

Switzerland, World Health Organization. 2006 (WHO/HTM/STB/2006.35).

12. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2008. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2008.393).

13. Laboratory services in tuberculosis control. Culture, Part 111, 1998, P. 95 (WHO/TB/98/258).

14. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. WHO/HTM/TB/2010.3.

15. Treatment of tuberculosis: guidelines- 4th ed. WHO/HTM/TB/2009.420.

16. The global plan to stop TB 2011-2015: transforming the fight towards elimination of tuberculosis. WHO, 2010.

17. Towards universal access to diagnosis and treatment of multidrug-resistant extensively drug-resistant tuberculosis by 2015, WHO Progress Report 2011, WHO/HTM/TB/2011.3.

Rezumat

Analiza răspândirii RM/MDR/RML a MBT în perioada 2007-2011 din 13 regiuni ale FR cu utilizarea metodelor internaționale (alinieră teritoriilor după gradul de precizie și reprezentativității datelor despre RM a MBT) și metodelor statistice federale, a evidențiat interdependența calității controlului RM și frecvența depistării MDR/RML a MBT. Realizarea monitoringului permanent permite estimarea stării epidemiologice a tuberculozei chimiorezistente și luarea măsurilor oportune la nivel de conducere. Creșterea ratei MDR și scăderea eficienței tratamentului mai frecvent se urmărea la pacienții care la depistare li se administra HREZFqKm/Am/Cm, care induce amplificarea rezistenței MBT către drogurile de bază (mai frecvent H) și către celor de rezervă (mai frecvent Fq).

Cuvinte-cheie: Supraveghere epidemiologică, tuberculoză, chimiorezistență, monitoring.

Summary

The analysis of prevalence of DR/MDR/XDR MTB for the period 2007-2011 from 13 regions of Russia using international approaches (ranking territories according to the degree of accuracy and representative data on DR MTB) and federal statistical tools revealed the relationship between the quality of supervision of DR and detection rate of MDR/XDR MTB. Implementing an ongoing monitoring allows to evaluate the epidemiological situation on DR TB and to manage the situation effectively. The increase of MDR MTB share and loss of efficiency of chemotherapy was more often defined in patients who at detection stage were prescribed HREZFqKm/Am/Cm, that are inducing amplification of DR MTB to the main (more often to H) and to reserve line anti-TB drugs (more often to Fq).

Keywords: Epidemiological surveillance, drug-resistant, tuberculosis, monitoring.

Резюме

Проведенный анализ распространения ЛУ/МЛУ/ШЛУ МБТ за 2007-2011 гг. из 13-ти регионов РФ с использованием международных подходов (ранжирование территорий по степени точности и репрезентативности данных о ЛУ МБТ) и федерального статистического инструментария выявил зависимость между качеством надзора за ЛУ и частотой выявления МЛУ/ШЛУ МБТ. Реализация постоянно действующего мониторинга позволяет оценивать состояние эпидемиологической ситуации по туберкулезу с ЛУ и оперативно принимать управленческие решения. Увеличение доли МЛУ МБТ и снижение эффективности химиотерапии чаще определяли среди больных, в лечении которым при выявлении были назначены HREZFqKm/Am/Cm, индуцирующие амплификацию ЛУ МБТ к основным (чаще к H) и к ПТП резервного ряда (чаще к Fq).

Ключевые слова: Эпидемиологический надзор, лекарственная устойчивость туберкулез, мониторинг.

VERSIUNEA NOUĂ A METODEI MOLECULAR GENETICE PENTRU DETECȚIA TUBERCULOZEI, PRECUM ȘI A REZISTENȚEI LA RIFAMPICINĂ ȘI IZONIAZIDĂ (LINE PROBE ASSAY GENOTYPE MTBDRPLUS VER2.0)

*Valeriu Crudu*¹, dr. în med., conferențiar cercetător, *Ecaterina Stratan*¹, cercetător științific, *Elena Romancenco*¹, cercetător științific; *Nicolae Moraru*¹ dr.hab. în med., profesor universitar, *Nadejda Turcan*¹, cercetător științific; *Vera Allerheiligen*², dr. în med., *Andreas Hillemann*². dr.hab. în med., profesor.

