

**DETECTAREA MUTAȚIILOR DE
REZISTENȚĂ A
MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS PRIN METODE
MOLECULARE**

Edițoiu Cornelia, Florescu Adriana, Filip Monica
Spitalul Clinic de Boli Infecțioase și Pneumoftiziologie "Victor Babeș"
Craiova

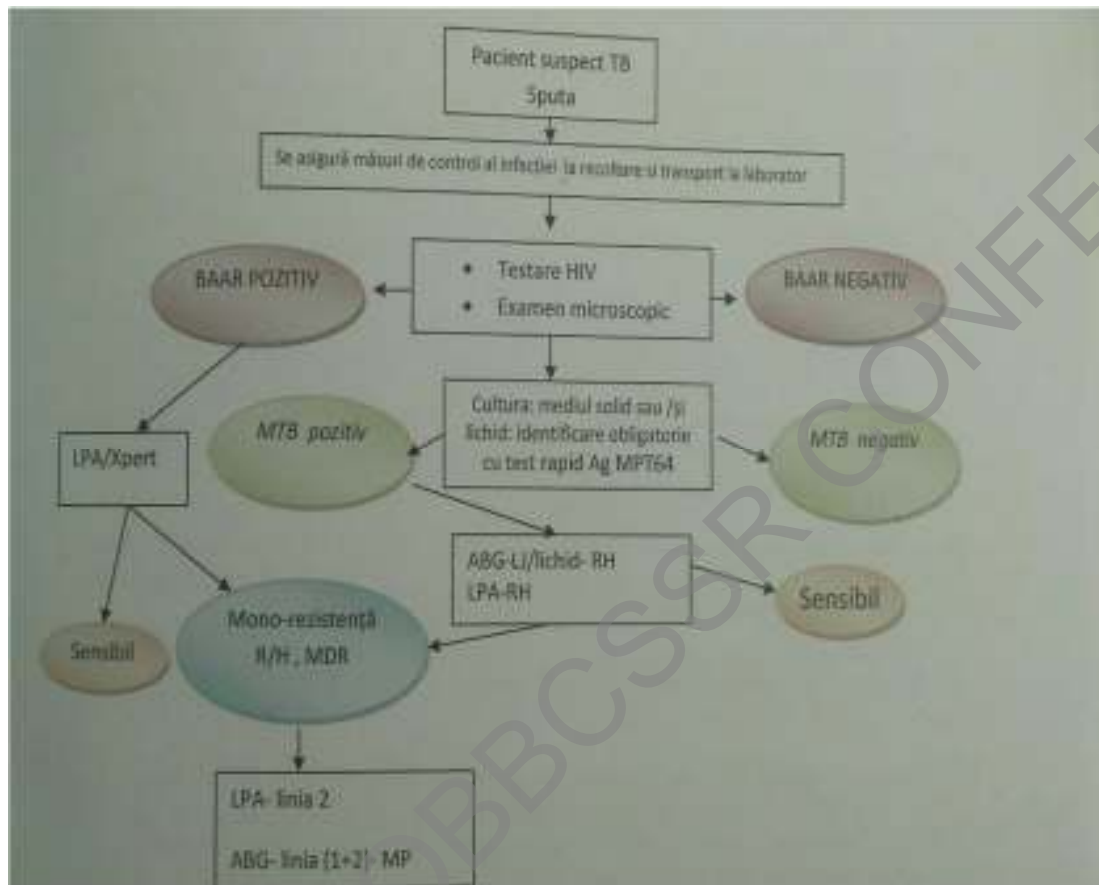
TUBERCULOZA

- reprezintă cea mai frecventă cauză de îmbolnăvire și de deces;
- problemă majoră de sănătate publică la scară mondială;
- este cauzată de bacterii aparținând complexului *Mycobacterium tuberculosis*
 - micobacteriile aparțin familiei *Mycobacteriaceae* și ordinului *Actinomycetales*;
- creșterea incidenței sale pe plan mondial:
 - epidemia de SIDA,
 - apariția unor tulpini bacteriene rezistente la tratament.
- pentru combaterea ei sunt necesare resurse financiare substanțiale;

