

DOI: 10.26693/jmbs03.03.140

УДК 616.24-002.5-015.8-07:577.2.088.7

Разнатовська О. М.¹, Камишний О. М.¹,
Ткачова О. Л.¹, Рохманова Н. А.², Кліменко А. В.²

ОЦІНКА РЕЗУЛЬТАТІВ ВПРОВАДЖЕННЯ GENOTYPE MTBDRPLUS V.2 ДЛЯ РАННЬОЇ ДІАГНОСТИКИ МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНИЙ ФОРМ ТУБЕРКУЛЬОЗУ У ЗАПОРІЗЬКІЙ ОБЛАСТІ

¹Запорізький державний медичний університет, Україна

²КЗ «Запорізький обласний протитуберкульозний клінічний диспансер», Україна

rahnatovskaya@gmail.com

Метою дослідження було провести оцінку отриманих результатів дослідження клінічних зразків мокротиння за допомогою тест-системи GenoType MTBDRplus v.2 з метою ранньої діагностики мультирезистентного туберкульозу у Запорізькій області.

Від 200 хворих з новими та повторними випадками захворювання на туберкульоз з наявністю бактеріовиділення отримано по 1 зразку мокротиння.

Діагностика резистентності до Rif в тесті GenoType MTBDRplus, v.2 була вища на 18%, ніж в тесті Genexpert MTB/RIF. Визначається висока частота мутації в гені *rpoB* (46,5%) та одночасно в 2 генах *katG* + *inhA* (34%). Мутації одночасно в 3 генах *rpoB* + *katG* + *inhA* діагностовано у 26,5% випадках. Чутливість тест-системи GenoType MTBDRplus, v.2 склала 97,2%, а специфічність – 85%.

В результаті проведених досліджень встановлено, що у хворих з новими та повторними випадками захворювання на туберкульоз з наявністю бактеріовиділення застосування тест-системи GenoType MTBDRplus, v.2 дає можливість на протязі 2-х діб встановити діагноз мультирезистентного туберкульозу у 37,5%.

Ключові слова: мультирезистентний туберкульоз, діагностика, GenoType MTBDRplus.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Стаття є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри фізіотерії і пульмонології Запорізького державного медичного університету за грантом «Оцінка впровадження GenoType MTBDRplus для ранньої діагностики мультирезистентний форм туберкульозу у Запорізькій області, Україна» (термін 2016-2017 рр.). Матеріально-технічне забезпечення: Фонд Мер'є (Франція) на підставі меморандуму між ЗДМУ та Фондом Мер'є, (Франція), 2015.

Вступ. Мультирезистентний туберкульоз (МРТБ) – найбільш поширене інфекційне захворювання та сама несприятлива форма туберкульозу [12, 13]. В Україні визначається зростання кількості зареєстрованих випадків захворювання на МРТБ [2].

На сьогодні із молекулярно-генетичних методів діагностики туберкульозу в Україні широко використовується тест-система Genexpert MTB/RIF, яка дає змогу одночасно виявити наявність мікобактерій (МБТ) та визначити мутації гену в кодоні *rpoB*, який асоційований з резистентністю до рифампіцину (Rif) [1, 3, 6]. На тлі переваг даного тесту у швидкості його проведення (2 години), високій чутливості та специфічності, недоліком є те, що дослідити можна лише мокротиння або його осад та визначити стійкість МБТ тільки до Rif [12].

Тест-система Genotype® MTBRplus version (v.) 2 (Hain Lifescience GmbH, Germany) дозволяє швидко одночасно ідентифікувати *M. tuberculosis complex* та визначити мутації гену в кодоні *rpoB* (Rif) та мутацій генів в кодонах *katG* та *inhA*, які асоційовані з резистентністю до ізоніазиду [11]. Значною перевагою цієї тест-системи є можливість дослідити не лише мокротиння, а й бронхоальвеолярний змив, плевральну та спинномозкову рідини.

За даними літератури, діагностична чутливість Genotype® MTBRplus v. 2 складає 95-97%, а специфічність – 85-90% [5, 8]. Використання цієї тест-системи дозволяє скоротити час діагностики МРТБ, своєчасно та правильно визначитися з тактикою лікування, що є актуальним для нашої країни [7, 9].

