

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

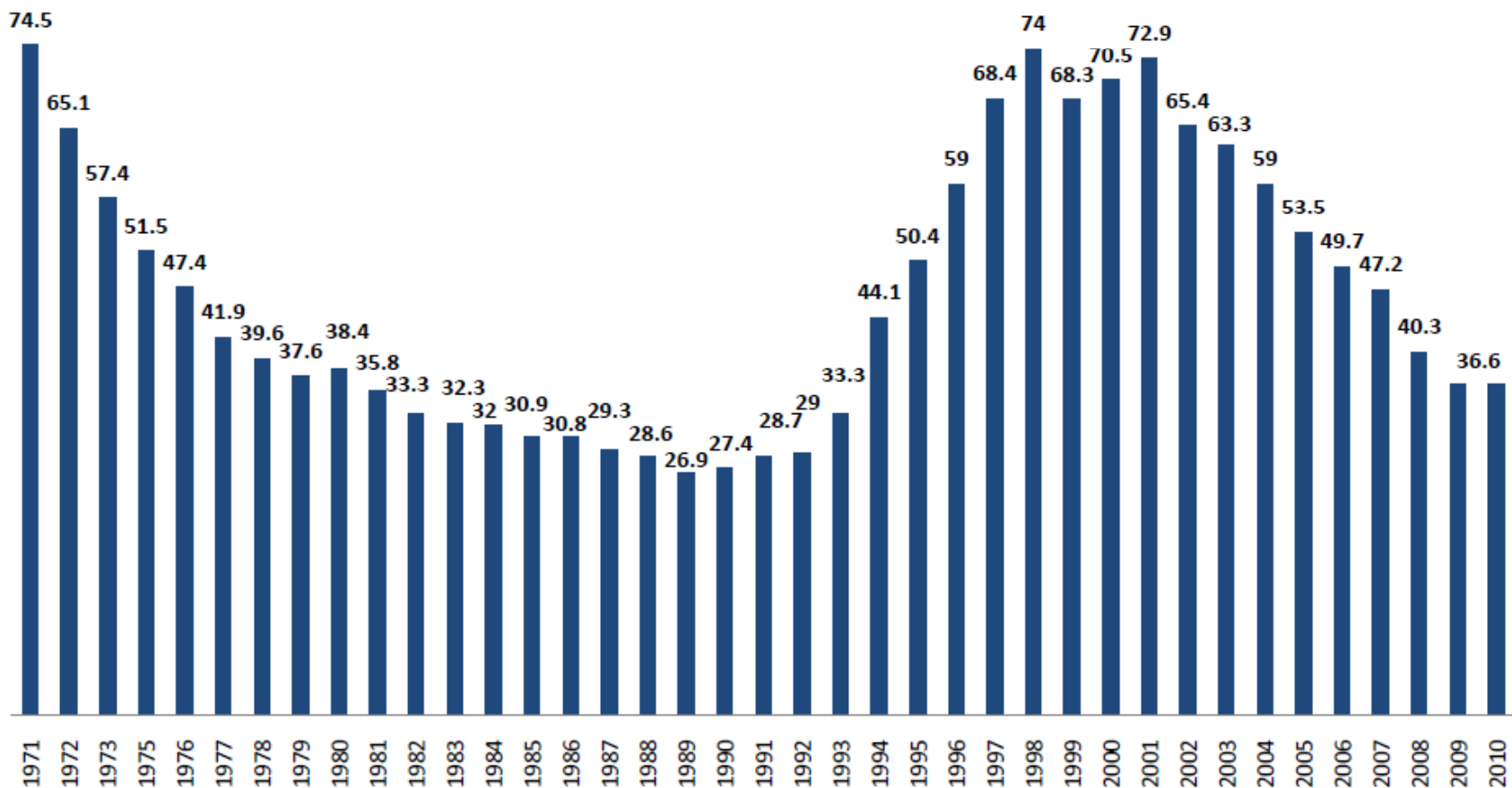
Apakšprojekts 9.3. „Bērnu tuberkulozes izsaucēja molekulārbioloģisks raksturojums, epidemioloģija, imunoģenētiskie aspekti un slimības klīniskā izpēte”

Izpildītāji:

Valsts Infektoloģijas 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 , E.Zole**

Saslimstība ar tuberkulozi Latvijā 1971.-2010. (rādītājs uz 100 000 iedzīvotājiem)



Avots: LIC TPSK Metodiskās vadības, uzraudzības un analīzes nodaļa

Absolūtos skaitļos:	Kopā	Bērni	Pusaudži
2010 visā gadā	825	45	16
10 mēnešos	649	36	12
2011 10 mēnešos	634	46	5

Saslimstība (incidence) ar tuberkulozi 2010. 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

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

No 52-202

Svazilenda –

1257

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)

