

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
BIOMEDICINOS MOKSLŲ INSTITUTO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

**PLAUČIŲ TUBERKULIOZE SERGANČIŲ PACIENTŲ *M.*
TUBERCULOSIS PADERMIŲ KRYŽMINIO ATSPARUMO ANTROS EILĖS
INJEKCIJAMS VAISTAMS ĮVERTINIMAS FENOTIPINIŲ IR PGR METODAIS**

Magistrantė GRETA ŠLIUŽAITĖ _____
(parašas)

Darbo vadovė:
Prof., habil. dr. Zita Aušrelė Kučinskienė _____
(parašas)

Darbo konsultantė:
Edita Vasiliauskienė _____
(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja
dr., doc. Dovilė Karčiauskaitė leidžiama ginti _____
(parašas)

Darbo įteikimo data _____
Registracijos Nr. _____

2018 m., Vilnius

TURINYS

SANTRUMPOS	3
ĮVADAS	5
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI.....	7
I. LITERATŪROS APŽVALGA.....	8
1.1. <i>M. tuberculosis</i> taksonomija ir klasifikacija	8
1.2. Morfologija ir struktūra.....	8
1.3. Tuberkuliozės epidemiologija.....	10
1.4. Tuberkuliozės etiologija, patogenezė ir gydymas.....	12
1.5. Tuberkuliozės laboratorinė diagnostika	13
1.5.1. Mikrobiologiniai ir imunologiniai tyrimai	14
1.5.2. Molekuliniai tyrimai.....	15
1.6. <i>M. tuberculosis</i> genomai.....	16
1.7. <i>M. tuberculosis</i> atsparumas vaistams ir jį lemiantys genai.....	18
II. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI	20
2.1. Tyrimo objektas ir etapai	20
2.2. <i>M. tuberculosis</i> fenotipinio jautrumo antros eilės injekciniams vaistams nustatymas Bactec MGIT 960 sistema.....	20
2.3. <i>M. tuberculosis</i> atsparumo antros eilės vaistams nustatymas PGR metodu	21
2.3.1. DNR išskyrimas	21
2.3.1.1. Bakterijų genomines DNR išskyrimo eiga.....	22
2.3.2. Polimerazės grandininė reakcija	22
2.3.3. PGR produktų atvirkštinė hibridizacija su specifiniais žymenimis	23
2.3.3.1. Atvirkštinės hibridizacijos su specifiniais žymenimis eiga.....	25
2.4. Atvirkštinės hibridizacijos rezultatų vertinimas ir interpretacija.....	26
2.5. Statistinė analizė	29
III. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	30
3.1. Jautrumo vaistams įvertinimas fenotipiniu metodu	30
3.2. PGR metodu gautų rezultatų įvertinimas	32
3.2.1. Atsparumą antibiotikams lemiančios genų mutacijos.....	32
3.3. Fenotipiniu ir PGR metodais gautų rezultatų palyginimas	34

3.4. Rezultatų aptarimas.....	35
3.4.1. Fenotipiniu metodu gautų rezultatų aptarimas	36
3.4.2. PGR metodu nustatyto atsparumo vaistams ir jį lemiančių genų mutacijų aptarimas	37
3.4.3. Kryžminio atsparumo vaistams fenotipiniu ir PGR metodais rezultatų aptarimas.....	39
IŠVADOS.....	41
SANTRAUKA	42
SUMMARY	43
PADĖKA.....	44
LITERATŪROS SĄRAŠAS	45
PRIEDAI.....	53

SANTRUMPOS

- AB – antibiotikai
AG – aminoglikozidai
AMK - amikacinas
BCG – vakcina nuo tuberkuliozės (*lot.* bacillus Calmette-Guérin)
CP - cikliniai peptidai
DNR - deoksiribonukleorūgštis
E – etambutolis
ET - etionamidas
FQ – fluorochinolonas
INH – izoniazidas
KAN – kanamicinas
KAP - kapreomicinas
LTBI - latentinė tuberkuliozės infekcija
MDR TB – daugeliui vaistų atspari tuberkuliozė (*angl.* multidrug-resistant tuberculosis)
MOX - moksifloksacinas
MSK – minimali slopinanti koncentracija
NPV – neigiama prognostinė vertė
OFL - ofloksacinas
PGR – polimerazės grandininė reakcija
pre-XDR TB – ypač vaistams atsparios tuberkuliozės pradinė forma (*angl.* pre-extensively drug-resistant tuberculosis)
PSO – Pasaulio sveikatos organizacija
PZA - pirazinamidas
R – rifampicinas
RAB – rūgščiai atsparios bakterijos
RNR - ribonukleorūgštis
rRNR – ribosominė ribonukleorūgštis
tRNR – transportinė (pernašos) ribonukleorūgštis
S – streptomicinas
TB – tuberkuliozė
TDR TB – visiems vaistams atspari tuberkuliozė (*angl.* totally drug-resistant tuberculosis)
TM – tuberkuliozės mikobakterijos
TPV – teigiama prognostinė vertė
TTL – Tuberkuliozės tyrimų laboratorija

VIO – viomicinas

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

ŽIV - žmogaus imunodeficitu virusas

IVADAS

Tuberkuliozė (TB) vis dar lieka viena iš plačiausiai paplitusių ir sunkiai išgydomų ligų pasaulyje. Per pastaruosius 200 metų nuo TB mirė 1 milijardas žmonių [26]. Kasmet pavojingiausia ligos forma, atvira plaučių TB, suserga daugiau nei 8 mln. gyventojų. Apskaičiuota, kad per 1 min. apytiksliai netenkama 3 gyvybių [25]. Spartų šios infekcinės ligos plitimą sąlygoja daugelis veiksnių, svarbiausi jų yra imunosupresinė būklė, socialinės gyvenimo sąlygos, vis populiarėjanti žmonių migracija [32, 57].

Greita ir tiksli TB diagnostika be galo svarbi siekiant užtikrinti sėkmingą gydymą. Vystantis biomedicinos mokslams, buvo sukurta ne mažai vaistų, galinčių išgydyti ligą. Tačiau dėl netinkamo ar ne laiku nutraukto vaistų vartojimo vystosi mikobakterijų atsparumas antimikrobiniais vaistams, kuris yra pagrindinė grėsmė visuomenei [76]. Vaistams atsparios TB plitimo priežastis yra uždelstas ar net vėlyvas jautrumo antimikrobiniais vaistams įvertinimas, dėl lėto mikobakterijų augimo [59].

Lietuva pagal sergamumą TB yra viena pirmaujančių Europos sąjungos šalių [86]. Naujausiais Europos ligų prevencijos ir kontrolės centro duomenimis, mūsų šalis priskiriama prie 18 Europos šalių, kurios patenka į aukšto sergamumo TB sąrašą. Daugeliui vaistų atsparios tuberkuliozės (MDR TB) paplitimas Lietuvoje apie 6 kartus viršija Europos šalių vidurkį. Mūsų šalis patenka tarp penkių Europos šalių, kuriose užregistruota daugiau, kaip 20% ypač vaistams atsparios tuberkuliozės (XDR TB) atvejų [90]. MDR TB ir XDR TB gydymas - labai bangus, mažiau efektyvus ir toksiškai veikiantis žmogaus organizmą [47].

Pasitelkus molekulinės biologijos žinias, atsirado galimybė *in vitro* greitai nustatyti specifines tuberkuliozės mikobakterijų (TM) genų mutacijas, siejamas su atsparumu vaistui išsivystymu [13, 18]. Taikant greitus molekulinis tyrimus, milijonams žmonių visame pasaulyje pavyksta diagnozuoti ir sėkmingai gydyti TB. Tačiau susiduriama su nauju iššūkiu - plintančiu kryžminiu atsparumu vaistams [50].

Šio darbo tikslas buvo nustatyti kryžminį atsparumą antros eilės leidžiamiesiems vaistams nuo TB. Kryžminio atsparumo vaistams fenomenas sutinkamas vis dažniau, neretai lemia pilną kryžminį atsparumą tarp tos pačios grupės antibiotikų (AB). Tyrimas labai svarbus, siekiant užtikrinti sėkmingą MDR ir XDR TB gydymą. Nustatyta ypač vaistams atsparios tuberkuliozės pradinė forma (pre-XDR TB) yra neteisingo gydymo prognostinis žymuo. Taigi, kryžminio atsparumo AB nustatymas padėtų kliniciams tikslingai parinkti vaistą, koreguoti jo dozę ir sustabdyti vaistams atsparių padermių plitimą [35, 50, 51].

Nepaisant didelės tyrimo praktinės reikšmės, kryžminio atsparumo vaistams mastas vis dar nežinomas [51]. Numatytam tyrimo tikslui pasiekti buvo pasitelktas molekulinis metodas,

skirtas greitai MDR TB ir XDR TB diagnostikai, svarbiausių, mono- ir kryžminį atsparumą AB lemiančių genų identifikavimui. Naudota naujausia GenoType® MTBDR_{sl} (Hain LifeScience, Vokietija) komercinio rinkinio antroji versija. Siekiant atskleisti tyrimo galimybes, įvertinti metodo tikslumą, gauti rezultatai palyginti su „auksinio standarto“ metodu gautais duomenimis.

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas: nustatyti *M. tuberculosis* kryžminį atsparumą injekciniams vaistams nuo tuberkuliozės fenotipiniu ir PGR metodais.

Darbo uždaviniai:

1. Įvertinti *M. tuberculosis* jautrumą antros eilės injekciniams vaistams fenotipiniu metodu.
2. Nustatyti *M. tuberculosis* atsparumą antros eilės antibiotikams PGR metodu. Įvertinti PGR metodo jautrumą ir specifiškumą, apskaičiuoti teigiamą ir neigiamą prognostines vertes.
3. PGR metodu aptikti genų mutacijas, lemiančias atsparumą antros eilės antimikobakteriniams vaistams.
4. Nustatyti ir įvertinti kryžminį atsparumą vaistams fenotipiniu ir PGR metodais.

I. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. *M. tuberculosis* taksonomija ir klasifikacija

Tuberkuliozės (TB) sukėlėjas *Mycobacterium tuberculosis*, 1882 m. atrastas žymaus vokiečių gydytojo, mokslininko Roberto Kocho, priklauso bakterijų karalystei, aktinobakterijų tipui, *Mycobacterium* genčiai, kurią šiuo metu sudaro daugiau nei 170 mikobakterijų rūšių (1 pav.) [7]. Vienos iš jų yra patogeninės, kitos - potencialiai patogeninės žmogui ir gyvūnams. Žmogui TB sukelia *M. tuberculosis* ir kitos *M. tuberculosis* kompleksui priklausančios patogeninės rūšys (*M. bovis* subsp. *bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. bovis* subsp. *caprae*, *M. pinnipedii*, *M. microtii*, *M. mungi*, *M. orygis*), kurios yra panašios savo antigeninėmis savybėmis ir todėl vadinamos tuberkuliozės mikobakterijomis (TM) [27, 87].

Mycobacterium genčiai priklauso ir netuberkuliozinės (atipinės) mikobakterijos. Didžioji jų dauguma yra aplinkos saprofitai, tačiau kai kurios rūšys (*M. intracellulare*, *M. avium*, *M. kansasii* ir kitos) žmogui gali sukelti tiek besimptomės, tiek simptomines įvairių organų (dažniausiai plaučių, odos, minkštųjų audinių) infekcijas, vadinamas mikobakteriozėmis [61, 69].

Mokslinė klasifikacija

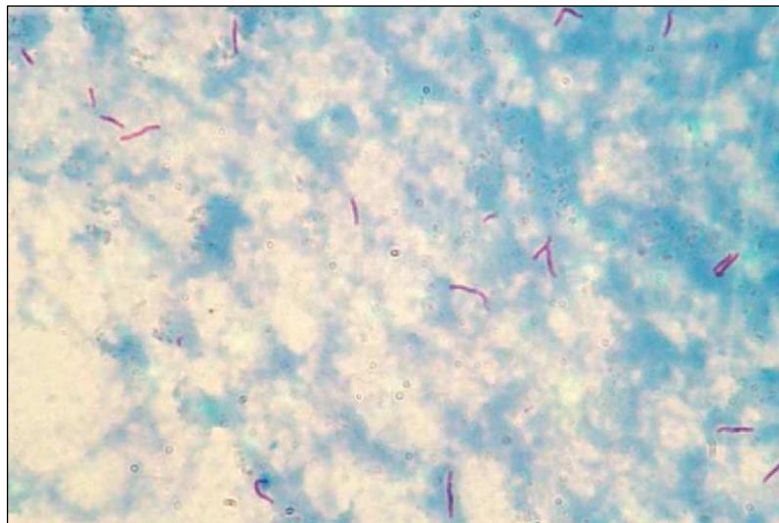
Karalystė:	Bacteria
Tipas:	Actinobacteria
Būrys:	Actinomycetales
Pobūris:	Corynebacterineae
Šeima:	Mycobacteriaceae
Gentis:	<i>Mycobacterium</i>
Kliniškai reikšmingos rūšys:	<i>M. tuberculosis</i> complex, <i>M. leprae</i> , <i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. ulcerans</i> , <i>M. simiae</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. genavense</i> , <i>M. szulgai</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. haemophilum</i> , <i>M. fortuitum</i> complex, <i>M. chelonae</i> , <i>M. abscessus</i> , etc.

1 pav. Mikobakterijų klasifikacija [69]

1.2. Morfologija ir struktūra

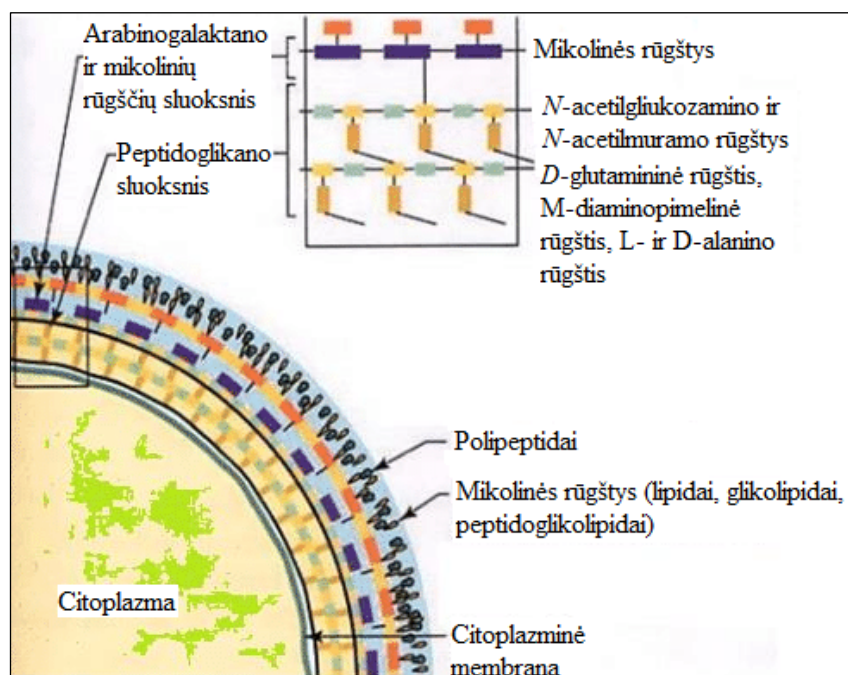
TM – gramneigiami intraląsteliniai mikroorganizmai, galintys daugintis neaktyvintų makrofagų viduje. TM pasižymi dideliu pleomorfiškumu: dažniausiai *M. tuberculosis* ląstelės yra lazdelės formos (apytiksliai nuo 0,2–0,8 μm pločio ir 1–10 μm ilgio), tačiau priklausomai nuo aplinkos sąlygų gali keisti formą ir tapti apvalios (kaip kokai) arba formuoti atšakas (ypač vaistams atsparios formos) (2 pav.). Tai aerobiniai, neformuojantys sporų, neturintys kapsulės, nejudrūs,

nesudarantys vakuolių, grybams ir bakterijoms būdingų savybių turintys mikroorganizmai [7, 42, 61].



2 pav. *M. tuberculosis* mikobakterijų ląstelių forma Cylio-Nilseno būdu dažytame tepinėlyje [40]

TM turi unikalios sudėties, storą ląstelės sienelę, kuri yra labiau hidrofobiška, nei kitų gramteigiamų bakterijų [30]. Ląstelės sienelę (3 pav.) sudaro vidinis ir išorinis sluoksniai, supantys plazminę membraną. Išorinį sluoksnį formuoja lipidai ir baltymai, vidinį - peptidoglikanas (svarbiausias elementas, lemiantis mikobakterijų formą), arabinogalaktanas ir mikolinės rūgštys. Mikolinės rūgštys – tai β hidroksilintos riebiosios rūgštys, sudarytos iš daugybės anglies atomų (nuo 83 iki 93), jos neaptinkamos kitose bakterijose [7]. TM ląstelėse taip pat randami vašikai (riebalų rūgščių ir alkoholio dariniai), veikiantys kaip imunologiniai adjuvantai ir sukeliantys antikūnų produkciją prieš svetimus antigenus [69, 81].



3 pav. Mikobakterijų ląstelės sienelės sandara [52]

Mikobakterijos gana plačiai paplitusios gyvojoje gamtoje – jų randama žmogaus organizme, įvairiuose šiltakraujuose ir šaltakraujuose gyvūnuose, vandenyje, dirvožemyje, ore, augaluose. Dauguma mikobakterijų rūšių prisitaikiusios augti ant paprasto substrato, naudojant amoniaką ar aminorūgštis kaip azoto šaltinį, ir glicerolį, kaip anglies šaltinį, gautą iš mineralinių druskų. Nors *M. tuberculosis* yra prototrofinis mikroorganizmas, sugebantis pats pasigaminti visus pagrindinius komponentus iš anglies ir azoto atsargų, tačiau kitos mikobakterijų rūšys gali būti heterotrofais – anglį gauna iš susintetintų organinių medžiagų [7].

M. tuberculosis geba prisitaikyti prie įvairių aplinkos veiksnių (karščio, šalčio, išdžiūvimo), maisto medžiagų trūkumo, hipoksijos, temperatūros ir pH pokyčių, druskingumo ir kitų stresą keliančių sąlygų. TM labai atsparios rūgštims, šarmams, alkoholiams ir kitoms cheminėms medžiagoms [81].

