

Nowoczesna diagnostyka gruźlicy i innych zakażeń układu oddechowego

Ewa Augustynowicz-Kopeć

Zakład Mikrobiologii
Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc
Warszawa



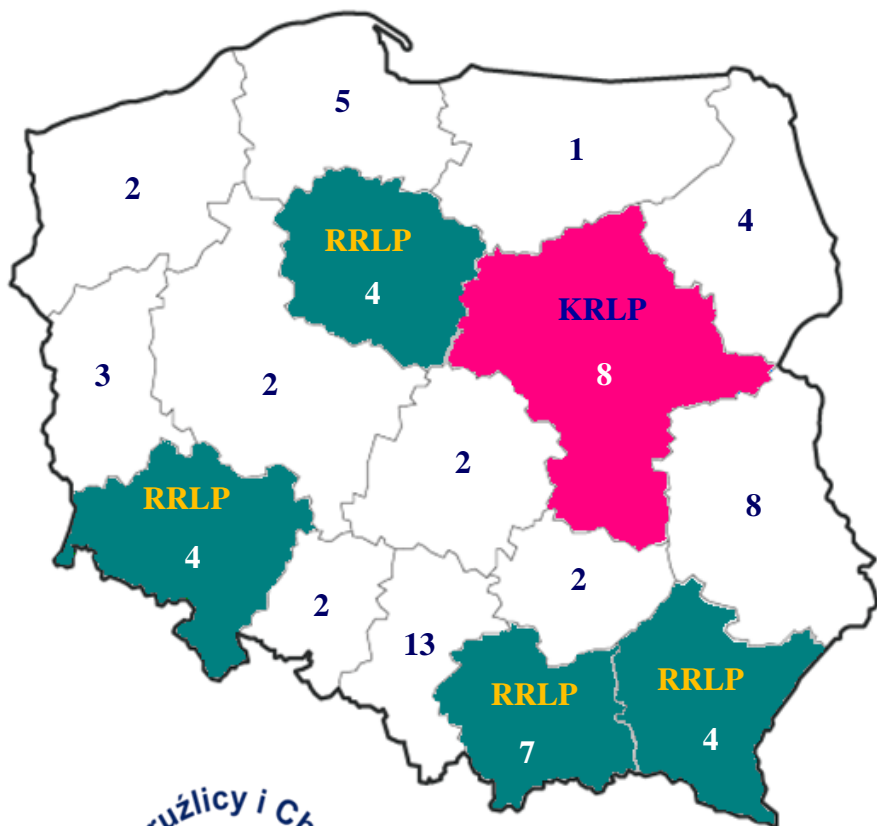
ROLA LABORATORIÓW MIKROBIOLOGICZNYCH W DIAGNOZOWANIU CHORYCH NA GRUŻLICĘ

Metody mikrobiologiczne na wszystkich etapach diagnostyki chorego są złotym standardem

- **prątkowanie chorego** – czas i intensywność prątkowania
- **jak leczyć** wskazują jakie leki należy zastosować do leczenia (test lekowrażliwości)
- potwierdzają odprątkowanie chorego – **testy mikrobiologiczne**
- **testy molekularne** umożliwiają przeprowadzenie dochodzeń do źródła zakażenia i określają częstość transmisji zakażenia w skali kraju



LABORATORIA PRĄTKA W POLSCE I ICH STRUKTURA



Zakres badań ośrodków laboratoryjnych

I rzędu (AFB)	0	0%
II rzędu (AFB, hodowla)	37	52%
III rzędu (AFB, hodowla, DST)	34	48%

Łącznie w 2016 roku – 71 laboratoriów TB



WYMAGANIA STAWIANE LABORATORIOM PRĄTKA ?

1. potwierdzenia metodami mikrobiologicznymi podejrzenia klinicznego
2. wykonania badania w najkrótszym czasie

wstępną diagnostykę

należy zakończyć **po 2 dniach** (bakterioskopia i badanie genetyczne)

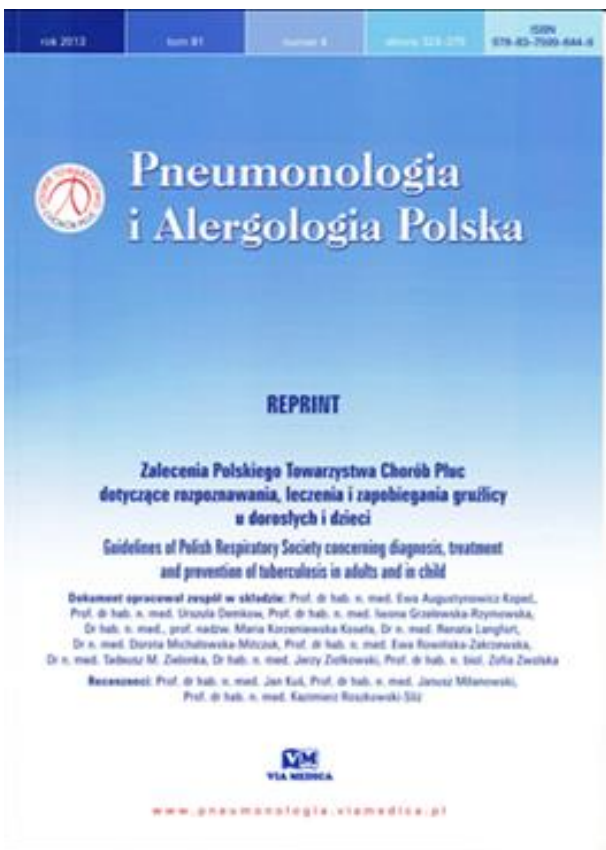


pełną diagnostykę

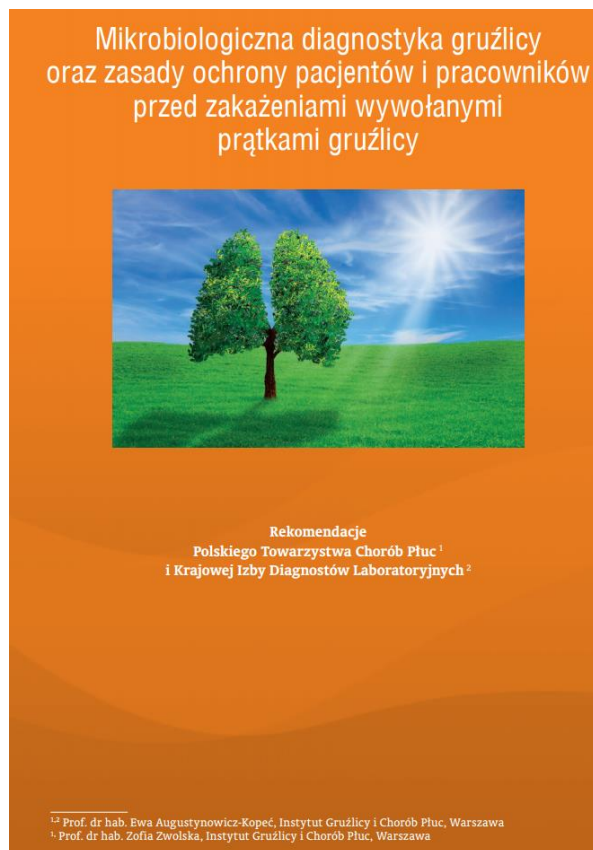
do 21 dni identyfikacja gatunkowa a **do 30 dni** test lekooporności



REKOMENDACJE



2013 rok



2015 rok





Szybka identyfikacja chorego z TB



Diagnostyka TB

Extra-pulmonary TB



Materiały płucne

Plwocina
Wydzielina oskrzelowa
Popłuczyny oskrzelowe
BAL
Popłuczyny żołądkowe

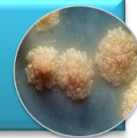
Materiały pozapłucne

Płyn mózgowo-rdzeniowy
Płyn z opłucnej
Płyn z otrzewnej
Płyn z osierdzia
Węzły chłonne
Tkanki
Biopsje
Mocz

Bakterioskopia



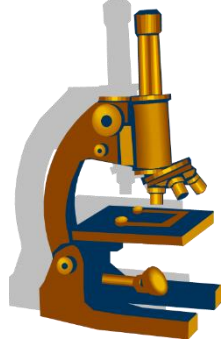
Hodowla



Badania genetyczne



Materiały histopatologiczne



- Metoda specyficzna , mało czuła ,50-70% w przypadku gruźlicy płucnej

Chory AFB (+) jest 4-20 razy bardziej zakaźny

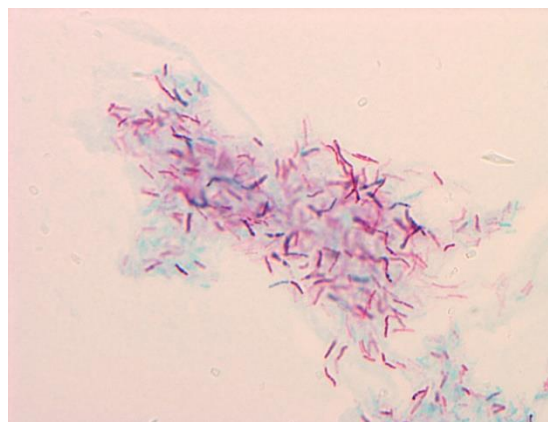
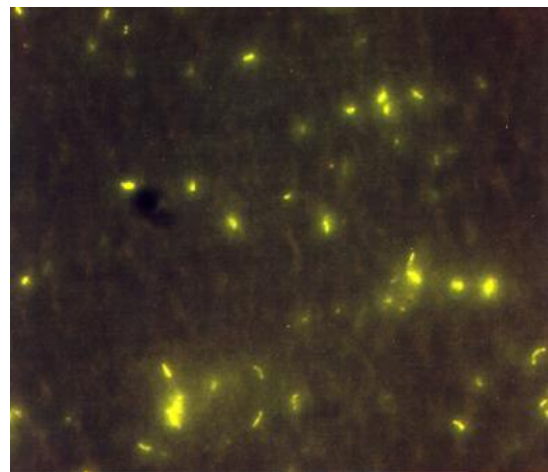
przy dodatnim rozmazie należy wykonać badanie genetyczne

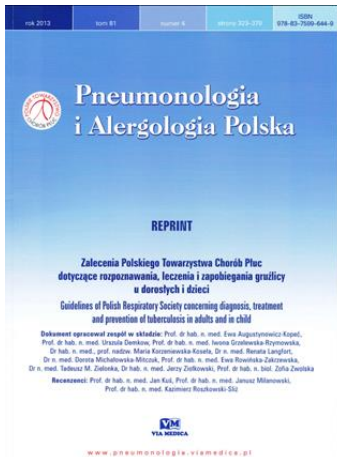
AFB (-)

nie świadczy o braku prątkowania mała ilość bakterii potwierdzona hodowlą

Chorzy HIV + postaci gruźlicy skąpopratkowe

wg World Health Organization (2012) Fact Sheet No. 104: Tuberculosis. Geneva: WHO





ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ZDROWIA ¹⁾

z dnia 25 marca 2014 r.

w sprawie biologicznych czynników chorobotwórczych podlegających zgłoszeniu, wzorów formularzy zgłoszeń dodatkich wyników badań w kierunku biologicznych czynników chorobotwórczych oraz okoliczności dokonywania zgłoszeń

Załącznik nr 1 Wykaz czynników chorobotwórczych podlegających zgłoszeniu

24	<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>	<p>– wykrycie prątków należących do kompleksu <i>Mycobacterium tuberculosis</i> w płwocinie lub innym materiale klinicznym pobranym z dróg oddechowych chorego – preparat bezpośredni (gruźlica w okresie prątkowania)</p> <p>– preparat bezpośredni i wykrycie w materiale klinicznym</p>
		<p>kwasu nukleinowego prątków należących do kompleksu <i>Mycobacterium tuberculosis</i></p> <p>– izolacja z materiału klinicznego prątków należących do kompleksu <i>Mycobacterium tuberculosis</i></p> <p>– wykrycie wielolekooporności typu MDR prątków należących do kompleksu <i>Mycobacterium tuberculosis</i></p>

Pieczęć laboratorium

ZLB-2
Zgłoszenie dodatkiego wyniku badania w kierunku gruźlicy¹⁾

Adresaci:
Państwowy Powiatowy Inspektor Sanitarny
w

.....
..
lub nazwa innego podmiotu²⁾
.....
.....

