

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

**TUBERKULIOZĖS MIKROBAKTERIJŲ PADERMIŲ MUTACIJŲ, SĄLYGOJANČIŲ
ATSPARUMĄ PRIEŠ TUBERKULIOZINIAMS VAISTAMS, PALYGINAMIEJI
TYRIMAI**

Magistrantė VAIDA BALIUTYTĖ _____
(parašas)

Darbo vadovė
Dr. S. Kiverytė _____
(parašas)

Darbo konsultantė
E. Vasiliauskienė _____
(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja
hab.dr., prof. Z. A. Kučinskienė leidžiama ginti _____
(parašas)

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

2017 m., Vilnius

TURINYS

SANTRUMPOS.....	4
Įvadas	5
Darbo tikslas ir uždaviniai	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	8
1.1 Tuberkuliozė	8
1.1.1. Tuberkuliozės epidemiologija.....	8
1.2 Tuberkuliozės etiologija ir patogenezė	11
1.3. Vaistams atspari tuberkuliozė.....	15
1.4. Tuberkuliozės mikobakterijų atsparumas vaistams	19
1.4.1 Atsparumas pirmos eilės vaistams.....	19
1.4.2 Atsparumas antros eilės vaistams	20
1.5. Tuberkuliozės laboratorinė diagnostika.....	22
1.5.1. Mikrobiologiniai tyrimai.....	23
1.5.2. Molekuliniai tyrimai	24
2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI.....	27
2.1. Tyrimo medžiaga	27
2.2. Tyrimo metodai.....	27
2.2.1. <i>M. tuberculosis</i> jautrumo vaistams nustatymas fenopiniu metodu Bactec MGIT 960 sistema	27
2.2.2. Genominės DNR išskyrimas iš <i>M. tuberculosis</i> kultūrų kolonėlių metodu	28
2.2.2.1 Laboratorinė įranga ir priemonės.....	29
2.2.2.2 DNR išskyrimo darbo eiga	29
2.2.3. Mutacijų, lemiančių genetinį atsparumą antros eilės vaistams nustatymas TL-PGR metodu30	
2.2.3.1 Mėginių paruošimas TL-PGR ir reakcijos vykdymas	31
2.3 Statistinė analizė	35
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	36
3.1. TM jautrumo antraeiliams antimikobakteriniams vaistams nustatymo fenotipiniu metodu Bactec MGIT 960 sistema ir TL-PGR metodu palyginimas ir analizė	36
3.2. Genų mutacijų, sąlygojančių atsparumą antros eilės antimikobakteriniams vaistams analizė39	
Išvados	45
SUMMARY	46

Padēka.....	47
LITERATŪROS SARAŠAS	48

SANTRUMPOS

AMK – amikacinas

ATP – adenozintrifosfatas

KAP – kapreomicinas

DVA TB - daugeliui vaistų atspari tuberkuliozė (angl. *multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB*)

EEE – Europos ekonominės erdvės

ELPKC – Europos ligų prevencijos ir kontrolės centras (angl. *ECDC – European Centre for Disease Prevention and control*)

EMB – etambutolis

ES – Europos sąjunga

FQ – fluorochinolonai

INH – izoniazidas

YVA TB - ypač vaistams atspari tuberkuliozė (angl. *extensively drug-resistant tuberculosis, XDR-TB*)

KAN – kanamicinas

NAD – nikotinamidadenindinukleotidas

NRA – nukleorūgščių amplifikacija

PSO – Pasaulio sveikatos organizacija

PZA – pirazinamidas

RAB – rūgščiai atsparios bakterijos

RFPL – restrikcijos fragmento polimorfizmas

RIF – rifampicinas

STR – streptomicinas

TB – tuberkuliozė

TL-PGR – tikro laiko polimerazės grandininė reakcija

TM – tuberkuliozės mikobakterijos

VNP – vieno nukleotido polimorfizmas

ŽIV – žmogaus imunodeficito virusas

Ivadas

Tuberkuliozė (TB) išlieka viena iš pagrindinių mirties priežasčių visame pasaulyje. TB priskiriama socialinių ligų grupei, nes turi ryšį su socialinėmis sąlygomis, gyventojų migracija, nepakankama sergančių ligonių kontrole, žema sanitarine kultūra. Tačiau didžiausią grėsmę ligos kontrolei kelia vaistams atsparios TB paplitimas. Kasmet nustatoma iki pusės milijono asmenų, sergančių vaistams atsparia TB [51]. Nors Lietuvoje stebimas sergamumo TB mažėjimas, epidemiologinė situacija vis dar lieka rimta [53]. Lietuvoje sergamumo TB ir atsparumo vaistams rodikliai yra vieni iš blogiausių Europos Sąjungoje. Nuo 2008 m. Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) Europos regiono biuras Lietuvą priskyrė prie 18 Europos regiono šalių, kuriose registruojamas didelis sergamumas daugeliui vaistų atsparia (DVA) TB. Šios Europos šalys priklauso 27 pasaulio valstybėms, kuriose yra didžiausias DAV TB paplitimas [49].

Vaistams atsparios tuberkuliozės gydymas yra žymiai sudėtingesnis ir brangesnis, taip pat mažiau veiksmingas nei standartinis gydymas [52]. Vienas iš svarbiausių TB infekcijos problemos sprendimų – greitas vaistams atsparios TB nustatymas *in vitro* diagnostiniais metodais. Labai svarbu rasti metodus, kurie greitai aptiktų infekcijos sukėlėją ir tuo pačiu metu nustatytų mikobakterijų jautrumą antimikobakteriniams vaistams. Tai neatsiejama nuo TB sukėlėjo atsparumo vaistams molekulinį mechanizmų tyrimų, kurie įgauna vis didesnę svarbą prognozuojant ligos eigą ir gydymo efektyvumą [14].

TB mikobakterijų fenotipiniai jautrumo vaistams tyrimo metodai yra rekomenduojami PSO dėl savo aukšto specifiškumo ir jautrumo. Tačiau dėl ilgo *M. tuberculosis* bakterijų dauginimosi laiko, antimikrobinio jautrumo vaistams tyrimai trunka kelias savaites, o gaunami rezultatai yra priklausomi nuo naudojamos vaistų koncentracijos [16]. Ilgai trunkantis tyrimas turi įtakos netinkamam gydymui ir atsparių TM plitimui. Klasikiniai fenotipiniai metodai reikalauja specialaus laboratorijos ir personalo pasiruošimo. Dėl šių priežasčių TM nustatymas fenotipiniais metodais yra ribotas, ypač šalyse, kuriose yra žemas pragyvenimo lygis [33].

Siekiant efektyvesnės TB infekcijos diagnostikos, buvo pasitelkti nauji molekulinės diagnostikos metodai, kurie pagrįsti *Mycobacterium tuberculosis* DNR aptikimu ir genų mutacijų, atsakingų už atsparumą vaistams nustatymu. Molekulinė diagnostika gali žymiai greičiau pateikti rezultatus nei klasikiniai mikrobiologiniai metodai. Teoriškai, tai galėtų būti žymiai ekonomiškiau nei fenotipiniai mikobakterijų tyrimo metodai. Mikobakterijų genų mutacijų, susijusių su atsparumu vaistams, nustatymas sumažina diagnostikos trukmę ir gali būti naudojamas efektyvesnei ligos

diagnostikai ir gydymui. Tai tampa ypač aktualu didėjant vaistams atsparios TB sergančių ligonių skaičiui visame pasaulyje, tame tarpe ir Lietuvoje. Reikalingi greiti ir veikmingi diagnostiniai metodai, galintys nustatyti TB mikobakterijų atsparumą vaistams [53; 54].

Manoma, kad fenotipinius tyrimo metodus gali pakeistu nauji molekuliniai metodai dėl jų aukšto specifiškumo ir jautrumo bei greito atlikimo. Vienas tokių metodų yra tikro laiko PGR pagrįstas AnyplexTM II MTB/XDR (Seegene, P.Korėja) metodas, skirtas daugeliui vaistų atsparios TB diagnostikai ir genų mutacijų nustatymui. Tačiau mokslinėje literatūroje trūksta duomenų apie šio metodo panaudojimo galimybes. Atsižvelgiant į problemos aktualumą, šio naujo molekulinio diagnostinio metodo įvertinimas yra svarbus, siekiant įdiegti kuo daugiau pažangių tyrimo metodų į kasdienį laboratorijų darbą. Todėl šiame moksliniame tyrime numatyta palyginti molekulinio tyrimo rezultatus su klasikiniu, „auksiniu standartu“, laikomu fenotipiniu atsparumo vaistams nustatymo metodu.

Darbo tikslas ir uždaviniai

Darbo tikslas:

nustatyti tuberkuliozės mikobakterijų (TM) atsparumą antraeilams antimikobakteriniams vaistams ir jų sąlygojančias genų mutacijas nauju AnyplexTM II MTB/XDR molekulinio metodu ir įvertinti jį, lyginant su fenotipiniu metodu gautais rezultatais.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti TM atsparumą antraeilams antimikobakteriniams vaistams AnyplexTM II MTB/XDR molekulinio tyrimo metodu bei įvertinti jo jautrumą, specifiskumą, teigiamą ir neigiamą prognostines vertes.
2. Naudojant molekulinį tyrimo metodą aptikti genų mutacijas, lemiančias atsparumą fluorochinolonams ir injekciniams aminoglikozidams.
3. Palyginti fenotipiniu ir molekulinio tyrimo metodais gautus atsparumo vaistams rezultatus.
4. Įvertinti naujo AnyplexTM II MTB/XDR molekulinio tyrimo metodo naudojimo galimybes.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

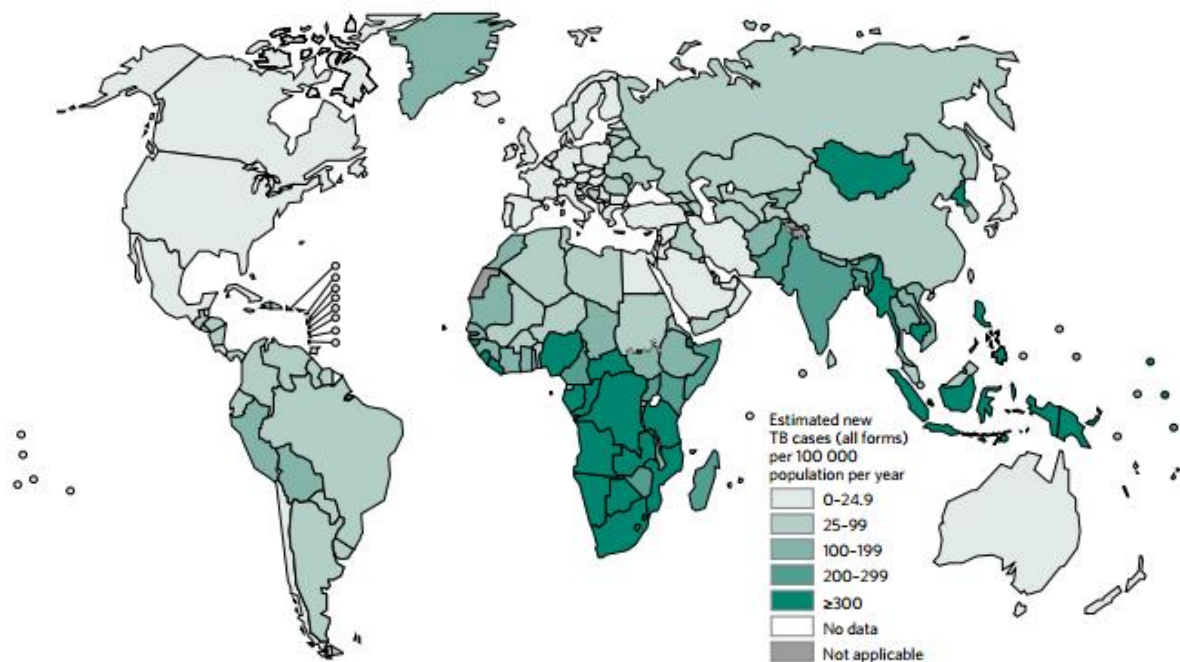
1.1 Tuberkuliozė

1.1.1. Tuberkuliozės epidemiologija

Tuberkuliozės (TB) problema visais laikais, įskaitant dabartį, išlieka viena aktualiausių žmonijos istorijoje. TB registruojama kiekvienoje pasaulio dalyje. 2015 m. TB paplitimas skyrėsi tarp viso pasaulio šalių priklausomai nuo populiacijos dydžio ir varijavo nuo 10 atv./100 000 gyv. šalyse, turinčiose aukštą pragyvenimo lygį iki 150-300 atv./100 000 gyv. šalyse su dideliu TB sergamumu, bei viršijo 500 atv./100 000 gyv. tokiose Pietų Afrikos šalyse kaip Mozambikas ir Lesotas (1 pav). Apžvelgiant viso pasaulio gyventojų sergamumą TB, net 61% visų TB atvejų 2015 m. registruota Pietryčių Azijos ir Vakariniame Ramiojo vandenyno regione (Indijoje, Indonezijoje, Kinijoje, Pakistane, Nigerijoje ir Pietų Afrikos šalyse, iš kurių Kinijai, Indijai ir Indonezijai tenka 45%). Tai tankiausiai gyvenami Žemės rutulio regionai. Didžiausias sergamumo rodiklis 2015 m. buvo Afrikos žemyne ir sudarė 26% visų pasaulio TB atvejų, arba 275 atv./100 000 gyv., kai pasaulio vidurkis – 142 atv./100 000 gyventojų. Amerikos žemynui teko 3% pasaulio TB (27 atv./100 000 gyv.), didžioji dalis – Pietų Amerikai. Europos regione sergamumas TB 2015 m. sudarė 3% visų globalinės TB atvejų, arba 36 atv./100 000 gyventojų. Viso pasaulyje 2015 metais buvo registruota 10,4 mln. naujų TB atvejų, tarp kurių 5,9 mln. (56%) atvejų sudarė vyrai, 3,5 mln. (34%) - moterys ir 1 mln. (10%) vaikai [17].

Ypač kelia nerimą situacija dėl kur kas sunkiau ir brangiau išgydomos daugeliui vaistų atsparios (DVA) TB. 2015 m. visame pasaulyje buvo registruota 480 000 naujų DVA TB atvejų, tarp kurių beveik pusę atvejų (45%) sudarė Indija, Kinija ir Rusijos Federacija [17].

TB yra viena iš infekcinių ligų, nuo kurios pasaulyje miršta daugiausiai žmonių. Nepaisant bendro mirtingumo nuo TB sumažėjimo 22% per 2000-2015 metų laikotarpį, TB išlieka viena iš dešimties pagrindinių mirties priežasčių visame pasaulyje. 2016 m. paskelbtais PSO duomenimis, 2015 m. nuo šios ligos mirė apie 1,4 mln. žmonių, iš kurių 0,4 mln. sudarė mirties atvejai tarp žmogaus imunodeficito virusu (ŽIV) infekuotų asmenų. Daugiau nei 95% mirčių nuo TB įvyksta mažas ar vidutinės pajamas gaunančiose šalyse. 2015 m. visame pasaulyje apie 1 mln. vaikų (0-14 metų) susirgo ir 170 000 vaikų mirė nuo šios ligos [17].



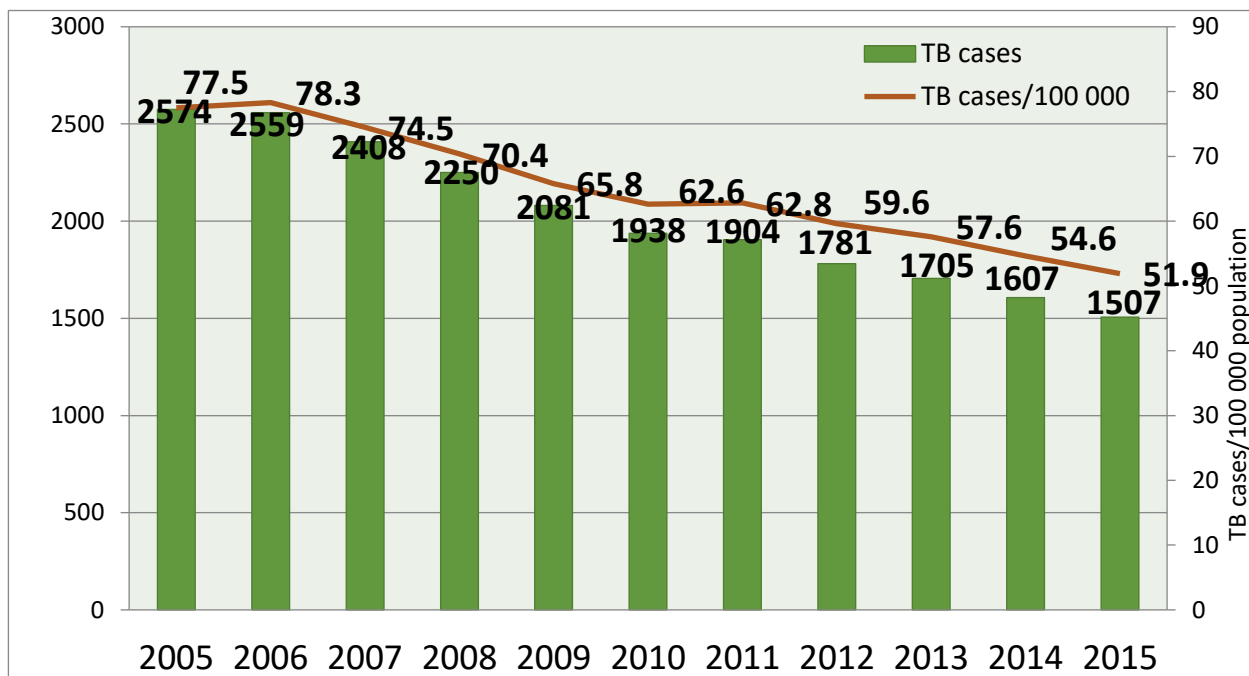
1 pav. Sergamumas TB pasaulyje 2015 m. [17]

PSO duomenimis, Europos regione TB išlieka pagrindiniu visuomenės sveikatos iššūkiu. 2015 m. Europos regione buvo registruota 323 000 naujų TB susirgimo atvejų (su atkryčiais), tarp kurių 27 000 atvejų sudarė ŽIV infekuoti asmenys. Dauguma (85%) naujų TB atvejų, įskaitant atkryčius, ir 91% mirčių nuo TB registruojami aštuoniolikoje aukštą pragyvenimo lygį turinčiose šalyse, į kurių sąrašą patenka Lietuva, Latvija ir Estija. Nors TB paplitimas per pastaruosius metus (2011- 2015) ES šalyse sumažėjo 4,3%, siekiant globalių tikslų – įveikti TB, metinė mažėjimo tendencija yra nepakankama ir kasmet turėtų sudaryti mažiausiai 10% [49].

