

# **Projekts Nr. 9 „Infekcijas aģentu un saimniekorganisma ģenētiskā fona mijiedarbība”**

**Apakšprojekts 9.3. „Bērnu tuberkulozes izsaucēja molekulārbioloģisks raksturojums, epidemioloģija, imunoģenētiskie aspekti un slimības klīniskā izpēte”**

**Izpildītāji:**

**Rīgas Austrumu Slimnīcas Tuberkulozes un Plaušu Slimību Centrs, RSU – I.Ozere, Ģ.Šķenders, I.Pole, L.Broka, A.Nodieva**

**Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs, LU - V.Baumanis, I.Jansone, M.Baušķenieks, A.Kalviša**

## **Saslimstība (incidence) ar tuberkulozi 2011. g. uz 100.000 iedzīvotājiem dažādās valstīs**

Islande, Beļģija, Čehija, Dānija, Somija, Francija, Vācija, Grieķija, Īrija, Izraēla, Itālija, Luksemburga, Malta, Nīderlande, Norvēģija, Slovākija, Slovēnija, Zviedrija, Šveice, Lielbritānija, ASV, Austrija

**No 3,1 – 13**

Albānija, Ungārija, Turcija, Maķedonija, **Latvija**, Igaunija, Lietuva, Polija, Portugāle, Serbija, Spānija, Bulgārija

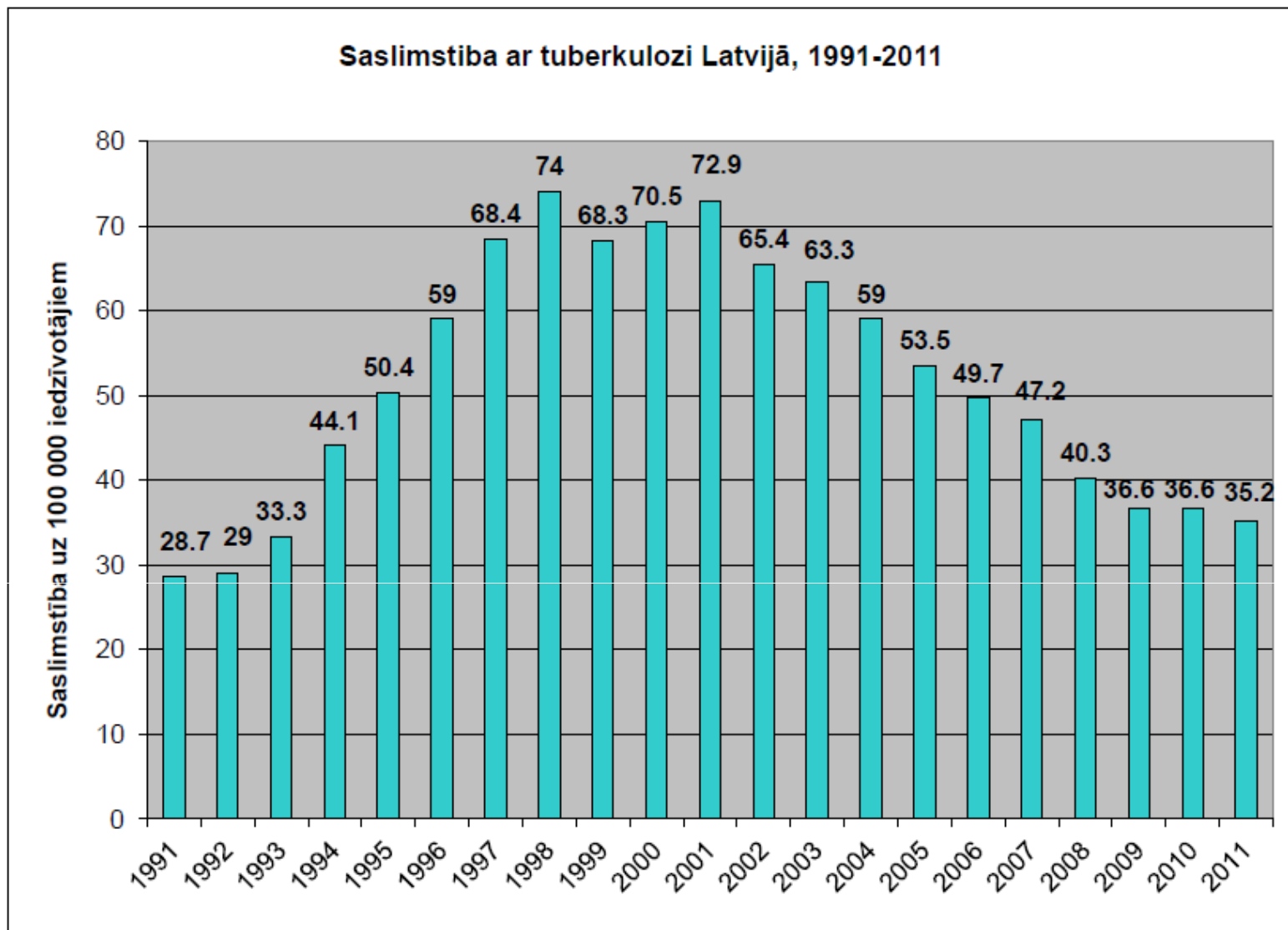
**No 14- 51**

Armēnija, Azerbaidžāna, Baltkrievija, Gruzija, Kazahija, Moldāvija, Rumānija, Krievija, Ukraina, Uzbekija, Turkmēnija, Tadžikija

**No 52-202**

Svazilenda –

**1257**



**Tuberkuloze Latvijā 2012.gadā**

<b>Absolūtos skaitļos 2011</b>	<b>788</b>	<b>bērni 61</b>	<b>pusaudži 3</b>
<b>Absolūtos skaitļos 2012 janvāris –novembris</b>		<b>bērni 45</b>	<b>pusaudži 11</b>
<b>MDR 2011 janvāris –aprīlis</b>	<b>32</b>		
<b>MDR 2012 janvāris –aprīlis</b>	<b>48</b>		

# Bērnu tuberkulozes problēma

□ Minimālas radioloģiskas atradnes gadījumā robeža starp **latentu** tuberkulozes infekciju un **aktīvu** tuberkulozi paliek neskaidra arī pēc MT izolācijas

□ “**Robežstāvokli**” var vērtēt kā latentu tuberkulozes infekciju vai aktīvu tuberkulozi, ja bērnam ir:

- kontakts ar aktīvas tuberkulozes slimnieku, tā *M.tuberculosis* raksturojums
- imunoloģiski apstiprināta *M.tuberculosis* infekcija (Mantoux >10mm)
- intratorakāla adenopātija ar vai bez pārmaiņām plaušu parenhīmā, iespējams, vizualizējama tikai DT

□ Slēdzienu latentā tuberkulozes infekcija vai aktīva tuberkuloze iespaido:

- Bērna vecums
- iespēja nozīmēt profilaktisku ārstēšanu (MT zāļu rezistences īpašības)



