

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII
INSTITUTUL DE PNEUMOFIZIOLOGIE “MARIUS NASTA”

PROGRAMUL NAȚIONAL DE PREVENIRE, SUPRAVEGHERE ȘI CONTROL AL TUBERCULOZEI

ISBN 978-606-94469-6-6
Editura **TOP AEDITION**

STANDARDE PENTRU LABORATOARELE TB
CONDIȚII MINIME PENTRU
ASIGURAREA SIGURANȚEI ȘI EFICIENȚEI
ACTIVITĂȚILOR DIN LABORATOR

BUCUREȘTI - 2017

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII
INSTITUTUL DE PNEUMOFIZIOLOGIE “MARIUS NASTA”
PROGRAMUL NAȚIONAL DE PREVENIRE, SUPRAVEGHERE ȘI CONTROL AL TUBERCULOZEI

STANDARDE PENTRU LABORATOARELE TB
CONDIȚII MINIME PENTRU
ASIGURAREA SIGURANȚEI ȘI EFICIENȚEI
ACTIVITĂȚILOR DIN LABORATOR

BUCUREȘTI - 2017

Dr Daniela Homorodean, medic primar microbiologie, doctor în științe medicale, coordonator al rețelei naționale a laboratoarelor de micobacteriologie, șef Laboratorul Național de Referință Cluj Napoca, Spitalul Clinic de Pneumoftiziologie Leon Daniello Cluj Napoca.

Dr Adriana Moisoiu, medic primar medicină de laborator, doctor în științe medicale, șef Laboratorul Național de Referință București, Institutul Național de Pneumoftiziologie Marius Nasta București.

Cuprins:

Lista figurilor	6
Lista tabelelor.....	6
Abrevieri	7
Introducere	8
1. Structura și funcțiile rețelei laboratoarelor de micobacteriologie	9
2. Tehnici și metode.....	12
Examenul microscopic	12
Cultivarea micobacteriilor.....	13
Antibiograma.....	13
Metodele de biologie moleculară	14
3. Condiții minime pentru asigurarea siguranței și eficienței activităților din laborator.....	15
Biosiguranța	15
Asigurarea calității	19
Timpul de diagnostic.....	19
Resursele umane.....	18
4. Algoritmul de diagnostic al tuberculozei.....	20
5. Înregistrări. Formulare de solicitare. Registre.....	22
Bibliografie	24

Lista figurilor

Figură 1. Structura actuală și cea de perspectivă a rețelei de laboratoare TB	9
Figură 2. Algoritm de selectare a cazurilor pentru teste rapide fenotipice și de biologie moleculară.....	23

Lista tabelelor

Tabel I. Metodele care sunt folosite în diferite niveluri de laboratoare.....	12
Tabel II. Timpul de diagnostic.....	19

Abrevieri

ABG: Antibiograma

BAAR: Bacilli acido-alcool rezistenți

C-LJ: Cultura în mediul Lowenstein Jensen

CEC: Control Extern al Calității

CIC: Control Intern al Calității

CPM: Cabinet de Protecție Microbiologică

INH: Isoniazidă

LJ: Mediul Lowenstein Jensen

LNR: Laborator Național de Referință

LPA: Line Probe Assay

LRR: Laborator Regional de Referință

M: Examen microscopic

MGIT: Mycobacterium Growth Indicator Tubes

MDR: Multidrug rezistență

MTB: *Mycobacterium tuberculosis*

NTM: Micobacterii netuberculoase

PZM: Pirazinamidă

PNPSCT: Programul Național de Prevenire, Supraveghere și Control a Tuberculozei

RMP: Rifampicină

SIRE: Streptomycină, Isoniazidă, Rifampicină, Etambutol

TB: Tuberculoză

ZN: Ziehl Neelsen

Introducere

Diagnosticul tuberculozei (TB) a cunoscut în ultimii ani progrese remarcabile prin folosirea în practica de rutină a metodelor rapide de diagnostic fenotipic și de biologie moleculară^{1, 2, 3}.

Îngrijirea pacienților cu TB începe cu un diagnostic de laborator cu calitate asigurată. Diagnosticul neadecvat, cauzat de unele laboratoare care nu au capacitatea să ofere rezultate cu calitate controlată, poate constitui o barieră în controlul TB^{3,4}.

Tehnicile și metodele recomandate pentru folosire în rețeaua națională a laboratoarelor TB trebuie să țină seama de necesitățile PNPSCT și de Strategia națională pentru controlul TB, astfel încât contribuția laboratorului la realizarea obiectivelor să se situeze la nivelul așteptărilor^{5,6}.

Introducerea de metode noi în practica de rutină generează situații complexe, fiind necesar să se țină seama de infrastructura laboratoarelor, de posibilitatea realizării condițiilor de biosiguranță corespunzătoare gradului de risc, validarea echipamentelor și asigurarea întreținerii acestora, asigurarea furnizării neîntrerupte a reactivilor și materialelor consumabile necesare, managementul fiecărui laborator în parte și a rețelei de laboratoare ca un întreg, cu realizarea unui sistem de asigurare a calității la toate nivelurile. De asemenea, este necesară asigurarea resurselor umane adecvate pentru situația nou creată³.

1. Structura și funcțiile rețelei laboratoarelor de micobacteriologie

Pornind de la obiectivele Strategiei naționale pentru controlul TB⁶, față de 105 laboratoare funcționale în rețeaua de laboratoare în anul 2014, până în anul 2020 vor trebui să ofere rezultate cu calitate asigurată, la nivelul necesităților PNPSCT, un număr de 40 - 45 laboratoare (fig 1).

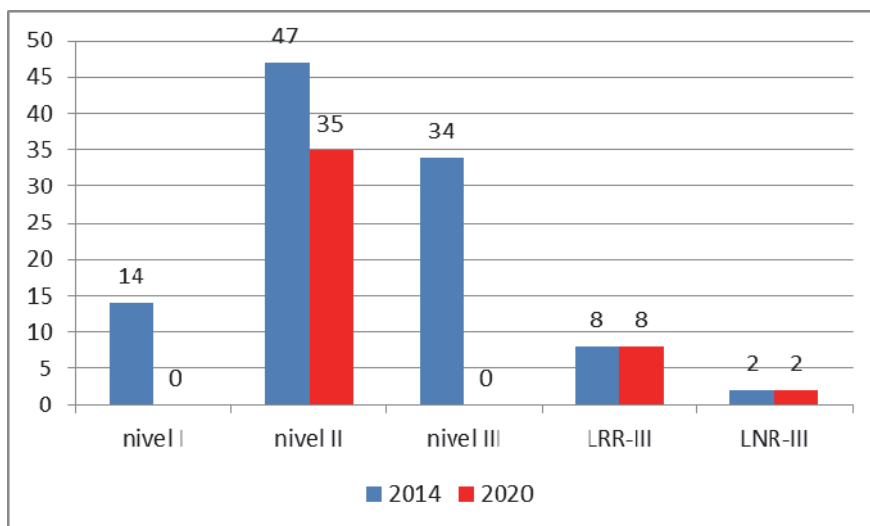


Figura 1. Structura actuală și cea de perspectivă a rețelei de laboratoare TB.