□ Kalcinācija L/m neizslēdz tuberkulozes procesa aktivitāti un MT izdali

Galvenie VPP10-4/ apakšprojekta 9.3. otrā posma uzdevumi un gaidāmie rezultāti

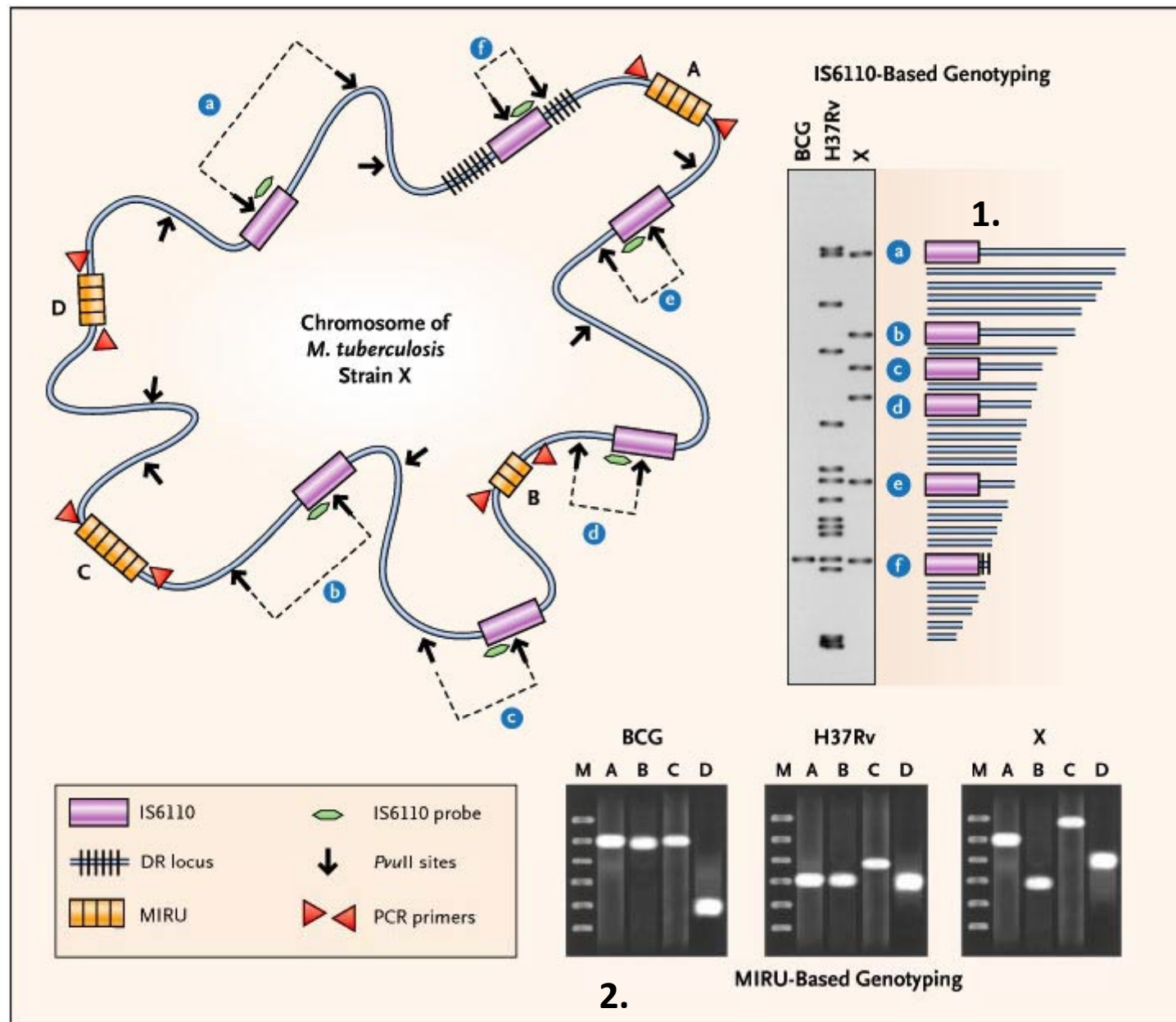
- ❑ Tuberkulozes (TB) diagnozes apstiprināšanas “zelta standarta” metode ir *M.tuberculosis* (MT) izolācija un identifikācija no klīniskā parauga pacientam ar TB atbilstošu klīnisko un radioloģisko atradi**
- ❑ Pozitīvas MT atrades interpretācija bērnam ar neatbilstošu TB klīnisko un radioloģisko ainu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

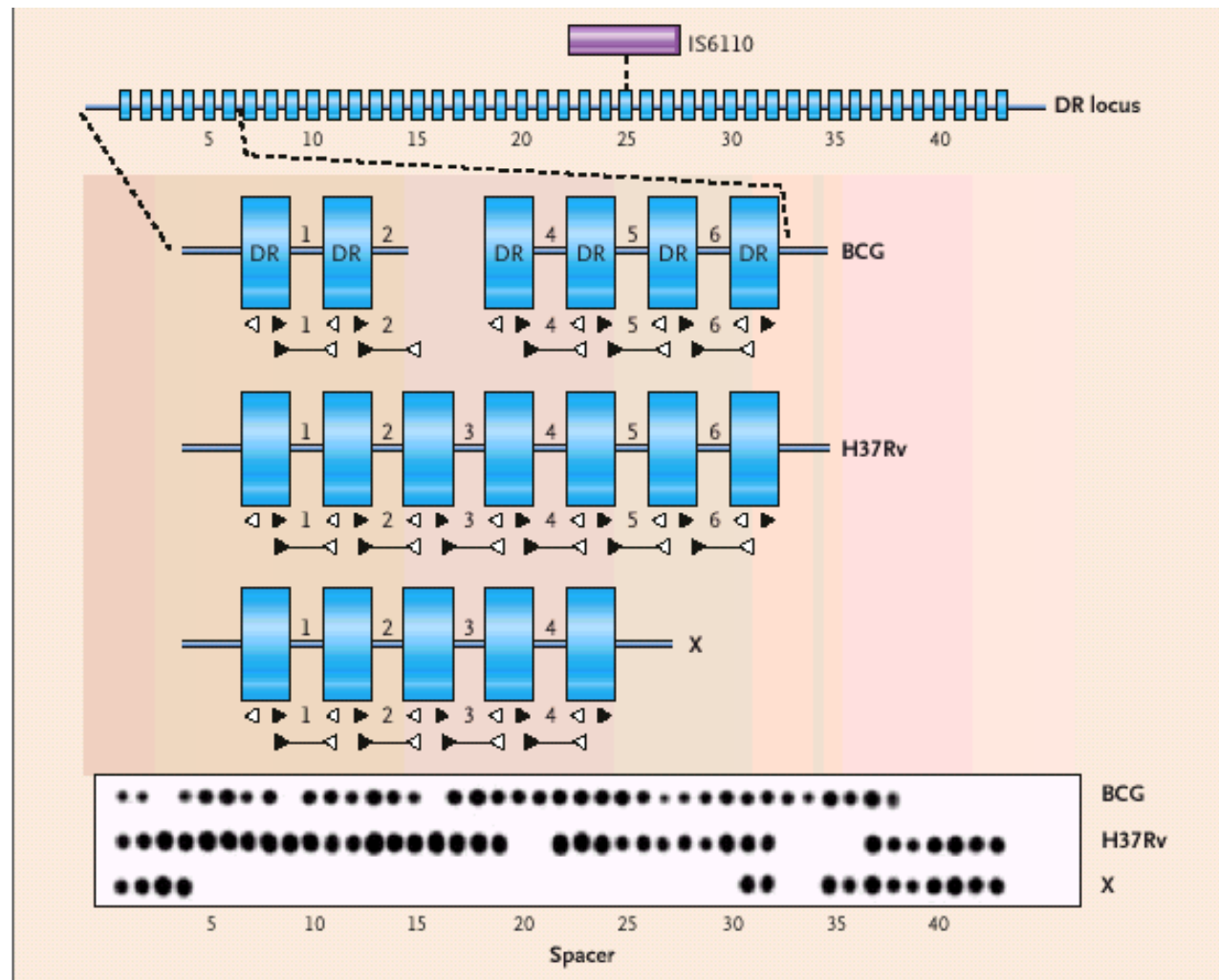
- 1. PvuII
restrikcijas
garuma
polimorfisma
shēma**
- 2. Tandēmisko
atkārtojumu
genotipēšanas
rezultāts**