# Pacientu izmeklēšanas rezultāti uzrāda raibu, bieži grūti definējamu ainu

(Cuevas I.B. et al. Evaluation of TB diagnostics in children. Methodological issues for conducting and reporting research evaluation of TB diagnostics for intrathoracic TB in children: consensus from an expert panel. J.Inf.Dis. 2012,205, Suppl 2:s209-215)

N <sup>o</sup>	Vecums	RM	Rtg	DT	Bronhoskopija	Bakterioloģija	ZJT
1	15 gadi	18	N	N	Katarāls traheobronhīts	IK uz L-J 2 reizes aug 3 kol un 10 kol	<u>Rez.</u> H R E Z S Km Am Cm Eto Ofx Mfx <u>Jut.</u> Pas Cs Thz
2	14 gadi	10	±	Perēklis 10 mm	N	IK uz BACTEC IK uz L-J 1 kol. BA L-J 1+ kol.	Jutība saglabāta
3	11 gadi	17	N	±	N	MT aug no 5 IK paraugiem un BA	Jutība saglabāta
4	8 gadi	18	±	+	4.sg bronha sašaurin.	IK uz L-J 2 kol. BA uz BACTEC un L-J 3+ kol.	Jutība saglabāta
5	6 gadi	15	N	N	N	IK uz L-J 10 kol.	Jutība saglabāta
6	12 mēn.	19	N	Nav izd.	Nav izdarīta	KS ARB 3-5-8-r.l. KS uz BACTEC un L-J 1+ kol.	Jutība saglabāta
7	2 gadi	14	±	+	Nav izdarīta	KS uz BACTEC	Jutība saglabāta
8	7 gadi	10	±	±	N	IK uz L-J 3+ kol.	Jutība saglabāta
9	13 gadi	18	±	+	Kr. augšd. bronha dist. daļā iespiedums no L/m	IK uz L-J 4 kol. BA uz BACTEC	<u>Rez.</u> H R S E Z Km Am Cm Ofx Mfx <u>Jut.</u> Eto Cs PAS Thz
10	12 gadi	18	N	+	N	IK uz L-J 1+ kol. BA uz BACTEC	<u>Rez.</u> H R S E Z Km Am Cm Ofx Mfx <u>Jut.</u> Eto Cs PAS Thz

•IK: inducētās krēpas; BA: bronhu aspirāts; KS: kuņģa skalojums; L-J: Levenšteina-Jensena barotne; BACTEC barotne  
N: normāla atrade; “±”: nepārliecinoša TB atbilstoša atrade; “+”: latentai TB infekcijai / aktīvai TB atbilstoša atrade  
Rtg: plaušu pārskata rentgenogramma; DT: plaušu datortomogramma; RM: Mantoux tests

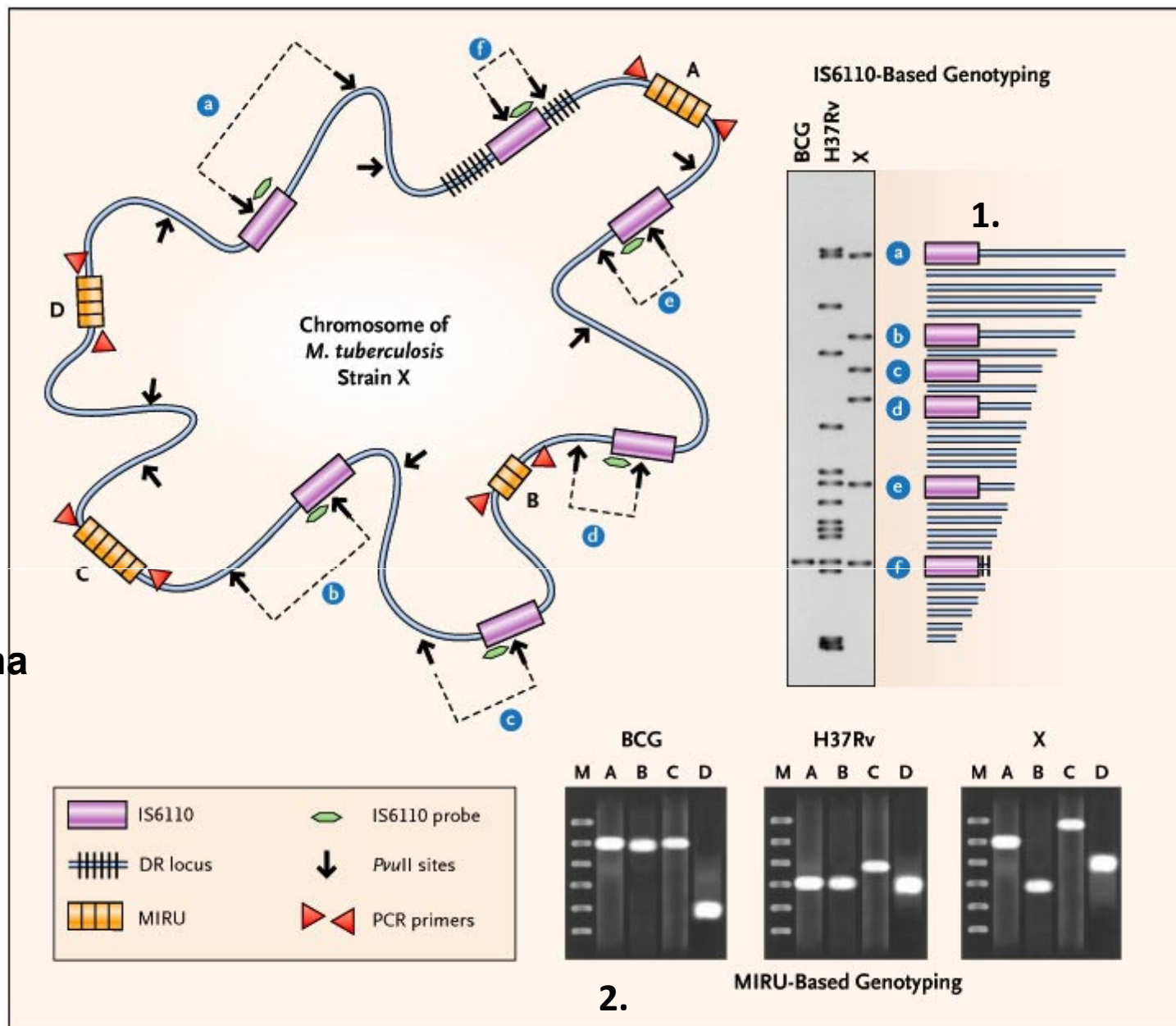
# **Galvenie VPP10-4/ apakšprojekta 9.3. trešā posma uzdevumi un gaidāmie rezultāti**

