

الله اعلم



Importance of phenotypic identification and drug susceptibility in Mycobacteria

اهمیت تعیین هویت فنوتیپیک و حساسیت دارویی در مایکوباکتریوم ها

سیروس امینی

مشاور و کارشناس ارشد فنی سل

آزمایشگاه مرجع منطقه ای سل تهران

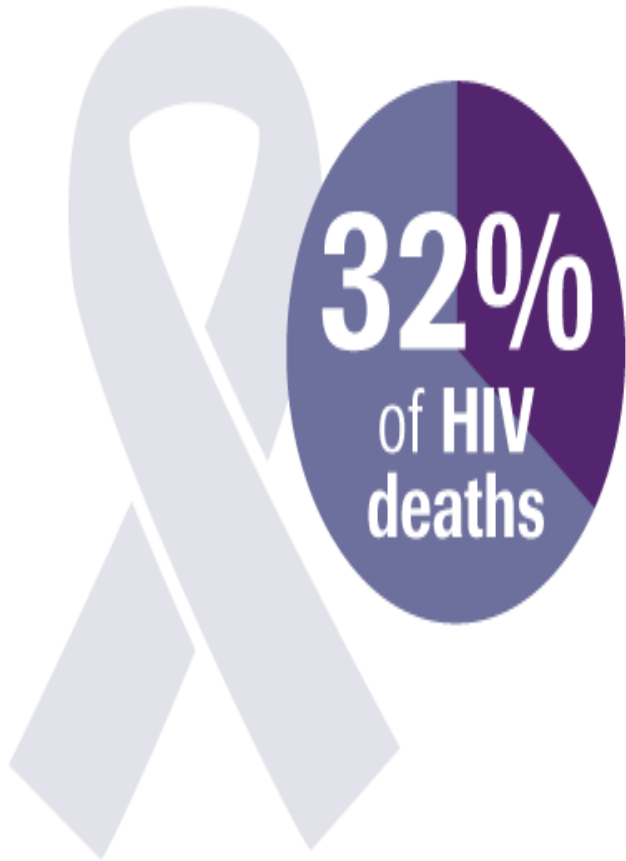
نوزدهمین کنگره ارتقای کیفیت خدمات آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران

اوردیبهشت ۱۴۰۱

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (MTB, TB) همچنان یک چالش جهانی است

- در سال ۲۰۱۸، تخمین زده می شود که ۱۰ میلیون نفر به سل مبتلا بوده و ۱.۵ میلیون نفر جان خود را از دست داده اند. تقریباً ۳۰ درصد از عفونت های جدید تشخیص داده نشده یا شناسایی شده اند اما گزارش نشده اند و مقاومت دارویی در حال افزایش است. عفونت همزمان با اچ آی وی و سایر عوامل بیماری زا، تشخیص و مراقبتی بیماران را پیچیده تر می کند. با وجود این اعداد، سل قابل درمان است.

چالش تشخیص



Occurred in patients
with a TB co-infection

- در سطح جهان، یک سوم مرگ و میرهای HIV به سل مبتلا بوده اند که هم تشخیص و هم درمان را پیچیده می کند. در برخی از مناطق جغرافیایی، میزان عفونت همزمان نزدیک به ۷۰٪ است.

• در حالی که سل در سراسر جهان انسان را مبتلا می کند تشخیص سریع، دقیق و با حساسیت زیاد سل و نشانه های مقاومت، برای شروع درمان مناسب، حیاتی است.

مقاومت ضد میکروبی

500,000

new cases of MDR/RR-TB*



*Multidrug- and rifampicin-resistant tuberculosis

- مقاومت (MDR) همچنان یک تهدید فزاینده برای سلامت جهانی است. تخمین زده می شود که سل عامل یک سوم مرگ و میر ناشی از MDR باشد. برای مبارزه با این تهدید سلامتی، هر بیمار سلی که مثبت بودن آن تایید شود باید حداقل یک آزمایش مقاومت دارویی خط اول دریافت کند.