Resortowy kod identyfikacyjny laboratorium³⁾

Część I. Numer księgi rejestrowej

Część II. TERYT siedziby

Część III. Podmiot tworzący

Część VIII. Specjalność komórki organizacyjnej⁴⁾

Objaśnienia:

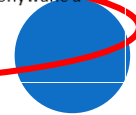
¹⁾ Zgłoszenia dodatkiego wyniku badania w kierunku gruźlicy należy dokonać w ciągu 24 godzin od momentu uzyskania tego wyniku, zgodnie z art. 29 ust. 1 pkt 1 ustawy

z dnia 5 grudnia 2008 r. o zapobieganiu oraz zwalczaniu zakażeń i chorób zakaźnych u ludzi (Dz. U. z 2013 r. poz. 947).

²⁾ Należy wpisać właściwy podmiot, o którym mowa w § 4 rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 25 marca 2014 r. w sprawie biologicznych czynników chorobotwórczych podlegających zgłoszeniu, wzorów formularzy zgłoszeń dodatkich wyników badań w kierunku biologicznych czynników chorobotwórczych oraz okoliczności dokonywania zgłoszeń (Dz. U. poz. 459).

³⁾ Laboratoria wypełniają zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 17 maja 2012 r. w sprawie systemu resortowych kodów identyfikacyjnych oraz szczegółowego sposobu ich nadawania (Dz. U. poz. 594).

⁴⁾ Badanie molekularne w kierunku prątków gruźlicy jest wykonywane u chorego z dodatnim wynikiem preparatu bezpośredniego.

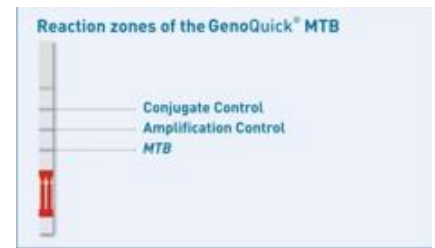


BEZPOŚREDNIE WYKRYWANIE M.TBC W MATERIAŁACH KLINICZNYCH

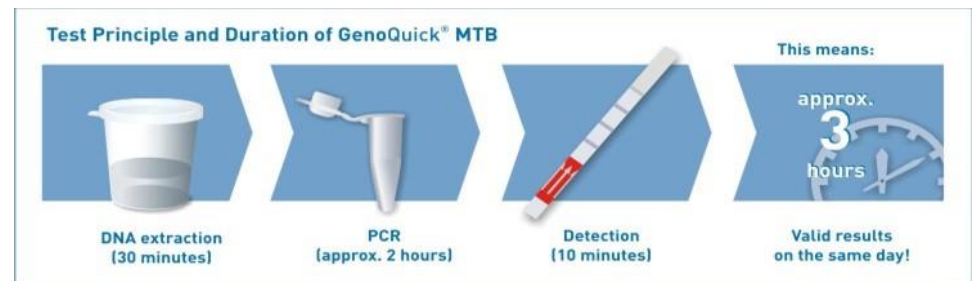
- Pozwala skrócić czas do 48h vs tygodnie wymagane do uzyskania hodowli
- Pozytywny wynik wskazuje na obecność MTBC
- Nie odróżnia żywych i martwych prątków
- wynikiem ujemnym, nie musi oznaczać braku MTBC
- -**hamowanie amplifikacji**
- - **ilość kom. prątków poniżej granicy wykrywalność**



TEST GENOQUICK® MTB



- Umożliwia wykrycie kompleksu *M. tuberculosis* z materiałów klinicznych przy **podejrzeniu gruźlicy płucnej jak i pozapłucnej**
- Test GenoQuick® MTB jest oparty na technologii PCR i GenoQuick®
- Procedura testowa : Ekstrakcja DNA, amplifikacji DNA, hybrydyzacji ampliconów ze specyficznymi sondami i wykrycie kompleksu sonda-amplicon
- Czas trwania procedury badawczej zajmuje tylko ok. 3 godziny.



Zalety GenoQuick® MTB:

- Wysoka specyficzność i czułość
- Szybka procedura 3 godziny.
- Kontrole wewnętrzne



TESTY GENETYCZNE

- Najnowsze testy molekularne są bardzo proste w wykonaniu
- nie wymagają spełniania kryteriów laboratorium molekularnego
- Czulość zależna o wyniku AFB i Hodowli
- Dodatni wynik 95-100% w przypadku pozytywnych AFB i hodowli
- 40-60% ww przypadku ujemnych wyników AFB i hodowli



JAKIE SĄ KORZYŚCI Z BADAŃ MOLEKULARNYCH?

- **Szybkość uzyskania wyniku** - bezpośrednio z materiału od chorego , szybka identyfikacją szczepu prątków
- **włączenie natychmiastowego leczenia przeciwpątkowego** , izolację chorych ,zapobieganie transmisji, badanie kontaktów
- Informacja w postaciach skąpopątkowych (gruźlica pozapłucna , u dzieci) w sytuacji kiedy **konwencjonalne testy są ujemne** –np.z AFB (-) i hodowlą
- Umożliwiają diagnostykę chorego z podejrzeniem TB w sytuacji , **materiał został wysłany tylko na badanie hist pat**





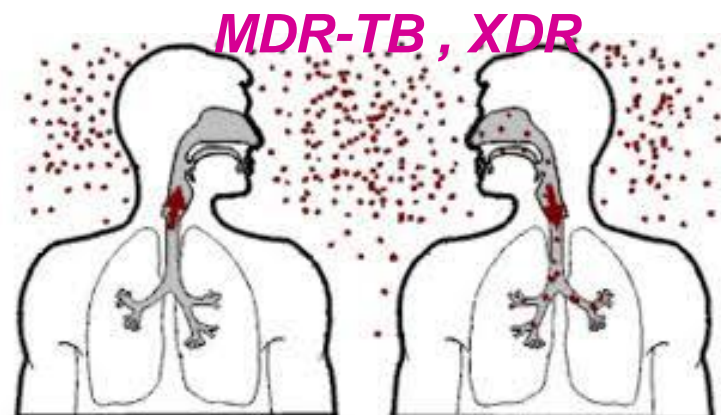
Szybka identyfikacja chorego z gruźlicą oporną na leki (MDR-TB)

Przerwanie łańcucha transmisji



GRUŹLICA LEKOOPORNA

W 2014 roku gruźlicę **MDR** stwierdzono u około **480 000 chorych - 5% zachorowań TB**

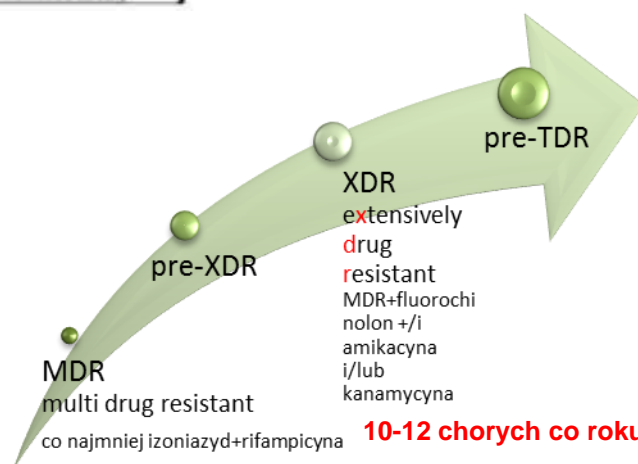


110 000 chorych na MDR-TB rozpoczęło leczenie

Zmarło 220 000 chorych 45%

75% MDR/RR-TB:

- Europa
- Afryka Południowa
- Indie
- Chiny



TDR

totally drug resistant
wszystkie leki podstawowe +
wszystkie leki z 6 grup
dodatkowych

W Polsce do chwili obecnej nie zarejestrowano

Co roku 30 – 40 chorych w Polsce

METODY GENETYCZNE – TESTY KOMERCYJNE

GeneXpert MTB/RIF



- obecności materiału genetycznego *M.tbc* + identyfikacja mutacji w genie *rpoB* związanych z opornością na ryfampicynę
- Wysoka czułość wykrywania *M.tbc*
- Nie wymaga dodatkowego sprzętu

SENSITIVITY: 98.0%
SPECIFICITY: 98.3%*

		AFB-		AFB+
		Culture POSITIVE	Culture NEGATIVE	Culture POSITIVE
Xpert MTB/RIF	MTB DETECTED	70	3	275
	MTB NOT DETECTED	7	171	0

* The sensitivity of the Xpert MTB/RIF assay in patient samples classified as smear negative, culture positive (S-C+) is 90.9% (70/77) and 100% (275/275) for those classified (S+C+).

mutacje *rpoB* (Leu533Pro, Leu511Pro, Asp516Tyr i His526Leu) –częstość występowania w populacji europejskich chorych na TB - 10 %

Oporność na RMP nie zawsze surogatem oporność MDR

Potrzeba szybkich testów na INH



ULTRA XPERT MTB / RIF (XPERT) (ULTRA) TEST / XPERT MTB,

- Poprawa
- **Wykrywalności *Mycobacterium tuberculosis* 133 CFU / ml**
- czułość 60 % w rozmazów-ujemne TB.
- Fałszywa identyfikacja RIF-R bliskoznacznych mutantów rpoB jako RIF-R.
potrzebne jest 100 CFU / ml LOD kultury płynnej i poprawy wykrywania RIF-R
- Nowy test TB molekularna z równoważnikiem LOD do 10
- ULTRA
- Technologia High Resolution rozróżnia 16 różne cele
- > ilość oczyszczonego DNA dostarczanego do reakcji PCR
- **Cztery nowo zaprojektowane sondy wykrywające mutacje w genie *rpoB***
- **Wykrywalność 10 CFU / ml**
- **Rekomendowany dla AFB (-)**



Xpert MTB RIF Ultra and Xpert XDR

Key Product Specifications



Xpert MTB RIF Ultra



Xpert XDR

Specification	Target
Time to result	85 minutes following 15 minute incubation
Hands on time	<2 mins
Sample type	Sputum, induced sputum, sediment
Targets	MTBC (IS6110, IS1081), RIF (rpoB)
Analytical Performance: Inclusivity (Reactivity)	MTB Complex
Clinical Performance: Sensitivity (MTB)	≥98% (Smear+, Culture+)
Clinical Performance: Sensitivity (Rif-resistance)	≥95% (Smear-, Culture+)
Clinical Performance: Specificity (MTB)	≥98%
Clinical Performance: Specificity (Rif-resistance)	≥98%
New Hardware	Not needed, users can use existing instrumentation

Specification	Target
Time to result	90 minutes following 15 minute incubation
Hands on time	<2 mins
Sample type	Sputum, induced sputum, sediment
Targets	MTBC (inhA promoter), INH, FQ, AMK, KAN
Analytical Performance and Clinical Performance characteristics to be determined	