- **Tuberkulozes (TB) diagnozes apstiprināšanas «zelta standarta» metode ir *M.tuberculosis* (MT) izolācija , identifikācija un genotipēšana no klīniskā parauga pacientam ar atbilstošu TB klīnisko un rentgenoloģisko atradi**
- **Pozitīvas MT atrades interpretācija bērnam ar neatbilstošu TB klīnisko un rentgenoloģisko ainu nav skaidra**
- **Izmantojot MT restrikcijas fragmentu garuma polimorfisma (RFLP) un citas genotipēšanas metodes var pierādīt potenciālā infekcijas avota un bērna izolātu genoma identiskumu, kas apstiprina MT izdali bērnam ar TB diagnozei nepārlicinošu klīniski – rentgenoloģisko ainu**

# Populārākās mikobaktēriju genotipēšanas metodes

- 1. Restrikcijas fragmentu garuma polimorfisma analīze pēc *M.tuberculosis* genoma šķelšanas ar restrikcijas endonukleāzi *PvuII* (RFLP)**
- 2. Amplificēto rajonu spoligotipēšana (speisers starp 36-bp tiešajiem atkārtojumiem (direct repeat))**
- 3. MIRU tipēšana (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units, MIRU typing) ,VNTR (Variable Number of Tandem Repeats)**
- 4. Savienotājlinkera PCR (Mixed linker PCR)**
- 5. Viena nukleotīda polimorfisma analīze (SNIP)**
- 6. Pulsējošā lauka elektroforēze pēc genoma šķelšanas ar retām restriktāzēm**
- 7. Polimorfo GC bagāto secību tipēšana (PGCR typing Polymorphic GC Rich Sequences)**

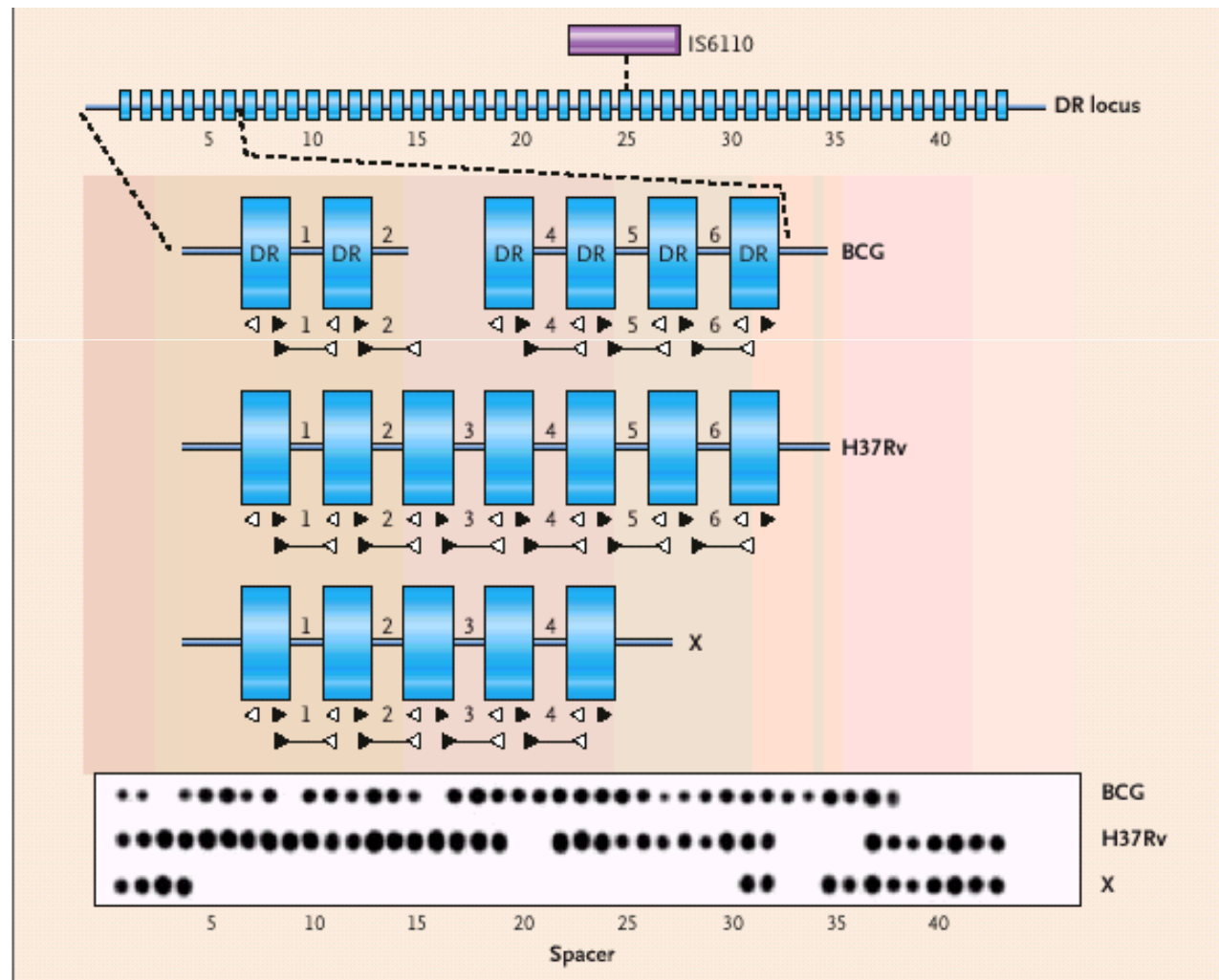
Populārāko  
 genotipēšanas  
 metožu shēmas:  
 1. *PvuII*  
 restrikcijas  
 garuma  
 polimorfisma  
 shēma  
 2. Tandēmisko  
 atkārtojumu  
 genotipēšanas  
 Rezultāts  
 3. Spoligotipēšana



NEJM, 18. sept.  
 2003, p. 1149

# Genotipēšanas paņēmiens, kurš pamatojas uz to DNS fragmentu analīzi, kuri atrodas starp tiešajiem atkārtojumiem spoligotipēšana