Nontuberculous Mycobacteria

مایکوباکتریوم غیر سل

- مانند سل، عفونت‌های مایکوباکتریوم غیر سل (NTM) یک چالش بهداشتی رو به افزایش در جمعیت‌های خاص است. اگرچه NTMها را می‌توان بر روی سطوح بدن و در ترشحات بدون ایجاد بیماری یافت، اما با چهار سندرم بالینی مجزا همراه است. بیماری پیشرونده ریوی، بیماری منتشر در بیماران شدیداً نقص ایمنی، و عفونت‌های پوست و بافت نرم (از جمله لنفاوی)

4 distinct clinical syndromes



Progressive pulmonary disease



Disseminated disease



Cutaneous



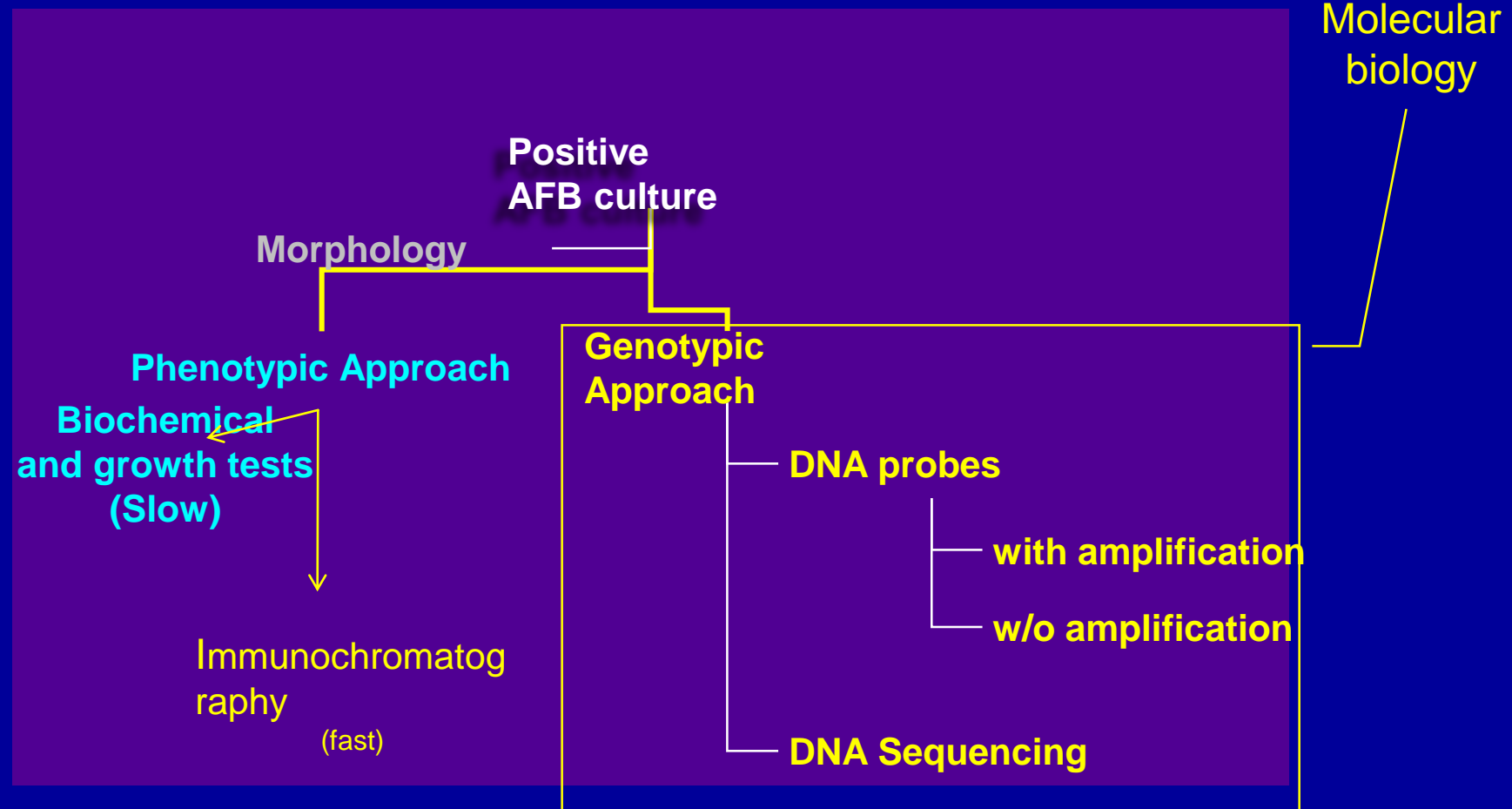
Lymphatic disease

رئوس مطالب

- شناسایی قطعی *M. tuberculosis*
- آزمون های کشت:
 - آزمایشات بیوشیمیایی:
 - نیاسین
 - احیاء نیترات
 - کاتالاز
- روش ایمونوکروماتوگرافی

استفاده از تست های بیوشیمیایی در ترکیب با ویژگی های رشد کلنی ها شناسایی دقیق **MTB** را در بیش از ۹۵ درصد موارد امکان پذیر می کند.