¹Institutul de Ftiziopneumologie "Ch. Draganiuc";

²Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germania.
e-mail: valeriu.crudu@gmail.com

Introducere

Diagnosticul rapid a tuberculozei multirezistente (TB-MD) asigură un tratament cu medicamente adecvate, reducând astfel morbiditatea, mortalitatea, costurile și transmiterea în continuare a infecției, precum și apariția unor tulpini XDR [1].

Datorită detectării rapide și sigure, metoda molecular genetică MTBDRPlus (Hain Lifescience, Nehren, Germany) a fost aprobată recent de OMS [7]. Prima versiune a acestei metode a fost evaluată cu

Tabelul 1

Rezultatele detecției CMTB prin metoda MTBDRplus ver2.0 în comparație cu datele culturale și clinice

Metoda extragerii a ADN-ului	Rezultate microscopice	Rezultate cultura și clinice pozitive (181)		Rezultate cultura negative și clinice pozitive (21)		Rezultate cultura și clinice negative (134)	
		MTBDRplus 2		MTBDRplus 2		MTBDRplus 2	
		Poz	Neg	Poz	Neg	Poz	Neg
GenoLyse (162)	Poz (40)	38	0	1	0	0	1
	Neg (122)	40	12	9	0	1	60
GenoXtract (174)	Poz (39)	39	0	0	0	0	0
	Neg (135)	39	13	11	0	0	72
Combinat (336)	Poz (79)	77	0	1	0	0	1
	Neg (257)	79	25	20	0	1	132
	Poz. + Neg.	156	25	21	0	1	133

mostre de cultură și microscopii pozitive [3]. Deoarece cantitatea de micobacterii în probele cu microscopie negativă este mica, metodele culturale erau unica șansă pentru depistarea lor. Pentru a depăși această limitare, testul MTBDRplus ver2.0 a fost îmbunătățit ca în continuare să fie posibilă detecția mycobacteriilor nu numai din culturi și microscopii pozitive dar și din microscopii negative.

Scopul studiului

Scopul principal al acestui studiu a fost de a determina utilitatea MTBDRplus ver2.0 pentru detectarea *M.tuberculosis* cât și sensibilitatea față de Rifampicină (RIF) și Isoniazidă (INH) direct din probele cu microscopie negativă a pacienților diagnostici din rutină, inclusiv pacienții aflați în tratament.

Caracteristicile de performanță ale diagnosticului au fost determinate folosind 338 de probe de spută din rutina laboratorului prin compararea rezultatelor MTBDRplus ver2.0 cu metoda microscopică, culturală (MGIT960 și Löwenstein-Jensen) și prin testarea sensibilității la preparatele antituberculoase (TS).

Rezultate

Versiunea nouă a MTBDRplus ver2.0 a fost concepută pentru a detecta și identifica *M.tuberculosis* complex în probele microscopice pozitive și negative cât și sensibilitatea la RIF și INH într-un singur test. În scopul de a evalua ambele beneficii ale testului, în primul rând versiunea nouă a fost comparată cu rezultatele culturii convenționale și rezultatele clinice ale pacientului, iar în al doilea rând cu rezultatele la DST și constatările clinice referitor la RIF și INH.

Pentru izolarea ADN-ului au fost aplicate două metode diferite de extragere: extragerea ADN-ului manual cu setul GenoLyse și metoda automa-

tă folosind chit-ul GXT ADN / ARN și dispozitivul GenoXtract. În total au fost procesate 348 de probe pulmonare.

162 probe de spută au fost utilizate pentru evaluarea performanței MTBDRplus ver2.0. Dintre aceste 39 de izolate (24,1%) au fost pozitive la metoda microscopică și conform datelor clinice, o probă (1,2%) a fost pozitiv microscopic, dar negativ clinic, 61 (37,7%) au fost microscopic negative dar clinic pozitive, și 61 (37,7%) au fost și microscopic și clinic negative (tabelul 1). 78 din cele 90 de culturi pozitive au fost, de asemenea, detectate prin MTBDRplus ver2.0. Din 72 probe negative, 11 au arătat un rezultat pozitiv prin metoda MTBDRplus ver2.0. Astfel, o sensibilitate și o specificitate de ansamblu pentru toate probele incluse în studiu, estimate cu cultura ca standard de referință a fost la 86,7% și 84,7%, respectiv. Gradul de pozitivitate a probelor negative au fost de 87,6% și 83,6%, respectiv.