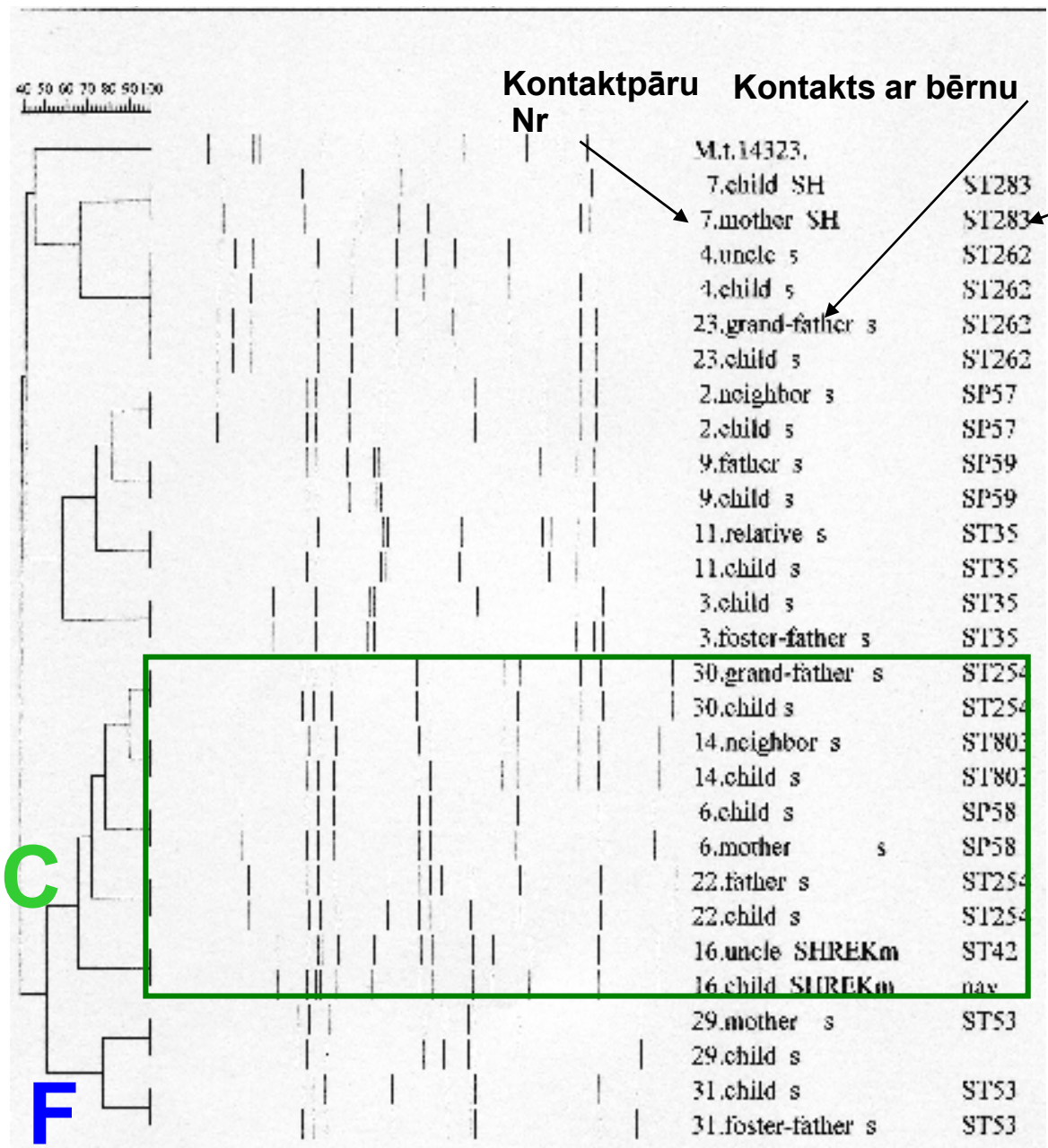
## Spoligotyping







# Ar RFLP genotipēšanu var pārlicinoši dokumentēt infekcijas pārnesi



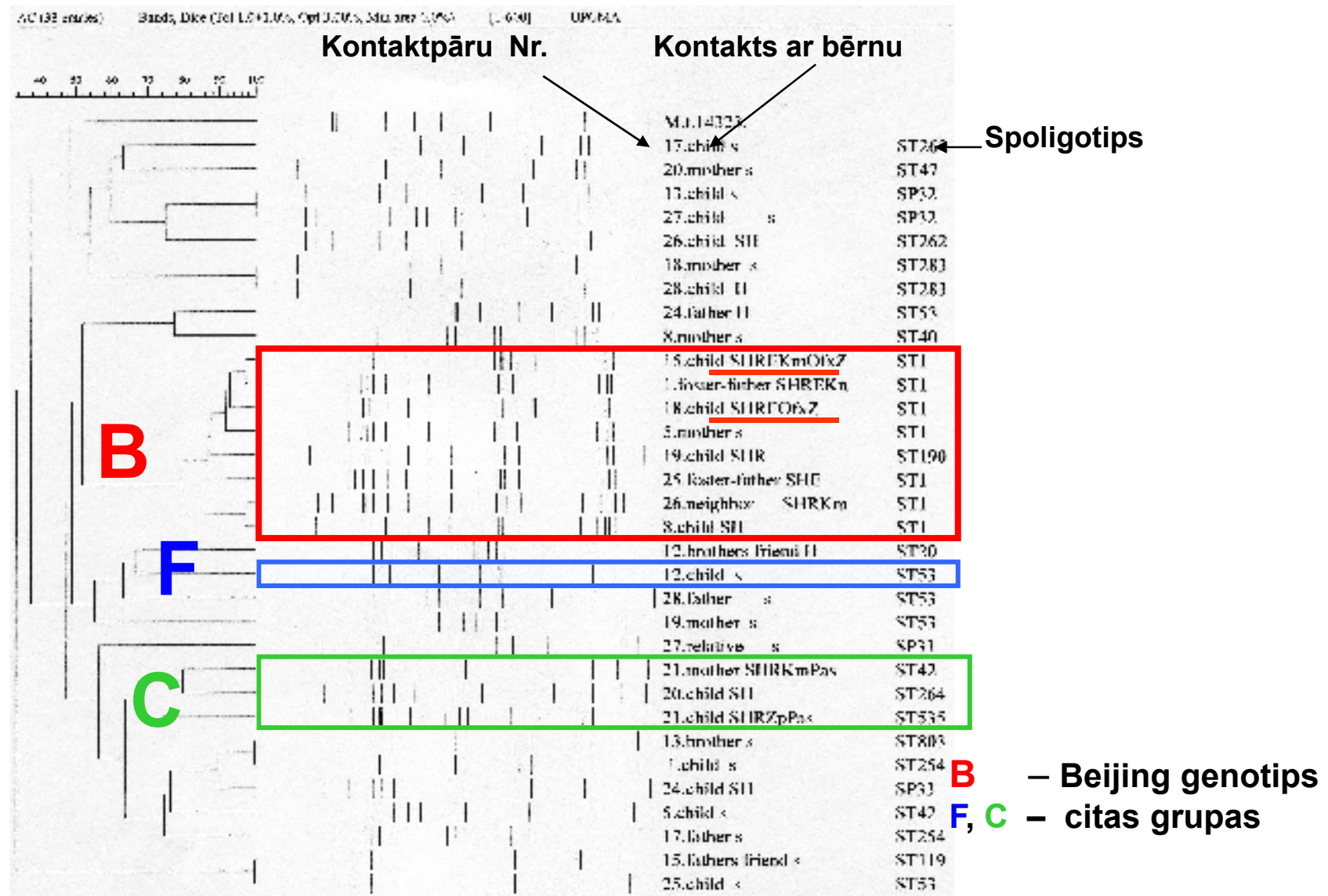
Kontaktpāru Nr      Kontakts ar bērnu

M.t.14323.	
7.child SH	ST283
7.mother SH	ST283
4.uncle s	ST262
4.child s	ST262
23.grand-father s	ST262
23.child s	ST262
2.neighbor s	SP57
2.child s	SP57
9.father s	SP59
9.child s	SP59
11.relative s	ST35
11.child s	ST35
3.child s	ST35
3.foster-father s	ST35
30.grand-father s	ST254
30.child s	ST254
14.neighbor s	ST1803
14.child s	ST1803
6.child s	SP58
6.mother s	SP58
22.father s	ST254
22.child s	ST254
16.uncle SHREKm	ST42
16.child SUREKm	nav
29.mother s	ST53
29.child s	
31.child s	ST53
31.foster-father s	ST53