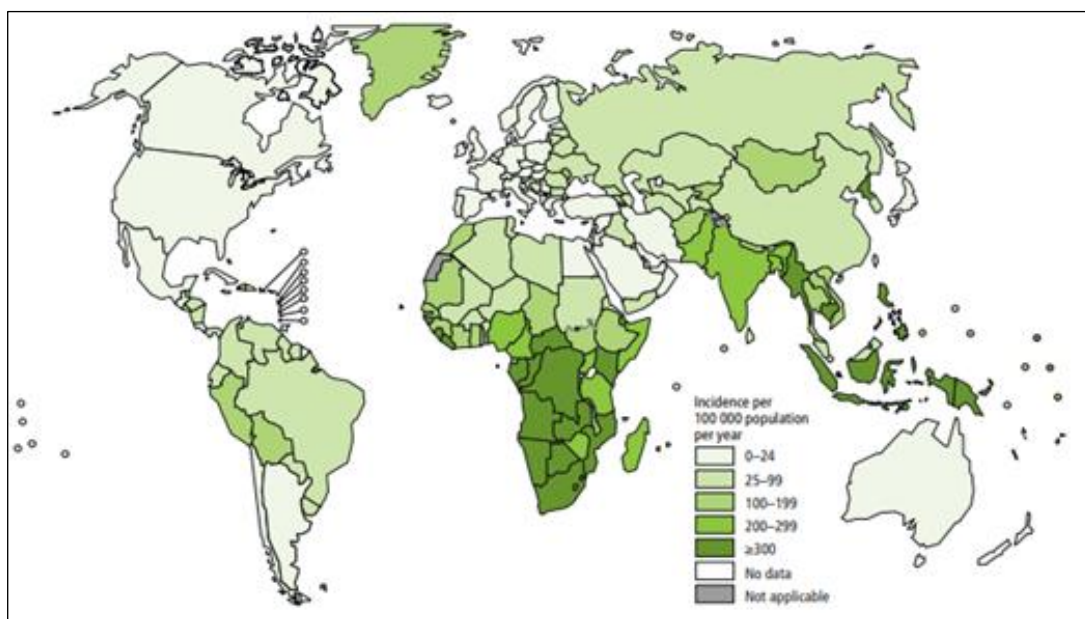
Mikobakterijų augimo temperatūra varijuoja gana plačiai nuo 23°C iki 50°C, ir priklauso nuo rūšies. *M. tuberculosis* augimui palanki 37°C temperatūra, bakterijos dalinasi labai lėtai – vienos ląstelės generacijos laikas apima apie 24 valandas [39, 61, 69].

1.3. Tuberkuliozės epidemiologija

TB – tai lėtinė infekcinė, užkrečiama liga, kurią sukelia TM, galinti pažeisti visus žmogaus organus ir sistemas, tačiau dažniausiai pažeidžianti kvėpavimo sistemą [24].

TB išlieka viena labiausiai paplitusių infekcinių ligų pasaulyje. Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) duomenimis, 2016 m. pasaulyje diagnozuota ~10,4 mln. TB atvejų. Didžiausias sergamumas TB (56%) nustatytas Indijoje, Indonezijoje, Kinijoje, Filipinuose, Pakistane, Pietryčių Azijoje registruota ~45% TB susirgimų, Afrikoje – 25%, Ramiojo vandenyno skalaujamose šalyse ~17%, rytų Viduržemio zonoje – 7%, Europoje ir Amerikoje - 3% [3, 26, 42].

Ekonomiškai stipriose valstybėse sergamumas TB 2016 m. sudarė mažiau, kaip 10 atv./100 000 gyv. Šalyse, kuriose TB atvejų skaičius vienas iš didžiausių, skaičiuojama 150-300 atv./100 000 gyv., pvz., daugiau kaip 500 atv./100 000 gyv. nustatyta Šiaurės Korėjoje, Mozambiko respublikoje, Filipinuose ir Pietų Afrikoje (4 pav.) [3]. Europos sąjungos šalyse ir Europos ekonominėje zonoje 2007-2013 m. stebėtas sergamumo TB mažėjimas 16,8 atv./100 000 gyv. ir 12,7 atv./100 000 gyv., atitinkamai [43]. 2016 m. pasaulyje registruota apytiksliai 6,3 mln. naujų TB atvejų, kai 2015 m. naujų atvejų buvo 6,1 mln. [3]. Kasmet nustatoma ~1,5 mln. mirčių nuo TB, kiekvieną minutę nuo šios ligos pasaulyje miršta 3 žmonės [25].



4 pav. Sergamumas TB pasaulyje 2016 metais [3]

Stengiantis pažaboti TB plitimą, taikomas gydymas antimikobakteriniais vaistais. Tačiau susiduriama su kita aktualia problema - labai sparčiai plintančiu TM atsparumu vaistams. 2016 m. registruota ~600 000 pacientų, kurių TM - atsparios rifampicinui (R) arba yra nustatytas dauginis atsparumas vaistams (MDR TB) [83].

MDR TB skaičius Europoje taip pat dramatiškai auga. Nuo 2011 iki 2016 m. Europos šalyse stebėtas reikšmingas MDR TB atvejų augimas, 33-73%, atitinkamai [90]. PSO duomenimis, daugiau nei 97% TB atvejų Rytų Europoje nustatomi kaip MDR TB. Ypatingai daug MDR TB diagnozuojama Baltijos šalyse [20, 33]. 2016 m. nustatyta 7,6% MDR TB atvejų Latvijoje, 13,3% - Lietuvoje, kai vidutiniškai Europos šalyse siekė 2,4% [90]. Dar sunkiau pagydoma ypač vaistams atspari tuberkuliozė (XDR TB) Rytų Europoje sudaro ~9% vaistams atsparios TB atvejų. Mirtingumas nuo TB Europos sąjungos šalyse yra mažesnis, nei 1 atv./100 000 gyv. [1].

Didžiulė rizika MDR TB ir XDR TB plitimui sukeliama, sergant žmogaus imunodeficitu virusu (ŽIV) [24]. ŽIV infekuoti asmenys yra labai jautrūs TB, o Rytų Europa pasižymi greičiausiai augančiu ŽIV infekcijų skaičiumi visame pasaulyje. Kiti rizikos veiksniai glaudžiai siejami su socialinėmis sąlygomis, žmonių migracija [1].

Lietuvoje TB problema yra labai aktuali. Vertinant sergamumą TB, mūsų šalis - viena iš pirmaujančių tarp Europos sąjungos šalių. 2016 m. duomenimis, Lietuvoje per metus TB nustatomi 49,9 TB atv./100 000 gyv., iš viso diagnozuota 1442 TB atvejų (2015 m. nustatyti 1507 atvejai) [86, 90]. MDR TB skaičius Lietuvoje nuo 2009 m. lieka stabilus, tačiau išlieka nepriimtinais didelis. 2016 m. Lietuvoje nustatyta tiek mažiau MDR TB atvejų lyginant su 2015 m. duomenimis (244 ir 241 atvejų, atitinkamai) [3, 31, 86]. Šalyje mirusiųjų skaičius dėl kvėpavimo organų TB 2016 m. siekė 4,99 atv./100 000 gyv. [31].

1.4. Tuberkuliozės etiologija, patogenezė ir gydymas

Manoma, kad TM yra vienos seniausių bakterijų grupių žemėje, kurių ištakos – Afrikos žemynas. Vykstant migracijai, šios bakterijos išplito į kitus žemynus. Dėl spartaus plitimo XX a. pradžioje TB tapo viena iš pagrindinių mirties priežasčių [27, 66].

TM plinta aerozolių pagalba, oro lašeliniu būdu [66]. Patekusios į apatinius kvėpavimo takus yra fagocituojamos alveolinių makrofagų. Jei TM nesunaikinamos, jas makrofagai perneša per alveolių epitelį į plaučių parenchimą. Infekuotos dendritinės ląstelės mikobakterijas transportuoja į limfmazgius, čia su mikobakterijomis sąveikauja T limfocitai. *M. tuberculosis* antigenai pateikiami B limfocitams. Plaučių parenchimoje formuojasi inkapsuluota granuloma, kuriai trūkus, patogenai gali išplisti po visą organizmą [24, 32, 57, 61]. Visgi į svetimkūnį reaguoja organizmo apsauginė sistema, todėl TB suserga ne kiekvienas žmogus [66].

Dažniausiai (~90%) stebima latentinė tuberkuliozės infekcija (LTBI). Ši būklė - besimptomė, neužkrečiama, ligos sukėlėjas yra žmogaus organizme, granulomoje, tačiau imuninė sistema geba apsaugoti šeimininką nuo patogeno. Nusilpus imunitetui, išlieka didelė reaktyvacijos grėsmė (5-10% rizika). TM gali suaktyvėti, ir latentinė TB gali pereiti į aktyvią TB formą. Didžiausia grėsmė pirmais, antrais metais po užsikrėtimo TM. Pasaulyje vienas trečdalis žmonių populiacijos turi LTBI [24, 57, 66, 89].

Epidemiologiniu požiūriu, pati pavojingiausia yra atvira plaučių TB, kai suirus granulomai, TM patenka į kvėpavimo takus, ir kosint, čiaudint išskiriamos į aplinką [57]. Šeimininko apsauginiai mechanizmai nepajėgia kovoti su TM, jos dauginasi ir plinta. Aktyvios TB atveju gali pasireikšti tokie simptomai kaip karščiavimas, drebulys, naktinis prakaitavimas, svorio netekimas, kosulys, skrepliavimas, atkosėjimas krauju [55, 67].

Per du dešimtmečius nuo streptomicino (S) išradimo 1943 m. iki rifampicino (R) išradimo 1963-aisiais išgydyti TB buvo lengva, nes per šį laikotarpį buvo išrasti beveik visi vaistai nuo TB. Per tuos metus nustatyti esminiai TB gydymo principai, kurie galioja ir šiandien: 1) skiriami vaistų deriniai, siekiant išvengti vaistams atsparių TM susidarymo; 2) pakankamai ilga gydymo trukmė tam, kad audiniuose būtų sunaikinta *M. tuberculosis*, ir taip būtų išvengta recidyvų [30, 64].

Šiuo metu priimta, kad TB turi būti gydoma bent 4 vaistais, iš kurių nors 2 yra pagrindiniai ir 2 – papildomi. Pagrindiniai vaistai (R, izoniazidas (INH), pirazinamidas (PZA), etambutolis (E)) yra tie, kurie gali sunaikinti *M. tuberculosis* bet kurioje jų būsenoje (užląstelines, viduląstelines besidauginančias ir persistuojančias (dormantines)). Papildomi vaistai (fluorchinolonų grupės, AG, CP) sustiprina pagrindinių vaistų veikimą ir mažina atsparumo vaistams išsivystymo tikimybę [57, 87].

M. tuberculosis atsparumas vaistams – evoliucijos, gydymo pasekmė. Dėl įgytų mutacijų ėmė plisti R ir INH atsparios *M. tuberculosis* padėrmės. PSO duomenimis, globaliai atsparumas

šioms dviem efektyviausiems AB sudaro apie 3,5% visų TB atvejų [64]. Nustačius atsparumą R ir INH, pacientui skiriami antros eilės vaistai: fluorochinolonai (FQ), etionamidas (ET), injekciniai aminoglikozidai (amikacinas (AMK), kanamicinas (KAN)) ir cikliniai peptidai (CP) kapreomicinas (KAP), viomicinas (VIO)). Tokia TB forma, kai aptinkamas atsparumas R ir INH vadinama MRD TB [7, 13]. MDR TB gydymas taikomas iki 20 mėnesių, gali apimti net 2-5 metus. Antros eilės antimikobakteriniai vaistai pasižymi mažesniu gydymo efektyvumu, didesniu toksiniu poveikiu žmogaus organizmui, gali sukelti kepenų, inkstų disfunkciją [13]. MDR TB gydymo sėkmingumas siekia 54%. Dar sunkesnė ligos forma - XDR TB, aptinkama nustačius atsparumą R ir INH, taip pat bet kuriam iš FQ grupės AB ir bent vienam iš antros eilės injekciniam vaistui (KAN, AMK, KAP). XDR TB gydymo sėkmingumas ~28%. Visiems antimikobakteriniams vaistams atspari TB (TDR TB) yra neišgydoma. Ši ligos forma užregistruota Kinijoje, Afrikoje, rytų Europoje [13, 73, 79].

Labai dažna ir mirtina TB komplikacija - koinfekcija su ŽIV [24]. Sergant ŽIV, dažnai nustatomas sumažėjęs CD4+ T limfocitų kiekis, nusilpęs imunitetas suteikia palankias sąlygas reaktyvuotis TM [26, 32]. R yra vienas iš pagrindinių AB, taikomų TB gydymo terapijoje, kuris indukuoja vaistų metabolizmo fermentus, taip pat ir citochromą – P450 3A4. Ši indukcija sumažina antiretrovirusinių vaistų veikimą. Todėl sergant ŽIV, visų pirma reikia išgydyti TB, tik pasveikus nuo TB galimas ŽIV gydymas.

TB gali tapti endemine liga, nesigydančys pacientai ar nesilaikantys tam tikrų sąlygų gydymo metu, tampa ligos platintojais. Nutraukus gydymą, šeimininko organizme tarpstančios gyvybingos TM mutuoja, tampa vis atsparesnės vaistams [63].

1.5. Tuberkuliozės laboratorinė diagnostika

Norint kontroliuoti TB, svarbu anksti diagnozuoti ligą ir ją gydyti. TB diagnostika plačiąja prasme apima aktyvios tuberkuliozės ir latentinės TB diagnostiką. Epidemiologiniu požiūriu pavojingi tik asmenys, sergantys atvira plaučių TB. Latentine TB sergantis asmuo neplatina TM, jo izoliuoti nereikia [36].

Preliminari aktyvios TB diagnozė remiasi paciento ligos istorija, klinikiniais simptomais, radiologiniais pokyčiais. Gali būti atliekami serologiniai tyrimai (QuantiFERON-TB Gold, T-Spot TB), tačiau jų patikimumas yra abejotinas [24, 57]. Kai yra būdingų klinikinių ir radiologinių požymių, TB gali būti diagnozuota remiantis: 1) mikroskopija (aptikus RAB) ir ėminiuose molekuliniais diagnostikos metodais patvirtinus TM arba 2) būdingais pokyčiais plaučių, pleuros ar limfmazgio biopsinėje medžiagoje (aptikus granulomų su nekroze) arba 3) respiraciniuose mėginiuose ar bioplate molekuliniais diagnostikos metodais patvirtinus TM. Tačiau svarbiausias

ir neabejotinas naujai diagnozuojamos TB diagnostikos kriterijus yra iš tiriamosios medžiagos išaugintos ir identifikuotos TM [36].

1.5.1. Mikrobiologiniai ir imunologiniai tyrimai

Skreplių tepinėlio mikroskopinis tyrimas buvo sukurtas daugiau nei prieš 130 metų [40]. Tai aukšto specifiskumo mikrobiologinis tyrimas, kuris paremtas RAB nustatymu natyviniame arba specialiais metodais apdorotų koncentruotų klinikinių ėminių tepinėlyje, dažytame fluorescenciniais dažais arba Cylio-Nilseno būdu [3, 18, 59]. Dažymas fluorescenciniais dažais diagnostikoje yra naudojamas kaip atrankinis metodas, nes dažų sudėtyje esantys fluorochromai (auraminas arba rodaminas) prisitvirtina prie mikobakterijų sienelės ir švyti, tepinėlių žiūrint liuminescenciniu mikroskopu [7, 54, 59, 63, 87]. Tepinėlių dažant Cylio-Nilseno būdu (karbolio fuksinu), RAB nusidažo ryškiai avietine spalva ir nepraranda jos, blukinant tepinėlių rūgšties alkoholiu [40]. Vadovaujantis PSO rekomendacijomis, TB gali būti patvirtinama gavus bent vieną teigiamą tepinėlių [3]. Tačiau atsižvelgiant į santykinai nedidelį metodo jautrumą, neigiamas mikroskopijos rezultatas neleidžia atmesti TB diagnozės. Taip pat atliekant mikroskopinį tyrimą, neįmanoma negyvybingų mikobakterijų atskirti nuo gyvų, identifikuoti jų rūšį ar nustatyti jautrumą vaistams, todėl būtina mikobakterijas tirti kitais metodais [7].

Tradicinis TM diagnostikos metodas yra sukėlėjo auginimas pasėlyje, naudojant standžias arba skystas mitybines terpes. Mikrobiologinis pasėlio metodas daug jautresnis, nei mikroskopija, išaugusios ir vizualiai ar automatizuotai nustatytos TM kolonijos leidžia patvirtinti TB diagnozę [18, 59]. Visame pasaulyje dažniausiai naudojama standi Levenšteino-Jenseno terpė, kurioje, lyginant su skysta (Bactec MGIT 960) terpe, aptinkamas mažesnis užteršimas kitomis bakterijomis, grybais. Standžioje terpėje TM augimas užtrunka 4-6 savaites [4, 69]. Greitesnis augimas (apimantis 1-2 savaites) yra gaunamas TM auginant skystoje terpėje. Atliekant mikrobiologinį pasėlių dėl TM, siekiant kokybiškų rezultatų, būtina užtikrinti tinkamą preanalizės etapą, be to labai svarbi yra ir darbuotojų patirtis [36, 59].

Pasėlyje išaugintos TM gali būti identifikuojamos imunochromatografiniais tyrimais, kurie paremti monokloninių antikūnų reakcija prieš *M. tuberculosis* komplekso bakterijų išskiriamus antigenus, pvz., 24 kDa baltymą - MPB64, anksti išskiriamą antigeną ESAT-6, baltymą CFP-10 [12, 46]. Tyrimai atliekami ant specialios nitroceliuliozinės juostelės, patalpintos kasetėje. Teigiamas tyrimo rezultatas nustatomas, įvykus spalvinei reakcijai kontrolės ir specifinėje zonoje [59, 70]. Įmobilizuoti specifiniai antikūnai prijungia mėginyje esančius antigenus. Sudaromas antigeno-antikūno kompleksas, kurį fiksuoja antras, žymėtas antikūnas. Žymėti antikūnai prisihybridizavę prie antigeno atpalaiduoja koloidines daleles ir matome spalvos pokyčius. Tyrimas gali būti atliekamas naudojant bakterijų kolonijas, išaugintas tiek skystoje, tiek standžioje terpėje.

Nepaisant aukšto imunochromatografinio tyrimo jautrumo (92,4-99,2%) ir specifiškumo (100%), galimi klaidingi rezultatai [21, 46]. Pasitaiko atveju, kai paciento organizme koegzistuoja *M. tuberculosis* mikobakterijos kartu su netuberkuliozinėmis mikobakterijomis [52, 80]. Taip pat galimos klaidingai neigiamos reakcijos, kai ieškomas antigenas išskiriamas neintensyviai, įmanoma ieškomo antigeno mutacija [46, 70].