Existența rețelei laboratoarelor permite⁵:

- aplicarea tehnicilor recomandate de PNPSCT la nivelul întregii țări, cu rezultate comparabile între laboratoare;
- asigurarea unor investigații speciale disponibile numai în laboratoarele specializate (ex. testarea sensibilității tulpinilor, teste de biologie moleculară, identificarea speciilor de micobacterii);
- obținerea informațiilor necesare planificării și evaluării activității la toate nivelurile;
- obținerea informațiilor privind activitatea de diagnostic și identificarea eventualelor deficiențe, cu aplicarea de măsuri corective;
- aprecierea tendințelor (ex: a confirmărilor bacteriologice, care este unul din indicatorii de performanță pentru programul de control al TB)
- asigurarea controlului intern și extern al calității diagnosticului bacteriologic al TB.

Categoriile de analize și activitățile care trebuie să fie asigurate de laboratoarele rețelei sunt⁵:

Laboratoare de nivel II:

- examenul microscopic pentru evidențierea bacililor acido-alcool-rezistenți (BAAR) și cultura micobacteriilor în mediul solid Lowenstein Jensen, cu identificarea obligatorie a germenilor din complexul *M. tuberculosis*. Dacă există condiții realizate pentru asigurarea cultivării în mediul lichid în sistem automat, aceste laboratoare pot folosi*

suplimentar și această metodă, la cazurile suspecte de TB-MDR sau pentru monitorizarea tratamentului acestora, conform algoritmului de diagnostic⁵.

- trimit culturile izolate de la toate cazurile noi și de la cele din cursul monitorizării tratamentului la laboratorul de nivel III, pentru efectuarea antibiogramei (a se vedea algoritmul de diagnostic) (ABG).
- trimit la laboratorul de referință, pentru identificare genetică, toate tulpinile de micobacterii netuberculoase (test imunocromatografic Ag MPT64 negativ).
- pot trimite spută recoltată de la pacienții suspecți de TB-MDR la laboratorul de arondare teritorială (LRR, LNR), în vederea efectuării de teste de biologie moleculară pentru diagnosticul rapid al TB-MDR.
- în zonele cu prevalență mare a TB-MDR sau/și a infecției HIV, a TB la copii, dacă există dotarea (GeneXpert MTB/Rif) și condițiile locale asigurate, pot efectua testarea rapidă pentru evidențierea TB/TB-MDR.

Laboratoare de nivel III- Laboratoare Regionale de Referință (LRR)

- *examenul microscopic* pentru evidențierea bacililor BAAR și *cultura micobacteriilor în mediul solid Lowenstein Jensen*, cu *identificarea obligatorie* a bacililor din complexul *M. tuberculosis*.
- asigură cultivarea în mediul lichid în sistem automat la cazurile suspecte de TB -MDR sau pentru monitorizarea tratamentului acestora, conform algoritmului de diagnostic (pag16).
- efectuează ABG MT pentru Rifampicină (RMP) și Isoniazidă (INH) prin metoda concentrațiilor absolute sau prin metoda proporțiilor modificată - în mediul lichid Middlebrook 7H9, în sistemul automat de cultivare disponibil.
- efectuează teste de biologie moleculară pentru identificarea complexului MTB și a rezistenței la RMP (GeneXpert MTB/Rif) sau RMP și INH (GenoType MTBDRplus)
- coordonează activitatea a 3 - 7 laboratoare județene arondate și din municipiul București;
- desfășoară activitate de supervizare, asigurare a calității rezultatelor pentru examenul microscopic pentru laboratoarele arondate.
- colaborează cu LNR pentru toate activitățile desfășurate.

Laboratoarele Naționale de Referință (LNR), din cadrul Institutului de Pneumoftiziologie „Marius Nasta” și din cadrul Spitalului Clinic de Pneumoftiziologie „Leon Danielo” - Cluj-Napoca:

- constituie nivelul la care se realizează coordonarea, planificarea, organizarea, monitorizarea și evaluarea rețelei, instruirea personalului cu studii superioare din laboratoarele rețelei.
- în plus față de LRR, testează sensibilitatea pentru substanțele anti-TB de linia a II-a prin metode fenotipice (metoda proporțiilor în mediul Lowenstein Jensen și metoda proporțiilor modificată în mediul Middlebrook 7H9 în sistem MGIT 960) și prin teste de biologie moleculară (GenoType MTBDRs/).
- identifică prin metode de biologie moleculară speciile din cadrul complexului *M. tuberculosis*, speciile de micobacterii netuberculoase (NTM) comune și efectuează teste de epidemiologie moleculară;

- desfășoară activitate de supervizare, asigurare a calității rezultatelor, informare, educare - instruire, management al resurselor și cercetare. Toate laboratoarele, indiferent de nivelul lor, pot participa la activitatea de cercetare științifică.

2. Tehnici și metode

Toate laboratoarele vor respecta algoritmul de diagnostic recomandat de PNPSCT⁵.

În tabelul I sunt prezentate metodele care sunt folosite în diferite niveluri de laboratoare:

Tabel I. Metodele care sunt folosite în diferite niveluri de laboratoare

Nivel ul lab	Nr lab	M	C-LJ	C- mediul lichid	AB G Lini a 1	ABG linia 1+2	GeneXpert MTB/Rif	GenoType LPA	Epidemio- logie molecula- ră
LNR	2	x	x	MGIT 960 VersaTrek	x	MP	x	MTBDRplus MTBDR _{sl}	x
LRR	8	x	x	MGIT 960	x		x	MTBDR _{plus}	
II	30- 35	x	x	MGIT 960 sau VersaTrek			x		

Examenul microscopic constituie prima etapă în identificarea cazurilor suspecte de TB, prin examinarea a 2 eșantioane de spută⁵.

Cazul de TB este definit dacă se obține rezultat pozitiv BAAR pentru cel puțin unul dintre eșantioanele examinate. Pentru monitorizarea tratamentului se examinează, de asemenea, câte 2 eșantioane de spută la intervalele de timp recomandate de PNPSCT pentru fiecare categorie de caz.

Microscopia convențională (optică)⁷

Folosește colorația Ziehl Neelsen (ZN), cu examinare la microscopul optic, cu mărire de 1000x (obiectiv cu imersie) pentru evidențierea BAAR.

