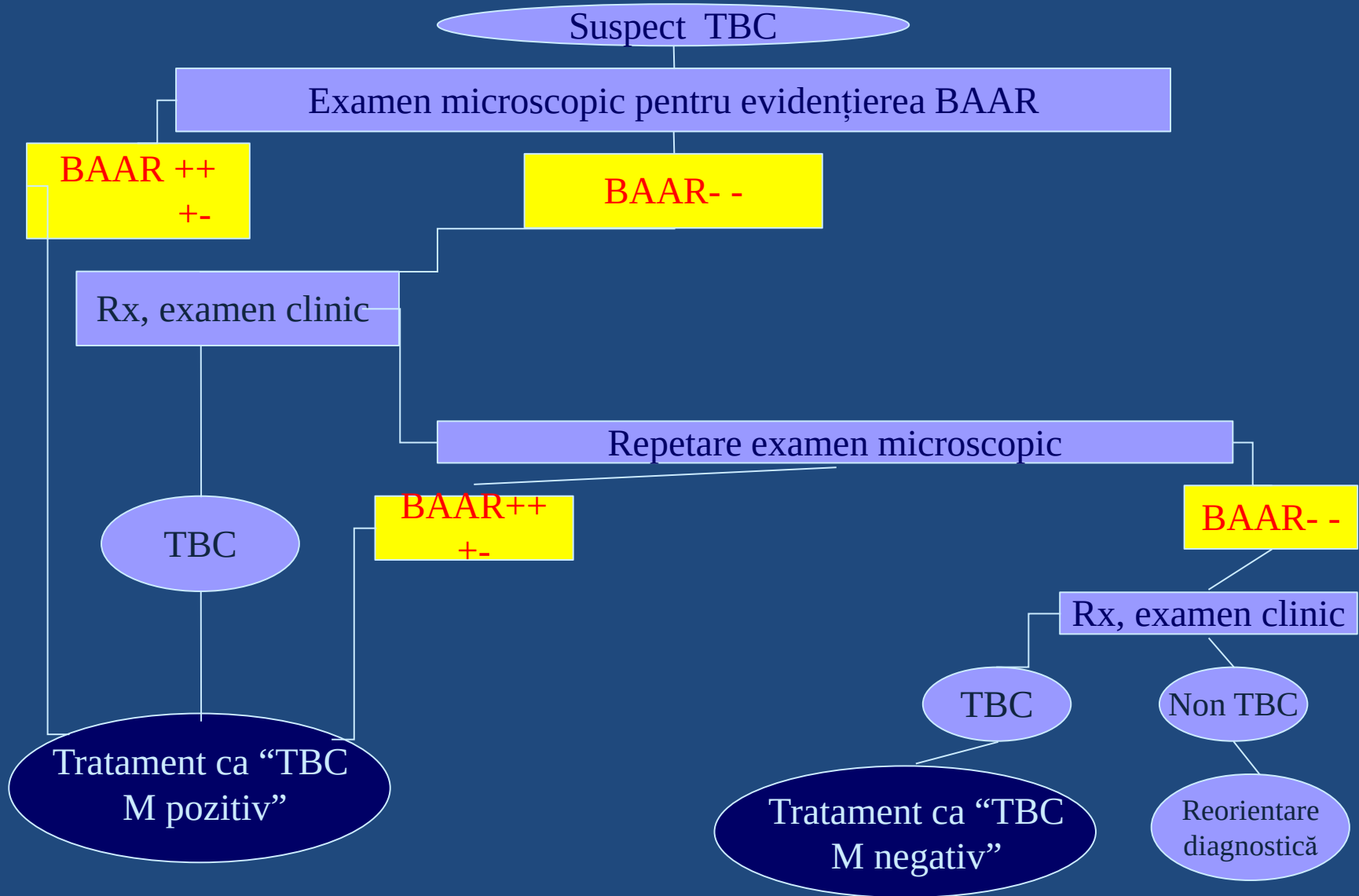
- Detectează doar MDR/XDR, necesară ABG convențională pentru profilul complet de rezistență.
- Cultura convențională este necesară pentru monitorizarea tratamentului cazurilor MDR.
- Potrivite pentru folosire la nivel central și regional, cu potențial de descentralizare, cu asigurarea infrastructurii corespunzătoare.