Išaiškinus naujus TB atvejus, po nesėkmingo gydymo ar TB atkričio atveju, atliekamas *M. tuberculosis* jautrumo vaistams tyrimas. Tyrimu siekiama išsiaiškinti, ar TM yra jautrios pirmos eilės ir antros eilės antimikobakteriniams vaistams. Atsparumas AB įvertinamas, auginant TM kultūras standžioje ir skystoje terpėje, kuriose yra minimali slopinanti AB koncentracija (MSK) [68]. Šiuo metu yra plačiai naudojamas visiškai automatizuotas, neradiometrinis, neinvazinis, jautrumo vaistams tyrimas Bactec MGIT 960 sistema (Becton Dickinson Microbiology System, Sparks, MD, USA). MGIT mėgintuvėlio dugne yra silikone patalpintas fluorescencinis žymuo, kuris detektuoja deguonies suvartojimą, o rezultatai stebimi, mėgintuvėlius apšvietus UV šviesa. Šiuo tyrimu užtikrinamas aukštas biosaugumo ir žemas užteršimo kitomis bakterijomis lygis. Tyrimas laikomas „auksiniu standartu“, nustatant TM jautrumą vaistams skystoje terpėje [65].

LTBI diagnostikoje TM aptikimui naudojami 2 imunologiniai tyrimai: odos tuberkulino tyrimas (Mantoux tyrimas) ir interferono γ nustatymas žmogaus kraujyje. Abu tyrimai paremti atmintį turinčių imuninių ląstelių (T limfocitų) atsaku [54]. Odos tuberkulino tyrimas pirmą kartą atliktas 1890 metais. Jo metu po paciento epidermio sluoksniu, suleidžiama baltymų derivato injekcija. Injekcijos sudėtyje yra *M. tuberculosis*, *M. bovis* ir kitų netuberkuliozinių bakterijų antigenų mišinys. Jei pacientas buvo susidūręs su atitinkamu antigenu, tai jo organizme yra sensibilizuotų limfocitų, per 48-72h sukeliama IV tipo hiperjautrumo reakcija, injekcijos vietoje – T limfocitų infiltracija, stebimas paraudimas, patinimas [21, 24, 57, 87]. Klaidingai teigiamą reakciją gali sukelti netuberkuliozinės bakterijos, taip pat neseniai suleista BCG vakcina. Klaidingai neigiama reakcija galima esant imunosupresinei paciento būklei [24, 58].

Kitas 2000 m. sukurtas metodas paremtas T limfocitų išskiriamo citokino, interferono γ , matavimu kraujo mėginyje - Quatiferon TB Gold testas. Lyginant su odos tuberkulino tyrimu, interferono γ tyrimo jautrumas siekia 81-88%, tuberkulino testo – 70%. Nepaisant geresnio jautrumo, tyrimas brangus, reikalaujantis specialios įrangos. Taigi, abu metodai, skirti nustatyti LTBI, turi trūkumų, nepakankamas tyrimų jautrumas [57].

1.5.2. Molekuliniai tyrimai

Molekuliniai mikobakterijų aptikimo metodai yra pranašesni TB diagnozuoti, nes yra greitesni, jautrūs ir specifiški, gerai standartizuoti ir reikalauja mažesnės biologinės saugos [9, 21,

59, 84].

Molekuliniais diagnostikos metodais galima labai greitai (iki 48 val.) aptikti *M. tuberculosis* kompleksą, identifikuoti kompleksui priklausančias mikobakterijų rūšis, nustatyti daugelį kliniškai svarbių ne tuberkuliozės mikobakterijų rūšių bei ištirti TM padermių atsparumą R (arba R ir INH kartu), FQ bei leidžiamiems II eilės vaistams (KAN, AMK ir KAP) [13, 30].

Molekuliniai mikobakterijų diagnostikos metodai yra grindžiami bakterijų nukleorūgščių išskyrimu iš grynos TM kultūros ar tiesiogiai iš tiriamosios medžiagos (pvz., skreplių) ir specifiško *M. tuberculosis* geno (-ų), siejamo (-ų) su atsparumu vaistui išsivystymu, aptikimu [68].

Vadovaujantis PSO rekomendacijomis, greitai MDR-TB diagnostikai siūloma naudoti komercinį Xpert MTB/RIF[®] molekulinį tyrimą (Cepheid, JAV), kuriuo galima labai greitai identifikuoti *M. tuberculosis* kompleksą ir nustatyti atsparumą R. Šis tyrimas pasižymi labai aukštu jautrumu ir specifiskumu, yra visiškai automatizuotas, veikimo principas paremtas tikro laiko PGR [3, 9, 18, 59, 74].

PSO taip pat rekomenduoja naudoti GenoType[®] MTBDR*plus* ir GenoType[®] MTBDR*sl* VER2.0 komercinius rinkinius (Hain LifeScience, Vokietija), kuriais galima identifikuoti *M. tuberculosis* komplekso rūšis, nustatyti pačias dažniausias genų mutacijas, lemiančias atsparumą R ir INH (GenoType[®] MTBDR*plus*) ir FQ, AG ir CP. Metodo principas yra grindžiamas specifinių mikobakterijos laukinio tipo ir mutavusių genų (žinomų mutacijų) DNR pagausinimu ir PGR produktų atvirkštinė hibridizacija ant nitroceliuliozinių juostelių. Atsparumas AB nustatomas, kai atvirkštinė hibridizacija nevyksta viename ar keliuose laukinio tipo genuose. Vis dėlto, molekuliniais metodais neaptikus genų mutacijų, negalima atmesti atsparumo vaistams galimybės, nes dar ne visos su atsparumu AB siejamos mutacijos yra žinomos [9, 13, 21, 59].

Yra nustatyta, kad TM atsparumas vaistui gali būti žemo lygio (*angl.* low level). Tai reiškia, kad tiriant atsparumą vaistui fenotipiniu metodu, jis nebus nustatytas (t.y. ištirta fenotipiniu metodu TM bus jautri vaistui), tačiau genotipiniu metodu žemą atsparumą vaistui galima aptikti. Taigi, tikslus atsparumo vaistui nustatymas yra labai svarbus, taikant teisingą ligos gydymą. Pavyzdžiui, fenotipiniu metodu galima nenustatyti žemo lygio atsparumo KAN, tačiau naudojant GenoType[®] MTBDR*sl* VER2.0 tyrimą, galima aptikti žemo lygio atsparumą KAN, įvykus *eis* geno promotoriaus mutacijai [9].

1.6. *M. tuberculosis* genomai

DNR sekoskaita yra ypatingai našus ir informatyvus mikobakterijų tyrimo metodas. Šio metodo panaudojimas leido geriau suprasti globalinę TM įvairovę ir genetinę struktūrą [15, 17].

Pirmą kartą *M. tuberculosis* (dažniausiai laboratorijoje naudojamos referentinės vaistams jautrios padermės *H37Rv*) genomo sekoskaita buvo atlikta 1998 m. Šio metodo pagalba yra

nustatyta, kad *M. tuberculosis* genomas sudarytas iš vienos žiedinės chromosomos, kuri talpina $4,4 \times 10^6$ (4411529 bp) bazių porų ir koduoja apytiksliai 4000 genų [16, 26, 27, 42, 56, 67]. Tai vienas iš didžiausių sekvenuotų bakterijų genomų (antrasis sekvenuotas po *E.coli*). Inicijacijos kodonas *dnaA* gene - oriC sritis, pradinis taškas, kuriame prasideda genomo replikacija. *M. tuberculosis* (H37Rv) genomas haploidinis, jame daug pasikartojančios DNR, dažnai natyvinėje sekoje įsiterpia ektovinė seka [15, 16]. Aptinkamas didelis kiekis genų, koduojančių fermentus. Manoma, kad fermentai ir riebalų rūgštys suteikia mikobakterijoms galimybes augti infekuoto šeimininko audiniuose. Apytiksliai 200 genų koduoja fermentus, kurie siejami su riebalų rūgščių metabolizmu, 100 genų - svarbūs riebalų rūgščių β oksidacijai [14]. Funkcionalią, stabilią RNR genome koduoja 50 genų, molekulės produkuojamos 3 vietose unikalaus ribosomų RNR operono. Genai, koduojantys tRNR, apima 43 kodonus, išsibarstę po visą genomą. Nustatyti 3924 struktūriniai genai (koduojantys baltymus), kurie apima ~91% visos koduojamos DNR [16]. Tam tikrose srityse guanino ir citozino nukleotidai (G+C) sudaro 65,6%, aptinkama zonų, kuriose ši nukleotidų kombinacija labai dažna (>80%). Polimorfinės guanino ir citozino sekos sudaro atskirą šeimą (PGRSs). Trys genai (*dnaB*, *recA* ir *Rv1461*) apima baltymų intronus. Apskaičiuotas genų tankumas - vienas genas per 1.1 kb [14]. Nustatytos šešiolika kopijų mišrių insercinių sekų (*IS6110*) ir šešios stabilesnės (*IS1081*) sekos H37Rv genome. Atlikus detalią genomo sekų analizę rasti ir kiti mišrūs intarpai. Dažniausiai sekos įsiterpusios tarp genų, nekoduojamoje srityje, šalia tRNR genų [16].

M. tuberculosis genome aptikti dviejų profagų genai (*phiRv1* ir *phiRv2*), kurie perduodami horizontaliai. Jie svarbūs mikobakterijų genomo virulentiškumo, kintamumo, evoliucionavimo stebėjimuose. Kai kurie profagų genai siejami su mikobakterijų adaptacija tam tikrose ekologinėse nišose [14, 23]. Abu profagų elementai (*phiRv1* ir *phiRv2*) yra ~10 kb ilgio. Profago genas *phiRv1* siejamas su distalinio geno (*bio*) raiška, kuri svarbi genų mutacijų atsiradimui [16].

Mikobakterijų genome aptinkamos sekos, koduojančios glicino aminorūgštis (PE, Pro-Glu ir PPE, Pro-Pro-Glu), jos nustatomos terminaliniuose N regionuose. PE ir PPE sritys koduoja 110 ir 180 aminorūgščių, atitinkamai. PE ir PPE funkcija dar nėra išaiškinta, mokslininkai sukūrė hipotezę, jog kai kurie šių sekų koduojami baltymai svarbūs antigenų kintamume [14, 26, 34, 75].

M. tuberculosis genome, kaip ir kituose mikroorganizmuose, aptinkami transkripciją reguliuojantys baltymai, genome nustatyta 13 sigma baltymų, kurie prisijungę prie RNR polimerazės užtikrina transkripcijos specifiškumą. Aptikti ir kiti 22 genai, reguliuojantys transkripcijos procesą, iš jų 13 genų siejami su atsako į impulsą reguliavimu. Tai dažniausiai transkripciją reguliuojantys baltymai, kurie yra indukuojami kintančių aplinkos veiksnių [14].

1.7. *M. tuberculosis* atsparumas vaistams ir jį lemiantys genai

M. tuberculosis, skirtingai nuo kitų bakterijų, kurios naudoja pernešamus genomo elementus (plazmidės ir transpozonus) atsparumo vaistams perdavimui tarp įvairių bakterijų, atsparumą vaistams įgyja išimtinai dėl genuose *de novo* atsirandančių mutacijų selektyvios bakterijų atrankos metu, t.y. vartojant vaistus nuo TB. Yra nustatyta, kad genetinį atsparumą vaistams lemia taškinės, spontaniškai įvykstančios genų mutacijos, modifikuojančios vaisto taikinį (pvz., pakeičiant bakterijos RNR polimerazę, kuri išvengia R veikimo) arba fermentą, verčiantį vaistą į aktyvią jo formą (pakitusi bakterijos katalazė, kuri neaktyvina INH) [13, 30, 71].

Dabartiniu metu yra identifikuota daugiau nei 30 skirtingų genų, asocijuotų su atsparumu tam tikriems vaistams nuo TB. Geriausiai ištyrinėti yra *rpoB*, *katG*, *inhA*, *pncA*, *rrs*, *gyrA*, *gyrB* genai, veikiantys per vaisto taikinio modifikaciją ar sukeliant geno hiperraišką ir taip sumažinant vaisto aktyvumą arba jo netenkant [13].

Atsparumą R nulemia mutacija, įvykusi RNR polimerazės β subvienetą koduojančiame *rpoB* gene. Provaistui INH atsparumą sąlygoja du mechanizmai: sutrikusi vaisto aktyvacija, įvykus mutacijai TM fermentą koduojančiame *katG* gene ir padidėjusi vaisto taikinio raiška ar atsiradusi taikinį koduojančio *inhA* geno modifikacija. PZA veikimui, taip pat būtinas jį aktyvinantis TM fermentas – pirazinamidazė, koduojamas *pncA* geno. Būtent šiame gene įvykusios mutacijos – pagrindinis atsparumo PZA mechanizmas. Aminoglikozidų (AMK, KAN, KAP) taikinytis yra *rrs* geno koduojama 16S rRNR, TM atsparumą aminoglikozidams sąlygoja, dėl mutacijų įvykusi vaisto taikinio modifikacija. FQ grupės vaistai veikia DNR girazę, kurią koduoja *gyrA* ir *gyrB* genai. Dažniausiai atsparumą lemiančios mutacijos nustatomas *gyrA* gene [6, 13, 28, 48].

Kryžminis atsparumas vaistams – įgytas procesas, kai vienam AB atspari TM padermė, kartu tampa atspari keliems arba visiems tos pačios grupės antibiotikams. Kryžmiškai atsparios padermės yra didžiulis iššūkis TB gydyme. Šis atsparumas išsivysto, dėl AB struktūrinio panašumo ir vienodo vaisto taikinio, kuriame įvyksta taškinė mutacija. Naujų molekulinės biologijos metodų dėka atsirado galimybė nustatyti TM genome mutacijas, siejamas su kryžminiu atsparumu keliems vaistams [61].

R atsparios padermės, dėl įvykusios vaisto taikinio mutacijos tampa kryžmiškai atsparios rifabutinui, rifalazilui. TM atsparios INH pasižymi mutacijomis *inhA* gene, kurios lemia kryžminį atsparumą panašios struktūros vaistui etionamidui (ET) [60]. Kryžminio atsparumo fenomenas aptinkamas ir tarp antros eilės leidžiamų vaistų. OFL yra plataus spektro vaistas, vartojamas įvairių infekcijų ir TB gydyme. Dėl dažno šio vaisto vartojimo plinta OFL atsparios TM padermės, o kryžminis atsparumas pastebimas tarp FQ grupės AB OFL, levofloksacino, moksifloksacino (MOX) ir gatifloksacino [51]. *Rrs* geno (A1401G) mutacija, įvykusi 16S rRNR, siejama su kryžminiu atsparumu tarp aminoglikozidų (AMK, KAN) ir ciklinio peptido (KAP). Kryžminis

atsparumas tarp šių vaistų gana dažnas, 70-80% KAP atsparių padermių turi A1401G mutaciją. Kitos mutacijos (G1484T, C517T, A514C) taip pat gali sukelti mono- ar kryžminį atsparumą tarp aminoglikozidų [35, 50, 61]. Tarp ciklinių peptidų KAP ir VIO yra nustatytas pilnas kryžminis atsparumas. Šie vaistai yra labai panašios struktūros ir jungiasi prie abiejų rRNR subvienetų [60].

Naujausiuose literatūros šaltiniuose teigiama, kad kryžminį atsparumą tarp aminoglikozidų gali sukelti mutacija G133C, įvykusi išmetimo pompą koduojančiuose genuose. Mutacija išmetimo pompos (*whiB7*) transkripcijos aktyvatoriuje sukelia *eis* ir *tap* genų raišką ir lemia žemo lygio atsparumą KAN ir S. Nors atrandama vis daugiau mutacijų, siejamų su kryžminiu atsparumu keliems to pačios grupės AB, tenka pripažinti, jog ne visi atsparumo mechanizmai visiškai aiškūs [50, 61].

M. tuberculosis atsparumą vaistams gali lemti ir toks reiškinys kaip heterorezistentiškumas, arba paciento “superinfekcija” TM. Šiuo terminu apibūdinama tokia paciento būseną, kuomet TB sergančio paciento organizme koegzistuoja keletas TM subpopuliacijų, kurių jautrumas antibiotikams skiriasi, t.y. vienu metu pasėlyje auga vaistams jautrios ir vaistams atsparios *M. tuberculosis* mikobakterijos [9, 19, 89]. Šis reiškinys yra siejamas su netinkamu TB gydymu. Per anksti nutraukus gydymą, nesunaikintos mikobakterijos tampa atsparios vaistams nuo TB [17, 38]. Nustatyta, kad tokie veiksniai kaip lytis, amžius, TB tipas, TB gydymo istorija nėra statistiškai reikšmingi ir nesiejami su heterorezistentiškumu [32]. Heterorezistentiškumą galima aptikti atliekant molekulinis tyrimus [9]. Tačiau atliekant nukleorūgščių pagausinimą galimi ir klaidingai teigiami rezultatai dėl įvykusio mėginio užteršimo [19].

II. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

2.1. Tyrimo objektas ir etapai

Tyrimui buvo naudotos *M. tuberculosis* kultūros, išaugintos standžioje ar skystoje mitybinėje terpėje iš plaučių TB sergančių pacientų skreplių, bronchoalveolinio lavažo (BAL) skysčio, aspirato ar pooperacinės medžiagos ėminių. Tyrimas buvo vykdomas nuo 2017 m. vasario mėnesio iki – 2017 m. lapkričio mėnesio VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centro Tuberkuliozės tyrimų laboratorijoje (TTL). Iš viso ištirtos 83 *M. tuberculosis* kultūros.

M. tuberculosis atsparumas antros eilės antibiotikams FQ (OFL ir MOX) ir AG/CP (AMK, KAN, KAP ir VIO) nustatytas PGR metodu, naudojant GenoType® MTBDRsl VER 2.0 komercinį rinkinį. Tyrimas buvo atliekamas trimis etapais: 1) iš kultūros išskirta genominė bakterijų DNR; 2) atliekamas DNR pagausinimas su biotinizuotais pradmenimis; 3) pagausinti DNR produktai hibridizuoti su specifiniais žymenimis. PGR metodu gauti duomenys palyginti su fenotipiniais jautrumo antros eilės vaistams tyrimų rezultatais (OFL, AMK, KAN, KAP), įvertintas kryžminis atsparumas vaistams. Fenotipinius jautrumo vaistams tyrimus atliko ir įvertino TTL darbuotojai, vadovaujantis laboratorijoje patvirtintu protokolu.

2.2. *M. tuberculosis* fenotipinio jautrumo antros eilės injekciniams vaistams nustatymas

Bactec MGIT 960 sistema

Fenotipiniai jautrumo antros eilės injekciniams vaistams tyrimai atlikti visiškai automatizuota mikobakterijų kultivavimo sistema Bactec MGIT 960 (Becton Dickinson, JAV). Tyrimo metodas paremtas fluorometrine technologija, kuri pasižymi aukštu jautrumu, nustatant deguonies sunaudojimą skystoje Bactec MGIT terpėje. Mėgintuvėlio dugne patalpintas silikonas, kuriame įterptas fluorescencinis, jautrus ištirpusiam deguonies kiekiui junginys (indikatorius - tris 4,7 - difenil-1, 10 fenantrolino rutenio chlorido pentahidratas). Indikatorijų slopina deguonis, nes augant TM, deguonies kiekis mažėja ir fluorescencinis junginys nebeslopinamas, UV šviesoje stebimas fluorescencinis švytėjimas, kurį fiksuoja detektorius. Tyrimas atliekamas dviem etapais: 1) bakterijų kultūros suspensija sėjama į skystą terpę su papildais ir tiriamu AB ir be jo (kontrolė); 2) mėgintuvėliai dedami į Bactec MGIT 960 analizatorių ir inkubuojami 37°C temperatūroje.