M. tuberculosis identification



Phenotypic approach: biochemical tests

معایب:

- زمان چرخه کاری طولانی
- تخصص فنی مورد نیاز است
- محدود به کشت های جامد

مزایای:

- ارزان
- شناسایی گروه MTB
- نتایج قابل اعتمادی برای برخی از MOTT می دهد

Immunochromatography: fast (<1 h), applicable to solid and liquid cultures

Genotypic approach

معایب:

- گران
- به تجهیزات اختصاصی نیاز دارد
- نیاز به تخصص فنی دارد
- روش های سنتی هنوز برای کشت و DST مورد نیاز است

مزایای:

- سریع
- قادر به تمایز بین اعضای مجتمع MTB
- NTM را شناسایی می کند
- نگرانی های ایمنی زیستی کمتر

Content outline

- روش های تست حساسیت دارویی: proportional method
 - مستقیم
 - غیر مستقیم
- روش تناسبی: پروتکل فنی و معیارهای تفسیر
- ثبت و گزارش نتایج DST
- ذخیره سازی سویه ها

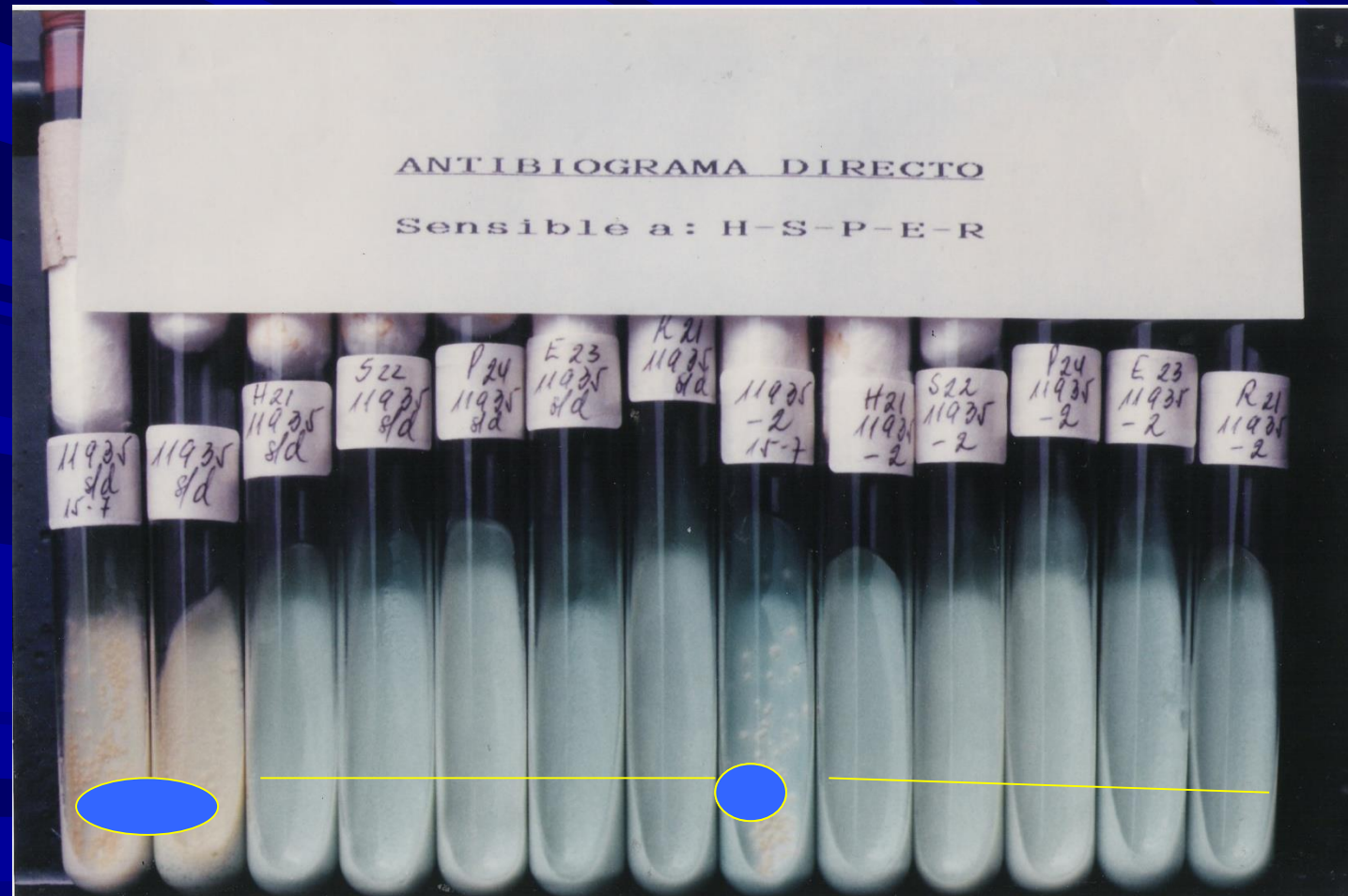
- Drug Susceptibility Testing for
- *Mycobacterium tuberculosis complex*