Availability TBD
Alpha Studies in progress

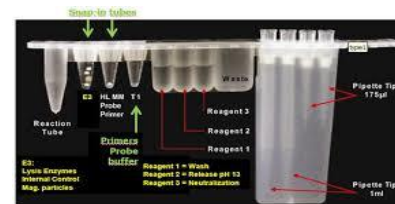


BD MAX

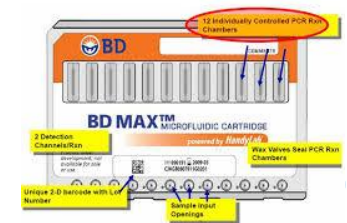
- BD MAX wysoce zintegrowany, zautomatyzowane urządzenie do izolacji, amplifikacji w czasie rzeczywistym i wykrywanie kwasów nukleinowych *M.tbc*
- Analiza maksymalnie 24 próbek w ciągu około 2,5 godziny.
- System otwarty pozwalający na wykorzystanie własnych starterów i sond
- **Jednoczesne wykrywanie oporności na RMP i INH**
- Czułość 91,9% (86.7-100%), swoistość 97,9% (95.8-100%), PPV95,8% i NPV 95,9%
- Przewidywana premiera na rynku III kwartał 2017



Aparat BD MAX



Kaseta ekstrakcyjna



Kaseta amplifikacyjna

METODY GENETYCZNE – TESTY KOMERCYJNE

Lekooporności *Mycobacterium tuberculosis* complex z uzyskanej hodowli

✓ GenoType MTBDRplus

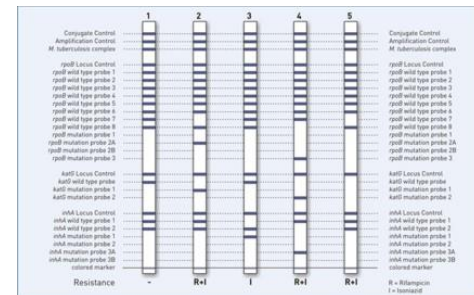
rifampicyna (rpoB) i *izoniazyd (katG i inhA)*

✓ GenoType MTBDRsl

fluorochinolony (gyrA), aminoglikozydy (rrs), etambutol (embB)

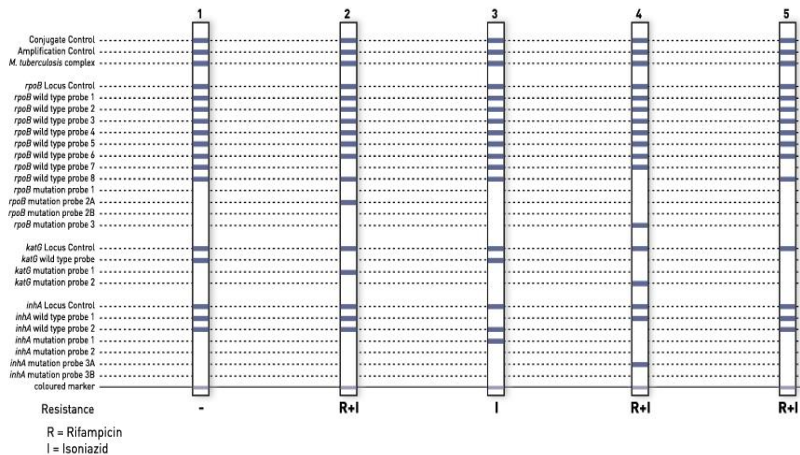
✓ GenoType MTBDRsl ver.2

fluorochinolony (gyrA i gyrB), aminoglikozydy (rrs) i kanamycynę (eis)



Test Genotype MTBDRplus (Hain Lifescience)

wykrywający oporność na rifampicynę i izoniazyd



Mutacje w genie *rpoB* wykrywane testem MTBDRplus wśród szczepów opornych na RMP.

Brak prążka dla typu dzikiego	Analiza kodonu	Pojawienie się prążków mutacji	Mutacja
<i>rpoB</i> WT1	505-509		F505L T508A S509T
<i>rpoB</i> WT2	510-513		E510H L511P*
<i>rpoB</i> WT2/WT3	510-517		Q513L* Q513P del514-516
<i>rpoB</i> WT3/WT4	513-519	<i>rpoB</i> MUT1	D516V D516Y del515
<i>rpoB</i> WT4/WT5	516-522		del518* N518I
<i>rpoB</i> WT5/WT6	518-525		S522L S522Q
<i>rpoB</i> WT7	526-529	<i>rpoB</i> MUT2A <i>rpoB</i> MUT2B	H526Y H526D H526R H526P* H526Q* H526N H526L H526S H526C
<i>rpoB</i> WT8	530-533	<i>rpoB</i> MUT3	S531L S531Q* S531W L533P

MIC RMP >32 µg/ml

Mutacje w genach *katG* i *inhA* wykrywane testem MTBDRplus wśród szczepów opornych na INH.

Brak prążka dla typu dzikiego	Analiza kodonu	Pojawienie się prążków mutacji	Mutacja
<i>katG</i> WT	315	<i>katG</i> MUT1 <i>katG</i> MUT2	S315T1 S315T2

Mutacje warunkujące wysokie miano oporności na INH >4 µg/ml

Brak prążka dla typu dzikiego	Zanalizowane pozycje kwasów nukleinowych	Pojawienie się prążków mutacji	Mutacja
<i>inhA</i> WT1	-15	<i>inhA</i> MUT1	C-15T
<i>inhA</i> WT2	-16	<i>inhA</i> MUT2	A-16G
	-8	<i>inhA</i> MUT3A <i>inhA</i> MUT3B	T-8C T-8A

Mutacje warunkujące niskie miano oporności na INH 0,1-2,0 µg/ml

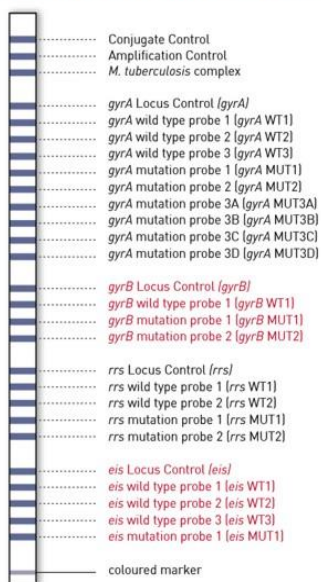
- Mutacje w kodonach 526 i 531 skutkują wysokim poziomem oporności na RMP.
- Mutacje w pozostałych regionach genu *rpoB* warunkują średni lub niski poziom tej oporności.

Test Genotype MTBDRs/ ver. 2 .0 (Hain Lifescience)

wykrywający oporność na fluorochinolony i aminoglikozydy/cykliczne peptydy

Mutacje w genach *gyrA* i *gyrB* wykrywane testem MTBDRs/ warunkujące oporność na fluorochinolony np. ofloksacynę, moksyflokscynę.

GenoType MTBDRs/ VER 2.0



Brak paska dla typu dzikiego	Pojawienie się pasków mutacji	Mutacja	Oporność fenotypowa
<i>gyrA</i> WT1	-	G88A G88C	
<i>gyrA</i> WT2	<i>gyrA</i> MUT1 <i>gyrA</i> MUT2	A90V S91P	FLQ
<i>gyrA</i> WT3	<i>gyrA</i> MUT3A <i>gyrA</i> MUT3B	D94A D94N	
	<i>gyrA</i> MUT3C <i>gyrA</i> MUT3D	D94Y D94G D94H ¹⁾	

Brak paska dla typu dzikiego	Pojawienie się pasków mutacji	Mutacja ¹⁾	Oporność fenotypowa
<i>gyrB</i> WT	<i>gyrB</i> MUT1 <i>gyrB</i> MUT2	N538D E540V	FLQ

Mutacje w genie *rrs* wykrywane testem MTBDRs/ warunkujące oporność na kanamycynę, amikacynę, kapreomycynę i wiomycynę.

Brak paska dla typu dzikiego	Zanalizowane pozycje kwasów	Pojawienie się pasków mutacji	Mutacja	Oporność fenotypowa			
<i>rrs</i> WT1	1401	<i>rrs</i> MUT1	A1401G	KAN	AMK	CAP	
	1402	-	C1402T	KAN		CAP	VIO
<i>rrs</i> WT2	1484	<i>rrs</i> MUT2	G1484T	KAN	AMK	CAP	VIO

KAN = kanamycyna, AMK = amikacyna, CAP = kapreomycyna, VIO = wiomycyna,

Mutacje w genie *eis* wykrywane testem MTBDRs/ warunkujące niski poziom oporności na kanamycynę.

Brak paska dla typu dzikiego	Pojawienie się pasków mutacji	Mutacja	Oporność fenotypowa
<i>eis</i> WT1	-	G-37T	
	<i>eis</i> MUT1	C-14T	niski poziom KAN
<i>eis</i> WT2	-	C-12T	
	-	G-10A	
<i>eis</i> WT3	-	C-2A	

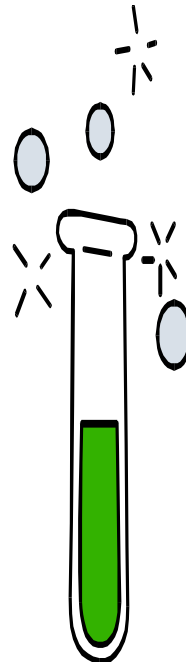


METODY IDENTYFIKACJI MYKOBAKTERII

- Test niacynowy

- ***M.tuberculosis***

- *M.bovis*
- *M.bovis BCG*
- *M.africanum,*
- *M.microti*
- MOTT



- Test immunochromatograficzny

M.Tbc *M.tuberculosis, M.bovis, M.bovis BCG, M.africanum, M.microti*

MOTT *wg grup Runyona*

- I *M.kansasii*
- II *M.xenopi*
- III *M.avium, M.intracellulare*
- IV *M.fortuitum M.chelonae*



GENO TYPE



- ✓ **GenoType MTBC** - identyfikacja z uzyskanej **hodowli** prątków należących do *Mycobacterium tuberculosis* complex (*M.africanum*, *M.bovis* BCG, *M.bovis* ssp *bovis*., *M.bovis* ssp *caprae*, *M.microtii* , *M.tuberculosis*, *M.canettii*). **Czas badania – 5 godzin**
- ✓ **GenoType Mycobacterium CM** - identyfikacja prątków atypowych z uzyskanej **hodowli** (*M.xenopi*, *M.avium*, *M. chelonae*, *M.abscessus*, *M.fortuitum*, *M.gordoniae*, *M.intracellulare*, *M.scrofulaceum*, *M.interjectum*, *M.kansasii*, *M.malmoense*, *M. peregrinum*, *M.marinum*, *M.ulcerans* oraz *M. tuberculosis* complex). **Czas badania – 5 godzin**
- ✓ **GenoType Mycobacterium AS** - identyfikacja prątków atypowych z uzyskanej **hodowli** (*M.simiae*, *M.mucogenicum*, *M.goodii*, *M.celatum*, *M.smegmatis*, *M.genavense*, *M.lentiflavum*, *M.heckeshornense*, *M.szulgai*/*M.intermedium*, *M.phlei*, *M.haemophilum*, *M.kansasii*, *M.ulcerans*, *M.gastri*, *M.asiaticum*, *M.shimoidei*). **Czas badania – 5 godzin**



MYCOBACTERIE MOTT



- Rozpowszechnione w przyrodzie około 150 gat.
- Gatunki chorobotwórcze dla ludzi 25 gat. (częste →10)
- Drobnoustroje szeroko rozpowszechnione w środowisku
- Zbiornikach wodnych, wodzie wodociągowej, glebie
- *Clinical Tuberculosis, wyd. 5, red. Davies P.D.O., Gordon S.B., Davies G. 2014*



PRZYCZYNY WZROSTU ZACHOROWAŃ NA MYKOBAKTERIOZY

- Starzenie społeczeństw: ryzyko MB - wiek → 50 do 70 lat
-
- Więcej osób z zaburzeniami odporności → cukrzyca, sterydoterapia, leczenie biologiczne
- Więcej chorych na POChP → czynnik ryzyka MB
- Popularność pryszniczy → narażenie na aerozole wodne
- Lepsza wykrywalność MOTT → powszechność systemu MGIT 960, metody molekularne,



SPEKTRUM CHORÓB WYWOŁANYCH MOTT

- Mykobakteriozy płucne



M. malmoense



Mycobacterium avium

- Zapalenie węzłów chłonnych podżuchwowych, szyjnych oraz pachowych i pachwinowych **dotyczy zwykle dzieci do 8 lat**

- Zakażenia skóry i tkanki podskórnej (pourazowe)



Mycobacterium marinum



Mycobacterium abscessus

- Zakażenia uogólnione związane z głębokim upośledzeniem odpowiedzi komórkowej
- Zakażenia uogólnione związane z zaburzeniami wytwarzania lub funkcji cytokin IFN- γ -IL-12 stymulują aktywację makrofagów.

