

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ
"CAROL DAVILA"

TEZĂ DE DOCTORAT

EVOLUȚIA PROFILULUI DE REZISTENȚĂ
A TULPINILOR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
SELECTATE DE LA PACIENȚI TB MDR
AFLAȚI SUB TRATAMENT

REZUMAT

Coordonator:
Prof. Univ. Dr. MARIAN NEGUȚ

Doctorand:
Dr. ROXANA MÎNDRU
Medic primar medicină de laborator

BUCUREȘTI
2017

CUPRINS

INTRODUCERE.....	4
POLITICA GLOBALĂ DE SĂNĂTATE PUBLICĂ.....	4
MĂSURI CU REZULTATE FAVORABILE ÎN COMBATAREA TUBERCULOZEI	5
1. Depistarea tuberculozei și tratamentul ei	5
2. Detectarea TB MDR și rezultatele tratamentului	5
3. Diagnosticul de laborator în TB și consolidarea laboratoarelor	5
4. Abordarea problemelor co-epidemiilor TB HIV	5
5. Instituirea unei strategii globale de combatere	5
SITUAȚIA TUBERCULOZEI ÎN ROMÂNIA.....	6
CAPITOLUL I. TUBERCULOZA – O PATOLOGIE APARTE.....	6
SCURT ISTORIC	6
DEFINIȚIE.....	6
ISTORIA NATURALĂ A BOLII	7
ETIOLOGIE	7
CARACTERISTICI ȘI PARTICULARITĂȚI STRUCTURALE ALE <i>M. tuberculosis</i>	7
Structura antigenică.....	7
<i>Tuberculinele</i>	7
<i>Gene implicate în supraviețuirea intracelulară</i>	8
Structura celulară și metabolismul	8
Structura genomului	8
CAPITOLUL II. DIAGNOSTICUL BACTERIOLOGIC	9
Algoritm pentru detectarea cazurilor TB DR.....	9
EXAMENUL MICROSCOPIC	10
DIAGNOSTICUL PRIN CULTURĂ	10
Medii clasice	10
Medii selective	10
Sisteme automate de cultivare	10
Metoda imunocromatografică de detecție calitativă a complexului <i>M. tuberculosis</i> din cultură cu Ag MPT64.....	11
TESTAREA MOLECULARĂ	11
Introducere	11
Teste de hibridizare liniară (Line Probe Assay)	12
TESTAREA SENSIBILITĂȚII LA TUBERCULOSTATICE DE LINIA I-A ȘI A II-A A TULPINILOR DE <i>M. tuberculosis</i>	12
Metode utilizate pentru testarea sensibilității la antituberculoase.....	13
<i>Metoda proporțiilor</i>	13
<i>Metoda concentrațiilor absolute</i>	13
CAPITOLUL III. CERCETĂRI PROPRII	13
VALOARE DIAGNOSTICĂ A DETERMINĂRII MUTAȚIILOR DE REZISTENȚĂ.....	13
Scurta introducere	13
Obiectivul studiului	14
MATERIALE ȘI METODE	14

Metodologia studiului	14
Algoritmul de diagnostic utilizat în cercetare (studiu)	15
TESTAREA SENSIBILITĂȚII LA SUBSTANȚELE ANTITUBERCULOASE	15
TESTAREA CHIMIOSENSIBILITĂȚII TULPINILOR DE <i>M.tuberculosis</i> LA SUBSTANȚE	
ANTITUBERCULOASE	15
Principiu	16
Antibiogramă – Metoda concentrațiilor absolute	16
<i>Principiu</i>	16
Antibiogramă – Metoda proporțiilor	17
<i>Principiu</i>	17
CONFIRMAREA DIAGNOSTICULUI DE TUBERCULOZĂ ȘI DEPISTAREA MUTAȚIILOR DE	
REZISTENȚĂ PRIN METODE MOLECULARE	17
Metoda LPA.....	17
<i>Principiul metodei</i>	17
GenoType MTBDRplus și MTBDRsl	17
<i>Evaluarea și interpretarea rezultatelor</i>	18
ANALIZA STATISTICĂ A DATELOR	19
Rezultate	20
Asigurarea calității rezultatelor.....	20
CAPITOLUL IV. REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	20
A. Analiza unor date demografice	20
<i>Vârsta și sexul</i>	21
<i>Mediul de proveniență</i>	22
<i>Calitatea de asigurat/neasigurat</i>	22
<i>Testarea HIV</i>	22
B. Evoluția (în timp) a fenomenului MDR	23
<i>Evoluția în timp de la momentul declarării CN de tuberculoză sensibilă/CN-MDR</i>	23
<i>Evoluția de la momentul declarării CN până la deces</i>	24
<i>Evoluția de la momentul declarării caz MDR la deces</i>	25
C. Metode de diagnostic utilizate în studiu	26
<i>Diagnostic fenotipic</i>	26
<i>Testare moleculară</i>	27
<i>Concordanța celor două metode utilizate în studiu</i>	28
CONCLUZII	34
PROPUNERI	36
Bibliografie	38

INTRODUCERE

Rezistența la antibiotice a *M. tuberculosis*, problemă globală de sănătate publică cu implicare majoră în:

Politica globală de sănătate publică

Tuberculoza (TB) este una dintre cele mai vechi boli cunoscute omenirii și continuă să fie principalul “ucigaș” în rândul bolilor infecțioase, rămâne lider în rândul bolilor transmisibile cu mortalitate crescută în lume [5]. Aproximativ o treime din populația lumii este infectată cu tuberculoză, dar numai o mică parte dintre cei infectați vor face boala [1].

Rezistența la medicamente anti-TB a continuat să fie recunoscută ca o problemă clinică sporadică prin anii 1960, 1970 și 1980 dar nu a fost considerată o problemă de către cercetătorii sau oficialii din domeniul sănătății publice. Apariția TB multidrog rezistente (TB MDR) în Statele Unite, la începutul anilor 1990 a reînnoit interesul pentru acest subiect [12].

Intervențiile agresive de sănătate publică, la un cost de zeci de milioane de dolari, au ajutat la stingerea rapidă a acestor focare, dar nu înainte de pierderea multor vieți [19]. În anii următori, tuberculoza rezistentă la medicamente, în special TB MDR, a fost recunoscută ca o provocare majoră pentru sănătatea publică la nivel mondial. Focare importante de TB MDR au fost raportate în diverse regiuni din lume și de asemenea au fost raportate zone cu incidență crescută de tuberculoză și niveluri scăzute de TB MDR, cum ar fi Peru [1].

Ca o consecință, tuberculoza rezistentă la medicamente constituie în prezent un pericol permanent pentru populație, o problemă prioritară și o provocare pentru sistemele de sănătate publică a unui număr însemnat de țări [20].

Un pas important în această luptă îl reprezintă adoptarea strategiei DOTS (Tratamentul direct observat pe termen scurt - *Directly Observed Treatment Short-Course*) care a fost declarată ca una dintre cele mai importante măsuri luate împotriva tuberculozei de către OMS în cadrul conferinței de presă de la Berlin din 1997 [22].

În 2013 au fost estimate peste 9 milioane cazuri de TB, iar 1,5 milioane de oameni au murit din cauza acestei boli, dintre care 360.000 au fost HIV pozitivi. Se înregistrează un declin lent al TB în fiecare an, iar între anul 2000 și 2013 se estimează că au fost salvate peste 37 de milioane de vieți prin diagnostic și tratament eficient [23].

MĂSURI CU REZULTATE FAVORABILE ÎN COMBATEREA TUBERCULOZEI

1) Depistarea tuberculozei și tratamentul ei

Rata de succes terapeutic în rândul cazurilor noi de TB continuă să fie ridicată, dar sunt necesare eforturi majore pentru a se asigura că toate cazurile sunt detectate, notificate și tratate.

2) Detectarea TB MDR și rezultatele tratamentului

Detectarea TB MDR și rezultatele tratamentului s-au îmbunătățit prin utilizarea metodelor noi, rapide de diagnostic, ceea ce dă asigurarea că semnificativ mai mulți pacienți cu TB sunt corect diagnosticați, dar rămân lacune majore de tratament și de finanțare insuficientă.

Cinci acțiuni prioritare – de la prevenire la vindecare – sunt necesare pentru a aborda epidemia TB MDR. Acestea sunt:

- tratamente de înaltă calitate pentru TB sensibilă la medicamente pentru a preveni TB MDR;
- extinderea testării rapide și de detectare a cazurilor de TB MDR;
- acces imediat la îngrijire de calitate;
- controlul infecțiilor;
- creșterea angajamentului politic, inclusiv finanțare adecvată pentru intervenții curente, precum și de cercetare pentru a dezvolta noi metode de diagnostic, medicamente și regimuri terapeutice [25].

3) Diagnosticul de laborator în TB și consolidarea laboratoarelor

Rolul de succes în lansarea de noi metode de diagnostic a fost asigurat prin diagnosticarea rapidă și tratarea corectă a mai multor cazuri de TB. Confirmarea diagnosticului de laborator a TB și a rezistenței la medicamente este esențială pentru a ne asigura că persoanele cu semne și simptome de TB sunt diagnosticate și tratate corect [25].

4) Abordarea problemelor co-epidemiilor TB HIV

S-a continuat înregistrarea de progrese în punerea în aplicare a activităților collaborative TB/HIV, dar sunt necesare eforturi intense, în special pentru a se asigura accesul universal la terapia antiretrovirală (ARV). Prima intervenție cheie pentru reducerea poverii coinfecției TB HIV este testarea HIV pentru pacienții cu TB [25].

5) Instituirea unei strategii globale de combatere

Sfârșitul anului 2015 marchează o tranziție de la ODM la un cadru de dezvoltare post-2015. În acest context mai larg, OMS a dezvoltat o Strategie globală post-2015

Strategia TB la nivel mondial (Strategia pentru eradicarea TB), care a fost aprobată de către toate statele membre în mai 2014 la consiliul Mondial al Sănătății [25].

SITUAȚIA TUBERCULOZEI ÎN ROMÂNIA

Deși în România incidența globală (IG) a TB (cazuri noi și recidive) este de departe cea mai mare din UE și una dintre cele mai mari din Regiunea Europa a OMS, aceasta a scăzut în ultimii 12 ani cu 48,7% de la un maximum de 142,2‰ în anul 2002, la 72,9‰ în anul 2013 (Baza Națională de date TB, actualizată pentru Raportarea TESSy 2014) [23].

În ceea ce privește numărul de cazuri noi și recidive înregistrate anual și acesta a scăzut de la 30.985 în anul 2002, la 15.523 în anul 2013 (Baza Națională de date TB actualizată pentru TESSy 2014). Mortalitatea a scăzut de la 10,8‰ în anul 2002 la 5,3‰ în anul 2013 [23].

Ancheta națională de chimiorezistență desfășurată în România în perioada iulie 2003-iunie 2004 a arătat că TB MDR era de 2,9% la cazurile noi și 10,7% la retratamente [27].

În aceste condiții, numărul de cazuri TB MDR estimate a fi notificate anual este de 1.200, reprezentând o importantă problemă de sănătate publică. În realitate, aproximativ 600–700 de cazuri sunt notificate anual (de aproape 2 ori mai puține decât cele estimate), deoarece peste o treime dintre cazurile TB confirmate nu sunt testate pentru sensibilitate [27].

CAPITOLUL I TUBERCULOZA – O PATOLOGIE APARTE

Scurt istoric

Tuberculoza este una dintre cele mai vechi boli cunoscute, ea însoțind umanitatea din cele mai vechi timpuri. Tuberculoza a apărut la oameni încă din antichitate [30].

DEFINIȚIE

Tuberculoza este cauzată de bacterii aparținând complexului *M. tuberculosis*. Boala afectează de obicei plămânii, însă până la o treime din cazuri sunt implicate și alte organe. Dacă este tratată adecvat, tuberculoza cauzată de tulpini chimiosensibile este curabilă în toate cazurile. Dacă nu este tratată, boala poate fi fatală în decurs de 5 ani la mai mult de jumătate dintre cazuri. Transmiterea are loc de obicei pe cale aerogenă, prin

răspândirea particulelor infectante eliminate de către pacienții cu tuberculoză pulmonară contagioasă [28].

ISTORIA NATURALĂ A BOLII

Istoria naturală a bolii cuprinde:

- Transmiterea tuberculozei
- Transformarea infecției în boală
- Perpetuarea bolii (caracterul endemic)

ETIOLOGIE

Micobacteriile aparțin familiei *Mycobacteriaceae* și ordinului *Actinomycetales*. Dintre speciile patogene aparținând complexului *M. tuberculosis*, agentul cel mai frecvent și important al bolii la om este chiar *M. tuberculosis*.