■ Turnaround Times

Direct drug susceptibility method: proportion method

- خلط با درجه بندی اسمیر ۱+ یا بیشتر می تواند به عنوان کشت خالص پس از آلودگی زدایی با استفاده از روش استاندارد استفاده شود.
- سوسپانسیون خنثی شده برای تلقیح مستقیماً بر روی محیط های حاوی دارو و بدون دارو، طبق روش نسبتی استفاده می شود.
- اندازه تلقیح با توجه به تعداد AFB مشاهده شده در طول میکروسکوپ اسمیر خلط تغیز شده تنظیم می شود.

Example of a susceptibility test, proportion method,
inoculated directly after decontamination from the sample
(4 AFB/field)



Direct drug susceptibility method: advantages

- جمعیت‌های باسیلی نماینده بهتری از آنهایی هستند که در داخل بدن وجود دارند.
- ۳ تا ۴ هفته کمتر از آزمایش غیر مستقیم طول می‌کشد.

Direct drug susceptibility method: disadvantages

- فقط برای اسمیر مثبت.
- در کشت مایع امکان پذیر نیست.
- میزان آلودگی بالا
- قاعده و روشمند کردن آن مشکل است (باسیل های زنده + مرده).
- میزان شکست: ۱۰-۱۵٪

Indirect drug susceptibility methods

* اورگانيسم های جدا شده در کشت

* یک سوسپانسیون همگن رشد، روی محیط جامد بر پایه تخم مرغ، شاهد و حاوی دارو، تلقیح می شود.

Indirect drug susceptibility method: proportion method

- روش نسبی پرکاربردترین روش برای DST است و در حال حاضر به عنوان مرجعی برای آزمایش روش های جدید استفاده می شود.
- روش نسبت، درصد رشد (تعداد کلنی ها) یک تلقیح تعریف شده را روی یک محیط کنترل بدون دارو در مقابل رشد روی محیط کشت حاوی غلظت بحرانی یک داروی ضد سل را تعیین می کند.
- غلظت بحرانی دارو، و همچنین نسبت بحرانی کلنی های مقاوم، از داده های بالینی ارزیابی شده است.

Indirect proportion method

■ کشت خالص باسیل سل (سویه آزمایشی) در فاز فعال رشد (۲-۴ هفته). در غیاب رشد کافی (کمتر از ۲۰ کلنی، +۱)، DST نباید انجام شود، مگر اینکه کشت از بیماری باشد که درمان ضد سل را دریافت میکند.

MODS is highly

- sensitive (pooled estimate 98%; 95CI 95% - 99%) and specific (pooled estimate 99%; 95CI 96% - 100%) for the detection of rifampicin resistance and slightly less so for
- isoniazid (pooled sensitivity 91%; 95CI 87% - 95%). High sensitivity and specificity are
- retained in direct MODS testing.