Poate să fie realizată direct, prin prelucrarea sputei sau, dacă există dotarea cu centrifugă conformă, după decontaminare/concentrare, prin colorarea frotiului efectuat din sediment.

Microscopia fluorescentă convențională

Folosește lampă cu vapori de mercur ca sursă de lumină. Față de microscopia optică, are avantajul examinării unui câmp microscopic mai larg, folosind obiective de 20x și 40-60x, permițând scurtarea timpului necesar examinării.

Necesită pregătire/instruire specială a personalului de laborator. De asemenea, costul este mai ridicat, comparativ cu microscopia optică.

Este recomandată pentru laboratoare care efectuează zilnic un număr mare de examinări (35-100)^{8,9}.

Poate să fie realizată direct, prin prelucrarea sputei sau, dacă există dotarea cu centrifugă conformă, după decontaminare/concentrare, prin colorarea frotiului efectuat din sediment.

Microscopia fluorescentă cu microscop LED-UV¹⁰

Spre deosebire de microscopia fluorescentă convențională, acest tip de microscop folosește ca sursă de lumină o diodă emițătoare de lumină (LED: Light-Emitting Diode), mai ieftină decât

lampa cu vapori de mercur, nu necesită timp pentru încălzirea lămpii, iar în cazul spargerii nu generează vapori toxici. Performanțele sunt similare cu ale microscopului cu fluorescență convențională, dar are avantajul că examinarea se face în încăpere luminată.

Cultivarea micobacteriilor

Se realizează prin însămânțarea produselor prelucrate în mediul solid Lowenstein Jensen (LJ) și, acolo unde există dotarea și se realizează condițiile de calitate și biosiguranță necesare, în mediul lichid Middlebrook 7H9.

Cultivarea în mediul lichid va fi folosită în mod special pentru cazurile noi, suspecte de TB-MDR, dar și pentru cultivarea probelor în cursul monitorizării terapiei, pentru obținerea rapidă a culturii în vederea testării sensibilității prin metodă fenotipică sau genetică. Trebuie reținut că se obțin doar rezultate calitative (pozitiv/negativ), spre deosebire de cultivarea în mediul solid LJ, care oferă informații cantitative (număr de colonii) utile pentru monitorizarea evoluției sub tratament. Pentru cazurile aflate la monitorizarea tratamentului, la controlul de la 4 luni este recomandabil ca sputa prelucrată să fie însămânțată și pe mediul lichid ca să avem mai repede informația referitoare la rezistența dobândită, prin testare genetică și fenotipică a culturii obținute.

Examenul microscopic și cultura în mediul LJ rămân obligatorii pentru toate laboratoarele rețelei, indiferent de nivelul laboratorului și de alte tipuri de teste folosite.

Pentru decontaminarea produselor potențial contaminate în momentul recoltării, se folosesc exclusiv metodele recomandate de PNPSCT și numai după ce personalul a fost instruit asupra tehnicii corecte. Introducerea în practica laboratorului a unei metode noi de decontaminare trebuie să fie precedată de instruirea personalului și de validarea metodei. Dacă nu se obțin rezultatele scontate (cel puțin cu calitate similară metodei anterior folosite), ori se renunță la metodă, ori se reia instruirea personalului. Se solicită asistența tehnică a LNR.

Identificarea microbilor crescuți în mediul solid sau lichid se va face pentru toate culturile care, la verificarea microscopică în colorația ZN, evidențiază prezența de BAAR (indiferent de așezarea acestora în frotiu), folosind testul rapid imunocromatografic Ag MPT64, cu rezultat în 15 minute¹¹. Identificarea genetică este rezervată situațiilor în care testul imunocromatografic Ag MPT64 este cu rezultat negativ.

Indiferent de mediul de cultivare folosit și de nivelul laboratorului, este obligatorie identificarea apartenenței bacteriilor izolate la *complexul M. tuberculosis*.

Antibiograma

ABG pentru substanțele anti-TB de linia I în mediul solid LJ se va limita la INH și RMP, folosind metoda concentrațiilor absolute. Testarea în mediul lichid Middlebrook 7H9 în sistem automat se va face față de SIRE și eventual la PZM în LNR în sistem Bactec MGIT 960 și la RIE

în cazul sistemului VersaTREK. LNR vor testa și substanțele anti-TB de linia a doua, atât în mediul solid, cât și în mediul lichid (în sistem MGIT 960).

Este de reținut că reproductibilitatea rezultatelor este foarte bună pentru RMP și INH, dar mai slabă pentru SM și EMB, de aceea mono-rezistența izolată doar la acestea din urmă trebuie interpretată cu prudență^{12,12a}.

Toate laboratoarele care efectuează ABG trebuie să participe la scheme de control extern al calității/comparare între laboratoare, pentru a dovedi și a putea menține calitatea rezultatelor¹².

Metodele de biologie moleculară

Metodele moleculare de diagnostic pot fi folosite ca *test direct* (din proba recoltată de la bolnav) *exclusiv pentru cazurile noi*, care nu au început tratamentul anti-TB sau sunt în primele 3 zile de tratament, deoarece se bazează pe detectarea ADN-ului bacterian și nu se poate face distincție între bacteriile vii (viabile) și cele moarte (neviabile)¹³.

Pentru cazurile aflate în cursul terapiei specifice și care necesită un rezultat rapid referitor la profilul de rezistență se va efectua *test molecular indirect* folosind cultura obținută în mediul lichid sau solid.

Se vor folosi metode de identificare simultană a complexului *M.tuberculosis* și a rezistenței la RMP sau și a rezistenței la RMP și INH. La nivelul LNR se va testa genetic rezistența la substanțele anti-TB de linia a doua, și se identifică speciile de micobacterii în cadrul complexului *M.tuberculosis* sau speciile comune de NTM¹⁴.

Metodele de epidemiologie moleculară vor fi folosite în LNR pentru stabilirea filiației cazurilor din focarele de TB.

Indiferent de nivelul laboratoarelor, tehnicile și metodele recomandate trebuie să fie folosite de personal calificat, suficient numeric pentru sarcinile și responsabilitățile pe care le are de îndeplinit, instruit și verificat pentru calitatea rezultatelor obținute.

3. Conditii minime pentru asigurarea siguranței și eficienței activităților din laborator

Biosiguranța

Deoarece *Mycobacterium tuberculosis* este încadrat în grupul 3 de bacterii patogene din cauza riscului pe care îl reprezintă pentru persoanele care sunt expuse profesional sau accidental, este necesar ca toate activitățile de laborator să se realizeze în condiții controlate, cu nivel de biosiguranță adecvat (1, 2 sau 3), care asigură protecția personalului și a mediului.