Fluorescencijos intensyvumą detektorius fiksuoja kas 60 min., jautrumas vaistui lyginamas su neigiama kontrole, kurioje nėra AB. Patikimas rezultatas nustatomas kontroliniame mėginyje pasiekus augimo lygmenį (*angl.* growth unit) 400 ar daugiau per 21 dieną. Atsižvelgiant į kontrolę, tiriamajame mėginyje su AB nustačius žemesnę kaip 100 augimo lygmenį, laikoma, kad TM kultūra yra jautri vaistui, didesnis rezultatas siejamas su mikobakterijų atsparumu.

2.3. *M. tuberculosis* atsparumo antros eilės vaistams nustatymas PGR metodu

2.3.1. DNR išskyrimas

Genominės *M. tuberculosis* DNR išskyrimas buvo atliekamas TTL bakteriologinių tyrimų patalpose, griežtai laikantis biologinės darbų saugos reikalavimų. Darbui reikalinga įranga ir priemonės pateikti 1 lentelėje.

1 lentelė. DNR išskyrimui atlikti reikalinga įranga ir priemonės

Priemonės pavadinimas
Biologinės saugos spinta su HEPA filtru
Kaitintuvas (sausos karščio termoblokas)
Laboratorinė centrifuga
Purtyklė
Absorbuojantis popierius
Atliekų konteineris
Dozatoriai 10-100 µl tūriams
DNR išskyrimo rinkinys GenoLyse® VER 1.0
Laikmatis
Sterilios 1 µl kilpelės
Sterilios 3 ml Pastero pipetės
Sterilūs 1,5 ml talpos centrifuginiai mėgintuvėliai
Stovėlis mėgintuvėliams
Tuberkulocidinis dezinfektantas
Vienkartinės apsaugos priemonės (pirštinės, chalatas, kepuraitė, 3M respiratorius su HEPA filtru)
Vienkartiniai sterilūs 2-120 µl antgaliai su filtru

DNR išskyrimas buvo atliktas iš grynoje kultūroje išaugintų *M. tuberculosis* padermių, naudojant „GenoLyse® VER 1.0 Kit for Extraction of Bacterial DNA“ (Hain LifeScience, Vokietija, Kat. Nr. IFU-51610-08) DNR išskyrimo rinkinį ir vadovaujantis gamintojo pateiktomis rekomendacijomis. Rinkinio sudėtis pateikta 2 lentelėje.

2 lentelė. „GenoLyse® VER 1.0 Kit for Extraction of Bacterial DNA“ rinkinio sudėtis

Rinkinio komponentai	Kiekis rinkinyje
Lizės buferis (A-LYS)	12 ml
Neutralizacijos buferis (A-NB)	12 ml

2.3.1.1. Bakterijų genominės DNR išskyrimo eiga

1. Į 1,5 ml sterilų centrifugavimo mėgintuvėlį Pastero pipete perkeliama 1 ml skystoje (Bactec MGIT 960) terpėje išaugusios bakterijų kultūros ir centrifuguojama 15 min. 10 000 x g kambario temperatūroje. Susidaręs skystos terpės centrifugatas nupilamas.
2. Jei DNR išskyrimas atliekamas iš standžioje (Levenšteino-Jenseno) terpėje išaugusios kultūros, į mėgintuvėlį perkeliama 1-2 *M. tuberculosis* kolonijos.
3. Abiem atvejais pridedama 100 µl lizės buferinio tirpalo (A-LYS), mėgintuvėlis supurtomas, inkubuojamas kaitintuve 5 min. 95 °C temperatūroje.
4. Nutraukus kaitinimą, į lizatą pilama 100 µl neutralizacijos buferio tirpalo (A-NB), mėgintuvėlis supurtomas.
5. Centrifuguojama 5 min. 16 000 x g kambario temperatūroje.
6. Supernatantas perkeliama į sterilų 1,5 ml talpos centrifuginį mėgintuvėlį. Iki PGR tyrimo išskirta bakterinė DNR laikoma nuo +4 °C iki -20 °C temperatūroje.

2.3.2. Polimerazės grandininė reakcija

Polimerazės grandininė reakcija (PGR) buvo atliekama TTL molekulinųjų tyrimų patalpose. PGR reakcijai atlikti buvo naudojami GenoType® MTBDRs/ VER 2.0 rinkinio reagentai, kurių sudėtis nurodyta 3 lentelėje. Darbas vykdytas pagal gamintojo nurodymus.

3 lentelė. PGR reakcijai reikalingi reagentai ir jų sudėtis

PGR reakcijos reagentai	Kiekis rinkinyje
Amplifikacijos mišinys A (AM-A) Sudėtis: buferis, nukleotidai, Taq polimerazė	0,15 ml
Amplifikacijos mišinys B (AM-B) Sudėtis: druskos, specifiniai pradmenys, dažas (violetinės spalvos)	0,53 ml

2.3.2.1. PGR mišinio paruošimas ir reakcijos vykdymas

1. PGR reikalingi reagentai ir DNR mėginiai išimami iš šaldiklio ir atšildomi iki kambario temperatūros, sumaišomi supurtant ir trumpai centrifuguojami.
2. PGR mišinys ruošiamas steriliomis sąlygomis PGR kambaryje. Prieš pradėdant darbą, laminarinė spinta apšvitinama UV šviesa, o darbo vieta išvaloma 1% hipochlorito tirpalu. Reakcijos mišinys ruošiamas steriliame 1,5 ml mėgintuvėlyje.
3. PGR mišiniui reikalingų komponentų kiekis apskaičiuojamas, atsižvelgiant į visų tiriamųjų DNR mėginių ir kontrolių skaičių. PGR mišinio komponentų kiekiai vienam mėginiui ištirti sudaro:

- pradmenys ir nukleotidų mišinys (35 µl),
 - PGR buferis (5 µl),
 - MgCl₂ (2 µl),
 - H₂O (2,8 µl),
 - Taq polimerazė (0,2 µl).
4. Vartotojų patogumui visi PGR mišinio komponentai yra AM-A ir AM-B mėgintuvėliuose. PGR mišinys vienam mėginiui paruošiamas paimant 10 µl AM-A mišinio ir 35 µl AM-B mišinio.
 5. Paruoštas PGR mišinys išpilstomas po 45 µl į PGR mėgintuvėlius.
 6. Siekiant išvengti užteršimo, mikobakterijų DNR įnešimas į PGR mišinį vykdomas DNR kambaryje. Į kiekvieną mėgintuvėlį, įpilama po 5 µl tiriamosios DNR. Bendras reakcijos tūris yra 50 µl.
 7. Siekiant užtikrinti tyrimo kokybę, atliekama neigiama pagausinimo kontrolė, kuri paruošiama įpylus 5 µl vandens be RNazių į PGR mėgintuvėlį su paruoštu PGR mišiniu.
 8. PGR mėgintuvėliai pernešami į hibridizacijų kambarį, kuriame atliekamas DNR pagausinimas. Mėgintuvėliai sudedami į termociklerį SensoQuest GmbH (gamintojas, Vokietija), kur vykdoma PGR, 4 lentelėje nurodytomis sąlygomis. PGR produktai gali būti laikomi nuo +8 °C iki -20 °C temperatūroje.

4 lentelė. PGR vykdymo sąlygos

Žingsniai	Reakcijos trukmė	Temperatūra	Ciklų skaičius
1	15 min.	95°C	1 ciklas
2	30 sek.	95°C	10 ciklų
3	2 min.	65°C	
4	25 sek.	95°C	20 ciklų
5	40 sek.	50°C	
6	40 sek.	70°C	
7	8 min.	70°C	1 ciklas

2.3.3. PGR produktų atvirkštinė hibridizacija su specifiniais žymenimis

PGR produktų atvirkštinei hibridizacijai atlikti buvo naudojami GenoType[®] MTBDRsl/VER 2.0 rinkinio reagentai, kurių sudėtis pateikta 5 lentelėje.

5 lentelė. Atvirkštinei hibridizacijai reikalingi reagentai ir jų sudėtis

Hibridizacijos reakcijos rinkinio komponentai	Kiekis rinkinyje
Nitroceliuliozinės juostelės (STRIPS), padengtos specifiniais žymenimis	12 vnt.
Denatūravimo tirpalas (DEN), dažytas (mėlynos spalvos), <2% NaOH	0,3 ml
Hibridizacijos buferis (HYB), dažytas (žalios spalvos), 8-10% anijoninės kilmės medž.	20 ml
Plovimo tirpalas (STR), dažytas (raudonos spalvos), >25% ketvirtinių amonio junginių, <1% anijoninės kilmės medž.	20 ml
Skalavimo tirpalas (RIN), buferis, <1% NaCl, <1% anijoninės kilmės medž.	50 ml
Koncentruotas konjugatas (CON-C), dažytas (oranžinės spalvos) streptavidinu konjuguota šarminė fosfatazė	0,2 ml
Konjugato buferis (CON-D) buferis, <1% blokuojantys reagentai, <1% NaCl	20 ml
Koncentruotas substratas (SUB-C) <70% dimetilsulfoksidai, <10% 4-nitrotetrazolio chloridas, <10% 5-brom-4-chlor-3-indolilfosfatas	0,2 ml
Substrato buferis (SUB-D) buferis, <1% MgCl ₂ , <1% NaCl	20 ml
Vertinimo lapas	1 vnt.
Plokštelė hibridizacijai	1 vnt.

Atvirkštinei hibridizacijai naudojama įranga ir papildomos priemonės nurodytos 6 lentelėje.

6 lentelė. Tyrimui atlikti reikalinga papildoma įranga ir vienkartinės priemonės

Priemonės pavadinimas
Termopurtyklė TwinCubator
Absorbuojantis popierius
Atliekų konteineris
Aliuminio folija
Dozatoriai 10, 20, 200 ir 1000 µl tūriams
Laikmatis
PGR mėgintuvėliai, be DNazių ir RNazių
Pincetas
Sterilūs 20, 200 ir 1000 µl dozatorių antgaliai su filtru

GenoType® MTBDR_{sl} VER 2.0 rinkinio metodas pagrįstas DNA-STRIP® technologija. Naudojant biotinizuotus pradmenis padauginama genomine DNR, kuri chemiškai denatūruojama, jei susidariusi viengrandė DNR yra specifiška ant nitroceliuliozinės juostelės imobilizuotam zondui, įvyksta DNR jungimasis komplementarumo principu. Nespecifinė viengrandė DNR yra pašalinama plovimų metu. Dėl aukšto afinineto biotinui prie specifinės DNR prijungiamas fermentas šarminė fosfatazė, konjuguota su streptavidinu. Įpilus substrato, stebima spalvinė reakcija, kuri įrodo įvykusią hibridizaciją.

Šiuo rinkiniu nustatomos mutacijos *M. tuberculosis* kompleksui priklausančių mikobakterijų (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* subsp. *bovis*, *M. bovis* subsp. *caprae*, *M. bovis* BCG, *M. microti*, *M. canettii* ir *M. pinnipedii*) genuose, siejamos su atsparumo išsivystymu. Atsparumas FQ (OFL ir MOX) nustatomas pagal pačias reikšmingiausias mutacijas *gyrA* ir *gyrB* genuose (koduojančiuose atitinkamus DNR girazės A ir B subvienetus). Atsparumas AG/CP nustatomas pagal 16S rRNR, *rrs* gene esančias mutacijas. Žemo lygio atsparumas KAN nustatomas pagal *eis* geno (koduojančio acetiltransferazę Eis) mutacijas promotoriaus srityje.

2.3.3.1. Atvirkštinės hibridizacijos su specifiniais žymenimis eiga

Atvirkštinė hibridizacija paremta plovimo ir purtymo etapais. Prieš darbą reagentai atšildomi iki kambario temperatūros.

1. Į kiekvieną naudojamą plokštelės hibridizacijai lovelio kampą įpilama po 20 µl denatūravimo tirpalo (DEN). Į DEN tirpalą įpilama 20 µl pagausinto PGR produkto, atsargiai pipetuoiant sumaišoma ir inkubuojama kambario temperatūroje termopurtyklėje 5 minutes (nustatoma programa P1S8 – be kratymo).
2. Į kiekvieną mėginio lovelį įpilama 1 ml pašildyto hibridizacijos buferio (HYB). Plokštelė atsargiai judinama kol tirpalo spalva tampa homogeniška. Naudojant pincetą, į kiekvieną lovelį įdedama nitroceliuliozinė juostelė.
3. Plokštelė inkubuojama termopurtyklėje 30 min. 45°C temperatūroje, programa - P1S1.
4. Pastero pipetėmis hibridizacijos buferis visiškai išsiurbiamas iš lovelių. Į kiekvieną lovelį įpilama 1 ml plovimo tirpalo STR ir inkubuojama termopurtyklėje 15 min. 45°C temperatūroje su kratymu, programa - P1S2.
5. Ruošiami konjugato ir substrato tirpalai (CON ir SUB tirpalai). Koncentratai (CON-C ir SUB-C) atskiedžiami santykiu 1:100 su atitinkamu buferiu (CON-D ir SUB-D), mažesnis kiekis pilamas į didesnę. Substrato tirpalas turi būti apsaugotas nuo tiesioginių saulės spindulių, todėl prieš ruošiant tirpalą mėgintuvėlis padengiamas aliuminio folija.

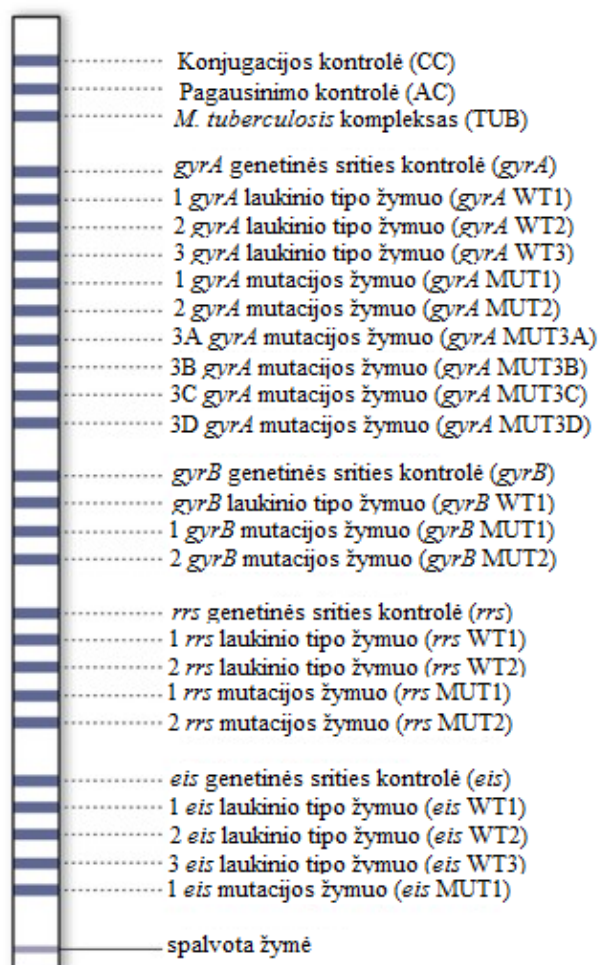
6. Po inkubacijos iš hibridizacijos plokštelės išpilamas STR tirpalas. Skysčio likučiai pašalinami apverstą padėklą švelniai purtant į absorbuojantį popierių. Ši procedūra taikoma visiems kitiems plovimo etapams.
7. Juostelės plaunamos 1 ml skalavimo skysčiu RIN ir inkubuojamos termopurtyklėje 1 min., programa - P1S3. Po inkubacijos RIN buferis išpilamas į atliekų konteinerį.
8. Ant kiekvienos juostelės pilama po 1 ml atskiesto konjugato tirpalo ir inkubuojama 30 min. purtant, programa - P1S4.
9. Pašalinamas tirpalas, juostelės plaunamos užpylus po 1 ml RIN tirpalo termopurtyklėje 1 min., programa – P1S5.
10. Pašalinamas tirpalas, juostelės plaunamos užpylus po 1 ml RIN tirpalo termopurtyklėje 1 min., programa – P1S6.
11. Pašalinamas tirpalas ir juostelės plaunamos užpylus po 1 ml dist. H₂O termopurtyklėje 1 min., programa - P1S7. Vanduo nupilamas ir įsitikinama, jog neliko skysčio pėdsakų.
12. Į kiekvieną lovelį su juostele įpilama po 1 ml atskiesto SUB tirpalo ir inkubuojama termopurtyklėje nepurtant ir uždengus folijos lakštu (saugant nuo tiesioginės saulės šviesos), programa – P1S8. Inkubacijos trukmė priklauso nuo tyrimo sąlygų, substrato inkubacija gali trukti nuo 3 iki 20 min. Juostelės turi būtų aiškiai matomos, tačiau per ilga inkubacijos trukmė gali lemti klaidingą rezultatų interpretaciją.
13. Reakcija stabdoma 2 kartus nuskalaujant juosteles distiliuotu vandeniu.
14. Pincetu juosteles išimamos, išdžiovinamos tarp dviejų absorbuojančio popieriaus lapų.

2.4. Atvirkštinės hibridizacijos rezultatų vertinimas ir interpretacija

Rezultatai fiksuojami specialiaame tyrimų protokolo lape, kuris yra kiekviename reagentų rinkinyje arba gali būti atsisiunčiamas iš gamintojo šiuo adresu: http://www.hain-lifescience.de/uploadfiles/file/produkte/mikrobiologie/mykobakterien/mtbdrsl_evaluation.pdf.

Juostelės atitinkamai prikljuojamos tyrimų registracijos lape nustatytuose laukeliuose ir saugomos nuo tiesioginio šviesos poveikio, kad neišbluktų. Kiekviena juostelė turi 27 reakcijos zonas (5 pav.).