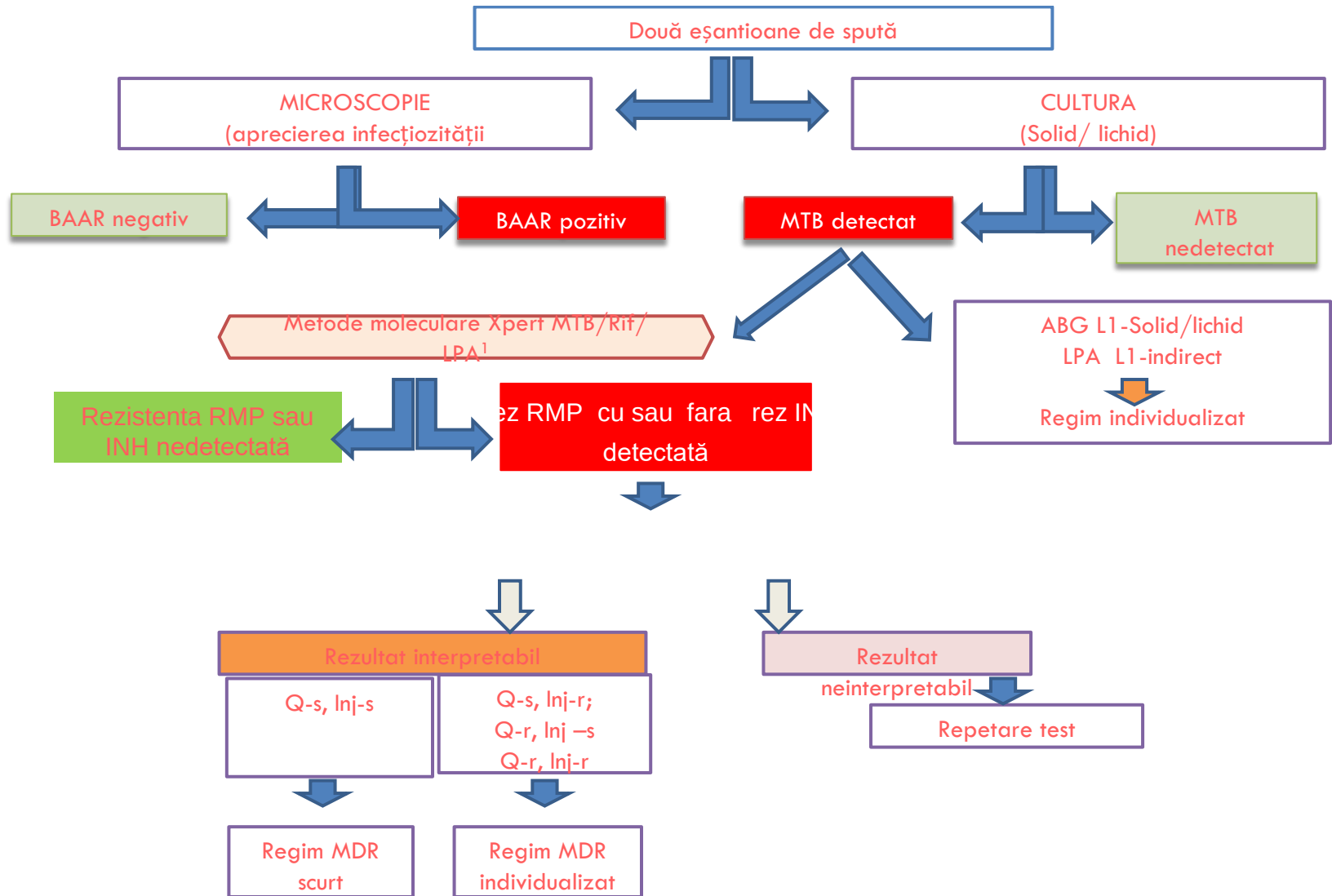
# GenoType MTBDRplus



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



Ex microscopic, cultură LJ, cultură lichid



## TAKE HOME MESSAGE

**-Succesul diagnosticului depinde de calitatea produsului prelevat-postulatele lui Koch**  
**Molecular biology reveals what you are looking for**

### **Proba de sputa**

- personal instruit pentru obținerea probei corespunzătoare;
- câteva minute de instruire a personalului și educarea pacientului;
- proba IDEALA pentru îmbunătățirea diagnosticului.



| SPUTA                                                                                                   | SALIVA                                                                      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Mucoasă</li></ul>                                               | <ul style="list-style-type: none"><li>• Clară, apoasă</li></ul>             |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Purulentă</li></ul>                                             | <ul style="list-style-type: none"><li>• Spumoasă</li></ul>                  |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Conține polinucleare neutrofile (celule inflamatorii)</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>• Conține celule epiteliale</li></ul> |

# CULTURA

- Însămânțare pe mediul special Lowenstein Jensen;
- Durată mare până la obținerea rezultatului (60 zile);
- Riscul contaminării;
- Pozitivare prea tardivă pentru pacient.