TUBERCULOZA

- OMS a dezvoltat o Strategie globală post-2015: Strategia TB la nivel mondial (Strategia pentru eradicarea TB), aprobată de către toate statele membre în mai 2014 la consiliul Mondial al Sănătății
- invitarea persoanelor cu risc de tuberculoză pentru evaluare în unități mobile (caravane, laboratoare mobile - în apropierea colectivităților cu risc sau în zone endemice);
- caravana “**End TB**” – proiect special ce oferă suport social și consiliere;
- personalul dedicat caravelor este instruit pentru activități de screening vizând controlul simptomelor, radiografie toracică și examen genetic din spută (GeneXpert);
- în activitatea de diagnostic trebuie să se țină seama de algoritmul de diagnostic recomandat de PNPSCT:

ALGORITM DE SELECTARE A CAZURILOR PENTRU TESTE RAPIDE FENOTIPICE ȘI DE BIOLOGIE MOLECULARĂ



LEGENDĂ:

- **LPA** = Geno Type, line probe assay,
- **Xpert** = GeneXpertMTB/Rif,
- **LJ**= cultură pe mediul solid Löwenstein Jensen,
- **MGIT** = sistem automat de cultivare în mediul lichid, MGIT 960 sau VersaTrek;
- **Linia 1**= medicamente anti-TB de linia I-a, **Linia 2**= medicamente anti-TB de linia a II-a; MP= metoda proporțiilor.

(GHIDUL NAȚIONAL PENTRU REȚEAUA LABORATOARELOR TB, BUCUREȘTI 2017)

METODE DE DIAGNOSTIC *M. TUBERCULOSIS*

Diagnosticul bacteriologic este singurul criteriu care stabilește diagnosticul de certitudine al TB:

- **Metode microscopice**
 - Colorarea Ziehl-Neelsen
 - Colorarea cu fluorocromi (auramină-rhodamină)
- **Metode microbiologice** (cultivare pe medii de cultură)
 - Medii solide (*Löwenstein-Jensen, Ogawa*)
 - Medii lichide (*Bactec MGIT 960, Versatrek*)
- **Metode molecular biologice**
 - GenoType MTBDR
 - GeneXpert MTB-RIF
- **Metode serologice** (IGRA, QuantiFERON-TB Gold)
- **Metode alergologice** (Testul PPD, proba Mantoux)

MATERIALUL PATOLOGIC FOLOSIT PENTRU DEPISTAREA *M. TUBERCULOSIS*

- **Tuberculoza pulmonară:**

- sputa;
- sputa indusă cu aerosoli expectoranți;
- lavajul laringo-traheal cu ser fiziologic steril (SFS);
- aspiratul gastric;
- aspiratul bronșic sau lavajul bronho-alveolar prin bronhoscopie.

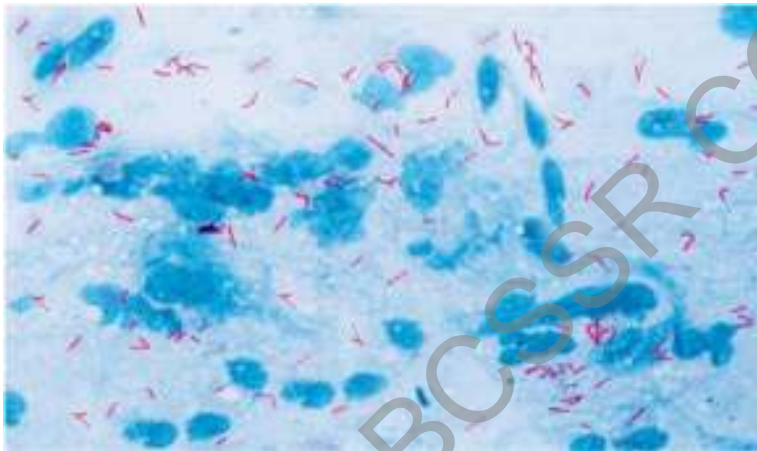
- **Tuberculoza extrapulmonară:**

- fluidele (lichidul pleural, cefalorahidian, pericardic, ascitic);
- puroi, măduvă osoasă;
- fragmente tisulare (piese de biopsie);
- urina.