Europos ligų kontrolės ir prevencijos centro (ELKPC) duomenimis, 2015 m. penktadalis visų pasaulio DVA TB atvejų buvo registruota ES šalyse. 2015 m. Europos sąjungos (ES)/Europos ekonominės erdvės (EEE) valstybėse DVA TB sudarė 4,1 % visų TB atvejų, tarp kurių 16% buvo nauji ir 48% anksčiau gydyti atvejai. Daugiausia DVA TB atvejų buvo registruota Baltijos šalyse. 19,7% visų DVA TB atvejų sudarė ypač vaistams atspari (YVA) TB (1027 atvejai), kuri sunkiai gydoma. ES/EEE šalyse šios TB formos gydymo sėkmės rodiklis siekia 24%, tuo tarpu prasčiausi YVA TB gydymo sėkmės rodikliai yra Lietuvoje (11,5%) ir Rumunijoje (12,2%) [49].

Remiantis Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) Europos regiono biuro duomenimis, Lietuva priskiriama vidutinio sergamumo TB šalims (25-100 atv./100 000 gyv.), tačiau sergamumas TB mūsų šalyje yra vienas didžiausių tarp ES šalių. ELKPC duomenimis, 2015 m. Lietuvoje buvo

užregistruoti 1507 TB atvejai, arba 51,6 atv./100 000 gyv. Lyginant su kitomis ES šalimis, kur TB paplitimo rodiklis siekia 11,7 atv./100 000 gyv., Lietuvoje šis rodiklis yra gerokai aukštesnis [49]. Nors pastaraisiais metais Lietuvoje stebimas TB epidemiologinių rodiklių stabilizavimasis, epidemiologinė situacija mūsų šalyje lieka sudėtinga. Vertinant 2005-2015 m. laikotarpį, TB paplitimas sumažėjo 41,5% proc., matoma teigiama tendencija, tačiau dėl demografinių šalies pokyčių (mažėjantis gyventojų skaičius) sergamumas TB išlieka didelis (2 pav.) [17].

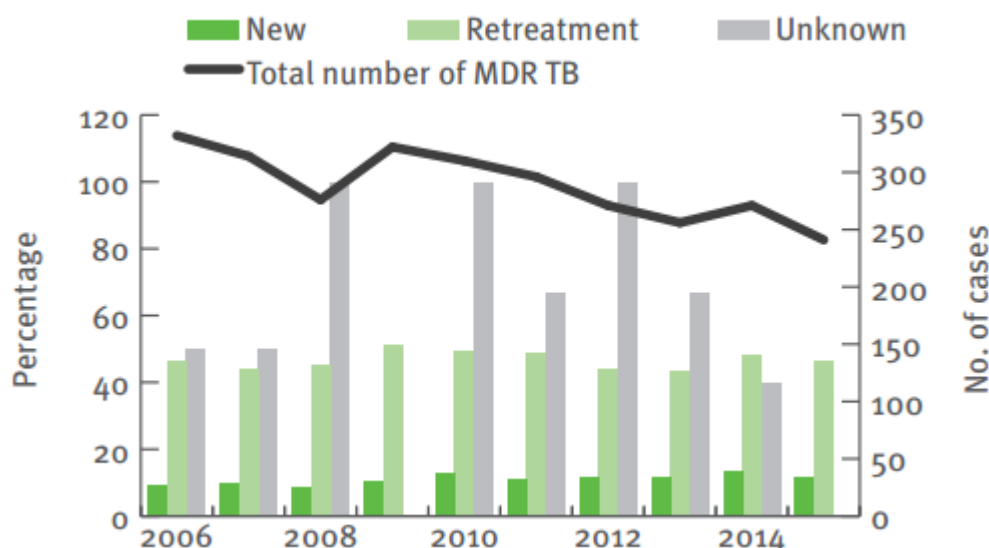


2 pav. TB paplitimas Lietuvoje, visi atvejai [17]

2015 m. Lietuvoje buvo registruoti 241 DAV-TB atvejai (19,7 %), iš kurių 59 (24,5%) buvo ypač vaistams atsparios (YVA) TB atvejai. Vertinant 2006-2015 m. laikotarpį, DVA TB paplitimas (visi TB atvejai) mūsų šalyje stabilizavosi ir toliau mažėja labai nežymiai (3 pav.). DVA TB problema šalyje išlieka labai aktuali, iki šiol ją spręsti sekėsi labai sunkiai. Vaistams atsparios TB gydymo rezultatai yra vieni blogiausių ES ir pasaulyje: iš 2013 m. registruotų 256 DVA TB atvejų, 76 (29,7%) pacientai buvo sėkmingai išgydyti, 59 (23 %) pacientai mirė [49].

Per 2015 m. Europoje registruoti 32 000 mirties atvejai dėl TB, arba 3,5 mirtys 100 000 gyventojų. 2014 m. Lietuvoje nuo TB mirė 110 ligonių, arba 11,7 atv./100 000 gyv. Tarptautinė situacija – 2014 m. mirtingumas ES šalyse: Estijoje -11,6/100 000 gyv., Latvijoje – 6,1/100 000 gyv.,

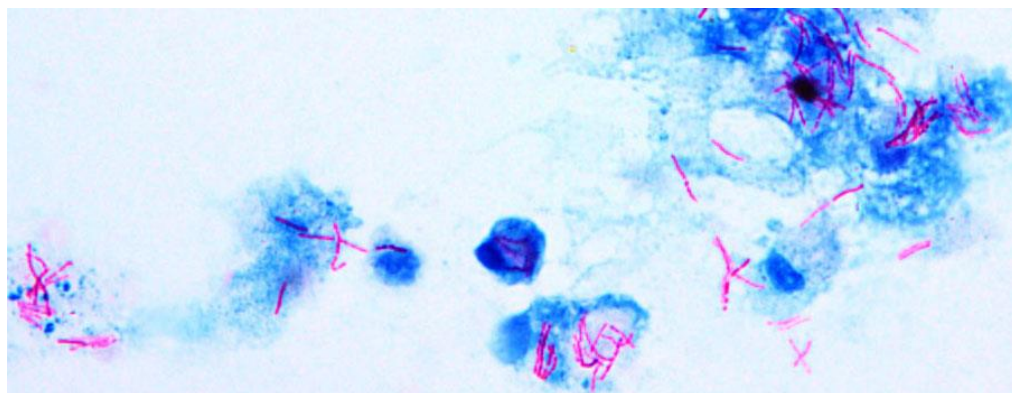
Rumunijoje – 6,3/100 000 gyv. Taigi, mirtingumas nuo TB Lietuvoje yra pats didžiausias tarp ES šalių [49].



3 pav. DVA TB paplitimas Lietuvoje, 2006-2015 m. [49]

1.2 Tuberkuliozės etiologija ir patogenezė

Tuberkuliozė (TB) – tai oro-lašeline būdu plintanti lėtinė, infekcinė liga, kurią sukelia tuberkuliozės mikobakterijos (TM). TM priskiriamos bakterijoms ir grybams būdingų savybių turinčiai *Mycobacteriaceae* šeimai, apimančiai vienintelę *Mycobacterium* gentį, kurioje šiuo metu suskaičiuojama daugiau nei 125 mikobakterijų rūšių. Visos *Mycobacteriaceae* šeimos mikobakterijos pasižymi rūgštims atspariomis savybėmis, nes dažymo metu sulaiko biocheminius dažus ir nusidažo ryškiai avietine spalva, kuri nenusiplauna, blukinant siera rūgštimi arba rūgščiu alkoholiu – t.y. 97% etanolio ir koncentruotos druskos reagentais. (4 pav.). Visos mikobakterijos yra skirstomos į patogenines (sukelia žmogaus ir gyvūnų TB) ir sąlyginai patogenines (didžioji dauguma mikobakterijų rūšių – saprofitiniai aplinkos mikroorganizmai) [36].



4

pav. *M. tuberculosis* bakterijos [48]

Mycobacterium tuberculosis yra pagrindinis žmogaus TB sukėlėjas. *M. tuberculosis* pirmasis nustatė ir išskyrė vokiečių gydytojas, mokslininkas Robertas Kochas 1882 m. Žmogui tuberkuliozę taip pat gali sukelti *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum* rūšys, kurios yra panašios pagal savo antigenines savybes ir todėl yra priskiriamos vadinamajam tuberkuliozės mikobakterijų kompleksui (*M. tuberculosis* complex). Lietuvoje dažniausiai TB sukelia *M. tuberculosis*, kitos komplekso rūšys – labai retai. Vienintelis *M. tuberculosis* rezervuaras – atvira plaučių TB sergantis žmogus [30; 10].

TM yra fakultatyviniai viduląsteliniai mikroorganizmai, galintys daugintis neaktyvintų makrofagų viduje. TM yra obligaciniai aerobai (jų augimui tinkamiausios gerai aeruojamos plaučių dalys), todėl nekrozinėje granulomoje, kur yra rūgštinė aplinka ir anoksijos sąlygos, jos negali daugintis. TM neformuoja sporų, nejudrios, neinkapsuliuotos, mikroskopiškai atrodo kaip šiek tiek lenktos ar tiesios lazdelės, kurių dydis varijuoja nuo 0,2 – 0,6 μm iki 1,0 – 10 μm [50].

Grynoje kultūroje išaugusių TM kolonijų morfologija ir spalva tarp rūšių kinta, pradedant nuo glotnių iki grublėtų ir nuo nepigmentuotų iki pigmentuotų. Kolonijų spalva gali būti nuo tamsiai geltonos iki citrinos spalvos geltonumo dėl pigmento karotino. Skirtingose mitybos terpėse išaugusios *M. tuberculosis* kolonijos skiriasi savo morfologija, yra nelygiu paviršiumi, raukšlėtos, šviesiai geltonos arba kreminės spalvos, forma primena žiedinį kopūstą (5 pav.) [35].

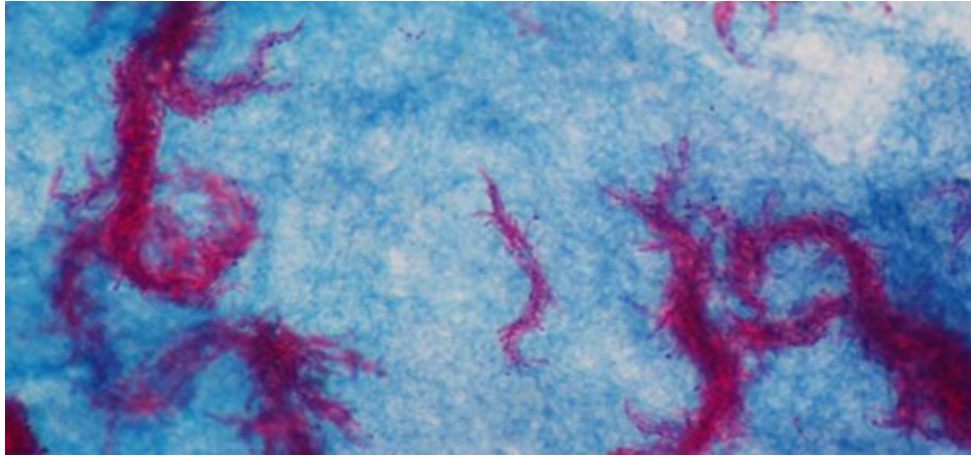


5 pav. Standžioje (a) ir skystoje (b) terpėje išaugusios *M. tuberculosis* kolonijos [5]

TM ląstelės sienelė yra unikali savo sudėtimi - apie 60 % jos sudaro lipidai, mikolinės rūgštys, peptidoglikanai, arabinomananas, kurie kartu suteikia ląstelės sieniei hidrofobiškumą ir atsparumą rūgštims ir daugeliui kitų cheminių medžiagų. Kai ląstelės sienelė yra pažeidžiama, pvz., įvairiais tirpikliais, tai lipidai, baltymai, kitos ląstelės sienelėje esančios medžiagos, kaip fosfatidilmanosidas, tirpsta. Mikolinių rūgščių, arabinogalaktano ir peptidoglikano kompleksas lieka netirpus [40]. Manoma, kad lipidai, baltymai ir peptidoglikanai taip pat tarnauja kaip signalinės, efektorinės molekulės sienelės pažeidimo procese, o netirpios medžiagos yra būtinos ląstelės išgyvenamumui [6].

TM labai atsparios rūgštims, šarmams, alkoholiams ir kitoms cheminėms medžiagoms. Tačiau jos yra jautrios ultravioletiniams spinduliams ir chloro junginiams. Tiesioginiai saulės spinduliai TM sunaikina per 45-55 min. TM atsparios šalčiui, karščiui, ir ilgai išgyvena išdžiūvusiuose skrepliuose [10].

Ar infekuotas žmogus susirgs TB priklauso nuo TM virulentiškumo ir patogeniškumo. Labai virulentiškos TM sulimpa viena su kita į ilgas grandines, kurios mikroskopiškai atrodo kaip susiraizgusios kasos arba juostos (6 pav.), ir vadinamos *Kord* veiksnium. *Kord* veiksnys stabdo leukocitų judėjimą, o tai lemia lėtinę granulomų eigą [45]. Šis veiksnys taip pat stimuliuoja šeimininko fermentų dehidrogenazių kofermento NAD veiklą, sumažindamas nuo NAD priklausomų mikrosomų fermentų veikimą. Nustatyta, kad *Kord* veiksnys paveikia mitochondrijų membranas, todėl sutrinka elektronų pernašos srautas mitochondrijose ir oksidacinis fosforilinimas. Didžioji dalis ląstelės makroenerginio junginio adenozintrifosfato (ATP) yra sintezuojama mitochondrijose oksidacinio fosforilinimo metu [6].



6 pav. *M. tuberculosis* bakterijų Kord veiksnys [48]

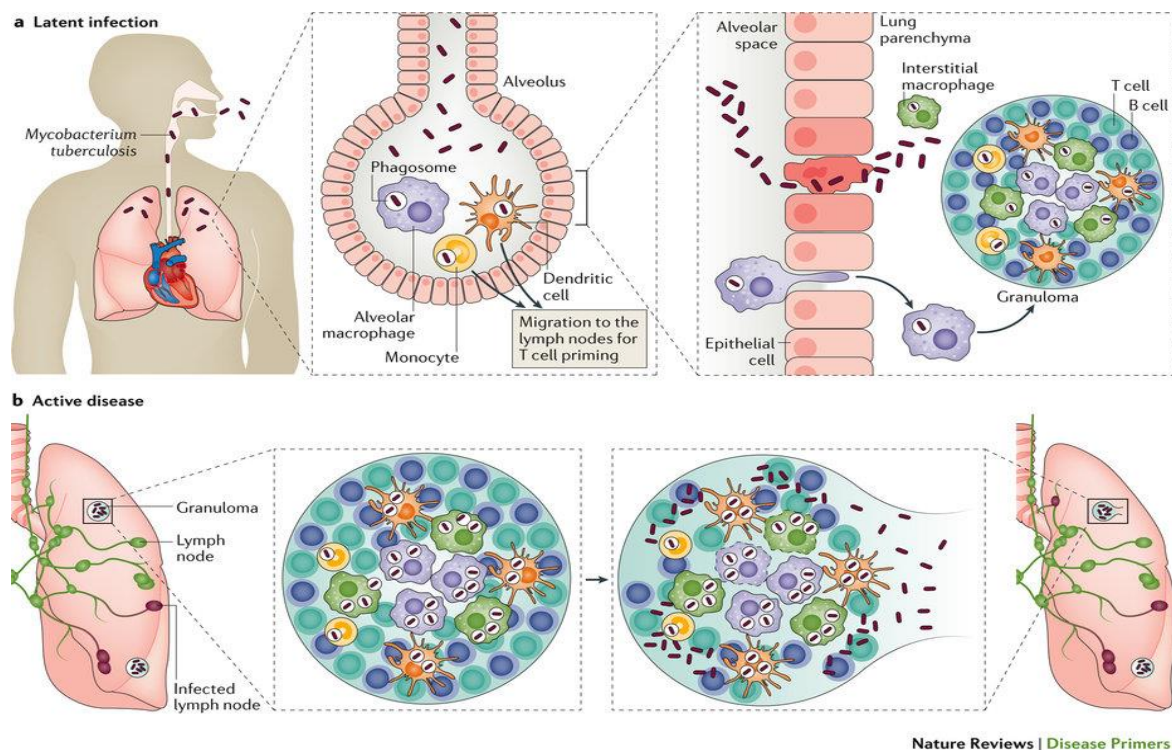
Žmogus dažniausiai (daugiau nei 95% atvejų) užsikrečia TB oro-lašeline būdu, retais atvejais – alimentiniu būdu (tiesioginis kontaktas per pažeistą odą ar gleivinę). TB bakterijos patenka į aplinką, kai atvira plaučių TB sergantis asmuo skiria TM į aplinką čiaudint, kosint ar kalbant. Žmogui įkvepiant orą, užterštą TM, jis gali užsikrėsti jomis, kadangi šios bakterijos gali išbūti ore kelias valandas, priklausomai nuo aplinkos [17].