Spoligotips

- DST – zāļu rezistence
- s – sensitīvs
- S – streptomīcīns
- H – izoniazīds
- R – rifamicīns
- E – etambutols
- Km – kanamicīns
- Z- pirazinamīds
- Ofx – ofloksacīns
- Pas – p-aminosalicilskābe

# Genotipēšana ļauj arī “reabilitēt” aizdomās turētos



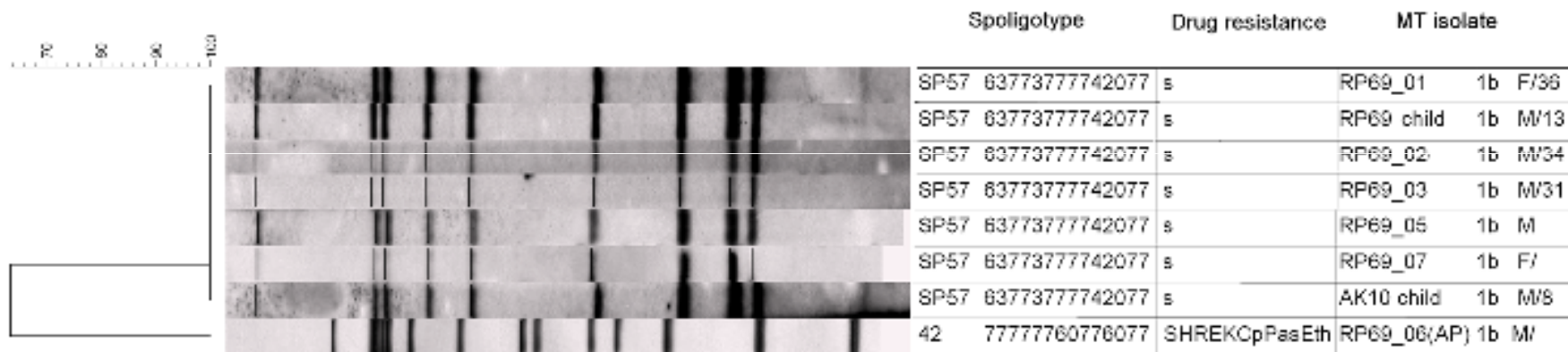




# Epidemioloģiski detalizēti izpētīta un apstiprināta infekcijas pārnese no pieaugušiem uz bērniem

Size (Opt 1.00%) (R 1.0%–3.0%) (H 1.0%–5.0%) (C 0.0%–100.0%)

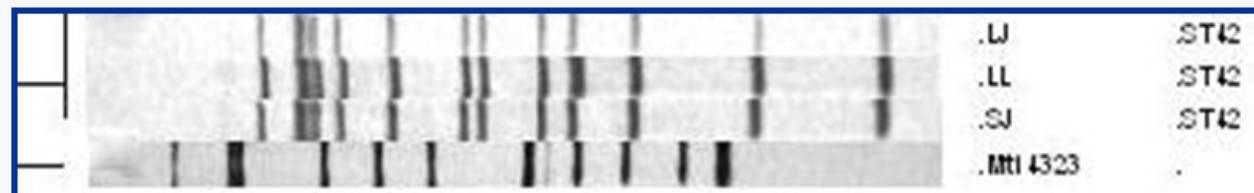
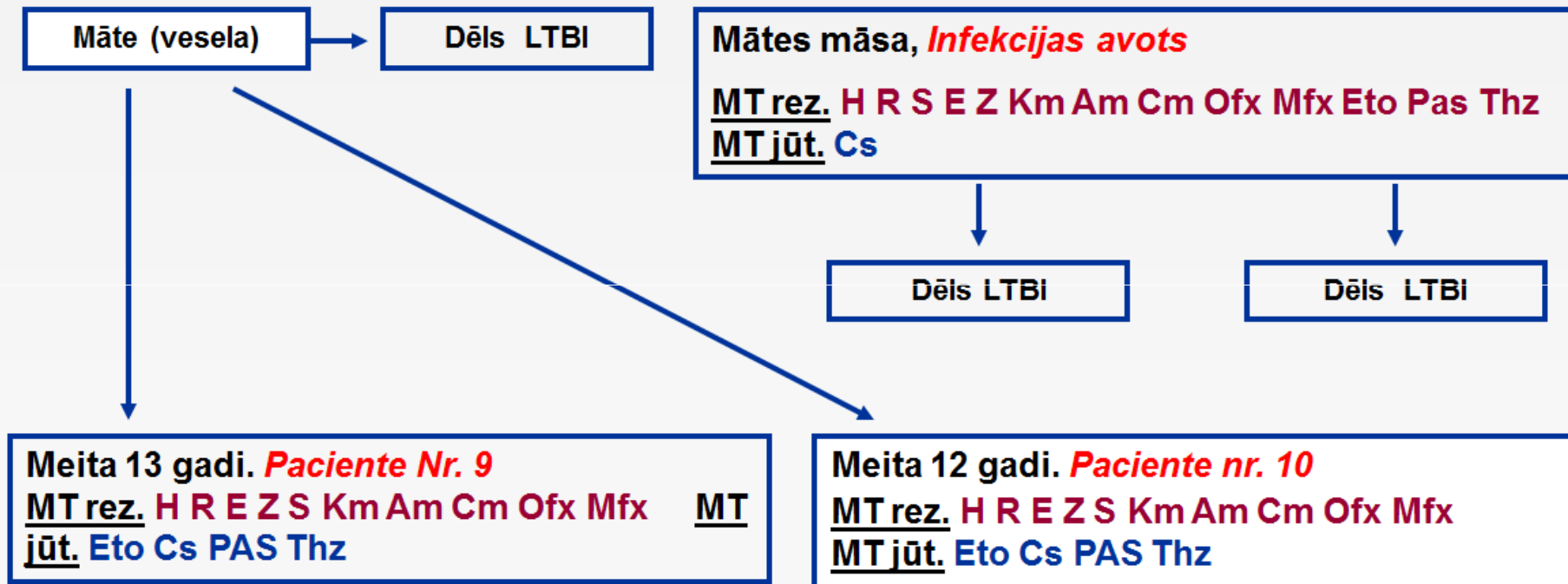
RFLP1