Sensibilitatea și specificitatea pentru probele microscopice pozitive și negative, au fost comparate cu datele culturale și rezultatele clinice (tabelul 2).

Tabelul 2

Rezultatele detecției MTB prin metoda MTBDRplus ver2.0 cu extragerea prin GenoLyse și GenoXtract, în comparație cu metodele culturale și clinice

		Sens. (%)	Spec. (%)	PPV (%)	NPV (%)
GenoLyse	Microscopic pozitive	88,0	98,4	98,9	83,6
	Microscopic negative	80,3	98,4	98,0	83,3
GenoXtract	Microscopic pozitive	87,3	100	100	84,7
	Microscopic negative	79,4	100	100	84,7
Combinat		87,6	99,2	99,4	84,1

Tabelul 3

Rezultatele detecției MTB prin metoda MTBDRplus ver2.0 cu extragerea prin GenoLyse și GenoXtract, în comparație cu metodele clinice

		Microscopic pozitive		Microscopic negative		
		Datele clinice		Datele clinice		
		Pacient TB	Pacient Non-TB	Pacient TB	Pacient Non-TB	
MTBDRplus	Pozitive	78	0	Pozitive	99	1
VER2.0	Negative	0	1	Negative	25	132

Din cele 174 de exemplare extrase cu ajutorul GenoXtract, 39 din ele (22,4%) au fost pozitive atât microscopic cât și clinic, 63 (36,2%) au fost microscopic negativ și clinic pozitiv iar 72 din probe (41,4%) au fost negative și microscopic și clinic.

Din aceste 174 tulpini extrase cu ajutorul GenoXtract, conform datelor clinice 102 (58,6%) au fost pozitive și 72 (41,4%) negative. 78 din 91 probe cu cultură pozitivă, de asemenea, au fost pozitive și prin metoda nouă MTBDRplus ver2.0 (tabelul 1). Din 52 de probe cu microscopia negativă dar cu cultură pozitivă, 39 au fost detectate ca fiind pozitive prin metoda MTBDRplus ver2.0. Din cele 83 de probe cu cultură 11 din ele au arătat un rezultat pozitiv prin metoda MTBDRplus ver2.0. În scopul de a evalua metoda MTBDRplus ver2.0 ca un instrument de diagnosticare a tuberculozei, rezultatele au fost corelate cu datele clinice (tabelul 3). Sensibilitatea, specificitatea, gradul de pozitivitate și a celor microscopic negative pentru ambele metode de extragere în comparație cu rezultatele clinice au fost de 87,6%, 99,2%, 99,4% și 84,1% respectiv.

Detectarea rezistenței la Rifampicină

Din cele 336 de probe testate prin metoda MTBDRplus ver2.0, pentru 156 din ele au fost disponibile și rezultatele de la DST (tabelul 4). Din toate cele 106 de tulpini care au fost rezistente la RIF 100 ar fi putut fi detectate corect prin MTBDRplus ver2.0, precum și 48 din cele 50 de tulpini sensibile, rezultând o sensibilitate și o specificitate de 94,3% și 96,0%. Doar o probă (0,94%) a fost monorezistentă la RIF și a fost detectată prin lipsa benzii WT 8.