Spațiul laboratorului trebuie să fie astfel dimensionat și structurat încât să asigure realizarea de analize de calitate, activitatea să se desfășoare în mod fluent și să prevină riscul contaminării încrucișate a probelor, contaminarea mediului sau a personalului. Trebuie să se asigure circuite funcționale pentru clienți/solicitanți, probe, personal și deșeurile provenite din prelucrarea probelor¹⁵. Compartimentul pentru diagnosticul TB trebuie să fie separat de bacteriologia non-TB, dotat cu echipament care să poată susține toate activitățile în condiții de biosiguranță¹⁶.

În timpul activităților de diagnostic se generează cantități diferite de aerosoli infecțioși în funcție de metoda folosită dar, mai ales, în funcție de cantitatea de micobacterii conținută în materialul prelucrat.

Fiecare laborator trebuie să-și evalueze activitățile prin prisma riscului pe care îl prezintă pentru transmiterea TB, cu identificarea zonelor care necesită, în afară de accesul restricționat, echipament pentru protecția personală.

În aprecierea riscului se ține seama de cantitatea de micobacterii conținută în materialul prelucrat (spută, fluid al corpului sau suspensie bacteriană din cultură), manopera care trebuie efectuată și gradul în care aceasta poate fi generatoare de aerosoli, numărul manevrelor generatoare de aerosoli pentru fiecare metodă, volumul de lucru al laboratorului, profilul epidemiologic al pacienților pentru care se efectuează testele și starea de sănătate a personalului din laborator.

Trebuie să existe plan pentru controlul infecției, cu reguli pentru realizarea programului de curățenie, dezinfecție, colectarea, neutralizarea și eliminarea deșeurilor în funcție de natura lor^{17,18a,19,20}.

Cerințe minime:

- Trebuie ca laboratorul de micobacteriologie să fie dotat cu cabinet de protecție microbiologică (CPM) de clasa II sau I și toate activitățile care presupun mânguirea de material cu conținut de micobacterii să se realizeze în interiorul acestuia.
- Dacă este folosită centrifuga pentru concentrarea probelor, aceasta trebuie să aibă sistem de protecție anti aerosoli.
- Accesul în laborator trebuie să fie controlat.
- Personalul trebuie să fie instruit asupra riscului de infecție și a manoperelor corecte, să lucreze cu calm, să reducă la minim cantitatea de aerosoli generați în timpul lucrului.
- Personalul trebuie să poarte echipamentul de protecție individuală recomandat pentru fiecare tip de activitate.

Cabinetele de protecție microbiologică (CPM)

- sunt concepute pentru a proteja personalul, mediul înconjurător sau/și produsele prelucrate
- folosesc filtre de mare eficiență în sistemul de exhaustare sau recirculare a aerului.
- filtrele HEPA (sau filtre ULPA) rețin particulele cu diametrul $> 0.3\mu\text{m}$ (respectiv $>0,1\mu\text{m}$), cu o eficiență de 99,97 % (respectiv 99.99%). Pentru activitatea de rutină din laboratorul TB sunt recomandate CPM cu filtre tip HEPA.
- în bacteriologia TB se folosesc cabinetele de clasa II și I^{2,14}

- necesită întreținere și verificarea vitezei fluxului de aer pentru asigurarea funcționării în parametri optimi
- este necesară verificare și certificare anuală a funcționării în parametri de protecție
- este necesară schimbarea filtrelor conform recomandării producătorului
- așezare - departe de căile de acces, centrifugi; nu se lucrează cu fereastra deschisă; nu se deschide ușa în timpul lucrului; nu se circulă prin spatele celui care lucrează deoarece perdeaua protectoare de aer este fragilă
- în interior se pun numai lucruri strict necesare; nu se amestecă în aceeași zonă materiale curate, sterile, cu deșeurile infecțioase: stânga-zonă curată, în față- zona de lucru; la dreapta -zona cu deșeuri infecțioase.
- flacăra de gaz crează turbulențe în interior, deci este preferabil lucrul cu materiale de unică folosință
- materialul infecțios se ține la mai mult de 15 cm de deschiderea frontală, cu flacoanele în poziție oblică, nu vertical
- nu se țin deschise în același timp mai multe recipiente, iar cele cu material infecțios sunt închise cât mai repede.

Pentru toate laboratoarele:

- La pregătirea frotiurilor, este preferabilă utilizarea anselor de unică folosință în locul anselor metalice reutilizabile care ar trebui sterilizate prin flambare.
- Dacă totuși nu există posibilitatea folosirii acestora, flambarea anselor metalice trebuie să se facă într-un microincinerator sau la flacăra unui bec Bunsen protejat, iar bucla ansei metalice reutilizabile se descarcă înainte de sterilizare prin rotire într-un amestec de nisip și alcool.
- Nu este permisă încălzirea sau fixarea la flacăra a frotiurilor înainte ca ele să se fi uscat complet la aer.

Factori care cresc riscul infecției în laborator:

- Lucrul în arii cu ventilație necorespunzătoare.
- Iluminare slabă a zonei de lucru.
- Utilizarea unor CPM necertificate, întreținute necorespunzător.
- Echipament pentru protecție personală neconform (halat cu mâneci scurte, închis în față, mască chirurgicală)
- Mediu cu mult praf care poate bloca filtrele CPM.
- Manevrare defectuoasă, neglijentă, a probelor, cu formare de aerosoli.
- Nu sunt luate toate măsurile de siguranță la vortexarea/agitarea probelor.
- Spargerea în timpul centrifugării a tuburilor conținând prelevate clinice.
- Formarea de aerosoli la deschiderea capacului blocat al unei centrifugi.
- Funcționarea defectuoasă a sistemelor de răcire sau de încălzire.

Folosirea tehnicilor microbiologice corecte este esențială pentru reducerea la minim a riscului de formare a aerosolilor infecțioși.

Pentru laboratoarele cu risc mediu și mare de infecție (efectuarea culturilor, identificarea culturilor, efectuarea ABG):

- Este interzisă eliminarea forțată a lichidului din pipetă.
- Este interzisă barbotarea (suflarea forțată a aerului într-un lichid cu conținut potențial infecțios).
- La pipetarea unui reactiv într-un lichid potențial infecțios, pipeta se plasează în apropierea peretelui intern al marginii superioare a recipientului și lichidul se împinge ușor pentru a se prelinge în interior.
- Centrifugarea unei probe sau a unei culturi trebuie făcută într-un rotor cu capac de siguranță pentru a preveni împrăștierea aerosolilor din centrifugă în incinta laboratorului. Capacele cuvelor rotorului trebuie deschise în interiorul CPM.
- După manevrele de centrifugare, vortexare sau după agitarea manuală a probelor, recipientele care le conțin trebuie să fie plasate în interiorul CPM și lăsate în repaos pentru cca 10 minute pentru a permite depunerea aerosolilor înainte de deschiderea recipientelor.
- Niciodată nu se vortexează sau agită manual un tub deschis; trebuie întotdeauna să ne asigurăm că filetul capacului este bine strâns. Niciodată nu se vortexează sau agită manual recipiente cu dop de vată sau cu dop de cauciuc.
- Trebuie să ne asigurăm că la decantarea lichidelor tuburile sunt ținute înclinat, astfel încât lichidul să se poată scurge, iar la depunerea recipientului în vasul colector al deșeurilor nu se formează stropi.
- *Zonele de lucru:* Laboratorul trebuie să fie împărțit în arii curate și arii potențial contaminate. Ariile curate sunt destinate activităților administrative și preparării materialelor necesare pentru procedurile de lucru.
- Laboratorul trebuie să fie curat și liber de materiale și echipamente care nu sunt necesare activității de rutină.
- Suprafețele de lucru trebuie decontaminate după orice manevră formatoare de stropi potențial infecțioși și la terminarea lucrului.