- First-line DST should be reported within 20 days after positive MTBC culture report (CDC guidance for public health laboratories)
- **A Clinician's Guide**
- **to the TB Laboratory**

HEARTLAND  **IND**

NATIONAL TB CENTER

THE UNIVERSITY OF TEXAS HEALTH SCIENCE CENTER AT TYLER

پژوهش های اجرا شده در آزمایشگاه مرجع منطقه ای سل تهران

<p>مجری</p>	<p>استفاده از روش مستقیم تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی جهت مایکوباکتریوم توپرکلوزیس: (مطالعه در چندین مرکز)</p> <p>Direct Drug susceptibility testing of Mycobacterium Tuberculosis Using the Propotional method: a Multicenter Study</p> <p>Published in The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease 2018</p>	<p>آزمایشگاه مرجع سل منطقه ای تهران - ۱۳۹۷</p>
<p>همکار اصلی</p>	<p>شناسایی، ژنوتایپینگ و الگوی حساسیت دارویی مایکوباکتریوم های جدا شده در بیماران HIV مثبت</p> <p>Identification, Genotyping and Drug Susceptibility Pattern of Mycobacteria Isolated from HIV Positive Patients at Tehran, Iran</p>	<p>آزمایشگاه مرجع سل منطقه ای تهران - ۱۳۹۷</p>
<p>مجری</p>	<p>Osteoarticular TB: Evaluation of the accuracy and efficiency of Xpert MTB/RIF assay implementation compared with culture and direct smear for bone and joint tuberculosis detection</p>	<p>آزمایشگاه مرجع سل منطقه ای تهران - ۱۳۹۶</p>
<p>همکار اصلی</p>	<p>شناسایی مایکوباکتریومهای غیرسلی باروشهای فنوتیپی؛ realtime pcr ; pcr sequencing; multiplex و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله ها</p>	<p>آزمایشگاه مرجع سل منطقه ای تهران - ۱۳۹۶</p>
<p>مجری</p>	<p>بررسی مقاومت به پیرازینامید در افراد مسلول مراجعه کننده به آزمایشگاه مرجع سل منطقه ای تهران</p>	<p>آزمایشگاه مرجع سل منطقه ای تهران - ۱۳۹۷</p>
<p>همکار اصلی</p>	<p>استفاده از نانوبیوسنسور طراحی شده بر مبنای سطوح نانوساختاری نقره برای تشخیص سریع مایکوباکتریوم توپرکلوزیس</p>	<p>آزمایشگاه مرجع سل منطقه ای تهران - ۱۴۰۰</p>



Direct drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using the proportional method: A multicenter study

Sirus Amini ^a✉, Sven Hoffner ^b, Mohammad Reza Allahyar Torkaman ^a, Gholamreza Hamzehloo ^a, Mohammad Javad Nasiri ^c, Mahshid Salehi ^d, Golnar Sami Kashkooli ^e, Mohammad Sadegh Shahraki ^f, Maryam Mohsenpoor ^g, Saman Soleimanpour ^h, Raha Mir ^h

^a Regional Tuberculosis Reference Laboratory, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

^b Swedish Institute for Infectious Disease Control, Stockholm, Sweden

^c Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

^d Regional Tuberculosis Reference Laboratory, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

^e Tuberculosis Reference Laboratory, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

^f Regional Tuberculosis Reference Laboratory, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

^g Tuberculosis Reference Laboratory, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

^h Antimicrobial Resistance Research Center, Bu-Ali Research Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Received 24 October 2018, Revised 10 December 2018, Accepted 30 December 2018, Available online 7 January 2019, Version of Record 13 May 2019.

استفاده از روش مستقیم تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی جهت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس: (مطالعه در چندین مرکز)
Direct Drug susceptibility testing of Mycobacterium Tuberculosis Using the Proportional

نکات برجسته

- سل مقاوم به چند دارو (**MDR-TB** یکی از تهدیدهای مهم در ایران است.
- تست حساسیت دارویی غیرمستقیم مرسوم (**DST**) مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با محیط جامد ارزان و قابل اعتماد است، اما زمان بر است.
- **DST** مستقیم روی محیط جامد این پتانسیل را دارد که زمان تشخیص مقاومت دارویی را در صورت استفاده مستقیم بر روی نمونه های اسمیر مثبت خلط به میزان قابل توجهی کاهش دهد.
- نشان داده شد که **DST** مستقیم روی محیط جامد نتایج قابل اعتمادی را در مراحل بسیار زودتر از **DST** فنوتیپی معمولی ارائه می دهد.
- روش مستقیم سریع تر، دقیق تر و ساده تر بود. علاوه بر این، کار با باکتری های بیماری زا را کاهش می دهد و در نتیجه خطرات زیستی مربوط به **DST** معمولی را کاهش می دهد.