EXAMENUL MICROSCOPIC

- confirmare rapidă, cost redus, accesibilitate majoră;
- depistează cele mai periculoase forme de tuberculoză (cu cât mai mare este numărul de BAAR în spută, cu atât mai contagios este bolnavul de tuberculoză).

Colorația Ziehl-Neelsen



Colorația Auramină-Rhodamină



EXAMENUL PRIN CULTURĂ

- permite izolarea culturii pure de micobacterii;
- permite determinarea exactă a etiologiei procesului specific;
- testarea sensibilității agentului patogen izolat la preparatele specifice.

Cultura pe medii solide

Löwenstein-Jensen



Cultura pe medii lichide

Bactec MGIT 960



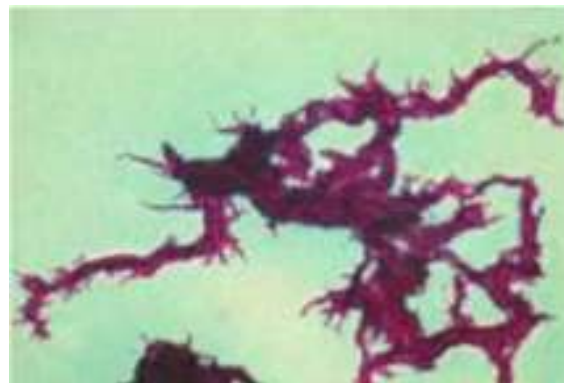
Versatrek



IDENTIFICAREA *M. TUBERCULOSIS*



- Pentru confirmarea *complexului M. tuberculosis*, din culturile pozitive se efectuează:
 - testul imunocromatografic Ag MPT64;
 - frotiu.