Medscape 2015



DROGI ZAKAŻENIA PRĄTKAMI NIEGRUŻLICZYMI

- Inhalacja aerozolu i pyłów zawierających MOTT
- Mikroaspiracje wody zanieczyszczonej MOTT z nosogardła do płuc
- Refluks żołądkowo- przełykowy i aspiracja połkniętych wcześniej MOTT
- Bezpośrednie przejście ze śluzówki nosogardzieli do naczyń limfatycznych (zap. węzłów chłonnych)
- Zakażenia skóry i tkanki podskórnej z wody, gleby, narzędzi medycznych
- saprofity występują w układzie oddechowym, przewodzie pokarmowym i układzie moczowym, w warunkach osłabionej odporności osobniczej, mogą stać źródłem zakażenia



Transmisja



- Transmisja z człowieka na człowieka może się zdarzyć

ale

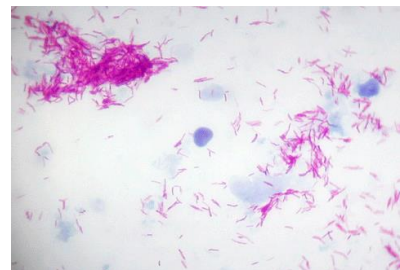


Jest to rzadkie wydarzenie



KRYTERIA ROZPOZNANIA MYKOBAKTERIOZY

PŁUC



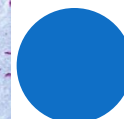
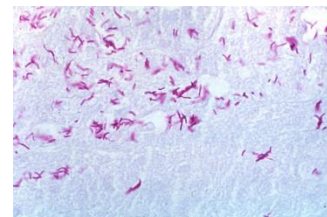
- muszą być spełnione oba kryteria kliniczne i jedno mikrobiologiczne.

Kryteria kliniczne:

- 1) objawy ze strony układu oddechowego, zmiany o charakterze guzków lub jam w RTG klatki piersiowej, lub wieloogniskowe rozstrzenie oskrzeli z wieloma drobnymi guzkami w TKWR
- 2) wykluczenie innych chorób

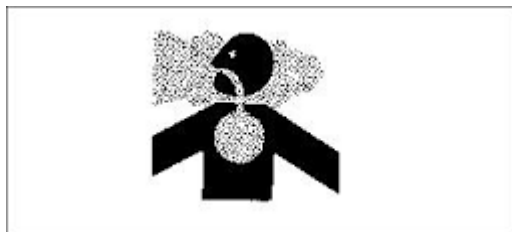
• Kryteria mikrobiologiczne:

- 1) dodatnie wyniki posiewów płwociny **przynajmniej z 2 oddzielnie pobranych** płwociny *jeśli wyniki tych badań nie są rozstrzygające, należy rozważyć powtórzenie badań bakterioskopowych i posiewów płwociny w kierunku prątków kwasoopornych*
- 2) dodatni wynik **przynajmniej jednego posiewu popłuczyn oskrzelowych** lub płynu z płukania oskrzelikowo-pęcherzykowego
- 3) **dodatni wynik badania histologicznego biopsjatu** (ziarniniaki i nacieki typowe dla zakażeń wywołanych przez prątki lub stwierdzenie obecności prątków kwasoopornych) **jednocześnie**
 - hodowla(+) materiału z przezoskrzelowej lub innej biopsji płuca,
 - hodowla(+) co najmniej 1 próbki płwociny lub popłuczyn oskrzelowych



MIKROBIOLOGICZNE KRYTERIA DIAGNOSTYCZNE WG ATS

- do analizy mikrobiologicznej powinny być wysłane co najmniej trzy materiały pochodzące z dróg oddechowych
- **okres pobierania próbek powinien wynosić do kilku tygodni**
- Krótkie przerwy między pobieraniem próbek stwarzają ryzyko interpretacji tymczasowej przypadkowej obecności MOTT w drogach oddechowych po ekspozycji chorego w środowisku

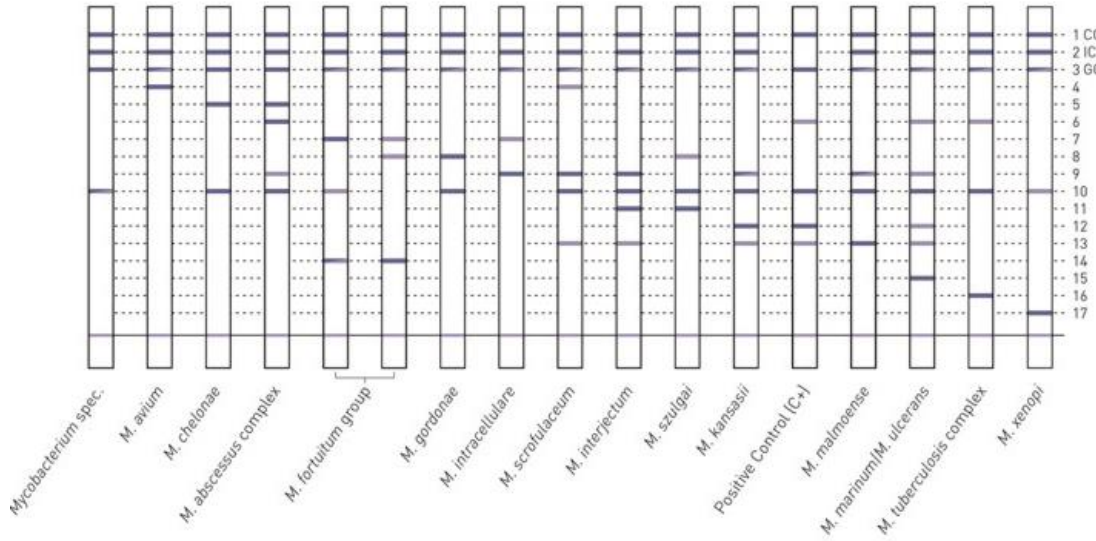


CZY IZOLOWANIE PRĄTKÓW MOTT Z PRÓBKI MATERIAŁU OD CHOREGO ZAWSZE WSKAZUJE NA MYKOBAKTERIOZĘ

- o spełnienie kryterium ATS i BTS jakim jest wielokrotne izolowanie tego samego gatunku prątka z próbek materiału klinicznego, przestaje uniwersalną zasadą.
- o Wyhodowany szczep MOTT często nie pochodzi z ogniska chorobowego, lecz z wody, której chory używał na przykład do porannej toalety przed wykrztuszeniem płwociny do badań.
- o szczep prątka wyhodowany nawet kilkakrotnie przypisze się błędnie choremu, zaprzestaje się dalszych badań diagnostycznych i rozpoczyna zbędne, drogie, długotrwałe (czasami do 2 lat) oraz obciążające leczenie.
- o niezbędna jest wiedza na temat występowania MOTT w szpitalu lub przychodni; należy również brać pod uwagę możliwość zanieczyszczenia wody wodociągowej w domu chorego.
- o jeżeli podejrzenie mykobakteriozy (po spełnieniu kryteriów mikrobiologicznych) wydaje się z klinicznego punktu widzenia mało prawdopodobne, to diagnostykę mikrobiologiczną powinno się przekazać do innego laboratorium.

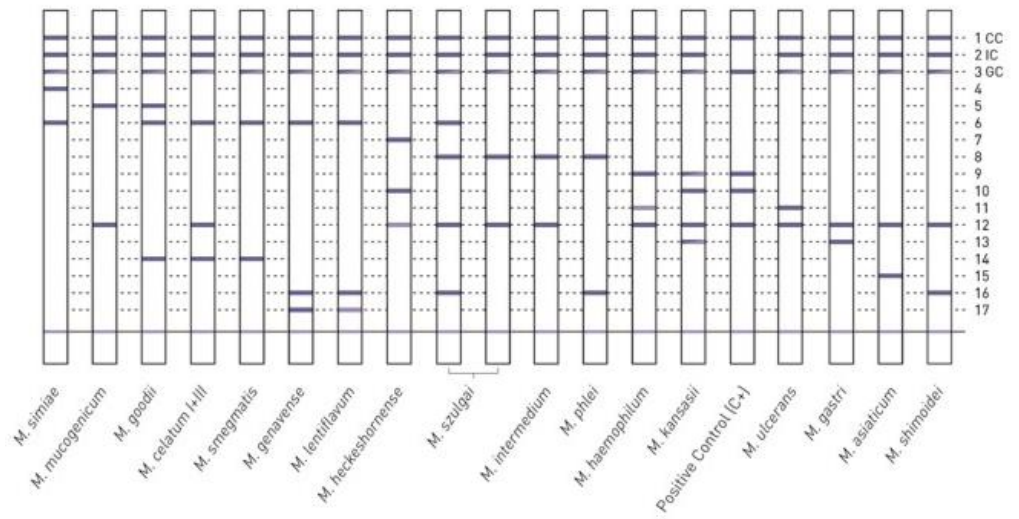


Testy genetyczne do identyfikacji prątków atypowych 5 h

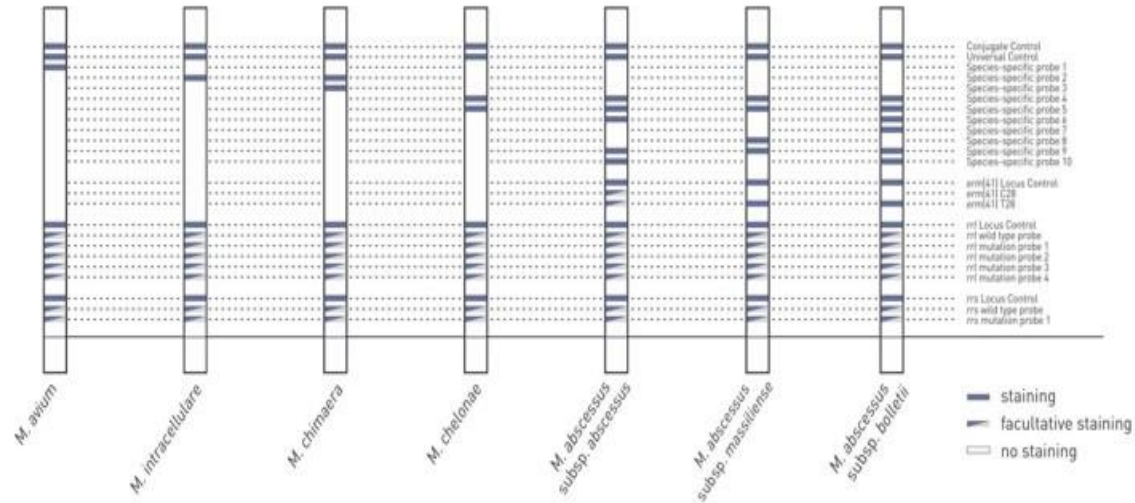


GenoType Mycobacterium CM

GenoType Mycobacterium AS



GenoType NTM-DR



identyfikacja *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.chimaera*,
M.chelonae i *M.abscessus* (3 podtypy)

wykrycie oporności na amoniglikozydy (gen *rrs*) i makrolidy
 (gen *rrl* i *emr*)