Personalul de laborator

- Erorile umane și slaba pregătire tehnică a personalului pot compromite măsurile de biosiguranță.
- Tot personalul trebuie să fie instruit pentru respectarea atât a bunelor practici de laborator, cât și a procedurilor operaționale din manualul de control al infecțiilor în laborator.
- Instruirile pentru controlul infecțiilor trebuie să cuprindă informații referitoare la practicile de biosiguranță pentru a reduce la minim riscul de inhalare, ingerare sau inoculare, precum și informații privitoare la colectarea, decontaminarea, depozitarea materialului infecțios și eliminarea deșeurilor din laborator^{17,18, 18a.}

Trebuie reținut că:

- **existența regulilor și a procedurilor nu conferă protecție prin ele însele, acestea trebuind să fie însușite și aplicate corect în activitatea de rutină.**
- **este necesară verificarea periodică a nivelului de cunoștințe teoretice și practice referitoare la tehnicile corecte de lucru și aplicarea de rutină a măsurilor de biosiguranță prin folosirea de chestionare și observarea directă.**
- **folosirea incorectă a CPM expune operatorul la risc.**

Dezinfecția și curățenia

Dezinfectanții recomandați pentru laboratorul de micobacteriologie sunt cei care conțin fenol, clor și alcool.

Pentru că *fenolul* este iritant pentru ochi, piele și mucoase, în locul lui se folosesc derivații fenolici în soluții apoase de 5%.

Clorul (hipocloriții) se folosește în soluție cu concentrație de 5%, care poate fi diluată în apă pentru a obține soluții finale de lucru de 1%. Soluția concentrată de clor poate fi păstrată într-un loc bine aerisit și la întuneric pentru o perioadă de 3 luni. *În soluțiile de lucru, diluate, clorul este instabil, deci se prepară zilnic; cantitatea nefolosită din ziua precedentă se îndepărtează la deșeuri chimice; nu se amestecă soluție veche cu soluție proaspătă.* Fiind foarte corozive, soluțiile de clor nu sunt indicate pentru dezinfecția componentelor metalice. Soluția de lucru de hipoclorit de sodiu cu concentrație de 1% se prepară amestecând 20 ml din soluția cu concentrație de 5% cu 80 ml apă distilată; sau 4 ml din soluția de hipoclorit de sodiu în concentrație de 25% cu 96 ml apă distilată.

Alcoolii, etanolul sau izopropil alcoolul trebuie folosiți în soluție de 70°. Alcoolii sunt volatili și inflamabili și este interzisă folosirea lor în apropierea flăcării. Soluțiile de alcool se păstrează în recipiente bine închise spre a preveni evaporarea. Aceste recipiente trebuie etichetate corespunzător și nu se autoclavează.

Alcoolul de 70° se utilizează pentru dezinfecția curentă a CPM.

Soluția de formalină pentru folosirea în vaporizatorul CPM se prepară astfel: 130 ml formalină 38-40% se amestecă cu 260 ml apă distilată. Rezultă 390 ml soluție apoasă de lucru pentru vaporizator.

Colectarea deșeurilor rezultate din activitățile laboratorului trebuie să se facă urmând procedurile scrise care se conformează reglementărilor referitoare la curățenie, dezinfecție și colectarea deșeurilor medicale^{17,18}.

Fiecare laborator trebuie să aibă proceduri scrise referitoare la conduita în caz de accident cu potențial infecțios.

Asigurarea calității

Activitatea de asigurare a calității și îmbunătățire a ei are ca scop motivarea personalului din laborator și ajută laboratorul în relațiile sale externe (factori de decizie, finanțatori, organizații de certificare/acreditare)^{21,22}. Numărul laboratoarelor care implementează standardul de calitate pentru laboratoare ISO 15189 este un indicator al calității pentru rețeaua de laboratoare²¹. Indiferent dacă sunt sau nu acreditate conform ISO 15189, toate laboratoarele rețelei trebuie să efectueze CIC pentru toate testele și metodele aplicate și să păstreze documente doveditoare. De asemenea, este obligatorie participarea la scheme de comparare interlaboratoare (CEC), cu documentarea corespunzătoare.

Pentru a lua în considerare rezultatele oferite de un laborator, acesta trebuie să obțină la CEC concordanță de cel puțin 90% a rezultatelor pentru examenul microscopic și cultură. Pentru ABG fenotipică la RMP concordanța trebuie să fie de cel puțin 95%, iar pentru INH cel puțin 90%.^{12,12a} Concordanța rezultatelor testelor genetice cu cele fenotipice trebuie să depășească 90%.

Rezultate concordante între 80-90% denotă deficiențe de tehnică și necesită corectare imediată prin instruirea/reinstruirea personalului în LNR. Concordanța sub 80% nu este acceptabilă pentru nicio metodă sau tehnică și este necesară verificarea imediată a condițiilor de lucru din laborator și pregătirea teoretică și practică a personalului.

Timpul de diagnostic

TB, boală infecțioasă pentru care există tratament specific, are șanse maxime de vindecare dacă este diagnosticată precoce și tratată corect. Timpul de diagnostic include, pe de o parte, intervalul de timp de la apariția simptomelor până la prezentarea la consult medical, iar pe de altă parte, intervalul de timp dintre recoltarea produselor patologice și obținerea rezultatelor testelor de laborator^{3,23,24,25}. Timpul de diagnostic, din perspectiva laboratorului, este calculat de la data recepției probelor de la pacienți în laborator (tabelul II).