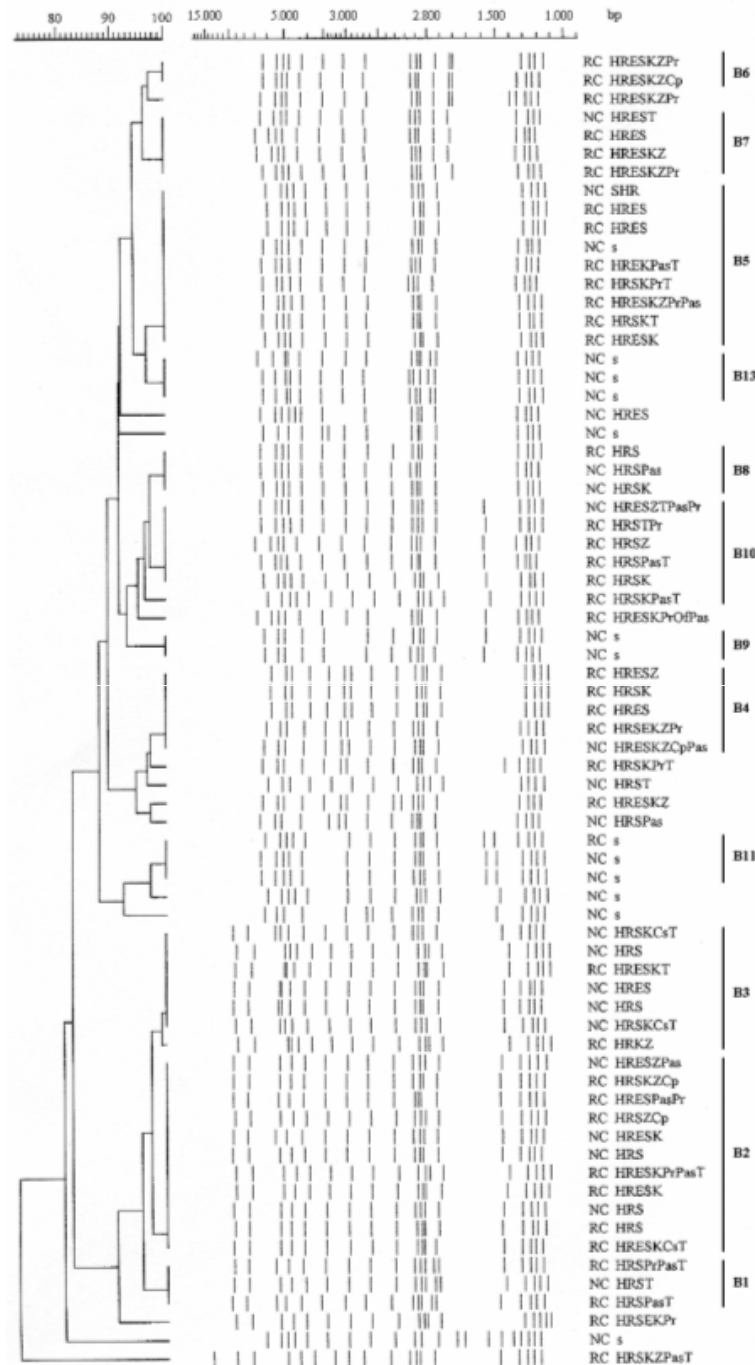


Visi dzīvo/dzīvoja vienā piecu dzīvokļu mājā



# Epidemioloģiskā saistība ar infekcijas avotu pacienti Nr. 9 un Nr. 10





## 191 izolāta (pieaugušo un bērnu) genotipu salīdzinājums I

Salīdzinājums ar visiem Latvijā reģistrētiem *M.tuberculosis* genotipiem , bērnu gadījumā ļauj spriest par:

1. sabiedībā cirkulējošajiem genotipiem
2. atsevišķu genotipu augstāku patogenitāti (Beijing)