CARACTERISTICI ȘI PARTICULARITĂȚI STRUCTURALE ALE *M. tuberculosis*

M. tuberculosis este o bacterie nesporulată, slab aerobă, cu formă de bacil subțire cu dimensiuni cuprinse între 0,5 și 3 μm. Micobacteriile, inclusiv *M. tuberculosis*, nu se colorează cu ușurință și sunt frecvent neutre la colorația Gram. Totuși, odată realizată colorația, bacilii nu pot fi decolorați cu acid-alcool, această caracteristică justificând clasificarea lor ca bacili acid-alcool-rezistenți (BAAR). Rezistența colorației la acțiunea acizilor se datorează, în principal, conținutului mare al peretelui microorganismelor în acizi micolici, acizi grași cu lanț lung și legături încrucișate între lanțuri și alte lipide ale peretelui celular [38].

STRUCTURA ANTIGENICĂ

Antigenele micobacteriene sunt utilizate frecvent pentru clasificarea, identificarea și tiparea micobacteriană, iar în ceea ce privește *M. tuberculosis* multe dintre cercetări sunt orientate spre identificarea structurilor antigenice generatoare de memorie imunologică antituberculoasă în vederea obținerii de noi vaccinuri cu eficiență superioară vaccinului BCG utilizat în prezent.

Tuberculinele

Primele extracte micobacteriene folosite experimental au fost *tuberculinele* obținute de R. Koch.

Gene implicate în supraviețuirea intracelulară

Genele care conferă virulența patogenilor se exprimă doar atunci când este necesar. Micobacteriile supraviețuiesc în mediul înconjurător perioade îndelungate de timp [49].

Structura celulară și metabolismul

M. tuberculosis are un perete celular dur, care împiedică trecerea de nutrienți în exterior și împiedică eliminarea lor din celulă, aceasta dându-i caracteristica ratei de creștere lentă. Peretele celular al agentului patogen are structură celulară Gram-pozitiv. Învelișul celular conține un strat de polipeptide, un strat de peptidoglicani și lipide libere. În plus, există și o structură complexă de acizi grași, cum ar fi acizii micolici [51].

Structura genomului

M. tuberculosis are lungimea cromozomilor circulari de aproximativ 4.200.000 nucleotide. Conținutul G + C este de aproximativ 65% [54]. Genomul *M. tuberculosis* a fost studiat folosind tulpina de *M. tuberculosis* H37Rv. Genomul conține aproximativ 4.000 de gene. Genele care au importanță în codificarea metabolismului lipide sunt o parte foarte importantă a genomului bacterian, iar 8% din genom este implicat în această activitate [55].

CAPITOLUL II

DIAGNOSTICUL BACTERIOLOGIC

Diagnosticul bacteriologic este singurul criteriu care stabilește diagnosticul de certitudine al TB. În momentul de față, algoritmul utilizat pentru stabilirea diagnosticului de TB și TB DR prezintă următoarele etape:

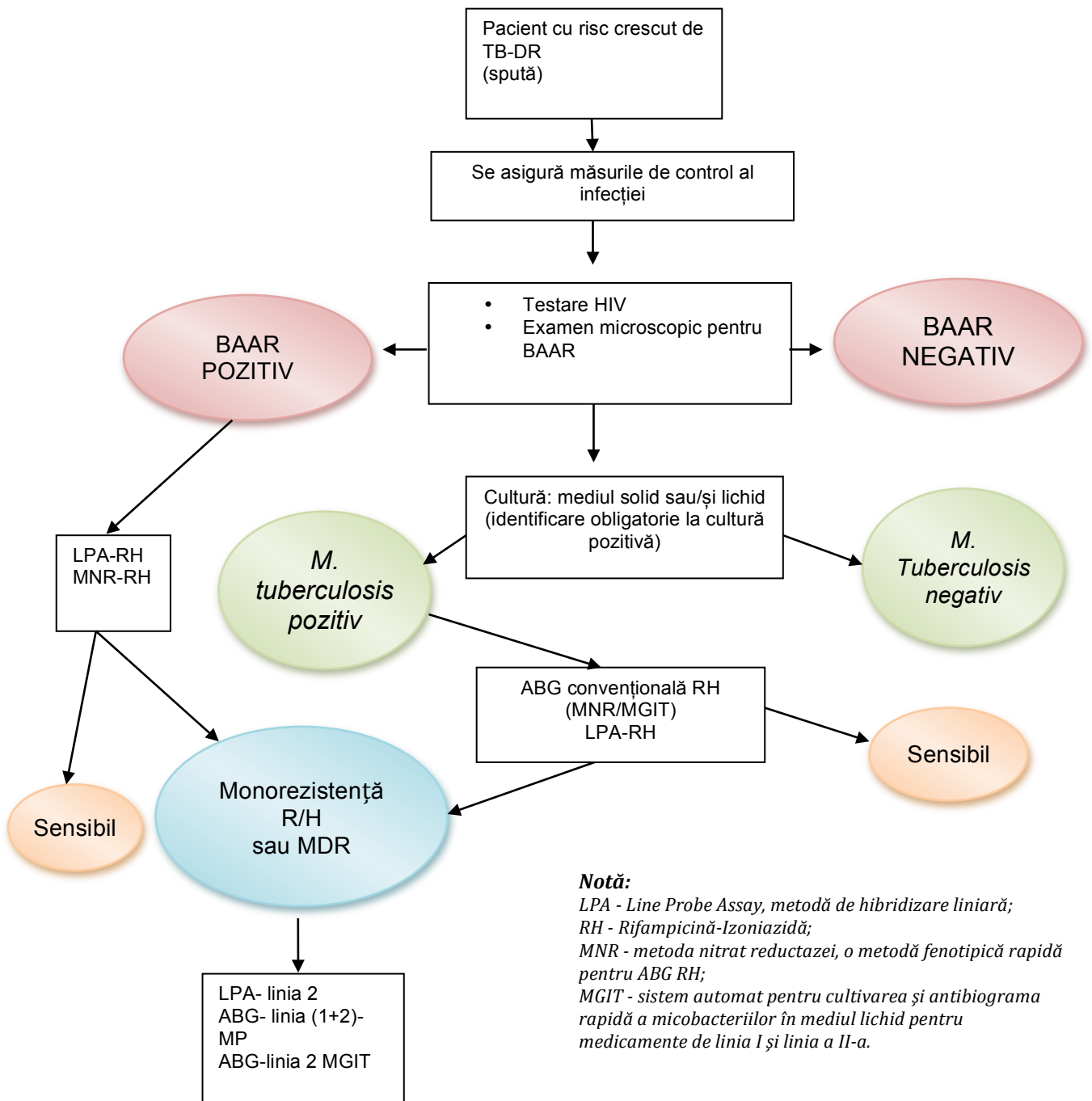


Fig. 12 Algoritm pentru detectarea cazurilor TB DR [3]

EXAMENUL MICROSCOPIC

Examenul microscopic este cea mai utilizată, simplă și rapidă metodă de diagnostic. Se poate utiliza microscopia optică sau microscopia cu fluorescență.

Microscopia nu permite identificarea speciilor de micobacterii și nici nu oferă informații cu privire la viabilitatea. Pacienții cu coinfecție TB HIV care au forme diseminate de boală cu sputele paucibacilare pot fi dificil de confirmat prin examen microscopic [65, 66].

DIAGNOSTICUL PRIN CULTURĂ

Cultura oferă diagnosticul de certitudine al tuberculozei. Avantajul principal al metodei este sensibilitatea mare și permite detectarea unui număr foarte redus de bacili (aproximativ 10 bacili/ml de spută, comparativ cu cel puțin 5000 bacili/ml de spută pentru microscopie). Utilizarea culturii crește potențialul de diagnosticare a TB în stadiile incipiente ale bolii. Cultura poate fi utilizată și pentru tuberculoza extrapulmonară.

Utilizarea culturii crește sensibilitatea diagnosticului în TB cu 30-50%. Mai mult decât atât izolarea tulpinii incriminate este utilă pentru identificarea speciei [70] și a sensibilității la medicamente [68, 69, 70].

Cultivarea *M. tuberculosis* se poate face atât pe medii solide, cât și pe medii lichide. Avantajul mediilor solide este dat de faptul că atât contaminarea, cât și culturile mixte pot fi observate, în schimb mediul lichid oferă avantajul unei creșteri mai rapide [68, 69].

Medii clasice

Medii neselective. Cele mai frecvent utilizate medii neselective sunt:

- pe baza de ou: mediul Löwenstein-Jensen (LJ) și mediul Ogawa;
- pe baza de agar: mediul Middlebrook 7H10 și mediu Middlebrook 7H11;
- mediul lichid: mediul Middlebrook 7H9 bulion.

Medii selective

Există mai multe medii de cultură selective care conțin mixuri de antibiotice și de antifungice în combinații diferite, cu rol de agenți selectivi.

Sisteme automate de cultivare

Mai multe sisteme comerciale de cultivare automatizate au fost dezvoltate pentru detectarea rapidă a micobacteriilor în mediu lichid:

- sistemul BACTEC TB 460 – MGIT 960 BD (Becton, Dickinson and Company Diagnostic Systems);
- sistemul VersaTREK – (Trek Diagnostic Systems Part of Thermo Fisher Scientific)
- sistemul MB/BacT (bioMérieux).

Metoda imunocromatografică de detecție calitativă a complexului

***M. tuberculosis* din cultură cu Ag MPT 64**

Indiferent de metoda de cultivare folosită pentru a confirma rezultatul pozitiv trebuie efectuată identificarea tulpinii izolate.

Identificarea rapidă a tulpinii de *M. tuberculosis* are la bază utilizarea unui test (ICA) imunocromatografic care detectează antigenul (Ag) MPT64, o fracție proteică micobacteriană înalt specifică, care este secretată în timpul cultivării.

TESTAREA MOLECULARĂ

Introducere

Denumirea de teste de biologie moleculară este utilizată pentru a defini în mod convențional testele care detectează acizii nucleici (ADN/ARN) specifici genomului agentului patogen.

Există mai multe tipuri de teste disponibile comercial, dintre care cele mai utilizate sunt: Line Probe Assays (LPA); INNO-LiPA Rif.TB (Innogenetics, Zwijndrecht, Belgia), Genotype MTBDR/MTBDR*plus* și Genotype MTBDR*sl* (Hain Lifescience, GmbH, Germania) [122]. Acestea se bazează pe amplificarea țintită printr-o reacție de polimerizare în lanț [PCR] a unor fragmente din genomul de *M. tuberculosis*, urmată de hibridizarea produșilor de amplificare (ampliconi) cu sonde oligonucleotidice imobilizate pe o membrană de nitroceluloză [123]. Testele pot detecta atât rezistența la rifampicină; rifampicină și isoniazidă; sau etambutol, fluoroquinolone și antibiotice injectabile. Testele sunt concepute pentru a fi utilizate atât pentru produse patologice, cât și pentru tulpini izolate din acestea [125].

Sistemul Cepheid Gene Xpert MTB/RIF (Cepheid Xpert Inc., Sunnyvale, CA, USA) este complet automatizat, care are la bază o reacție de polimerizarea în lanț în timp real (RT)-PCR pentru a detecta ADN-ul de *M. tuberculosis* și mutațiile asociate cu rezistența la rifampicină din probele clinice [126].

Teste de hibridizare liniară (Line Probe Assay)

Metoda utilizează tehnologia revers hibridizării cu diferite sonde ADN specifice imobilizate pe stripuri:

- Extracția ADN din specimen (pulmonar) decontaminat sau cultură bacteriană (din mediul solid sau lichid);
- Amplificarea multiplex cu primeri biotinilați;
- Revers-hibridizarea cu sonde specifice oligonucleotidice. Stripurile sunt marcate cu sonde specifice complementare secvenței țintă ADN.

TESTAREA SENSIBILITĂȚII LA TUBERCULOSTATICE DE LINIA I-A ȘI A II-A A TULPINILOR *M. tuberculosis*

Obiectivele majore pentru testarea sensibilității la medicamente (ABG) în tuberculoză includ:

- (a) asigurarea unui tratament ținut și eficient pentru tuberculoză,
 - (b) monitorizarea rezistenței la medicamente la nivelul unui spital, oraș, regiune sau țară;
 - (c) identificarea necesității izolării și instituționalizării pacienților;
 - (d) determinarea domeniului de aplicare al investigațiilor în focarele instituționale și comunitare necesare [142].
- Datorită apariției tuberculozei drog rezistente peste tot în lume, testarea la medicamente antituberculoase de linia I este necesară pentru a defini un caz de tuberculoză (pacient cu o cultură pozitivă din complexul *M. tuberculosis* sau pacient cu frotiu pozitiv BAAR la examenul de spută în cazul în care cultura nu este disponibilă). Procentul de cazuri cu rezistență la medicamente anti-TB este mai mare în cazul de retratament (rezistența dobândită sau rezistență secundară) decât în cazuri noi de boală (rezistență primară), diferența variind în funcție de țară sau de situația epidemiologică [124, 143].