Tabel II. Timpul de diagnostic

Testul	Limite de timp acceptabile
Examenul microscopic pentru evidențierea BAAR	24 de ore
Cultura în mediul LJ	3-8 săptămâni
Cultura în mediul lichid	1-3 săptămâni (6 săptămâni pentru rezultatele negative)
Identificarea culturii pozitive	Imediat după pozitivare
ABG mediul lichid	14 zile de la data culturii pozitive
ABG linia întâi, mediul solid	30 zile de la data culturii pozitive
ABG linia a doua	4 săptămâni de la data culturii pozitive
Testele de biologie moleculară pentru diagnostic	48 ore

Rezultatele testelor trebuie comunicate clinicianului (telefonic, intranet) imediat după validarea lor, în mod special pentru cele pozitive la examenul microscopic, cultură, test genetic sau fenotipic de sensibilitate. Se eliberează imediat și buletinul semnat de către șeful de laborator care a validat rezultatele.

Rezultatele trebuie, de asemenea, să fie înregistrate imediat și în baza națională de date a PNPSCT pentru cunoașterea în timp real a situației din țară.

Întârzierea diagnosticului are impact în dinamica transmiterii, a măsurilor de prevenire și în controlul infecției TB, putând fi unul dintre factorii decisivi în controlul TB, de aceea sunt necesare măsuri pentru scurtarea timpului de diagnostic în ansamblu.

Resursele umane

Corectitudinea rezultatelor analizelor efectuate de un laborator poate fi influențată de mai mulți factori, dintre care cel mai important este factorul uman¹⁵.

Calificarea și numărul personalului necesar în fiecare laborator sunt dependente de funcțiile și responsabilitățile care îi revin în cadrul laboratorului, dar și al rețelei de micobacteriologie.

Pentru realizarea obiectivelor PNPSCT în condiții de diagnostic cu calitate asigurată, este necesară încadrarea corespunzătoare cu personal calificat, în acord cu volumul de lucru realizat și estimat.

Particularitatea activității în laboratoarele de micobacteriologie constă în faptul că¹⁵:

- numărul de examene bacteriologice/pacient este standardizat,
- necesarul de examene bacteriologice se poate estima pentru perioade îndelungate de timp,
- cantitatea de muncă poate fi echitabil repartizată în cadrul laboratorului,
- personalul acestor laboratoare este instruit special pentru folosirea tehnicilor standardizate de lucru pentru diagnosticul bacteriologic al TB,
- personalul este instruit pentru a înțelege semnificația și consecințele rezultatelor eronate,
- personalul lucrează în concordanță cu sistemul de management al calității implementat în cadrul rețelei laboratoarelor de micobacteriologie.

Numărul frotiurilor colorate ZN examinate zilnic de către un microscopist nu trebuie să depășească 20³, datorită oboselii care se instalează și a riscului de deteriorare a calității rezultatelor. Totuși, calitatea poate fi menținută doar dacă microscopistul examinează săptămânal cel puțin 10–15 frotiuri³.

Activitatea de diagnostic trebuie să fie asigurată fără întrerupere, motiv pentru care este necesar ca într-un laborator să existe mai multe persoane instruite și implicate în activitatea zilnică pentru tehnicile de lucru folosite.

La stabilirea necesarului de instruire trebuie avute în vedere⁹:

- deficiențele în stăpânirea tehnicilor de lucru (apreciate prin participarea la scheme de comparare interlaboratoare, CIC - cu evaluarea periodică a indicatorilor realizați, observarea directă),
- personal nou angajat, care necesită instruire referitoare la normele de biosiguranță și pregătire teoretică și practică pentru metodele pe care le va efectua,
- introducerea de metode noi în practica de rutină,

- achiziția de echipament nou,
- modificări în situația epidemiologică locală,
- modificarea statutului și responsabilităților laboratorului.

Atragerea de personal spre laboratoarele de micobacteriologie se poate realiza prin introducerea unui modul dedicat diagnosticului TB în curricula de învățământ a medicilor rezidenți, a biologilor/chimiștilor și asistenților de laborator.

4. Algoritmul de diagnostic al tuberculozei

În activitatea de diagnostic trebuie să se țină seama de algoritmul de diagnostic recomandat de PNPSCT⁵ (fig. 2).

În funcție de dotarea laboratorului, experiența personalului și solicitarea clinicianului, ținând seama de categoria de caz, se va selecta calea de urmat pentru fiecare situație:

- a. Produsele provenite de la toate cazurile (cazuri noi, recidive, monitorizare) se **prelucrează obligatoriu pentru examen microscopic și cultură pe mediul LJ**, indiferent ce alte metode se pot folosi într-un laborator. Se prelucrează și se însămânțează pe mediul LJ toate tipurile de produse patologice, cu excepția sângelui pentru hemoculturi, care necesită sistem special de cultivare (centrifugare-liză).
- b. Este obligatorie folosirea testului imunocromatografic Ag MPT64 pentru confirmarea apartenenței culturilor la *complexul M. tuberculosis*, atât pentru **culturile pozitive din mediul lichid, cât și pentru cele din mediul solid**. Culturile cu rezultat negativ la acest test se trimit la LNR de arondare pentru identificare, cu această mențiune. Se va menționa și produsul patologic pentru care s-a făcut cultura și rezultatul semicantitativ al examenului microscopic și al culturii din mediul solid sau dacă este pozitiv doar în mediul lichid.
- c. Dacă este un caz **eligibil pentru cultivare în mediul lichid**, respectiv *suspect de tuberculoză cu rezistență* (contact cu un caz MDR, abandon repetat, recidivă, colectivitate supraaglomerată, persoană fără adăpost), *pacient infectat HIV suspect de TB*, *copil suspect de TB*, cel puțin unul dintre produsele prelucrate se va însămânța atât pe două tuburi cu mediul LJ cât și un tub cu mediul lichid în sistem automat (celălalt produs însămânțându-se doar pe mediul LJ).
- d. Se **exclud** de la însămânțarea în mediul lichid în sistem MGIT 960 urina și sângele (pentru acesta din urmă se folosesc sisteme speciale).
- e. **Produsele pozitiv BAAR se pot testa genetic prin test direct** pentru confirmarea MTB și evidențierea modificărilor indicatoare de rezistență la RMP sau RMP/INH (GeneXpert MTB/Rif, respectiv GenoType-MTBDRplus). **Cazurile eligibile: suspect de TB cu rezistență¹⁴** (contact cu un caz MDR, abandon repetat, recidivă, colectivitate supraaglomerată, persoană fără adăpost), *pacient infectat HIV suspect de TB*, *copil suspect de TB*.
- f. În cazurile HIV pozitiv sau spută de la copii, se pot testa genetic (folosind GeneXpert MTB/Rif) și cazuri negative BAAR la microscopie.
- g. **Culturile pozitive după 4 luni de la începerea tratamentului și toate culturile izolate după fiecare 6 luni de la ABG anterioară** se testează genetic pentru detectarea rezistenței RMP/INH și prin metodă fenotipică rapidă folosind mediul lichid în sistem automat, urmată de metodă convențională (metoda proporțiilor în mediul Lowenstein Jensen), față de substanțele anti-TB de linia I și linia II. Testarea folosind cele două metode se va menține până la câștigarea experienței necesare obținerii unor rezultate de încredere la testarea în mediul lichid.
- h. **Nu se face test genetic direct** pentru produsele recoltate în cursul monitorizării, indiferent de rezultatul examenului microscopic, rezultatele nefiind concludente. Pentru aceste cazuri se poate face test genetic indirect (i) folosind cultura din mediul lichid

sau mediul solid, urmat de testele fenotipice pentru confirmarea rezistențelor.