Мета дослідження – провести оцінку отриманих результатів дослідження клінічних зразків мокротиння за допомогою тест-системи GenoType MTBDRplus v.2 з метою ранньої діагностики МРТБ у Запорізькій області.

Об'єкт і методи дослідження. Від 200 хворих з новими та повторними випадками захворювання на туберкульоз з наявністю бактеріовиділення отримано по 1 зразку мокротиння, який використувався для: мікроскопії, проведення тестів Genexpert MTB/RIF та GenoTypeMTBDRplus v.2, посівів на середовище Левенштейна-Йенсена з виділенням культур МБТ. Усі хворі обстежувалися і лікувалися у протитуберкульозних диспансерах Запорізької області.

Дослідження виконані з дотриманням основних положень «Правил етичних принципів проведення наукових медичних досліджень за участю людини», затверджених Гельсінською декларацією (1964-2013 рр.), ICH GCP (1996 р.), Директиви ЄЕС № 609 (від 24.11.1986 р.), наказів МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р., № 944 від 14.12.2009 р., № 616 від 03.08.2012 р. Кожен пацієнт підписував інформовану згоду на участь у дослідженні.

Деконтамінацію клінічних зразків проводили у мікробіологічній лабораторії III рівня КУ «Запорізький обласний протитуберкульозний клінічний диспансер» з використанням Eppendorf ThermoStat C (Germany). Виконання досліджень за допомогою тест-системи GenoType MTBDRplus, v.2 (Hain Lifescience GmbH, Germany) проводили у відділі молекулярно-генетичних досліджень кафедри мікробіології, вірусології та імунології ЗДМУ згідно інструкції виробника поетапно [10]: 1 етап – виділення ДНК із проб клінічних зразків проводився у DNA/RNA UV-Cleaner Box (Latvia) з використанням набору реагентів GenoLyse (Hain Lifescience GmbH, Germany), 2 етап – мультиплексна ампліфікація з використанням прибору T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, United States), 3 етап – гібридизація з використанням термошейкера Twincubator (Hain Lifescience GmbH, Germany). Результати оформлювали у вигляді протоколів.

Діагностичні параметри тест-системи GenoType MTBDRplus, v.2 розраховували за формулами [4]:

$$1) \text{ Чутливість тесту} = \frac{ІП}{ІП+ХН} \times 100,$$

$$2) \text{ Специфічність тесту} = \frac{ІН}{ІН+ХП} \times 100,$$

де ІП – кількість істинно позитивних результатів, ІН – кількість істинно негативних результатів, ХП – кількість хибнопозитивних результатів, ХН – кількість хибнонегативних результатів.

Результати дослідження оброблені сучасними методами аналізу на персональному комп'ютері з використанням статистичного пакету ліцензійної

програми «STATISTICA® for Windows 6.0» (Stat Soft Inc., № AXXR712 D833214FAN5). Нормальність розподілу кількісних ознак аналізували за допомогою тесту Шапіро-Уїлка. Параметри мали нормальний розподіл. Порівняння показників у групах здійснили із застосуванням критерію Стьюдента. Статистично значущою вважали різницю за $p < 0,05$. Усі тести були двобічними. Для визначення достовірних відмінностей між якісними показниками використовували непараметричні статистичні критерії (аналіз чотирипільних таблиць – критерій χ^2).

Результати дослідження та їх обговорення.

За допомогою тест-системи GenoType MTBDRplus, v.2 протестовано 200 клінічних зразків мокротиння від хворих, у яких встановлено бактеріовиділення, із них мікроскопічним методом бактеріовиділення діагностовано в 136 зразках (68%), а за допомогою тест-системи Genexpert MTB/RIF – в 200 зразках (100%).

В тесті Genexpert MTB/RIF в 57 зразках (28,5%) діагностовано Rif+, в 143 (71,5%) – визначалася чутливість до Rif (рис. 1). В тесті GenoType MTBDRplus, v.2 ізольована резистентність до H діагностувалася у 57 зразках (28,5%), ізольована резистентність до Rif – у 6 (3%), резистентність до HRif (мультирезистентність) – у 87 (43,5%), чутливими до HRif були 50 зразків (25%).