بررسی مقاومت به پیرازینامید در افراد مسلول مراجعه کننده به آزمایشگاه مرجع سل منطقه ای تهران

- پیرازینامید یک داروی ضروری خط اول در درمان سل می باشد. این دارو نقش مهمی در درمان افراد آلوده به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس که حداقل مقاوم به ریفامپین و ایزونیاژید هستند را داشته و استفاده از این دارو به ویژه در دو ماه اول درمان، دوره درمان را از ۹ الی ۱۲ ماه به ۶ ماه کاهش می دهد. علاوه بر این پیرازینامید با فعالیت بهتر در شرایط اسیدی باسیل های نهفته (semidormant) را مورد هدف قرار داده و نقش کلیدی را در کاهش میزان عود بیماری ایفا می کند. بنابراین اهمیت غیرقابل انکار پیرازینامید در درمان سل نیاز به تعیین مقاومت این دارو را ضروری می نماید.

روش کار

- در این طرح پایلوت مقاومت دارویی ۳۷ ایزوله مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به دارو و ۸ ایزوله حساس به دارو در مقابل پیرازینامید بررسی شد. مقاومت به داروهای خط اول با روش تناسبی تعیین شده و برای بررسی مقاومت داروهای خط دوم از روش **Line Probe assay** استفاده شده است. برای تعیین حساسیت داروی پیرازینامید از محیط میدل بروک 7H11 با pH برابر ۶ و حاوی غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر آنتی بیوتیک پیرازینامید در نظر گرفته شد. سویه H37Rv به عنوان استاندارد حساس و سویه م. بوویس به عنوان مقاوم به پیرازینامید مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج:

- از بین ایزوله های مقاوم، ۶ ایزوله تک مقاومتی به ریفامپین (Rif-R)، ۲۰ ایزوله مقاوم به چنددارو (MDR)، ۸ ایزوله مقاوم به یکی از کوئینولون ها یا آمینوگلیکوزیدها (Pre-XDR) و ۳ ایزوله XDR (مقاومت همزمان حداقل به یکی از کوئینولون ها و آمینوگلیکوزیدها) بدست آمد. طبق این مطالعه از میان ۳۷ ایزوله مقاوم، ۲۶ عدد (۷۰٪) ایزوله مقاوم به پیرازینامید شناسایی شدند که از این بین ۴، ۱۵، ۵ و ۲ مورد به ترتیب Rif-R، MDR، Pre-XDR و XDR بودند. مقاومت به پیرازینامید در بین نمونه های حساس مشاهده نشد.

بحث ونتیجه گیری:

- با توجه به اهمیت پیرازینامید و شرایط خاص تعیین حساسیت این دارو در روش تناسبی، با بررسی بیشتر و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و پایش مولکولی می توان روش تناسبی مرسوم (proportional) را برای حصول نتایج قابل اعتماد در آزمایشگاه های سل راه اندازی کرد.

اهمیت تعیین هویت فنوتیپیک مایکوباکتریوم ها

➤ با توجه به افزایش مایکوباکتریوم های غیر معمول (غیرتوبرکلوز) که حاصل موتاسیون در محیط زیست می باشند، ضروری است نمونه های مثبت منجر به تشکیل کلنی به روشهای ساده و ارزان تعیین هویت شوند تا برای درمان تصمیمات درستی گرفته شود.

➤ در بخش سل آزمایشگاه رفرانس دانشگاه تهران در سال ۱۴۰۰ از بین حدود ۵۰۰۰ مورد آزمایش به روش کشت و اسمیر، ۱۱ درصد مثبت و از بین آنها، ۴.۸ درصد مایکوباکتریوم های غیر توبرکلوز به روش فنوتیپی با استفاده از تولید رنگدانه، زمان رشد و قوام باکتری و در نهایت تست های شیمیایی شناسایی شد. البته ما به نقاط ضعف و قوت روش های بکارگیری واقفیم، بدین دلیل تنها متکی به روش های فنوتیپی نیستیم. اما از نقاط قوت مهم این روش، سادگی، ارزان بودن و داشتن تاییدیه WHO است.

سایر فعالیت ها

➤ در این آزمایشگاه، تعیین حساسیت دارویی به روش proportional بر روی تمامی نمونه های مثبت منجر به کلنی انجام گرفته و ۵ مورد MDR و RR تشخیص داده شد. گروه ما توانست آنتی بیوگرام داروی بسیار مهم و تایین کننده پیرازینامید را از نظر PH و غلظت دارو setup کند و این روش را به آزمایشگاه سوپرنشنال سوئد اعلام کردیم.