GenoType MTBDRsl VER 2.0



5 pav. Nitroceliuliozinė juostelė su reakcijos zonomis [85]

Konjugacijos kontrolės (CC) zonoje išryškėjęs ruoželis rodo konjugato prijungimo ir substrato reakcijų efektyvumą. Pagausinimo kontrolės (AC) zonoje matomas ruoželis rodo, kad amplifikacija įvykdyta teisingai, susidarę produktai prisijungė prie juostelės. Ruoželio nebuvimas informuoja apie klaidingą DNR pagausinimo eigą arba jos slopinimą inhibitoriais. Išryškėjus ruoželiams tik CC ir AC zonose, rezultatas vertinamas kaip neigiamas. Ruoželių spalvos intensyvumas vertinamas atsižvelgiant į AC zonos signalą (išskyrus CC): jeigu išryškėjusi žymės spalva mažesnio intensyvumo nei AC zona, žymė nevertinama. *M. tuberculosis* komplekso (TUB) zona identifikuoja *M. tuberculosis* kompleksui priklausančias mikobakterijas. *GyrA*, *gyrB*, *rrs*, *eis* genetinių sričių kontrolės ruoželiai parodo geno sritį, specifinę atitinkamam genui. Išryškėjus visiems laukinio tipo žymenims nustatoma, kad tiriamas *M. tuberculosis* kamienas yra jautrus atitinkamiems vaistams. Mutacijų žymenys rodo atsparumą antimikobakteriniams vaistams lemiančias mutacijas. Išryškėjus ruoželiams laukinio tipo ir mutacijų zonose manoma, kad tiriamajame mėginyje gali būti heterorezistentiškas kamienas, kai išsivysto dalinis atsparumas arba mėginys sudarytas iš kelių kamienų, kurių bent vienas - mutavęs. Taigi, mutacijos žymenys leidžia

nustatyti dažniausias mutacijas, tačiau nenustačius laukinio tipo ir mutacijos žymenų, rezultata vertiname kaip atsparumą tam tikriems antibiotikams, įtariant kitą ne dažnai pasitaikiusią mutaciją. *GyrA* ir *gyrB* genų mutacijos siejamos su atsparumu FQ (OFL ir MOX) (7 lentelė). *Rrs* geno mutacijos lemia atsparumą AG/CP: AMK, KAN, KAP ir VIO, *eis* geno mutacijos – žemo lygio atsparumą KAN (8 lentelė).

7 lentelė. Mutacijos *gyrA* ir *gyrB* genuose

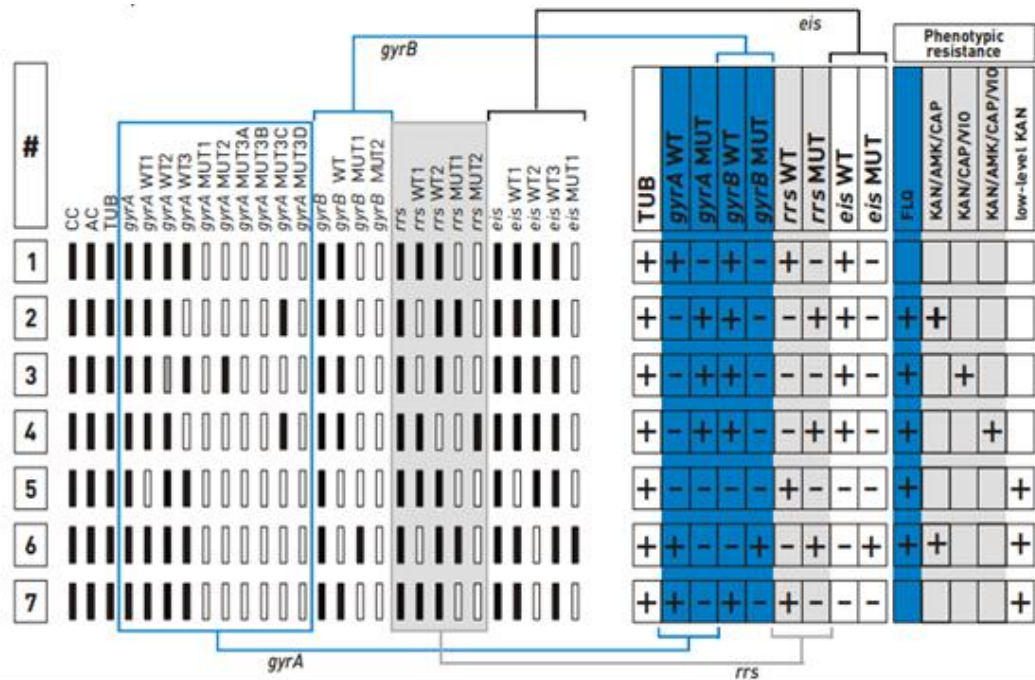
Mutavęs laukinis tipas	Išryškėjęs mutacijos ruoželis	Mutacija	Fenotipinis atsparumas
<i>gyrA</i> WT1	-	G88A	FQ
		G88C	
<i>gyrA</i> WT2	<i>gyrA</i> MUT1	A90V	
	<i>gyrA</i> MUT2	S91P	
<i>gyrA</i> WT3	<i>gyrA</i> MUT3A	D94A	
	<i>gyrA</i> MUT3B	D94N	
		D94Y	
	<i>gyrA</i> MUT3C	D94G	
<i>gyrA</i> MUT3D	D94H		
<i>gyrB</i> WT	<i>gyrB</i> MUT1	N538D	
	<i>gyrB</i> MUT2	E540V	

8 lentelė. Mutacijos *rrs* ir *eis* genuose

Mutavęs laukinis tipas	Nukleorūgšties lokusas	Išryškėjęs mutacijos ruoželis	Mutacija	Fenotipinis atsparumas
<i>rrs</i> WT1	1401	<i>rrs</i> MUT1	A1401G	AMK, KAN, KAP
	1402	-	C1402T	KAN, KAP, VIO
<i>rrs</i> WT2	1484	<i>rrs</i> MUT2	G1484T	AMK, KAN, KAP, VIO
<i>eis</i> WT1	-	-	G-37T	KAN
<i>eis</i> WT2	-	<i>eis</i> MUT1	C-14T	
		-	E540V	
		-	G-10A	
<i>eis</i> WT3	-	-	C-2A	

Išryškėjus visiems laukinio tipo žymenų ruoželiams, vertinimo lape ties atitinkamo geno laukiniu tipu dedamas „+“ ženklas, tačiau trūkstant nors vienam žymeniui, žymima „-“.

Neišryškėjus nei vienam mutacijos žymenų ruoželiui – žymima „-“. Aptikus bent vieną mutacijos žymens ruoželį prie atitinkamo geno, mutacijos stulpelyje žymima „+“ (6 pav.).



6 pav. GenoType® MTBDRs/ VER 2.0 rinkinio hibridizacijos rezultatų vertinimo pavyzdžiai

2.5. Statistinė analizė

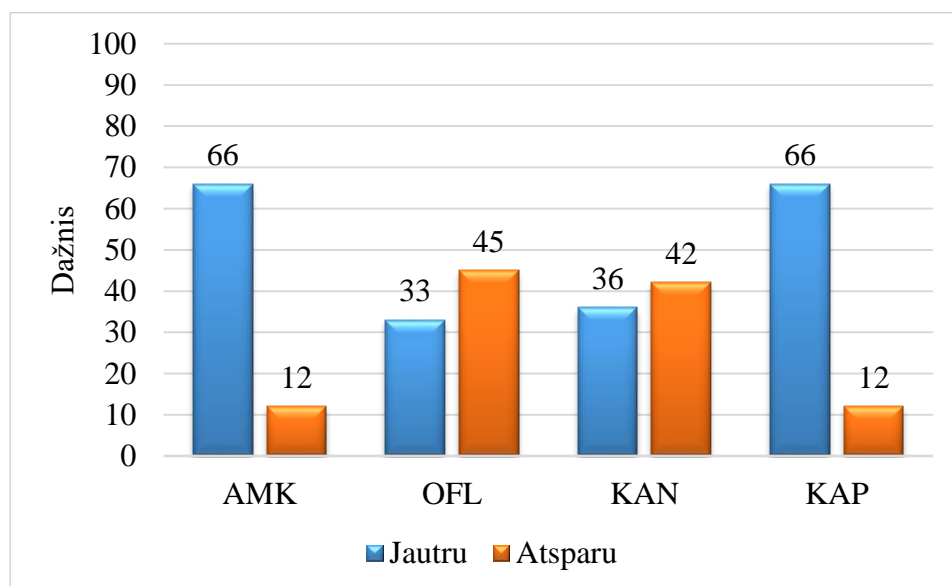
Statistinė analizė atlikta naudojant R (versija R 3.3.3) ir IMB SPSS Statistic 23 programų paketus. R programa apskaičiuoti kokybinių ir kiekybinių duomenų dažniai, sudarytos dažnių lentelės, skaičiuotas χ^2 (chi-kvadratų) kriterijus, taikant homogeniškumo hipotezę. Fenotipinį metodą laikant „auksinio standarto“ metodu, SPSS programa apskaičiuotas PGR metodo jautrumas, specifiskumas, teigiama (TPV) ir neigiama (NPV) prognostinės vertės. Siekiant įvertinti skirtingais metodais gautų rezultatų sutapimą nustatytos Koheno kapos koeficiento (*angl.* Cohen's kappa coefficient) vertės. Rezultatai vizualizuoti naudojant Microsoft Office Excel programą.

III. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Tyrimo metu PGR metodu buvo iširtos 83 *M. tuberculosis* padermės, išskirtos iš plaučių TB sergančių pacientų ėminių. Iš jų, 78 *M. tuberculosis* padermės buvo įvertintos fenotipiniu metodu, 5 padermės nebuvo įtrauktos į galutinę analizės imtį dėl fenotipinių duomenų trūkumo.

3.1. Jautrumo vaistams įvertinimas fenotipiniu metodu

Fenotipinio metodo rezultatų analizei buvo panaudoti tik jautrumo antros eilės injekciniams vaistams (OFL, AMK, KAN ir KAP) tyrimų rezultatai. Analizuojant fenotipiniu metodu gautus rezultatus nustatyta, kad iš 78 *M. tuberculosis* padermių daugiau nei pusė buvo atsparios OFL (45; 58%) ir KAN (42; 54%). Mažesnė dalis padermių buvo vienoda dalimi atsparios AMK (12; 15%) ir KAP (12; 15%) (7 pav.). Didžioji dauguma tirtų *M. tuberculosis* padermių buvo jautrios AMK ir KAP (66; 85%).



7 pav. Fenotipiniu metodu nustatyti jautrumo vaistams tyrimų rezultatai

Siekiant nustatyti kryžminį atsparumą antros eilės injekciniams vaistams, visos fenotipiniu metodu tirtos kultūros buvo suskirstytos į dvi grupes (XDR TB ir pre-XDR TB) pagal atsparumo vaistams tyrimų rezultatus, vadovaujantis PSO atsparios TB klasifikacijos kriterijais. *M. tuberculosis* padermės, atsparios R, INH, bent vienam vaistui iš FQ grupės ir bent vienam iš antros eilės injekciniam vaistui (AMK, KAN, KAP), priskirtos XDR TB grupei. *M. tuberculosis* padermės, atsparios R, INH, nors vienam vaistui iš FQ grupės arba bent vienam iš antros eilės injekciniam vaistui, tačiau ne abiem iš karto, priskirtos pre-XDR TB grupei [45, 55].

TM padermes suskirsčius į XDR TB ir pre-XDR TB grupes, 16 (21%) *M. tuberculosis* padermių buvo priskirtos pre-XDR TB grupei ir 36 (46%) - XDR TB grupei. 3 (4%) *M.*

tuberculosis padermės nebuvo priskirtos nei vienai TB grupei, nes joms buvo nustatytas visiškas jautrumas antros eilės injekciniams vaistams.

Įvertinus kryžminį atsparumą antros eilės injekciniams vaistams pre-XDR ir XDR TB grupėse nustatyta (9 lentelė), kad pilnas kryžminis atsparumas aminoglikozidams (AMK/KAN/KAP) pre-XDR TB grupėje yra dvigubai mažesnis (2; 12,5%), nei XDR TB grupėje (4; 11%). Taip pat XDR TB grupėje kryžminis atsparumas AMK/KAN sutinkamas dažniau, nei pre-XDR TB grupėje - 2 (12,5%) ir 3 (8%), atitinkamai. Kryžminis atsparumas KAN/KAP XDR TB grupėje 5 kartus dažnesnis, nei pre-XDR TB grupėje -1 (6%) ir 5 (14%), atitinkamai.

Mono-atsparumas AMK, KAN ir KAP abiejose grupėse skyrėsi. Statistiškai reikšmingi rezultatai nustatyti XDR TB grupėje, kur didžioji dauguma padermių buvo mono-atsparios KAN, lyginant su pre-XDR TB kultūromis, (23; 64% ir 2; 12,5%, atitinkamai). Mono-atsparumas AMK nustatytas tik vienai XDR TB kultūrai, o mono-atsparių KAP padermių aptikta nebuvo.

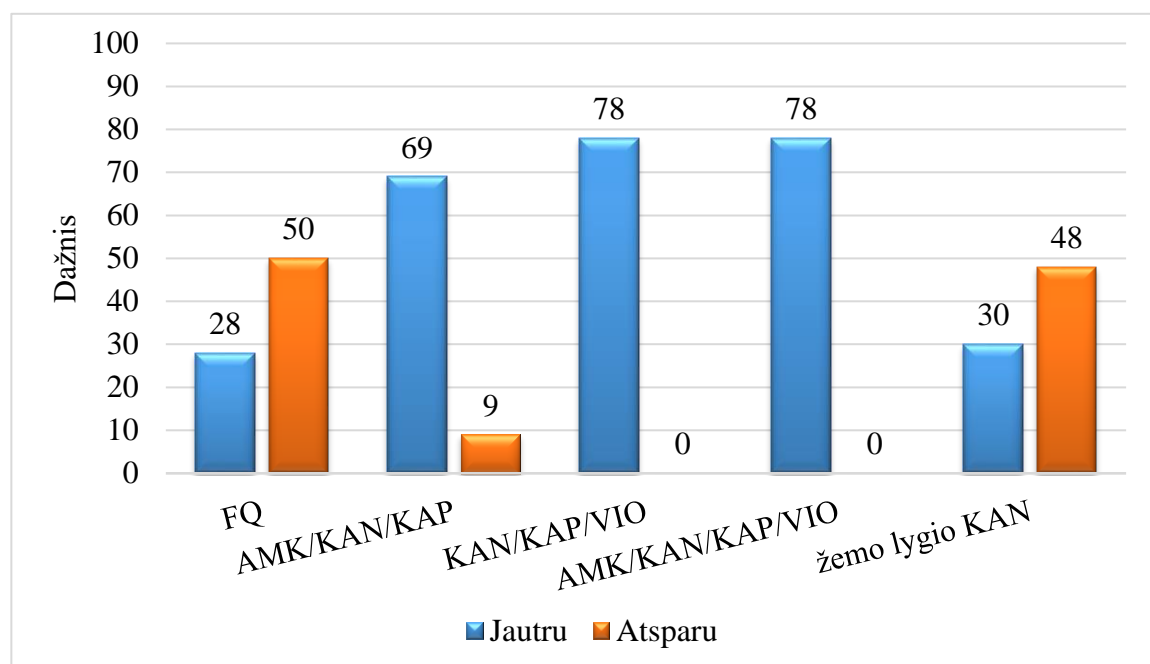
9 lentelė. Fenotipiniu metodu tirtu kryžminio atsparumo vaistams analizė

Atsparumas vaistams	pre-XDR TB padermių skaičius N (%)	XDR TB padermių skaičius N (%)	P*	Bendras padermių skaičius N (%)
AMK/KAN/KAP	2 (12,5)	4 (11)	1	6 (11,5)
AMK/KAN	2 (12,5)	3 (8)	0,64	5 (10)
AMK/KAP	0	0	0	0
KAN/KAP	1 (6)	5 (14)	0,65	6 (11,5)
AMK	0	1 (3)	1	1 (2)
KAN	2 (12,5)	23 (64)	0,0006	25 (48)
KAP	0	0	0	0

Taikant chi-kvadratų asociacijos kriterijų tarp grupių ir atsižvelgus į skirtingą atsparumą vaistams, patikrinta homogeniškumo hipotezė. Aptikus kryžminį atsparumą trims vaistams (AMK/KAN/KAP), dviem (AMK/KAN ir KAN/KAP), bei nustačius mono-atsparumą AMK tarp grupių paskaičiuoti maži tikėtini dažniai (<5), dėl χ^2 kriterijaus nepakankamo tikslumo, pritaikytas tikslusis Fišerio kriterijus. Nustatyta, kad pre-XDR TB ir XDR TB grupėse atsparumas šiems antimikobakteriniams vaistams statistiškai reikšmingai nesiskiria, esant reikšmingumo lygmeniui 0,05. Tačiau vertinant atsparumą KAN tarp pre-XDR TB ir XDR TB grupių, nustatyti tikėtini dažniai didesni nei 5, pritaikius χ^2 kriterijų nustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas ($p < 0,05$; $p = 0,0006$).

3.2. PGR metodu gautų rezultatų įvertinimas

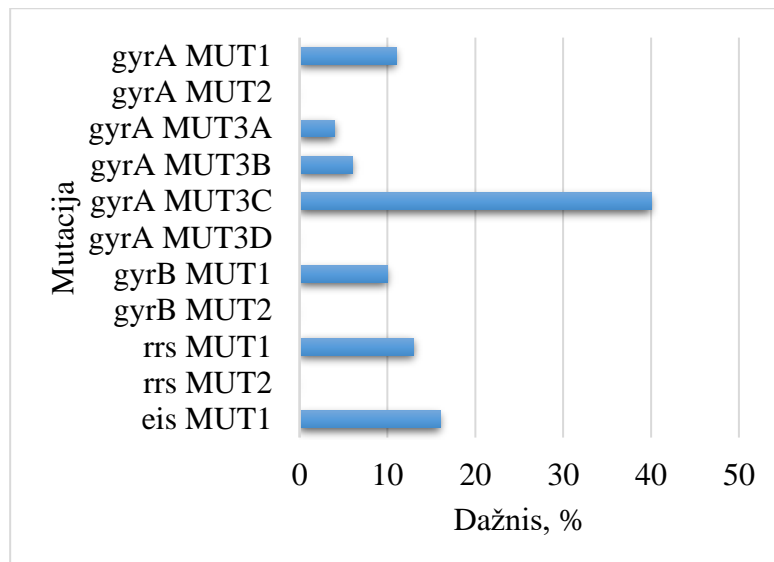
Įvertinus atsparumą antros eilės injekciniams vaistams PGR metodu, nustatyta (8 pav.), kad tiriamojoje imtyje (N= 78) daugiau nei pusė *M. tuberculosis* padermių yra atsparios FQ - 50 (64%) ir turi žemo lygio atsparumą KAN - 48 (62%). Tik nedidelė dalis tirtų mikobakterijų padermių (9; 12%) turėjo kryžminį atsparumą AMK/KAN/KAP, dauguma jų (69; 88%) buvo jautrios šiems antibiotikams. Tiroje mikobakterijų imtyje padermių kryžmiškai atsparių KAN/KAP/VIO ir AMK/KAN/KAP/VIO nustatyta nebuvo.