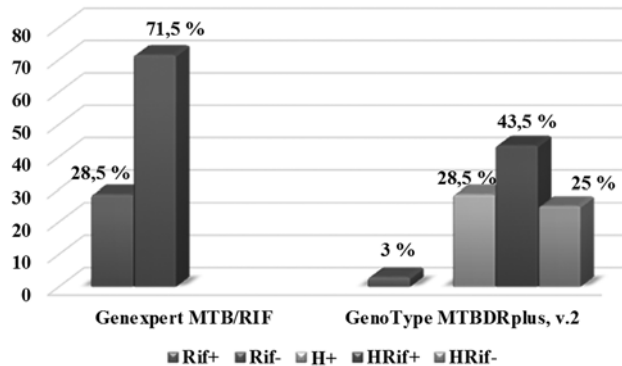


Рис. 1. Частота діагностики резистентності до H та Rif за допомогою тест-систем Genexpert MTB/RIF та GenoType MTBDRplus, v.2

Як бачимо, діагностика резистентності до Rif в тесті GenoType MTBDRplus, v.2 була достовірно вищою на 18%, ніж в тесті Genexpert MTB/RIF (93 (46,5%) проти 57 (28,5%) відповідно, $p < 0,001$). Збережена чутливість до антимікобактеріальних препаратів (АМБП) в тесті Genexpert MTB/RIF була достовірно вищою на 46,5%, ніж в тесті GenoType MTBDRplus, v.2 (71,5% проти 25%, $p < 0,001$).

Проведено вивчення спектру генетичних мутацій до H та Rif (рис. 2).

Встановлено, що мутації в гені *groV*, який кодує лікарську стійкість (ЛС) до Rif (у тому числі й

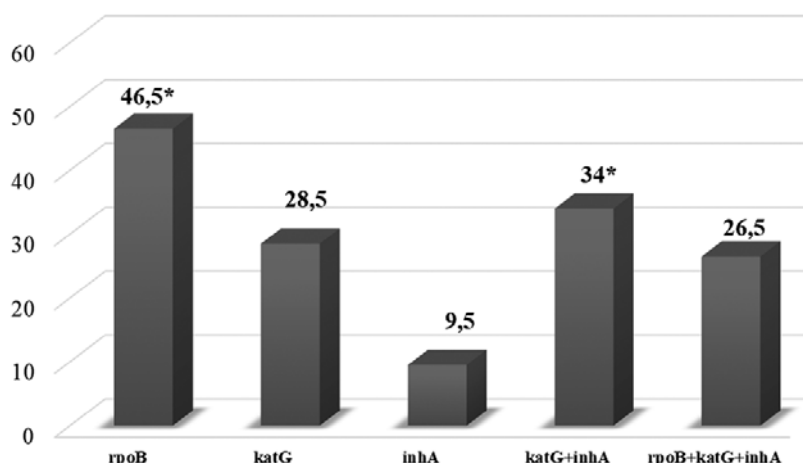


Рис. 2. Спектр генетичних мутацій до H та Rif, визначений за допомогою тест-системи GenoType MTBDRplus, v.2, %

мультирезистентних) визначалися у 93 зразках (46,5%), що було достовірно частіше, ніж інші мутації ($\chi^2=21,12$; $p<0,001$). Із кількості H-резистентних штамів (у тому числі й мультирезистентних) найбільшу кількість склали мутації одночасно в 2 генах

концентрації КСБ у мазку достовірно частіше за допомогою тест-системи GenoType MTBDRplus, v.2 діагностувалась мультирезистентність ($\chi^2=8,5$; $p<0,05$), ніж ізольована резистентність до H чи Rif та чутливість зразків до HRif.