TESTAREA SENSIBILITĂȚII LA TUBERCULOSTATICE DE LINIA I PENTRU *M. TUBERCULOSIS*



TESTAREA SENSIBILITĂȚII LA TUBERCULOSTATICE DE LINIA I PENTRU *M. TUBERCULOSIS*



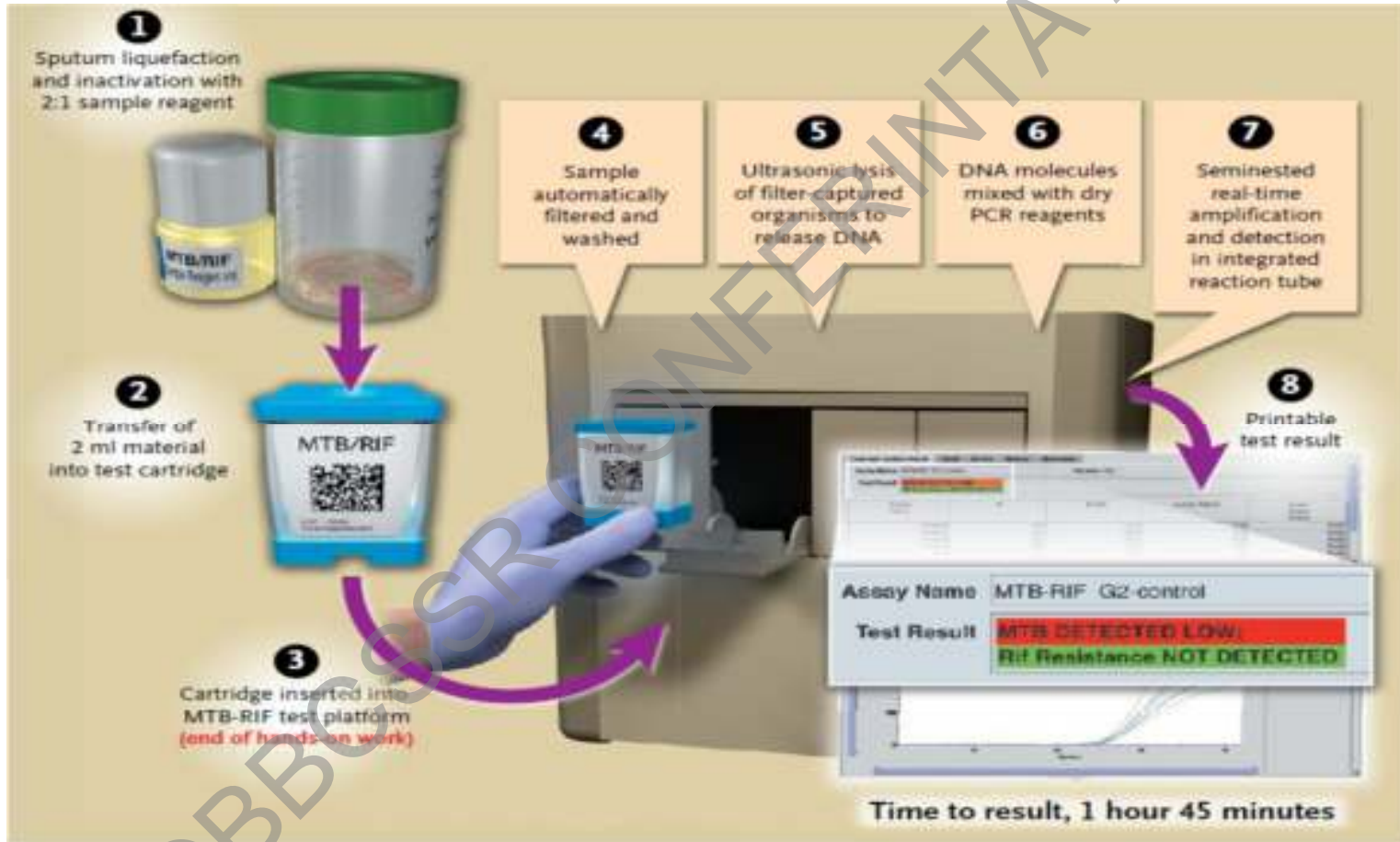
- asigură un tratament țintit și eficient pentru tuberculoză;
- metodele de testare a sensibilității la medicamentele antituberculoase:
 - Antibiograma directă;
 - Antibiograma indirectă:
 - metoda proporțiilor (cazul tulpinilor cu creștere foarte lentă);
 - metoda concentrațiilor absolute (condițiile tehnice mai accesibile, costul mai redus, interpretarea rezultatelor se face la 21 zile de la însămânțare).