## Noi abordari si lectii asimilate

- Pandemia SARS COV 2 a daramat zidurile laboratorului catre partea clinica-from bench to bedside
- Acum testele de amplificare a acizilor nucleici sunt efectuate POC
- Viitorul apartine biologiei moleculare; iar diagnosticul tuberculozei s-a inscris deja in acest concept
- Programele de screening tuberculoza, introducerea sistemelor GeneXpert sunt cateva exemple

# Termenul Diagnostic stewardship

- Introdus de WHO, GLASS (Global Antimicrobial Resistance Surveillance System)
- Definit ca o “ ghidare coordonata si interventie pentru a imbunatati utilizarea tehnicilor de diagnostic microbiologic in vederea deciziei terapeutice” ( Chew *et al.*, 2023)
- Promoveaza testarea adecvata, integrata in timp care include prelevarea probei , identificarea corecta a patogenului si raportarea in timp real etapizat a rezultatului

**In concluzie,**

**Diagnostic stewardship inseamna a efectua**

- **testul corect,**
- **pentru pacientul potrivit**
- **Pentru motivul potrivit**
- **La momentul optim**
- **Cu interpretarea corecta**

**Rezultatul:**

- **Tratament adecvat**
- **Management optimizat al pacientului**

**Cuvantul cheie: ADECVAT**

# Concepte

- Termen aplicabil la cele trei faze de diagnostic: preanalitica, analitica, postanalitica
- Personalul interesat: clinicieni, microbiologi, personal asociat (asistente, infirmiere)
- In egala masura se aplica in cele 3 faze de testare

## Faza preanalitica

- Consta in alegerea adecvata a testului, prelevarea probei, detaliile tehnice care permit laboratorului interpretarea corecta
- Rolul major: clinicianul in alegerea testului si minimizarea resurselor alocate
- Rolul echipei: infectionist, microbiolog, epidemiolog
- Decizia computerizata- algoritmuri de diagnostic integrate in cererea de analiza
- Cererea electronica utila pentru standardizare si cresterea eficientei

# Faza preanalitica

- Personalul de laborator trebuie sa verifice conformitatea probelor: tip si calitate
- Monitorizarea volumului si calitatii probei
- Verificarea conditiilor de transport si stocare
- Calitatea probei la receptie in laborator
- Standard 15189/ 2022- Asigurarea calitatii DPMO
- Corelatia intre calitatea probelor, probe respinse si sectile clinice
- Raportarea criteriilor de respingere, performanta tehnica, interpretarea



# Faza analitica

- Controlul apartine in totalitate laboratorului
- Principalii actori- medicii de laborator,asistentii, stafful ethnic
- Implementarea metodelor de control de calitate cu generare de rezultate exacte in timpul minim
- Performanta:
  - metrica –six sigma; calitatea
  - Cum influenteaza testul populatia deservita de laborator

## Faza postanalitica

- Raportare si interpretare rezultate
- Utilizarea rezultatelor de catre clinician in decizia terapeutica
- Rezultatele generate trebuie sa fie intelese de clinicieni si generate la timp pentru ca terapia sa fie adecvata si aplicata in cel mai scurt timp
- Cheia: retea puternica de colaborare in tre clinica si laborator
- Comunicarea trebuie sa depaseasca etapa unidirectionala, a rezultatului eliberat

## Faza postanalitica

- Important in special dupa introducerea unui test nou, cu discutarea modului de prelevare, transport si interpretare rezultate
- Recenta pandemie SARS CoV 2 –emergenta rapida a testelor de diagnostic care au devenit accesibile in scurt timp
- Interpretarea mai multor teste, a testelor multistep sau secventiale ex: screening initial serologic, confirmare serologica prin metoda diferita sau test molecular

## TAKE HOME MESSAGE

**Succesul diagnosticului depinde de  
calitatea produsului prelevat**

### **Proba de sputa**

- personal instruit pentru obținerea probei corespunzătoare;
- câteva minute de instruire a personalului și educarea pacientului;
- proba IDEALA pentru îmbunătățirea diagnosticului.

- Eradicarea tuberculozei este foarte complicată, în ciuda suprastandardizării diagnosticului și tratamentului.
- Este ușor să dai un tratament după standard, dar nu chiar atât de ușor.
- Este mai greu să ridici starea socială a unei populații astfel încât să o faci invulnerabilă la îmbolnăvire.
- Așteptam cu toții momentul în care OMS va declara România “**tuberculosis free**”.

# SERENDIPIDITY

- Tuberculoza este un diagnostic la care trebuie să ne gândim, deși suntem în secolul XXI.
- Diagnostic stewardship – concept actual integrat in clinica-laborator

**“ The future depends on what  
you do today”  
M. Gandhi**





Ha Long Bay Vietnam

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



# Bibliografie (selecție)

1. Carroll K., M. Pfaller, *et al* (2023) Manual of Clinical Microbiology ASM Press, Washington.
2. B.Mahler *et al* . (2018) Aderența pacientului la tratamentul TB.
3. Daniela Homorodean (2018). Curs POCU, Instrumente structurale 2014-2021