Таблиця – Розподіл клінічних зразків, у яких методом мікроскопії мазка були визначені КСБ, за їх концентрацією та резистентністю до H та Rif

Концентрація КСБ у мазку (n)	Ізольована резистентність до H		Ізольована резистентність до Rif		Резистентність до HRif		Чутливі зразки до HRif	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
1-9 КСБ (n=18)	6	33,3	2	11,1	8	44,5	2	11,1
1+ (n=56)	16	28,6	0	0	19	33,9	21	37,5
2+ (n=20)	5	25,0	0	0	8	40,0	7	35,0
3+ (n=42)	12	28,6	1	2,4	16	38,1	13	30,9
Всього (n=136)	39	28,7	3	2,2	51	37,5*	43	31,6

Примітка: * – достовірна відмінність показника ($p<0,05$).

При порівнянні результатів тест-системи GenoType MTBDRplus, v.2 і абсолютних концентрацій на середовищі Левенштейна-Йенсена встановлено, що чутливість і специфічність тест-системи GenoType MTBDRplus, v.2 для H склали 95,8% і 88% відповідно, для Rif – 97,8% і 95,8%. В цілому чутливість і специфічність тест-системи GenoType MTBDRplus, v.2 склали 97,2% і 85% відповідно.

Висновки

1. Діагностика резистентності до Rif в тесті GenoType MTBDRplus, v.2 була вища на 18%, ніж в тесті Genexpert MTB/RIF (46,5% проти 28,5%, $p<0,001$).
2. При використанні тест-системи GenoType MTBDRplus, v.2 у Запорізькій області визначається достовірно висока частота мутації в гені rpoB (46,5%) та мутації одночасно в 2 генах katG + inhA (34%). При цьому, мутації одночасно в 3 генах rpoB + katG + inhA діагностовано у 26,5% випадках.

3. Незалежно від концентрації КСБ у мазку достовірно частіше діагностується мультирезистентність (37,5%), ніж ізольована резистентність до H (28,7%) чи Rif (2,2%) та чутливість зразків до HRif (31,6%).
4. Чутливість тест-системи GenoType MTBDRplus, v.2 склали 97,2%, а специфічність – 85%.
5. Таким чином, при тому, що проведення тестів GenoType MTBDRplus, v.2 складніше, ніж Genexpert MTB/RIF, самі тести більш чутливі. У хворих з новими та повторними випадками захворювання на туберкульоз з наявністю бактеріовиділення застосування тест-системи GenoType MTBDRplus, v.2 дає можливість на протязі 2-х діб встановити діагноз МРТЕ у 37,5% випадків та своєчасно розпочати цим пацієнтам оптимальний режим АМБТ.

Перспективи подальших досліджень. В подальшому планується проведення досліджень у ранній діагностиці мультирезистентних форм туберкульозу.