Tabelul 4

Rezultatele detecției MTB prin metoda MTBDRplus ver2.0 în comparație cu DST RMP-R- rezistent la Rifampicină; RMP-S- sensibil la Rifampicină; INH-R- rezistent la Isoniazidă; INH-S- sensibil la Isoniazidă

	Rezistența - RMP		Rezistența - INH	
	RMP-R	RMP-S	INH-R	INH-S
	MTBDRplus ver2.0(n=156)	100 (51/49)	2 (1/1)	115 (57/58)
	RMP-S	48 (24/24)	5 (1/4)	32 (18/14)

Detectarea rezistenței la Isoniazidă

Ca și în cazul RIF, de asemenea, 156 de rezultate rezistente la INH au fost disponibile (tabelul 4). Din toate cele 120 de tulpini rezistente la INH ar fi putut fi detectate corect prin MTBDRplus ver2.0, precum și 32 din cele 36 de tulpini sensibile, rezultând într-o sensibilitate și o specificitate de 95,8% și 88,9%. 22 de tulpini (18,33%) au fost monorezistente la INH. Rezultatele probelor microscopic negative și celor pozitive, referitor la sensibilitatea la RIF și INH nu diferă în mod semnificativ (tabelul 5).

Tabelul 5

Rezultatele detecției MTB prin metoda MTBDRplus ver2.0 comparând microscopia cu datele clinice

		Sens. (%)	Spec. (%)	PPV (%)	NPV (%)
RMP	Microscopic. pozitive	98,1	96,0	98,1	96,0
	Microscopic. nenative	90,7	96,0	98,0	82,7
INH	Microscopic. pozitive	89,3	94,7	98,2	94,7
	Microscopic. nenative	93,5	82,3	95,1	77,7

Prevalența mutațiilor

Prevalența mutațiilor a fost calculată pe baza rezultatelor MTBDRplus ver2.0 (n = 177), incluzând și pe cele cu cultură negativă, dar pozitivă prin metoda moleculară studiată (n = 21). În total, 114 de tulpini rezistente la RIF având o mutație în zona benzii rpoB; 135 de tulpini au dovedit rezistență față de INH având în total 201 mutații (66 izolate, cu 2 mutații; 48,9%). Mutația cea mai răspândită la rpoB a rezultat în schimbarea aminoacidului S531L : 86,8% (n = 99), urmată de o mutație în codonul 530 - 533 (7; 6,1%). Mutația cea mai răspândită la katG a rezultat în schimbarea aminoacidului S315T - 128 din 135 (94,8%). Mutația inhA s-a constatat la 71 (52,6%) tulpini.

Discuții

MTBDRplus ver2.0 a fost evaluată pentru prima dată. Funcționalitatea noului test MTBDRplus ver2.0

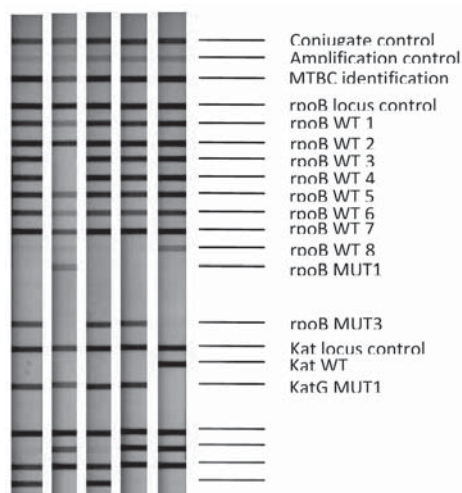


Fig. 1. Exemplu de rezultate obținute prin metoda MTBDRplus VER 2.0

independent de metoda de extracție a ADN-ului, a fost demonstrată (sensibilitate 88.0 și 87.3%, specificitate 98.4% și 100 cu metode GenoLyse și GenoXtract, respectiv). În scopul de a determina performanțele noului test, un accent deosebit a fost pus pe probele microscopic negative. Prin urmare, majoritatea probelor au fost microscopic negative (73,9%, 257 din 348). Noul test MTBDRplus ver2.0 a arătat o sensibilitate ridicată (76,0%, combinând datele de la ambele metode de extracție cu cultura ca standard de referință) pentru detecția MTB din probele microscopic negative cu un singur test. Sensibilitatea acestui test poate fi comparată cu GeneXpert (72,5%).

În cazul în care datele obținute prin metoda MTBDRplus ver2.0 au fost corelate cu datele clinice, sensibilitatea a crescut până la 79,8% pentru exemplele microscopic negative. Cu toate acestea, pentru interpretarea acestor rezultate ale studiului trebuie să se considere că, pacienții aflați sub tratament, elimină micobacterii moarte, care pot fi detectate prin PCR.