Didžiausia reikšmė apsisaugant nuo šios ligos tenka žmogaus ląsteliniam imunitetui. TB vystosi tada, kai imuninė sistema nebegali kontroliuoti TB bakterijų ir jos pradeda greitai daugintis makrofagų viduje. Šios bakterijos paprastai pažeidžia plaučius, bet taip pat gali infekuoti ir kitus organus (kaklo limfmazgius, kaulus, inkstus ir kt.). Apie 85% visų TB atvejų sudaro plaučių TB [17].

Daugiau kaip 90% infekuotų asmenų niekada nesuserga aktyvia TB. Tokia būseną yra vadinama latentine TB, kuri nėra užkrečiama. Tai tokia TB forma, kai yra teigiamas tuberkulino ar serologinis gama-interferono mėginys dėl TB, bet nėra klinikinių ir radiologinių ligos požymių. Pacientams, kurie serga aktyvia TB forma, pasireiškia nespecifiniai klinikiniai simptomai, tokie kaip subfebrilus karščiavimas, nuovargis, prakaitavimas, apetito ir svorio praradimas, ilgiau nei 3 savaites nepraeinantis kosulys, nuolatinis skrepliavimasis, o ligai progresavus - atsikosėjimas su krauju [30].

Latentinės TB atveju infekcija prasideda, kai *M. tuberculosis* patenka į plaučius su įkvėpiamu oru, pasiekia alveoles ir susiduria su alveolių makrofagais. Makrofagams nepavykus pašalinti bakterijų, *M. tuberculosis* įsiskverbia į plaučių intersticinį audinį arba tiesiogiai pereina per alveolių epitelį ir migruoja į plaučių parenchimą. Vėliau dendritinės ląstelės ar monocitai transportuoja TM į

plaučių limfmazgius ir pristato jas T-ląstelėms. Tai skatina imuninės sistemos ląstelių telkimąsi ir granulomų susidarymą (7 pav.) [30].



7 pav. *M. tuberculosis* plitimas latentinės (a) ir aktyvios (b) TB atveju [30]

Esant atvirai TB formai, TM dauginasi granulomoje, nes neutrofilai ir makrofagai nesugeba sunaikinti mikobakterijų. Kai TM prisidaugina per daug, granuloma jų nebesulaiko ir bakterijos išplinta plaučiuose, dendrintinių ląstelių limfagyslėmis yra nunešamos į sritininius limfmazgius ir kraujagyslėmis į kitus organus (7 pav.) [30].

1.3. Vaistams atspari tuberkuliozė

TB yra gydoma ir išgydoma liga. Aktyviai, vaistams jautrios TB formai gydyti taikomas standartinis 4 pagrindinių antimikobakterinių pirmos eilės, arba pirmaeilių vaistų 6 mėnesių kursas: izoniazidas (INH), rifampicinas (RIF), etambutolis (EMB), streptomocinas (STR) ir pirazinamidas (PZA). Daugumą TB atvejų galima išgydyti, jei yra laiku paskirtas gydymas ir vaistai tinkamai

vartojami. Tačiau dėl netinkamo vaistų vartojimo, TM tampa atsparios vaistams, ir gydymas pirmos eilės vaistais tampa neveiksmingas [17].

1 lent. Pagrindinės vaistų grupės TB gydymui

	Vaistų grupė	Vaistai	Trumpinys
1.	Pirmos eilės antimikobakteriniai vaistai:		
		Isoniazidas Rifampicinas Etambutolis Streptomycinas Pirazinamidas	INH RIF EMB STR PZA
2.	Antros eilės antimikobakteriniai vaistai:		
2.1.	Fluorchinolonai	Ofloksacinas Levofloksacinas Moksifloksacinas Gatifloksacinas	OFL FLOX MXF GXF
2.2.	Aminoglikozidai (injekciniai)	Amikacinas Kanamicinas	AMK KAN
2.3.	Cikliniai peptidai	Kapreomicinas Viomicinas	KAP VIO

Vaistams atspari TB diagnozuojama tuomet, kai TM yra atsparios kuriam nors vaistui nuo TB. TM atsparumas dviem veiksmingiausiems vaistams, kurie skirti gydyti TB - INH ir RIF, vadinamas dauginiu atsparumu vaistams (DAV, angl. *multidrug-resistant TB*, *MDR*) [55]. Lietuvoje daugiau kaip 9% naujai diagnozuotų ligonių ir daugiau kaip 40% jau gydytų ligonių TM yra atsparios INH ir RIF, išsivysčiusiose šalyse – mažiau kaip 1%. Įgytas DAV atsiranda dėl įvairių priežasčių, lemiančių nebaigtą ar nepakankamą TB gydymą. Pirminis DAV yra tuomet, kai asmuo užsikrečia INH ir RIF atspariomis TM [10]. DAV TB galima įtarti tuomet, kai pagal standartinę schema gydomam asmeniui kartotinai randama TM ar yra klinikinių ir (ar) radiologinių TB progresavimo požymių. DAV nuo TB yra patvirtinamas, atlikus *in vitro* molekulinį genotipo nustatymo arba jautrumo vaistams tyrimą ir nustačius TM atsparumą INH ir RIF [17].

Pastaraisiais metais atsirado ypatingai vaistams atsparios (YVA, angl. *extensively drug-resistant*, *XDR*) TM, kurios yra atsparios INH, RIF, taip pat bet kuriam vienam fluorochinolonų grupės antibiotikui ir bent vienam iš trijų injekcinių vaistų nuo TB (amikacinui, kanamicinui ir kapreomicinui). Taip pat nuo 2009 m. jau yra registruojama ir visiškai vaistams atsparios TB (angl. *totally drug-resistant TB*) atvejų [13].

DVA ir YVA TB formos yra gydomos rezerviniais antros eilės, arba antraeiliais vaistais: fluorochinolonais (ofloxacinu, levofloxacinu, moksifloksacinu ir gatifloksacinu), injekciniais aminoglikozidais (kanamicinu, amikacinas) ir cikliniais peptidais (kapreomicinas, viomicinas), etionamidu, protionamidu, cikloserinu (1 lent.) [14]. Vaistams atsparios TB gydymas trunka žymiai ilgesnį laiką (iki 36 mėn.), naudojami antros eilės vaistai yra toksiškesni, turi daugiau šalutinių poveikių ir yra žymiai brangesni [13].

Tyrimai rodo, kad dažniausiai DAV ir YVA TB priežastis yra ne organizme persistuojančių TM reaktyvacija, o pakartotinis užsikrėtimas, dažniausiai TB gydymo įstaigose nuo vaistams atsparia TB sergančių ligonių. Vaistams atsparių TM plitimas priklauso nuo tokių veiksnių kaip infekuotų žmonių kiekis vienoje vietoje ir žmonių imunitetas, nes didesnę riziką užsikrėsti turi asmenys, sergantys ŽIV. Plitimo rizika padidėja, jei yra didelė TM koncentracija, pavyzdžiui, prastai vėdinamoje aplinkoje – perpildytuose namuose, ligoninėse ar kalėjimuose. Plitimo rizika yra sumažinama, jei sergantis pacientas laiku gauna tinkamą gydymą [12].

Pacientams, sergantiems YVA TB, tikimybė išgydyti yra žymiai mažesnė, nei jautria ar DVA TB forma sergantiems pacientams. TB prognozę lemia daug veiksnių: kitos ligos, socialinės sąlygos, TM atsparumas vaistams, ligos sunkumas ar paciento imuninė sistema. Įvairiose šalyse atlikti tyrimai parodė, kad nuo negydomos TB per vienerius metus nuo diagnozės nustatymo miršta apie trečdalis ligonių, o per penkerius metus – apie pusę ligonių. Maždaug 60% likusių gyvų ligonių įvyksta savaiminė TB remisija, 40% liga tampa lėtine, o ligoniai pastoviai skiria TM į aplinką [13; 10].

Dideliam tuberkuliozės paplitimui turi įtakos prastai mediciniškai aprūpinamos etinės mažumos, benamiai, kaliniai, alkoholikai, intraveninių narkotikų vartojimas, pagyvenę žmonės, taip pat žmonės, gyvenantys aplinkoje, kur tuberkuliozės paplitimas yra labai didelis ir žmonės, kurie bendrauja su tuberkulioze sergančiais žmonėmis. ŽIV infekcija taip pat yra vienas iš pagrindinių ligos rizikos veiksnių [35]. Tiesioginę įtaką atsparios TB vystymuisi turi neteisingas gydymo taktikos parinkimas, kai nesilaikoma griežtų visuotinai nustatytų gydymo schemų, kai parenkamos netinkamos vaistų dozės, taip pat savavališkas gydymo nutraukimas, nepakankama pacientų kontrolė ir kt. [31]. Taip pat vaistams atsparių TM padermių plitimui populiacijose turi įtakos migracija iš šalių, kur yra labai aukštas sergamumas DVA TB. Esteban J. ir kt. (2003) tyrė atsparios tuberkuliozės paplitimą tarp imigrantų Ispanijoje. 50% TB sergantiems imigrantams buvo nustatytas atsparumas bent vienam pirmos eilės antimikobakteriniam vaistui, o 17% sergančiųjų - nustatyta DAV TB [31].

TM atsparumas vaistams nėra naujas reiškinys. *M. tuberculosis* padermės, atsparios STR atsirado 1944 m., netrukus po to, kai vaistas buvo pradėtas vartoti gydymui. Yra nustatyta, kad

genetinį atsparumą vaistams lemia taškinės, spontaniškai įvykstančios genų mutacijos, modifikuojančios vaisto taikinį (pvz., pakeičiant bakterijos RNR polimerazę, kuri išvengia RIF veikimo) arba fermentą, verčiantį vaistą į aktyvią jo formą (pakitusi bakterijos katalazė, kuri neaktyvina INH) [30]. Skirtingai nuo kitų bakterijų, kurios naudoja pernešamus genomo elementus (plazmides ir transpozonus) atsparumo vaistams perdavimui tarp įvairių bakterijų, TM atsparumą vaistams įgyja išimtinai dėl genuose *de novo* atsirandančių mutacijų selektyvios bakterijų atrankos metu, vartojant vaistus nuo TB. 2 lentelėje yra pavaizduoti genai, kuriuose dažniausiai įvyksta mutacijos, lemiančios atsparumą vaistams [56]. Dabartiniu metu yra identifikuota daugiau nei 30 skirtingų genų, asocijuotų su atsparumu tam tikriems vaistams nuo TB. Geriausiai yra ištyrinėti *katG* (kodono 315 aminorūgščių pakaitos) ir *inhA* (kodonai 8, 15 ir 16) genai, asocijuoti su atsparumu INH, *rpoB* (kodonai 531, 526, 513 ir kt.) genas, atsakingas už atsparumą RIF, *embB306* genas, sąlygojantis atsparumą EMB, *pncA* genas, lemiantis atsparumą PZA, *rrs* ir *rpsL* genai, lemiantys atsparumą STR [36]. Taip pat yra nustatytos genų mutacijos, lemiančios atsparumą rezerviniams antros eilės vaistams nuo TB: fluorchinolonų grupės antibiotikams – *gyrA* ir *gyrB* genai, aminoglikozidams – *rrs1400* genas, insercijos *tlyA* gene ir taškinės mutacijos skirtinguose *eis* geno srityse [18]. Kadangi daugumoje atvejų atsparumą vaistams lemia vieno nukleotido polimorfizmai (VNP), visi šiuolaikinės molekulinės diagnostikos metodai yra paremti VNP paieška šiuose genuose [16]. Tačiau atsparumą vaistams lemiančias genų mutacijas turi ne visos atsparios TM. Manoma, kad atsparumą vaistams gali sąlygoti kiti atsparumo mechanizmai: kiti geno lokusai, antibiotikus išmetančios pompos, ląstelės sienelės pralaidumas ir kt. [30].

2 lentelė. *M. tuberculosis* genai ir atsparumą vaistams nuo TB sąlygojantys mechanizmai [36]

Gene	Encoded protein	Protein function	Affected drug	Drug's mode of action
<i>katG</i>	Catalase–peroxidase	Prodrug activation	Isoniazid	Inhibiting mycolic acid biosynthesis and other metabolic processes
<i>inhA</i>	Enoyl ACP reductase	Drug target		
<i>ndh</i>	NADH dehydrogenase II	Modulation of NADH/NAD ratio		
<i>ahpC</i>	Alkyl hydroperoxidase	Oxidative stress resistance		
<i>rpoB</i>	β -Subunit of RNA polymerase	Drug target	Rifampicin	Inhibiting transcription
<i>pncA</i>	Pyrazinamidase	Prodrug activation	Pyrazinamide	Inhibiting trans-translation
<i>rspA</i>	S1 ribosomal protein	Drug target		
<i>embCAB</i>	Arabinosyltransferases	Drug target	Ethambutol	Inhibiting arabinogalactan synthesis
<i>embR</i>	<i>embCAB</i> transcription regulator	Regulation of <i>embCAB</i> expression		
<i>rpsL</i>	S12 ribosomal protein	Drug target	Streptomycin	Inhibiting protein synthesis
<i>rrs</i>	16S rRNA	Drug target		
<i>gidB</i>	16S rRNA methyltransferase	Modification of drug target		
<i>whiB7</i>	MDR transcription regulator	Regulation of drug resistance genes		
<i>rrs</i>	16S ribosomal RNA	Drug target	Amikacin/kanamycin	Inhibiting protein synthesis
<i>eis</i>	Aminoglycoside acetyltransferase	Drug inactivation		
<i>whiB7</i>	MDR transcription regulator	Regulation of <i>eis</i> expression		
<i>ethA</i>	Flavin monooxygenase	Prodrug activation	Ethionamide	Inhibiting mycolate biosynthesis
<i>ethR</i>	<i>ethA</i> transcription repressor	Regulation of <i>ethA</i> expression		
<i>inhA</i>	Enoyl ACP reductase	Drug target		
<i>ndh</i>	NADH dehydrogenase II	Modulation of NADH/NAD ratio		
<i>mshA</i>	Glycosyltransferase	Prodrug activation		
<i>gyrA</i>	DNA gyrase subunit A	Drug target	Fluoroquinolones	Inhibiting DNA gyrase
<i>gyrB</i>	DNA gyrase subunit B	Drug binding		
<i>alrA</i>	D-Alanine racemase	Drug target	D-Cycloserine	Inhibiting peptidoglycan synthesis
<i>cycA</i>	D-Alanine-D-alanine ligase	Drug target		
<i>ddl</i>	Amino acid transporter	Drug uptake		
<i>thyA</i>	Thymidylate synthase A	dTTP synthesis	p-Aminosalicylic acid (PAS)	Inhibiting folate biosynthesis
<i>dhfrA</i>	Dihydrofolate reductase	Drug target		
<i>folC</i>	Dihydrofolate synthase	Prodrug activation		
<i>ribD</i>	Dihydrofolate reductase analog	Replacement of drug target activity		
<i>tlyA</i>	rRNA methyltransferase	Ribosome protection	Capreomycin	Inhibiting protein synthesis
<i>rrs</i>	16S ribosomal RNA	Drug target		

1.4. Tuberkuliozės mikobakterijų atsparumas vaistams

1.4.1 Atsparumas pirmos eilės vaistams

Visi prieštuberkulioziniai vaistai klasifikuojami į pagrindinius (pirmos eilės) ir rezervinius (II eilės). Vaistams jautrios TB gydymas grindžiamas pagrindiniais vaistais. Visi jie geriama iš karto vienu metu, kadangi INH, RIF ir EMB veikia viduląstelines ir užląstelines TM, PZA – tik viduląstelines, o STR – tik užląstelines TM. Kiekvienos pirmojo pasirinkimo TB gydymo schemos svarbiausias vaistas yra INH [17].