Mycobacterium chimaera

- ❑ wolno rosnący gatunek prątków atypowych wyróżniony z kompleksu *Mycobacterium avium* (MAC) w 2004 roku
- ❑ powiązana z infekcjami płuc u pacjentów z POCHP
- ❑ badania przeprowadzone w Stanach Zjednoczonych i Niemczech sugerują, że ***M. chimaera* jest mniej patogenny niż inne gatunki** w obrębie MAC, np. *M. intracellulare* i *M. avium*
- ❑ **naturalny rezerwuuar *M. chimaera* nie jest znany**, ale badania wykazały, że jest powszechnie wykrywana w środowisku wodnym i biofilmach.
- ❑ od 2011 zanotowano kilkanaście przypadków inwazyjnego zakażenia układu krążenia spowodowane przez *M. chimaera* (**chorzy po zabiegach kardiochirurgicznych** w Szwajcarii, Holandii, Niemczech i Wielkiej Brytanii). Czas obserwacji chorego – 4 lata
- ❑ Szwajcaria (6 przypadków – 2 chorych zmarło) zidentyfikowano obecność *M. chimaera* w aparatach służących do regulacji temperatury krwi w czasie krążenia pozaustrojowego

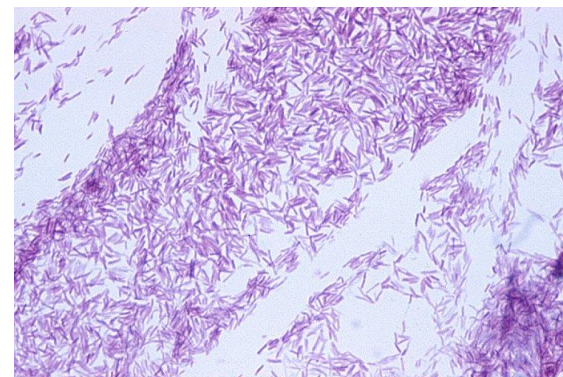
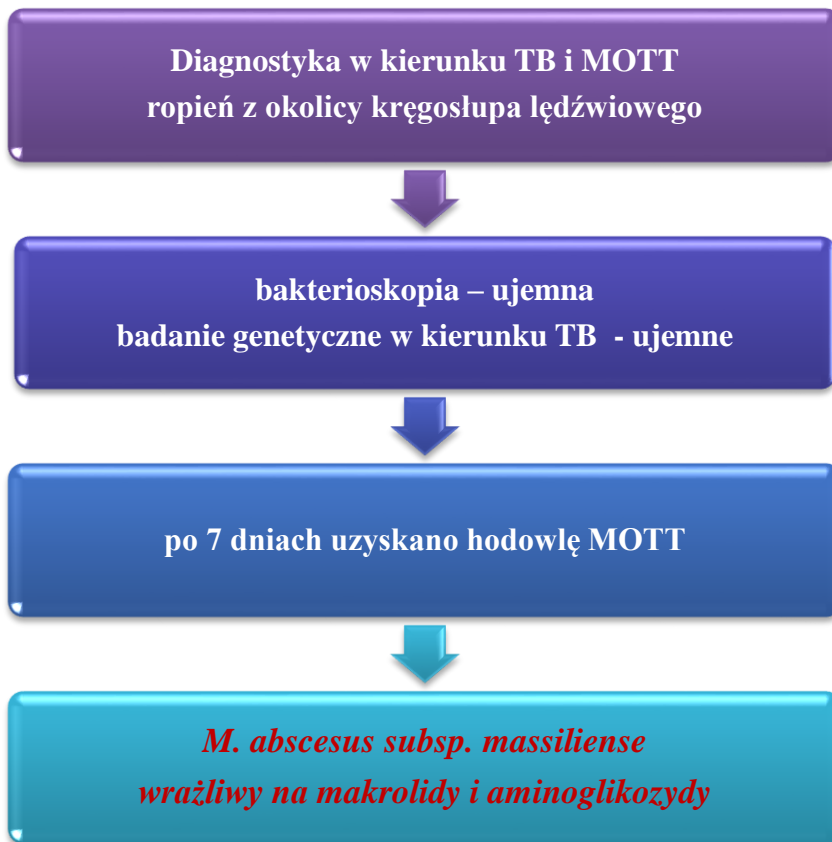
Mycobacterium abscessus

- ❑ *Mycobacterium abscessus* wszechobecne, szybko rosnące prątki znajdują się w wodzie, glebie i kurzu. Opisana po raz pierwszy przez Moore'a i Frerichs w 1953 r.
- ❑ *M. abscessus* jest uważany za **najbardziej chorobotwórczy szybko rosnący** gatunek prątków atypowych a zakażenia są trudne do wyleczenia
- ❑ Zakażenia – najczęściej układ oddechowy, skóra i zakażenia tkanek miękkich; również infekcje oka, ucha środkowego, zapalenie węzłów chłonnych, zapalenie stawów, zapalenie kości i szpiku, zapalenie wsierdzia
- ❑ 3 podgatunki
 - ❖ *Mycobacterium abscessus subsp. abscessus*
 - ❖ *Mycobacterium abscessus subsp. massiliense*
 - ❖ *Mycobacterium abscessus subsp. bolletii*

Charakteryzują się wysokim stopniem oporności, zróżnicowanie w obrębie podtypów – przykład klarytromycyna, lek z wyboru od 1990r:

- ❖ *Mycobacterium abscessus subsp. massiliense* –wrażliwy,
- ❖ *Mycobacterium abscessus subsp. bolletii* – oporny
- ❖ *Mycobacterium abscessus subsp. abscessus* – oporny

Zakażenie prątkami atypowymi u 64-letniej chorej ze zmianami po operacji w okolicach kręgosłupa



Zakażenie prątkami atypowymi u chorej po wszczepieniu zastawki



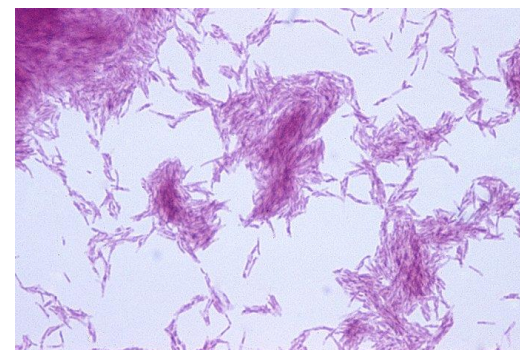
Chora po zabiegu wszczepienia zastawek – w krótkim czasie po zabiegu skoki gorączki

Pobrano krew w kierunku bakterii szybko rosnących i grzybów

Izolacja *M. fortuitum* na podłożu Bactec Mycosis IC/F

Wymiana zastawki na nową,

Po 8 miesiącach nawrót gorączki,
ponowna izolacja *M. fortuitum* z krwi



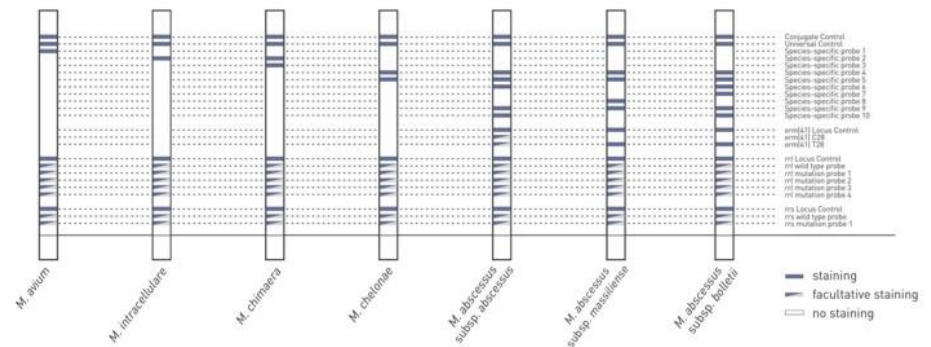
PODSUMOWANIE

1. Znalezienie czynnika sprawczego choroby jest procesem trudnym i wymaga ścisłej współpracy mikrobiologów z klinicystami
2. W ostatniej dekadzie metody szybkiej diagnostyki TB w tym testy oporności umożliwiły wczesne wykrycie chorego z TB i identyfikację lekoopornej gruźlicy
3. W odróżnieniu gatunków **zakażających człowieka** od gatunków występujących w **otoczeniu chorego** bardzo pomocne są molekularne badania środowiskowe tj. znajomość głównych gatunków *Mycobacterium* występujących na terenie danego szpitala.
4. Wiarygodność mikrobiologicznej diagnostyki **mykobakterozy** jest trwale zagrożona pomyłkami diagnostycznymi (prątki środowiskowe), a ich całkowita eliminacja nie wydaje się możliwa.



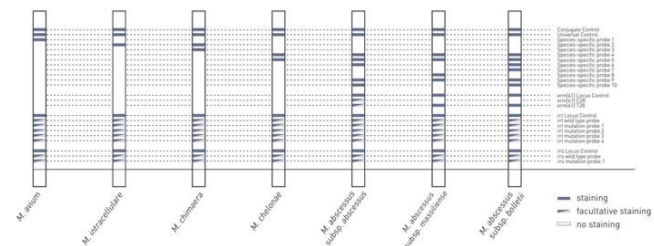
GENOTYPE NTM-DR

- Test GenoType NTM-DR umożliwia identyfikację *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.chimaera*, *M.chelonae* i *M.abscessus* (3 podtypy)
- Test GenoType NTM-DR umożliwia wykrycie oporności na **aminoglikozydy** (gen *rrs*) i **makrolidy** (gen *rml* i *emr*)
- Procedura : Ekstrakcja DNA, amplifikacji DNA, hybrydizacji amplikonów ze specyficznymi sondami i wykrycie kompleksu sonda- amplikon
- Czas trwania procedury badawczej zajmuje **ok. 5 godzin.**



MYCOBACTERIUM CHIMAERA

- Wolno rosnący gatunek prątków atypowych wyróżniony z kompleksu *Mycobacterium avium* (MAC) w 2004 roku
- *M. chimaera* została powiązana z infekcjami płuc u pacjentów z chorobami płuc, takie jak przewlekła obturacyjna choroba płuc.
- Badania przeprowadzone w Stanach Zjednoczonych i Niemczech sugerują, że *M. chimaera* jest bardziej patogenny niż inne gatunki w obrębie MAC, np. *M. intracellulare* i *M. avium*
- Naturalny rezerwuuar *M. chimaera* nie jest znany, ale badania wykazały, że jest powszechnie wykrywany w środowisku wodnym i biofilmach.
- Od 2011 zanotowano kilkanaście przypadków inwazyjnego zakażenia układu krążenia spowodowane przez *M. chimaera* (chorzy po zabiegach kardiochirurgicznych w Szwajcarii Holandii, Niemczech i Wielkiej Brytanii). Czas obserwacji chorego – 4 lata
- Szwajcaria (6 przypadków – 2 chorych zmarło) zidentyfikowano obecność *M. chimaera* w aparatach służy do regulacji temperatury krwi w czasie krążenia pozaustrojowego, wyizolowano z próbek powietrza pobranych w sali operacyjnej oraz w wodzie z poidełek w szpitalu

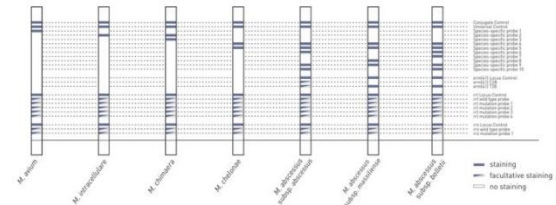


MYCOBACTERIUM ABSCESSUS

- *Mycobacterium abscessus* wszechobecne, szybko rosnące prątki znajdują się w wodzie, glebie i kurzu. Opisana po raz pierwszy przez Moore'a i Frerichs w 1953 r.
- *M. abscessus* jest uważany za najbardziej chorobotwórczy szybko rosnący gatunek prątków atypowych a zakażenia są trudne do wyleczenia
- **Zakażenia** – najczęściej układ oddechowy, skóra i zakażenia tkanek miękkich; również infekcje oka, ucha środkowego, zapalenie węzłów chłonnych, zapalenie stawów, zapalenie kości i szpiku, zapalenie wsierdzia