**NEJM, 18. sept.
2003, p. 1149**

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

Spoligotyping

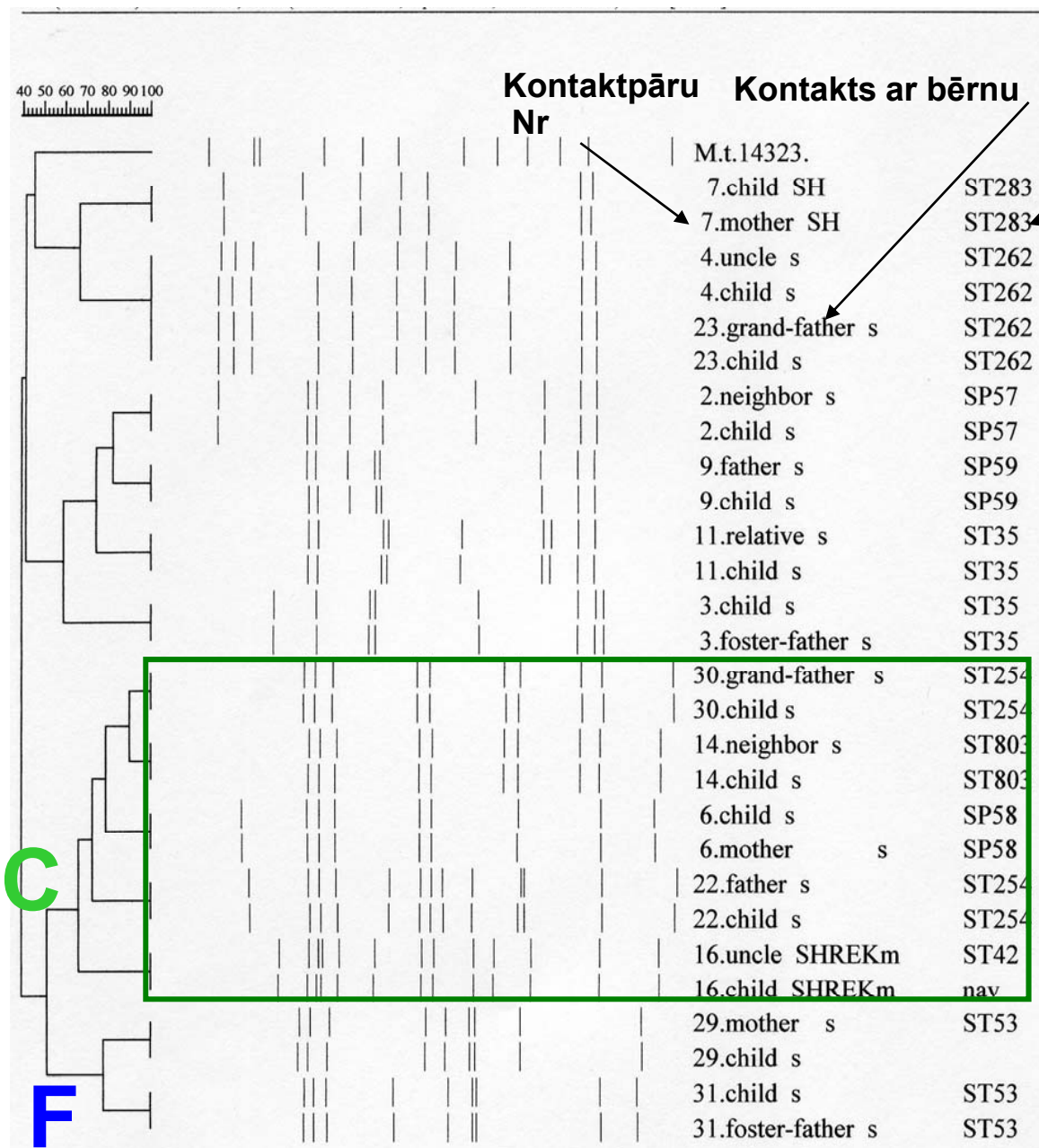


Pacientu izmeklēšanas rezultāti

N ^o	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; "±": nepārliciecināma TB atbilstoša atrade; "+": latentai TB infekcijai / aktīvai TB atbilstoša atrade
Rtg: plaušu pārskata rentgenogramma; DT: plaušu datortomogramma; RM: *Mantoux* tests

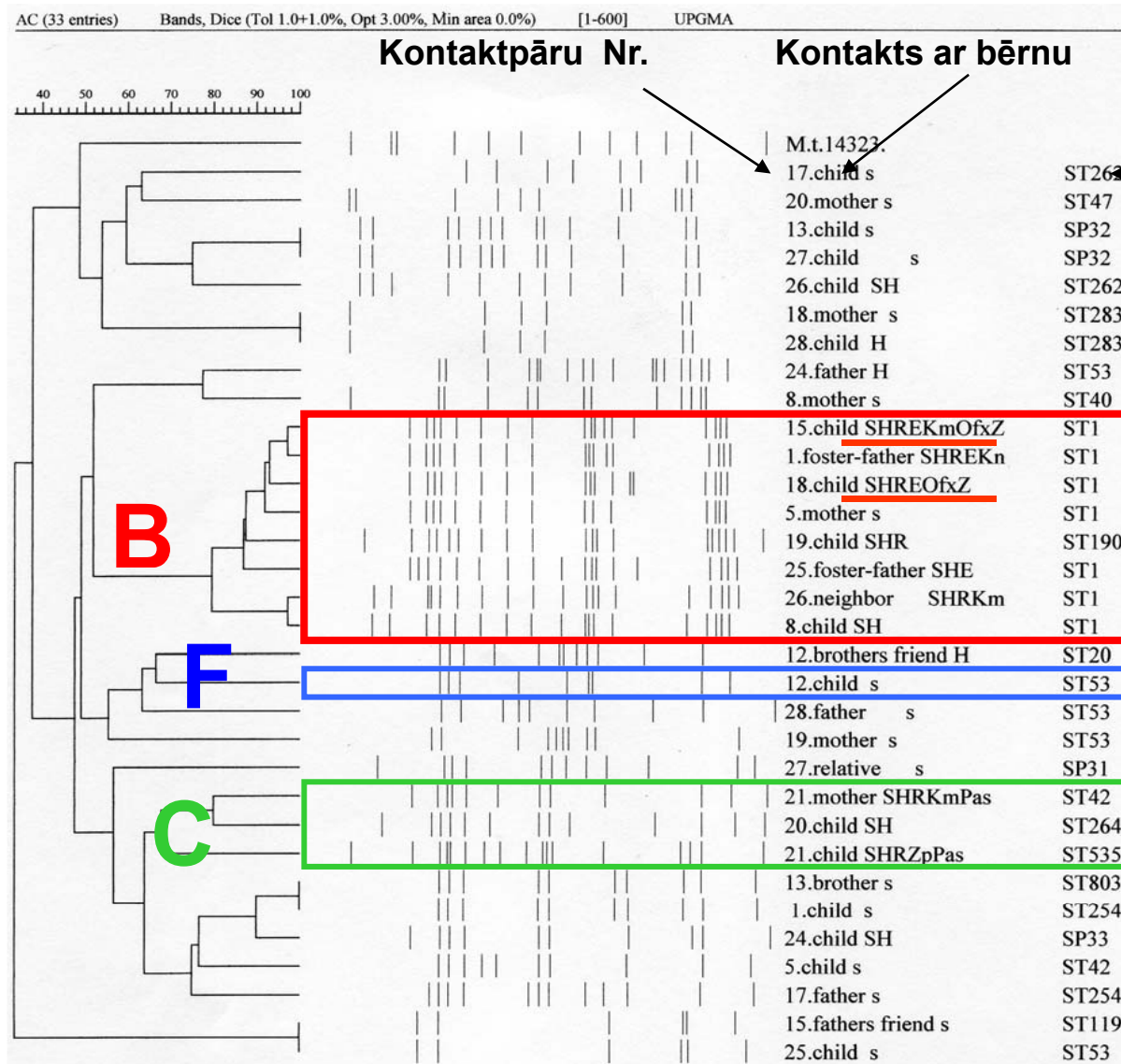
Ar genotipēšanu var pārlicinoši dokumentēt infekcijas pārnesi