INH yra vienas plačiausiai naudojamų pirmos eilės vaistų TB gydyti, pradėtas naudoti nuo 1952 m. *M. tuberculosis* pasižymi labai dideliu jautrumu INH. INH yra vaisto pirmatakas, kuris turi būti aktyvuojamas bakterijų katalazės-peroksidazės fermento KatG, kurį koduoja *katG* genas.

Izoniazidas stabdo bakterijų augimą slopindamas mikolinių rūgščių biosintezę. Kitas pagrindinis vaisto inhibitorius yra InhA fermentas (enoil-ACP reduktazė), kuris dalyvauja mikolinės rūgšties biosintezėje [56].

RIF yra svarbus pirmos eilės vaistas TB gydymui. RIF sutrikdo mikobakterijų RNR sintezę, surišdamas RNR polimarezės β subvienetą [37]. RNR polimerazė yra pagrindinis fermentas, dalyvaujantis transkripcijos procese. RIF veikia bakteriocidiškai, jungdamasis prie β subvieneto netoli RNR/DNR kanalo ir blokuodamas RNR grandinės elongaciją. Apie 96 % RIF atsparių *M. tuberculosis* padermių turi mutacijas *rpoB* geno srityje [22;55].

PZA yra labai veiksmingas pirmaeilis vaistas, kuris sutrumpina TB gydymą nuo 9-12 mėn. iki 6 mėnesių, nes bakteriocidiškai veikia TM granulomos viduje, kur kiti vaistai nepatenka. PZA yra vaisto pirmtakas, kuris rūgščioje granulomos terpėje turi virsti į aktyvią formą – pirazino rūgštį, inhibuojančią fermentą riebalų rūgščių sintazę I, reikalingą mikobakterijų ląstelės sienelės riebalų rūgščių sintezei. Šiame procese dalyvauja pirazinamidazės ir nikotimidazės fermentai, kurie yra koduojami *M. tuberculosis pncA* geno PZA atsparios *M. tuberculosis* padermės praranda pirazinamidazės/nikotinamidazės aktyvumą. Šių fermentų aktyvumo praradimas susijęs su *pncA* geno mutacijomis [42; 37].

EMB, priešingai nei kiti pirmos eilės vaistai nuo TB, veikia bakteriostatiškai aktyviai augančias TM ląsteles, trukdydamas ląstelės sienelės formavimuisi. EMB taikiny yra ląstelės sienelėje esančio biopolimero arabinogalaktano sintezė. Arabinoziltransferazė, koduojama *embB* geno, yra fermentas, kuris dalyvauja arabinogalaktano sintezėje. *embB* geno mutacijos yra atsakingos už atsparumą EMB [56].

STR yra pirmasis antibiotikas, kuris pradėtas naudoti TB gydymui nuo 1943 m. STR yra plačiai naudojamas įvairių kitų gram-teigiamų ir neigiamų bakterijų sukeltų infekcijų gydymui. TB gydymui STR naudojamas kartu su pirmos eilės vaistais, injekcijomis į veną ar raumenis. STR yra baltymų sintezės inhibitorius, veikiantis bakterijų 30S ribosomos subvienetą ir 16S rRNR, koduojamus *rpsL* ir *rrs* genų. Mutacijos *rpsL* ir *rrs* genuose yra pagrindiniai atsparumo mechanizmai, jos aptinkamos 60-70 % STR atsparių padermių [37].

1.4.2 Atsparumas antros eilės vaistams

Atraeiliai, arba antros eilės vaistai nuo TB yra rezerviniai antibiotikai, naudojami vaistams atsparios TB gydymui. Šiai grupei yra priskiriami fluorochinolonai, injekciniai aminoglikozidai, cikliniai peptidai [17]

Fluorochinolonai (FQ) yra plataus veikimo spektro antibiotikai, veikiantys daugelį gram-teigiamų ir neigiamų mikroorganizmų, tame tarpe ir TM. FQ grupės antibiotikams priskiriami ciprofloksacinas, ofloksacinas, levofloksacinas, gatifloksacinas ir moksifloksacinas. Ciprofloksacinas ir ofloksacinas yra sintetiniai nalidikso rūgšties dariniai, atrasti kaip šalutinės antimaliarinio chlorihino medžiagos [23].

Fluorochinolonų pagrindinis taikinytis *M. tuberculosis* bakterijose yra DNR girazės baltyminis kompleksas, kuris katalizuoja nuo ATP-azių priklausančią neigiamą DNR superspiralizaciją į žiedinę DNR molekulę. *gyrA* ir *gyrB* genai koduoja du DNR girazės subvienetus, kurie sudaro aktyvų GyrA2-GyrB2 kompleksą. *M. tuberculosis* atsparumą FQ pirmiausia sukelia mutacijos, esančios *gyrA* geno 320 bp konservatyviose sekose. Fluorochinolonų atsparumas taip pat susijęs su mutacija, esančia *gyrB* geno 375 bp regione. Bet ši mutacija pasireiškia rečiau [46].

Nustatytas ryšys tarp mutacijų, sukeliančių *M. tuberculosis* atsparumą fluorochinolonams, ir naudojamų fluorochinolonų koncentracijos. Vartojant mažas šių vaistų koncentracijas, gali atsirasti bakterijos, turinčios nedidelį atsparumą FQ [31].

M. tuberculosis bakterijos turi pentamerinį MfpA peptidą. Buvo atrasta, kad MfpA raiška koreliuoja su atsparumu fluorochinolonams. *M. tuberculosis* bakterijose MfpA struktūra labai panaši į tretinę DNR molekulę. Manoma, kad MfpA atskiria fluorochinolonus į mikobakterijų citoplazmą imituodami DNR struktūrą, ir taip apsaugo mikobakterijų genetinę informaciją nuo fluorochinolonų veikimo [36].

Kanamycinas (KAN) ir amikacinas (AMK) yra aminoglikozidų grupės antibiotikai, o kapreomicinas (KAP) yra ciklinis peptidas. Visi šie antibiotikai yra injekciniai ir naudojami kaip antros eilės vaistai atsparios TB gydymui [44]. AMK ir KAN slopina TM baltymų sintezę, veikdami per rRNR 16S subvienetą. Mutacijos 16s rRNR susijusios su aukštu atsparumu KAN ir AMK. *tlyA* genas TM koduoja rRNR metiltransferazę. Šio geno mutacijos taip pat gali sukelti atsparumą KAP. KAP atsparios TM dažniausiai turi *tlyA* geno C1402T ir *rrs* geno mutacijas. Daugybinių mutacijų *rrs* gene gali sukelti kryžminį atsparumą tarp KAN ir KAP [18;26]. AMK ir KAN pasižymi nepilnu kryžminių atsparumu. rRNR A1401G mutacija sukelia aukšto lygio atsparumą AMK ir KAN ir žemo lygio atsparumą KAP. G1484T mutacija susijusi su aukšto lygio atsparumu AMK, KAN ir taip pat KAP [14].

Daugiausia mutacijų, lemiančių atsparumą KAN, yra randamos *rrs* gene. Mutacijos *eis* geno promotoriaus regione, kuris koduoja aminoglikozidų acetyltransferazę, skatina baltymų raišką ir sukelia žemo lygio atsparumą KAN [37].

1.5. Tuberkuliozės laboratorinė diagnostika

TB laboratorinė diagnostika yra esminis TB kontrolės ir gydymo elementas. TM sukeltos infekcijos nustatymas paprastai remiasi paciento ligos istorija, klinikiniais ir radiologiniais ligos požymiais bei rūgščiai atsparių bakterijų (RAB) aptikimu paciento klinikiniuose mėginiuose, bakterijų kultūrų auginimu, naudojant skystąsias ar standžiąsias mitybines terpes, ir molekuliniiais tyrimais (PGR, hibridizavimas, sekvenavimas) [11;30]. Dažniausiai naudojami TM nustatymo metodai ir jų įvertinimas yra apibendrinti 3 lentelėje.

3 lent. TM nustatymo metodai

Metodas	Privalumai	Trūkumai
Klinikiniai požymiai	Greita	Nespecifiška
Radiologiniai tyrimai (kompiuterinė tomografija, rentgeninis tyrimas)	Lengvai prieinami	Nespecifiški
Kraujo serologiniai tyrimai	Greita, nebrangu	Nespecifiška ir žemas jautrumas
Mikroskopinis tyrimas	Greita, nebrangu	Nepakankamas specifiškumas ir jautrumas
Kultūrų auginimas standžioje terpėje	Aukštas specifiškumas, nebrangu	Ilgai trunka (4-10 sav.)
Automatizuotas kultūrų auginimas skystoje terpėje (MGIT Bactec)	Aukštas specifiškumas	Lėtas (2-3 sav.), brangu
Hibridizacija	Greita	Brangu, reikalauja specialaus techninio pasiruošimo, ne visoms mikobakterijų rūšims identifikuoti
PGR	Greita	Brangu, reikalauja specialaus techninio pasiruošimo
Sekvenavimas	Greita, aukštinis standartas	Brangu

Krūtinės ląstos rentgenologinis tyrimas dažniausiai atliekamas TB atrankos, diagnostikos ir gydymo efekto įvertinimo tikslu. Kompiuterinė plaučių tomografija yra tikslinga, kai TB būtina diferencijuoti nuo kitų ligų. Išplėstiniai vizualizavimo būdai teikia platesnes galimybes nustatyti plaučių pažeidimus, tačiau šie tyrimai yra brangūs ir nerekomenduojami įprastam naudojimui. Rentgenologiniams tyrimams trūksta specifiškumo, gautus rentgenologinius rezultatus reikia lyginti su mikrobiologiniais tyrimais, kadangi svarbiausias neabejotinas TB diagnostikos kriterijus yra iš tiriamosios medžiagos išaugintos TM [30].

1.5.1. Mikrobiologiniai tyrimai

Mikrobiologiniai tyrimai yra laikomi klasikiais TB laboratorinės diagnostikos metodais, kadangi yra naudojami virš šimto metų nuo TM atradimo. Mikroskopinis RAB tyrimas yra vienas pigiausių, paprasčiausių ir greičiausių mikrobiologinių TM aptikimo metodų. Tiriant TM mikroskopu, negalima atskirti ar ląstelės gyvybingos ir negyvybingos, atskirti mikobakterijų skirtingų rūšių (TM nuo atipinių) bei vaistams jautrias bakterijas nuo vaistams atsparių padermių [11]. Atsižvelgiant į santykinai nedidelį metodo jautrumą (kad būtų galima aptikti mikobakterijas, reikia mažiausiai 10 000 bakterijų viename mililitre tiriamosios medžiagos), mikroskopijos metodo pagalba išaiškinami didžiausią epidemiologinį pavojų keliantys TB sergantys asmenys bei vertinamas gydymo efektyvumas. Vadovaujantis PSO rekomendacijomis, plaučių TB diagnozei patvirtinti pakanka vieno teigiamo mikroskopijos rezultato [19].

Kultūrų auginimo metodai išlieka auksiniu TB diagnostikos standartu, nes leidžia neabejotinai identifikuoti ir įrodyti TM buvimą. Šis tyrimo metodas yra žymiai jautresnis nei mikroskopija, kadangi TM gali būti išskirtos, jų koncentracijai esant nuo 10 iki 100 bakterijų viename tiriamosios medžiagos mililitre. Pasėlio specifiškumas yra 100%, todėl jis laikomas auksiniu diagnostikos standartu. Pasėlio metodas yra brangesnis ir sudėtingesnis nei mikroskopija, reikalauja tiriamosios medžiagos apdorojimo, atitinkamo laboratorijos pasiruošimo (įrangos, kompetencijų), biologinės saugos sąlygų, o rezultato gavimas gali užtrukti iki 8 savaičių [17]. Laboratorijose TM auginimui dažniausiai naudojamos selektyvinės standžiosios (Levenšteino–Jenseno, Middlebrook) arba skystosios (Bactec MGIT) mitybinės terpės. Naudojant standžiąsias mitybines terpes, galima įvertinti išaugusių kolonijų morfologiją, gausumą ir pigmentaciją, skystosiose terpėse kolonijų morfologijos įvertinti neįmanoma [11;4].

M. tuberculosis auginimas skystosiose mitybinėse terpėse yra jautresnis ir greitesnis metodas nei bakterijų auginimas, naudojant standžiąsias terpes. Dabartiniu metu mikobakterijų kultūrų auginimui plačiausiai naudojama Bactec MGIT sistema (Becton Dickinson, JAV), kuri taip pat naudojama atlikti jautrumo tyrimams pirmos ir antros eilės antimikobakteriniams vaistams [20]. Automatizuota Bactec MGIT sistema naudoja MGIT mikobakterijų augimo indikacinius mėgintuvėlius. Šis mikobakterijų auginimo metodas yra jautresnis ir sutrumpina mikobakterijų augimo laiką nuo 2 iki 27 dienų. Deja, naudojant šią sistemą, mikobakterijų identifikavimas vis tiek užima apie 3-5 savaites [3].

1.5.2. Molekuliniai tyrimai

TM aptikimas molekuliniiais tyrimais turi daug privalumų, lyginant su įprastais mikrobiologiniais tyrimo metodais. Pirmiausia, sutrumpėja rezultatų gavimo laikas, nes nėra jokių reikalavimų tiriamajai medžiagai, mažesnė mėginių kontaminacijos tikimybė, jie yra greitesni, jautrūs ir specifiški, reikalauja mažesnės biologinės saugos. Šiuolaikinėje TB molekulinėje diagnostikoje plačiai naudojami nukleorūgščių amplifikacijos (NRA) tyrimai, kurių pagalba galima aptikti *M. tuberculosis* komplekso bakterijas tiesiogiai iš pacientų ėminių mažiau nei per dvi valandas. Šių metodų taikinytis yra *M. tuberculosis* kompleksui specifinės rNR ir DNR sekos. Pagrindiniai molekuliniai tyrimo metodai TB tyrimui yra PGR, TL-PGR, DNR hibridizacija, RFLP analizė (restrikcijos fragmento ilgio polimorfizmas) ir kt. [11].

Molekulinės biologijos diagnostika grindžiama bakterijų nukleorūgščių išskyrimu iš grynos TM kultūros ar tiesiogiai iš tiriamosios medžiagos (pvz., skreplių) specifiško *M. tuberculosis* geno aptikimu. Taip pat šiais metodais galima nustatyti mikobakterijų genų mutacijas, lemiančias atsparumą vaistams nuo TB, pvz., *rpoB* geno mutacija lemia TM atsparumą rifampicinui, *katG* geno mutacija – didelį atsparumą izoniazidui, *inhA* geno mutacija – nedidelį atsparumą izoniazidui [56].

Xpert MTB/RIF (Cepheid, JAV) tyrimas. Vienas iš dažniausiai naudojamų molekulinį TM nustatymo metodų yra Xpert MTB/RIF tyrimas. Xpert MTB/RIF tyrimas, tai visiškai automatizuota nukleorūgščių išskyrimo, gausinimo ir aptikimo (tikro laiko polimerazės grandininės reakcijos metodu) sistema *GeneXpert*[®] (Cepheid, JAV), kuri leidžia dar greičiau (iki 2 val.) aptikti ir identifikuoti *M. tuberculosis* DNR bei sukėlėjo atsparumą rifampicinui. Xpert MTB/RIF tyrimas gali būti atliekamas iš skreplių (tiesiogiai iš skreplių arba apdorotų skreplių sedimento) ir kitų respiracinių ėminių, ekstrapulmoninių ėminių (likvoro, skrandžio išplovų, limfmazgio, audinio bioptato) suaugusiems ir vaikams. Xpert MTB/RIF tyrimui naudojamos vienkartinės reagentų kasetės, į kurių sudėtį įeina visi reagentai, reikalingi PGR reakcijai. Kiekvienam mėginiui naudojama atskira kasetė, todėl išvengiama kryžminio mėginių užteršimo. *M. tuberculosis* komplekso ir *rpoB* geno mutacijų aptikimui naudojamos specialios sekos, kurios yra pažymėtos skirtingais fluorochromais, kurių pagalba įvertinamas reakcijoje pagausinamo produkto kiekis kiekviename konkrečiame cikle. Visi tyrimo etapai yra automatizuoti, o rezultatai pateikiami per 2 valandas [25;15].

Vienas svarbiausių šio tyrimo privalumų yra didelis jautrumas ir specifiskumas respiraciniuose ėminiuose. Xpert MTB/RIF tyrimo jautrumas siekia iki 90-99%, tiriant mėginius, kurių mikroskopijos rezultatai yra teigiami. Tiriant mėginius, kurių mikroskopijos tyrimas yra

neigiamas, jautrumas sumažėja iki 66-74%. Nepaisant sumažėjusio jautrumo, šie tyrimai yra rekomenduojami pacientams, kuriems įtariama TB [7].