**71 no tiem Beijing genotips - 37%**

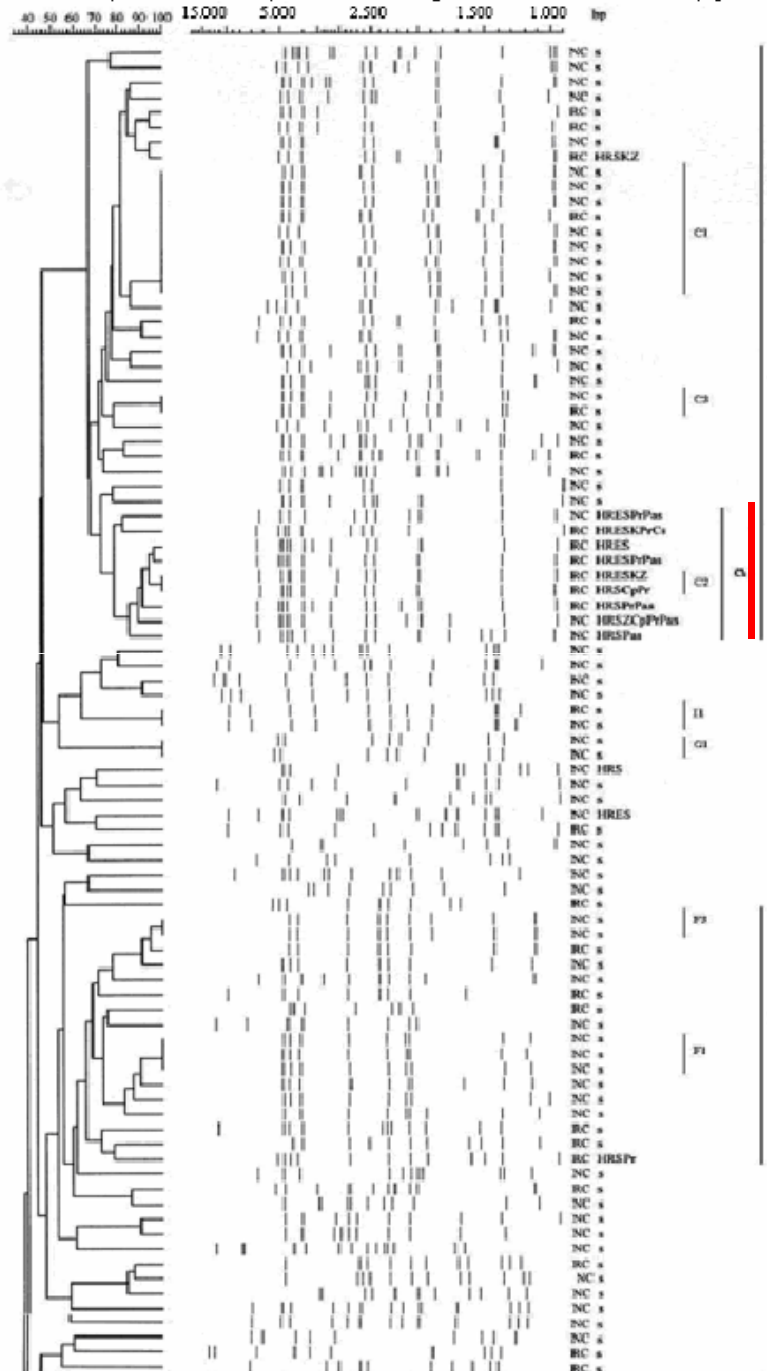
**58 no tiem MDR - 82%**

**22 – jaunie gadījumi - 31%**

**49 – atkārtotie - 69%**

**Beijing genotips**

**6 - bērni**



## 191 izolāta (pieaugušo un bērnu) genotipu salīdzinājums II

**C genotipa grupa – 42 izolāti, no tiem 10 MDR – 24%, bet Apakšgrupā Cb visi 9 izolāti ir MDR**

# **Zāļu rezistences pētījumi**

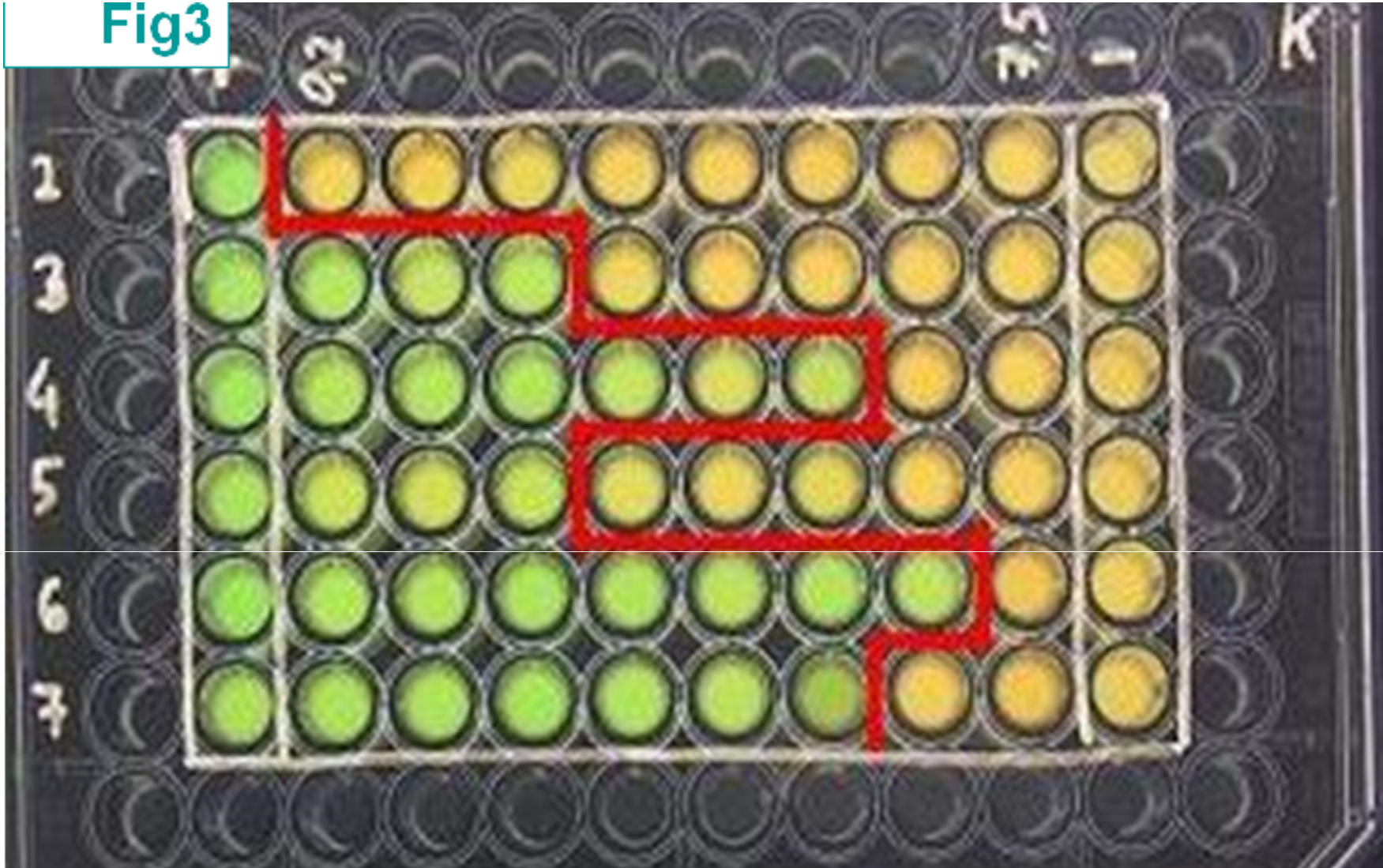
**11% ar tuberkulozi slimo bērnu cieš  
no multi zāļu rezistentās formas**

**Kanamicina gadījumā ar ribosomām saistītajos gēnos mutācijas atrada mazāk nekā pusei izolātu, bet dažādās mutācijas saistītas ar atšķirīgu rezistences pakāpi**

No.	Resistance pattern	gene <i>rrs</i> region 1400 mutations	Other mutations
1	SHRE <b>Kn</b> CapPasEth	<i>rrs</i> A1400G	-
2	Tio	<i>rrs</i> A1400G	-
3	SHREZ <b>Kn</b> EthCap	<i>rrs</i> A1400G	-
4	SHRE <b>Kn</b> TioEthCap	<i>rrs</i> A1400G	-
5	SHRZ <b>Kn</b>	<i>rrs</i> A1400G	-
6	SHRE <b>Kn</b>	<i>rrs</i> A1400G	-
7	HREZ <b>Kn</b> CapOfTio	<i>rrs</i> A1400G	-
8	SHRE <b>Kn</b> PasClsEth	WT	<i>rrs</i> A513C
9	SHR <b>Kn</b> Tio	WT	<i>rrs</i> C516T
10	SHREZPas <b>Kn</b> Eth	WT	<i>rrs</i> C516T
11	SHREZ <b>Kn</b>	WT	-
12	SHREZ <b>Kn</b> EthTio	WT	-
13	SHE <b>Kn</b> Pas	WT	-
14	SHREZ <b>Kn</b>	WT	-
15	SHR <b>Kn</b> Eth	WT	-
16	TioPro	WT	-
17	SHRE <b>Kn</b>	WT	-
18	SHREZ <b>Kn</b> Of	WT	-
19	HRE <b>Kn</b> PasTio	WT	-
20	HR <b>Kn</b> Tio	WT	-
21	SHREZ <b>Kn</b>	WT	-
22	apTio	WT	-
23	HREZ <b>Kn</b> EthOfTio	WT	-
24	HREZ <b>Kn</b> OfI	WT	-
25	Tio	WT	-
26	pOfTio	WT	-
27	SHR	WT	<i>rrs</i> A513C
28	SH	WT	-
29	s	WT	-
30	s	WT	-
31	s	WT	-



**Fig3**



**Zāļu jutības noteikšanas paātrināta testa imunoplatēs shēma. Kanamicīna «rezistences» noteikšana pie dažādām preparāta koncentrācijām (Martin et al., J.Antimicrob.Chemother.2011, 66,827)**