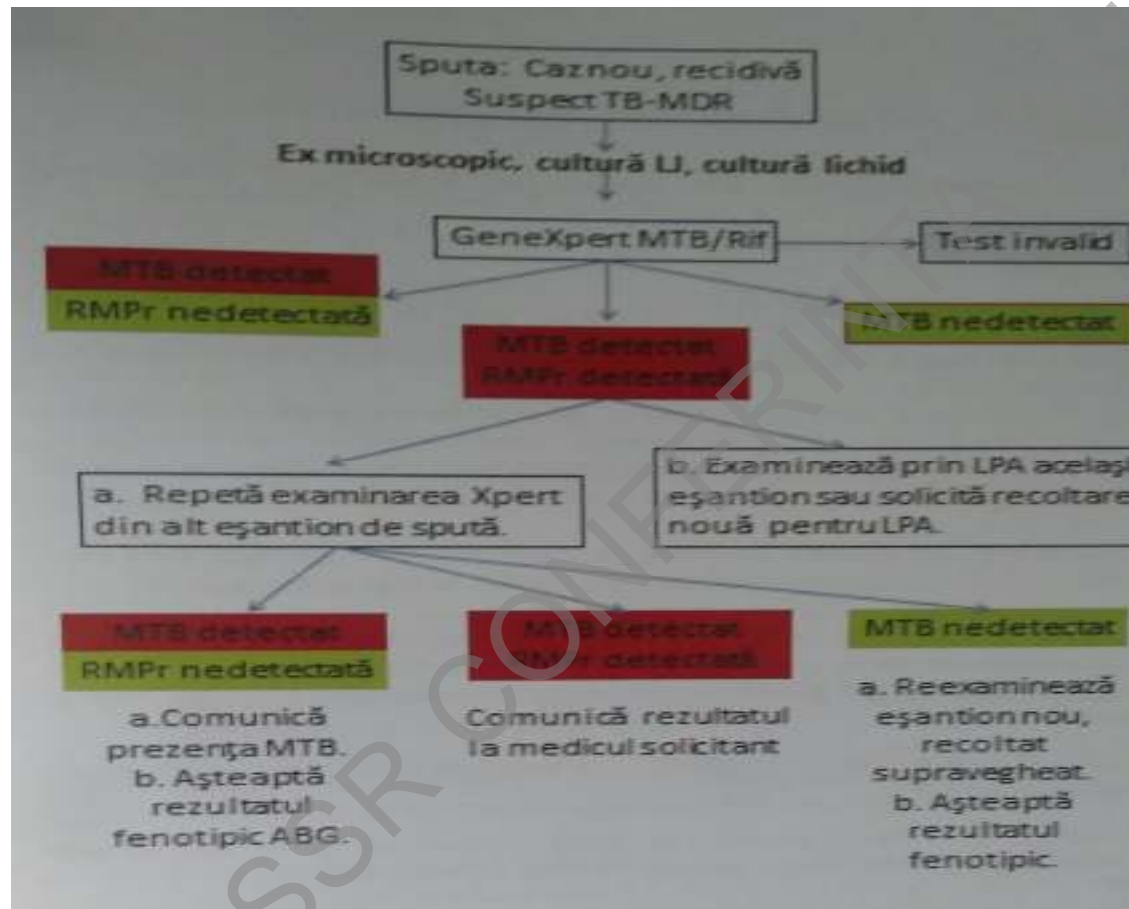
TESTUL GENEXPERT MTB/RIF



- depistarea rapidă a cazurilor de tuberculoză, ca metodă de screening pentru persoanele cu simptome clinice caracteristice tuberculozei;
- permite depistarea simultană și rapidă a rezistenței la rifampicină (prin mutații în gena *rpoβ*);
- primerii (secvențe de ADN) conținuți amplifică porțiunea “core” de 81 perechi de baze a genei *rpoβ*, având capacitatea să facă distincție între secvențele de tip sălbatic (fără mutații) și secvențele cu mutații din această regiune;
- rezultatele cu rezistență la RIF sunt disponibile în numai 2 ore (de la prelucrarea probei);
- testul se bazează pe multiplex, PCR în timp real, pentru a detecta și a diagnostica *M. tuberculosis*.

Cepheid Xpert MTB/RIF





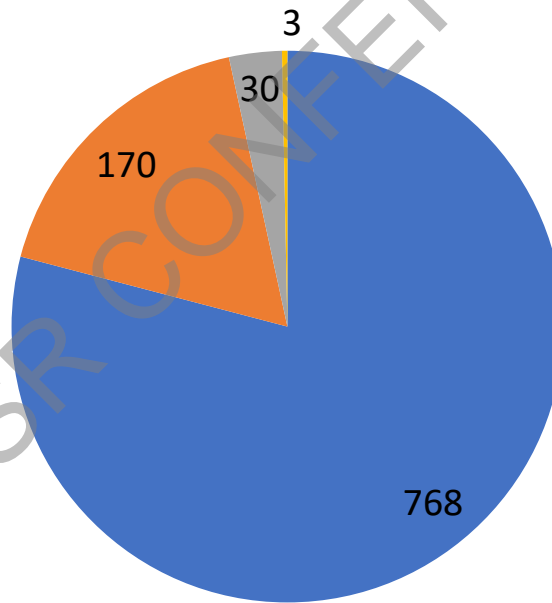
ALGORITMUL PENTRU SISTEMUL GENEXPERT MTB/RIF – GHIDUL NAȚIONAL PENTRU REȚEAUA LABORATOARELOR TB, BUCUREȘTI 2017