Xpert MTB/RIF tyrimas yra brangesnis nei įprasti TB laboratorinės diagnostikos metodai, bet yra lengvai atliekamas, reikalauja minimalių biologinės saugos sąlygų, personalo apmokymo, todėl jį gali atlikti tiek TB laboratorijos, tiek TB mikroskopijos centrai. Tačiau jis negali pakeisti mikroskopijos, pasėlio ir jautrumo vaistams tyrimų, kurie yra būtini gydymo efektyvumui vertinti ir atsparumui kitiems vaistams nuo TB nustatyti [39].

Atvirkštinės hibridizacijos su specifiniais žymenimis tyrimai. Šiais molekulinės diagnostikos tyrimais išskiriama sukėlėjo DNR iš TM kultūros arba tiesiai iš mikroskopiškai teigiamos tiriamosios medžiagos. Tyrimai leidžia išskirti *M. tuberculosis* kompleksą bei genų mutacijas, lemiančias atsparumą vaistams. Pagrindinis šių metodų privalumas yra greitas (iki 48 val.) atsparumo rifampicinui ir izoniazidui nustatymas [11].

Vis dėlto, LPA (angl. *line-probe assays*) negali pakeisti tradicinio pasėlio ir jautrumo vaistams tyrimų. Tiriant atsparumą izoniazidui, LPA tyrimo jautrumas yra mažesnis (vidutiniškai 85 proc.) nei pasėlio. Vadovaujantis PSO rekomendacijomis, LPA siūloma naudoti tik skreplių ėminiuose, kuriuose mikroskopuojant aptikta RAB ar pasėlyje išaugo TM. LPA tyrimas gali būti atliekamas TB laboratorijose, kuriose yra atitinkamai įrengtos molekulinei diagnostikai skirtos patalpos [17].

Ši technologija paremta DNR zondu hibridizacija. Naudojama nitroceliuliozės membrana, ant kurios linijiškai padengti mikobakterijų rūšiai specifiniai zondai. Bakterijų kultūros yra suardomos, o išlaisvinta DNR hibridizuojasi su zonu. Ant membranos susidaro specifinės juostelės. Pagal susidariusias juosteles galima nustatyti mikobakterijų rūšį. Zondai hibridizuojasi su DNR, kurioje yra nukleotidų pakitimai 16s ir/arba 23S rRNR regionuose. Šiuo metodu galima aptikti *M. tuberculosis* komplekso rūšis. Metodo jautrumas ir specifiškumas yra apie 90%, o rezultatai yra gaunami po 4-6 valandų. Metodo trūkumas – kryžminis reaktyvumas tarp mikobakterijų rūšių. Todėl šio testo rezultatai turėtų būti derinami su mikobakterijų fenotipinėmis savybėmis [7].

Kiti panašūs testai, kuriais galima aptikti *M. tuberculosis* atsparumą vaistams – GenoType MTBDRsl (Hain Lifescience GmbH, Germany) ir GenoType MTBDRplus (Hain Lifescience GmbH, Germany). GenoType MTBDRsl metodu yra aptinkamos mutacijos *gyrA*, *rrs* ir *embB* genuose. Šios mutacijos siejamos su *M. tuberculosis* bakterijų atsparumu FQ, antros eilės vaistams – KAP, AMK ir KAP, ir taip pat pirmos eilės vaitui EMB [48] GenoType MTBDRplus metodas skirtas identifikuoti *M. tuberculosis* komplekso bakterijas ir nustatyti jų atsparumą rifampicinui ir/arba izoniazidui. [19;38]

Gautų rezultatų patvirtinimui rekomenduojama atlikti daugiau mikroskopijos ir NRA tyrimų. Šių testų rezultatai turi būti derinami su kultūrų auginimo metodu. NRA testai negali atskirti gyvų bakterijų nuo negyvybingų, todėl šie metodai negali būti naudojami stebėti ligos eigą, jos atsaką į gydymą. Ligų kontrolės ir prevencijos centras rekomenduoja atlikti bent po vieną NAR testą pacientams, kuriems įtariama plaučių tuberkuliozė [7].

Lietuvoje greiti molekuliniai genotipo nustatymo tyrimai buvo pradėti naudoti 2009 m., pagal nacionalinę TB programą, siekiant kovoti su didėjančiu DVA TB sergamumu. Šiuo metu yra galimybė visų TB sergančių pacientų, gyvenančių Lietuvoje, ėminius tirti Xpert MTB/RIF tyrimo metodu [39].

Vis dėlto, molekuliniai diagnostikos metodai nepakeičia klasikinių mikroskopijos, kultūrų auginimo ir fenotipinių jautrumo vaistams nuo TB tyrimo metodų, nes galimi klaidingai teigiami ir neigiami rezultatai [11].

2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

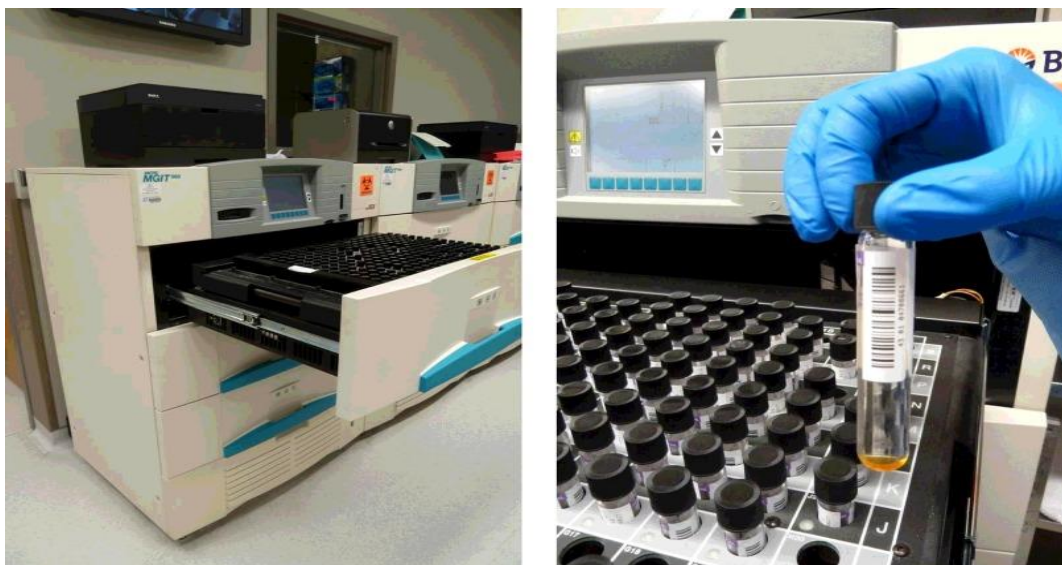
2.1. Tyrimo medžiaga

Tyrimas buvo atliekamas 2016-2017 metais Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centro Tuberkuliozės tyrimų laboratorijoje (P. Širvio g. 5) ir Mikrobiologijos laboratorijoje (Santariškių g. 2). Tyrimui naudotos Lietuvos pacientų, sergančių plaučių TB, *M. tuberculosis* padermės, išaugintos Tuberkuliozės tyrimų laboratorijoje iš pacientų skreplių ėminių. Iš viso buvo ištirtos 66 *M. tuberculosis* padermės. Joms atlikti fenotipiniai jautrumo vaistams tyrimai ir genomines DNR išskyrimas. Molekulinės diagnostikos laboratorijoje atlikta TL-PGR su nauju DAV ir YVA TB diagnostikai skirtu Anyplex™ II MTB/XDR rinkiniu (Seegene, Pietų Korėja).

2.2. Tyrimo metodai

2.2.1. *M. tuberculosis* jautrumo vaistams nustatymas fenopiniu metodu Bactec MGIT 960 sistema

Fenotipiniai jautrumo vaistams tyrimai atlikti VšĮ VULSK TTL darbuotojų pagal laboratorijoje patvirtintą protokolą. Tyrimui naudota Bactec MGIT 960 automatizuota mikobakterijų auginimo sistema. Skreplių mėginiai buvo sėjami mėgintuvėlius su skysta Bactec MGIT terpe su papildais, mėgintuvėliai įstatomi į aparatą ir inkubuojami 37° C temperatūroje. MGIT mėgintuvėlio dugne esančiame silikone įtvirtintas fluorescuojantis junginys, kurio fluorescenciją slopina deguonis. Augant bakterijoms mėgintuvėlyje naudojamas deguonis ir pakeičiamas CO₂. Išėikvojus laisvą deguonį, fluorochromas nebeslopinamas, dėl to MGIT mėgintuvėlyje, kuriame vyksta mikobakterijų augimas, įvyksta fluorescencija, kurią fiksuoja prietaisas (8 pav.).



8 pav. Bactec MGIT (Becton Dickinson, JAV) automatizuota mikobakterijų auginimo sistema, naudojanti MGIT mėgintuvėlius su skysta mitybine terpe [41]

Iš Bactec MGIT 960 sistemoje teigiamų mėgintuvėlių buvo nustatomas jautrumas pirmos ir antros eilės antimikobakteriniams vaistams (STR, RIF, INH, EMB, OFL, AMK, KAN ir KAP):

TM jautrumo vaistams tyrimai buvo atlikti Bactec MGIT 960 sistema. Į MGIT terpę įdėjus atitinkamos koncentracijos vaisto nuo TB, *M. tuberculosis* padermių augimas slopinamas, dėl to sunaudojama mažai deguonies, o junginio fluorescencija slopinama. Jei *M. tuberculosis* padermės atsparios vaistui nuo TB, jų augimas neslopinamas, sunaudojamas deguonis ir matuojamas fluorescencijos didėjimas. Gauti rezultatai vertinami kokybiškai: instrumentas interpretuoja rezultatus tuo metu, kai augimo lygmuo (angl. *GU - growth unit*) kontroliniame MGIT terpės mėgintuvėlyje pasiekia 400 (per 4-13 dienų).

2.2.2. Genominės DNR išskyrimas iš *M. tuberculosis* kultūrų kolonėlių metodu

Genominės DNR išskyrimas buvo atliekamas iš grynoje kultūroje išaugintų *M. tuberculosis* padermių, naudojant “RibospinTM_vRD” (Seegene, Korėja, Kat. Nr.322-150) DNR išskyrimo rinkinį (9 pav.). Rinkinio sudėtis pavaizduota 4 lentelėje.

4 lentelė. “Ribospin™_vRD” rinkinio sudėtis

Reagentai ir priemonės	Kiekis
VL buferis	30 ml
RB1 buferis	40 ml
RBW buferis	30 ml
RNW buferis	30 ml
Vanduo be nukleazijų	15 ml
1,5 ml mikrocentrifuginiai mėgintuvėliai	50 vnt.
2 ml surinkimo mėgintuvėliai	50 vnt.
Išskyrimo kolonėlės	50 vnt.

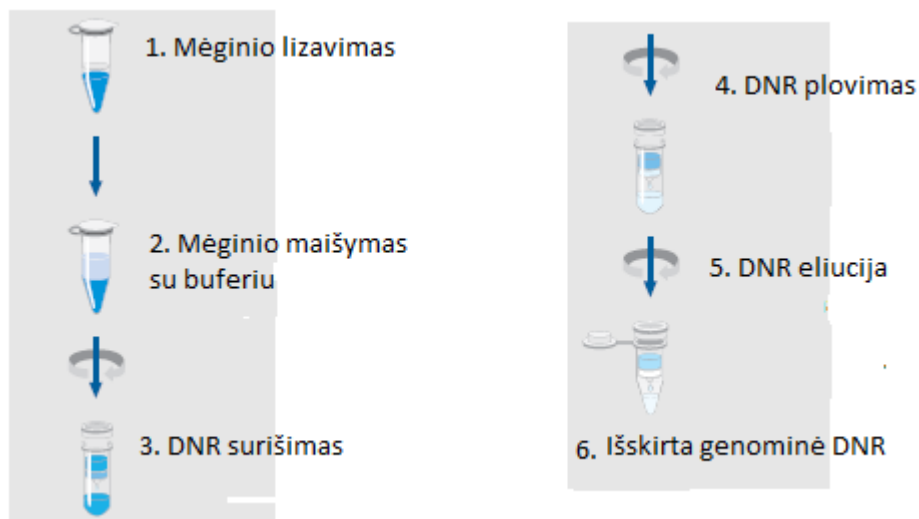
2.2.2.1 Laboratorinė įranga ir priemonės

1. Biologinės saugos spinta su HEPA filtru;
2. Laboratorinė centrifuga;
3. Sūkurinis maišytuvas;
4. Automatinės 10 - 100 µl pipetės;
5. Vienkartiniai automatinių pipetėlių antgaliai su filtrais;
6. Mėgintuvėliai 1,5 ml;
7. Laikmatis;
8. Vienkartinės pirštinės;
9. 3M respiratoriai su HEPA filtru;
10. Vienkartinė laboratorinė apranga (chalatai ir kepuraitės).

2.2.2.2 DNR išskyrimo darbo eiga

- 1) Į 1,5 ml mėgintuvėlį perkeliama 2-3 kilpelės *M. tuberculosis* grynos kultūros.
- 2) Pridedama 500 µl VL buferio. Uždarius dangtelį, mėgintuvėlis supurtomas.
- 3) Lizatas inkubuojamas 10 min kambario temperatūroje. Po to trumpai centrifuguojama (30 s).
- 4) Pridedama 700 µl RB1 buferio ir gerai išmaišoma, pavartant ar purtant.
- 5) 750 µl mėginio perkeliama ant centrifugavimo kolonėlės.
- 6) Centrifuguojama 10000xg 30 s kambario temperatūroje. Filtratas pašalinamas iš mėgintuvėlio, nuėmus centrifugavimo kolonėlę.

- 7) Ant kolonėlės pridedama 500 μ l RBW buferio.
- 8) Centrifuguojama 10000xg 30 s kambario temperatūroje. Filtratas pašalinamas iš mėgintuvėlio, nuėmus centrifugavimo kolonėlę.
- 9) Ant kolonėlės pridedama 500 μ l RNW buferio Centrifuguojama 10000xg 30 s kambario temperatūroje.
- 10) Papildomai centrifuguojama 10000 x g 1 minutę kambario temperatūroje tam, kad būtų pašalintas likęs plovimo buferis. Kolonėlė perkeliama į naują 1,5 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį.
- 11) Į kolonėlės membranos centrą pridedama 30-50 μ l vandens be nukleazių, Leidžiama pastovėti 1 min.
- 12) Centrifuguojama 10000 x g 1 minutę kambario temperatūroje. Išgryninta DNR laikoma 4° C temperatūroje, jei iš karto atliekamas tyrimas. Jeigu PGR tyrimas atliekamas vėliau, DNR užšaldoma ir laikoma –20° C temperatūroje.



9 pav. DNR išskyrimo “Ribospin™_vRD” (Seegene, Pietų Korėja) rinkiniu principas

2.2.3. Mutacijų, lemiančių genetinį atsparumą antros eilės vaistams nustatymas TL-PGR metodu

Darbai naudotas Anyplex™ II MTB/XDR rinkinys (Seegene, Korėja, Kat. Nr.TB7302Y), kurio sudėtis nurodyta 5 lentelėje. Tai kokybinis *in vitro* diagnostinis tyrimas, skirtas nustatyti *M. tuberculosis* ir sukėlėjo atsparumą antros eilės antimikobakteriniams vaistams skreplių, bakterijų

kultūrų, šviežių audinių ar bronchų nuoplovų mėginiuose. Šiuo rinkiniu galima aptikti 7 mutacijas *gyrA* gene, lemiančias atsparumą fluorochinolonams ir 6 mutacijas *rrs* gene ir *eis* geno promotoriaus regione, lemiančias atsparumą antros eilės injekciniams vaistams. Metodas pagrįstas daugkartine TL-PGR, kurios metu atliekama taikinių amplifikacija ir aptinkamos šios *M. tuberculosis* sekos (taikiniai): 7 atsparumą fluorochinolonams sukeliančios mutacijos *gyrA* gene (A90V(GTG), S91P(CCG), D94A(GCC), D94G(GGC), D94H(CAC), D94N(AAC), D94Y(TAC)) ir 6 atsparumą antros eilės injekciniams vaistams sukeliančios mutacijos - *rrs* 1401(G), 1402(T), 1484(T), *eis* promotoriuje -37(T), -14(T), -10(A)) bei vidinė kontrolė [1].