Dintre metodele convenționale fenotipice, sunt standardizate și recomandate pentru aplicare de rutină, metoda: metoda proporțiilor, metoda raportului de rezistență, și metoda concentrațiilor absolute, pentru acestea utilizându-se mediu solid, dar și anti-biograma în mediu lichid în sisteme automate, metodă care în momentul acesta reprezintă “standardul de aur” [152, 153, 154].

Pentru a efectua antibiograma indirectă, inoculul bacterian se prepară din cultura de *M. tuberculosis* după verificarea purității ei. Are avantajul dimensionării corecte a

inoculului bacterian, iar rata de contaminare este nulă, dacă se respectă tehnica de lucru corectă [124, 142].

Metodele cele mai des utilizate sunt metoda modificată a proporțiilor pe mediu solid Löwenstein-Jensen (LJ) [149, 150] și metoda modificată a proporțiilor în mediu lichid Middlebrook [146].

Metode utilizate pentru testarea sensibilității la antituberculoase

Metoda proporțiilor (Canetti, Franța) a fost una dintre primele metode descrise pentru testarea sensibilității complexului *M. tuberculosis*. Aceasta a fost descrisă pentru prima dată folosind mediul solid pe baza de ou Löwenstein-Jensen (LJ) și este considerată „standardul de referință” pentru evaluarea altor metode.

Metoda concentrațiilor absolute (Meissner, Germania). Este cea mai utilizată tehnică în țara noastră. Ia în considerare cea mai mică concentrație de substanță antituberculoasă care inhibă creșterea sau permite o creștere a mai puțin de 20 de colonii (aproximativ 1%) din inoculul standardizat. Metoda utilizează mediul solid Lowenstein-Jensen în care este inclus drogul antituberculos. După perioada de incubare rezistența este indicată dacă mai mult de 20 de colonii cresc pe tubul test [61, 115, 144, 147].

CAPITOLUL III

CERCETĂRI PROPRII

Valoarea diagnostică a determinării mutațiilor de rezistență

Scurtă introducere

Creșterea endemiei TB, și în special a celei M/XDR la nivel mondial, este o problemă de sănătate publică ceea ce impune depistarea precoce a rezistențelor pentru abordarea rapidă din punct de vedere clinic a pacientului cu tratament țintit pentru a limita răspândirea și a crește rata de succes terapeutic.

Metodele genetice (de biologie moleculară), care permit investigarea direct în produsul biologic pentru aflarea prezenței *M. tuberculosis* și a modificărilor asociate rezistenței la substanțe antituberculoase au devenit imperios necesare pentru decizia terapeutică și aplicarea măsurilor antiepidemice imediate.

Diagnosticul rapid și evoluția profilului de rezistență la antibioticele antituberculoase sunt cerințe actuale esențiale care condiționează eficiența tratamentului specific și implicit consecințele benefice ale aplicării lor precoce.

Obiectivul studiului

În acest studiu mi-am propus determinarea caracteristicilor genetice de rezistență ale tulpinilor de *M. tuberculosis* și corespondența cu expresia fenotipică.

Istoricul de boală al majorității pacienților arată că tulpinile izolate la prima îmbolnăvire au fost sensibile, ulterior, după episoade repetate de abandon, eșec terapeutic, recidivă, tulpinile au căpătat rezistențe multiple care s-au adăugat în timp și au determinat modificarea profilului de rezistență.

În acest sens am încercat să gășesc o legătură cauzală între anul de declarare a pacientului, respectiv anul îmbolnăvirii lui și evoluția rezistențelor în profilul tulpinii izolate de la el.

MATERIALE ȘI METODE

Metodologia studiului

Studiul de față a fost efectuat în Institutul Național de Pneumoftiziologie “Profesor Dr. Marius Nasta” (IPMN), materialul biologic (produse patologice, tulpini de *M. tuberculosis*) fiind reprezentat de produsele prelucrate în cadrul laboratorului de Bacteriologie al Institutului, acesta fiind unul dintre cele două Laboratoare Naționale de Referință.

Pentru abordarea acestui obiectiv am efectuat determinarea rezistenței direct din produs prin LPA folosind kitul MTBDR*plus* și apoi, după izolarea tulpinii, am efectuat ABG serie scurtă prin metoda concentrațiilor absolute. După confirmarea rezistențelor față de Rifampicină și Isoniazidă s-a efectuat ABG serie lungă prin metoda proporțiilor. Din tulpina izolată s-a făcut și extracție de ADN pentru testare moleculară pe trusa MTBDR*s*/ vers 1.0 pentru a depista mutațiile la quinolone, aminoglicozide și peptide ciclice, precum și la etambutol.

În figura 30 am prezentat schematic algoritmul de diagnostic utilizat în acest studiu în care este evidențiată etapa de diagnostic la care face referire cercetarea.

ALGORITMUL DE DIAGNOSTIC UTILIZAT ÎN CERCETARE (STUDIU)

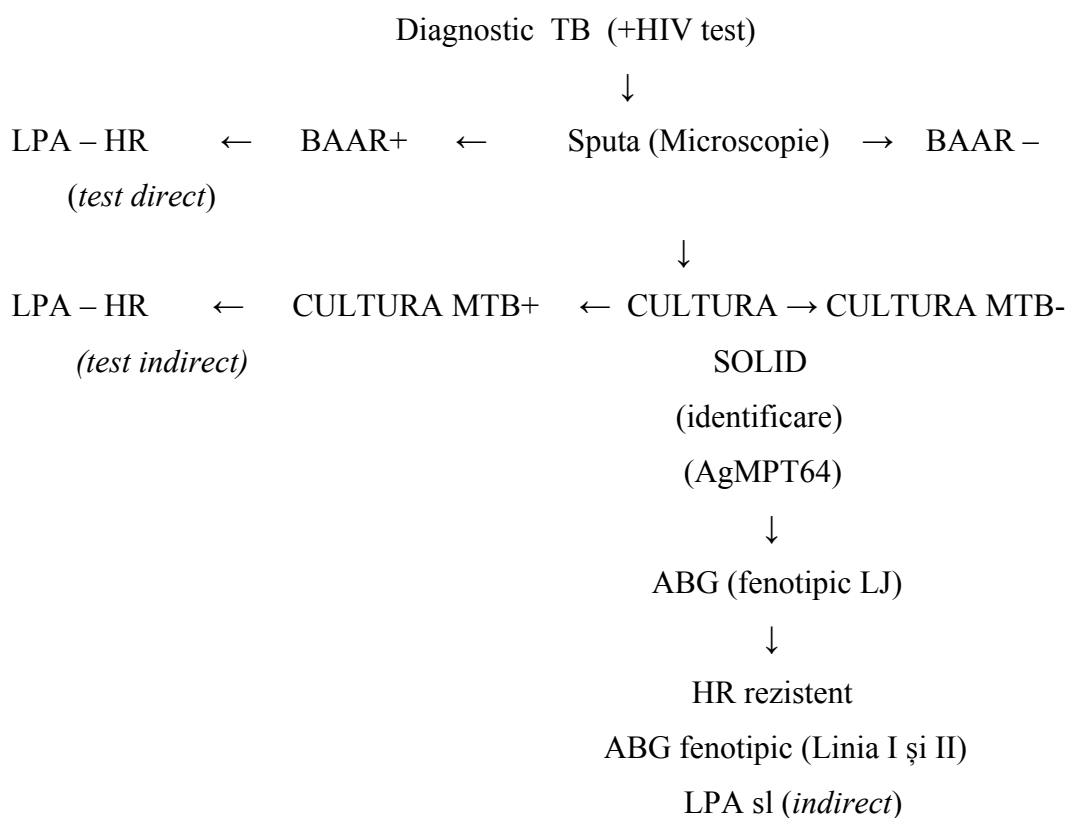


Fig. 30 Algoritm de investigare practicat în studiu

Studiul propriu-zis l-am efectuat pe un eșantion de 153 de tulpini de *M. Tuberculosis* selectate în laborator. O parte dintre tulpini au fost izolate în laboratorul nostru, altele au fost trimise de către alte laboratoare pentru a fi testate față de substanțe antituberculoase de linia a II-a în cadrul LNR. Datele privind istoricul bolii pacienților de la care au provenit tulpinile studiate au fost obținute din Baza Națională de Date, identificându-se momentul declarării cazului, eventualele recidive și tratamente efectuate cu antituberculoase.

La toate produsele prelucrate s-au efectuat culturi pe mediu Löwenstein-Jensen, prin însămânțarea fiecărui produs pe 3 tuburi de mediu după cum este precizat în protocolul național de diagnostic la nivelul rețelei de laboratoare din țară [61].

TESTAREA SENSIBILITĂȚII LA SUBSTANȚELE ANTITUBERCULOASE

Studiul a fost retrospectiv și am selectat un număr de 153 de tulpini, izolate de la pacienți MDR.

Am respectat algoritmul de diagnostic și la o parte dintre pacienții cu microscopie pozitivă BAAR am efectuat diagnostic molecular direct prin LPA, apoi am continuat etapele de diagnostic: cultivare cu izolarea și identificarea tulpinii, urmată de testare fenotipică SS pentru confirmarea rezistenței, iar pentru tulpinile MDR s-a continuat testarea cu antibiograma extinsă, precum și testare moleculară pentru SL pentru a evidenția mutațiile existente.

La pacienții care nu au avut testare moleculară pentru SS direct din produs pozitiv BAAR în microscopie, am efectuat extracție de ADN și testare indirectă din cultură, aceasta încadrându-se în algoritmul de diagnostic.

În studiu am urmărit concordanța rezultatelor dintre metodele diagnostice utilizate, precum și găsirea unei legături cauzale între anul de declarare a pacientului (CN MDR), respectiv anul îmbolnăvirii lui, și evoluția profilului de rezistență a tulpinii izolate.

Diagnosticul bacteriologic al tuberculozei este cel care confirmă tuberculoza.

TESTAREA CHIMIOSENSIBILITĂȚII TULPINILOR DE *M. tuberculosis* LA SUBSTANȚE ANTITUBERCULOASE

Principiu

Ca principiu, antibiograma utilizează compararea creșterii de pe tuburile test în care se găsește substanța de cercetat cu tuburile martor după ce acestea au fost însămânțate cu un eșantion reprezentativ din populația bacilară.

Am folosit testarea indirectă pentru tulpina obținută din produsul patologic și pentru că are avantajul utilizării unui inocul bacterian precis dimensionat, standardizat, iar rata de contaminare este scăzută. Singurul dezavantaj al acestei metode este prelungirea timpului de obținere a rezultatului (timpul necesar obținerii culturii).

Antibiogramă - Metoda concentrațiilor absolute

Principiu

Compararea creșterii inoculului standardizat din tulpina de testat de pe tuburile martor față de cele test care conțin în mediu substanțe antituberculoase în concentrație bine stabilită care să fie aproximativ egală cu concentrația substanței respective în sângele pacienților. Este metoda de elecție care se utilizează în toate laboratoarele din țara noastră pentru antibiograma fenotipică de linia I. Este o metodă relativ simplă,

standardizată cu reproductibilitate, sensibilitate și specificitate foarte bună, comparabilă cu alte metode de diagnostic al chimiosensibilității [61].

Antibiogramă - Metoda proporțiilor

Principiu

Metoda proporțiilor calculează proporția de bacili rezistenți prezenți într-o tulpină, din totalul populației însămânțate la o concentrație de substanță antituberculoasă cunoscută. Sub o anumită proporție, tulpina este clasificată ca fiind sensibilă; peste această proporție este clasificată a fi rezistentă. Această metodă este bine standardizată pentru prima linie de medicamente antituberculoase și unele medicamente din linia a II-a [115].

CONFIRMAREA DIAGNOSTICULUI DE TUBERCULOZĂ ȘI DEPISTAREA MUTAȚIILOR DE REZISTENȚĂ PRIN METODE MOLECULARE

METODA LPA

Cea de-a doua metodă de diagnostic utilizată în studiu este diagnosticul molecular, metoda LPA (Hain Lifescience).

Prima etapă a diagnosticului molecular a fost diagnosticul de TB și/sau depistarea rezistenței la RIF și HIN, utilizând truse GenoType MTBDR_{plus} (Hain Lifescience) [134].

Principiul metodei

Metoda LPA se bazează pe tehnologia ADN-strip și permite identificarea moleculară a complexului *Mycobacterium tuberculosis* care include: (*M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis* și *M. bovis* BCG) și este asociat cu sensibilitate la rifampicină (RIF) și izoniazidă (HIN). Prin această metodă se pot testa pacienții cu spută pozitivă, culturi izolate din diferite produse și din specimene decontaminate. Pe durata studiului am folosit kiturile MTBDR_{plus}, versiunea 1.0 și 2.0 și MTBDR_{sl}, versiunea 1.