Spoligotips

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

Genotipēšana ļauj arī “reabilitēt” aizdomās turētos

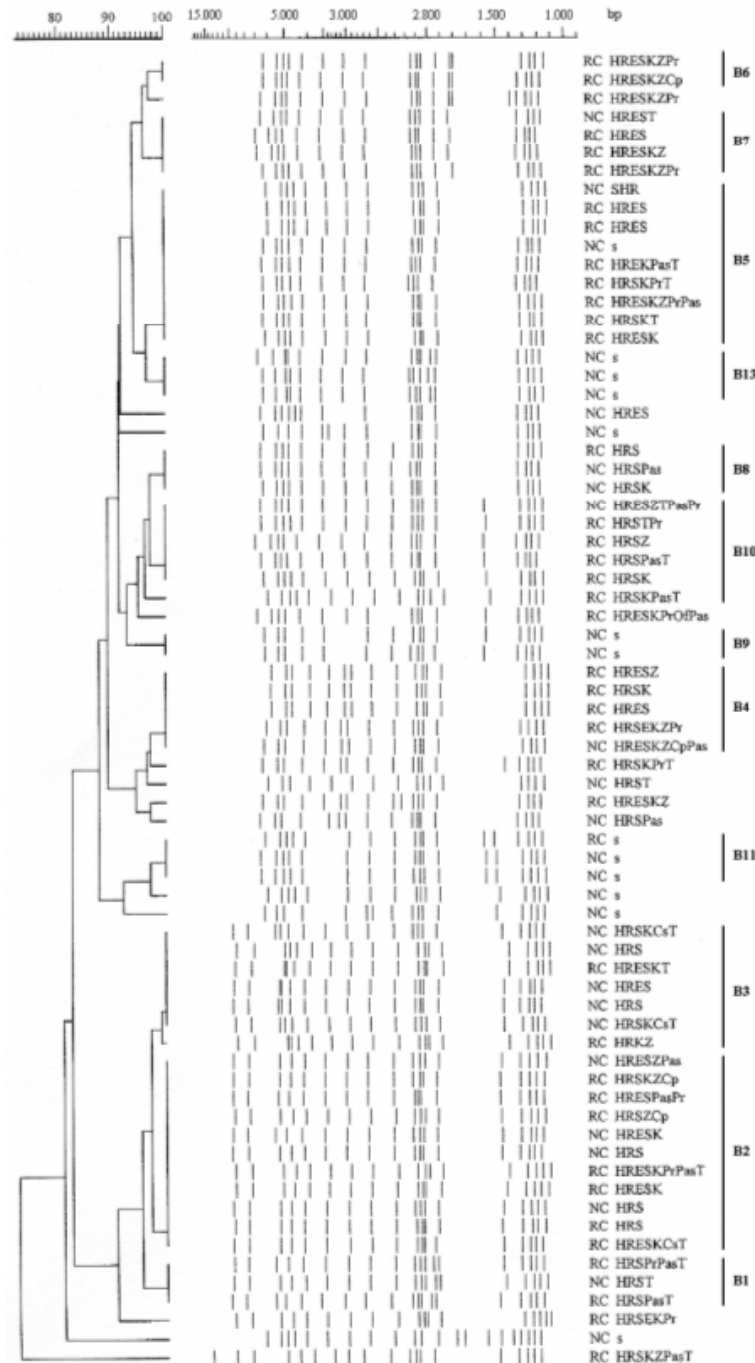


Spoligotips

Bērnu grupā no 30 izolātiem ar Beijing genotipu bija 4 izolāti – 13%

B – Beijing genotips

F, C – citas grupas



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

- 1. sabiedībā cirkulējošajiem genotipiem**
- 2. atsevišķu genotipu augstāku patogenitāti**

Dažādu 191 *M.tuberculosis* izolātu RFLP

71 no tiem Beijing genotips - 37%

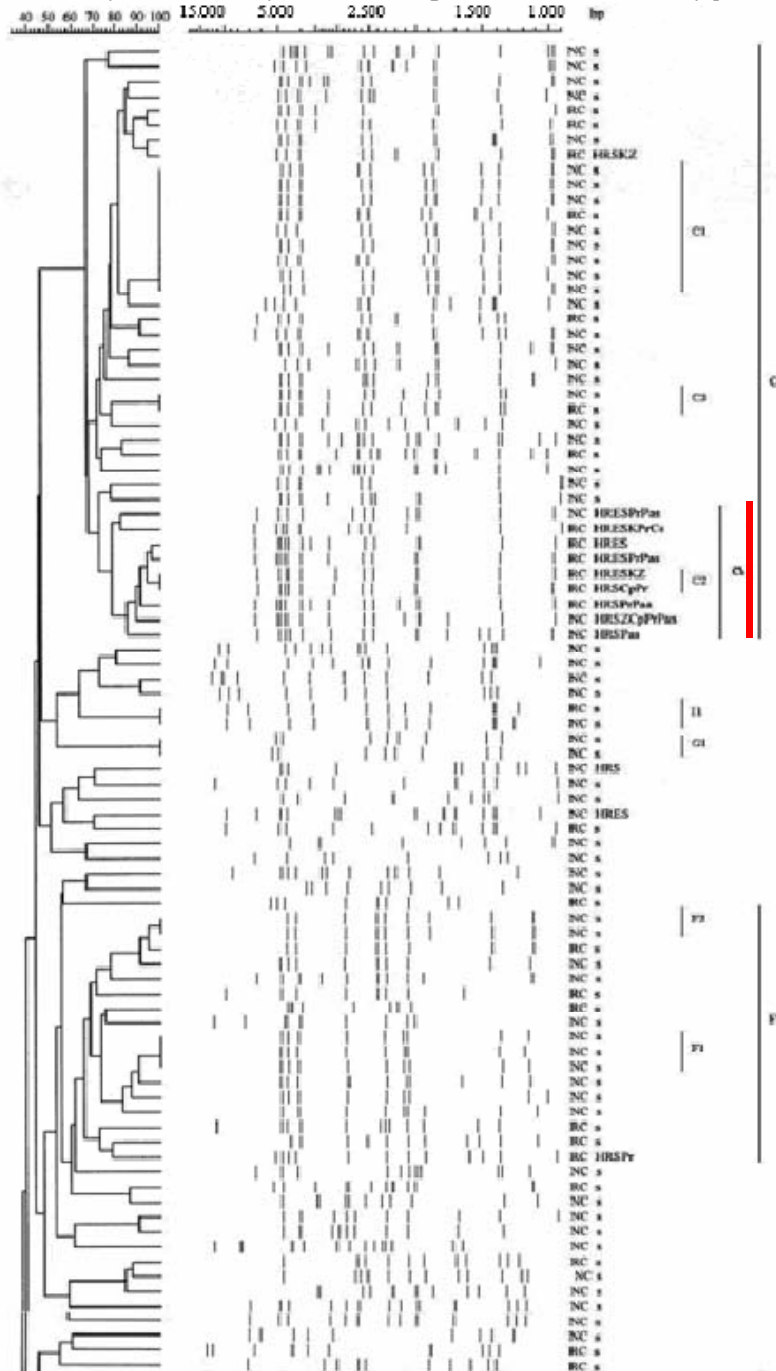
58 no tiem MDR - 82%

22 – jaunie gadījumi - 31%

49 – atkārtotie - 69%

Beijing genotips

6 - bērni




Dažādu 191 *M.tuberculosis* izolātu RFLP

- 120 no tiem ne -Beijing genotips - 63%
- 15 - no tiem MDR - 12%
- 90 – jaunie gadījumi - 75%
- 30 – atkārtotie - 25%