شایعترین مایکوباکتریوم های غیر توبرکلوز تشخیص داده شده در سال ۱۴۰۰

- از گروه فتوکروموژن ها:

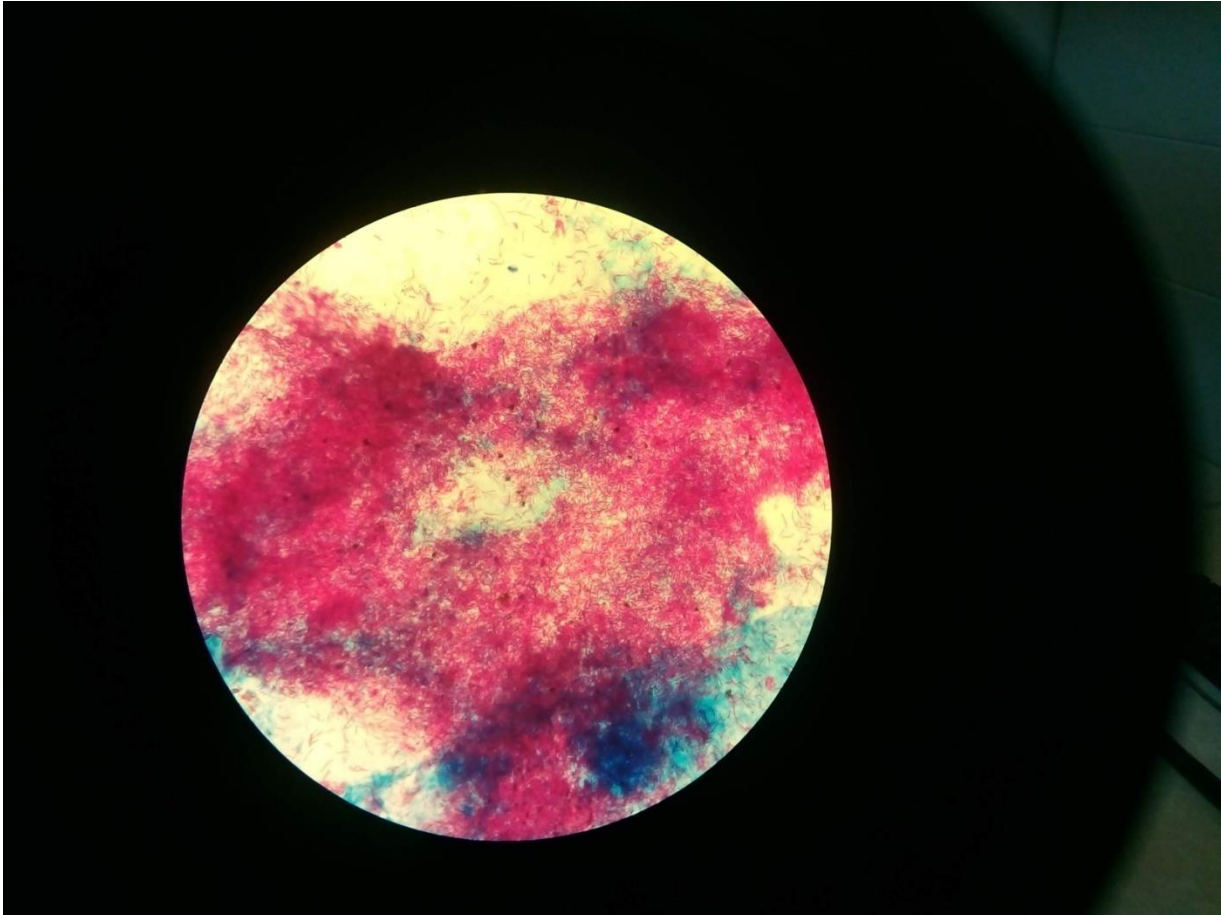
- مایکوباکتریوم کانزاسی
- مایکوباکتریوم سیمیه

- مایکوباکتریوم های غیر شایع تشخیص داده شده:

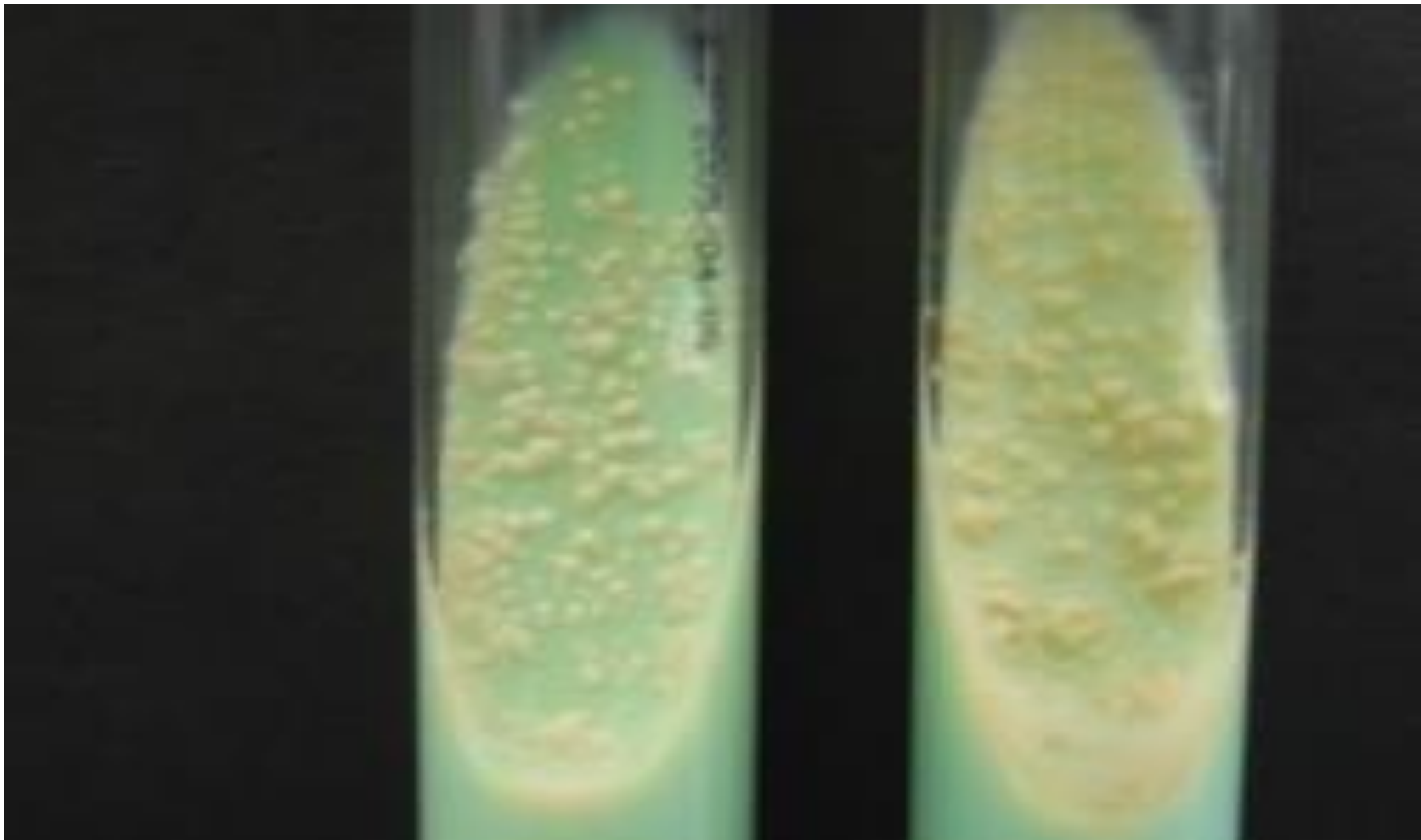
- مایکوباکتریوم جنائسه از بیمار HIV مثبت و HCV مثبت جدا شده
- مایکوباکتریوم پرگرینوم از بیماری که اول با MTB شروع درمان شد و در حین درمان با مایکوباکتریوم پراگرینوم آلوده شد
- آلودگی درصد اندکی از بیماران MTB به NTM حین درمان یک اتفاق غیر معمول نیست

➤ تعیین حساسیت دارویی علاوه بر داروهای خط یک درمان شامل پیرازینامید، اتامبوتول، ایزونیاژید و ریفامپین، در خط دوم درمان نیز شامل Am, MFX, LVX انجام میشود.

➤ امیدواریم در آینده نزدیک داروهای خط سوم را نیز وارد آنتی بیوگرام کنیم.







DIAGNOSIS OF TUBERCULAR INFECTIONS



MAJ (DR) ROHIT VIKAS
MS (ORTHO)