8 pav. PGR metodu nustatytas atsparumas antros eilės injekciniams vaistams nuo TB

3.2.1. Atsparumą antibiotikams lemiančios genų mutacijos

Analizuojant *M. tuberculosis* padermių genų mutacijų dažnį pasirinktoje imtyje (9 pav.), nustatyta, jog procentiniu atžvilgiu vyrauja *gyrA* geno mutacijos (50%), lemiančios atsparumą FQ. Dažniausiai aptikta *gyrA* MUT3C mutacija - 28 (40%) atvejų. Taip pat 3 TM padermėse buvo nustatytos įvairios *gyrA* geno mutacijų kombinacijos: MUT3B ir MUT3C, MUT1 ir MUT3C, MUT1 ir MUT3B. Mutacijos *gyrB* gene aptiktos rečiau: iš 78 padermių MUT1 aptikta 7 (10%) padermėse. Nedidelė dalis TM padermių turėjo *rrs* MUT1 (9; 13%) mutaciją, lėmusią kryžminį atsparumą AMK/KAN/KAP ir *eis* geno mutaciją MUT1 (11; 16%), lėmusią atsparumą KAN. Tyrimo metu *gyrA* MUT2, *gyrA* MUT3D, *gyrB* MUT2, *rrs* MUT2 mutacijos nenustatytos, tai leidžia daryti prielaidą, jog šios mutacijos gana retos.



9 pav. PGR metodu nustatytas *M. tuberculosis* genų mutacijų dažnis

Išanalizuotas genų mutacijų pasiskirstymo dažnis, atsižvelgiant į TM fenotipinį atsparumą vaistams (10 lentelė). Nustatyta, kad 6 *M. tuberculosis* padermės su kryžminiu atsparumu AMK/KAN/KAP turėjo *gyrA* MUT1 ir *rrs* MUT1 genų mutacijas, o 5 padermės su kryžminiu atsparumu AMK/KAN – *eis* MUT1 geno mutaciją. *GyrA* MUT3C mutacija nustatyta 3 KAN/KAP atspariose padermėse. Vertinant fenotipiškai KAN mono-atsparias TM padermes, didžioji jų dalis (N=25) turėjo *gyrA* MUT3C mutaciją. Vienoje AMK mono-atsparioje padermėje rastos 2 mutacijos (MUT3C ir *rrs* MUT1). TM padermės su kryžminiu atsparumu AMK/KAP ir mono-atsparios KAP mutacijų neturėjo.

10 lentelė. Atsparumo vaistams ir jį lemiančių genų mutacijų analizė

Mutacija	AMK/KAN/ KAP N=6	AMK/ KAN N=5	AMK/ KAP N=0	KAN/ KAP N=6	AMK N=1	KAN N=25	KAP N=0	Bendras skaičius
<i>gyrA</i> MUT1	3	1	0	0	0	2	0	6
<i>gyrA</i> MUT2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>gyrA</i> MUT3A	0	0	0	0	1	1	0	2
<i>gyrA</i> MUT3B	1	0	0	0	0	2	0	3
<i>gyrA</i> MUT3C	1	2	0	3	0	17	0	23
<i>gyrA</i> MUT3D	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>gyrB</i> MUT1	0	0	0	1	0	3	0	4
<i>gyrB</i> MUT2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>rrs</i> MUT1	4	0	0	1	1	1	0	7
<i>rrs</i> MUT2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>eis</i> MUT1	0	5	0	1	0	3	0	9

3.3. Fenotipiniu ir PGR metodais gautų rezultatų palyginimas

Siekiant nustatyti PGR metodo jautrumą, specifiškumą, prognostines vertes, visi tyrimų rezultatai buvo suskirstyti į tikrai teigiamus (TT), tikrai neigiamus (TN), klaidingai teigiamus (KT) ir klaidingai neigiamus (KN). Fenotipinį tyrimą laikant „auksinio standarto“ metodu, o atsparumą vaistui – teigiama reikšme, nustatyti TT atvejai, kai abiem metodais aptiktas atsparumas tiriamam vaistui, o TN atvejai - kai abiem metodais nustatytas jautrumas tiriamam vaistui. Taip pat nustatyti KT ir KN atvejai, kai fenotipinio ir PGR metodų rezultatai nesutapo (11 lentelė).

Apskaičiuotas PGR metodo jautrumas, specifiškumas, teigiama (TPV) ir neigiama prognostinė vertė (NPV) atskiriems vaistams (FQ, AMK, KAN, KAP). Nustatyta, kad PGR metodo jautrumas FQ yra labai aukštas ir siekia net 98%, specifiškumas – 82%, TPV – 88%, NPV – 96%. Vertinant PGR metodo jautrumą ir specifiškumą AMK ir KAP, buvo gauti identiški rezultatai: žemas jautrumas aminoglikozidams - 42%, tačiau ganėtinai aukštas specifiškumas – 94%, atitinkamai paskaičiuotos TPV (55%) ir NPV (90%). PGR metodu įvertintas žemo lygio atsparumas KAN, rezultatai palyginti su fenotipiniu atsparumu KAN rezultatais. Nustatytas gana aukštas metodo jautrumas (88%), tačiau žemesnis specifiškumas (69%), bei TPV – 77% ir NPV – 83%.

Lyginant fenotipinio ir PGR metodų rezultatus, Excel programa apskaičiuotas sutapimo procentas. Didžiausias rezultatų glaudumas stebėtas tiriant FQ - rezultatų sutapimas tarp metodų siekė 86%, mažiausias sutapimas nustatytas tiriant atsparumą AMK ir KAP (sutapo 31% tyrimų rezultatų).

11 lentelė. Fenotipiniu ir PGR metodai gautų rezultatų palyginimas

Vaistas	TT	TN	KT	KN	Jautrumas (%)	Specifiškumas (%)	TPV (%)	NPV (%)	Sutapimo procentas (%)	Kappa-vertė
FQ	44	27	6	1	98	82	88	96	86	0,81
AMK	5	62	4	7	42	94	55	90	31	0,4
KAN	37	25	11	5	88	69	77	83	70	0,58
KAP	5	62	4	7	42	94	55	90	31	0,4

Norint palyginti abiejų metodų rezultatų sutapimą, SPSS programa apskaičiuotas Koheno kapos koeficientas (kitais Kappa koeficientas), kuris įvertina metodo tikslumą, paklaidą. Kappa koeficiento reikšmės pateikiamos skalėje nuo -1 iki 1. Aukštas metodų sutapimas nustatomas, pasiekus 1 Kappa koeficientą, rezultatams toliant nuo 1, lyginamų metodų rezultatų sutapimas mažėja, pvz., jei Kappa koeficientas yra 0,41-0,60 – sutapimas vidutinis, jei 0,61-0,80 - sutapimas didelis, jei 0,81-0,99 – sutapimas labai didelis, beveik idealus [77, 82].

Taigi, vertinant PGR ir fenotipinio metodų sutapimą, nustatytas labai aukštas Kappa koeficientas (0,81) FQ, vidutinis metodų sutapimas nustatytas KAN (0,58), žemiausias Kappa koeficientas apskaičiuotas AMK ir KAP (0,4).

3.4. Rezultatų aptarimas

Apibendrinus fenotipiniu metodu gautus rezultatus buvo nustatyta, kad didžiąją dalį tiriamosios imties sudarė XDR TB (36; 69%) padermės, kiek mažiau nustatyta pre-XDR TB (16;

31%). Remiantis PSO duomenimis, 2016 m. Lietuvoje buvo registruoti 58 (23,8%) XDR TB atvejai [86]. Stebint bendrąsias XDR TB tendencijas Baltijos šalyse (Latvijoje, Lietuvoje, Estijoje), 2012-2016 m. XDR TB atvejų skaičius jose išaugo nuo 13,9 iki 20,6% [70]. Taigi, atliktas tyrimas išryškino vis blogėjančią XDR TB situaciją Lietuvoje, turinčią tendenciją augti, jeigu nebus imtasi griežtų TB prevencijos ir kontrolės priemonių.

Tyrimo metu aptiktos 7 (9%) heterorezistentiškos TM padermės, turinčios laukinio tipo ir mutacijos juosteles. Yra žinoma, kad heterorezistentiškos TM padermės gali atsirasti lėtinės infekcijos atveju, po recidyvų ar nutraukto TB gydymo, taip pat gydymo metu, esant suboptimaliam vaisto kiekiui arba šeimininką infekavusių “miksiuotų” infekcijų, turinčių skirtingas padermes, atveju [11, 38]. 2011-2013 m. Kontsevaya I. ir kt. bendraautorių atlikto tyrimo duomenimis, kurio metu buvo iširta 512 Lietuvos, Latvijos ir Rusijos TM padermių, buvo aptikta 13 (5,9%) heterorezistentiškų padermių [44]. Mūsų tyrimo metu nebuvo galimybės nustatyti sergančiųjų TB pacientų gydymo kategorijų, informacijos apie nutrauktą gydymą, tačiau galima teigti, kad heterorezistentiškumas yra neretas reiškinys, o atsižvelgiant į vis blogėjančius atsparios TB gydymo rezultatus ir nepakankamą infekcijos kontrolę, gali ateityje didėti.

Mokslinėje literatūroje nurodoma, jog TM heterorezistentiškumas gali būti esmine PGR ir fenotipinio metodų rezultatų nesutapimo priežastimi. Be to, šių tyrimų rezultatai gali nesutapti dėl žemo lygio atsparumo vaistui, įvairių genų mutacijų, kitų atsparumo mechanizmų, kurių taikomais metodais neaptiksime [22, 23]. Atliktame tyrime PGR metodu tirtose 5 heterorezistentiškose padermėse aptikta *rrs* geno mutacija, lemianti kryžminį atsparumą AMK/KAN/KAP, taip pat nustatyti abu išryškėję *rrs* geno laukinio tipo žymenys. Ištyrus šias padermes fenotipiniu metodu, atsparumas bent vienam aminoglikozidui nustatytas tik 3 padermėse. PGR metodu heterorezistentiškumas 2 padermėse aptiktas ir FQ. Iš jų tik viena padermė buvo fenotipiškai atspari OFL. Taigi, tokie nesutapimai komplikuoja tyrimo vertinimą ir interpretaciją bei nusako apie tai, kad egzistuoja kiti atsparumą vaistui sąlygojantys veiksniai, kurių dar negalima aptikti turimais metodais [22, 23].

3.4.1. Fenotipiniu metodu gautų rezultatų aptarimas

Atlikus fenotipinio tyrimo rezultatų analizę nustatyta, kad daugiau nei pusė TM padermių buvo jautrios AMK ir KAP bei atsparios KAN ir FQ. Remiantis Lietuvos TB registro duomenimis, 2015-2016 m. TM atsparumas AMK mūsų šalyje siekė 12,4%, KAP – 6,8%, KAN – 40,4% ir OFL – 40%. Lyginant su 2009 m. literatūroje pateiktais duomenimis, atsparumas AMK ir KAP Lietuvoje siekė apie 10%, OFL - 21,8%, KAN - 30,1% [33]. Taigi, apibendrinant šiuos duomenis galima teigti, jog atsparumas injekciniams vaistams nuo TB mūsų šalyje auga, ir tai yra viena priežasčių, bloginančių TB epidemiologinę situaciją.

Dar didesnę nerimą kelia ypatingai išaugęs TM atsparumas dviem labai efektyviems antimikobakteriniams vaistams - OFL ir KAN. Remiantis literatūros duomenimis, FQ atsparumo plitimui visame pasaulyje turi įtakos platus šių vaistų veikimo spektras, taip pat šie AB skiriami daugeliui infekcijų gydyti [57]. Lietuvoje daugiau kaip 97% OFL sunaudoja TB skyriai, jis yra vartojamas MDR ir XDR TB gydymui. Mikobakterijų atsparumo mechanizmai, tokie kaip išmetimo pompos, taip pat prisideda prie atsparumo FQ išsivystymo, nes vaistų išmetimo pompos indukuoja antituberkulioziniai vaistai, pavyzdžiui, R, ir jos geba pašalinti antimikobakterinius vaistus [49, 84].

Aminoglikozido KAN atveju taip pat stebimas didėjantis atsparumas šiam vaistui. Statistiškai reikšmingi rezultatai gauti pre-XDR ir XDR TB grupėse, analizuojant atsparumą KAN ($p < 0,05$). Iš pateiktų duomenų matyti, kad beveik 12 kartų daugiau atsparių KAN padermių nustatyta XDR TB grupėje. Analizuojant kitus vaistus reikšmingų skirtumų nerasta.

3.4.2. PGR metodu nustatyto atsparumo vaistams ir jį lemiančių genų mutacijų aptarimas

PGR metodu, taip pat, kaip ir fenotipiniu metodu, didžiausias atsparumas tiriamojoje imtyje nustatytas FQ. Šie duomenys patvirtina atsparių FQ TM plitimą.

FQ grupės vaistai veikia *M. tuberculosis* DNR girazę, kurią koduoja *gyrA* (320 bp) ir *gyrB* (428 bp) genai. Atsparumas FQ dažniausiai išsivysto dėl įgytų mutacijų už FQ atsparumą apsprendžiančiame regione (QRDR), *gyrA* ir *gyrB* genuose [6, 13, 48]. Analizuojant 78 *M. tuberculosis* padermes didžiausias mutacijų dažnis buvo nustatytas *gyrA* gene. Literatūros šaltiniuose nurodoma, kad 42-85% FQ atsparių mikobakterijų pasižymi mutacija tik *gyrA* gene [48, 72]. Remiantis kitų šalių (Švedija, Vokietija, Italija) 2009-2013 m. duomenimis, dažniausios *gyrA* geno mutacijos yra MUT1 (A90V) ir MUT3C (D94G) [76]. Ištirtoje imtyje vyravo *gyrA* geno MUT3C (D94G) mutacija, palyginti dažnai aptikta ir MUT1 (A90V) mutacija. Aptariant *gyrB* geno mutacijas, svarbu paminėti, kad TM padermėse jų buvo nustatyta (7; 10%) gana mažai. Tačiau net ir labiausiai TB paplitusiose šalyse (pavyzdžiui, Indijos valstijoje) mutacijos *gyrB* gene nustatomos ne dažnai (7%) [72]. Nepaisant to, reikia pripažinti, kad dar ne visos *gyrB* geno mutacijos yra žinomos [48].

Kiti injekciniai antibiotikai, aminoglikozidai KAN ir AMK, cikliniai peptidai KAP ir VIO, visi jie – antros eilės vaistai MDR TB gydymui. Šie antibiotikai slopina baltymų transliacijos procesą, prisijungdami prie 16s rRNR. Minėti vaistai turi tą patį taikinį, jungiasi panašioje ribosomos padėtyje [13, 28, 63, 88]. Atsparumą aminoglikozidams gali sąlygoti nepralaidi ląstelės sienelė, anaerobinis metabolizmas, vaistų išmetimo pompos. Įgytas atsparumas išsivysto dėl genų mutacijų 16s rRNR *rrs* gene. Pakinta sienelės pralaidumas, gaminami modifikuoti fermentai, kurie veikia antimikobakterinius vaistus. Pasikeitusios struktūros AB praranda afinitetą ribosomos

subvienetui ir negali stabdyti 16s rRNR baltymų sintezės [88]. Nepaisant galimų atsparumą lemiančių veiksnių gausos, PGR metodu ištirtose padermėse nustatytas didelis jautrumas aminoglikozidams. Tyrimo metu nustatyta *rrs* geno mutacija MUT1 (A1401G), kuri siejama su aukštu kryžminių atsparumu tarp aminoglikozidų (AMK, KAN, KAP) [10, 13]. Mokslinėje literatūroje minima, kad dažniausios mutacijos, lemiančios kryžminį TM atsparumą aminoglikozidams yra A1401G, C1402T ir G1484T [10, 63, 88]. Padermės, turinčios aukštą atsparumą KAN yra kryžmiškai atsparios kitiems, panašios struktūros ribosomos subvienetą blokuojantiems AB kaip AMK ir KAP [2, 13, 88]. Ahmad K. ir kitų autorių nuomone, A1401G mutacija yra laikoma atsparumo aminoglikozidams diagnostiniu žymeniu, tai patvirtina nustatyta aukšta koreliacija tarp mutacijos ir atsparumo vaistui. Kitos mutacijos *rrs* gene mažiau siejamos su atsparumu vaistams, todėl neturi tokios reikšmės diagnostikoje [2]. *Rrs* geno mutacija MUT2 (G1484T), lemianti atsparumą tarp AG ir CP (AMK, KAN, KAP, VIO) 78 padermėse neaptikta. Galima įtarti, jog atsparumas neišvystytas VIO, kuris Lietuvoje TB gydymui yra nenaudojamas, vaistas labai brangus, sukeliantis neigiamą toksinį poveikį organizmui.

Aptariant gautus rezultatus pastebėta, jog beveik pusė ištirtų padermių turėjo žemo lygio atsparumą KAN (*angl.* low-level KAN). Remiantis literatūros duomenimis, 30-80% KAN atspariose padermėse yra nustatomas žemo lygio atsparumas KAN, kuris siejamas su mutacija *eis* geno promotoriaus regione (-10 ir -35 zonoje). Garzan A. ir kiti mokslininkai teigia, kad *eis* genas koduoja viduląstelinį stiprintuvą, kuris atsakingas už acetiltransferazės aktyvumą. Aktyvi acetiltransferazė geba acetilinti įvairius aminoglikozidus, tarp kurių – antituberkulioziniai vaistai KAN ir AMK. Mokslininkai aiškina, kad acetilo grupės pernešimas nuo acetil-KoA ant lizino amino rūgščių pakeičia antibiotiko struktūrą. Vandenilio atomo pakeitimas acetilo grupe (-COCH₃) sumažina antibiotikų aktyvumą, todėl nustatomas atsparumas vaistui [28]. Pasak Zaunbrecher MA., žemo lygio atsparumas KAN negali būti priskiriamas nei vienam iš žinomų atsparumo mechanizmų [88]. Kol kas nėra metodų, kurie atskleistų *eis* geno promotoriaus mutacijų asociacijas su AMK, todėl mutacijos nustatytos *eis* geno promotoriuje siejamos su atsparumu tik KAN [10].

Nors PGR metodu *eis* geno promotoriaus mutacija MUTC1 (C14T) nustatyta 11 (14%) padermių, likusios 67 (86%) *M. tuberculosis* padermės mutacijų neturėjo, tačiau iš jų, net 37 (47%) padermėse buvo neaptiktas nors vienas laukinio tipo genas, todėl atsparumas žemo lygio KAN tirtose TM padermėse – dažnas.