# **Analizētās rezistenci pret aminoglikozīdiem izraisošās mutācijas**

**Analizēta mutāciju klātbūtne streptomicīna , kanamicīna , amikacīna  
(kapreomicīna) rezistentu izolātu gēnos :**

**Punktveida mutācija ribosomālās 16S RNS gēnā – *rrs* (A1400G)**

***eis* (aminoglikozīd acetiltransferāze)**

***rpsL* (ribosomu proteīns S12)**

***gidB* (7-metilguanozīn metiltransferāze)**

***whiB7* (*eis* gēna promotera rajons)**

***tap* (*tap* – effluksa gēna promotera rajons)**

**Rv1877 (effluksa gēna promotera rajons)**

**ar atšķirīgu rezistenci pret dažādiem aminoglikozīdiem**

# SECINĀJUMI

1. **Vispārēji secinājumi**
2. **Secinājumi pēc genotipēšanas datiem**
3. **Secinājumi par aminoglikozīdu rezistenci**

- **Infekcijas avota un bērna izolātu genoma RFLP var izmantot kā papildus latentu tuberkulozes infekciju / aktīvu tuberkulozi apstiprinošu metodi bērniem ar neskaidru MT atradnes interpretāciju**
- **RFLP izmantošana klīniskajā praksē dod jaunu izpratni par tuberkulozes gaitu un aktivitāti bērniem**
- **Paātrinātās molekulārās zāļu rezistences noteikšanas metodes papildus ļauj apstiprināt infekcijas pārnesi, kontakta gadījumā izšķirties par ātrāku ķīmijterapiju, bet jutības pakāpes noteikšana postulēt aminoglikozīdu darbības mehānismu un iespējamu aktivitātes atjaunošanu**

## **Nozīmīgākie secinājumi pēc genotipēšanas datiem**

**1) Aktīva tuberkulozes transmisija no bērna uz bērnu (t.i.bērnu dārzos un skolā) ir reta, bet aprobežojas ar ģimenes un sociālajiem kontaktiem.**

**2)Molekulārā genotipēšana (34+7) 68 % gadījumos apstiprina kontaktu izmeklēšanas datus. Trūkstošie 32% norāda uz nepieciešamību paplašināt iespējamo kontaktu meklēšanu.**

**3) Samērā augstais unikālo genotipu daudzums -20, kādi nav reģistrēti uzkrātajā datu bāzē (~1500 izolātu, ~ 500 variantu ) norāda uz nezināmiem sabiedrībā cirkulējošiem infekcijas avotiem , jeb iespēju par ārpusrobežu infekcijas transmisiju.**

**4) Klasterētie genotipi (izņemot vienu -SP57) ir Latvijā plaši izplatīti , bet Bejing genotipa procents - 12% starp bērniem ir zemāks, nekā starp pieaugušajiem - 30%**

**5) Atsevišķie klīniski nepārlicinošie 5 gadījumi, kad tomēr izauga mikobaktērijas, bet klīniskie dati nepārlicinoši , stimulē veikt padziļinātus imunoloģiskus izmeklējumus un attiecīgu novērošanu.**

## Aminoglikozīdu rezistences pētījumu rezultāti un secinājumi

- Punktveida mutācija ribosomālās 16S RNS gēnā – *rrs* (A1400G) saistīta ar augstu rezistenci pret kanamicīnu (MIC >100 mkg/ml), bet variablu rezistenci pret amikacīnu
- Parādīta vairāku citu mutāciju klātbūtne streptomicīna un kanamicīna rezistentu izolātu gēnos :
  - eis* (aminoglikozīd acetiltransferāze)
  - rpsL* (ribosomu proteīns S12)
  - gidB* (7-metilguanozīn metiltransferāze)
  - whiB7* (*eis* gēna promotera rajons)
  - tap* (*tap* – effluksa gēna promotera rajons)
  - Rv1877 (effluksa gēna promotera rajons)ar atšķirīgu rezistenci pret dažādiem aminoglikozīdiem (7,5-100 mkg/ml)
- Mutāciju lokalizācija ļauj papildus spriest par infekcijas transmisiju, bet atšķirīgais rezistences līmenis pie dažādām mutācijām, paplašināt iespējamo ķīmijterapijas līdzekļu arsenālu, kā arī mēģināt restaurēt zāļu jutību , inhibējot effluksa mehānismus

## **2012.g. raksti žurnālos, abstrakti un citas īsākas publikācijas (tēzes)**

**1. Delamanid Improves Outcomes and reduces Mortality for Multidrug-Resistant tuberculosis.**

Skripconoka V, Danilovits M, Pehme L, Tomson T, Skenders G, Kummik T, Cirule A, Leimane V, Kurve A, Levina K, Geiter LJ, Manissero D, Wells CD. Eur Respir J. 2012 Sep 27.

**2. Performance of the Geno Type MTBDRPlus assay in routine settings: a multicenter study.**

Mironova S, Pimkina E, Kontsevaya I, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Skenders G, Kummik T, Drobniewski F. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012 Jul;31(7):1381-7.

**3. Baumanis V., Ozere I., Jansone I., Nodieva A., Pole I., Skenders G.**

**Molecular geno typing as a tool in monitoring of children tuberculosis in Latvia.**

33rd Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, 01st-04th July, 2012, Brasov, Romania, Scientific Program including Abstracts, p.51

**4. Pole I., Skenders G., Jansone I., Trofimova J., Broka L., Nodieva A., Riekstina V., Leimane V., Baumanis V.**

**Families and subfamilies of MDR and XDR tuberculosis causing mycobacteria.**

in Latvia. 33rd Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, 01st-04th July, 2012, Brasov, Romania, Scientific Program including Abstracts, p.56

**5. Bauskenieks M., Pole I., Jansone I., Kalvisa A., Broka L., Skenders G., Baumanis V.**

**Novel mutations in Mycobacterium tuberculosis GIDB gene as a cause of streptomycine resistance as well as a genetic marker of H lieneage.**

33rd Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, 01st-04th July, 2012, Brasov, Romania, Scientific Program including Abstracts, p.61

**6. Šēla I., Skenders G., Pole I., Kukša L., Jansone I.**

**Discordance in genetic and phenotypic detection of M.tuberculosis rifampicin resistance in Latvia.**

33rd Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, 01st-04th July, 2012, Brasov, Romania, Scientific Program including Abstracts, p.71-72

**Pilni abstraktu teksti atrodami saitā:**

[http://vorschau.agentur-konsens.de/ESM/downloads/FINAL\\_ESM\\_Abstract\\_Book2012\\_druck\\_2.pdf](http://vorschau.agentur-konsens.de/ESM/downloads/FINAL_ESM_Abstract_Book2012_druck_2.pdf)

**7. Pole I., Nodieva A., Jansone I., Skenders G., Broka L., Riekstina V., Storozenko J.,**

**Rožentāle B., Leimane V., Baumanis V. Genetic diversity and drug susceptibility pattern of M.tuberculosis strains from HIV positive patients in Latvia. Lietuvo gydytojo priedas, Vilnius, Lithuania, 4-5 October, 2012, Final Program and abstract book, p 53-54**

**Pilns abstrakta teksts atrodams saitā:**

<http://vitaelitera.lt>