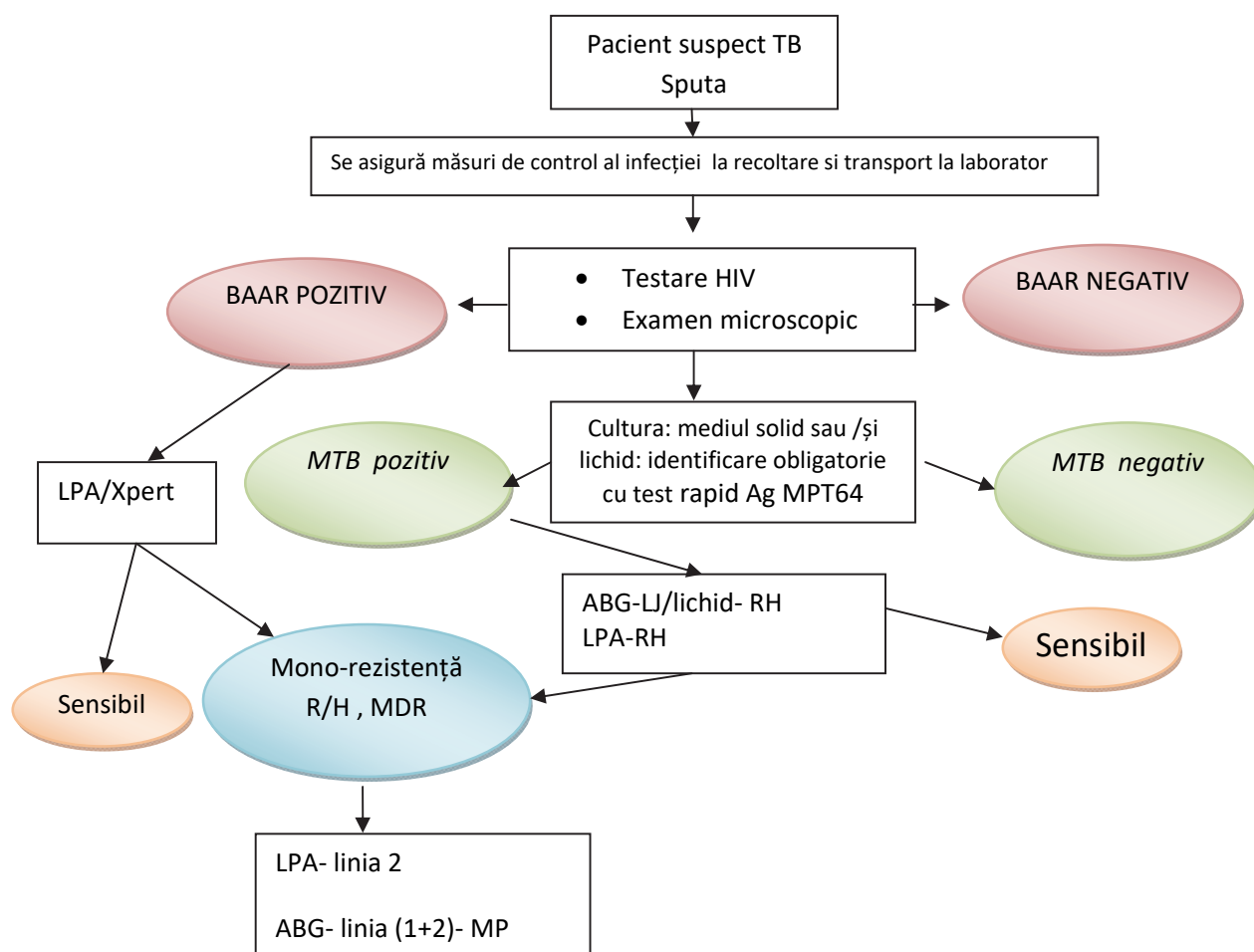


Figura 2. Algoritm de selectare a cazurilor pentru teste rapide fenotipice și de biologie moleculară

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

- i. **Cultura pozitivă de la T₀ pentru cazul nou microscopic negativ, contact cu un caz TB - MDR** se trimite la un laborator care are în dotare echipament GenoType-LPA sau GeneXpert pentru examinare preliminară. Dacă se evidențiază modificări sugestive pentru rezistență la RMP sau/și INH, laboratorul respectiv trimite imediat cultura respectivă la LNR de arondare pentru a fi testat prin metodă rapidă (GenoType MTBDRsl) și metodă convențională față de substanțele anti-TB de linia I și linia II.
- j. Pentru pacienții cu rezistență confirmată la RMP (GeneXpert) sau TB-MDR (GenoType MTBDRplus) prin test direct, trebuie efectuată imediat testarea moleculară pentru linia a doua (GenoType MTBDRsl) ca test initial, pentru orientarea rapidă a terapiei, în loc de

testarea fenotipică pentru detectarea rezistenței la fluoroquinolone.^{14a} **Culturile de la pacienții TB-MDR cunoscuți se trimit imediat după izolare la LNR de arondare și se efectuează test genetic indirect pentru detectarea rezistenței la aminoglicozide/poliptide și fluoroquinolone (pentru orientarea rapidă a terapiei) și se face ABG pentru substanțe de linia I și linia a II-a prin metodă fenotipică rapidă (mediul lichid) și prin metodă convențională (mediul solid).** (Rugăm revedeți și punctul g, referitor la intervalul de timp între testări) .

- k. **Orice cultură pozitivă (mai mult de 10 colonii) crescută după conversia bacteriologică se va testa prin metodă genetică indirectă (GenoType-LPA) și metodă fenotipică rapidă - mediul lichid, pentru substanțe de linia I;**
- l. **Pentru supravegherea dinamicii prevalenței MDR se vor efectua teste fenotipice de sensibilitate la *INH* și *RMP* la toate culturile pozitive cu mai mult de 10 colonii, obținute din produsul recoltat înainte de începerea tratamentului,** chiar dacă testul genetic direct efectuat nu a pus în evidență modificări sugestive de rezistență. ABG se efectuează în laboratoarele de nivel III care au implementat sistemul de management al calității, care au obținut rezultate excelente și foarte bune la controlul extern al calității cel puțin pentru RMP și INH.