Visgi, atlikti koreliacijos tyrimai Indijoje įrodė, jog *eis* geno mutacijos mažiau siejamos su atsparumu KAN, nei mutacijos esančios *rrs* gene [36]. Nepaisant stipresnio ryšio tarp *rrs* geno mutacijos ir atsparumo KAN, yra svarbu nustatyti *eis* geno mutaciją, nes dėl atviros hibridizacijos sistemos gali įvykti kryžminis užteršimas pagausintais PGR produktais, ir jei nėra nustatomos *eis*

geno mutacijos, tai gali mažinti metodo specifiškumą ir jautrumą [10]. Gikalo MB. ir kiti autoriai teigia, kad nustačius mutaciją *rrs* ir *eis* genuose (ypač esant A1401G ir C14T mutacijoms), nustatomas aukštas atsparumas KAN [29].

Tyrime išanalizavus mutacijų dažnį pagal fenotipiniu metodu nustatytą atsparumą AB, pastebėtas įdomus niuansas. Fenotipiškai AMK ir KAN atspariose padermėse dažniausiai aptikta *eis* geno mutacija, nors remiantis literatūra, *eis* geno mutacija lemia atsparumą vien tik KAN, o *rrs* geno mutacija – dominuoja aminoglikozidams atspariose padermėse. Sunkiai suprantami rezultatai, mutacijų nebuvimas AMK ir KAP fenotipiškai atspariose padermėse, bei KAP monoatspariose padermėse, leidžia manyti, jog egzistuoja mutacijų, kurių GenoType® MTBDRs/ VER 2.0 rinkiniu negalime aptikti arba veikia atsparumo mechanizmai, kurie PGR metodu nenustatomi.

3.4.3. Kryžminio atsparumo vaistams fenotipiniu ir PGR metodais rezultatų aptarimas

Kryžminio atsparumo tarp tos pačios grupės AB problema tampa vis aktualesnė. Dėl panašios vaistų struktūros ir to pačio mutavusio vaistų taikinio, šis reiškinys pasaulyje sparčiai plinta [50, 51]. Siekiant nustatyti ir įvertinti kryžminį atsparumą tarp plaučių tuberkulioze sergančių pacientų dviem skirtingais metodais buvo išanalizuotos 78 *M. tuberculosis* padermės.

Fenotipiniu metodu nustatyta kryžmiškai atsparių padermių pre-XDR TB grupėje, šis radinys gali būti siejamas su neteisingai parinkta gydymo terapija ir sąlygoti tolesnį vaistams atsparių padermių vystymąsi bei plitimą [51].

Tyrimo metu nustatyta, kad rezultatai tarp fenotipinio ir PGR metodų skiriasi. Analizuojant kryžminį atsparumą PGR metodu, nustatyta daugiau kryžmiškai atsparių AMK/KAN/KAP TM kultūrų, nei fenotipiniu metodu. Padermėse, kuriose yra aptinkama *rrs* geno mutacija, siejama su kryžminiu atsparumu trimis vaistams, buvo nustatyta fenotipiškai jautrių vienam ar keliems AB padermių. Fenotipiniu metodu nustatytas kryžminis atsparumas tik tarp dviejų aminoglikozidų įrodo, kad ne visada PGR metodu nustatyta mutacija lemia pilną atsparumą visiems tos pačios grupės AB. Vis dėlto, literatūroje minima, kad padermėje nustačius kelias su kryžminiu atsparumu siejamas mutacijas, vaistų MSK kinta labiau, nei aptikus tik vieną mutaciją. Teigiama, kad egzistuoja ir kiti kryžminio atsparumo mechanizmai, pvz., vaisto išmetimo pompos, kurios prisideda prie kryžminio atsparumo vaistams išsivystymo [53]. Taigi, kryžminio atsparumo fenomenas yra sutinkamas, tačiau kol kas dar ne visiškai suprastas. Norint detaliau išanalizuoti šią problemą, reikėtų atlikti didesnės apimties studijas, būtų galima į tyrimą įtraukti ir *tlyA* geno mutacijų ištyrimą, kurios siejamos su kryžminiu atsparumu tarp ciklinių peptidų (KAP ir VIO).

Siekiant įvertinti PGR metodo galimybes, buvo analizuotas metodo tikslumas konkrečiam vaistui. Aukšti metodo tikslumą apibūdinantys rodikliai nustatyti tiriant atsparumą FQ. Panašūs rezultatai pateikti 2009-2010 m. Lietuvoje ir Danijoje atliktose studijose, jautrumas

FQ siekė 91%, o specifiškumas net 100% [6]. Remiantis Prancūzijoje atliktais Brossier F. ir kitų autorių tyrimais, kurių metu iširtos 127 *M. tuberculosis* padermės, nustatytas jautrumas FQ sudarė ~95%, specifiškumas – 98% [8]. Tagliani E. ir kiti tyrimo bendraautoriai nustatė GenoType® MTBDRsl VER 2.0 rinkiniu PGR metodo jautrumą FQ – 84%, specifiškumą – 100%, apskaičiavo TPV – 100%, NVP – 93% [76]. Nepaisant patikimo metodo įvertinimo FQ, pastebėta, kad atsparumo AMK ir KAN tikimybė PGR metodu nustatoma nepakankamai tiksliai. Analizuojant kitų autorių pateiktus rezultatus, aptikta, jog jautrumas aminoglikozidams yra daug didesnis – 89%, specifiškumas 92% [76]. Remiantis Bang D. ir kitų bendraautorių rezultatais, kur buvo analizuojamos Lietuvos TM padermės, jautrumas ir specifiškumas aminoglikozidams siekė 89% ir 77%, atitinkamai [6]. Galbūt tokius rezultatus lėmė *eis* geno promotoriaus mutacija, kurią PGR metodu galime aptikti, o „auksinio standarto“ metodu žemo atsparumo lygį KAN sudėtinga nustatyti. Mokslinėje literatūroje minima, kad fenotipiniu metodu žemo lygio atsparumas vaistui gali būti neaptinkamas [8; 76]. Tokiu atveju tikslinga būtų atlikti *M. tuberculosis* padermių viso genomo sekoskaitą (*angl.* whole genome sequencing). Mikobakterijų viso genomo sekoskaita yra laikoma naujausiu „auksiniu standartu“, identifikuojant su atsparumu vaistui siejamas mutacijas. Tačiau sekvenuojant genomą, atsparumą lemianti mutacija nustatoma, jei ji aptinkama >50% nusekvenuotuose genomuose. Taip pat ir kiti molekulinė biologija pagrįsti metodai yra mažiau jautrūs minimaliems mutacijų kiekiams. Fenotipiniu pasėlio metodu nustatome atsparumą vaistui, jei 1% ar daugiau mikobakterijų yra atsparios. Todėl interpretuojant PGR ir fenotipiniu metodais gautus rezultatus įmanomi skirtumai, dažniausiai dėl skirtingo metodų jautrumo [22].

Nepaisant PGR metodo trūkumų, jis yra „nepakeičiamas skubios diagnostikos įrankis“, ypatingai MDR ir XDR TB atveju. Greiti molekulinės biologijos tyrimo metodai padeda anksti diagnozuoti ligą, nustatyti atsparumą vaistui. PSO rekomenduoja atlikus PGR tyrimą, paraleliai atlikti ir klasikinius fenotipinius tyrimus bei įvertinti PGR metodo ir „auksinio standarto“ rezultatų panašumą, ryšį [2].

IŠVADOS

1. Ištyrus 78 *M. tuberculosis* padermes fenotipiniu metodu nustatyta, kad didžioji dauguma (66; 85%) buvo jautrios AMK ir KAP, daugiau nei pusė - atsparios OFL (45; 58%) ir KAN (42; 54%).
2. PGR metodu ištyrus 78 *M. tuberculosis* padermes nustatyta, kad daugiau nei pusė jų buvo atsparios FQ (50; 64%) ir turėjo žemo lygio atsparumą KAN (48; 62%), 9 (12%) padermėms nustatytas pilnas kryžminis atsparumas aminoglikozidams (AMK, KAN, KAP). PGR metodas yra pakankamai jautrus ir specifiškas FQ (98% ir 82%, atitinkamai), mažai jautrus, bet specifiškas AMK ir KAP (42% ir 94%, atitinkamai). PGR metodo TPV ir NPV didžiausia FQ (88% ir 96%, atitinkamai).
3. PGR metodu aptiktos genų mutacijos, siejamos su atsparumu FQ ir aminoglikozidams. Tiriamojoje imtyje vyravo (50% atvejų) *gyrA* geno mutacija (D94G), siejama su fenotipiniu atsparumu FQ, 9 *M. tuberculosis* padermės turėjo *rrs* geno mutaciją (A1401G), kuri lėmė kryžminį atsparumą aminoglikozidams, 11 padermių - *eis* geno mutaciją (C14T), siejamą su monoatsparumu KAN.
4. Tiroje *M. tuberculosis* imtyje (N=78) nustatytas nepilnas kryžminis atsparumas antros eilės injekciniams (AMK, KAN, KAP) vaistams nuo TB. Lyginant abiejų metodų rezultatus, pilnas kryžminis atsparumas vaistams fenotipiniu metodu aptiktas tik 6 padermėse, PGR metodu – 9, visos kitos TM padermės kryžminio atsparumo neturėjo. Dėl šios priežasties būtų tikslinga visuomet atlikti fenotipinius jautrumo vaistams tyrimus.

SANTRAUKA

Magistro baigiamojo darbo autorius: **Greta Šliužaitė**

Magistro baigiamojo darbo vadovė: **Prof., habil. dr. Zita Aušrelė Kučinskienė**

Magistro baigiamojo darbo konsultantė: **Edita Vasiliauskienė**

Vilnius 2018

Darbo pavadinimas: Plaučių tuberkulioze sergančių pacientų *M. tuberculosis* padermių kryžminio atsparumo antros eilės injekciniams vaistams įvertinimas fenotipiniu ir PGR metodais.

Darbo tikslas: nustatyti *M. tuberculosis* kryžminį atsparumą injekciniams vaistams nuo tuberkuliozės fenotipiniu ir PGR metodais.

Darbo uždaviniai: Įvertinti *M. tuberculosis* jautrumą antros eilės injekciniams vaistams fenotipiniu metodu; nustatyti *M. tuberculosis* atsparumą antros eilės antibiotikams PGR metodu; įvertinti PGR metodo jautrumą ir specifiškumą, apskaičiuoti teigiamą ir neigiamą prognostines vertes; PGR metodu aptikti genų mutacijas, lemiančias atsparumą antros eilės antimikobakteriniams vaistams; nustatyti ir įvertinti kryžminį atsparumą vaistams fenotipiniu ir PGR metodais.

Tyrimo objektas ir metodai. VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros Klinikų Laboratorinės medicinos centro Tuberkuliozės tyrimų laboratorijoje iširtos 78 *M. tuberculosis* kultūros išskirtos iš plaučių tuberkulioze sergančių pacientų ėminių. Tyrimas vykdytas nuo 2017 m. vasario mėn. iki 2017 m. lapkričio mėn. Remiantis fenotipiniu ir PGR metodu, įvertintas *M. tuberculosis* padermių jautrumas antros eilės injekciniams vaistams, nustatytos dažniausios genetinės mutacijos, lemiančios kryžminį atsparumą antibiotikams.

Rezultatai ir išvados. PGR metodu didžiausias atsparumas nustatytas fluorochinolonams ir žemo lygio atsparumas kanamicinui. Nustatytas aukštas metodo jautrumas fluorochinolonams - 98%, aukštas specifiškumas aptiktas tiriant amikaciną ir kapreomiciną - 94%. Dažniausia fluorochinolonams atsparumą lemianti mutacija nustatyta *gyrA* gene - D94G, 9 padermėse aptikta *rrs* geno A1401G mutacija, siejama su kryžminiu atsparumu aminoglikozidams, G1484T mutacija nenustatyta. 11 *M. tuberculosis* padermių pasižymėjo *eis* geno mutacija C14T, siejama su monoatsparumu kanamicinui. Palyginus PGR metodu gautus rezultatus su „auksinio standarto“ metodu, nustatytas nepilnas kryžminis atsparumas antros eilės injekciniams (AMK, KAN, KAP) vaistams nuo TB. Dėl šios priežasties yra tikslinga visuomet atlikti fenotipinius jautrumo vaistams tyrimus visiems injekciniams vaistams.

Raktažodžiai: *M. tuberculosis*, kryžminis atsparumas vaistams.

SUMMARY

Authors of Master's degree scientific research work: **Greta Šliužaitė**

Head of Master's degree scientific research work: **Prof., habil. dr. Zita Aušrelė Kučinskienė**

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

Vilnius 2018

Full title of the thesis: Phenotypic and Molecular Analysis of Cross-Resistance to Second Line Injectable Drugs in Clinical Isolates From Pulmonary Tuberculosis Patients.

The aim of the study: To determine the cross-resistance of *M. tuberculosis* to injectable drugs by phenotypic and PCR methods.

Objectives: to evaluate the sensitivity of second line injectables drugs by the phenotypic method; to determine *M. tuberculosis* resistance to second line antibiotics by PCR method; to evaluate sensitivity and specificity of the PCR method; to compute positive and negative predictive values; to detect gene mutations associated with resistance to second line injectables drugs; to determine and evaluate cross-resistance to injectable by phenotypic and PCR methods.

Materials and methods. In this study 78 *M. tuberculosis* strains, isolated from pulmonary patients, were analysed at Vilnius University Hospital Santaros Klinikos Centre of Laboratory Medicine Tuberculosis Laboratory. Analysis was performed from February 2017 to November 2017. Drug susceptibility testing to second line injectable drugs were performed by the phenotypic and PCR methods, the most common genetic mutations, associated with cross-resistance to injectable drugs, were identified.

Results and conclusions. PCR analysis showed that resistance to FQ and low-level KAN occurs more frequently than for most anti-tuberculosis drugs. High sensitivity (98%) was determined to fluoroquinolones, high specificity (94%) was found to amikacin and capreomycin. The most common with fluoroquinolone resistance associated genetic mutation was determined in *gyrA* gene (D94G), only 9 strains had mutation in *rrs* gene (A1401G) that associated with cross-resistance mechanism in aminoglycosides, G1484T mutation was not detected. 11 *M. tuberculosis* strains were characterized by the mutation of the *eis* gene (C14T), which associated with mono-resistance to kanamycin. Since cross-resistance to injectable drugs was not found in all strains, we propose that clinical isolates should be tested phenotypically to all injectables.

Keywords: *M. tuberculosis*, drug resistance, cross-resistance.

PADĖKA

Reiškiu padėką darbo vadovei Prof., habil. dr. Zitai Aušrelei Kučinskienei už vertingas konsultacijas ir pastabas mokslo darbo metu.

Noriu nuoširdžiai padėkoti Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centro Tuberkuliozės tyrimų laboratorijos vedėjai Editai Vasiliauskienei už suteiktą galimybę atlikti magistro darbą jos vadovaujamoje laboratorijoje, už pagalbą, rūpestį, bei naudingus patarimus rašant darbą.

Svarbus aspektas – medicinos biologėms Limai Vasiliauskaitei, Aistei Poškutei ir Uršulei Miknevičiūtei už palaikymą, kantrybę ir pagalbą atliekant tyrimus laboratorijoje.

Pagarbiai,
Greta Šliužaitė

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Acosta CD, Dadu A, Ramsay A, Dara M. Drug-resistant tuberculosis in Eastern Europe: challenges and ways forward. *Public Health Action* 2014; 4: S3–S12; DOI: 10.5588/pha.14.0087.
2. Ahmad K, Ahmad Z, Somayya R, Ali A, Rahat S. Analysis of *rrs* gene mutations in amikacin resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Microb Pathog* 2017; 108: 66-70; DOI: 10.1016/j.micpath.2017.05.002.
3. Andersom L, Baddeley A, Dean A, Dias HM, Falzon D, Floyd K, et al. Global tuberculosis report 2017.
4. Asmar S, Chatellier S, Mirande C, Belkum A, Canard I, Raoult D, et al. A Novel Solid Medium for Culturing *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Clinical Specimens. *J Clin Microbiol* 2015; 53(8): 2566-2569; DOI: 10.1128/JCM.01149-15.
5. Balabanova Y, Radiulyte B, Davidaviciene E, Hooper R, Ignatyeva O, Nikolayevskyy V, et al. Risk factors for drug-resistant tuberculosis patients in Lithuania, 2002–2008. *European Respiratory Journal* 2012; 39: 1266-1269; DOI: 10.1183/09031936.00133911.
6. Bang D, Andersen SR, Vasiliauskiene E, Rasmusse ME. Performance of the GenoType MTBDR*plus* assay (v2.0) and a new extended GenoType MTBDR*sl* assay (v2.0) for the molecular detection of multi- and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* on isolates primarily from Lithuania. *J Diagn Microbiol Infect Dis* 2016; 86: 377–381; DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.08.026.
7. Bonamonte D, Romita P, Verni P, Angelini G. Mycobacteria. *Microbial Skin Infections* 2017; 1-9; DOI: 10.1007/978-3-319-48538-6_1.
8. Brossier F, Guindoa D, Phama A, Reibela F, Sougakoffa W, Vezirisa N, et al. Performance of the new version (v2.0) of the GenoType MTBDR*sl* test for detection of resistance to second-line drugs in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J Clin Microbiol* 2016; 54: 1573-1580; DOI: 10.1128/JCM.00051-16.
9. Brossier F, Sougakoff W, Aubry A, Bernard C, Cambau E, Jarlier V, et al. Molecular detection methods of resistance to antituberculosis drugs in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Médecine et maladies infectieuses* 2017; 47: 340-348; DOI: 10.1016/j.medmal.2017.04.008.
10. Chakravorty S, Lee JS, Cho EJ, Roh SS, Smith LE, Lee J, et al. Genotypic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates for amikacin and kanamycin resistance by use of a rapid sloppy molecular beacon-based assay identifies more cases of low-level drug resistance than phenotypic Lowenstein-Jensen testing. *J Clin Microbiol* 2015; 53(1): 43-51; DOI: 10.1128/JCM.02059-14.