Analizând datele clinice, acestea ar putea clarifica numărul rezultatelor fals pozitive: dintre aceste 22 de alarme false 18 pacienți erau deja sub tratament. Doar 4 probe din 182 nu au fost în corelație cu datele clinice (2,2%). Cu toate acestea, referindu-ne la datele metodei culturale, detectarea ADN-ului din mycobacteriile moarte au condus la o rată mai mare a rezultatelor fals pozitive și, prin urmare, la o specificitate mai mică. Pacienții din acest grup au fost urmăriți, după o lună, două, trei și 5 luni de tratament însoțit de DST și la necesitate tratamentul a fost modificat în conformitate cu rezultatele obținute. Scopul acestui studiu fiind utilizarea acestui test în rutină, nu am exclus acești pacienți aflați sub tratament.

În alte studii diverse s-ar fi indicat că LPA-ul are o sensibilitate și specificitate mai mare pentru testarea sensibilității la RIF și INH [3, 4]. Rezultatele din acest studiu diferă puțin și anume cu o sensibilitate și speci-

STRIP 1: tulpină MDR (lipsa) (Δ) rpoB WT8, rpoB MUT3; Δ katG WT, katGMUT1, Δ inhA WT1, inhA MUT1).

STRIP 2: MDR strain (Δ rpoB WT3, Δ rpoB WT4, rpoB MUT1, Δ katG WT, katG MUT1).

STRIP 3: MDR strain (Δ rpoB WT8, rpoB MUT3; Δ katG WT, katGMUT1, Δ inhA WT1, inhA

ficitate pentru RMP de 94,3% și 96%, iar pentru INH de 95,8% și 88,9%. Sensibilitatea pentru RMP este mai scăzută decât în alte date publicate [3] și mai mare pentru INH. Un motiv pentru abaterea de la valorile medii ar putea fi numărul mic de tulpini rezistente investigate. Alt motiv ar putea fi prezența mutațiilor non-detectabile prin metoda MTBDRplus ver2.0 în alte regiuni ale rpoB, katG, sau gene necunoscute [2, 5].

Scopul principal al acestui studiu a fost de a demonstra funcționalitatea noului test, cu o capacitate de a detecta MTBC în probele microscopic negative de rutină, într-o țară cu o prevalență atât de ridicată a tuberculozei. Necesitatea pentru o identificare rapidă și reală a tuberculozei în probele microscopic negative și în special la pacienții infectați cu HIV, pare să fie încă o provocare. De exemplu, a fost descrisă o sensibilitate de doar 47% a sistemului GeneXpert pentru detectarea CMTB din mostre microscopic negative și cultură pozitivă de la pacienții HIV infectați [6].

De remarcat este faptul, că 18,3% din tulpinile rezistente la INH sunt monorezistente. Acest lucru reflectă importanța unui test de a face deosebirea între MDR și monoresistance INH.

Bibliografie

1. Chiang, C. Y, and W. W. Yew. 2009. *Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis*. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 13:304–311.
2. Heep, M., Rieger, U., Beck, D. and N. Lehn. 2000. *Mutations in the beginning of the rpoB gene can induce resistance to rifamycins in both Helicobacter pylori and Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother. 44:1075–1077.
3. Ling, D. I., Zwerling, A. A., and M. Pai. 2008. *GenoType MTBDR assays for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: a meta-analysis*. Eur. Respir. J. 32:1165–1174.
4. Parsons, L. M., Somoskovi, A., Gutierrez, C., Lee,

E., Paramasivan, C. N., Abimiku, A., Spector, S., Roscigno, G., and J. Nkengasong. 2011. *Laboratory Diagnosis of Tuberculosis in Resource-Poor Countries: Challenges and Opportunities*. Clin. Microbiol. Rev. 24:314–350.

5. Sandgren, A., Strong, M., Muthukrishnan, P., Weiner, B. K., Church, G. M. and M. B. Murray. 2009. *Tuberculosis Drug Resistance Mutation Database*. PLoS Med. 6:e132–e136.