Este posibil să fie semnalate situații epidemiologice noi, particulare pentru o anumită zonă, de aceea se vor lua în considerare recomandările referitoare la triajul pacienților, metodele folosite, a relațiilor dintre clinică și laborator, care vor fi comunicate de către PNPSCT.

5. Înregistrări. Formulare de solicitare. Registre.

Pentru solicitarea examinărilor vor fi folosite formularele recomandate de PNPST, anexele 8, 9 și 11 din Ghid metodologic de implementare a Programului Național de Prevenire, Supraveghere și Control al Tuberculozei. București, 2015 ⁵., sau ultima revizie a sa, recomandată de PNPSCT

Bibliografie

1. F. Drobniowski, V. Nikolayevskyy, Y. Balabanova, D. Bang, D. Papaventsis. Diagnosis of tuberculosis and drug resistance: what can new tools bring us? *INT J TUBERC LUNG DIS* 16(7):860–870.
2. Karin Weyer. Review of WHO TB diagnostics policy development. GLI Meeting: Les Pensières, Annecy, France : 17 -19 April 2012.
3. WHO. Policy Framework for Implementing New Tuberculosis Diagnostics, 2011, March.
4. A Roadmap for Ensuring Quality Tuberculosis Diagnostics Services within National Laboratory Strategic Plans Prepared by The Global Laboratory Initiative Advancing TB Diagnosis. First Issue 20th January 2010, World Health Organization 2010.
5. Ghid metodologic de implementare a Programului Național de Prevenire, Supraveghere și Control al Tuberculozei. București, 2015. ISBN 978-973-139-325-4. Ordinul Ministerului Sănătății nr. 1171/21.09.2015
6. Strategia Națională de Control al Tuberculozei în România 2015-2020. Guvernul României Hotărâre nr. 121 din 25 februarie 2015.
7. De Kantor IN, Kim SJ, Frieden T, and col. Laboratory services in tuberculosis control, part II: Microscopy, WHO/TB/98.258, 1998
8. Rieder HL, Chonde TM, Myking H, Urbanczik R, Laszlo A, Kim SJ, Van Deun A, Trebuch A- The public Health service national tuberculosis reference laboratory and the national laboratory network, IUATLD, 1998.
9. American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America: Controlling Tuberculosis in the United States. *Am J Respir Crit Care Med* Vol 172. pp 1169–1227, 2005 DOI: 10.1164/rccm.2508001, Internet address: www.atsjournals.org
10. WHO. Policy statement on fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis. Geneva, 2010. <http://www.who.int/tb/laboratory/>
11. Andrew J. Brent, Daisy Mugo, Robert Musyimi, Agnes Mutiso, Susan Morpeth Michael Levin, J. Anthony G. Scott. Performance of the MGIT TBc Identification Test and Meta-Analysis of MPT64 Assays for Identification of the Mycobacterium tuberculosis Complex in Liquid Culture. *J.Clin.Microbiol*, Dec. 2011, p. 4343–4346 Vol. 49, No. 12; 0095-1137.
12. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis – 4th ed. WHO/HTM/TB/2009.422
- 12a. David J.Horne, Lancelot M. Pinto, Matthew Arentz, S.Y. Grace Lin, Edward Desmond, Laura L. Flores, Karen R Steingart, Jessica Minion. Diagnostic accuracy and reproducibility of WHO endorsed phenotypic susceptibility testing methods for first-line and second line antituberculosis drugs. *JCM*, Febr 2013: 51(2), 393-401.
13. Dominguez J, EC Boetger, D Cirillo, F Cobelens, KD Eisenach, S Gagneaux, D Hilleman, R Horsburgh, B Molina-Moya, S Nieman, E Tortoli, A Whitelaw, C Lange. Clinical implications of molecular drug resistance testing for Mycobacterium tuberculosis: a TBNET/RESIST_TB consensus statement. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2015, 20(1):24-42.
14. World Health Organization. Policy statement. Molecular line probe assay for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant (MDR) TB. Geneva, 2008.

- 14a. The use of molecular line probe assays for the detection of mutations associated with resistance to fluoroquinolones (FQs) and second-line injectable drugs (SLIDs). Policy guidance. WHO/HTM/TB/2016.07
15. Daniela Homorodean, Olga Moldovan, Mihaela Stoian, Mihaela Brojboiu, Grația Chiriac, Ionela Sorina Muntean, Domnica Ioana Chiotan, Iuliana Nicolae, Constantin Marica, Nicolae Galie. Organizarea si managementul laboratorului de micobacteriologie, Bucuresti 2008, Ed Totem, ISBN:978-973-0-05558-0.
16. ORDIN MS nr. 1.301 din 20 iulie 2007 (*actualizat*) pentru aprobarea Normelor privind funcționarea laboratoarelor de analize medicale (actualizat până la data de 2 aprilie 2008*).
17. HG 856/2002. Clasificarea deșeurilor medicale
18. Ord MS 261/ 2007. Curățenia Dezinfecția. Sterilizarea.
- 18a. Ordinul nr. 961/2016 pentru aprobarea Normelor tehnice privind curățarea, dezinfecția și sterilizarea în unitățile sanitare publice și private, tehnicii de lucru și interpretare pentru testele de evaluare a eficienței procedurii de curățenie și dezinfecție, procedurilor recomandate pentru dezinfecția mâinilor, în funcție de nivelul de risc, metodelor de aplicare a dezinfectantelor chimice în funcție de suportul care urmează să fie tratat și a metodelor de evaluare a derulării și eficienței procesului de sterilizare
19. Tuberculosis Laboratory Biosafety Manual, WHO, 2012.
20. Friedman C. Newsom W. Basic Concepts of Infection Control. International Federation of Infection Control, 2007.
21. Linda Oskam, Tjeerd Datema, Paul Klatser..TB laboratory performance indicators to measure the effect of ISO 15189 QMS implementation. KIT Biomedical Research, Amsterdam, The Netherlands, www.kit.nl
22. TB Microscopy Network Accreditation. An assessment tool. First English Edition, October 2013. A publication of the Global Laboratory Initiative a Working Group of the Stop TB Partnership.
23. Chandrashekhar T Sreeramareddy, Kishore V Panduru, Joris Menten, J Van den Ende. Time delays in diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review of literature. BMC Infectious Diseases 2009, 9:91 doi:10.1186/1471-2334-9-91
24. WHO. Noncommercial culture and drug-susceptibility testing methods for screening patients at risk for multidrug-resistant tuberculosis. Policy statement. WHO/HTM/TB/2011.9
25. S.R. Ritchie, A.C. Harrison, R.H. Vaughan, L. Calder" and A.J. Morris. New recommendations for duration of respiratory isolation based on time to detect Mycobacterium tuberculosis in liquid culture. Eur Respir J 2007; 30: 501–507