11. Chen L, Zhang J, Zhang H. Heteroresistance of *Mycobacterium tuberculosis* strains may be associated more strongly with poor treatment outcomes than within-host heterogeneity of *M. tuberculosis* infection. *J Infect Dis* 2016; 214(8): 1286-7; DOI: 10.1093/infdis/jiw350.
12. Chew KL, Lin RTP, Teo JWP. MPT64 gene mutations leading to non-reactivity on a rapid immunochromatographic assay. *J Infect Dev Ctries* 2017; 11(4): 371-373; DOI:10.3855/jidc.8768.
13. Cohen KA, Bishai WR, Pym AS. Molecular Basis of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Spectr* 2014; 2(3); DOI: 10.1128/microbiolspec.MGM2-0036-2013.
14. Cole ST. Learning from the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *FEBS Lett* 1999; 452(1-2): 7-10; DOI: 10.1016/S0014-5793(99)00536-0.
15. Cole ST, Barrell BG. Analysis of the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Novartis Found Symp* 1998; 217: 160-72; DOI: 10.1002/0470846526.ch12.
16. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998; 393(6685): 537-44; DOI: 10.1038/31159.
17. Coscolla M, Gagneux S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Seminars in immunology* 2014; 26: 431-444; DOI: 10.1016/j.smim.2014.09.012.
18. Cross LJ, Anscombe C, McHugh TD, Abubakar I, Shorten RJ, Thorne N, et al. A Rapid and Sensitive Diagnostic Screening Assay for Detection of *Mycobacteria* Including *Mycobacterium tuberculosis* Directly from Sputum without Extraction. *International Journal of Bacteriology* 2015; 8; DOI: 10.1155/2015/593745.
19. Cullen MM, Sam NE, Kanduma EG, McHugh TD, Gillespie SH. Direct detection of heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis* using molecular techniques. *J Med Microbiol* 2006 ; 55(8): 1157-8; DOI: 10.1099/jmm.0.46483-0.
20. D'Ambrosio L, Dara M, Tadolini M, Centis R, Sotgiu G, Werf MJ, et al. Tuberculosis elimination: theory and practice in Europe. *Eur Respir J* 2014; 43(5): 1410-20; DOI: 10.1183/09031936.00198813.
21. ECDC technical report. Mastering the basics of TB control: development of a handbook on TB diagnostic methods. Stockholm: ECDC 2011.
22. Engstroma A, Hoffner S, Jureena P. Detection of heteroresistant *Mycobacterium tuberculosis* by pyrosequencing. *J Clin Microbiol* 2013; 51(12): 4210-4212; DOI: 10.1128/JCM.01761-13.
23. Fan X, Xie L, Li W, Xie J. Prophage-like elements present in mycobacterium genomes. *BMC Genomics* 2014; 15: 243; DOI: 10.1186/1471-2164-15-243.
24. Fogel N. Tuberculosis: A disease without boundaries. *Tuberculosis* 2015; 95: 527-531; DOI: 10.1016/j.tube.2015.05.017.

25. Folkvardsen DB, Thomsen VØ, Rigouts L, Rasmussen EM, Bang D, Bornaerts G, Werngren J, et al. Rifampin heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis* cultures as detected by phenotypic and genotypic drug susceptibility test methods. *J Clin Microbiol* 2013; 51(12): 4220-4222; DOI: 10.1128/JCM.01602-13.
26. Gagneux S. Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Reviews Microbiology* 2018; 16: 202–213; DOI: 10.1038/nrmicro.2018.8.
27. Galagan JE. Genomic insights into tuberculosis. *Nat Rev Genet* 2014; 15(5): 307-20; DOI: 10.1038/nrg3664.
28. Garzan A, Willby MJ, Green KD, Gajadeera CS, Hou C, Tsodikov V, et al. Sulfonamide-based inhibitors of aminoglycoside acetyltransferase *eis* abolish resistance to Kanamycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Chem* 2016; 59(23): 10619-10628; DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b01161.
29. Gikalo MB, Nosova EY, Krylova LY, Moroz AM. The role of *eis* mutations in the development of kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Moscow region. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 2107–2109; DOI: 10.1093/jac/dks178.
30. Gyli MS, Borrell S, Trauner A, Gagneux S. Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: mechanistic and evolutionary perspectives. *FEMS Microbiol Rev* 2017; 41: 354-373; DOI: 10.1093/femsre/fux011.
31. Higienos institutas. Sveikatos statistinių duomenų portalas, sergančiųjų asmenų skaičius pagal diagnozių grupes. Interneto prieiga:
https://stat.hi.lt/default.aspx?report_id=168
32. Hoagland DT, Liu J, Lee RB, Lee RE. New agents of the treatment of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2016; 102: 55-72; DOI: 10.1016/j.addr.2016.04.026.
33. Ignatyeva O, Balabanova Y, Nikolayevskyy V, Koshkarova E, Radiulyte B, Davidaviciene E, et al. Resistance profile and risk factors of drug resistant tuberculosis in the Baltic countries. *Tuberculosis* 2015; 95: 581–588; DOI: 10.1016/j.tube.2015.05.018.
34. Ioerger RT, Feng Y, Ganesula K, Chen X, Dobos KM, Fortune S, et al. Variation among Genome Sequences of H37Rv Strains of *Mycobacterium tuberculosis* from Multiple Laboratories. *J Bacteriol* 2010; 192(14): 3645-3653; DOI: 10.1128/JB.00166-10.
35. Jugheli L, Bzekalava N, Rijk P, Fissette K, Portaels E, Rigouts L. High Level of Cross-Resistance between Kanamycin, Amikacin, and Capreomycin among *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Georgia and a Close Relation with Mutations in the *rrs* Gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(12): 5064-5068; DOI: 10.1128/AAC.00851-09.

36. Kalinauskaitė-Žukauskė V. Plaučių tuberkuliozė: paplitimas, diagnostikos metodai ir gydymo principai. *Epidemiologija. Internistas* 2017.
37. Kambli P, Ajbani K, Nikam C, Sadani M, Shetty A, Udawadia Z, et al. Correlating *rrs* and *eis* promoter mutations in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* with phenotypic susceptibility levels to the second line injectables. *Int J Mycobacteriol* 2016; 5(1): 1–6; DOI: 10.1016/j.ijmyco.2015.09.001.
38. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, Agterveld A, Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 907-914.
39. Kassaza K, Orikiriza P, Llosa A, Bazira J, Nyehangane D, Page AL, et al. Lowenstein-Jensen Selective Medium for Reducing Contamination in *Mycobacterium tuberculosis* Culture. *J Clin Microbiol* 2014; 52(7): 2671-2673; DOI: 10.1128/JCM.00749-14.
40. Khutlang R, Krishnan S, Dendere R, Whitelaw A, Veropoulos A, Learmonth G, et al. Classification of *Mycobacterium tuberculosis* in Images of ZN-Stained Sputum Smears. *IEEE Trans Inf Technol Biomed* 2010; 14(4): 949–957; DOI: 10.1109/TITB.2009.2028339.
41. Kim SY, Han SA, Kim DH, Koh WJ. Nontuberculous mycobacterial lung disease: ecology, microbiology, pathogenesis, and antibiotic resistance mechanisms. *Precision and Future Medicine* 2017; 1(3): 99-114; DOI: 10.23838/pfm.2017.00135.
42. Koch A, Mizrahi V. *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in Microbiology* 2018. DOI: 10.1016/j.tim.2018.02.012.
43. Ködmön C, Zucs P, Werf MJ. Migration-related tuberculosis: epidemiology and characteristics of tuberculosis cases originating outside the European Union and European Economic Area, 2007 to 2013. *Euro Surveill* 2016; 21(12): 30164; DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.12.30164.
44. Kontsevaya I, Nikolayevskyy V, Kovalyov A, Ignatyeva O, Sadykhova A, Simak T, et al. Tuberculosis cases caused by heterogeneous infection in eastern Europe and their influence on outcomes. *Infect Genet Evol* 2017; 48:76-82; DOI: 10.1016/j.meegid.2016.12.016.
45. Kozinska M, Brzostek A, Krawiecka D, Rybczynska M, Zwolska Z, Kopec EA. MDR, pre-XDR and XDR drug-resistant tuberculosis in Poland in 2000–2009. *Pneumonol Alergol Pol* 2011; 79(4): 278-287.
46. Kumar N, Agarwal A, Dhole TN, Sharma YK. Rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical isolates by combining presumptive cord formation and MPT64 Antigen Immunochromatographic Assay. *Indian Journal of Tuberculosis* 2015; 62(2): 86-90; DOI: 10.1016/j.ijtb.2015.04.007.

47. Lange C, Leth F, Mitnick CD, Dheda K, Günther G. Time to revise WHO-recommended definitions of MDR-TB treatment outcomes. *Lancet Respir Med* 2018; 6(4): 246-248; DOI: 10.1016/S2213-2600(18)30104-8.
48. Lata M, Sharma D, Deo N, Tiwari PK, Bisht D, Venkatesan K. Proteome analysis of ofloxacin and moxifloxacin induced *Mycobacterium tuberculosis* isolates by proteomic approach. *Protein and peptide letters* 2015; 22(4): 362-371(10).
49. Machado D, Coelho TS, Perdigao J, Pereira C, Couto I, Portugal I, et al. Interplay between mutations and efflux in drug resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Microbiol* 2017; 8: 711; DOI: 10.3389/fmicb.2017.00711.
50. Malinga L, Brand J, Olorunju S, Stoltz A, Walt M. Molecular analysis of genetic mutations among cross-resistant second-line injectable drugs reveals a new resistant mutation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016; 85(4): 433-7; DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.05.010.
51. Mamatha HG, Shanthi V. Baseline resistance and cross-resistance among fluoroquinolones in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates at a national reference laboratory in India. *J Glob Antimicrob Resist* 2018; 12: 5-10; DOI: 10.1016/j.jgar.2017.08.014.
52. Martynov AV, Bomko TV, Nosalskaya TN, Lisnyak YV, Romanova EA, Kabluchko TV, et al. Tuberculosis As An Infectious Pathology Of Immune System. *Annals of Mechnikov Institute* 2016; 3: 8-14; DOI: 10.5281/zenodo.167423.
53. Maus CE, Plikaytis BB, Shinnick TM. Molecular Analysis of Cross-Resistance to Capreomycin, Kanamycin, Amikacin, and Viomycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(8): 3192–3197; DOI: 10.1128/AAC.49.8.3192-3197.2005.
54. Mekonnen D, Admassu A, Mulu W, Amor A, Benito A, Gelaye W, et al. Multidrug-resistant and heteroresistant *Mycobacterium tuberculosis* and associated gene mutations in Ethiopia. *J Infect Dis* 2015; 39: 34-38.
55. Mirza IA, Khan FA, Khan KA, Satti L, Ghafoor T, Fayyaz M. Extensively and pre-extensively drug resistant tuberculosis in clinical isolates of multi-drug resistant tuberculosis using classical second line drugs (levofloxacin and amikacin). *J Coll Physicians Surg Pak* 2015; 25(5): 337-41; DOI: 05.2015/JCPSP.337341.
56. O'Toole RF, Gautam SS. Limitations of the *Mycobacterium tuberculosis* reference genome H37Rv in the detection of virulence-related loci. *Genomics* 2017; 109(5–6): 471-474; DOI: 10.1016/j.ygeno.2017.07.004.
57. Pai M, Behr AM, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC, et al. Tuberculosis. *Nat Rev Dis Primers* 2016; 2: 16076; DOI: 10.1038/nrdp.2016.76.

58. Pai M, Denkinger CM, Kik SV, Rangaka MX, Zwerling A, Oxlade O, et al. Gamma interferon release assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27: 3-20; DOI: 10.1128/CMR.00034-13.
59. Pai M, Nicol MP, Boehme CC. Tuberculosis Diagnostics: State of the Art and Future Directions. *Microbiol Spectr* 2016; 4(5); DOI: 10.1128/microbiolspec.TBTB2-0019-2016.
60. Palomino JC, Martin A. Drug Resistance Mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiotics* 2014; 3(3); 317-340; DOI: 10.3390/antibiotics3030317.
61. Pavilonis A, Lasinskaitė-Čerkašina A, Vaičiuvėnas V. Diagnostinė mikrobiologija. Kaunas: KMU I-kla; 2007.
62. Reeves AZ, Campbella PJ, Sultana R, Malik S, Murray M, Plikaytis BB, et al. Aminoglycoside Cross-Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Due to Mutations in the 5' Untranslated Region of *whiB7*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57(4): 1857-1865; DOI: 10.1128/AAC.02191-12.
63. Reeves AZ, Campbell PJ, Willby MJ, Posey JE. Disparities in capreomycin resistance levels associated with the *rrs* A1401 mutation in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59(1): 444-449; DOI: 10.1128/AAC.04438-14.
64. Rodrigues-Junior VS, Villela AD, Goncalves RS, Abbadi BL, Trindade RV, Lopez-Gavin A, et al. Mefloquine and its oxazolidine derivate compound are active against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains and in a murine model of tuberculosis infection. *J Antimicrob Agents* 2016; 48: 203-207.
65. Rüsç-Gerdes S, Pfyffer GE, Casal M, Chadwick M, Siddiqi S. Multicenter laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* to classical second-line drugs and newer antimicrobials. *J Clin Microbiol* 2006; 44(3): 688-92; DOI: 10.1128/JCM.44.3.688-692.2006.
66. Salgame P, Geadas C, Collins L, Lopez EJ, Ellner JJ. Latent tuberculosis infection – revisiting and revising concepts. *Tuberculosis* 2015; 95: 373-384.
67. Santoro F, Guerrini V, Lazzeri E, Iannelli F, Pozzi G. Genomic polymorphisms in a Laboratory Isolate of *Mycobacterium tuberculosis* Reference Strain H37Rv (ATCC27294). *New Microbiol* 2017; 40(1): 62-69.
68. Schön T, Miotto P, Köser CU, Viveiros M, Böttger E, Cambau E. *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistance testing: challenges, recent developments and perspectives. *Clin Microbiol Infect* 2017; 23(3): 154-160; DOI: 10.1016/j.cmi.2016.10.022.
69. Shenai S, Rodrigues C. Molecular detection of human bacterial pathogens. CRC Press, Taylor & Francis group; 2011.

70. Shenoy VP, Mukhopadhyay C. Rapid immunochromatographic test for the identification and discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from non-tuberculous mycobacteria. *J Clin Diagn Res* 2014; 8(4): DC13-DC15; DOI: 10.7860/JCDR/2014/7098.4253.
71. Silva PEA, Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(7): 1417–1430; DOI: 10.1093/jac/dkr173.
72. Singh P, Jain A, Dixit P, Prakash Sh, Jaiswal I, Venkatesh V, et al. Prevalence of *gyrA* and *B* gene mutations in fluoroquinolone-resistant and – sensitive clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and their relationship with MIC of ofloxacin. *J Antibiotics* 2014; 68: 63-66; DOI: 10.1038/ja.2014.95.
73. Singhal P, Dixit P, Singh P, Jaiswal I, Singh M, Jain A. A study on pre-XDR & XDR tuberculosis & their prevalent genotypes in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in north India. *Indian J Med Res* 2016; 143(3): 341–347; DOI: 10.4103/0971-5916.182625.
74. Small PM, Pai M. Tuberculosis Diagnosis — Time for a Game Change. *N Engl J Med* 2010; 363: 1070-1071; DOI: 10.1056/NEJMe1008496.
75. Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 463-496.
76. Tagliani E, Cabibbe AM, Miotto P, Borroni E, Toro JC, Mansjo M, et al. Diagnostic performance of the new version (v2.0) of GenoType MTBDR_{sl} assay for detection of resistance to fluoroquinolones and second-line injectable drugs: a multicenter study. *J Clin Microbiol* 2015; 53(9): 2961-2969; DOI: 10.1128/JCM.01257-15.
77. Tang W, Hu J, Zhang H, Wu P, He H. Kappa coefficient: a popular measure of rater agreement. *Shanghai Arch Psychiatry* 2015; 27(1): 62–67; DOI: 10.11919/j.issn.1002-0829.215010.
78. Telles MA, Bori A, Amorim AB, Cruz AF, Pini MI, Sato DN. Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* using the mycobacteria growth indicator tube (MGIT) system. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35(10): 1127-31.
79. Tessema B, Nabeta P, Valli E, Albertini A, Collantes J, Lan NH, et al. Find *tuberculosis* strain bank: a resource for researchers and developers working on tests to detect *Mycobacterium tuberculosis* and related drug resistance. *J Clin Microbiol* 2017; 55: 1066-1073; DOI: 10.1128/JCM.01662-16.
80. Tu HZ, Lin EY, Tseng MR, Huang TS, Chen YS. Cost-effective identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex using microscopic morphology and rapid tests. *J Tuberc Lung Dis* 2015; 19: 1204-1208.
81. Velayati AA, Farnia P. Morphological characterization of *Mycobacterium tuberculosis*. InTech 2012. Chapter from the book understanding *Tuberculosis* - deciphering the secret life of the bacilli.

82. Viera AJ, Garrett JM. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Fam Med* 2005; 37(5): 360-3.
83. Walker TM, Merker M, Knoblauch AM, Helbling P, Schoch OD, Werf MJ, et al. A cluster of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* among patients arriving in Europe from the Horn of Africa: a molecular epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2018; 18(4): 431-440; DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30004-5.
84. Wang Z, Xie T, Mu Ch, Wang Ch, Ju H, Zhao H, et al. Molecular characteristics of ofloxacin mono-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from new and previously treated tuberculosis patients. *J Clin Lab Anal* 2017; 32: e22202; DOI: 10.1002/jcla.22202.
85. World Health Organization. The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs: policy guidance. 2016. Interneto prieiga: <http://www.who.int/tb/areas-of-work/laboratory/WHOPolicyStatementSLLPA.pdf?ua=1>
86. World Health Organization. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2018. Interneto prieiga: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0010/364663/tb-report-2018.pdf?ua=1
87. Yates VM, Walker SL. Mycobacterial Infections. *Rook's Textbook of Dermatology* 2016; DOI: 10.1002/9781118441213.rtd0027.
88. Zaunbrecher MA. Low-level kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: molecular mechanisms and clinical implications. Dissertation. Laney Graduate School, Biological and Biomedical Sciences (Microbiology & Molecular Genetics); 2008.
89. Zheng C, Li S, Luo Z, Pi R, Sun H, He Q, et al. Mixed Infections and Rifampin Heteroresistance among *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. *J Clin Microbiol* 2015; 53(7): 2138-2147; DOI: 10.1128/JCM.03507-14.
90. Zucs P, Dara M, Colombani P, Ehsani S, Gozalov O, Hovanesyan A, et al. 1. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe, 2018. Stockholm: ECDC 2018. Interneto prieiga: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/ecdc-tuberculosis-surveillance-monitoring-Europe-2018-19mar2018.pdf>

PRIEDAI

1 Priedas. GenoLyse® DNR išskyrimo schema

Iš skystos mitybinės terpės:

1000 µl



Centrifuguoti **15 min. 10 000 xg** (rcf),
Nupilti



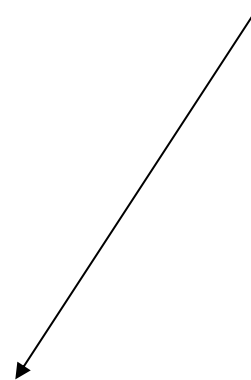
Įpilti **100 µl** lizės buferio **A-LYZ**
Supurtyti



Nuo kietos mitybinės terpės:

1-2 kolonijas į

100 µl lizės buferio **A-LYZ**
Supurtyti.



5 min. 95°C



100 µl neutralizacijos buferio
A-NB mėginį purtyti 5 s.



Nusukti 5 min pilnu greičiu



Supernatantą perkelti į kitą
mėgintuvėlį.

Laikyti +4°C...–20°C