6. Theron, G., Peter, J., van Zyl-Smit, R., Mishra, H., Streicher, E., Murray, S., Dawson, R., Whitelaw, A., Hoelscher, M., Sharma, S., Pai, M., Warren, R., and K. Dheda. 2011. *Evaluation of the Xpert(R) MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in a high HIV prevalence setting*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 184:132–140.

7. World Health Organization. 2008. *Molecular line probe assays for the rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB), Policy Statement*. WHO, Geneva, Switzerland. http://www.who.int/tb/laboratory/lpa_policy.pdf.

Rezumat

Testul molecular genetic (Line Probe Assay) disponibil comercial MTBDRplus ver2.0 (Hain Lifescience, Nehren, Germany) a fost evaluat pentru abilitatea de depistare a *M.tuberculosis* și mutațiilor care conferă rezistență la Isoniazidă și Rifampicină direct din specimene clinice microscopice pozitive și negative. Au fost examinate în total 348 probe: 73.9% dintre care microscopice negative și 23.3% probe au fost microscopice pozitive. 104 din 257 probe microscopice negative, au fost pozitive prin cultură și 20 au fost negative și prin cultură, diagnosticul de tuberculoză la acești pacienți fiind confirmat prin metode clinice și radiologice. MTBDRplus ver.2 a demonstrat o sensibilitate de 94.3% și specificitate de 96.0%. În concluzie, MTBDRplus ver2.0 este un test rapid cu o sensibilitate majoră pentru depistarea *M.tuberculosis* în specimene clinice microscopice pozitive și negative, care permite determinarea sensibilității către Rifampicină și Isoniazidă, și poate ușor fi implementată în practica de rutină a laboratoarelor de profil.

Cuvinte-cheie: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculoză, rezistentă, test rapid, metodă molecular-genetică.

Summary

Line Probe Assay commercially available genotype MTBDRplus ver2.0 (Hain Lifescience, Nehren, Germany) was evaluated for its ability to detect *M.tuberculosis* and while mutations that confer resistance to rifampicin and isoniazid directly from clinical samples of patients who are positive and negative microscopic. Were investigated in total 348 samples: 257 (73.9%) of them were microscopic - negative, 12 samples were excluded and 81 (23.3%) were microscopically - positive. 104 of 257 microscopic samples - negative, were found to be positive by culture

method and 20 were negative according to laboratory data, but positive based on clinical symptoms. MTBDRplus ver.2.0 genotype has a sensitivity of 94.3% and a specificity of 96.0%. In conclusion, the MTBDRplus ver2.0 is a rapid test and highly sensitive for detecting *M.tuberculosis* strains in clinical samples with positive and negative microscopy, information on sensitivity to rifampicin (RIF) and isoniazid (INH), which can be easily included in routine laboratory work.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis, resistance, rapid test, molecular-genetic method.

Резюме

Новая версия молекулярно-генетического метода для выявления туберкулеза и устойчивости к Рифампицину и Изониазиду (Line Probe Assay) MTBDRplus ver.2.0, оценивали с имеющимся в продаже версией 1. Обе версии сравнивали по способности обнаруживать *M.tuberculosis* непосредственно из микроскопически положительных и отрицательных клинических образцов пациентов. Сравнивали способность методов выявить мутации, которые придают устойчивость к Рифампицину и Изониазиду. Были исследованы 348 проб: 73,9% из них были микроскопические – отрицательные и 23,3% были микроскопически - положительные. 104 из 257 микроскопически отрицательных образцов, были признаны положительными методом культуры и 20 были отрицательными в соответствии с лабораторными данными. MTBDRplus ver.2.0 имеет чувствительность 94,3% и специфичность 96,0% и является очень чувствительным экспресс-тестом для выявления *M.tuberculosis* в клинических образцах с положительной и отрицательной микроскопии, а также предоставляет информацию о чувствительности к Рифампицину (РИФ) и Изониазиду (изониазид), который может быть легко включен в рутинной работы профильной лаборатории.

Ключевые слова: Микобактерия туберкулеза, туберкулез, устойчивость, экспресс-тесты, молекулярно-генетический метод.