GenoType MTBDR_{plus} și MTBDR_{sl}

Procedura de lucru s-a bazat pe trei mari etape:

1. Extracția ADN-ului direct din specimenul pulmonar după decontaminare (din sedimentul centrifugat) sau din cultura bacteriană (solidă sau lichidă). Reactivii necesari sunt incluși în trusa pentru extracție GenoLyse;
2. Amplificare multiplex cu primeri biotinilați;
3. Revers-hibridizarea cu sonde specifice oligonucleotidice.

Evaluarea și interpretarea rezultatelor

Cu ajutorul șablonului de interpretare, specific fiecărei truse, am urmărit prezența sau absența benzilor sălbatice și am notat pe grilă cu + sau - . Ulterior, am interpretat testul ca fiind o tulpină sensibilă sau o tulpină cu monorezistență la HIN sau RIF, sau o tulpină MDR, la care se asociază sau nu și alte rezistențe (AG/PC, FLQ, EMB), depistate cu trusa Genotype MTBDR*sl*.

Ambele metode de diagnostic molecular pe care le-am utilizat în studiu au același principiu pentru interpretarea și evaluarea rezultatelor, specifice substanțelor antituberculoase testate de trusa utilizată.

Pentru a putea fi validat un test trebuie să prezinte obligatoriu locusul de conjugat control (CC), urmat de prezența locusului de amplificare (AC). În cazul tulpinilor pozitive, acesta este un semnal foarte slab vizibil datorită competiției existente între ampliconi.

De asemenea pentru a fi validat testul prezența locusurilor corespunzătoare genelor *rpoB*, *katG* și *inhA* este obligatorie pentru trusa Genotype MTBDR*plus*, respectiv prezența locusurilor genelor *gyrA*, *rrs*, *embB* pentru trusa Genotype MTBDR*sl*.

Dacă pe un strip apar doar benzile CC și AC asta înseamnă că rezultatul este negativ, de altfel așa apare controlul negativ pe care îl punem pentru a putea valida testarea.

Următoarea bandă care apare pe strip este cea corespunzătoare complexului *M. tuberculosis*, bandă denumită TUB a cărei prezență este obligatorie pentru a valida un rezultat pozitiv. Această bandă se pozitivează cu toți ampliconii generați de toate tulpinile componente ale complexului *M. tuberculosis*.

Pentru fiecare genă corespunzătoare unui anumit antibiotic există una sau mai multe benzi sălbatice plus/minus benzile de mutație cele mai frecvente, care dau rezistență la antibioticul respectiv.

Dacă pentru o anumită genă toate sondele sălbatice sunt prezente și lipsesc cele de mutație înseamnă că tulpina respectivă este sensibilă la antibioticul cercetat.

Fiecare modificare de la profilul tulpinii sălbatică indică o rezistență a tulpinii testate.

Benzile corespunzătoare genei *rpoB* dau informații privitoare la comportamentul tulpinii la rifampicină, similar se obțin informații la izoniazidă, astfel mutațiile din gena *katG* fiind legată de rezistența înaltă la izoniazidă pe când cele din gena *inhA* dau informații referitoare la rezistența joasă la izoniazidă.

Pentru Genotype MTBDR_{sl} gena *gyrA* dă informații privind rezistența la chinolone (moxifloxacină, ofloxacină), gena *rrs* aminoglicozide/peptide ciclice (kanamicină, amikacină/capreomicină, viomicină) și gena *embB* la etambutol.

Fiecare etapă de testare poate fi validată doar dacă martorii, cel negativ și cel pozitiv, sunt corespunzători, adică la martorul negativ sunt prezente doar benzile specifice CC și AC. Martorul pozitiv trebuie să arate ca o tulpină sălbatică cu sensibilitate.

Testarea moleculară este o testare de confirmare a diagnosticului și nu de excludere și trebuie urmată întotdeauna de testarea fenotipică, dar nu trebuie ignorată importanța informațiilor furnizate, mai ales în cazul rezistenței.

Conduita clinică poate fi adoptată imediat în funcție de rezultatele obținute urmând a se definitiva în momentul confirmării sau, eventual, infirmării rezultatelor prin testare fenotipică.

ANALIZA STATISTICĂ A DATELOR

Variabilele studiate în cercetare sunt categoriale și dihotomice (deoarece pot lua doar două forme sunt bimodale) deoarece rezultatele testărilor nu sunt reprezentate cantitativ, iar rezultatul este eliberat doar sub forma sensibil sau rezistent, iar în cazul detecției moleculare se raportează ca mutație detectată sau nedetectată.

Pentru analiza statistică am folosit compararea rezultatelor prin calcularea procentului de concordanță între rezultate, precum și a coeficientului de concordanță Cohen între cele două metode diagnostice utilizate pentru lotul studiat (testarea fenotipică/testarea moleculară). Am considerat ca referință antibiograma pe mediu solid Löwenstein-Jensen, metoda proporțiilor versus determinarea moleculară a mutațiilor care determină rezistența.

Sensibilitatea metodei, reprezentată de posibilitatea acesteia de a detecta rezistența reală, este capacitatea de a detecta tulpinile real rezistente din totalul tulpinilor presupuse a fi rezistente.

Nu am calculat specificitatea reprezentată prin capacitatea metodei de a depista sensibilitatea reală a unei metode comparativ cu metoda aleasă de referință deoarece tulpinile testate sunt cunoscute cu rezistență MDR.

Rezultate

Am selectat un număr de 153 de tulpini de la pacienți cu tuberculoză MDR pentru care medicii curanți au solicitat efectuare de antibiogramă, iar rezultatele au fost comunicate pentru a putea fi folosite în beneficiul pacienților.

Datele obținute au fost introduse într-un fișier Excel cu ajutorul căruia s-a efectuat analiza rezultatelor obținute.

Trebuie menționat că, în studiu, termenul de tulpină MDR sau de evoluție a pacienților MDR este considerat a fi corespondent și pentru tulpinile cu polichimio-rezistență sau rezistență XDR.

ASIGURAREA CALITĂȚII REZULTATELOR

Laboratorul de bacteriologie în care s-au efectuat testările (IPMN) are acreditare RENAR pentru activitatea de BK și acreditarea Laboratorului Supranațional de Referință pentru Tuberculoză de la Stockholm, atât pentru testarea fenotipică – antibiogramă serie extinsă prin metoda proporțiilor, cât și pentru testare moleculară prin metoda LPA Hain.

Rolul CEC este extrem de important în raportarea rezultatelor deoarece atestă că rezultatele sunt de încredere și, de asemenea, certifică testarea făcută în laboratorul respectiv în care există evidențe pentru menținerea calității rezultatelor [166].

CAPITOLUL IV

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Din analiza datelor și rezultatelor obținute prin cercetările proprii reiese importanța unor factori implicați atât în apariția unor cazuri noi, dar mai ales în evoluția fenomenului de rezistență la tulpinile sensibile ori indusă pe parcursul tratamentului și evoluția bolii.

Deși nu reflectă real incidența tuberculozei datele demografice înregistrate pentru tulpinile luate în studiu pot fi corelate cu anume particularități ale prezenței și evoluției MDR la tulpinile de *M. tuberculosis*.

Între acești factori am considerat ca fiind importanți:

A. ANALIZA UNOR DATE DEMOGRAFICE

1. Vârsta și sexul

Pacienții a căror tulpini au fost luate în studiu au media de vârstă de aproximativ 44 de ani, fiind perioada activă cea mai intensă și, în consecință, cea mai expusă riscului contaminant în colectivitățile ocazionale și profesionale. Și în literatură se confirmă că vârsta care se încadrează în perioada activă profesional este cea mai expusă [167]. Totodată purtătorii excretori neidentificați reprezintă sursa epidemiologică cea mai activă, inclusiv pentru tulpinile TB MDR.

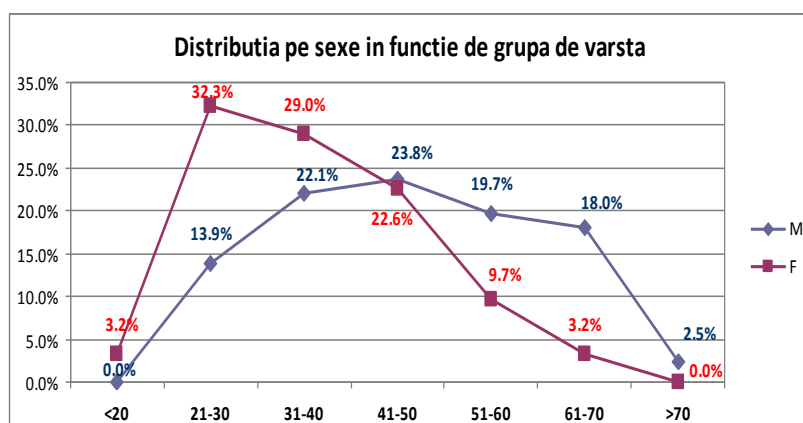


Fig. 39 Distribuția pe sexe în funcție de grupa de vârstă

Din punct de vedere al sexului, cel mai afectat a fost sexul masculin cuprins între 21-30 de ani, 17 cazuri la bărbați, 10 la femei. Procentul de femei afectate în acest interval de vârstă este mai mare, respectiv 32,3%, reprezentând vârful cohorței, cu scădere treptată ajungând la 0 (zero) în intervalul de vârstă 60-70 de ani.

La bărbați, intervalul de vârstă a crescut progresiv atingând un maxim între 41-50 de ani.

Este important de remarcat că în acest interval, 41-50 de ani, cele două grupuri se suprapun, perioadă după care ambele curbe de distribuție încep să scadă treptat spre intervalul 61-70 de ani.

2. Mediul de proveniență

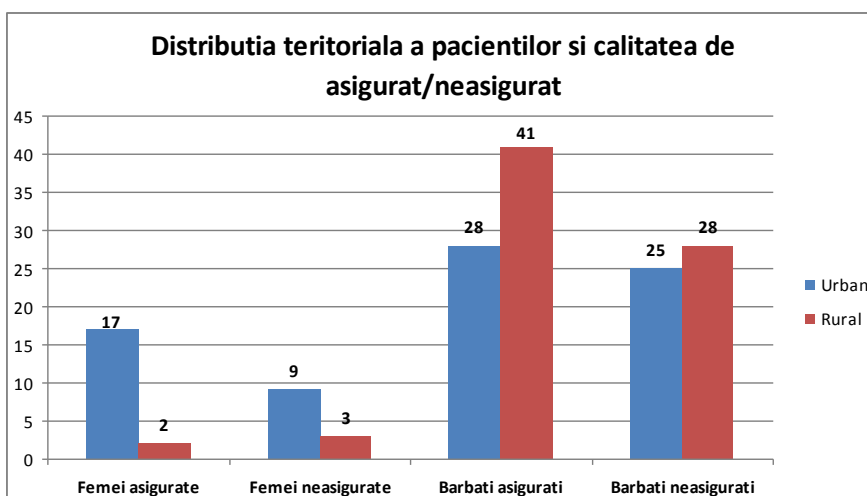


Fig. 40 Distribuția pe medii de rezidență și situația asigurării de sănătate a pacienților

Analizând distribuția pe medii de rezidență a pacienților este de remarcat că cei din mediul urban predomină. Cu toate că diferența procentuală între cele două loturi este foarte mică, este însă semnificativă din punct de vedere statistic $p < 0,05$. Aglomerația mai mare (risc de expunere crescut), precum și condițiile particulare ale mediului urban creează condiții epidemice de contagiune mult mai favorizante decât în mediul rural.

3. Calitatea de asigurat/neasigurat

Importantă este și calitatea de asigurat a pacienților din lotul studiat, știut fiind că tuberculoza este o boală care afectează în special, dar nu numai, populația vulnerabilă aflată la risc de a dezvolta boala activă, una dintre cauze fiind tocmai situația socio-economică precară, fapt menționat adesea în literatura de specialitate [168] și confirmat de cercetarea proprie.

Luând în discuție diferența dintre totalul de femei asigurate, respectiv neasigurate, și totalul bărbaților asigurați/neasigurați, rezultatul nu este semnificativ statistic deoarece raportând la totalul de femei luate în studiu și totalul de bărbați, diferențele procentuale nu sunt majore.

4. Testarea HIV

Datorită riscului major pe care îl reprezintă coinfecția TB HIV, a fost reglementată obligativitatea testării HIV a tuturor pacienților cu TB, printr-un Ordin de

Ministru, prima dată în 1993 apoi modificat în 1999, cât și invers, testarea pentru tuberculoză a tuturor pacienților infectați cu HIV.