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

M.tuberculosis genotipi bērniem (2001-2011.g.dati)

 — identiski kontaktpersonai

 — Klusters  — LTBI

n=65

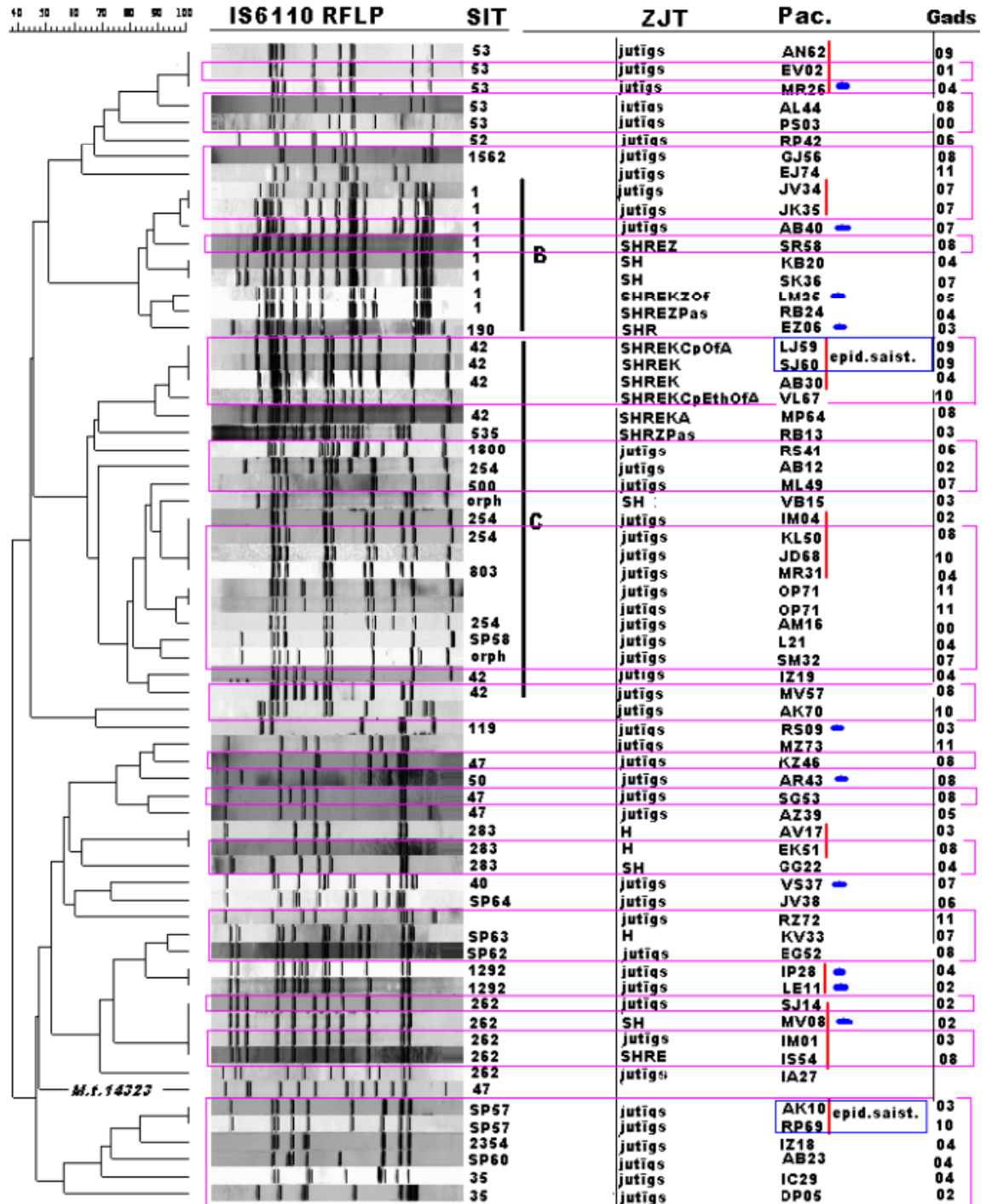
Beijing = 9 , 14%

MD,PR = 10 , 15%

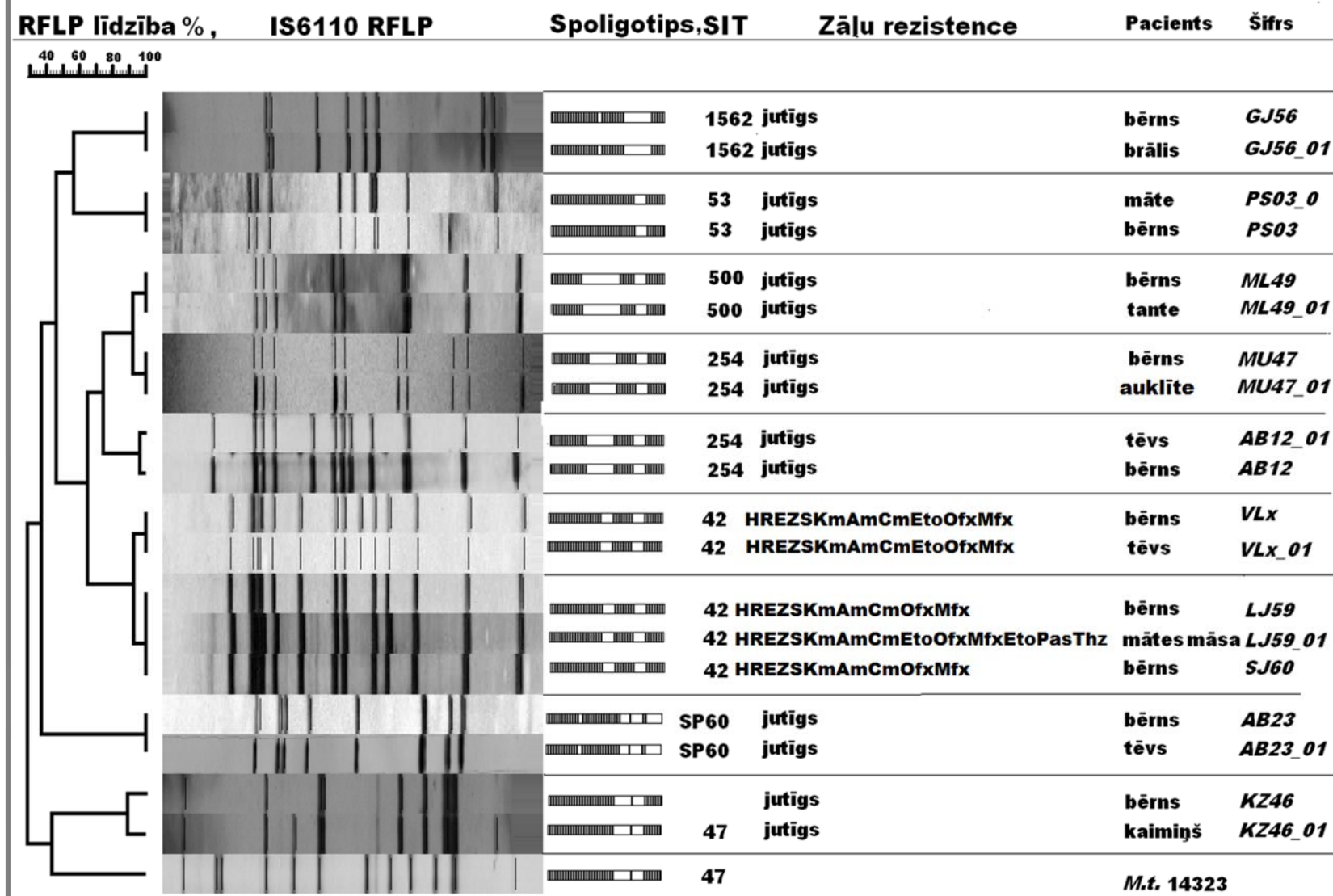
Beijing = 6 , 60%

Klasterēti=22, 34%

Klasterizācijas līmenis norāda uz nesenu transmisiju

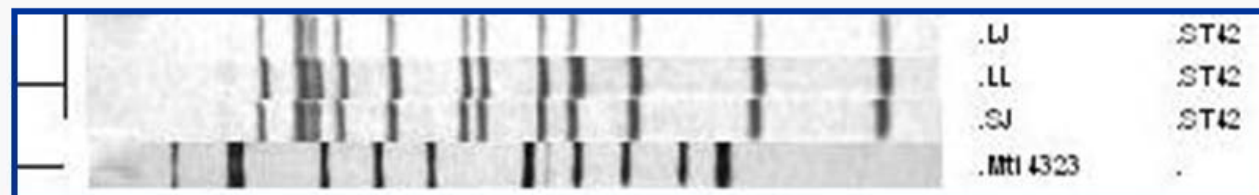
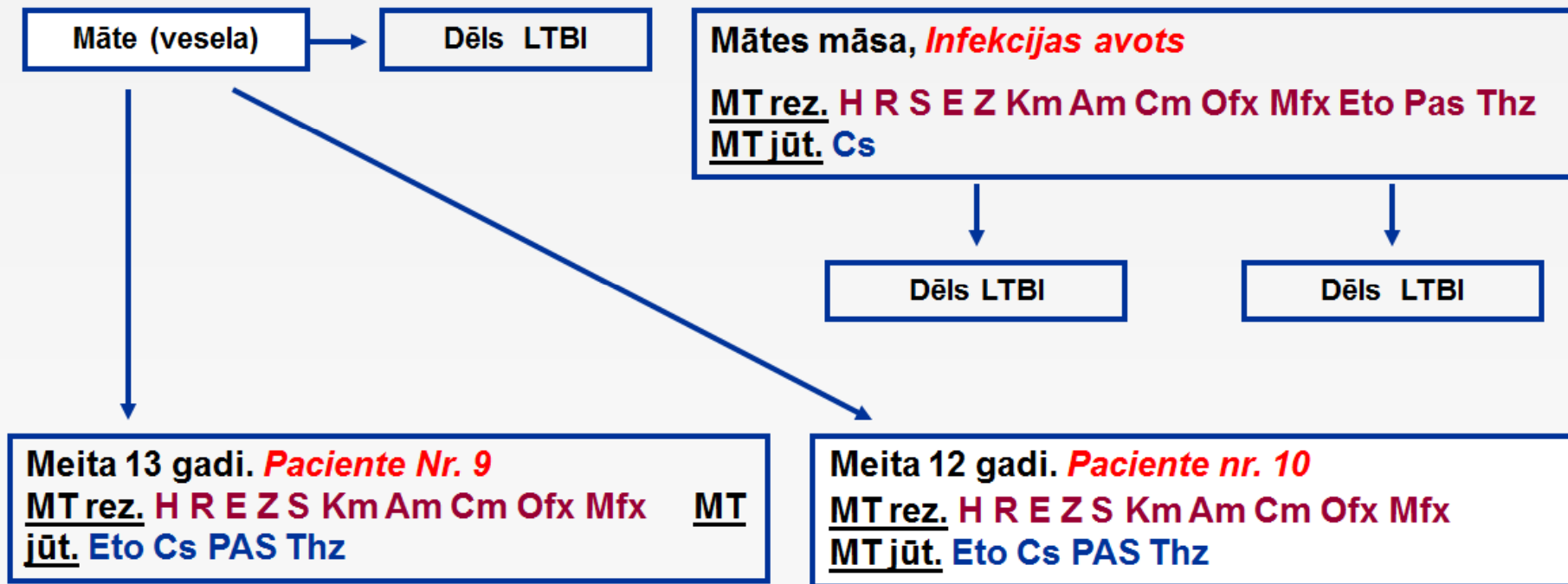


Dendrogramma



H: izoniazīds; R: rifampicīns; E: etambutols; Z: pirazinamīds; S: streptomīcīns; Km: kanamicīns; Am: amikacīns; Cm: kapreomicīns; Ofx: ofloksacīns; Mfx: moksifloksacīns; Eto: etionamīds; Thz: tioacetazons; Pas: para-aminosalicilskābe