- **3 podgatunki**

- *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus*
- *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*
- *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*



- Charakteryzują się wysokim stopniem oporności, zróżnicowanie w obrębie podtypów

np. klarytromycyna (lek z wyboru od 1990r.) *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* –wrażliwy, ***Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* i *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* - oporny**



GRUŹLICA LEKOOPORNA



World Health Organization

W 2014 roku gruźlicę **MDR** stwierdzono u około **480 000 chorych - 5% zachorowań TB**

110 000

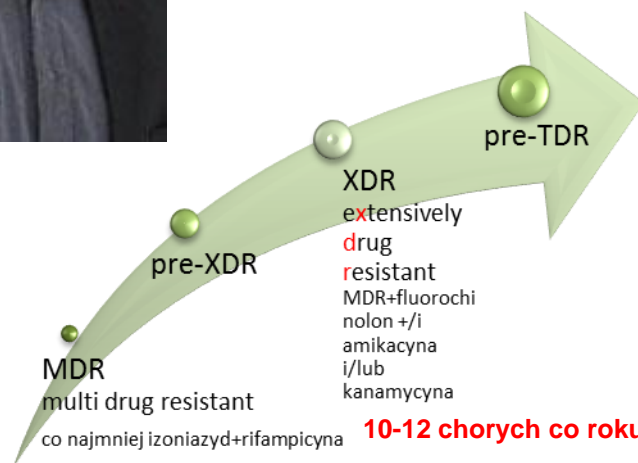
chorych na MDR-TB rozpoczęło leczenie

Zmarło 220 000 chorych 45%



75% MDR/RR-TB:

- Europa
- Afryka Południowa
- Indie
- Chiny



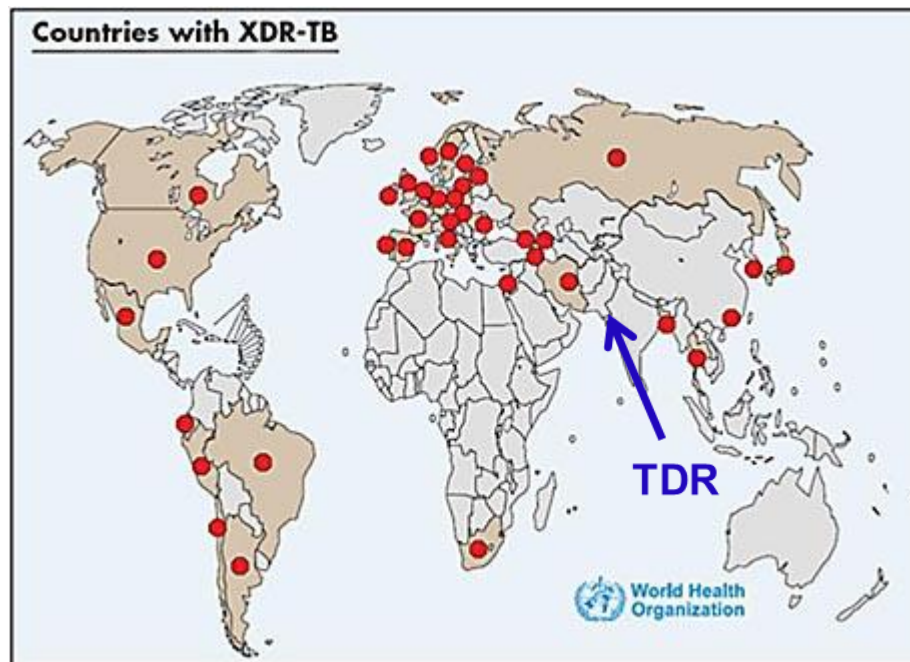
TDR

totally drug resistant
wszystkie leki podstawowe +
wszystkie leki z 6 grup
dodatkowych

W Polsce do chwili obecnej nie zarejestrowano

Co roku 30 – 40 chorych w Polsce

Gruźlica lekooporna XDR na świecie 2014 rok



Raporty WHO

2009 58 krajów

2011 77krajów

2014 105 krajów



METODY DST

Pożywki stałe

Löwenstein-Jensen
Middlebrook
Metoda proporcji, wskaźników oporności i stężeń absolutnych
Czas 4-6 tygodni



Pożywki płynne

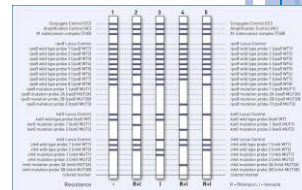
MGIT & MGIT 960
Czas 4-12 dni



Metody molekularne

GenoType®MTBDRplus
GeneXpert® Xpert MTB/RIF

Czas 2-6 godzin



METODY GENETYCZNE – TESTY KOMERCYJNE

Lekooporności *Mycobacterium tuberculosis* complex z uzyskanej hodowli lub próbki klinicznej **AFB (+)**

✓ GenoType MTBDRplus

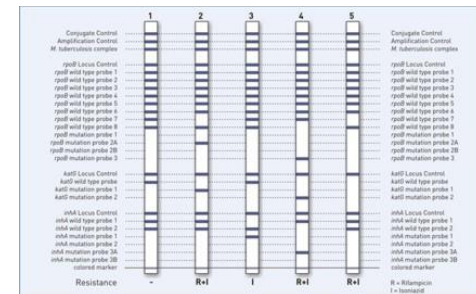
rifampicyna (rpoB) i izoniazyd (katG i inhA)

✓ GenoType MTBDRsl

fluorochinolony (gyrA), aminoglikozydy (rrs), etambutol (embB)

✓ GenoType MTBDRsl ver.2

fluorochinolony (gyrA i gyrB), aminoglikozydy (rrs) i kanamycynę (eis)



METODY GENETYCZNE – TESTY KOMERCYJNE

GeneXpert MTB/RIF



- obecności materiału genetycznego *M.tbc* + identyfikacja mutacji w genie *rpoB* związanych z opornością na ryfampicynę
- Wysoka czułość wykrywania *M.tbc*
- Nie wymaga dodatkowego sprzętu

SENSITIVITY: 98.0%
SPECIFICITY: 98.3%*

		AFB-		AFB+
		Culture POSITIVE	Culture NEGATIVE	Culture POSITIVE
Xpert MTB/RIF	MTB DETECTED	70	3	275
	MTB NOT DETECTED	7	171	0

* The sensitivity of the Xpert MTB/RIF assay in patient samples classified as smear negative, culture positive (S-C+) is 90.9% (70/77) and 100% (275/275) for those classified (S+C+).

mutacje *rpoB* (Leu533Pro, Leu511Pro, Asp516Tyr i His526Leu) –częstość występowania w populacji europejskich chorych na TB - 10 %

Oporność na RMP nie zawsze surogatem oporność MDR

Potrzeba szybkich testów na INH



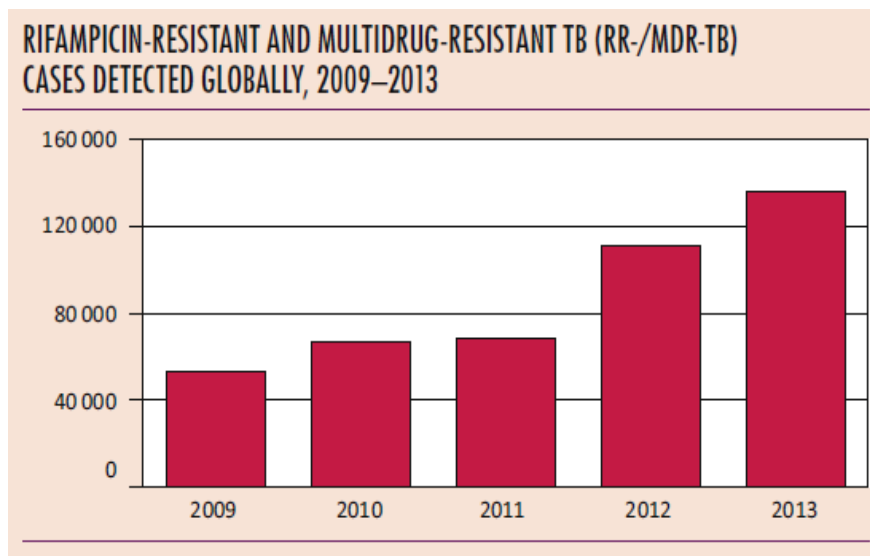
ULTRA XPERT MTB / RIF (XPERT) (ULTRA) TEST / XPERT MTB,

- Poprawa
- Wykrywalności *Mycobacterium tuberculosis* 133 CFU / ml
- czułość 60 - 80% w rozmazów-ujemne TB.
- Fałszywa identyfikacja RIF-R bliskoznacznych mutantów rpoB jako RIF-R.
potrzebne jest 100 CFU / ml LOD kultury płynnej i poprawy wykrywania RIF-R
- Nowy test TB molekularna z równoważnikiem LOD do 10
- ULTRA
- Technologia High Resolution rozróżnia 16 różne cele
- > ilość oczyszczonego DNA dostarczanego do reakcji PCR
- Cztery nowo zaprojektowane sondy wykrywające mutacje w genie rpoB
- Wykrywalność 10 CFU / ml
- Rekomendowany dla AFB (-)



ROZWÓJ SZYBKICH TESTÓW DO DIAGNOSTYKI GRUŻLICY LEKOOPORNEJ – TEST GENEXPERT MTB/RIF

- ❑ Wprowadzenie systemu GeneXpert do diagnostyki TB spowodowało **3-krotnie częstsze** wykrywanie gruźlicy MDR,



- ❑ **Projekt EXPAND-TB**, wspierający 27 krajów o niskich i średnich dochodach poprzez udostępnienie nowoczesnych metod diagnostyki TB, takich jak GeneXpert,
- ❑ Dzięki programowi EXPAND-TB od 2009 roku do czerwca 2014 roku wykryto **89 261 chorych na MDR-TB**

Xpert MTB RIF Ultra and Xpert XDR

Key Product Specifications



Xpert MTB RIF Ultra



Xpert XDR

Specification	Target
Time to result	85 minutes following 15 minute incubation
Hands on time	<2 mins
Sample type	Sputum, induced sputum, sediment
Targets	MTBC (IS6110, IS1081), RIF (rpoB)
Analytical Performance: Inclusivity (Reactivity)	MTB Complex
Clinical Performance: Sensitivity (MTB)	≥98% (Smear+, Culture+)
Clinical Performance: Sensitivity (Rif-resistance)	≥95% (Smear-, Culture+)
Clinical Performance: Specificity (MTB)	≥98%
Clinical Performance: Specificity (Rif-resistance)	≥98%
New Hardware	Not needed, users can use existing instrumentation

Specification	Target
Time to result	90 minutes following 15 minute incubation
Hands on time	<2 mins
Sample type	Sputum, induced sputum, sediment
Targets	MTBC (inhA promoter), INH, FQ, AMK, KAN
Analytical Performance and Clinical Performance characteristics to be determined	

Availability TBD
Alpha Studies in progress

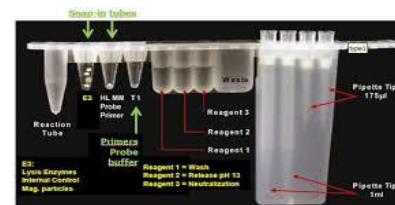


BD MAX

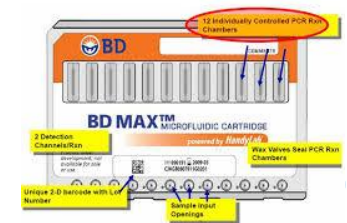
- BD MAX wysoce zintegrowany, zautomatyzowane urządzenie do ekstrakcji, amplifikacji w czasie rzeczywistym i wykrywanie kwasów nukleinowych *M.tbc*
- Analiza maksymalnie 24 próbek w ciągu około 2,5 godziny.
- System otwarty pozwalający na wykorzystanie własnych starterów i sond
- Jednoczesne wykrywanie oporności na RMP i INH
- Czułość 91,9% (86.7-100%), swoistość 97,9% (95.8-100%), PPV95,8% i NPV 95,9%
- Przewidywana premiera na rynku III kwartał 2017