5 lentelė. Anyplex™ II MTB/XDR rinkinio sudėtis

Pradmenys	4X MTB/XDR TOM	250 µl	TOCE oligonukleotidų mišinys (TOM) - Reagentas MTB ir XDR-TB amplifikacijai
Premix	4X Anyplex PGR mišinys (su UDG)	250 µl	- DNR polimerazė - Uracil – DNR – glikozidazė (UDG) - Buferis su dNTPs
Teigiama kontrolė	MTB/DR PC	100 µl	- Maišyti klonai su visais teigiamais taikiniais ir vidine kontrole
Kontrolė – WTC	MTB/DR WTC	100 µl	Laukinio tipo kontrolė - Sumaišyti visi MTB laukinio tipo klonai
Vanduo	Vanduo be Rnazių	1000 µl	
DNR/ES	DNR išskyrimo tirpalas	10 ml	- Reagentai bakterijų DNR išskyrimui

2.2.3.1 Mėginių paruošimas TL-PGR ir reakcijos vykdymas

1. Visi reagentai, skirti TL-PGR reakcijai ir DNR mėginiai išimami iš šaldiklio ir atšildomi iki kambario temperatūros, supurtomi ir trumpai nucentrifuguojami.
2. TL-PGR reakcijos mišiniui reikalingų komponentų kiekis apskaičiuojamas, atsižvelgiant į visų tiriamųjų DNR mėginių ir kontrolių skaičių. TL-PGR reakcijos mišinio komponentų kiekiai vienam mėginiui ištirti nurodyti 6 lentelėje.
3. TL-PGR reakcijos mišinys ruošiamas steriliomis sąlygomis, prieš pradėdant darbą, laminarinė spinta apšvitinama UV šviesa, o darbo vieta išvaloma etanoliu. Reakcijos mišinys ruošiamas steriliame 1,5 ml mėgintuvėlyje.

4. Paruoštas PGR mišinys išpilstomas po 15 µl į PGR mėgintuvėlius.
5. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilama po 5 µl tiriamos DNR. Bendras reakcijos tūris - 20 µl.
6. Neigiamai kontrolė paruošiama į PGR mėgintuvėlį įpylus 15 µl PGR mišinio ir pridėjus 5 µl vandens be RNazių.
7. Teigiamai kontrolei naudojama 5 µl MTB/DR PG (PC).

6 lentelė. TL-PGR mišinio komponentų kiekiai vienam mėginiui

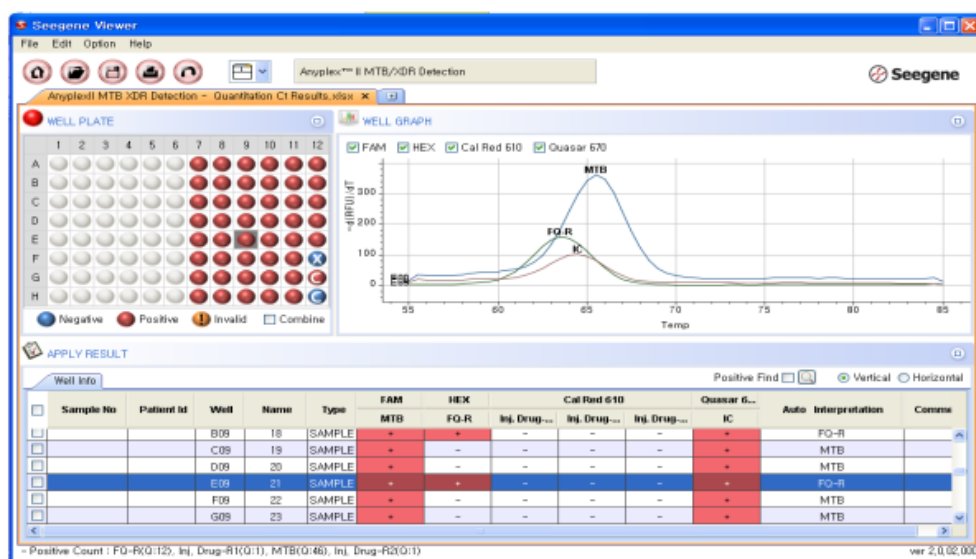
Medžiagos tūris vienam mėginiui, µl	Reagentas
5 µl	4 x MTB/XDR TOM
5 µl	4X Anyplex PCR Master Mix (su UDG)
5 µl	Vanduo be RNazių
Bendras tūris: 15 µl	Viso PGR mišinio

8. Laukinio tipo kontrolei naudojama 5 µl MTB/DR WTC.
9. Laukinio tipo kontrolė atliekama kiekvieno bandymo metu, nežinomi vaistams atsparūs mėginiai analizuojami, remiantis laukinio tipo kontrole.
10. Mėgintuvėliai dedami į TL-PGR amplifikatorių CFX96 (Bio-Rad, JAV), kur vykdoma reakcija 7 lentelėje nurodytomis sąlygomis:

7 lentelė. TL-PGR vykdymo sąlygos

Žingsniai	Ciklų skaičius	Temperatūra	Trukmė
1	1	95 °C	15 min
2	50	95 °C	30 sec
3		60 °C	1 min
4		72 °C	30 sec
5	1	55 °C	30 sec

TL-PGR reakcijai naudojami dvigubi pradmenų oligonukletidai (DPO), kurie slopina nespecifinių PGR produktų susidarymą. DPO sudaryti iš dviejų pradmenų sričių (5' galo stabilizatoriaus ir 3' galo pradmens). Šie pradmenys yra susijungę polydeoksinozino tilteliu. Šios skirtingos pradmenų sritys pasižymi skirtinga lydymosi temperatūra. 5' galo pradmuo ilgesnis ir jo lydymosi temperatūra yra aukštesnė nei 3' galo pradmens. 5' galo pradmuo veikia kaip stabilizatorius, kuris prisijungia pirmiau nei 3' galo pradmuo. Jei 3' galo pradmuo neprisijungia dėl komplementarumo trūkumo, taikinio DNR sekos pagausinimas nevyksta. Pasibaigus reakcijai, gauti duomenys buvo analizuojami *Seegene Viewer* programa, kuri automatiškai parodo, kuriuose mėginiuose ir kokios mutacijos yra aptiktos (10 pav.).



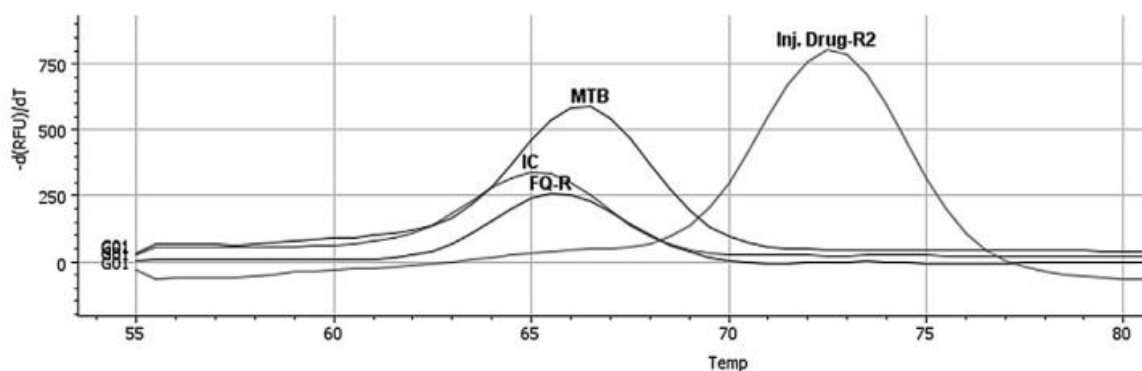
10 pav. TL-PGR rezultatų analizė *Seegene Viewer* programa

Anyplex TM II MTB/XDR rinkinys (Seegene, Korėja, Kat. Nr.TB7302Y) nustato atsparumą vaistams pagal lydymosi kreives tik tada, kai yra aptinkamos mutacijos. Kai mutacijos neaptinkamos, sekos nustatomos kaip laukinio tipo. TL-PGR reakcijos metu yra nustatoma *M. tuberculosis* (MTB lydymosi kreivė), atsparumas antros eilės injekciniams vaistams ir atsparumas FQ. Kiekvienos reakcijos metu taip pat atliekama ir vidinė kontrolė (IC). Šis metodas neatskiria atsparumo tarp KAN, AMK ir CAP. Tačiau galima aptikti tris lydymosi kreives. Pirma kreivė (Inj. Drug-R1), kuri turi mažiausią lydymosi temperatūrą, parodo mutacijų buvimą *eis* promotoriuje. Antra lydymosi kreivė

(Inj. Drug-R2) rodo *rrs* A1401G ir/arba G1484T mutacijas. Trečia kreivė (Inj. Drug-R3), turinti aukščiausią lydymosi kreivę rodo *rrs* C1402T mutacijų buvimą (8 lent.), (11 pav.).

8 lentelė. Anyplex™ II MTB/XDR rinkiniu nustatomos mutacijos

Lydymosi kreivės	Mutacijos lokalizacija	Interpretacija
FQ-R	<i>gyrA</i> (-37(T), -14(T), -10(A))	Atsparumas fluorchinolonams
Inj. Drug-R1	<i>eis</i> promotoriuje	Atsparumas aminoglikozidams (AMK, KAN)
Inj. Drug-R2	<i>rrs</i> A1401G ir/arba G1484T	
Inj. Drug-R3	<i>rrs</i> C1402T	Atsparumas cikliniam peptidui (KAP).



11 pav. Pavyzdys amplifikacijos kreivių *M.tuberculosis* bakterijų, kurios atsparios FQ-R ir antros eilės injekciniams vaistams. Aptiktos *gyrA* ir *rrs* mutacijos

2.3 Statistinė analizė

Tikro laiko PGR metodo jautrumas, specifiškumas, neigima ir teigiama prognostinė vertė, fenotipinio Bactec MGIT ir TL-PGR metodų patikimumas apskaičiuoti naudojant Koheno kapos matą, arba Kappa koeficientą (angl. *Cohen's kappa*) su IMB SPSS Statistic 19 programų paketu.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. TM jautrumo antraeilams antimikobakteriniams vaistams nustatymo fenotipiniu metodu Bactec MGIT 960 sistema ir TL-PGR metodu palyginimas ir analizė

Tyrimo metu buvo ištirtos 66 *Mycobacterium tuberculosis* padermės, kurioms atlikti fenotipiniai ir molekuliniai jautrumo antros eilės antimikobakteriniams vaistams tyrimai Bactec MGIT 960 sistema ir TL-PGR metodu, naudojant Anyplex II MTB/XDR rinkinį. 66 *M. tuberculosis* padermės buvo išskirtos iš Lietuvos pacientų, sergančių plaučių TB skreplių mėginių. Kontrolei naudota viena kontrolinė *M. tuberculosis* H₃₇Rv padermė, kuri yra jautri visiems vaistams.

Fenotipiniai jautrumo vaistams tyrimai atlikti 66 mėginiais. Nustatytas jautrumas ir atsparumas šiems antros eilės antimikobakteriniams vaistams: ofloksacinui (OFL), amikacinui (AMK), kanamicinui (KAN) ir kapreomicinui (KAP). Gauti tyrimų rezultatai pateikti 9 lentelėje.

Didžioji dalis tirtų mėginių, tai yra 32 (47,8 %), buvo fenotipiškai atsparūs, o 34 (52%) nustatyti kaip jautrūs OFL. Atsparumas AMK ir KAN buvo nustatytas 12 (17,9 %) ir 26 (38,8 %) mėginiuose (atitinkamai). 54 (82 %) mėginiai buvo jautrūs AMK, o 40 (61 %) - KAN. Dėl ribotų techninių galimybių fenotipiniai jautrumo vaistams tyrimai KAP buvo atlikti tik 38 mėginiais, iš kurių tik 5 (13,2 %) buvo atsparūs, o 33 (86,8 %) buvo jautrūs KAP. Apibendrinant, 27 (41%) mėginiai buvo nustatyti kaip jautrūs visiems tirtiems antimikobakteriniams vaistams, o 39 (59%) nustatyti kaip atsparūs bent vienam antros eilės antituberkulioziniam vaistui.

9 lentelė. Bactec MGIT 960 sistema atliktų fenotipinių jautrumo vaistams tyrimų rezultatai

Jautrumo vaistams tyrimo rezultatas	Antros eilės antimikobakteriniai vaistai				Bendras jautrių ir atsparių padermių skaičius
	OFL	AMK	KAN	KAP	
Jautru (%)	34 (52%)	54 (82 %)	40 (61%)	33 (86,8 %)	27 (41%)
Atsparu (%)	32 (48 %)	12 (18 %)	26 (39 %)	5 (13,2 %)	39 (59%)
Iš viso:	66 (100 %)	66 (100 %)	66 (100%)	38 (100 %)	66(100%)

Ištyrus mėginius molekulinio TL-PGR metodu, buvo nustatytas atsparumas antros kartos antituberkulioziniam vaistams, kurį sąlygojo tam tikros genų mutacijos. Iš 66 tirtų mėginių, 22 (33,3 %) mėginiai nustatyti kaip jautrūs, o 44 (66,7%) buvo nustatyti kaip atsparūs bent vienam antros eilės antimikobakteriniam vaistui (10 lent.). 31 (46,3%) iš 66 mėginių buvo atsparūs fluorochinolonams

(OFL), o 35 (53,7%) nustatyti kaip jautrūs. Aminoglikozidams (AMK, KAN) buvo atsparūs 35 (52,2%) mėginiai, 31 (47,8%) mėginiai buvo jautrūs. Cikliniam peptidui (KAP) atsparių mikobakterijų nustatyta nebuvo.

10 lentelė. TL-PGR metodu nustatyti atsparumo antros eilės anitimikobakteriniams vaistams tyrimų rezultatai

Jautrumo vaistams tyrimo rezultatai	TL-PGR metodas			Bendras jautrių ir atsparių padermių skaičius
	Fluorchinolonai (OFL)	Aminoglikozidai (AMK, KAN)	Cikliniai peptidai (KAP)	
Jautru (%)	35 (53,7%)	31 (47,8%)	66(100 %)	22 (34,3 %)
Atsparu (%)	31 (46,3%)	35 (52,2%)	0 (0%)	44 (65,7%)
Iš viso:	66 (100 %)	66 (100 %)	66 (100 %)	66 (100 %)

Siekiant nustatyti TL-PGR tyrimo metodo patikimumą, lyginant su fenotipiniu „auksiniu standartu“ laikomu Bactec MGIT metodu, visiems tiriamiems vaistams buvo nustatyti tikrai teigiami, tikrai neigiami, klaidingai teigiami ir klaidingai neigiami tyrimų rezultatai. Mūsų tyrime metodo jautrumas parodė, kokia yra galimybė nustatyti vaistams atsparias padermes, kai jos iš tikrųjų atsparios, t. y. tikrai teigiamus rezultatus. Metodo specifiškumas parodė, kokia yra galimybė nustatyti jautrias vaistams *M. tuberculosis* padermes, kai jos iš tikrųjų yra jautrios vaistams nuo TB, t. y. teisingai neigiamų rezultatų dalis iš rezultatų visumos.

11 lentelėje pateikiami atsparumo ir jautrumo OFL tyrimų rezultatai. Kaip matyti pateiktoje lentelėje, 26 (39%) mėginiai buvo tikrai teigiami (atsparūs OFL), 29 (44,8%) – tikrai neigiami (jautrūs OFL), 5 (7,5%) mėginiai - klaidingai teigiami (fenotipiškai jautrūs OFL, bet atsparūs OFL pagal TL-PGR) ir 6 (10%) - klaidingai neigiami mėginiai (fenotipiškai atsparūs OFL, bet jautrūs OFL pagal TL-PGR).

11 lentelė. Jautrumo ir atsparumo OFL nustatymas TL-PGR ir fenotipiniu metodais

			Bactec MGIT	
			OFL	
			Atsparu	Jautru
TL-PGR	OFL	Atsparu	26 (39%)	5 (7,5%)
		Jautru	6 (10%)	29 (44,8%)
		Viso:	32 (47,8 %)	34 (52,20%)

12 lentelėje pateikiami fenotipiniu ir TL-PGR metodais nustatyti jautrumo ir atsparumo aminoglikozidams (AMK, KAN) tyrimų rezultatai, tikrai teigiami, tikrai neigiami, klaidingai teigiami ir klaidingai neigiami tyrimų rezultatai. Kaip matyti 12 lentelėje, 22 (33%) mėginiai buvo tikrai teigiami (atsparūs AMK, KAN), 26 (40%) - tikrai neigiami (jautrūs AMK, KAN), 5 (8%) - klaidingai neigiami (fenotipiškai atsparūs aminoglikozidams, bet jautrūs pagal TL-PGR) ir 13 (40%) - klaidingai teigiami (fenotipiškai jautrūs aminoglikozidams, bet atsparūs pagal TL-PGR).

12 lentelė. Jautrumo ir atsparumo aminoglikozidams (AMK, KAN) nustatymas TL-PGR ir fenotipiniu metodais

		Bactec MGIT	
		Aminoglikozidai (AMK, KAN)	
		Atsparu	Jautru
TL-PGR	Atsparu	22 (33%)	13 (19%)
	Jautru	5 (8%)	26 (40%)
	Viso:	27 (40%)	39 (60%)

TL-PGR metodo jautrumas ir specifiškumas bei teigiama ir neigiama prognostinė vertė, nustatant jautrumą ir atsparumą FQ ir aminoglikozidams (AMK, KAN) (13 lent.), buvo lyginti su „auksiniu standartu“ laikomu fenotipiniu Bactec MGIT metodu, kurio specifiškumas siekia 100%.

Siekiant palyginti šių metodų rezultatų sutapimą, nustatant FQ ir aminoglikozidams (AMK, KAN) atsparius ir jautrius mėginius, buvo apskaičiuotas Koheno kapos matas, arba Kappa koeficientas (angl. *Cohen's kappa*). Koheno kapa gali būti nuo 0 iki 1. Kapai artėjant prie 0, metodų rezultatų sutapimas mažėja. Kuo Kappa koeficientas didesnis, tuo didesnis metodų rezultatų sutapimas. Jei Kappa yra 0,40–0,59, tai sutapimas vidutinis, jei 0,60–0,74 – sutapimas didelis, o jei daugiau nei 0,74 - labai didelis.