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

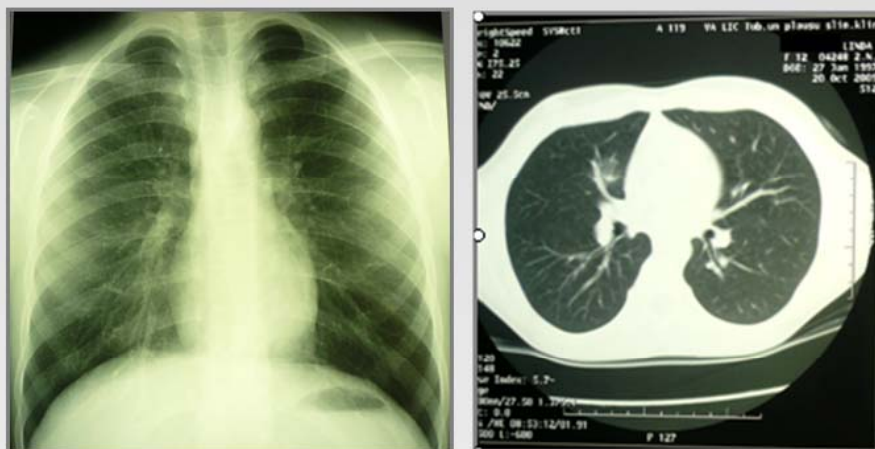


Paciente Nr. 10

- ❑ 12 gadus veca
- ❑ Klīniski vesela
- ❑ Pārbaudīta saistībā ar kontaktu ar TB slimnieku
- ❑ *Mantoux* tests 18 mm
- ❑ Radioloģiski *M.tuberculosis* izdales avots pārliecinoši nav skaidrs
- ❑ Bronholoģiski: bez patoloģijas
- ❑ MT kultūra iegūta no bronhu aspirāta un inducēto krēpu parauga

MT rezistenta: H R E Z S Km Am Cm Ofx Mfx

MT jutīga: Eto Cs PAS Thz

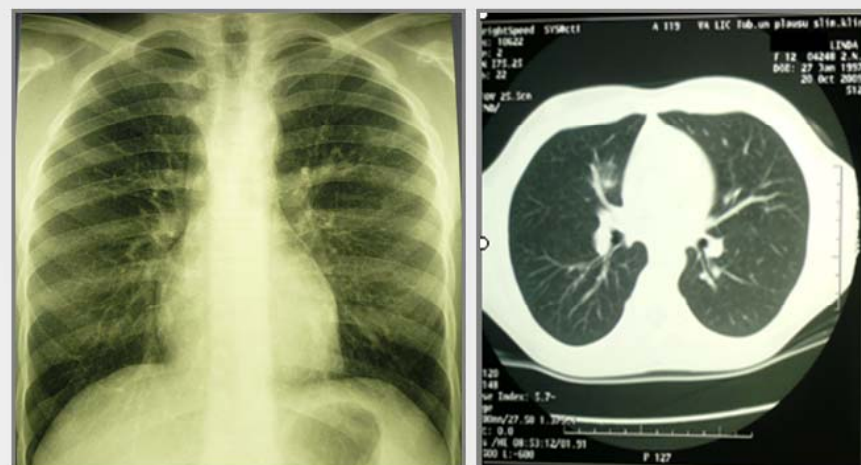


Paciente Nr. 9

- ❑ 13 gadus veca
- ❑ Klīniski vesela
- ❑ Pārbaudīta saistībā ar kontaktu ar TB slimnieku
- ❑ *Mantoux* tests 18 mm
- ❑ Radioloģiski *M.tuberculosis* izdales avots pārliecinoši nav skaidrs
- ❑ **Bronholoģiski:** kreisās augšdaivas 2. segmentārā bronha distālā daļā cauri gļotādai dzeltenīgs iespiedums, varētu būt limfas mezgls ar kazeozi. Ventilācija nav traucēta
- ❑ MT kultūra iegūta no bronhu aspirāta un inducēto krēpu parauga