REZULTATE ȘI DISCUȚII

- Dotarea laboratorului cu aparatură performantă pentru teste genetice:
 - 2012 – LPA (GenoType-HAIN),
 - 2015 – RTPCR (GeneXpert MTB-RIF-CEPHEID)
- 971 probe lucrate în sistemul GeneXpert în perioada ianuarie 2016 – decembrie 2017:
- 768 complex MTB NEDETECTAT;
- 170 complex MTB DETECTAT – REZISTENȚĂ RIF NEDETECTATĂ;
- 33 complex MTB DETECTAT – REZISTENȚĂ RIF DETECTATĂ.
- Probele cu complexul MTB detectat au fost prelucrate prin metoda clasică de testare a sensibilității la tuberculostaticile de linia I.
- La cele 170 probe cu rezistență RIF nedetectată, antibiograma a confirmat sensibilitatea la RIF.
- Din cele 33 probe cu rezistență RIF detectată, prin antibiogramă au fost confirmate 30, iar 3 probe nu au manifestat rezistență la RIF.

REPREZENTAREA GRAFICĂ A REZULTATELOR OBTINUTE

- MTB NEDETECTAT
- MTB DETECTAT – REZISTENȚĂ RIF NEDETECTATĂ;
- MTB DETECTAT – REZISTENȚĂ RIF DETECTATĂ
- REZISTENȚĂ RIF NEDETECTATĂ PRIN AB



REZULTATE ȘI DISCUȚII

- Asigurarea calității:
 - constituie parte integrată în activitatea laboratorului;
 - este în responsabilitatea tuturor celor care lucrează în laborator;
 - monitorizarea și analizarea indicatorilor de calitate.
- Limitările metodei:
 - calitatea rezultatelor depinde de recoltarea corectă a probei, mânuirea și păstrarea ei;
 - rezultatul pozitiv nu indică neapărat *M. tuberculosis* viabil; este doar un test prezumptiv pentru prezența *M. tuberculosis* și a rezistenței la rifampicină;
 - rezultatul poate fi afectat de terapie anti-TB precedentă, sau terapie cu efect asupra micobacteriilor;
 - fiind un test bazat pe detectarea ADN-ului *M. tuberculosis*, se adresează doar cazurilor noi de TB.

CONCLUZII

- Metodele de diagnostic fenotipic și molecular, utilizate în studiu, sunt standardizate complementare, reproductibile și cu rezultate de încredere.
- Testele moleculare nu înlocuiesc testarea fenotipică, ci doar o completează cu un rezultat preliminar.
- Metodele moleculare aplicate direct probelor biologice expun personalul de laborator la risc mai mic de infecție decât metodele indirecte, care presupun testare de culturi.
- Este important să testăm molecular sensibilitatea micobacteriilor pentru a scurta timpul de diagnostic și a urgenta decizia terapeutică cu inițierea imediată a tratamentului specific țintit.
- Se previne astfel selectarea de noi rezistențe și este stopată diseminarea micobacteriilor rezistente.
- Metodele de hibridizare sunt considerate standard internațional, fără a renunța la cultivarea în mediul solid și antibiogramă convențională.

MULȚUMIRI ECHIPEI DE LABORATOR!

MULȚUMIRI PENTRU ATENȚIA ACORDATĂ!

OBBCSSR CONFERINȚA 2018