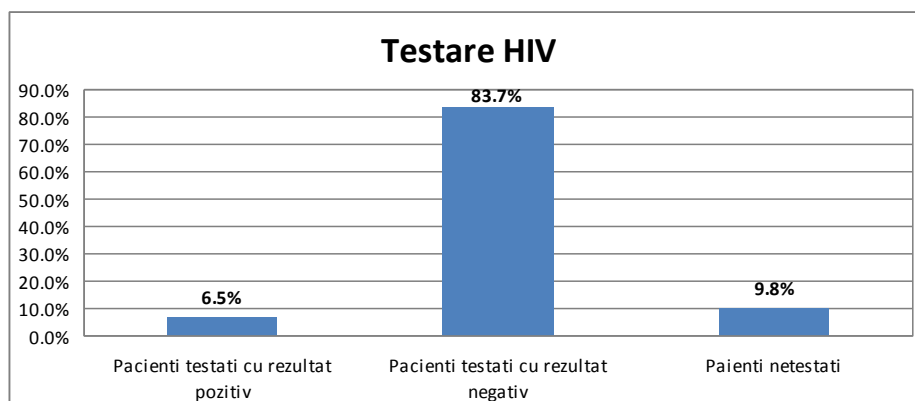


Fig. 41 Testare HIV la pacienții din lotul studiat

Am analizat statusul HIV la pacienții aflați în cohortă și din totalul de 153 doar 15 pacienți nu au fost testați.

Din totalul pacienților doar 10 (6,5%) prezintă coinfecție TB HIV, iar dacă este să analizăm separat pe sexe, procentul femeilor HIV pozitive raportat la totalul de femei luate în studiu este de 12,9%, comparativ cu 4,9% procentul bărbaților HIV pozitiv.

B. EVOLUȚIA (ÎN TIMP) A FENOMENULUI MDR

1. Evoluția în timp de la momentul declarării CN de tuberculoză sensibilă/ CN-MDR

Utilizând informațiile din “Baza de date Națională a Programului de TB” am notat momentul în care pacienții luați în studiu au fost declarați Caz Nou, ulterior momentul în care au fost declarați caz MDR. Cincizeci de pacienți au fost declarați Caz Nou de TB MDR, neavând istoric de boală în Baza Națională de Date. La restul de pacienți rezistența a fost dobândită prin evoluția îndelungată și trecerea prin episoade succesive de boală, abandon, recidivă, eșec.

Dintre aceștia 34 au fost bărbați și 16 femei. Nu știm dacă acești pacienți au fost real cazuri noi de îmbolnăvire cu o tulpină MDR sau, din diverse motive, a fost omisă declararea la momentul real al îmbolnăvirii și introducerea lor în BN-TB. Deoarece nu s-au găsit înregistrări anterioare ale lor au fost incluși în baza de date drept CN-TB-MDR în momentul inițierii tratamentului specific MDR, ca prim episod de boală.

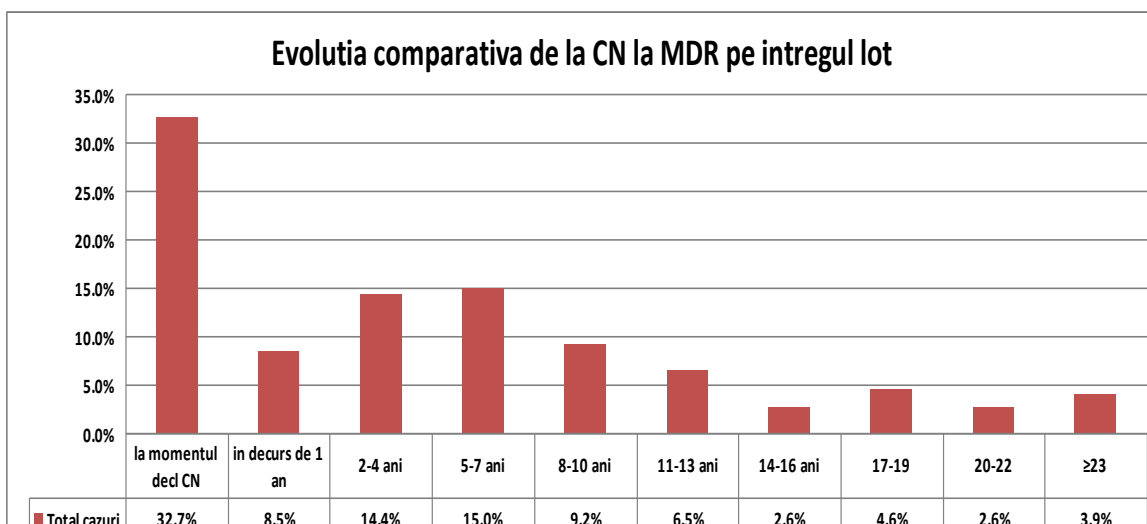


Fig. 44 Evoluția comparativă de la CN la MDR pe întreg lotul

Un procent de 8,5% (10) din pacienți au avut o evoluție de un an de la declararea CN sensibil urmat de un episod de abandon sau eșec în decurs de 1 an, până la declararea lor ca TB MDR.

Un număr de 22 (14,4%) de pacienți au evoluție între 2 și 4 ani, apoi între 5-7 ani 23 (15%) pacienți, între 8 și 10 ani 14 pacienți (9,2%), între 11-13 ani 10 (6,5%) pacienți, între 14 și 16 ani 4 (2,6%) pacienți.

Evoluția bolii se prelungește între 17-19 ani la 7 (4,6%) pacienți, între 20-22 de ani pentru 4 (2,6%) pacienți și la peste 23 de ani la un număr de 6 (3,9%) pacienți. De altfel, în literatură, sunt menționate evoluții lungi de peste 12 ani la pacienții necomplianți [170].

Desigur, acești pacienți au în baza de date consemnate numeroase episoade de abandon, eșec, cronic, este de discutat dacă la cei care au evoluție așa de îndelungată nu există chiar posibilitatea unei noi îmbolnăviri cu o tulpină MDR.

Toți pacienții care au evoluție în ani și-au achiziționat în timp rezistențele plecând de la tulpini sensibile și trecând prin diferite episoade de boală.

Dacă este să analizăm comparativ evoluția de la CN la MDR pe lotul de femei și de bărbați observăm că evoluția în timp la femei este de maxim 10 ani, pe când la bărbați evoluția are o întindere de 20 de ani.

2. Evoluția de la momentul declarării CN până la deces

Utilizând înregistrările din BN-TB am analizat și evoluția pacienților incluși în studiu de când au fost declarați CN până la momentul decesului.

La cele 31 de decese s-a analizat evoluția în timp a bolii de la momentul în care au fost declarate caz nou până la final. Cel mai mare număr a deceselor s-au înregistrat după o perioadă de evoluție cuprinsă între 1-15 ani. S-au înregistrat decese în decurs de 1 an de la declarare la 4 pacienți și tot 4 pacienți au avut evoluție pe o perioadă cuprinsă între 16-25 de ani. În studii efectuate pe cohorte de pacienți TB MDR s-a înregistrat o rată de succes a tratamentului foarte scăzută și o mortalitate scăzută, deși acești pacienți au urmat recomandările de tratament ale OMS [171].

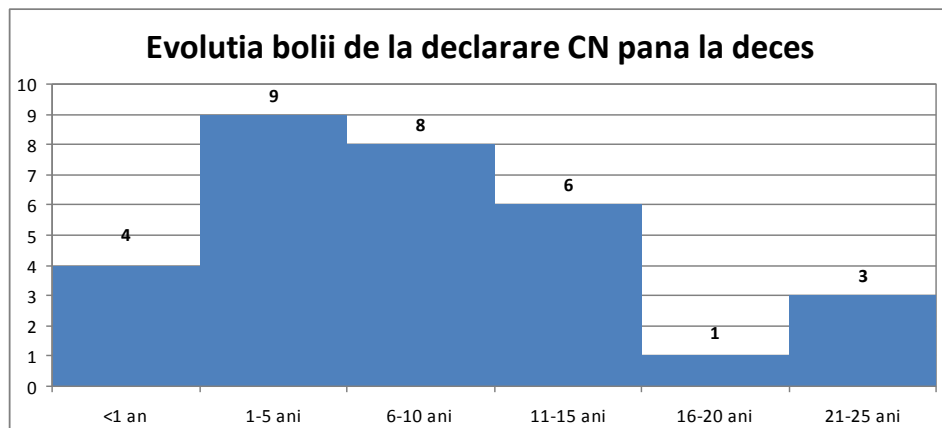


Fig. 46. Evoluția bolii de la declarare CN până la deces

3. Evoluția de la momentul declarării caz MDR până la deces

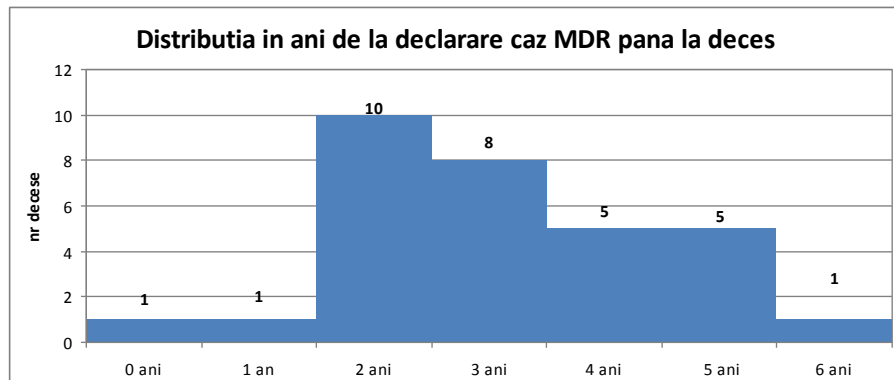


Figura 47. Evoluția bolii de la declarare MDR până la deces

Dacă analizăm aceleași date pentru numărul de decese înregistrate de la momentul în care au fost declarate caz MDR până la momentul decesului, constatăm un vârf al deceselor (un număr de 10) după 2 ani de evoluție de la momentul declarării, urmată de un număr de 8 cazuri după 3 ani de evoluție. De menționat este faptul că evoluția în timp din momentul declarării cazului MDR (caz nou MDR) până la deces nu mai are o așa întindere, aproximativ 15 ani, comparativ cu evoluția de aproximativ 5 ani până la deces la cazurile diagnosticate și declarate MDR [171].

C. METODE DE DIAGNOSTIC UTILIZATE ÎN STUDIU

1. Diagnostic fenotipic

Pentru a fi confirmată rezistența tulpinilor selectate de la pacienții incluși în studiu am efectuat antibiogramă fenotipică prin metoda concentrațiilor absolute, iar tulpinile cu rezistență au fost retestate pentru confirmare, prin antibiogramă serie extinsă prin metoda proporțiilor pe mediul Lowenstein Jensen.

Toate tulpinile selectate au prezentat cel puțin rezistență MDR plus/minus alte rezistențe în proporții variabile.

La testarea fenotipică toate tulpinile din lotul studiat au prezentat rezistență pe HIN și RIF la care s-au adăugat și tulpini cu alte rezistențe în proporție de 68,6% Etambutol și 39,9 % Kanamicină (tabelul XIV).

Tabel XIV Rezistențe la testarea fenotipică pe mediu solid, metoda proporțiilor

	Testare fenotipică – L1+L2				
	Sensibil		Rezistent		Total
HIN	0	0%	153	100%	153
RIF	0	0%	153	100%	153
EMB	48	31.4%	105	68.6%	153
CAP	109	71.2%	44	28.8%	153
AMK	105	68.6%	48	31.4%	153
OFL	94	61.4%	59	38.6%	153
K	92	60.1%	61	39.9%	153

Similar cu testarea la antibiotice de linia I-a s-a urmărit concordanța între testarea fenotipică la antibiotice de linia a II-a și testarea moleculară care pe banda test în afară de aminoglicozide, peptide ciclice și chinolone, are și testare pentru etambutol.

Astfel, concordanța pentru Amikacina a fost situată la 92,2%, iar coeficientul Cohen este de 0,818 ceea ce arată că rezultatele obținute prin cele două metode sunt foarte bune, superpozabile peste 92%.

Pentru Kanamicină concordanța rezultatelor este de 88,9% cu coeficient Cohen de 0,760, ceea ce arată o concordanță bună a rezultatelor deoarece coeficientul este cuprins în intervalul 0,61-0,80, dar mult mai aproape de limita superioară a intervalului ceea ce reprezintă rezultat confident.

Situația nu este la fel de mulțumitoare pentru Capreomicină unde concordanța dintre testarea fenotipică și cea moleculară arată o concordanță de 85,6%, coeficientul Cohen fiind de 0,658 ceea ce arată o legătură bună, dar valoarea este foarte aproape de limita inferioară a intervalului.

Aceeași situație am constatat-o și la Fluoroquinolone unde concordanța celor două metode de testare a fost de 84,3%, dar coeficientul Cohen de 0,663 semnifică o legătură bună dar apropiată ca valoare de limita inferioară a intervalului de încredere.