MT rezistenta: H R E Z S Km Am Cm Ofx Mfx

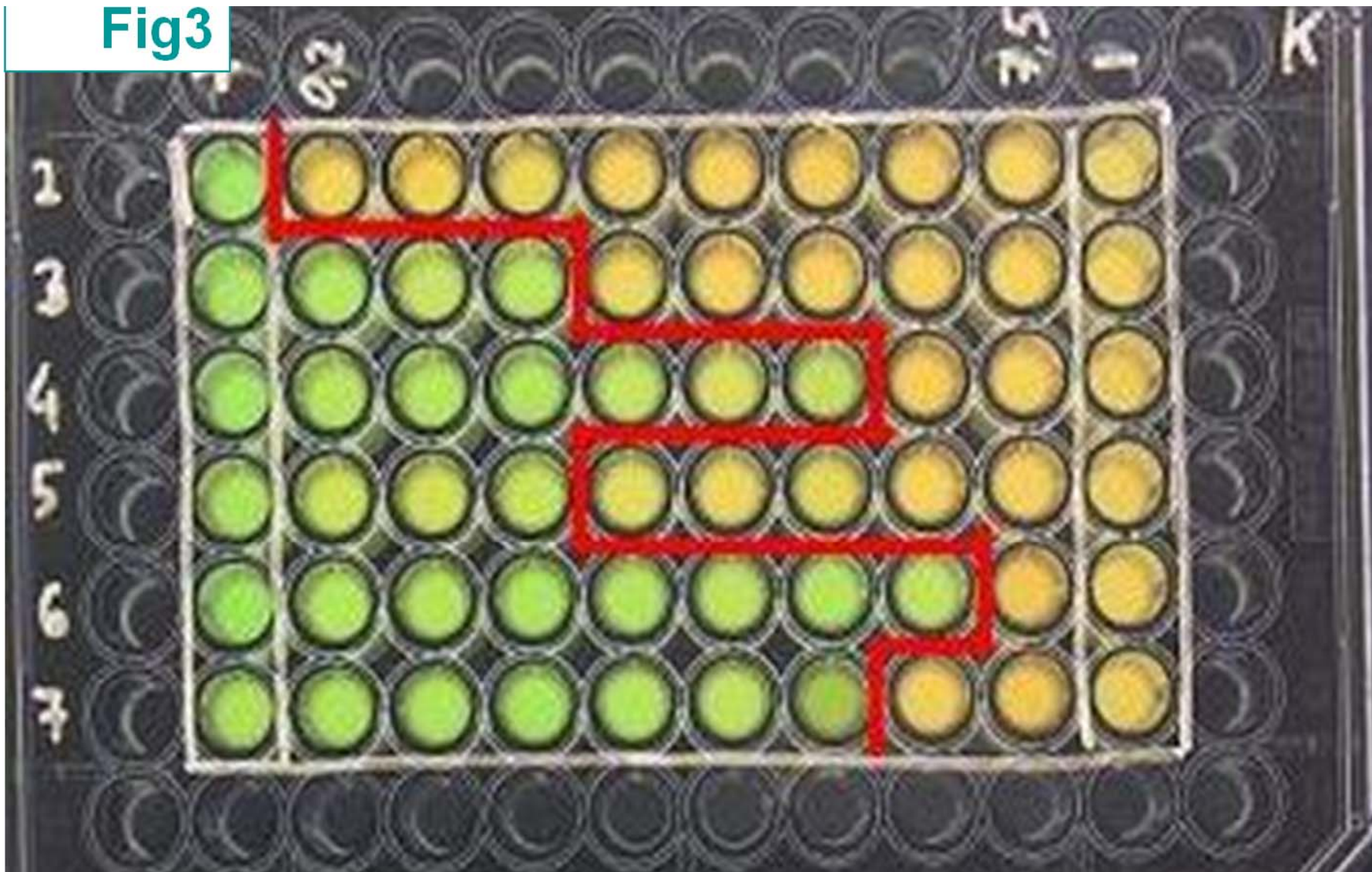
MT jutīga: Eto Cs PAS Thz



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 Kn CapPasEth	<i>rrs</i> A1400G	-
2	Tio	<i>rrs</i> A1400G	-
3	SHREZ Kn EthCap	<i>rrs</i> A1400G	-
4	SHRE Kn TioEthCap	<i>rrs</i> A1400G	-
5	SHRZ Kn	<i>rrs</i> A1400G	-
6	SHRE Kn	<i>rrs</i> A1400G	-
7	HREZ Kn CapOfTio	<i>rrs</i> A1400G	-
8	SHRE Kn PasClsEth	WT	<i>rrs</i> A513C
9	SHR Kn Tio	WT	<i>rrs</i> C516T
10	SHREZPas Kn Eth	WT	<i>rrs</i> C516T
11	SHREZ Kn	WT	-
12	SHREZ Kn EthTio	WT	-
13	SHE Kn Pas	WT	-
14	SHREZ Kn	WT	-
15	SHR Kn Eth	WT	-
16	TioPro	WT	-
17	SHRE Kn	WT	-
18	SHREZ Kn Of	WT	-
19	HRE Kn PasTio	WT	-
20	HR Kn Tio	WT	-
21	SHREZ Kn	WT	-
22	apTio	WT	-
23	HREZ Kn EthOfTio	WT	-
24	HREZ Kn 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 testa imunoplatēs shēma.
Kanamicīna «rezistences» noteikšana pie dažādām
preparāta koncentrācijām**

SECINĀJUMI

- 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

Publikāciju (rakstu) abstrakti un citas īsākas publikācijas (tēzes) atrodamas:

Tēzes

<http://www.esmycobacteriology.eu/>

1. Bauskenieks M., Pole I., Skenders G., Jansone I., Broka L., Nodieva A., Ozere I., Baumanis V. Compatibilities between aminoglycoside resistance level and genetic polymorphisms in tuberculosis mycobacteria. 32 nd Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, Scientific Program including abstracts, 26th-29th June 2011, Lubeck, Germany, p.88

2. Pole I., Skenders G., Jansone I., Baumanis V., Nodieva A., Riekstiņa V., Leimane V. Variation of M.tuberculosis lineage distribution in Latvia during the period from 1999 to 2010. 32 nd Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, Scientific Program including abstracts, 26th-29th June 2011, Lubeck, Germany, p.74

<http://www.nature.com/natureevents/science/events/8649-7th-ISABS-Conference-in-Forensic-Anthropologic-and-Medical-Genetics>

3. Gustina A., Pliss L., Gerhards G., Baumanis V. Applying ancient DNA analysis to post-medieval skeletons from Latvia. 7th ISABS Conference in Forensic, Anthropologic and Medical Genetics and Mayo Clinic Lectures in Translational Medicine, June 20-24, 2011, Brač, Croatia, p. 153

<http://www.farmacija-mic.lv/medica/medica>, LU zinātniskā bibliotēka

4. Baumanis V. Tuberkulozes vakcīnas – par un pret. *Materia medica*, 2011, Nr.11, 22-23 lpp.

<http://www.plzk.lv/>, LU zinātniskā bibliotēka

5. Nodieva A., Pole I., Cēsniņa L., Riekstiņa V., Koševacka A., Konošenoka Ž., Toma A., Skripčonoka V., Šķenders G., Žvīgure V., Lipska A., Bruse I., Deklava R., Strautmane Z., Leškeviča I., Biraua E., Ijaz K., Holtz T., Baumanis V., Leimane V., Moonan P. Infekcijas kontroles pasākumi multizāļu rezistences tuberkulozes izplatības samazināšanai stacionāros. Pasaules apvienotais latviešu zinātnieku 3. kongress un letonikas 4. kongress, Medicīnas zinātne un Latvijas sabiedrības veselība XXI gadsimtā. Tēzes, Rīga, 2011, 63-64 lpp.

<http://www.plzk.lv/>, LU zinātniskā bibliotēka

6. Ozere I., Nodieva A., Jansone I., Šķenders G., Pole I., Broka L., Baušķenieks M., Baumanis V., Bobrikova O., Lauska Z., Koševacka A., Morozova I., Zarovska E., Leimane V. Infekcijas kontroles pasākumi multizāļu rezistences tuberkulozes izplatības samazināšanai stacionāros. Pasaules apvienotais latviešu zinātnieku 3. kongress un letonikas 4. kongress, Medicīnas zinātne un Latvijas sabiedrības veselība XXI gadsimtā. Tēzes, Rīga, 2011, 65 lpp.

<http://www.plzk.lv/>, LU zinātniskā bibliotēka

7. Koševacka A., Nodieva A., Krējere I., Melgaile M., Šķenders G., Broka L., Norvaiša I., Zarovska E., Morozova I., Leimane V. Infekcijas pārtraukšana pirmreizējiem infekcioziem tuberkulozes slimniekiem. Pasaules apvienotais latviešu zinātnieku 3. kongress un letonikas 4. kongress, Medicīnas zinātne un Latvijas sabiedrības veselība XXI gadsimtā. Tēzes, Rīga, 2011, 51 lpp.

<http://www.erscongress2011.org/>

8. Nodieva A, Skenders G, Jansone I, Bauskenieks M, Pole I, Broka L, Morozova I, Baumanis V, Leimane V “ Who are at risk for tuberculosis recurrence?” 21 ERS Annual congress, Amsterdam, The Netherlands 24-28 September 2011. ERJ Vol 38, suppl 55, 806s

Raksti atrodami PubMed, NIH <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?term=Baumanis%20V.&db=pubmed>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?term=Skenders%20V.&db=pubmed>

9. Mironova S, Pimkina E, Kontsevaya I, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, **Skenders G**, Kummik T, Drobniewski F. [Performance of the GenoType® MTBDRPlus assay in routine settings: a multicenter study](#). Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011 Oct 25

10. **Skenders GK**, Holtz TH, Riekstiņa V, Leimane V. [Implementation of the INNO-LiPA Rif. TB® line-probe assay in rapid detection of multidrug-resistant tuberculosis in Latvia](#). Int J Tuberc Lung Dis. 2011 Nov;15(11):1546-52.

11. [Martin A, Paasch F, Docx S, Fissette K, Imperiale B, Ribón W, González LA, Werngren J, Engström A, Skenders G, Juréen P, Hoffner S, Del Portillo P, Morcillo N, Palomino JC. Multicentre laboratory validation of the colorimetric redox indicator \(CRI\) assay for the rapid detection of extensively drug-resistant \(XDR\) Mycobacterium tuberculosis](#). J Antimicrob Chemother. 2011 Apr;66(4):827-33.

12. [Pliss L, Brakmanis A, Ranka R, Elferts D, Krumina A, Baumanis V.](#)

The link between mitochondrial DNA hypervariable segment I heteroplasmy and ageing among genetically unrelated Latvians.

[Exp Gerontol](#). 2011 Jul;46(7):560-8. Epub 2011 Mar 3.