Aparat BD MAX



Kaseta ekstrakcyjna



Kaseta amplifikacyjna

WYNIKI BADAŃ MOLEKULARNYCH LEK POTWIERDZONE KONWENCJONALNYMI



Dlaczego??

fenotyp lekooporności niewykrywany przez testy molekularne

- nie wszystkie mutacje powodujące oporność wykrywane w testach
- mutacja na zewnątrz regionu badanego inne nieznanne mechanizmy oporności
- niektóre mutacje powodują tzw niskie miano oporności np.RMP, lek może być stosowany w wyższych dawkach
- Sekwencjonowanie całego genomu -porównanie genomu szczepów lekoopornych i wrażliwych wykrycie nowych mutacji



ZASTOSOWANIE TESTÓW MOLEKULARNYCH W DIAGNOSTYCE TB



Xpert
MTB/RIF



2010

Hain MTB



2012

BD Max



Xpert Ultra
MTB/RIF



2017

Xpert XDR



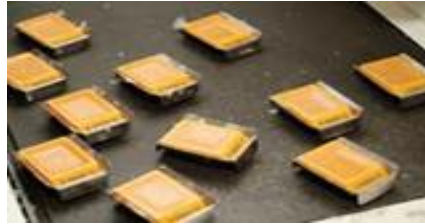
Sekwencjonowanie



2018+

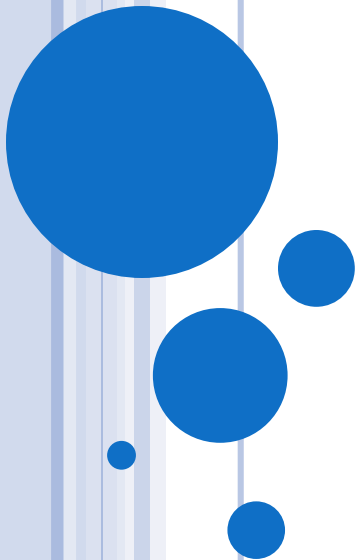
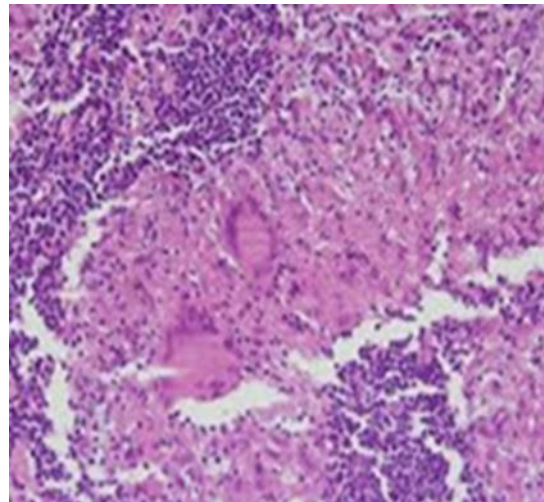


BADANIA MOLEKULARNE MATERIAŁÓW TKANKOWYCH UTRWALONYCH W PARAFINIE

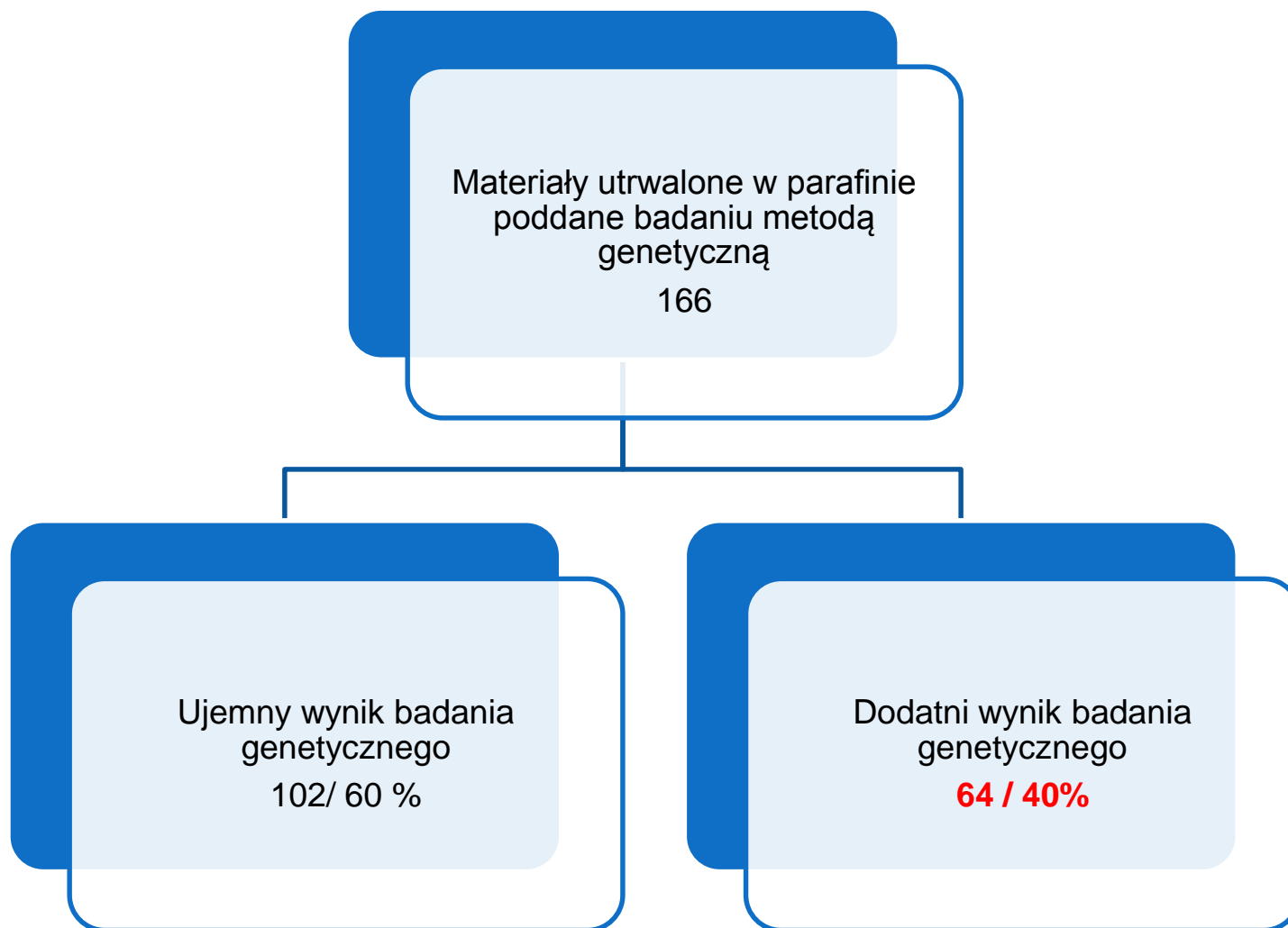


W preparatach histopatologicznych uzyskanych z materiałów 166 chorych stwierdzono :

- 1. organizujące się ziarniniaki,**
- 2. zwłóknienia**
- 3. inne zmiany charakterystyczne dla procesu zapalnego.**



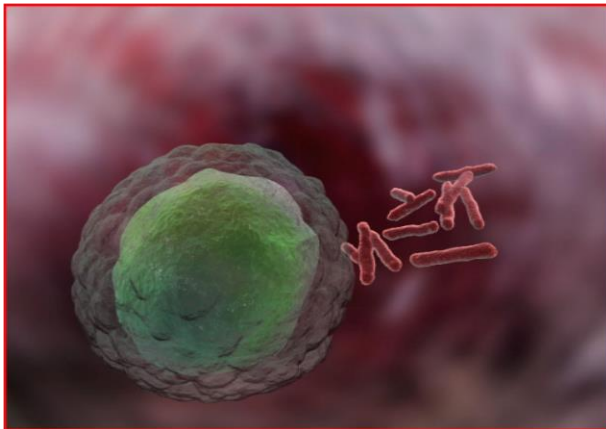
BADANIE GENETYCZNE



DIAGNOSTYKA LATENTNEGO ZAKAŻENIA PRĄTKIEM GRUŻLICY



Do niedawna zakażenie prątkiem gruźlicy było diagnozowane za pomocą **próby tuberkulinowej TST** (*tuberkulin skin test*)



Obecnie obok TST stosuje się nowoczesne **testy immunologiczne IGRA** (*interferon-gamma release assay*)



QuantiFERON-TB Gold Plus najnowsza wersja testu IGRA



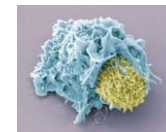
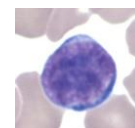
Czułość > 95%

Najwyższa specyficzność

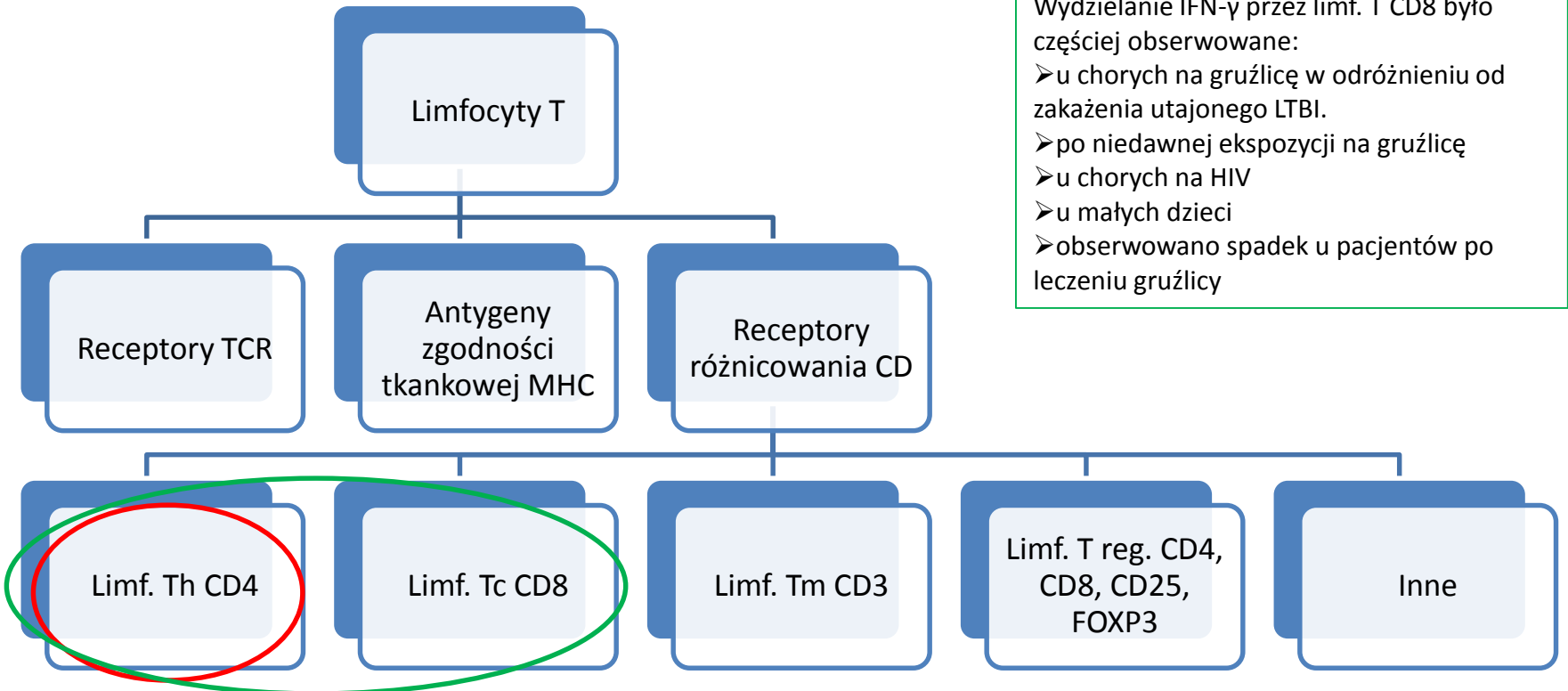
Innowacyjna technologia CD8⁺ T-cell



QFT-TB Plus



Subpopulacje limfocytów T wykorzystane w teście QFT Plus



QFT-TB Gold

QFT-TB Plus

Wydzielanie IFN- γ przez limf. T CD8 było częściej obserwowane:

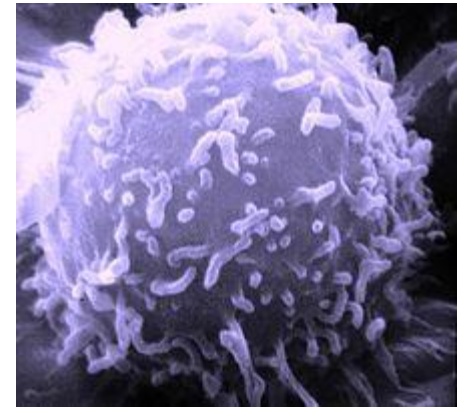
- u chorych na gruźlicę w odróżnieniu od zakażenia utajonego LTBI.
- po niedawnej ekspozycji na gruźlicę
- u chorych na HIV
- u małych dzieci
- obserwowano spadek u pacjentów po leczeniu gruźlicy

Rola Limfocytów T (CD8⁺) w przebiegu odpowiedzi immunologicznej:

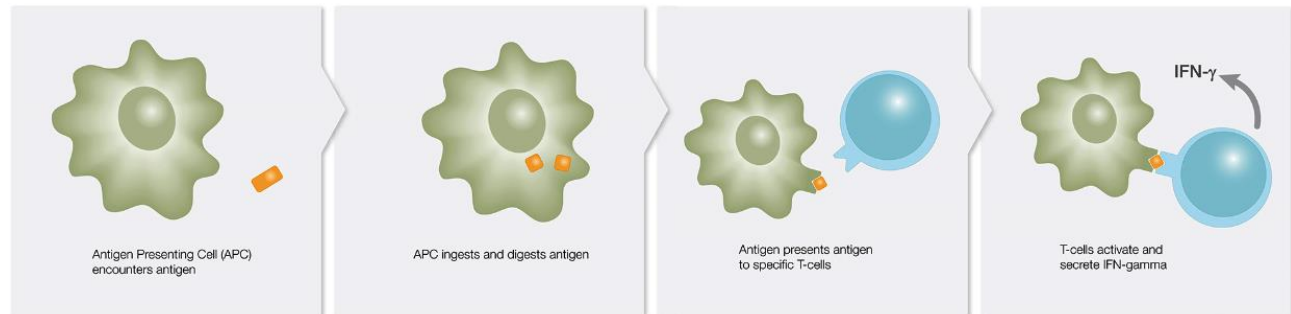
- wydzielają IFN- γ i inne cytokiny
- tłumią wzrost *M. tuberculosis*
- zabijają komórki zakażone

QFT-TB Gold vs. QFT -TB Plus

	QuantiFERON-TB Gold	QuantiFERON-TB Gold Plus
Białka (koktajl peptydowy)	ESAT-6, CFP-10 i TB7.7 MHC klasy II (marker CD4 ⁺)	ESAT-6, CFP-10 MHC klasy II (marker CD4 ⁺) MHC klasy I (marker CD8 ⁺)
Populacja uczulonych komórek	(CD4 ⁺) -Limfocyty T pomocnicze	(CD4 ⁺) – Limfocyty T pomocnicze (CD8⁺) – Limfocyty T cytotoksyczne
Poprawa właściwości zestawu		Wzrost czułości testu u chorych z niską populacją limfocytów Th (CD4 ⁺) np. pacjenci HIV



Zasada testu QFT



W 2 probówkach znajduje się koktajl peptydowy białek naśladujących ESAT-6 i CFP10, które łączą się z komórkami APC. U osób zakażonych MTB limfocyty T rozpoznają antygeny gruźlicze i rozpoczynają produkcję IFN-γ, którego poziom mierzony jest metodą ELISA.

PODSUMOWANIE

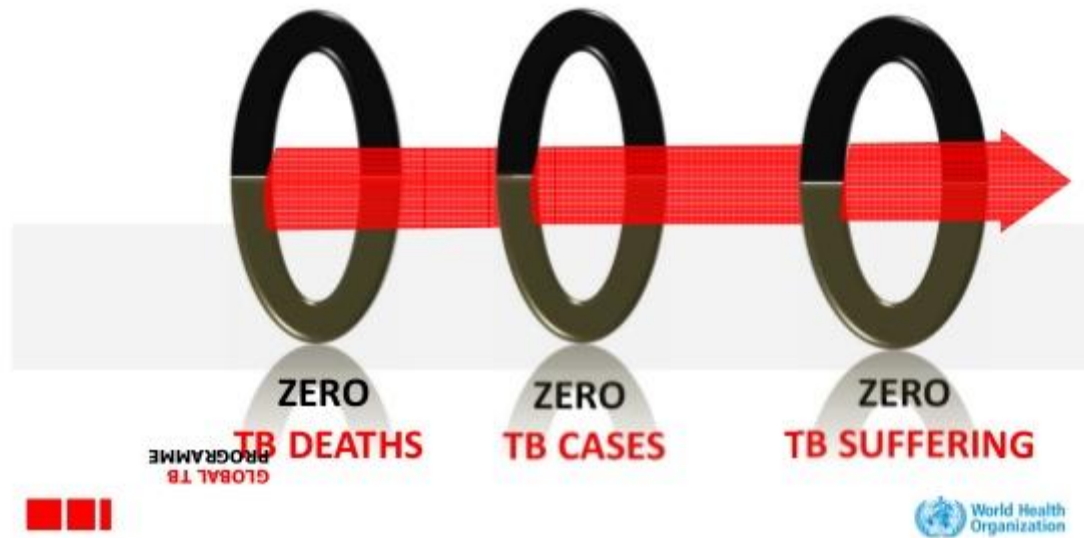
- W ostatniej dekadzie metody szybkiej diagnostyki TB w tym testy oporności umożliwiły wczesne wykrycie chorego z TB i identyfikację lekoopornej gruźlicy
- Problemem pozostaje czułość wykrywania gruźlicy u dzieci, zakażonych HIV i postaci pozapłucnych



PODSUMOWANIE

Vision

A WORLD FREE OF TB



Spektrometria mas MALDI-TOF/TOF

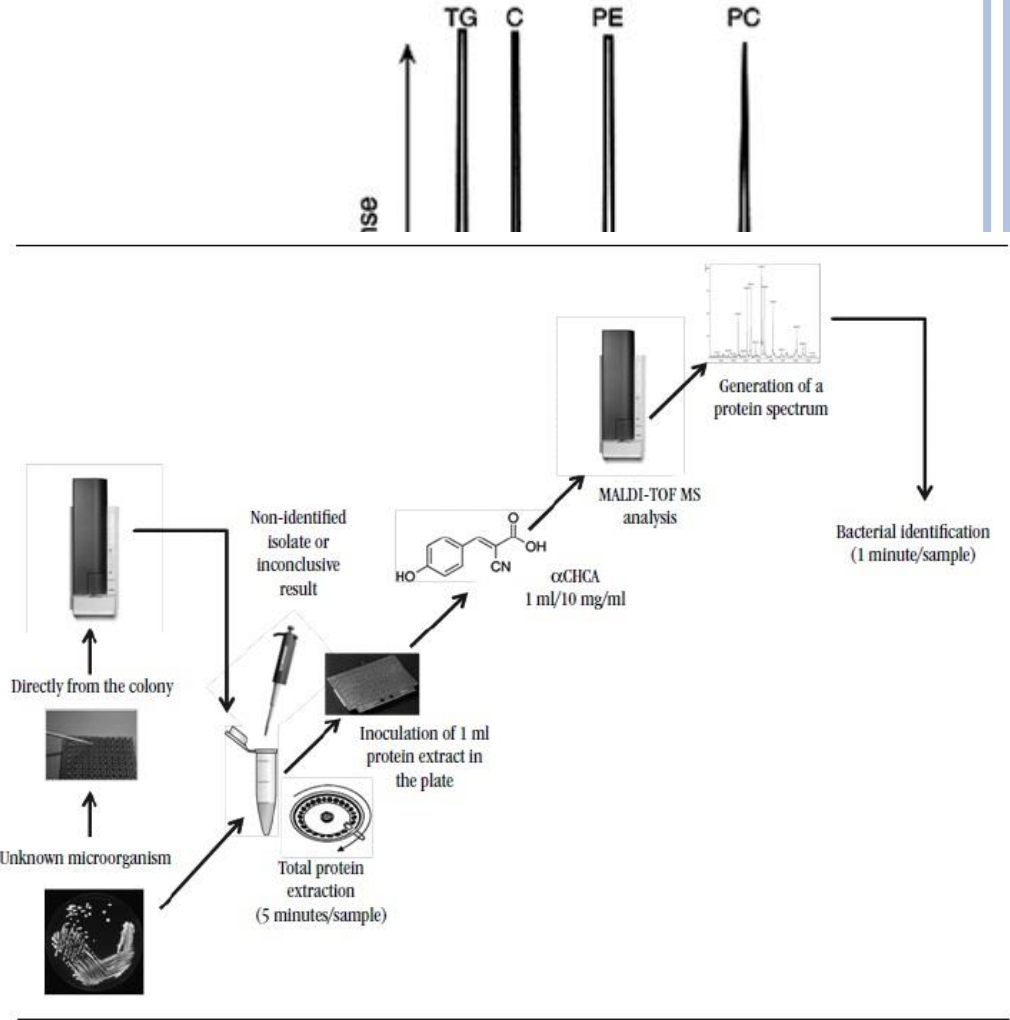
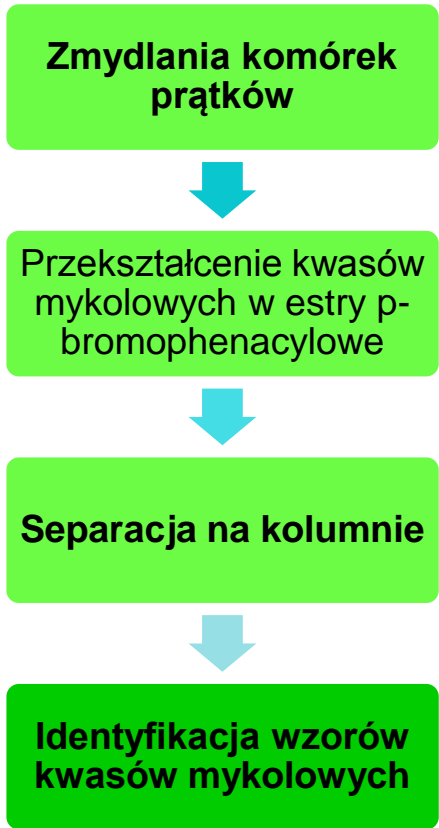


FIGURE 2 – Flowchart of the use of MALDI-TOF MS in microorganism identification at the clinical microbiology laboratory

MALDI-TOF MS: matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry; αCHCA: alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid.