Situația este cu totul alta pentru Etambutol unde concordanța rezultatelor obținute prin cele două metode de testare este de 69,3%, iar coeficientul Cohen este de 0,369 ceea ce arată doar o legătură satisfăcătoare (0,21-0,40). De altfel se confirmă mențiunile din literatura de specialitate, care arată rezultate cu sensibilitate scăzută pentru testarea moleculară pentru Etambutol pe gena *embB* [175, 176].

Este de menționat faptul că tulpinile au fost alese aleator și era de așteptat ca profilul de rezistență să nu fie așa de extins, dar se constată că un procent de 22,3% din tulpinile studiate prezintă rezistență XDR sau pre-XDR, ceea ce confirmă faptul că evoluția îndelungată a bolii, trecând prin episodul de tuberculoză sensibilă, apoi tuberculoză MDR, tuberculoză pre-XDR și tuberculoză XDR adaugă în timp rezistențe noi ceea ce agravează boala și o face mult mai greu de tratat. Desigur, la adăugarea acestor rezistențe contribuie și episoadele repetate de abandon, începerea unui tratament fără a fi finalizat, astfel încât populația bacilară este stimulată să se adapteze la condițiile din mediu prin încercarea de a contracara acțiunea medicamentului anti-TB. Administrarea necontrolată a medicației contribuie la selectarea subpopulațiilor bacteriene cu rezistență și proliferarea lor în detrimentul subpopulației sensibile [172].

2. Testare moleculară

Din totalul tulpinilor selectate pentru studiu, 132 au fost testate molecular pe truse HAIN MTBDR_{plus}. Dintre acestea la 111 tulpini s-a efectuat testare directă, produsele fiind pozitive BAAR la examenul microscopic (s-a urmărit algoritmul de diagnostic al studiului), iar la 21 de tulpini s-a efectuat testare indirectă, după extragerea ADN-ului din tulpina izolată din produs.

Dintre cele 132 de tulpini testate pe gena *rpoB* unde se găsesc peste 95% din mutațiile răspunzătoare de rezistența la RIF, cea mai frecventă mutație a fost **MUT3** cu lipsa benzii wild 8 corespunzătoare pentru tipul sălbatic (wild type 8). În tabelul XVI am sumarizat rezultatele testărilor, interpretarea și reprezentarea lor statistică.

Tabelul XVI Interpretarea și evaluarea rezultatelor testelor moleculare pentru gena *rpoB*

Interpretare si evaluare test						
Banda de hibridizare absentă	Nr. tulpini	Procent cazuri cu <i>rpoB</i> WT lipsa	Nr cazuri cu mutatii	Codon analizat	Mutatie detectată	Procent cazuri cu mutatii
rpoB WT 1		0.0%		505-509		
rpoB WT 2		0.0%		510-513		
rpoB WT 2 / WT 3	4	3.0%		510-517		
rpoB WT 3 / WT 4	20	15.2%	13	513-519	rpoB MUT 1	10.7%
rpoB WT 4 / WT 5	1	0.8%		516-522		
rpoB WT 5 / WT 6		0.0%		518-525		
rpoB WT 7	24	18.2%	19	526-529	rpoB MUT 2A	15.7%
			5		rpoB MUT 2B	4.1%
rpoB WT 8	72	54.5%	77	530-533	rpoB MUT 3	63.6%
Nici una	11	8.3%	1	526-529	rpoB MUT 2A	0.8%
			1	526-529	rpoB MUT 2B	0.8%
			5	530-533	rpoB MUT 3	4.1%
Total	132	100%	121	0	0	100%

La interpretare am urmărit, conform grilei, prezența sau absența benzilor sălbatice (WT – wild type) corespunzătoare tulpinilor care nu au venit niciodată în contact cu un antituberculos. Lipsa lor, însoțită de mutații, are ca expresie fenotipică rezistență față de RIF.

Deoarece antibiograma este un test care completează diagnosticul prin informația referitoare la sensibilitatea/rezistența MTB și influențează decizia terapeutică, am măsurat reproductibilitatea rezultatelor obținute prin calcularea coeficientului de concordanță Cohen (K), având în vedere că testul este calitativ și se notează cu sensibil sau rezistent.

Din punct de vedere al validității testului molecular acesta este un test calitativ, iar răspunsurile sunt binare (dihotomice): mutație detectată/nedetecată.

Validitatea testului molecular este dată de performanța testului în raport cu metoda de referință, “standardul de aur”, în cazul nostru a fost reprezentată de antibiograma fenotipică. Este important de menționat că testarea moleculară este reproductibilă, interpretarea făcându-se pe baza unei grile de interpretare și indiferent de cine citește interpretarea este aceeași [173].

3. Concordanța celor două metode utilizate în studiu

A fost important să vedem concordanța celor două metode de diagnostic utilizate în studiu fiind știut faptul că metoda moleculară LPA detectează populația rezistentă la un prag de sensibilitate de 5% pe când pentru testarea fenotipică pragul critic pentru detecția populației cu rezistență este situat la 1% [174].

Tabelul XV Coeficient COHEN de concordanță

Antibiotic/Metoda	Semnificație
HIN Fenotipic / HIN Molecular	Concordanță excelentă
RIF Fenotipic / RIF Molecular	Concordanță excelentă

Pentru **RIF** rezultatele sunt superpozabile în proporție de 99,2%, iar pentru **HIN** în proporție 98,5%. Coeficientul Cohen a fost de 0,825 pentru cele două metode de testare la **HIN**, respectiv 0,905 pentru **RIF**. Aceasta demonstrează că între rezultatele celor două metode utilizate există o concordanță excelentă, iar valoarea coeficientului Cohen situat între 0,81-1 arată o legătură foarte bună între cele două metode.

Pentru Isoniazidă, rezistența este analizată prin testul folosit, pentru două gene, respectiv gene *katG* și *inhA*. Dacă apar mutații în regiunea promoter a genei *inhA*, tulpina poate prezenta rezistență scăzută. În cazul mutațiilor care apar în gena *katG*, acestea determină rezistență înaltă la Isoniazidă.

Dintre cele 153 de tulpini studiate, am testat molecular 132 de tulpini prin testul LPA pe truse HAIN MTBDR_{plus}. Am testat astfel prezența/absența benzilor sălbatice, pentru genele *katG* și *inhA*: absența asociată cu prezența mutațiilor semnifică rezistență. Rezultatele sunt prezentate în tabelul XVII.

Pentru gena *inhA* care determină rezistența de nivel scăzut la Isoniazidă am observat mutații la un număr de 49 dintre tulpinile testate. 48, respectiv 98,0% dintre acestea au banda *inhA* WT1 absentă și au detectată mutația *inhA* MUT1, respectiv C-15T. Doar o singură tulpină are prezente ambele benzi *inhA*WT1/2, dar are detectată mutația *inhA* MUT1.

Tabelul XVII Interpretare și evaluare test molecular pentru Isoniazidă

Interpretare și evaluare test LPA pentru izoniazidă							
Banda de hibridizare absentă	Nr. tulpini	Procent tulpini din total	Nr tulpini cu mutații	Poziția acidului nucleic analizat	Mutație dezvoltată	Mutație	Procent tulpini
<i>inhA</i> WT 1	55	41.7%	48	-15	<i>inhA</i> MUT 1	C-15T	98.0%
<i>inhA</i> WT 2	0	0.0%	0	-8	<i>inhA</i> MUT 3A	T-8C	0.0%
			0		<i>inhA</i> MUT 3B	T-8A	0.0%
Nici una	77	58.3%	1	-15	<i>inhA</i> MUT 1	C-15T	2.0%
Total	132	100%	49				100.0%

Din totalul tulpinilor testate un număr de 125 prezintă rezistență la Isoniazidă datorată mutației în gena *katG*.

Pentru rezistența la Isoniazidă este implicată și gena *katG*. Dacă la aceste tulpini lipsește banda wild și apar sau nu mutații, acestea semnifică rezistența de nivel înalt la Isoniazidă

Prezența sau absența benzilor wild în gena *katG* la lotul de pacienți testați este prezentată în tabelul XVIII.

Tabelul XVIII Interpretare și evaluare test pentru gena *katG*

Interpretare si evaluare test pentru gena <i>katG</i>							
Banda de hibridizare analizată	Nr tulpini	Procent tulpini din total	Nr tulpini cu mutații	Codon analizat	Banda de mutație dezvoltată	Mutație	Procent tulpini cu mutații din total
katG WT absent	113	85.6%	110	315	katG MUT 1	S315T1	88.0%
			2		katG MUT 2	S315T2	1.6%
katG WT prezent	19	14.4%	13	315	katG MUT 1	S315T1	10.4%
Total	132	100%	125				100%

La gena *katG*, prin testul HAIN, urmărim prezența sau absența unei singure benzi sălbatice (wild) corespunzătoare codonului 315. Absența ei asociată cu prezența de mutații conferă tulpinii rezistență de nivel înalt la Isoniazidă. La tulpinile testate proporția dominantă de mutații a fost reprezentată de mutația *katG* MUT1 (mutație detectată S315T1) însoțită de absența benzii *katG* WT, asociație înregistrată la un procent de 88,0% dintre tulpini.

Este cunoscut faptul că drog rezistența în tulpina de *M. tuberculosis* este cauzată, în principal, de o mutație care apare într-o singură nucleotidă, care se acumulează în timp într-o genă specifică. Există medicamente la care asocierea dintre o anumită genă responsabilă și mecanismul de rezistență este foarte bine cunoscută, în timp ce pentru altele cunoștințele sunt incomplete. Nu toate mutațiile unei singure nucleotide detectate în tulpini care ar indica rezistența produc expresia rezistenței fenotipice la antibiotice [177].

Cele 153 de tulpini din studiu au fost testate molecular și pe truse HAIN MTBDRs/ v. 1.0 care testează rezistența la fluoroquinolone, aminoglicozide/peptide ciclice și etambutol.

Pentru fluoroquinolone a fost testată gena *gyrA* (subunitatea A a ADN girazei) care are ca mecanism de acțiune scăderea legării la ADN giraza. Este important de știut proporția rezistenței la fluoroquinolone deoarece cu cât avem mai multă rezistență la Q cu atât rata de succes terapeutic scade. 1% din tulpini dezvoltă mutații de rezistență în cursul replicării indiferent de ce medicamente se folosesc în tratament [154].

Tabelul XX Interpretarea și evaluarea rezultatelor testelor moleculare pentru determinarea mutațiilor de rezistență la FLQ

Banda de hibridizare analizată	Codon analizat	Banda mutație prezentă	Mutație	Nr. tulpini	Procent tulpini din total	Nr. tulpini cu mutații	Semnificație fenotipică
gyrA WT 1 lipsa	85-90		C885 A884	3	1.97%	3	Rezistență FLQ
		gyrA MUT 1	A90V			14	
gyrA WT 2 lipsa	89-93	gyrA MUT 2	S91P	19	12.42%	4	
						1	
gyrA WT 3 lipsa	92-97	gyrA MUT 3A	D94A	28	18.3%	3	
		gyrA MUT 3B	D94N			4	
		gyrA MUT 3C	D94Y			16	
		gyrA MUT 3D	D94G			4	
			D94H			1	
gyrA WT1/2/3 prezent	85-97			103	67.32%	1	
						1	
						1	
Total				153	100%	53	

Pentru rezistența la FLQ kitul folosit permite doar analiza genei *gyrA* la care se urmărește prezența/absența a trei benzi de tip sălbatic, însoțite sau nu de mutații. Prezența benzilor *gyrA* WT 1/2/3, caracterizând tulpinile sensibile la fluoroquinolone, a fost identificată în 67,3% din cazuri dominând ca frecvență în lotul studiat. La tulpinile rezistente la fluoroquinolone, în total 53 (37,7%) au fost identificate 9 tipuri de mutații corespunzătoare la 6 benzi. Dintre acestea mutațiile D94A, D94N, D94Y, D94G și D94H au însumat 28 de tulpini, respectiv mai mult de jumătate din tulpinile rezistente.

Gena *rrs* este gena în care, dacă apar mutații, acestea se traduc fenotipic prin rezistența la aminoglicozide (Kanamicină și Amikacină) și peptide ciclice (Capreomicină și Viomicină) medicație cu efect bactericid, injectabilă, considerată de rezervă și utilizată ca linia a II-a de tratament.

Prin testare moleculară folosind kitul HAIN Genotype MTBDRs/ (de linia a II-a) am analizat și gena *rrs* în care prezența mutațiilor și absența benzilor de tip sălbatic determină fenotipic rezistența la aminoglicozide sau peptide ciclice.

Tabel XXII. Interpretare și evaluare test pentru *rrs*

Interpretare și evaluare test pentru gena <i>rrs</i>							
Banda de hibridizare analizată	Nr tulpini	Procent tulpini din total	Nr tulpini cu mutații	Codon analizat	Banda de mutație dezvoltată	Mutație	Raportul mutațiilor pe <i>rrs</i>
rrs WT 1 lipsa	44	28.76%	45	1401	rrs MUT 1	A1401G	93.8%
			0	1402	-	C1402T	0.0%
rrs WT 2 lipsa	3	1.96%	2	1484	rrs MUT 2	G1484T	4.2%
rrs WT 1 și WT 2 prezent	106	69.3%	1	1401	rrs MUT 1	A1401G	2.1%
Total	153	100%	48				100%

Absența benzii *rrs*WT1 însoțită de *rrs*MUT1 are corespondent fenotipic în rezistența la Kanamicină Amikacină și Capreomicină.

Dintre cele 153 de tulpini testate, 48 dintre ele prezintă mutații de rezistență, una având profil de tulpină cu populație heterorezistentă (prezente ambele benzi sălbatică și prezentă și *rrs*MUT1).

Testarea moleculară pentru medicamentele de linia a II-a are asociat pe strip-ul de testare și gena *embB* pentru evidențierea mutațiilor de rezistență la Etambutol, medicament care face parte din prima linie de tratament.

Tabel XXIII Interpretarea și evaluarea rezultatelor pentru gena *embB*

Interpretare și evaluare test							
Banda de hibridizare analizată	Nr. tulpini	Procent tulpini din total	Nr. tulpini cu mutații	Codon analizat	Mutații	Banda de mutație dezvoltată	Raportul mutațiilor pe <i>embB</i>
embB WT 1 absent	81	52.9%	48	306	M306I	embB MUT 1A	58.5%
			33		M306V	embB MUT 1B	40.2%
			0		M306I	-	0.0%
embB WT 1 prezent	72	47.1%	1	306	M306V	embB MUT 1B	1.2%
Total	153	100%	82				100%

La peste jumătate dintre tulpini (52,9%) banda *embB* WT1 a fost absentă, dar s-a detectat prezența la 58,5% din cazuri de *embB* MUT 1A și la 40,2% *embB* MUT 1B,

cea ce conferă rezistența la Etambutol. La un număr de 72 de tulpini nu s-a detectat absența benzii sălbatică, una dintre ele având totuși prezentă o mutație care conferă rezistență.

Din punct de vedere fenotipic un număr de 71 de tulpini prezintă sensibilitate la Etambutol.

Dacă analizăm în ansamblu testarea moleculară pentru medicamente anti-TB de linia a II-a și Etambutol, corespondența fenotipică a mutațiilor depistate molecular este următoarea: 53,6% din tulpinile testate prezintă rezistență la Etambutol, pentru amino-glicozide și peptide ciclice, procentul tulpinilor rezistente este de 31,4%, iar pentru fluoroquinolone procentul tulpinilor rezistente este de 34,6%.

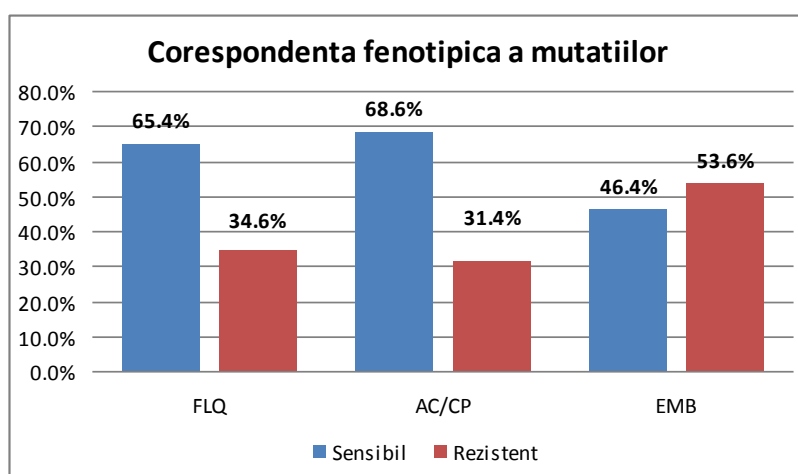
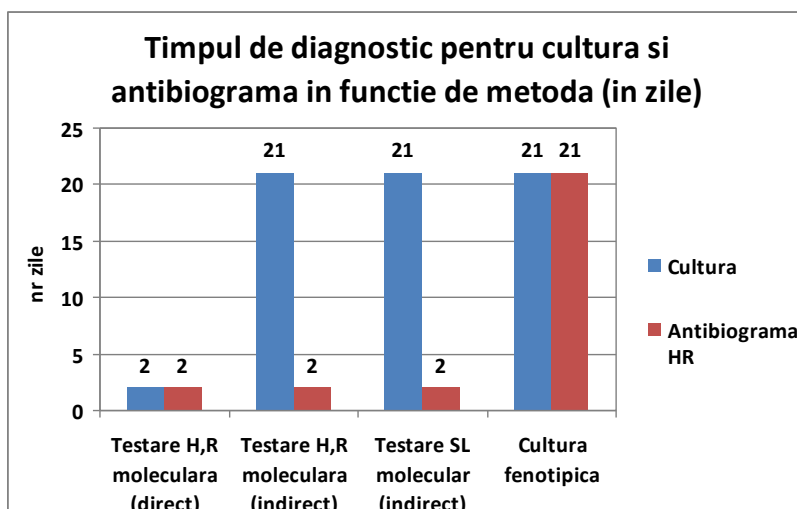


Fig. 67 Corespondența fenotipică a mutațiilor

Nu este de neglijat luarea în discuție a timpului de diagnostic necesar ambelor metode folosite în studiu.



Deși rezultatul obținut prin testare moleculară este foarte rapid, acesta este preliminar și trebuie completat cu testarea fenotipică. Dacă testarea moleculară se face indirect din tulpină, timpul de obținere a rezultatului se prelungește cu timpul de obținere al culturii (în medie 28 zile), dar important este că oricum avem informații în legătură cu profilul de rezistență mult mai repede decât le-am obține cu ajutorul ABG fenotipice.

Este de luat în calcul timpul scurt de obținere a informațiilor în cazul testării moleculare față de testarea fenotipică. Indiferent de metoda aleasă pentru extragerea ADN-ului, timpul necesar obținerii rezultatului este semnificativ mai scurt față de metoda clasică fenotipică.

CONCLUZII

1. Metodele de diagnostic fenotipic și molecular, utilizate în studiu, sunt standardizate complementare, reproductibile și cu rezultate de încredere. Există totuși situații particulare care trebuie cunoscute:

1.1 În cazul testării moleculare pentru evidențierea modificărilor care ar putea fi asociate cu rezistența la medicamentele antituberculoase trebuie ținut cont de existența tulpinilor cu populație heterorezistentă (amestec de populație bacteriană sălbatică și cu populație cu rezistență), stare exclusiv fenotipică într-o cultură genetic omogenă, greu de diferențiat și la care rezultatul este ambiguu, dificil de interpretat.

1.2 Testele moleculare pot identifica și mutațiile silențioase, neexprimate fenotipic, conducând la un rezultat de falsă rezistență.

1.3 Unele tulpini pot prezenta mutații rare, nedepistate prin testele folosite în studiu, dar care se manifestă prin rezistență fenotipică. Rezultatul testului molecular indică deci falsă sensibilitate, respectiv nu detectează modificările genetice asociate cu rezistența.

1.4 Examenul microscopic, urmată de metoda moleculară (primele etape folosite în algoritmul de diagnostic ca metode de triaj) scurtează timpul de diagnostic și orientează decizia terapeutică.

1.5 Testele moleculare nu înlocuiesc testarea fenotipică, ci doar o completează cu un rezultat preliminar.

1.6 Utilizarea metodei moleculare LPAs/ la pacienții depistați cu MDR este deosebit de utilă pentru detecția rapidă a cazurilor pre-XDR/XDR și stabilirea regimului terapeutic adecvat.

1.7 Metodele moleculare aplicate direct probelor biologice expun personalul de laborator la risc mai mic de infecție decât metodele indirecte, care presupun testare de culturi.

2. Este important să testăm molecular sensibilitatea micobacteriilor pentru a scurta timpul de diagnostic și a urgenta decizia terapeutică cu inițierea imediată a tratamentului specific țintit. Se previne astfel selectarea de noi rezistențe și este stopată diseminarea micobacteriilor rezistente.

3. Întârzierea diagnosticului și tratamentului cazurilor MDR favorizează achiziția de noi rezistențe.

4. Studiul nostru confirmă, că lipsa complianței la tratament și abandonul amplifică fenomenul de selecție urmat de proliferare a mutațiilor pre-existente.

5. Urmărirea mai atentă și monitorizarea pacienților, precum și fidelizarea lor pentru a crește complianța la tratament, conștientizarea lor în legătură cu importanța efectuării tratamentului și șansele crescute de vindecare în cazul tratamentului corect și complet, duce la reducerea sau chiar dispariția cazurilor de eșec și abandon, implicit ar diminua povara tuberculozei drog rezistente.

6. Este necesară o supraveghere mai atentă în tuberculoză pentru a afla în timp real atât tendințele bolii, cât și a impactul asupra populației pentru a lua imediat măsurile necesare având în vedere creșterea numărului cazurilor cu coinfecție TB-MDR-HIV.

7. Afectarea în procent mai mare a bărbaților și, mai ales, a celor cu media de vârstă de 44 de ani, care reprezintă segmentul activ al forței de muncă, are și implicații sociale și de sănătate publică.

8. Cu cât evoluția bolii este mai îndelungată în timp se achiziționează noi rezistențe. O parte dintre pacienți au trecut prin episoade succesive de boală, plecând doar de la tulpini MDR la care s-au adăugat alte rezistențe, ajungând la selectarea de tulpini cu rezistență totală la medicamentele uzuale.

9. Este posibil ca la o parte dintre pacienții cu evoluția bolii cuprinsă între 17-23 de ani să fie vorba de reinfecție exogenă cu tulpină MDR. Nu avem date suficiente pentru a dovedi că pacienții cu trecut de tuberculoză au fost pozitivi în tot acest timp sau este vorba de reactivare endogenă a infecției.

10. La lotul luat în studiu nu putem stabili cu exactitate momentul în care s-a produs drog rezistența, dar este evident că aceasta a apărut în timpul evoluției bolii, exceptând situația cazurilor noi de MDR care nu au în spate istoric de tuberculoză sensibilă și infectarea inițială a fost cu o tulpină MDR.

11. Completarea în timp real a bazei de date a Programului Național de Prevenire, Supraveghere și Control al Tuberculozei și îmbunătățirea ei prin adăugarea de informații referitoare la rezultatele testărilor moleculare ar contribui la îmbunătățirea managementului cazurilor de tuberculoză, ar limita răspândirea tulpinilor rezistente, iar regimurile terapeutice ar putea fi inițiate precoce, cu șanse mai mari de vindecare, eliminând achiziția suplimentară de rezistențe.

PROPUNERI

Schimbările importante care au avut loc în istoria naturală a tuberculozei cu impact major în epidemiologie reprezintă o urgență de sănătate publică mai ales datorită tuberculozei drog rezistente. Deși există o scădere semnificativă a tuberculozei sensibile, îngrijorătoare este creșterea numărului de cazuri de tuberculoză multidrog rezistentă (TB MDR) sau a tuberculozei cu rezistență extinsă (TB XDR). În acest sens, eforturile sunt îndreptate spre îmbunătățirea capacității de detecție a cazurilor de tuberculoză, cât și spre depistarea rapidă a rezistențelor.

Ținând cont de aceste preocupări, consider ca necesare unele sugestii referitoare la activitatea laboratoarelor de bacteriologie a tuberculozei, evidențiate de acest studiu.

1. Extinderea testării moleculare și la nivelul altor laboratoare din rețeaua de laboratoare pentru TB, astfel încât să fie acoperite toate regiunile cu incidență crescută. Metodele de diagnostic molecular reprezintă un avantaj considerabil atât în diagnosticul de tuberculoză, cât și în depistarea rapidă a rezistențelor, fapt care permite abordarea precoce a pacientului cu TB MDR, precum și instituirea rapidă a unui tratament eficient.
2. Utilizarea testării moleculare LPAs/ la pacienții depistați cu monorezistența la **RIF** sau cu MDR pentru a depista cazurile de XDR și a scurta timpul de diagnostic.
3. Asigurarea condițiilor de biosiguranță la nivelul tuturor laboratoarelor regionale și mentenanței cabinetelor de securitate biologică pentru a funcționa optim în concordanță cu metodele aplicate.

4. Asigurarea controlului extern al calității atât pentru laboratoarele regionale, cât și pentru LNR, pentru a oferi rezultate corecte și de încredere, deoarece există situații în care rezultatele testării moleculare pot arăta rezultate discordante comparativ cu antibiograma fenotipică datorate limitelor metodei moleculare.
5. Inițierea de programe care să mărească compliancea la tratament a pacienților, eventual consiliere psihologică de care să beneficieze toți pacienții pentru a diminua rata de abandon și eșec, situații în care cresc mult șansele de a selecta tulpini rezistente.
6. Îmbunătățirea aplicației software (softului) Bazei de date a Programului Național de Control al Tuberculozei și obligativitatea completării în timp real a rezultatelor pentru a avea acces la datele pacientului, istoricul de boală, informații referitoare la sensibilitatea tulpinii și statusul HIV.
7. Abordarea mai atentă a populației aflate la risc prin diagnostic activ (triaj), folosind metode de testare rapidă și creșterea aderenței la tratament a acestui segment.

Ca o concluzie finală, luând în considerare aceste criterii de adoptare a metodelor de diagnostic și ca urmare a rezultatelor proprii, consider necesar că:

1. Se menține necesitatea diagnosticului rapid în tuberculoză și utilizarea metodelor moderne de diagnostic molecular la nivel național, tehnici care nu înlocuiesc metodele fenotipice ci le completează.
2. Utilizând tehnicile de biologie moleculară în diagnosticul tuberculozei este crescută capacitatea de diagnostic mai ales în cazul produselor paucibacilare. Identificarea profilului de rezistență determină o scurtare semnificativă a timpului de diagnostic, ceea ce permite abordarea precoce a pacientului cu TB M/XDR, prin tratament țintit, limitarea transmiterii bolii și oferă șanse mai mari de succes terapeutic.
3. Este important că LPA este o tehnică standardizată care se poate aplica în toate laboratoarele regionale pentru a acoperi toate zonele cu incidență crescută.
4. Este foarte importantă cunoșterea în timp real a istoricului de boală, a factorilor predispozanți pentru evoluția către caz MDR (monorezistențele HIN/RIF, infecție HIV, existența cavităților pulmonare, eșec/abandon al unui tratament anterior pentru TB, date care pot fi aflate în timp real numai din Baza Națională de Date dacă aceasta este corect și la timp completată.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- [1] WHO Library Cataloguing-in-Publication Data Global tuberculosis report 2014.
- [3] Carmen Tania Macavei, Daniela Homorodean, Georgeta Gilda Popescu, Emilia Crișan. 2014. Diagnostic și tratament în tuberculoză. ISBN 978-606-19-0404-4, Editura Universității Transilvania, Brașov.
- [12] Frieden TR, Sterling T, Pablos-Mendez A, Kilburn JO, Cauthen GM, Dooley SW. 1993. The emergence of drug resistance tuberculosis in New York City. *N Engl J Med*; 328:521–6.
- [19] Park MM, Davis AL, Schluger NW, Cohen H, Rom WN. 1996. Outcome of MDR-TB patients, 1983–1993: prolonged survival with appropriate therapy. *Am J Respir Crit Care Med*; 153:317–24.
- [20] Frieden TR, Fujiwara PI, Washko RM, Hamburg MA. 1995. Tuberculosis in New York City: turning the tide. *N Engl J Med*; 333:229–33.
- [22] <http://www.indiacelebrating.com/events/world-tb-day/>
- [23] <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/end-tb/en/>
- [25] POPESCU Georgeta Gilda: Tuberculoza în România, 2015 *Viața Medicală*, Nr. 8 (1310).
- [27] Popescu Georgeta Gilda, Spînu Victor, Dumitru Marius. 2013, Actualele provocări ale endemiei TB în România și implicarea PNSCTP. www.srm.ro/prezentari-conferinte.php.
- [28] Lawn, SD. 2011. „Tuberculosis”. *Lancet* **378** (9785): 57–72. PMID 21420161.
- [30] Haas, F., and S. S. Haas. 1996. The origins of *Mycobacterium tuberculosis* and the notion of its contagiousness, p. 3-19. In W. N. Rom and S. Garay (ed), *Tuberculosis*. Little, Brown and Co., Boston, Mass.
- [36] Gheorghe Nini, Adriana Socaci, Constantin Marica, 2013. Tuberculoza de la diagnostic la tratament, p. 9. In Editura Partos, Timișoara.
- [37] Buiuc D., Neaguț M., 2009, *Tratat de microbiologie clinică*. Ediția a III-a; București. Tabel 34-2, p. 883.
- [38] Cole, et al. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**:537–544.
- [49] Dunn P., 1995. Virulence ranking of some *M. tuberculosis* and *M. bovis* strain according to their ability to multiply in the lungs, induce lung pathology and cause mortality in mice. *Infection and Immunity*. **63**: 3428.
- [51] Ouellet, H. et al., 2010. *Mycobacterium tuberculosis* CYP125A1, a steroid C27 monooxy-genase that detoxifies intracellularly generated cholest-4-en-3-one. *Mol. Microbiol.* **77**, 730.
- [54] Crowle A., 1991. Evidence that vesicles containing living, virulent *M. tuberculosis* or *M. avium* in cultured human macrophages are not acidic. *Journal of Immunology*. **59** (5) : 1823.
- [55] Ouellet, H. et al., 2010. *Mycobacterium tuberculosis* CYP125A1, a steroid C27 monooxy-genase that detoxifies intracellularly generated cholest-4-en-3-one. *Mol. Microbiol.* **77**, 730.
- [61] Daniela Homorodean, Olga Moldovan, Daniela Diculencu, Grația Chiriac, Ionela Muntean, Coord. I.M. Popa. 2005. *Îndrumar de tehnici de laborator de bacteriologie BK*, București, ISBN 973-0-04173-3.
- [65] Centers for Disease Control [homepage on the internet]. 2011. Atlanta, Georgia, USA: CDC. Acid-fast direct smear microscopy training package [cited 14 February 2011].
- [66] World Health Organization. 2010. A roadmap for ensuring quality tuberculosis diagnostics services within national laboratory strategic plans. The Global Laboratory Initiative, Advancing TB Diagnosis.
- [68] Migliori GB, Zellweger JP, Abubakar I, Ibraim E, Caminero JA, De Vries G, et al., 2012 European Union standards for tuberculosis care. *Eur Respir J.*; **39** (4):807-19.
- [69] De Kantor IN, Kim SJ, Frieden T, Laszlo A, Luelmo F, Norval PY, et al., 1998. Laboratory services in tuberculosis control. WHO Global Tuberculosis Programme. WHO/TB/ 98.258. Geneva: WHO.
- [70] Hirano K, Aono A, Takahashi M, Abe C. 2004. Mutations including IS6110 insertion in the gene encoding the MPB64 protein of Capilia TB-negative *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol.*; **42**(1):390-2.
- [115] European Centre for Disease Prevention and Control. Handbook on TB laboratory diagnostic methods for the European Union, Stockholm: ECDC; 2016. ISBN 978-92-9193-739-4.
- [122] European Centre for Disease Prevention and Control. 2013. ERLN-TB expert opinion on the use of the rapid molecular assays for the diagnosis of tuberculosis and detection of drug-resistance. Stockholm: ECDC.
- [123] Richter, E., M. Weizenegger, A. M. Fahr, and S. Rusch-Gerdes. 2004. Usefulness of the GenoType MTBC assay for differentiating species of the VOL. 24, 2011 LABORATORY DIAGNOSIS

- OF TB IN RESOURCE-POOR COUNTRIES 347 *Mycobacterium tuberculosis* complex in cultures obtained from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. **42**:4303–4306.
- [124] Grosset J, Truffot-Pernot C, Cambau E. 2000. Bacteriology of tuberculosis. In: Reichman LB, Hershfield ES, editors. Tuberculosis, a comprehensive international approach. New York: Marcel Dekker; p. 157-85.
- [125] Pathak D, Chakravorty S, Hanif M, Tyagi JS. 2007. Lysis of tubercle bacilli in fresh and stored sputum specimens: implications for diagnosing tuberculosis in stored and paucibacillary specimens by PCR. BMC Microbiol. **7**:83.
- [126] WHO 2014. Xpert MTB/RIF implementation manual: technical and operational ‘how-to’; practical considerations. www.who.int/
- [134] [http://www.hainlifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/tuberculosis.html/_GenoTypeMTBDRplus VER 2.0.](http://www.hainlifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/tuberculosis.html/_GenoTypeMTBDRplusVER2.0)
- [142] Canetti G, Rist N, Grosset J. 1964. Primary Drug Resistance in Tuberculosis. Am Rev Respir Dis. **90**:792-9.
- [143] Heifets L. 1991. Drug susceptibility tests in the management of chemotherapy of tuberculosis. In: Drug susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infections. Boca Raton: CRC Press; p. 89-121.
- [144] WHO. 2008. World Health Organization. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. Geneva.
- [146] Mitchison, DA. 1968. Sensitivity testing. In: Heaf FRG (editor). Recent advances in respiratory tuberculosis. London: Churchill J & A; p. 160.
- [147] Kim SJ. 2005. Drug-susceptibility testing in tuberculosis: methods and reliability of results. Eur Respir J. **25**(3) : 564-9.
- [149] Kim SJ, Espinal MA, Abe C, Bai GH, Boulahbal F, Fattorin L, et al. 2004. Is second-line anti-tuberculosis drug susceptibility testing reliable? Int J Tuberc Lung Dis. **8**(9): 1157-8.
- [150] Bwanga F, Hoffner S, Haile M, Joloba ML. 2009. Direct susceptibility testing for multi drug resistant tuberculosis: A meta-analysis. BMC Infect Dis. **9**:67.
- [152] Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler HT, Menon NK, Mitchison DA, et al., 1969. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. Bull World Health Organ **41**(1):21-43.
- [153] Canetti G, Froman S, Grosset J, Hauduroy P, Langerova M, Mahler HT, et al., 1963. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. Bull World Health Organ **29**:565-78.
- [154] Caminero JA, Sotgiu G, Zumla A, Migliori GB. 2010. Best drug treatment for multidrug resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. Lancet Infect. Dis. **10**(9), 621–629.
- [166] Vladyslav Nikolayevskyy, Doris Hillemann, Elvira Richter, Nada Ahmed, Marieke J. van der Werf, Csaba Kodmon, Francis Drobniewski, Sabine Ruesch-Gerdes, and ERLTB-Net Network 2016 PLoS One. 2016. External Quality Assessment for Tuberculosis Diagnosis and Drug Resistance in the European Union: A Five Year Multicentre Implementation Study; **11**(4): e0152926: [10.1371/ journal.pone.0152926](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152926).
- [167] Daniel Judge, Vicki L. Krause. 2016. Multidrug-resistant tuberculosis in the Northern Territory: A 10-year retrospective case series. CDI, vol. 40, no. 3.
- [168] Robert E. Snyder, Mariel A. Marlow, Melissa E. Phuphanich, Lee W. Riley, and Ethel Leonor Noia Maciel, BMC Infect Dis. 2016. Risk factors for differential outcome following directly observed treatment (DOT) of slum and non-slum tuberculosis patients: a retrospective cohort study; **16**: 494. Published online 2016 Sep 20. doi: [10.1186/s12879-016-1835-1](https://doi.org/10.1186/s12879-016-1835-1).
- [170] Francesca Meacci, Germano Orru and Marco R. Oggioni and all. 2005. Drug Resistance Evolution of a *Mycobacterium tuberculosis* Strain from a Noncompliant Patient. J Clin Microbiology ASMsociety. **43** (7): 3114-3120.
- [171] Vladimir Milanov, Dennis Falzon, Marya Zamfirova, Tonka Varleva, Elisabeta Bachiyiska and all. 2015. Factors associated with treatment success and death in cases with multidrug-resistant tuberculosis in Bulgaria, 2009-2010. International Journal of Mycobacteriology. Vol 4, p. 131-137.
- [172] Fonseca J. D, Knight G. M, McHugh T. D. 2015. The complex evolution of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. International Journal of Infectious Diseases. Vol 32, p. 94-100.
- [173] Ameeta S. Kalokhe and all. 2013. Multidrug-resistant tuberculosis drug susceptibility and molecular diagnostic testing: a review of the literature. AJM HHS Public Acces. **345** (2): 143-148.
- [174] Dorte Bek Folkvardsen, Erik Svensson, Vibeke Ø. Thomsen, Erik Michael Rasmussen, Didi Bang, Jim Werngren, Sven Hoffner, Doris Hillemann, Leen Rigoutsd. 2013. Can Molecular

- Methods Detect 1% Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*? J. Clin. Microbiol., **51** (5) 1596-1599.
- [175] Takayama K, Armstrong EL, Kunugi KA, Kilburn JO. 1979. Inhibition by ethambutol of mycolic acid transfer into the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. Antimicrob Agents Chemother.; **16** (2):240-2.
- [176] Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S, Bernasconi C, Stockbauer KE, Wieles B, Musser JM, Jacobs WR Jr. 1997. The emb operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. Nat Med.; **3** (5):567-70.
- [177] Ramaswamy SV, Reich R, Dou SJ, et al., 2003. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, Antimicrob Agents Chemother., **47**: 1241-50.