13 lentelė. TL-PGR metodo jautrumo, specifiškumo, teigiamos ir neigiamos prognostinių verčių fluorochinolonams ir aminoglikozidams įvertinimas

Metodas	Fluorochinolonai (FQ)				
Molekulinis TL-PGR	Jautrumas, %	Specifiškumas, %	TPV*	NPV*	Kappa koef.
	81 %	86 %	84 %	83 %	0,67
	Aminoglikozidai (AMK, KAN)				
	Jautrumas, %	Specifiškumas, %	TPV*	NPV*	Kappa koef.
	81 %	67 %	63 %	84 %	0,47

*TPV – teigiama prognostinė vertė; *NPV – neigiama prognostinė vertė

TL-PGR metodo jautrumas, specifiškumas, teigiama ir neigiama prognostinės vertės, nustatant jaurumą ir atsparumą kapreomicinui (KAP) apskaičiuoti nebuvo dėl per mažos tiriamų mėginių imties (dėl ribotų galimybių fenotipiniai jautrumo vaistams tyrimai nebuvo atlikti).

Apibendrinant tyrimo rezultatus matyti, kad molekulinio TL-PGR metodo jautrumas ir specifiškumas fluorochinolonams ir aminoglikozidams skiriasi. Metodas yra pakankamai jautrus abiemis vaistų grupėms, tačiau specifiškumas žymiai skiriasi tarp fluorochinolonų ir aminoglikozidų. Molekulinis tyrimo metodas yra daugiau specifiškesnis, tiriant atsparumą fluorochinolonams, tačiau žymiai mažiau specifiškas aminoglikozidams. Mokslinėje literatūroje pateikiami duomenys svyruoja įvairiuose intervaluose, pavyzdžiui, Molina-Moya ir kt. (2015) tyrime TL-PGR specifiškumas vyravo nuo 67% iki 82,7%, o jautrumas nuo 92,3% iki 100%.

3.2. Genų mutacijų, sąlygojančių atsparumą antros eilės antimikobakteriniams vaistams analizė

Vienas pagrindinių TL-PGR metodo pranašumų buvo galimybė aptikti genų mutacijas, kurios lemia atsparumą antraeilams antimikobakteriniams vaistams. Tyrimo metu buvo tirtos *gyrA* geno mutacijos, kurios lemia atsparumą FQ, taip pat *rrs* geno (A1401G, C1402T, G1484T) ir *eis* geno promotoriaus mutacijos (-37(T), -14(T), -10(A)), lemiančios atsparumą injekciniams antibiotikams – aminoglikozidams (AMK, KAN) ir cikliniam peptidui (KAP).

Ištyrus 66 *M. tuberculosis* padermes TL-PGR metodu, viso 31 (46%) mėginyje buvo aptiktos *gyrA* geno mutacijos (14 lent.). 26 (39%) mėginiai, kuriuose buvo rastos *gyrA* mutacijos, buvo

fenotipiškai atsparūs OFL, tačiau 5 (7%) mėginiai, fenotipiškai jautrūs OFL, taip pat turėjo *gyrA* geno mutacijas. 29 fenotipiškai jautrių OFL mėginių *gyrA* geno mutacijų neturėjo. 6 (10%) mėginiams, kurie buvo fenotipiškai atsparūs OFL, *gyrA* geno mutacijų nustatyta nebuvo.

14 lentelė. Ryšys tarp fenotipiniu metodu nustatyto jautrumo ir atsparumo FQ ir aptiktų *gyrA* geno mutacijų

Fenotipinis tyrimo rezultatas FQ	Aptiktos <i>gyrA</i> geno mutacijos (mėginių sk.)	<i>gyrA</i> geno mutacijos neaptiktos (mėginių sk.)	Iš viso:
Jautru	5 (7 %)	29 (44 %)	34 (52 %)
Atsparu	26 (39 %)	6 (9 %)	32 (48 %)
Iš viso:	31(46 %)	35 (53%)	66 (100 %)

Iš pateiktų duomenų matyti, kad dažniausiai atsparumą FQ lemia *gyrA* geno mutacijos (26 (39%)). Šie rezultatai sutampa su kitų autorių pateiktais rezultatais. Yuan X. ir kt. (2012) teigia, kad fenotipinį atsparumą labiausiai lemia *gyrA* geno mutacijos. Tačiau nustatyta, kad atsparumą FQ gali lemti ir *gyrB* geno mutacijos. Iš autoriaus tirtų 97 *M. tuberculosis* padermių, 82,1% FQ atsparių mikobakterijų padermių buvo nustatytos *gyrA* geno mutacijos. Tik 5,1 % izoliatų buvo nustatytos mutacijos *gyrB* gene. Yuan X. ir kt. teigia, kad *gyrB* geno mutacijos yra mažiau paplitusios nei *gyrA* geno mutacijos [24]. Savo tyrime, *gyrB* geno mutacijų nustatyti negalėjome dėl rinkinyje naudoto fiksuoto genų-taikinių skaičiaus.

Idomu tai, kad mūsų tyrime 6 (10%) mėginiams, kuriems buvo nustatytas fenotipinis atsparumas OFL, *gyrA* geno mutacijos nebuvo rastos. Kumari R. ir bendraautorių (2017) atlikti tyrimai parodė, kad OFL atsparios padermės ne visada turi *gyrA* geno mutacijas. Autoriai teigia, kad atsparumą FQ gali sąlygoti *gyrB* geno mutacijos arba mutacijos, esančios kituose *gyrA* geno kodonuose [28]. Šie mūsų tyrimo duomenys parodo, kad molekulinio metodu neaptikus mutacijų dar negalima teigti, kad tiriamą bakterijų padermę yra jautri vaistui, kadangi dalis TM padermių *gyrA* geno mutacijų gali ir neturėti. Dėl šios priežasties fenotipinis metodas yra patikimesnis.

Molina-Moya ir kt. (2015) autorių duomenimis, egzistuoja papildomi mechanizmai, lemiantys pačios bakterijos apsisaugojimą nuo poveikio FQ. Atsparumą FQ gali lemti sumažėjęs bakterijų sienelės pralaidumas vaistams, padidėjusi ląstelės sienelės išmetimo siurblių veikla, vaistų sulaikymas, izoliavimas ar jų neutralizavimas [34].

Remiantis mokslinėje literatūroje pateiktais duomenimis, nustatytas ryšys tarp *gyrA* geno mutacijų ir skirtingo atsparumo lygio FQ. Kambli ir kt. (2015) savo tyrime parodė, kad tam tikrų *gyrA* geno kodonų mutacijos gali koreliuoti su skirtingomis mažiausiomis slopinančiomis vaisto koncentracijomis, kurios gali lemti žemo, vidutinio ir aukšto lygio atsparumą FQ [29; 27]. Šie duomenys iš dalies gali paaiškinti, kodėl mūsų tyrime buvo gauti 5 (7%) mėginiai, fenotipiškai jautrūs OFL, tačiau juose buvo aptiktos *gyrA* geno mutacijos. Gali būti, kad mūsų nustatytos *gyrA* geno mutacijos lėmė žemo lygio atsparumą FQ, kurio nebuvo įmanoma nustatyti Bactec MGIT metodu.

Vienas iš mūsų naudoto molekulinio metodo apribojimų buvo tai, kad Anyplex II MTB/XDR rinkiniu techniškai nebuvo įmanoma nustatyti tikslias mutacijas, t. y., *rrs* geno mutacijos A1401G/G1484T buvo nustatomos kartu, taip pat ir *eis* geno promotoriaus mutacijos (-37(T), -14(T), -10(A)). Tai reiškia, kad nustačius bent vieną mutaciją, suminė rezultato išraiška buvo „atsparu“, nors, galbūt, mutacijų kituose kodonuose ir nebuvo.

Ištyrus 66 *M. tuberculosis* padermes TL-PGR metodu, 29 (44%) mėginiuose buvo aptiktos *eis* geno promotoriaus mutacijos: 17 (26%) mėginių, kurie buvo fenotipiškai atsparūs aminoglikozidams (AMK, KAN) ir 12 (18%) mėginių, kurie buvo jautrūs AMK ir KAN (15 lent.). 27 (41%) mėginiai, kurie buvo jautrūs aminoglikozidams, mutacijų neturėjo. 10 (15%) tirtų mikobakterijų padermų, kurios buvo fenotipiškai atsparios aminoglikozidams, *eis* geno promotoriaus mutacijų nustatyta nebuvo.

15 lentelė. Ryšys tarp fenotipiniu metodu nustatyto jautrumo ir atsparumo aminoglikozidams (AMK, KAN) ir aptiktų *eis* geno promotoriaus mutacijų

Fenotipinis tyrimo rezultatas aminoglikozidams (AMK, KAN)	Aptiktos <i>eis</i> geno promotoriaus mutacijos(mėginių sk.)	Neaptiktos <i>eis</i> geno promotoriaus mutacijos (mėginių sk.)	Iš viso:
Jautru	12 (18%)	27 (41%)	39 (59%)
Atsparu	17 (26%)	10 (15%)	27 (41%)
Iš viso	29 (44%)	37 (56%)	66(100%)

Mokslinėje literatūroje skelbtuose tyrimuose nurodoma, kad nėra aišku kuri *eis* promotoriaus mutacija susijusi su atsparumu KAN ir/arba AMK. Manoma, kad mutacijos *eis* geno promotoriuje nėra susijusios su atsparumu KAN. Georghiou ir kt. parodė, kad G-10A ir C-14T mutacijos *eis* promotoriaus regione susijusios su atsparumu KAN. Taip pat kitų mokslininkų tyrimuose G-10A ir

C-12T mutacijos dažnai buvo aptinkamos bakterijose, kurios atsparios KAN. Tačiau iki galo nėra aišku ar C-14T mutacija susijusi su atsparumu KAN. Manoma, kad C-14T mutacija specifiškai susijusi su atsparumu AMK. Taip pat šios mutacijos gali lemti žemo lygio atsparumą aminoglikozidams [34]. Sawajassatakul A. ir kt. (2014) nustatė kitas *eis* promotoriaus mutacijas, kurios gali būti susijusios su aukšto lygio atsparumu KAN ir žemo lygio atsparumu AMK (G-6T, G-10A, C-12T, A-13G ir C-15A) [47].

16 lentelėje yra pateikiamas ryšys tarp *rrs* geno mutacijų ir fenotipinio atsparumo aminoglikozidams. Tirtuose 66 mėginiuose, buvo nustatytos tik 6 (9%) *rrs* geno (A1401G/G1484T) mutacijos. Ši mutacija buvo aptikta 5 (8%) mėginiuose, kurie fenotipiškai atsparūs aminoglikozidams (AMK, KAN). 1 (1%) mėginyje, kuris buvo fenotipiškai jautrus, buvo rasta mutacija. *rrs* geno (A1401G/G1484T) mutacijos nebuvo aptiktos 38 (58%) fenotipiškai jautriuose ir 22 (33%) fenotipiškai atspariuose mėginiuose.

16 lentelė. Ryšys tarp fenotipiniu metodu nustatyto jautrumo ir atsparumo aminoglikozidams (AMK, KAN) ir aptiktų *rrs* geno (A1401G/G1484T) mutacijų

Fenotipinis tyrimo rezultatas aminoglikozidams (AMK, KAN)	Aptiktos <i>rrs</i> geno (A1401G/G1484T) mutacijos (mėginių sk.)	Neaptiktos <i>rrs</i> geno mutacijos (mėginių sk.)	Iš viso:
Jautru	1(1%)	38 (58%)	39 (59%)
Atsparu	5 (8%)	22 (33%)	27 (41%)
Iš viso	6 (9%)	60 (91%)	66 (100%)

Manoma, kad *rrs* geno G1484T kodono mutacijos gali būti susijusios su atsparumu aminoglikozidams. Kadangi šių mutacijų paplitimas yra labai mažas, rekomenduojama molekuliniams metodams kaip taikinius naudoti *rrs* geno 1402 ir 1401 kodonus. Chrakavorti ir kt. savo tyrime aptiko stiprią koreliaciją tarp *rrs* A1401G mutacijų ir aukšto lygio atsparumo AMK ir KAN [9].

J. Clint (2012 m.) tyrime TM, turinčios C1402T mutacijas, buvo jautrios AMK, bet atsparios KAN. Atlikus papildomą jautrumo vaistams tyrimą, buvo nustatytas jautrumas KAN. Tai gali sąlygoti nepilnas kryžminis atsparumas tarp AMK ir KAN bei bakterijų heterorezistentiškumas [9]. Heterorezistentiškumas apibrėžiamas kaip dviejų, vaistams atsparių ir vaistams jautrių, bakterijų

populiacijų buvimas (augimas) vienoje kultūroje. Heterorezistentiškumo fenomenas dažnai sutinkamas tarp *M. tuberculosis* padermių, išskirtų iš pacientų, kurie buvo jau anksčiau gydyti nuo TB [29]. Mūsų tyrime naudoto Anyplex II MTB/XDR rinkinio pagalba heterorezistentiškumo nustatyti nebuvo įmanoma, jis gali būti aptiktas taikant TM padermių DNR sekoskaitą ar zonų hibridizaciją [34].

Yuan X. ir kt. (2012 m.) savo tyrime aptiko C1402T mutacijas KAN, AMK ir KAP atspariose padermėse. Tačiau G1484T C1402T mutacijos, kurios susijusios su atsparumu AMK nebuvo aptiktos. A1401G mutacijos reikšmė atsparumui AMK nebuvo įrodyta. Tai rodo, kad egzistuoja kiti atsparumo mechanizmai AMK. Gali būti, kad atsparios padermės turi pokyčius kituose geno lokusuose, pvz., *tlyA* (atsparumas KAP) ar *eis* promotoriaus regione, kuris lemia žemo lygio atsparumą KAN [24].

Iš 66 analizuojamų, 7 mėginiuose, kurie fenotipiškai buvo atsparūs KAN, bet jautrūs AMK ir KAP, buvo aptiktos *eis* geno promotoriaus mutacijos. 2 mėginiai, kurie nustatyti kaip atsparūs AMK, KAN ir KAP, taip pat turėjo šią mutaciją. *eis* promotoriaus mutacija buvo aptikta 3 mėginiuose, kurie buvo atsparūs AMK ir KAN, bet jautrūs KAP ir 3 mėginiai, kurie jautrūs AMK, bet atsparūs KAN, turėjo *eis* promotoriaus mutacijas. Šiems mėginiams nebuvo atliktas fenotipinis jautrumo tyrimas KAP. *eis* promotoriaus mutacijos nebuvo aptiktos mėginiuose, kurie buvo atsparūs tik AMK ir mėginiuose, kurie atsparūs AMK ir KAN, ir neatliktas jautrumo tyrimas KAP.

Apibendrinant galima teigti, kad TM, turinčios mutacijas *eis* promotoriuje yra tikrai atsparios KAN, o TM, turinčios *rrs* geno A1401G/G1484T mutacijas, yra atsparios KAN ir AMK.

Tiriant fenotipiniu metodu, iš 38 tirtų mėginių, 5 (13,2 %) buvo nustatytas atsparumas KAP. Tačiau C1402T mutacija, kuri susijusi su atsparumu KAP, Anyplex II MTB/XDR rinkiniu aptikta nebuvo. Sawajassatakul A. ir kt. (2014) savo atliktuose tyrimuose nustatė dvi *tlyA* geno mutacijas (T539G ir Ins49GC), kurios galėjo suteikti atsparumą KAP [47]. Neatmetame tikimybės, kad mūsų tyrime atsparios padermės taip pat galėjo turėti ne C1402T, o kitas mutacijas.

Dabartiniu metu nėra nustatyta tinkamų universalių biožymenų, kuriais būtų galima patikimai nustatyti genetinį atsparumą KAN ir AMK. Žinoma, kad 15-20% *M. tuberculosis* padermių neturi *rrs* geno ir *eis* promotoriaus mutacijų. Neseniai atliktos studijos parodė galimą ryšį tarp *thexhB7* geno mutacijų ir atsparumo KAN. Kai kurie tyrimai rodo, kad *PPE60* ir *Rv3186* genai gali būti susiję su atsparumu KAN. Tolesni tyrimai yra būtini patvirtinti šių genų mutacijų įtaką atsparumui KAN [9].

Atliekant TL-PGR, lydimosi kreivės nustatomos kai yra aptinkamos mutacijos. Vis dėlto, lydimosi kreivės gali atsirasti ir dėl nepavykusios taikinio sekų amplifikacijos. Todėl gali būti gaunami klaidingai jautrūs rezultatai [34]. Visada išlieka tikimybė jautrius mėginius užteršti

atspariomis KAN ir AMK padermėmis. Tai gali turėti įtakos fenotipinių ir molekulinį rezultatų nesuderinamumui [9].