References

1. Barbova AI, Zhurylo OA, Zherebko NM, Chayka AO. *Poryadok vykorystannya molekulyarno-henetychnykh metodiv u laboratoriyakh z diahnozyky tuberkulozu v Ukraini: metodychni rekomendatsiyi*. Kyiv, 2014. 17 s. [Ukrainian]
2. Borovyk SP. Multyrezystentnyi tuberkuloz: aktualni pytannya vedennya khvorykh, mizhnarodni pidkhody ta natsionalnyi dosvid [digital resource]. *Ukrainskyi medychnyi chasopys*. 2015 [tsytovano 2015 Kvit. 06]. Available from: <http://www.umj.com.ua/article/85659/multirezistentnij-tuberkuloz-aktualni-pitannya-vedennya-xvorix-mizhnarodni-pidxodi-ta-nacionalnij-dosvid>. [Ukrainian]
3. Zhurylo OA, Barbova AI, Cherenko SO., Popova KYe, Pavlenko OM, Chayka AO. *Alhorytm diahnozyky khimioresyistentnoho tuberkulozu z kompleksnym vykorystanniam heno- ta fenotypichnykh metodiv v bakteriologichnykh laboratoriyakh protytuberkuloznykh zakladiv Ukrainy: metodychni rekomendatsiyi*. Kyiv. 2013. 21 s. [Ukrainian]
4. Ignateva O. A. *Lekarstvennaya ustoychivost shtammov Mycobacterium tuberculosis i optimizatsiya diagnosticheskikh algoritmov na primere Samarskoy oblasti* [dissertatsiya]. Samara: Samar gos un-t; 2015. 157 s. [Russian]
5. Nikolaevskiy VV, Balabanova YaM, Mironova SA, Kontsevaya IS, Ignateva OA, Chinkova YuD, i dr. Chuvstvitelnost i spetsifichnost molekulyarnogeneticheskoy test-sistemy Hain MTBDRplus dlya ekspress-diagnostiki lekarstvennoy chuvstvitelnosti mikobakteriy tuberkuleza na materiale mokroty. *Problemy tuberkuleza i bolezney legkikh*. 2010; 4: 28-34. [Russian]
6. Raznatovska OM, Mikhaylova AO, Kostenko IA. Effektivnost Genexpert MTB/RIF u bolnykh s novymi sluchayami i retsidivami tuberkuleza legkikh. *Aktualnaya infektologiya*. 2015; 2: 55-7. [Russian]
7. Raznatovskaya EN, Khudyakov GV, Gritsova NA. Molekulyarno-geneticheskie metody diagnostiki i ikh ispolzovanie vo ftiziatrii. *Suchasni medichni tekhnologiyi*. 2016; 2: 63-71. [Russian]
8. Fedorin IM, Nikolaevskiy VV, Balabanova YaM, Malamanova NA, Mironova SA, Ignateva OA, i dr. Chuvstvitelnost i spetsifichnost molekulyarno-geneticheskoy test-sistemy Hain MTBDRplus dlya ekspress- diagnostiki lekarstvennoy chuvstvitelnosti mikobakteriy tuberkuleza na materiale mokroty. *Problemy tuberkuleza i bolezney legkikh*. 2010; 4: 28-34. [Russian]
9. Filatova OV, Boyko MG. Rol genetichnikh doslidzhen v likuvanni tuberkulozu. *Visnik problem biologiyi i meditsini*. 2013; 2 (99): 221-3. [Ukrainian]
10. *GenoType® MTBDRplus*. Instruction for Use. Hain Lifescience. Nehren, Germany. 2009. 144 p.
11. Kipiani M, Mirtskhulava V, Tukvadze N, Magee M, Blumberg HM, Kempker RR. Significant clinical impact of a rapid molecular diagnostic test (Genotype MTBDRplus assay) to detect multidrug-resistant tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 2014; 59 (11): 1559-66. PMID: 25091301. PMCID: PMC4357804. doi: 10.1093/cid/ciu631.
12. World Health Organization. Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children. *WHO/HTM/TB/2013.16*. 2013. 79 p.
13. World Health Organization. The use of molecular line-probe assay for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs. WHO expert group meeting report Geneva: February 2013. *WHO/HTM/TB/2013.01*. 2013. 52 p.

УДК 616.24-002.5-015.8-07:577.2.088.7

ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ВНЕДРЕНИЯ GenoTypeMTBDRplus v.2 ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНЫХ ФОРМ ТУБЕРКУЛЕЗА В ЗАПОРОЖСКОЙ ОБЛАСТИ

*Разнатовская Е. Н., Камышный А. М., Ткачева Е. Л.,
Рохманова Н. А., Клименко А. В.*

Резюме. Цель исследования – провести оценку полученных результатов исследования клинических образцов мокроты с помощью тест-системы GenoTypeMTBDRplus, v.2 с целью ранней диагностики мультирезистентного туберкулеза в Запорожской области.

От 200 больных с новыми и повторными случаями заболевания туберкулезом с наличием бактериовыделения получено по 1 образцу мокроты.

Диагностика резистентности к Rif в тесте GenoType MTBDRplus, v.2 была выше на 18%, чем в тесте Genexpert MTB/RIF. Определяется высокая частота мутации в гене *rpoB* (46,5%) и одновременно в 2 генах *katG* + *inhA* (34%). Мутации одновременно в 3 генах *rpoB* + *katG* + *inhA* диагностировано у 26,5% случаях. Чувствительность тест-системы GenoTypeMTBDRplus, v.2 составила 97,2%, а специфичность – 85%.