Jei įtariama DAV TB ir YVA TB, nustatomas atsparumas FQ ar bet kuriam antros eilės injekciniam vaistui, šie rezultatai turėtų būti patvirtinami klasikiniiais fenotipiniais tyrimais. Viso genomo sekoskaitos tyrimai, ypač tų vaistams atsparių bakterijų, kur nėra žinomos mutacijos, gali padėti nustatyti naujas mutacijas, kurios susijusios su atsparumu vaistams [34].

Maksimalus metodo jautrumas gali būti pasiekiamas tiriant kitas galimas mutacijas, susijusias su atsparumu FQ ir injekciniams vaistams (AMK, KAN, KAP), tačiau *gyrB* geno mutacijos buvo mažai tiriamos. Keli mokslininkai savo tyrimuose pranešė apie galimas dvigubas *gyrA* ir *gyrB* mutacijas [28].

Nors kai kurių genų mutacijos aiškiai susijusios su TM atsparumu vaistams, yra dar daugybę nežinomų mutacijų, kurios turi įtakos mikobakterijų atsparumui vaistams. Klinikiniu požiūriu yra labai svarbu turėti diagnostines priemones, kuriomis būtų lengva naudotis, jos būtų nebrangios ir tiksliai nustatytų vaistams atsparią TB. Platesnės žinios apie vaistų atsparumo mechanizmus, leistu kurti efektyvesnius antituberkuliozinius vaistus [44].

Apibendrinant galima teigti, kad *M. tuberculosis* atsparumo vaistams mechanizmai yra sudėtingi ir dar ne iki galo ištirti. Molekuliniai tyrimai gali nustatyti mutacijas, įtakojančias bakterijų atsparumą vaistams, tačiau tik taikant kelis tyrimo metodus galima patikimai nustatyti atsparumą vaistams. Vis dėlto, molekuliniai diagnostiniai tyrimai dar negali pakeisti fenotipinių nustatymo metodų.

Išvados

1. Ištyrus 66 mėginius TL-PGR metodu nustatyta, kad beveik pusę mėginių buvo atsparūs FQ ir aminoglikozidams (AMK, KAN). KAP atsparių mikobakterijų nustatyta nebuvo. TL-PGR metodo jautrumas FQ yra 81%, o specifiškumas - 86%. Jautrumas aminoglikozidams - 81%, specifiškumas – 67%. Nustatyta metodo teigiama prognozinė vertė FQ – 84 %, aminoglikozidams - 63%. Neigiama prognozinė vertė FQ yra 83%, o aminoglikozidams - 84%.
2. Naudojant Anyplex II MTB/XDR rinkinį 66 pacientų TM izoliatuose daugiausiai buvo aptikta *gyrA* geno ir *eis* geno promotoriaus mutacijų: 31 (47 %) ir 29 (44%) atitinkamai. Mažiausiai aptikta *rrs* (A1401G/G1484T) genų mutacijų, tik 6 (9%) mėginiuose. C1402T mutacija, susijusi su atsparumu KAP, Anyplex II MTB/XDR rinkiniu aptikta nebuvo.
3. Palyginus fenotipiniu ir TL-PGR metodu gautus tyrimo rezultatus nustatyta, kad abiejų metodų rezultatų sutapimas yra geresnis tiriant atsparumą FQ (kappa – 0,67), tiriant atsparumą aminoglikozidams šių dviejų metodų rezultatų sutapimas yra prastesnis (kappa – 0,47).
4. AnyplexTMII MTB/XDR rinkiniu galima nustatyti mutacijas, kurios lemia *M. tuberculosis* atsparumą antros eilės antimikobakteriniams vaistams. Naujas tyrimo metodas greitas ir pakankamai jautrus, tačiau dėl riboto genų-taikinių skaičius ir žemo specifiškumo, jo naudojimas klinikinėje praktikoje abejotinas. Gauti tyrimų rezultatai turi būti patvirtinti klasikiniu fenotipiniu metodu.

SUMMARY

Comparative Analysis of Mutations Associated with Resistance to Anti-tuberculosis Drugs in *Mycobacterium Tuberculosis* Isolates

Authors of Master's degree scientific research work: **Vaida Baliutytė**

Head of Master's degree scientific research work: **Dr Silvija Kiveryte**

Consultant of Master's degree scientific research work: **Edita Vasiliauskienė**

Vilnius 2017

The aim of the Thesis: Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* resistance to second line anti-tuberculosis drugs and associated gene mutations, tested by Anyplex TM^{II} MTB/XDR assay. Assessment was based on relative analysis to results of phenotypic methods.

Materials and methods. Study was conducted in 2016-2017 at Vilnius University Hospital Santaros Hospital Center of Laboratory Medicine Tuberculosis Laboratory and Microbiology Laboratory. 66 *M. tuberculosis* strains isolated from Lithuanian patients pulmonary sputum samples were used in the study. All strains were examined using phenotypic drug susceptibility testing to second line anti-tuberculosis drugs with following genomic DNA extraction. Drug-resistance and associated gene mutations detected by RT-PGR at molecular diagnostic laboratory.

Results and conclusions. RT-PCR analysis showed that almost half of the samples were resistant to fluoroquinolones and aminoglycosides (AMK, KAN). KAP-resistant mycobacteria were not identified. RT-PCR sensitivity to fluoroquinolone was 81%, specificity - 86%. Sensitivity to aminoglycosides - 81%, specificity - 67%. *gyrA* gene was detected in majority 31 (47%) isolates and *eis* gene promoter mutations in 29 (44%) isolates. *rrs* (A1401G/G1484T) gene mutation were identified in 6 (9%) isolates. C1402T mutation was not detected. A comparison of phenotypic and RT-PCR showed good results for FQ resistance results, however specificity to aminoglycosides (AMK, KAN) were suboptimal. In conclusion, the new assay showed good results, however due to the limited number of gene-target specificity were lower, so its use in clinical practice is uncertain. The obtained results must be confirmed by classical phenotypic method.

Keywords: *M. tuberculosis*, Anyplex TM^{II}MTB/XDR, mutations, resistance

Padėka

Esu dėkinga savo darbo vadovei Dr. S. Kiverytei už vertingus pasiūlymus ir konsultacijas mokslinio darbo metu.

Taip pat labai noriu padėkoti Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centro Tuberkuliozės tyrimų laboratorijos vedėjai E. Vasiliauskienei už visapusišką pagalbą, vertingus patarimus ruošiant baigiamąjį darbą ir kantrybę.

Dėkoju Dr. Astai Križanauskienei už pagalbą ir patarimus.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Anyplex™ II MTB/XDR Detection manual (Cat. No. TB7302Y) 2017;
2. Aidsmap prieiga internetu:
http://images.aidsmap.com/v634655271881100000/file/1052053/resize/w524~r0~f0/187_03.png
3. BACTEC MGIT 960 M. tuberculosis detection system manual, L000180JAA(01)
4. Bactec MGIT 960 prieiga internetu: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=18278>
5. Bacteria in photos prieiga internetu:
<http://www.bacteriainphotos.com/Mycobacterium%20tuberculosis.html>
6. Brennan P.J. „Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*“, Department of Microbiology, Colorado State University, Fort Collins, CO 80523, USA, Tuberculosis (2003) 83, 91-97
7. Caulfield A., Wegenack L. „Diagnosis of active tuberculosis disease: From microscopy to molecular techniques“. Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases 4. 2016 (33-43)
8. Causse M., Ruiz P., Gutierrez J. B., Vaquero M., Casal M., „New Anyplex II MTB/MDR/XDR kit for detection of resistance mutations in *M.tuberculosis* cultures“, INT J TUBERC LUNG DIS 2015 19(12):1542-1546
9. Chajravorty S., Lee Seok J, Cho Jin E., and et al. „Genotypic Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates for Amikacin and Kanamycin Resistance by Use of Rapid Sloppy Molecular Beacon-Based Assay Identifies More Cases of Low-Level Drug Resistance than Phenotypic Lowenstein-Jensen Testing“, Journal of Clinical Microbiology, 2015 Vol 53, Nr1
10. Danila E, Zablockis R, Gruslys V ir kt. Klinikinė pulmonologija (IV leidimas). Vaistų žinios, Vilnius, 2015, p 989.
11. Dongyou Liu, “Molecular detection of Human Bacterial Pathogens”, CRC Press, 2011 6
12. Drug-resistant TB:XDR-TB FAQ prieiga internetu: <http://www.who.int/tb/areas-of-work/drug-resistant-tb/xdr-tb-faq/en/>
13. Extensively Drug-Resistant Tuberculosis (XDR TB), prieiga internetu:
<https://www.cdc.gov/tb/publications/factsheets/drtb/xdrtb.htm>
14. First-and Second –Line drugs and Drug Resistance, prieiga internetu: prieiga internetu:
<https://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/43723.pdf>

15. Frequently asked question on Xpert MTB/RIF assay, prieiga internetu:
http://www.who.int/tb/laboratory/xpert_faqs.pdf
16. Georhiou B.S., Magana M., Garfein R., Catanzaro D., Catanzaro A., Rodwell T. “Evaluation of Genetic Mutations Associated with Mycobacterium tuberculosis Resistance to Amikacin, Kanamycin and Capreomycin: A systematic Review”, PlosOne. 2012. Vol 7, e33275
17. Global Tuberculosis report 2016, prieiga internetu:
<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250441/1/9789241565394-eng.pdf?ua=1>
18. Govender S., Plessis S. P., M van de Venter, Hayes C. „Antibiotic Susceptibility of Multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* using Flow Cytometry“, Medical Technology SA. 2010 Volume 24 No. 2;
19. Hain lifescience prieiga internetu: <http://www.hain-lifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/tuberculosis/genotype-mtbdplus.html>
20. Heemskerk D., Caws M., Maris B., “Tuberculosis in Adults and Children“. Springer Briefs in Public Health. 2015. ISBN 978-3-319-19132-4
21. Hoagland T. D., Liu J., Lee R. B., Lee E. R., New agents for the treatment of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, Advanced Drug Delivery Reviews 2016, ADR-12983, No 18
22. Yang, X., Dubnau, E., Smith, I. & Sampson, N. S. Rv1106c from *Mycobacterium tuberculosis* is a 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase. Biochemistry (N. Y.) 2007, 46, 9058
23. Issar S., „*Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence“, Clinical Microbiology Reviews, July 2003, p 463-496
24. Yuan X., Zhang T., Kawakami K., and et. al., “Molecular Characterization of Multidrug and Extensively Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains in Jiangxi, China.”, Journal of Clinical Microbiology, 2012, Vol 50, p. 2404-2413
25. Yuan X., Zhang T., Kawakami K., and et. al. “Molecular Characterization of Multidrug and Extensively Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains in Jiangxi, China“. Journal of Clinical Microbiology. 2012.p No. 7. 20101-2413
26. Kambli P., Ajbani K., Nikam C., Sadni M. and et. al., Correlating *rrs* and *eis* promoter mutations in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* with phenotypic susceptibility levels to the second line injectables”. HHS Public Access, Author manuscript. 2016; 5(1): 1-6
27. Kambli P., Ajbani K., Sadani M and et al. “Correlating Minimum Inhibitory Concentrations of ofloxacin and moxifloxacin with *gyrA* mutations using the Genotype MTBDRsl Assay”, HHS Public Access, 2015, 95(2); 137-141

28. Kumari R., Banerjee T., Anupurba S. "Molecular detection of drug resistance to ofloxacin and kanamycin in *Mycobacterium tuberculosis* by using multiplex allele-specific PCR", *Journal of Infection and Public Health*, 2017
29. Machado D., Coelho S. T., Perdigao J. and et al., "Interplay between mutations and efflux in drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates", *Frontiers in Microbiology*, 2016
30. Madhurar P., Marcel A. Behr, Dawdy D., Dheda K., Divangahi M., Catharina C. Boehme, Ginsberg A., Swaminathan S., Spigelman M., Getahun H., Menzies D., Raviglione M. "Tuberculosis", *Nature Reviews Disease Primer* 2. 2016 :16076
31. Merza M., Masjedi R. M. „Extensively drug-resistant tuberculosis (XDR) and extremely drug-resistant tuberculosis (XXDR): risk factors and molecular perspectives“. *Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases*. 2010;5(3):174-188;
32. Microbe online prieiga internetu: <http://microbeonline.com/wp-content/uploads/2016/01/GeneXpert-box.jpg>
33. Miotto P., Saleri N., Dembele M., Ouedraogo M., Badoum G., Pinsi G., Migliori G., Matteelli A., Cirillo M. Molecular detection of rifampin and isoniazid resistance to guide chronic TB patient management in Burkina Faso. *BMC Infection Diseases*. 2009. 9:142
34. Molina-Moya B, Lacombe A., Prat C. and et.al., "Diagnostic accuracy study of multiplex PCR for detecting tuberculosis drug resistance", *Journal of Infection* 2015, 71,220-230
35. Murray P. R., Baron J. E., Jorgensen J. H., Landry L. M., Pfaller M. A., „Manual of Clinical Microbiology, 9th Edition“, Washington, DC: ASM Press, 2007, 2488 pp.
36. Nguyen L. "Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis*: an update". *Arch Toxicol* 2016, 90:1585-1604
37. Palomino J. C., Martin A. „Drug resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*“. *Antibiotics* 2014, 3, 317-340;
38. Peter T., Richardson M., Donegan S., Warren R., Steigart KR., Dheda K. „The diagnostic accuracy of the GenoType MTBDRsl assay for the detection of resistance to second –line anti-tuberculosis drug“. *The Cochrane Library* 2014. Issue 10
39. Pimkina E., Zablockis R., Nikolayevskyy V., Danila E., Davidavičienė E. „The Xpert MTB/RIF assay in routine diagnosis of pulmonary tuberculosis: A multicentre study in Lithuania“. *Respiratory Medicine* 109. 2015 (1484-1489).
40. Queiroz A., Riley Lee W., „Bacterial immunostat: *Mycobacterium tuberculosis* lipids and their role in the host immune response“, *Sociedade Brasileira Medicina Tropical* 2017 50(1):9-18

41. Research gate prieiga internetu:
<https://www.researchgate.net/publication/303560156/figure/fig2/AS:366359167946759@1464358240556/The-BACTEC-MGIT-960-instrument-Becton-Dickinson-and-culture-tubes-for-broth-based.png>
42. Santos L. C., „Review: The Molecular basis of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*“. Open Journal of Medical Microbiology, 2012, 2, 24-36;
43. Schlesinger, L. S. 1993. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. J. Immunol. 150:2920–2930
44. Silva P. E., Palomino C. J. “Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs”. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2011; 66: 1417-1430
45. Simeao F. C. S., Chimara E., Oliveira R. S., Yamauchi J. U., Latrilha F. O., Telles M. A. „Cord factor detection and macroscopic evaluation of mycobacterial colonies: an efficient combined screening test for the presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex on solid media“, J Bras Pneumol. 2009;35(12):1212-1216;
46. Singhal R., Reynolds P., Marola J., Jyoti E, Sarin R., Prasad V., Strong M., Salfinger M.” Sequence Analysis of Fluoroquinolone Resistance-Associated Genes *gyrA* and *gyrB* in Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Patients Suspected of Having Multidrug-Resistant Tuberculosis in New Delhi, India”. Journal of Clinical Microbiology. 2016, 54:2298–2305
47. Sowajassatakul A, Prammananan T., Chaiprasert A., Phunpruch S., „Molecular characterization of amikacin, kanamycin and capreomycin resistance in M/XDR-TB strains isolated in Thailand“, BMC Microbiology 2014.14:165
48. Staining Microscopic Specimens, prieiga internetu:
[https://bio.libretexts.org/TextMaps/Map%3A_Microbiology_\(OpenStax\)/02%3A_How_We_See_the_Invisible_World/2.4%3A_Staining_Microscopic_Specimens](https://bio.libretexts.org/TextMaps/Map%3A_Microbiology_(OpenStax)/02%3A_How_We_See_the_Invisible_World/2.4%3A_Staining_Microscopic_Specimens)
49. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2017 prieiga internetu:
http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0020/334703/tuberculosis-surveillance-and-monitoring-in-europe-2017.pdf?ua=1
50. Vitkauskienė A., Skrodenienė E., Pavilonis A.”Tuberkuliozės laboratorinė diagnostika (Metodinės rekomendacijos), Laboratorinė medicina 2010, t. 12, Nr. 4(48);

51. World Health organization. Interneto prieiga <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254712/1/WHO-HTML-TB-2017.01-eng.pdf?ua=1>
52. World Health organization. Interneto prieiga
<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254712/1/WHO-HTML-TB-2017.01-eng.pdf?ua=1>
53. World Health organization. Interneto prieiga: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/tuberculosis/country-work/lithuania>
54. World Health organization. Interneto prieiga: <http://www.who.int/features/qa/08/en/>
55. Zhang D., An J., Wang Y., Pang Y. „Genetic diversity of multidrug-resistant tuberculosis in a resource-limited region of China“, International Journal of Infectious Diseases 29, 2014 7–11;
56. Zhang Y., Yew W. W., „Mechanism of drug resistance in *M. tuberculosis*“. State of the art. INT J Tuberc Lung Dis 2009, 13(11):1320-1330;