В результате проведенных исследований установлено, что у больных с новыми и повторными случаями заболевания туберкулезом с наличием бактериовыделения применение тест-системы GenoTypeMTBDRplus, v.2 дает возможность в течение 2-х суток установить диагноз мультирезистентного туберкулеза в 37,5 %.

Ключевые слова: мультирезистентный туберкулез, диагностика, GenoTypeMTBDRplus.

UDC 616.24-002.5-015.8-07:577.2.088.7

Evaluation of the Results of GenoTypeMTBDRplus v.2 Implementation for the Early Diagnosis of Multi-Resistant Forms of Tuberculosis in Zaporizhzhia Region

*Raznatovska O. M., Kamyshny O. M., Tkacheva O. L.,
Rochmanova N. A., Klimenko A. V.*

Abstract. The article is a fragment of the research work of the Department of Phthisiology and Pulmonology of the Zaporizhzhia State Medical University under the grant "Evaluation of the results of GenoTypeMTBDRplus v.2 implementation for the early diagnosis of multi-resistant forms of tuberculosis in Zaporizhzhia region, Ukraine" (2016-2017). Logistics: Merrier Foundation (France) on the basis of a memorandum between Zaporizhzhia State Medical University and Merrier Foundation (France), 2015. Multidrug resistant tuberculosis (MDRTB) is the most common infectious disease and the most unfavorable form of tuberculosis. The GenoTypeMTBDRplus v.2 provides rapid identification of the *M. tuberculosis* complex and the detection of gene mutations in *rpoB* (Rif) codon and mutations in the *katG* and *inhA* codons that are associated with isoniazid resistance.

Study objective is to evaluate the obtained results of the study of clinical specimens of sputum using GenoTypeMTBDRplus v.2 test system for the early diagnosis of MRTB in Zaporizhzhia region.

Study object and methods. 200 patients with new and repeated cases of tuberculosis with the presence of bacterial excretion provided one sputum sample each which was used for microscopy, Genexpert MTB/RIF and GenoTypeMTBDRplus v.2 tests, cultures on the Levenstein-Jensen medium with MBT cultures. The decontamination of clinical specimens was carried out in the microbiological laboratory of the III level of Municipal Establishment "Zaporizhzhia Regional Tuberculosis Clinical Dispensary" using Eppendorf ThermoStat C (Germany). Study was carried out using the GenoTypeMTBDRplus test system v.2 (Hain Lifescience GmbH, Germany) in the department of molecular genetic research of the Department of Microbiology, Virology and Immunology of the Zaporizhzhia State Medical University in accordance with the stepwise manufacturer's instructions.

Study results. The diagnosis of resistance to Rif in the GenoTypeMTBDRplus, v.2 test was higher by 18% than in the Genexpert MTB/RIF test (46,5% versus 28,5 %, $p < 0,001$). When using the GenoTypeMTBDRplus, v.2 test system in Zaporizhzhia region, a significantly higher mutation rate in the *rpoB* gene (46,5%) and simultaneous mutations in the 2 genes of *katG* + *inhA* (34%) are determined. In this case, simultaneous mutations in 3 genes of *rpoB* + *katG* + *inhA* are diagnosed in 26,5% of cases. Irrespective of the concentration of acid-resistant bacteria in the smear, the multidrug resistance (37,5%) is significantly more likely to be diagnosed compared with isolated resistance to isoniazid (28,7%) or rifampicin (2,2%) and sensitivity of the samples (31,6%). The sensitivity of the GenoTypeMTBDRplus test system, v.2 is 97,2%, and the specificity is 85%.

Conclusions. Thus, performance of GenoTypeMTBDRplus, v.2 tests is more complicated than Genexpert MTB/RIF, and the tests are more sensitive. In patients with new and repeated cases of tuberculosis with the presence of bacteria, the use of GenoTypeMTBDRplus, v.2 test system provides 2 days to diagnose MDRTB in 37,5% of cases and to start the optimal treatment of antimycobacterial therapy in a timely manner for these patients.

Keywords: multidrug resistant tuberculosis, diagnosis, GenoTypeMTBDRplus.

Стаття надійшла 26.02.2018 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування