



Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ - Скопје
Медицински факултет

Д-р Зорица Нановиќ

**КОМПАРАТИВНА СТУДИЈА НА ДИЈАГНОСТИЧКИТЕ
ПОСТАПКИ ЗА МОЛЕКУЛАРНА БРЗА ДИРЕКТНА ДЕТЕКЦИЈА
НА
Mycobacterium tuberculosis complex
И РЕЗИСТЕНЦИЈА КОН РИФАМПИЦИН
СО КЛАСИЧНИТЕ МИКРОБИОЛОШКИ МЕТОДИ КАЈ
БЕЛОДРОБНА ТУБЕРКУЛОЗА**

- Докторска дисертација -

Скопје, 2019

**COMPARATIVE STUDY OF DIAGNOSTIC PROCEDURES
FOR RAPID DIRECT MOLECULAR DETECTION OF
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX
AND RESISTANCE TO RIFAMPICIN
WITH CONVENTIONAL MICROBIOLOGICAL METHODS
IN PULMONARY TUBERCULOSIS**

Истражувањето беше работено на Институтот за белодробни заболувања и туберкулоза – Скопје, на Одделението за туберкулоза и во Националната референтна лабораторија за туберкулоза

Датум на одбрана: 27.5.2019 година

Комисија за одбрана:

1. Проф. д-р Горица Брешковска, претседател
2. Проф. д-р Милена Петровска, ментор
3. Проф. д-р Бисерка Каева-Јовковска
4. Проф. д-р Сашо Панов
5. Проф. д-р Лилјана Симоновска

На моите најмили

СОДРЖИНА

ПОПИС НА КРАТЕНКИ	1
АПСТРАКТ.....	3
ABSTRACT.....	6
1. ВОВЕД.....	9
2. ЦЕЛИ НА ДОКТОРСКАТА ДИСЕРТАЦИЈА.....	85
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ.....	86
4. РЕЗУЛТАТИ.....	96
5. ДИСКУСИЈА.....	149
6. ЗАКЛУЧОЦИ.....	174
7. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА.....	176

ПОПИС НА КРАТЕНКИ

КРАТЕНКА	ЗНАЧЕЊЕ
AFB	Acid-fast bacilli (ацидо-алкохолно-резистентни бацили)
BT; ВАСТЕС MGIT 960	Автоматизиран систем за детекција на микобактерии на течна подлога, Mycobacteria growth indicator tube 960
Bp	Base pair (базен пар)
CFU	Colony forming units (формирани колонии од микроорганизмот)
Core region	Основен регион
Ct	Cycle threshold (циклус на прагот)
DM; ДМ	Diabetes mellitus (дијабетес, шеќерна болест)
DNA	Deoxyribonucleic acid (дезоксирибонуклеинска киселина)
DOTS	Directly observed treatment, Short course (директно надгледувано краткотрајно лекување)
DST	Drug-susceptibility testing (тестирање на чувствителност кон лекови)
EMB; E	Етамбутол
gDST	Genotypic drug-susceptibility testing (генотипско тестирање на чувствителност кон лекови)
HIV; ХИВ	Human immunodeficiency virus; Вирус на хумана имунодефициенција
IGRA	Interferon-gamma releasing assay (интерферон-гама ослободувачки тест)
INH; H	Изониазид
LJ	Löwenstein–Jensen (цврста подлога за културелно испитување на микобактерии)
LPA	Line probe assay (молекуларни тестови со линеарни проби)
LSP	Large sequence polymorphism (полиморфизам на долги секвенци)
MDGs	Millennium development goals (милениумски развојни цели)
MDR-TB	Multidrug-resistant tuberculosis (мултirezистентна туберкулоза)
MGIT 960 BD	Mycobacteria growth indicator tube 960 Becton Dickinson (течна подлога за културелно испитување на микобактерии)
MIC	Minimal inhibitory concentration (минимална инхибиторна концентрација)
mRNA	messenger-Ribonucleic acid (информациска рибонуклеинска киселина)
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
NAATs	Nucleic acid amplification tests (тестови на амплификација на нуклеински киселини)
PCR	Polymerase chain reaction (полимеразно-верижна реакција)
pDST	Phenotypic drug-susceptibility testing (фенотипско тестирање на чувствителност кон лекови)
PZA; Z	Пиразинамид
RD	Region of difference (регион на разликување)
real-time PCR	Полимеразно-верижна реакција во реално време

RIF; R	Рифампицин
RNA	Ribonucleic acid (рибонуклеинска киселина)
RR	Rifampicin-resistance (резистенција на рифампицин)
RRDR	Rifampicin-resistance-determining region (регион кој ја определува резистенцијата кон рифампицин)
rRNA	ribosomal-Ribonucleic acid (рибозомска рибонуклеинска киселина)
SDGs	Sustainable development goals (одржливи развојни цели)
SITs	Standard international types (стандардни интернационални типови)
SITVIT	Mycobacterium tuberculosis molecular markers database (датабаза на молекуларни маркери на <i>Mycobacterium tuberculosis</i>)
SM; S	Стрептомицин
SNP	Single nucleotide polymorphism (полиморфизам на единечен нуклеотид)
TTP	Time-to-positivity (време до позитивитет)
TTT	Time-to-treatment (време до третман)
WGS	Whole genome sequencing (секвенционирање на цел геном)
WT	Wild type (див тип)
XDR-TB	Extensively drug-resistant tuberculosis (екстензивно-резистентна туберкулоза)
Xpert	Xpert МТВ/RIF молекуларен тест
АТЛ	Антитуберкулотски лекови
БТБ	Белодробна туберкулоза
ИБЗТ	Институт за белодробни заболувања и туберкулоза – Скопје
ЛТБИ	Латентна туберкулозна инфекција
СЗО	Светска здравствена организација
ТБ	Туберкулоза

КОМПАРАТИВНА СТУДИЈА НА ДИЈАГНОСТИЧКИТЕ ПОСТАПКИ ЗА МОЛЕКУЛАРНА БРЗА ДИРЕКТНА ДЕТЕКЦИЈА НА *Mycobacterium tuberculosis* COMPLEX И РЕЗИСТЕНЦИЈА КОН РИФАМПИЦИН СО КЛАСИЧНИТЕ МИКРОБИОЛОШКИ МЕТОДИ КАЈ БЕЛОДРОБНА ТУБЕРКУЛОЗА

Д-р Зорица Нановиќ

Институт за белодробни заболувања и туберкулоза - Скопје

Ментор: Проф. Милена Петровска

АПСТРАКТ

Краток осврт. Туберкулозата (ТБ) е голем глобален јавно-здравствен проблем. Таа е една од десетте водечки причини за смрт во светот и примарна причина за смрт од еден инфективен агенс. Појавата и ширењето на резистентни форми на ТБ (мултirezистентна ТБ, екстензивно-резистентна ТБ, MDR-ТБ и XDR-ТБ, соодветно) го мултиплицираат проблемот. Првиот одговор на предизвикот за рана и точна дијагноза на ТБ стигна пред неколку години, кога Светската здравствена организација ја одобри примената на молекуларни тестови за истовремена детекција на *Mycobacterium tuberculosis* complex (МТВС) и чувствителност на антитуберкулотски лекови.

Цел. Целта на студијата беше проценка на GeneXpert МТВ/RIF тестот (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA, Xpert), кој има капацитет за детекција на МТВС и резистенција кон рифампицин (RIF), за дијагноза на ТБ. Ова е прва студија за евалуација на молекуларен тест за ТБ во Република Македонија.

Материјал и методи. Студијата се изведуваше во Институтот за белодробни заболувања и туберкулоза во Скопје, Република Македонија, во тек на две години (2016 - 2017). Во овој период испитавме 185 респираторни примероци со Xpert и класични микробиолошки методи, вклучувајќи: флуоресцентна микроскопија (аурамин-О бојење) за ацидо-алкохол-резистентни бацили (acid-fast bacilli, AFB), цврст и течен медиум за култивирање (Löwenstein-Jensen и BACTEC MGIT 960, соодветно) и фенотипско тестирање за чувствителност (phenotypic drug susceptibility testing, pDST; пропорционален метод на подлога по Löwenstein-Jensen). Примероците со потврдена резистенција на RIF беа предмет на дополнителна молекуларна дијагностика (MTBDR*plus*, MTBDR*sl*, Hain Lifescience GmbH, Нерен, Германија). Статистичката анализа на Xpert-тестот, микроскопијата на директен препарат и културите, како и нивна споредба, беа извршени со XLSTAT софтверски додаток за Excel 2016.

Резултати. Од 185 респираторни примероци, 167 (90,28%) беа Xpert-позитивни за МТВС и 91 (49,19%) позитивни за АФВ. Кај културелно-позитивните примероци Xpert покажа сензитивност од 97,67% и 86,36% за АФВ-позитивните и АФВ-негативните примероци, соодветно. Xpert идентификуваше дополнителни 57 АФВ-негативни култура-позитивни примероци, зголемувајќи ја на тој начин стапката на откривање на ТБ за 36,18% кај културелно-позитивните и за 41,08% кај целата кохорта во споредба со микроскопијата (т.н. додадена вредност на Xpert, Xpert vs AFB). Во споредба со културата, Xpert покажа сензитивност од 92,76% (95% CI; 87,42-96,33%) и специфичност од 22,58% (95% CI; 9,59-41,10%). Во споредба со кој било класичен микробиолошки тест, се следеше постепено зголемување на сензитивноста на Xpert, со највисока вредност во однос на микроскопијата (93,82%; 95% CI; 89,12-96,60%) и негативна предиктивна вредност од 0,389; специфичноста тука изнесуваше 100% со позитивна предиктивна вредност 1. 152/185 примероци (82,16%) кои покажаа раст на микобактерии во култура беа предмет на рDST. Кај 151/152 (99,34%) примероци најдовме совпаѓање на резултатот од испитување на чувствителност кон RIF меѓу Xpert и рDST, вклучувајќи и еден примерок резистентен на RIF. Кај еден од 152 (0,66%) примероци немаше совпаѓање на овој резултат: Xpert покажа чувствителност на RIF, а рDST – резистенција на RIF. Со натамошно молекуларно испитување (MTBDR*plus*, MTBDR*sl*) беше потврдено присуство на MDR-TB сој на МТВС во двата примерока, а во едниот беше одредена местопозицијата на мутација (D516V во rifampicin-resistance-determining-region, RRDR на *rpoB* генот). Квантитативните Xpert резултати (Ct-вредност) беа предмет на напредна статистичка анализа. Најдовме значајна корелација на Ct-вредностите со степенот на позитивитет на директниот микроскопски препарат (тест на линеарна регресија, $p < 0,000,1$), времето до позитивитет на култура (ANCOVA тест, $p < 0,0001$), како и со степенот на позитивитет на цврста култура и целокупната класична микробиолошка дијагностика за ТБ (тест за логистичка регресија, Wald, $p < 0,0001$). Не најдовме корелација во однос на течната култура. Најдовме значајна корелација на Xpert со стапката на седиментација на еритроцити, како и рендгенолошко присуство на белодробни каверни, но немаше статистички значајна разлика во групата пациенти со дијабетес. Слично на тоа, немаше значајна разлика за Xpert кај нови и претходно лекувани пациенти од ТБ, ниту квалитативни ниту квантитативни (Xpert Ct- вредности).

Дискусија и заклучоци. Xpert покажа висока сензитивност за детекција на МТВС во целата група и во различни подгрупи на примероци, слична или подобра во однос на резултатите на други истражувачи, добиени во услови на ниска инциденца на ТБ.

Ниската специфичност на Xpert наспроти културата се должи на споредбата со несовершен „златен стандард“, бидејќи е познато дека околу 20% од случаите на белодробна ТБ се културелно-негативни; во споредба со класичната микробиолошка дијагностика како целина, специфичноста на Xpert достигнува 100%. Во однос на резистенцијата на RIF, група од два MDR-TB соја не е доволна за напредна статистичка анализа, но укажува на потребата од брзо разрешување на клиничката релевантност на откриените мутации (т.е. отпочнување на соодветен антитуберкулотски режим) и постоење на можност за несовпаѓање на резултатот со рDST, што може да вклучи присуство на „тивки“ мутации, како и мутации со ниско ниво на резистенција (т.н. „disputed“). Добрата корелација на Ct-вредностите на Xpert како мерка за бактериската концентрација, со степенот на позитивитет на директниот микроскопски препарат и културата на цврста подлога, заедно со високата сензитивност, ја поддржуваат интенцијата за идна замена на микроскопијата со Xpert. Сумирано, Xpert нуди несомнена предност во рана дијагноза на белодробна ТБ, особено кај AFB-негативни случаи. Потребна е доза на претпазливост кога се разгледуваат резултатите од резистенцијата на RIF и тоа би требало да се подобри со воведување на методи за секвенционирање на геномот. Последново исто така би помогнало во креирањето на базата на мутации на MTBC на територијата на нашата земја, која започна со откривање на првата мутација во оваа студија. Конечно, донесувањето одлука за постоење на релапс на ТБ кај претходно лекувани пациенти не треба да се базира исклучиво врз резултатот од Xpert, туку врз сеопфатна клиничка и радиолошка проценка на секој пациент посебно.

Клучни зборови: белодробна туберкулоза, молекуларни тестови, детекција на *Mycobacterium tuberculosis* complex, резистенција на рифампицин, GeneXpert MTB/RIF.

COMPARATIVE STUDY OF DIAGNOSTIC PROCEDURES FOR RAPID DIRECT MOLECULAR DETECTION OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX AND RESISTANCE TO RIFAMPICIN WITH CONVENTIONAL MICROBIOLOGICAL METHODS IN PULMONARY TUBERCULOSIS

D-r Zorica Nanovic

Institute of lung diseases and tuberculosis - Skopje

Mentor: Prof. Milena Petrovska

ABSTRACT

Background. Tuberculosis (TB) remains the global public health concern, being one of the top 10 causes of death and the leading cause from a single infectious agent. The emergence and spread of resistant forms of TB (multidrug-resistant and extensively-drug resistant, MDR-TB and XDR-TB respectively) multiply the problem. The challenge of early and accurate diagnosis of TB took advantage several years ago, by World Health Organization – endorsement of molecular assays for simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) and resistance to anti-tuberculous drugs.

Aim. The aim of the study was to assess the performance of GeneXpert MTB/RIF assay (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA; Xpert), which possesses a capacity for detection both MTBC and rifampicin (RIF)-resistance, as a diagnostic tool for pulmonary TB. This is a first study designed to evaluate the performance of a molecular assay for TB in the Republic of Macedonia.

Material and methods. The study took place in the Institute of lung disease and tuberculosis in Skopje, Republic of Macedonia, and covered a two-year period (2016-2017). We examined 185 respiratory samples by Xpert and conventional methods, including fluorescent smear microscopy (auramine-O staining) for acid-fast-bacilli (AFB), solid and liquid culture medium (Löwenstein-Jensen and BACTEC MGIT 960, respectively), and phenotypic drug susceptibility test (pDST, proportion method on Löwenstein-Jensen medium). Additional molecular diagnostics was conducted in samples with confirmed rifampicin-resistance (MTBDR*plus*, MTBDR*sl*, Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany). Statistical evaluation of Xpert, smear and culture tests and their comparisons were performed using XLSTAT software add-on for Excel 2016.

Results. Out of 185 respiratory samples, 167 (90,28%) were Xpert-positive for MTBC and 91 (49,19%) were AFB positive. Among culture-positive samples, Xpert showed a sensitivity of 97,67% and 86,36% in smear-positive and in smear-negative, respectively. Xpert identified an additional 57 smear-negative culture-positive samples, increasing the TB detection rate by

36,18% in culture-positive and by 41,08% in the whole cohort compared to smear microscopy (Xpert added value, Δ Xpert vs smear). Compared to culture, Xpert showed a sensitivity of 92,76% (95% CI; 87,42-96,33%) and specificity of 22,58% (95% CI; 9,59-41,10%). In comparison with any conventional microbiological test, we found a gradual increase of sensitivity for Xpert, being the highest vs smear-microscopy (93, 82%; 95% CI; 89,12-96,60%) with the negative predictive value of 0,389; specificity was 100%, with a positive predictive value of 1. 152/185 samples (82,16%) yielded valuable culture for further pDST. In 151/152 (99,34%) samples the RIF-susceptibility result of Xpert was concordant with pDST, including one RIF-resistant sample. Only one sample out of 152 (0,66%) showed discordant result – being RIF-susceptible by Xpert and RIF-resistant by pDST. Further molecular investigation (MTBDR*plus*, MTBDR*sl*) of both samples confirmed the existence of two MDR-TB strains of MTBC, allowing to determine the location of the mutation in one of them (D516V in rifampicin-resistance-determining-region, RRDR of *rpoB* gene). The quantitative Xpert results (Ct-values) were subject for advanced statistical analyses. Ct-values significantly correlate with smear positivity status (Linear regression test, $p < 0,0001$), culture time-to-positivity (ANCOVA test, $p < 0,0001$), as well as both solid culture positivity status and overall conventional microbiology diagnostic procedures for TB (Logistic regression test, Wald; $p < 0,0001$). No correlation was observed regarding the liquid culture. There was a significant correlation of Xpert with erythrocyte sedimentation rate as well as the appearance of caverns on chest X-ray, and no difference in diabetic patients. Similarly, there was no significant difference for Xpert in new and previously treated patients, neither qualitative nor quantitative for Xpert Ct- values.

Discussion and conclusions. Xpert showed high sensitivity for MTBC-detection in various subgroups of samples and overall, being similar and even better to other investigator's results obtained in a low-incidence setting. The low specificity of Xpert vs culture is due to its comparison with imperfect “gold standard”, as approximately 20% of cases of pulmonary tuberculosis remain culture negative; in comparison with conventional microbiology diagnostics as a whole, its specificity achieves 100%. Regarding RIF-resistance, a group of two MDR-TB strains is not sufficient for advanced statistical analysis, but indicates the need of prompt resolving of clinical relevance of mutations discovered (i.e. starting an appropriate anti-tuberculosis regimen), and anticipating the possibility of pDST discordance, including presence of silent as well as low-level resistance-conferring mutations (“disputed” mutations). The good correlation of Xpert Ct-values as a measure of bacterial load, with smear and solid culture positivity, along with high sensitivity, support the intention of future replacement of microscopy with Xpert. All things considered, Xpert offers an undoubted advantage in early diagnosis of

pulmonary TB, particularly in AFB-negative cases. A dose of cautiousness is needed when considering RIF-resistance results and should be improved by introducing the genome sequencing methods. This would also help in creating the MTBC-mutation database on the territory of our country, which has started with the revealing the first one in this study. Finally, decision-making regarding TB-relapse in previously treated patients should not be based exclusively on Xpert result per se, but rather on an individual, comprehensive, clinical and radiological assessment.

Keywords: pulmonary tuberculosis, molecular test, *Mycobacterium tuberculosis* complex, rifampicin-resistance, GeneXpert MTB/RIF.

1. ВОБЕД

1.1. Историјат на туберкулозата

Туберкулозата (ТБ) е прастара болест, една од најстарите познати во историјата на човештвото [1]. До пред неколку години во научниот свет преовладуваше ставот дека туберкулозата потекнува од животните и дека била трансферирана на човекот во тек на периодот на неолитската демографска транзиција, пред околу 10 000 години [2]. Но компаративните геномски и генетски популациски истражувања го сменија овој став. Во 2009 година, по откритието на 500 000 – години стар фосил на *Homo erectus* во Турција со типични туберкулозни коскени лезии Roberts et al. [3] сугерираат дека туберкулозата можеби им претходела на модерните луѓе. Студијата на Comas et al. од 2013 година индицира дека предизвикувачот на ТБ, *Mycobacterium tuberculosis complex* (МТВС) се појавил пред околу 70 000 години, ја следел миграцијата на анатомски модерните луѓе од Африка и се проширил меѓу припадниците на човечкиот род како последица на популациската пренаселеност [4]. Анализата на овој истражувачки тим, со која се опфатени 259 примероци на МТВС и анализирани со секвенционирање на целиот геном (whole genome sequencing, WGS), претставува реконструкција на еволуциската историја на *Mycobacterium tuberculosis complex*. Овие студии сугерираат дека, спротивно на широкоприфатената првична хипотеза, МТВС нема анимално туку хумано потекло, дека бактеријата еволуирала заедно со човекот во тек на долг временски период и заемно реципрочно влијаеле врз нивната еволуција.

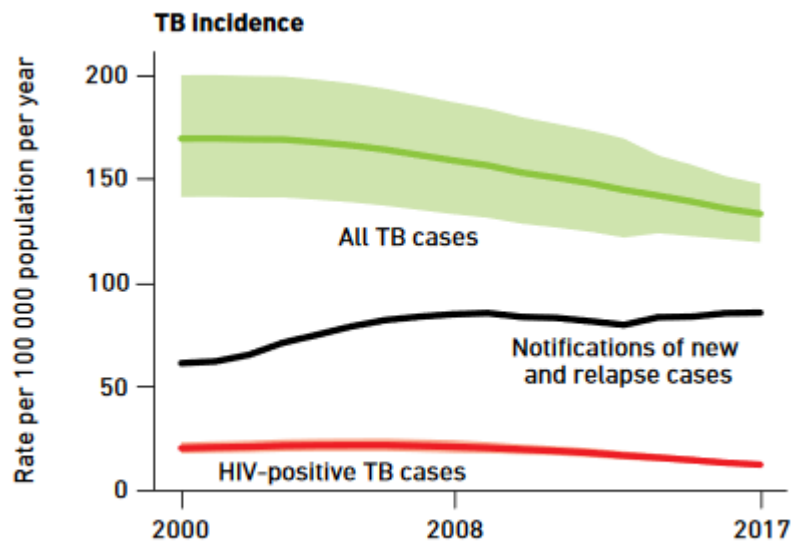
Од епидемиолошки аспект, туберкулозата се карактеризира со спорадичен начин на јавување сè до 18 век [5]. Во текот на индустриската револуција добива епидемски размери, благодарение на лошите услови на живеење и пренаселеноста. Во текот на 20 век, инциденцата на туберкулозата почнува да опаѓа во развиените земји благодарение на подобрувањето во грижата за здравјето, исхраната и условите за живот. Во создавање на овој тренд, голем придонес имаат и воведувањето на вакцинацијата против туберкулоза (BCG, *Bacillus Calmette–Guérin*) во 1921 година и употребата на антимикробните лекови, како што се стрептомицин (1943), изониазид (1952) и рифампицин (1963) [5]. И покрај напорите за ерадикација, инциденцата на туберкулозата почнува повторно да расте во 1980-тите, како резултат на HIV (Human Immunodeficiency Virus; ХИВ, вирус на хумана имунодефициенција) пандемијата, детериорацијата на здравјето во големите градови и појавата на резистентни форми на туберкулозата [5]. Се смета дека во периодот меѓу 17 и 19 век туберкулозата убила 20% од возрасното

население на Европа и Северна Америка, односно дека во текот на последните 100 години, веројатно убила повеќе од 100 милиони луѓе [6, 7]. И денес, по повеќе од 130 години од епохалното откритие на Robert Koch во 1882 година на етиолошкиот фактор на болеста - *Mycobacterium tuberculosis* (Koch-ов бацил) – „белата чума“ продолжува да биде значајна глобална причина за морбидитет и морталитет, доминантно во ниско и средноприходните земји [1, 8].

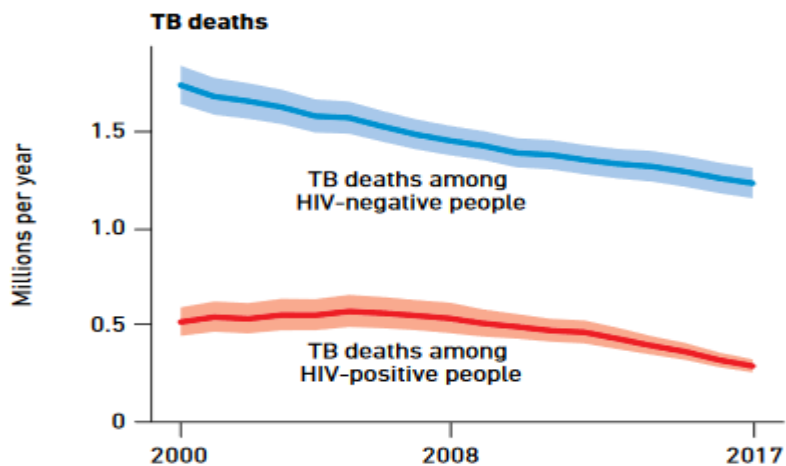
1.2. Епидемиологија на туберкулозата

Според проценките на Светската здравствена организација (СЗО), во 2017 година 10 милиони луѓе заболеле од туберкулоза. Од нив, 1,3 милиони починале меѓу ХИВ-негативните и дополнителни 300 000 меѓу ХИВ-позитивните луѓе [Графикон 1, 2]. Товарот на ТБ е нерамномерно дистрибуиран. Така на пример, во Јужна Африка инциденцата на туберкулозата е 188 пати поголема (567/100 000) отколку во Соединетите Американски Држави (3,1/100 000) [Слика 1, 2, 3]. Во 2017 година, 9% од случаите на ТБ биле луѓе што живеат со ХИВ (72% во Африка), а две третини од вкупниот број во светот биле во следниве осум земји: Индија (27%), Кина (9%), Индонезија (8%), Филипини (6%), Пакистан (5%), Нигерија (4%), Бангладеш (4%) и Јужна Африка (3%). Овие, заедно со уште 22 други земји ја сочинуваат листата на земји високооптоварени со ТБ според СЗО, и учествуваат со 87% од сите случаи на туберкулоза глобално [Слика 3]. Само 3% од случаите на ТБ се во европскиот регион на СЗО и уште 3% во СЗО регионот на американскиот континент [8].

Стапката на активна туберкулоза е многу висока кај експонираните доенчиња, но многу пониска кај деца на возраст од 2 до 10 години; ризикот расте во текот на адолесценцијата и достигнува плато околу 25 година од животот, за да се задржи на високо ниво во текот на адултниот животен век [9]. Инциденцата на туберкулоза е апроксимативно двапати поголема кај мажите во однос на жените [9, 10]; околу 10% од сите нови случаи на ТБ во светот се јавуваат кај деца [9, 11].

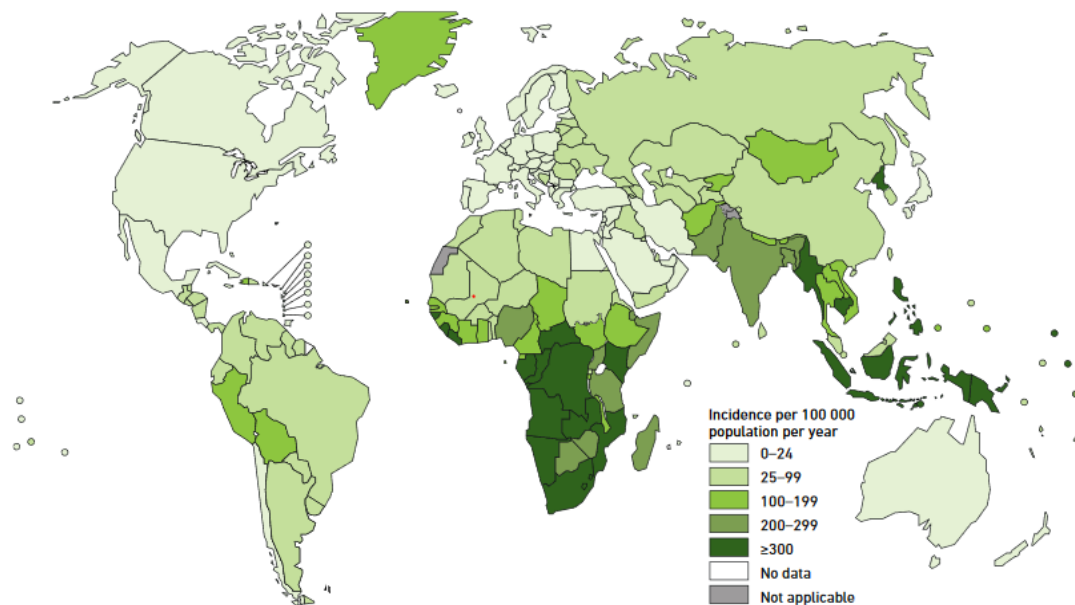


Графикон 1. Инциденца на туберкулоза во светот (период 2000-2017 година, стапка на 100 000 население годишно) (според референца бр.8)



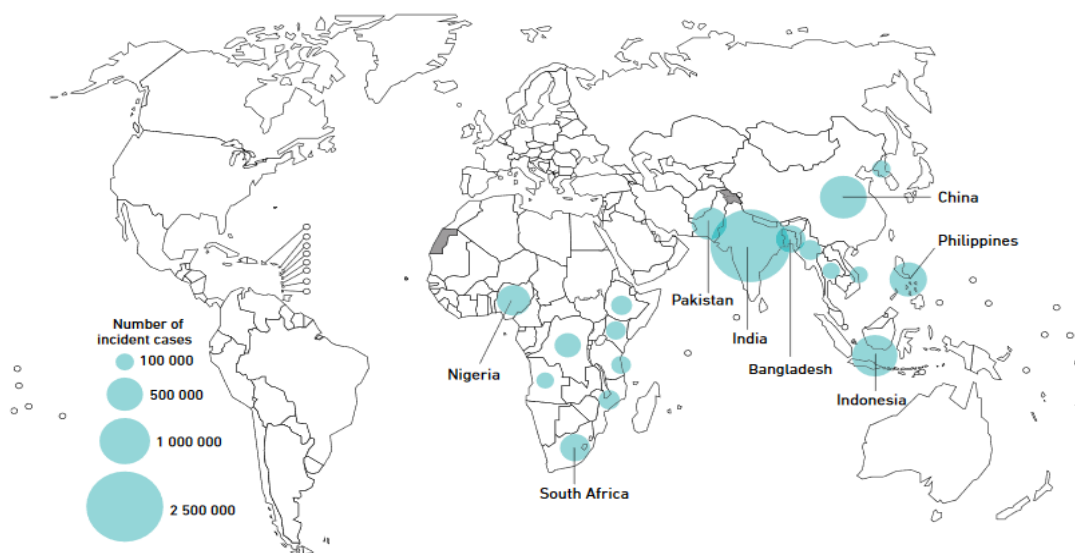
Графикон 2. Морталитет од туберкулоза во светот кај ХИВ-негативни и ХИВ-позитивни лица, изразен во милиони годишно (период 2000-2017 година) (според референца бр.8)

Estimated TB incidence rates, 2017



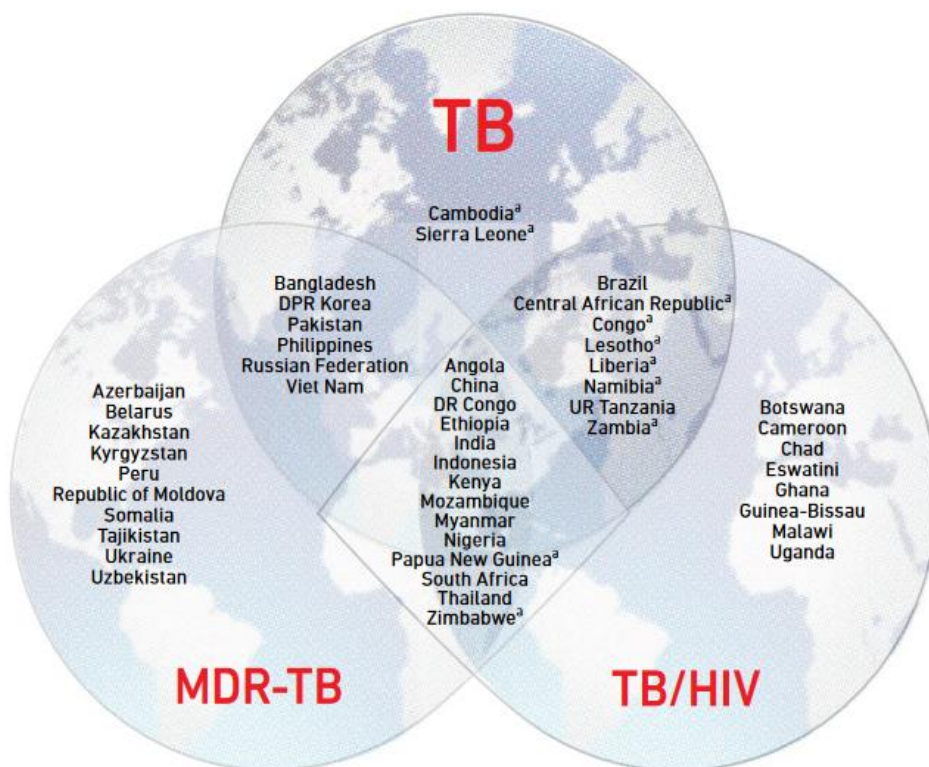
Слика 1. Процентата инциденца на туберкулоза во светот во 2017 година, изразена како стапка на 100 000 население годишно (според референца бр.8)

Estimated TB incidence in 2017, for countries with at least 100 000 incident cases



Слика 2. Процентата инциденца на туберкулоза во светот во 2017 година, во земји со најмалку 100 000 случаи годишно (според референца бр.8)

Countries in the three high-burden country lists for TB, TB/HIV and MDR-TB being used by WHO during the period 2016–2020, and their areas of overlap



Слика 3. Нерамномерна дистрибуција на товарот на туберкулозата во светот во периодот 2016-2020 година: земји со најголем товар за туберкулоза, MDR-TB, коинфекција ТБ-ХИВ и преклопување меѓу нив (според референца бр.8)

Од познатите ризик-фактори за туберкулоза, ХИВ-инфекцијата е најсилниот [9, 12]; 12% од сите нови случаи на ТБ и 25% од сите ТБ-асоцирани смртни случаи се јавуваат кај ХИВ-позитивни лица. Други ризик-фактори за туберкулоза се: тип 2 шеќерна болест [9,13] и ексцесивна употреба на алкохол [9, 14] (секој од претходните два ризик-фактори приближно тројно го зголемува ризикот од туберкулоза), и пушење цигари (што двојно го зголемува ризикот од туберкулоза) [9, 15].

1.3. Етиологија на туберкулозата

Туберкулозата кај човекот и животните ја предизвикува група од филогенетски сродни бактерии, познати под заедничко име *Mycobacterium tuberculosis complex* (МТВС) [2, 16]. Со МТВС се опфатени следниве специеси во рамките на генусот *Mycobacterium*: *M.tuberculosis sensu stricto*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *M. bovis*, *M. orygis*, *M. mungi*, *M. suricattae* и *M. canetti*. На ниво на секвенционирање на целиот геном (WGS), членовите на овој комплекс делат речиси идентична нуклеотидна секвенца на DNA (deoxyribonucleic acid, дезоксирибонуклеинска киселина) (99.9%) и комплетно идентична секвенца на 16S rRNA (ribosomic ribonucleic acid, рибозомска рибонуклеинска киселина) [17]. Екстремно високиот степен на сличност укажува дека имаат заеднички предок, а меѓу себе се разликуваат во поглед на тропизмот кон примарниот домаќин, фенотипот и патогеноста.

Од аспект на тропизмот кон примарниот домаќин, специесите во МТВС може да се поделат на оние: адаптирани на човекот, адаптирани на диви и домашни цицачи, и *Mycobacterium canettii* [18]:

1. **Специеси на МТВС адаптирани на човекот** [18] [Слика 4]. Тука спаѓаат: *Mycobacterium tuberculosis sensu stricto* и *M. africanum*, кои се примарно одговорни за туберкулозата кај луѓето. Тие се облигатни хумани патогени, со лимитирано преживување надвор од човечкото тело и без познат животински резервоар. Луѓето се единствениот познат домаќин за инфекција и трансмисија на *M. tuberculosis* и *M. africanum*, со континуирано одржување на циклусот на инфекција. Кај овие два специеса, предуслов за трансмисија на болеста е постоење на активна болест, односно постои директна врска меѓу вируленцијата и трансмисијата. *M. africanum* манифестира пониска вируленција од *M. tuberculosis sensu stricto*.

Во последната деценија членовите на МТВС се предмет на опсежни анализи со употреба на различни генетски маркери [18]. Врз основа на single nucleotide polymorphisms (SNPs, полиморфизам на единечен нуклеотид) и large sequence polymorphisms (LSPs, полиморфизам на големи секвенци), самиот *M. tuberculosis* (*sensu stricto*) се класифицира во четири главни линии [19], од кои секоја е силно асоцирана со специфичен географски регион, односно хумана популација [20]. Спроведувањето геномски студии кулминира со обемни компаративни студии на ниво на секвенционирање на целиот геном (WGS) [18]. Најновите филогенетски сознанија базирани врз WGS откриваат дека хуманите специеси во МТВС можат да се класифицираат во седум главни филогенетски линии што дивергирале од заеднички

предок и се распространиле во различни региони во светот (фило-географска структура) [18, 20] [Слика 5, 6]

1.1. Линии – носители на TbD1-делеција, познати и како „модерни“:

1.1.1. Линија 4 (евро-американска) – со широка дистрибуција во Европа и Америка, но и во Африка и на Блискиот Исток

1.1.2. Линија 2 (источно-азиска линија, во која спаѓа Beijing-фамилијата на соеви) – со широка дистрибуција во источно-азиските земји

1.1.3. Линија 3 – со релативно тесна дистрибуција во Источна Африка и Централна и Јужна Азија (источно-африканско-индиска)

1.2. Линии без TbD1-делеција, познати и како „древни, прастари“:

1.2.1. Линија 1 (индо-океанска) – со дистрибуција во околината на Индиски Океан и Филипините

1.2.2. Линија 5 (*M. africanum* – западно-африканска 1)

1.2.3. Линија 6 (*M. africanum* – западно-африканска 2). Линија 5 и Линија 6 припаѓаат на *M. africanum* и се географски ограничени на западно-африканските земји. Причината за тоа не е позната, но се знае дека овој специес е одговорен за 50 % од хуманата туберкулоза во овој регион.

1.2.4. Линија 7 (етиописка линија) – ограничена на Етиопија

Соевите од „модерните“ линии 2 и 4 се одговорни за најголемиот број случаи на туберкулоза во светот, а одредени соеви од овие линии се имплицирани и како предизвикувачи на големи епидемски избивања на чувствителна и на резистентна туберкулоза [19-21]. Овие линии се поврзуваат со побрза прогресија на инфекцијата во болест и се повируленти на анимални модели отколку древните линии [20, 21]. Претпоставка е дека одредени линии подобро се адаптирале на дадена локална популација.

Некои линии, но и подгрупи во рамки на основните линии на МТВ (може да се наречат „сублинии“) се географски попроширени од другите. Дали оваа географска структура на популацијата е одраз на локалната адаптација, интринзичната структура на соевите на МТВ, хуманата демографија, т.н. „founder effect“, миграцијата, или пак е комбинација на сите претходни – не е доволно јасно. Некои од линиите би биле способни да перзистираат во различни популации (т.н. генералисти), додека други би биле способни да перзистираат само во една или неколку хумани популации (т.н. специјалисти) [22]. Споредбата на географски ограничените линии 5, 6 и 7 со географски многу пораширените линии 2 и 4 е добар пример. Уште повеќе, некои сублинии внатре

во линијата 4 исто така се разликуваат во нивната географска дистрибуција – на пример, – Haarlem и LAM фамилиите се јавуваат низ цел свет, додека други сублинии се географски ограничени (пр. Камерун (Cameroon) и Уганда (Uganda) фамилиите на соеви се најпревалентни во секоја од овие земји, соодветно) [18].

Сите МТВ линии понатаму можат да се поделат на сполиготип-фамилии или т.н. SITs (spoligotype international types) со сполиготипизација (референтна техника) [5]. Овие сполиготип-фамилии се класифицирани во светска база, која досега брои 7104 различни спологотипови што одговараат на 58 187 клинички изолати од 102 земји (SITVITWEB) [23]. Најголемиот број досегашни клинички изолати припаѓаат на 24 сполиготипови. Главните МТВ сполиготип-фамилии се: Beijing, Central Asian (CAS), East African Indian (EAI), Haarlem (H), Latin American Mediterranean (LAM), T и X. Ваквите податоци сугерираат дека некои сполиготип-фамилии се пренесуваат поефикасно од другите. Различниот потенцијал за трансмисија може да се објасни со различни фактори, како што се: специфични внатрешни карактеристики во фамилијата и специфични карактеристики во здравствената состојба на афектираната популација. Интересно е дека најголемиот број од доминантните сполиготип-фамилии опишани во дататазата им припаѓаат на т.н. „модерни“ линии: Beijing ѝ припаѓа на линијата 2, CAS на линијата 3, а Haarlem, LAM, X и T - на линијата 4. Ова укажува на повисок епидемиоген потенцијал на овие линии, што се потврдува и во практика – тие генерално се асоцирани со неодамнешна трансмисија на ТБ и со епидемии. Ова особено важи за Beijing фамилијата, која е убиквитарна и во фаза на проширување во многу земји (како што е Виетнам), а исто и за LAM фамилијата, која се шири во Африка [5].

Поради ваквите опсервации, научното истражување се фокусира на откривање дали овие линии поседуваат специфични карактеристики на вируленција. Бидејќи еволуцијата на МТВ е клонална – по пат на супституции, делеции и дупликации – можно е некои линии да акquirале специфични карактеристики во смисла на вируленција и/или резистенција пред да се прошират во популацијата [5]. Еден од најилустративните примери е Beijing типот [5]. Се работи за високовирулентен генотип, поврзан со неколку својства асоцирани со вируленција – како што се: резистенција на лекови и неуспех од лекувањето, вонбелодробна туберкулоза и туберкулозен менингитис [24]. Овие соеви се предоминантни во многу региони на Источна Азија, но се причина за многу епидемски избивања во цел свет и нивната епидемиска пропација е генерално асоцирана со резистенција на повеќе антитуберкулотски лекови. Анималните експерименти покажуваат дека овие соеви се високовирулентни генотипови, со зголемена способност

за дисеминација и побрза смрт на инфицираните животни [5], споредено со другите гениотипови [24]. Покажуваат повисока стапка на интрацелуларен раст во инфицираните хумани макрофаги и индуцираат пониска продукција на протективни цитокини. Но, факторите и механизмите кои ја детерминираат вируленцијата кај Beijing сојот остануваат елузивни, иако фенолните гликолипиди се идентификувани како еден од механизмите одговорен за нивниот фенотип [19, 24].

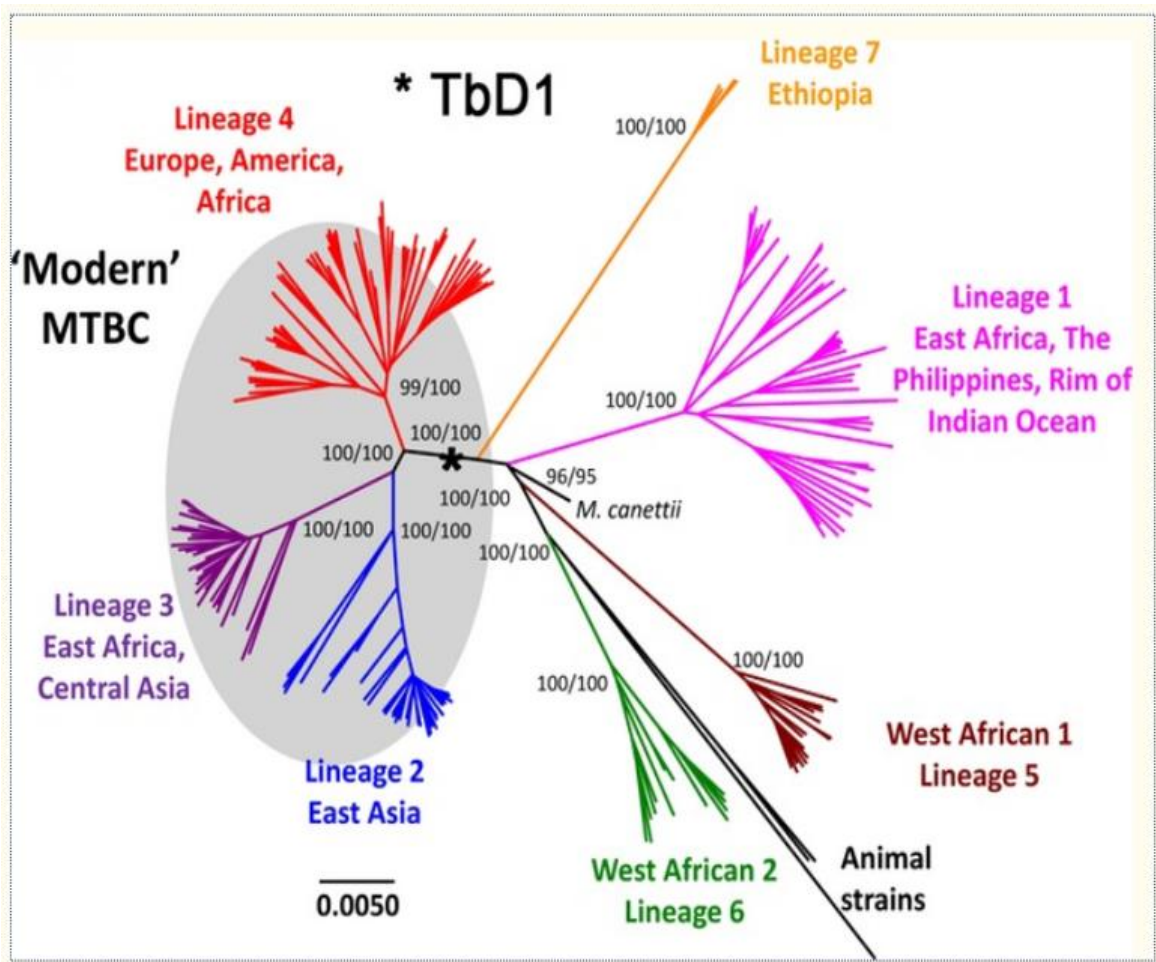
Неколку *in vitro* студии покажале дека постои разлика во одговорот на домаќинот кон модерните и древните МТВ линии [5]. Карактеристично е што инфекцијата со модерните линии е проследена со попрогресивна болест и повисок потенцијал за трансмисија. Базирано врз овие епидемиолошки и експериментални податоци, станува јасно дека еволуцијата на МТВ е сконцентрирана околу зголемена трансмисија и покачен потенцијал на вируленција.

2. **Специеси на МТВС адаптирани на животни [18].** За сите анимални линии на МТВС и хуманата *M. africanum* линија б се заеднички следниве делеции: RD7 (region of difference, регион на разликување), RD8, RD9, и RD10. Во оваа група спаѓаат: *M. microti* (патоген на глодачи – стаорци и глупци), *M. pinnipedii* (патоген на фоки и морски лавови), *M. caprae* (патоген на кози и овци), *M. orygis* (патоген на газела, антилопа и бафало), *M. mungi* (патоген на мунгос), *M. suricattae* (патоген на меркатите во Јужна Африка) и *M. bovis* (патоген на говеда). *M. bovis* порано бил сигнификантна причина за хумана туберкулоза поради консумација на необработено млеко. Инфекциите кај човекот значајно се намалиле со воведување на пастеризацијата на млекото и контрола на месото. Покрај тоа, *M. bovis* не се пренесува лесно меѓу луѓето.

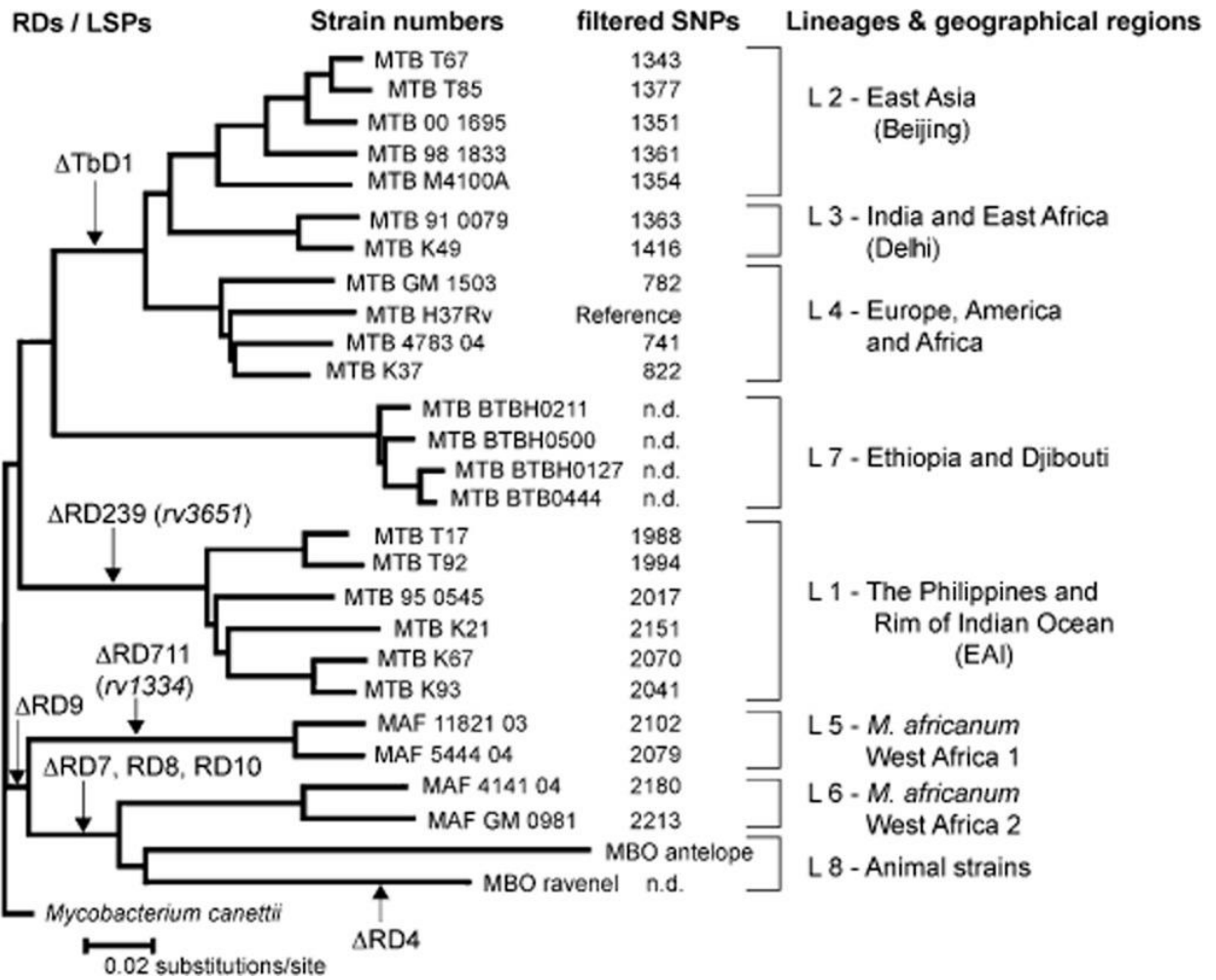
Поделбата на МТВС е според примарниот домаќин, но мора да се нагласи дека повремено е можна трансмисија на *M. tuberculosis* од човек на животни и на *M. bovis* од животни на човек [18]. Иако постои извесен степен на специес-вкрстена инфекција и трансмисија, не е демонстрирана одржлива трансмисија од човек на човек на соевите на МТВС адаптирани на животните [18], ниту пак трансмисија на *M. tuberculosis* или *M. africanum* од животно на животно [2]. За разлика од линиите на МТВС адаптирани на човек, некои соеви адаптирани на животни се способни за инфекција и трансмисија во други животински видови, различни од примарниот домаќин.

3. ***Mycobacterium canettii* [18]** спаѓа во т.н. „Smooth tubercle bacilli“ (СТВ, (мазни туберкулозни бацили). *Mycobacterium canettii* е формално дел од МТВС, но се разликува од другите членови на МТВС опишани погоре на повеќе начини: продуцира мазни и сјајни колонии на цврсти медиуми за култивирање - наспроти грубата, рапава

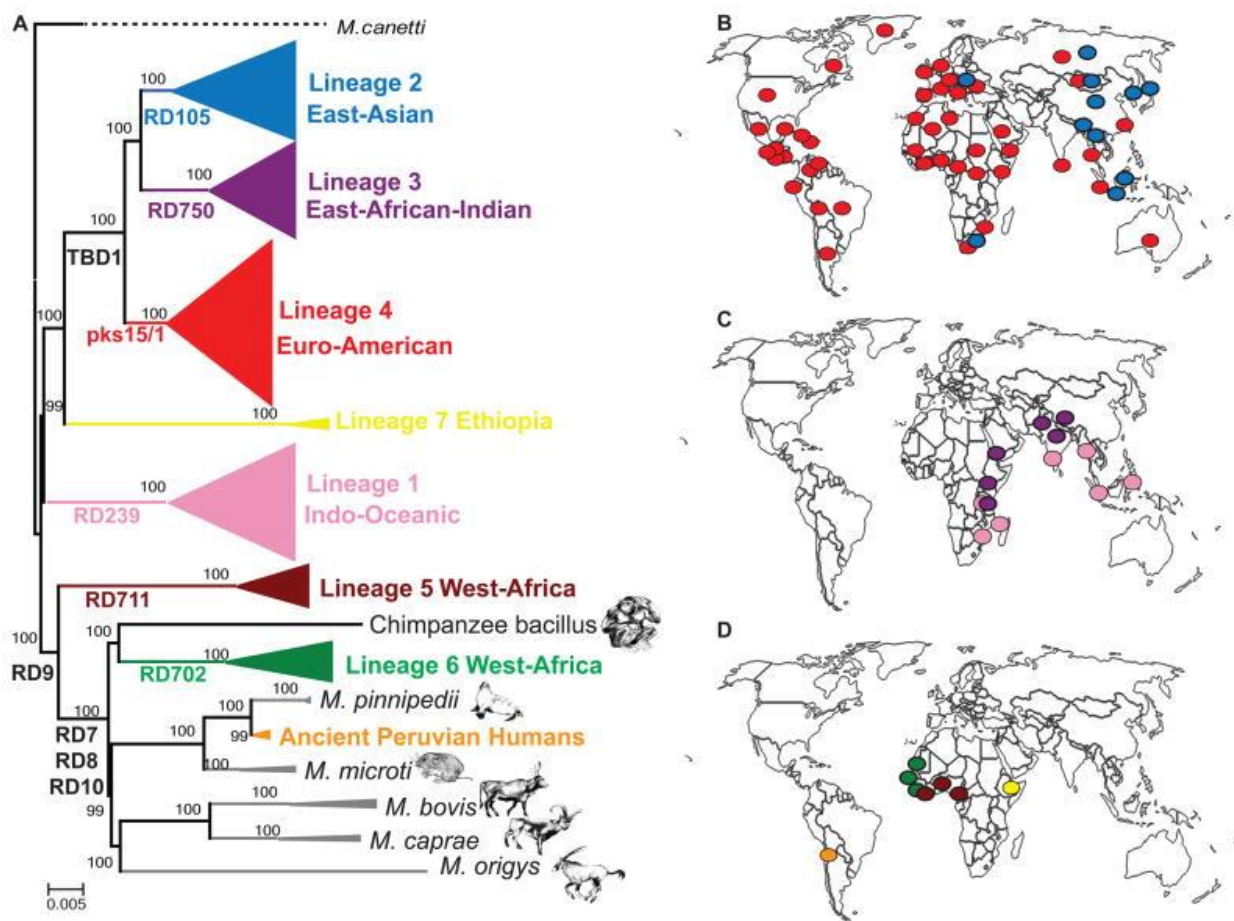
морфологија карактеристична за МТВС; подлежи на чест хоризонтален генски трансфер – што не се јавува кај класичните членови на МТВС. СТВ имаат просечно нуклеотидно совпаѓање на DNA секвенцата од над 95% и висок степен на хомологија со другите членови на МТВС, што го оправдува нивното вклучување во комплексот. До денес се рапортирани околу 60 СТВ изолати, претежно од Рогот на Африка. Изгледа дека СТВ диспропорционално ги напаѓа иселениците, децата и ХИВ-коинфицираните индивидуи. Освен тоа, не е опишана трансмисија на СТВ меѓу луѓето – оттука, овие бактерии најверојатно се опортунисти аквирани од околината, чиј резервоар постои некаде во Рогот на Африка. Но, во моментов не е познат анимален или резервоар во средината на инфекција за СТВ. Експериментите кај глувци сугерираат пониска вируленција и пократка перзистенција во тек на хронична инфекција со СТВ споредено со референтниот сој на *M. tuberculosis* (H37Rv). СТВ се бактерии од околината, а само повремено се патогени за луѓето. Ова е во голем контраст со другите членови на МТВС, кои се облигатни патогени. МТВС веројатно еволуирал од *M. canettii*-сличен предок, сој што ја изгубил способноста да преживее и во околината и во домаќинот. Генетските промени асоцирани со оваа транзиција – да стане професионален патоген – инволвираат загуба и аквизиција на гени. Помеѓу *M. canettii* – сличниот предок и најмладиот заеднички предок на денешниот МТВС била изгубена способноста за репликација вон домаќинот, но била стекната способност да се заобиколи имунолошкиот одбранбен систем на домаќинот и да се перзистира внатре во клетките на домаќинот. Ова се случило на сметка т.е. на штета на вируленцијата, бидејќи барем извесен степен на патогеност е неопходен за да настане трансмисија на МТВС. Ова можеби го означило почетокот на коеволуациска асоцијација меѓу *M. tuberculosis* и *Homo sapiens*. Значајно е што траекторијата во правец на специјализација кон одреден домаќин му овозможила на овој МТВС-предок да се прошири низ целиот свет и да стане еден од најуспешните хумани патогени.



Слика 4. Филогенија на 220 соеви на *Mycobacterium tuberculosis* complex, со секвенционирање на целиот геном (WGS) (според референца бр. 18)



Слика 5. Филогенетска еволуција на *Mycobacterium tuberculosis* базирана на присуство/отсуство на: TbD1 делецијата, регионите на разликување (RD), полиморфизмот на големи секвенци (LSP) и полиморфизмот на единечен нуклеотид (SNP) (според референца бр. 1)



Слика 6. Глобална филогеографија на *Mycobacterium tuberculosis* во светот (според референца бр. 20)

1.4. Основни микробиолошки карактеристики на микобактериите

Родот *Mycobacterium* припаѓа на кралството *Bacteria*, колото *Actinobacteria*, редот *Actinomycetales*, подредот *Corynebacterineae*, фамилија *Mycobacteriaceae*, и во него досега се идентификувани 188 вида [25]. Микобактериите се Gram-позитивни, прави или малку свиени тенки стапчести бактерии (бацили), широки 0,2-0,6 μm , долги 1,0-10 μm , аеробни, неподвижни, аспорогени, немаат капсула, каталаза позитивни. Се карактеризираат со висока содржина на G+C (guanine + cytosine) азотни бази во нивната DNA [26 -28].

Главна морфолошка карактеристика на микобактериите е нивниот клеточен ѕид [Слика 7]. Тој е тенок (20 nm), но сложено граден, богат со восоци и липиди – кои го прават хидрофобен. Меѓу липидите најважна е миколитичната киселина, со содржина од 60-90 јаглеродни атоми, ацидо-алкохол-резистентна. Клеточниот ѕид е одговорен за многу особини на микобактериите: резистенција на киселини, детергенти и антибиотици, бавно растење, антигени својства.

Внатрешната цитоплазматска мембрана е обвиткана со пептидогликански скелет, кој е поврзан со молекули на арабиногалактан и миколитична киселина, а тие се обвиткани со слободни липиди (восоци, микозиди, Cord – factor) и полипептиди. Површинските гликолипиди, вклучувајќи ги специес-специфичните микозиди (пептидогликолипиди, олиголипосахариди) и фенолните гликолипиди – имаат силни антигени својства.

Микобактериите се размножуваат со бинарна физија (попречна делба).

Во однос на брзината на репликација - односно растот на колониите, микобактериите се делат на брзорастечки (формираат видливи колонии во период до 7 дена) и бавнорастечки (со период на растење од 3-8 недели). Во однос на патогеноста микобактериите се делат на патогени и непатогени. Во патогени спаѓаат: МТВС (облигатoren патоген, причинител на туберкулоза), атипичните микобактерии (сапрофити од околината, некои може да предизвикаат опортунистички инфекции како белодробни заболувања слични на туберкулоза, но и заболувања во други органски системи – како кожата и лимфните јазли) и *M. leprae* (облигатoren патоген, причинител на лепра, Hansen-ова болест). Непатогените микобактерии, најчесто сапрофити, не предизвикуваат заболувања кај човекот и животните (брзорастечки и бавнорастечки). Во однос на продукцијата на пигменти, микобактериите се делат на фотохромогена група, скотохромогена група и нехромогена група [26-28].

Mycobacterium tuberculosis

M. tuberculosis (Koch-ов бацил) е причинителот на туберкулоза. Го открил Роберт Кох во 1882 година, за што во 1905 година добил Нобелова награда [1, 8, 26, 29]. Примарен домаќин на *M. tuberculosis* е човекот.

Морфологија. *M. tuberculosis* ги следи морфолошките карактеристики на родот *Mycobacteriaceae*. На микроскопија, бацилите се распоредени поединечно или во форма на буквите X, V, M. Вирулентните соеви во клеточниот сид содржат липид наречен Cord-factor ('б'б димиколат на трехалоза), кој е одговорен за создавање на формации во форма на испреплетени јажиња или влакна (т.н. Cord-облици) [26]. Вакви серпентинести формации може да се видат при раст во течна култура [27].

MTB тешко се бои по Gram. Ако се обои по Gram, MTB се бои слабо Gram-позитивно [26, 28]. Не се класифицира ниту како Gram-позитивна ниту како Gram-негативна бактерија, бидејќи ги нема нивните хемиски карактеристики, иако бактериите содржат поголемо количество пептидогликан (murein) во нивниот клеточен сид. Се класифицира како ацидо-алкохол-резистентен бацил (acido-alcohol-resistant-bacilli = AARB) или „acid-fast bacilli“ (AFB). Називот произлегува од фактот што клеточниот сид на бацилите, богат со липиди и восоци, е непропустлив за одредени бои – но станува пропустлив со загревање на бојата [30]; кога еднаш ќе се обојат, AFB-бактериите ја задржуваат бојата при обработка со кисели и алкохолни органски соединенија (клеточниот сид повторно станал непропустлив по ладење на бојата и стврднување на восоците). Поради тоа најчесто се бојат според методот на Ziehl-Neelsen (боење со загревање) и Kinyon (ладно боење). Направената размаска при боењето по Ziehl-Neelsen се загрева – за да може бојата карбол-фуксин да влезе во клетката. Одбојување се врши со кисел алкохол (3% H₂SO₄ и 95% C₂H₅OH), а контрастно боење со метиленско-сино. Микобактериите се бојат розово-црвено со карбол-фуксинот (миколичната киселина оневозможува одбојување), а сè друго на препаратот се обојува со сина боја (од метиленското сино). Може да се користи и флуоресцентно боење, т.е. флуоро-хром бои (аурамин, родамин) и специјален флуоресцентен микроскоп за така подготвени препарати [26, 28] [Слика 8].

Култивирање. Култивирањето се врши на специјални збогатени подлоги, во стриктно аеробни услови, оптимална температура 35-37°C [27]. Најдобра и најчесто користена за MTB подлогата базирана на јајца – т.е. Löwenstein-Jensen подлога (LJ). Подлогата содржи малахит-зелено, кој го инхибира растот на контаминиращки бактерии и дава контраст на кој лесно се забележуваат колониите [27]. Со оглед на бавната делба

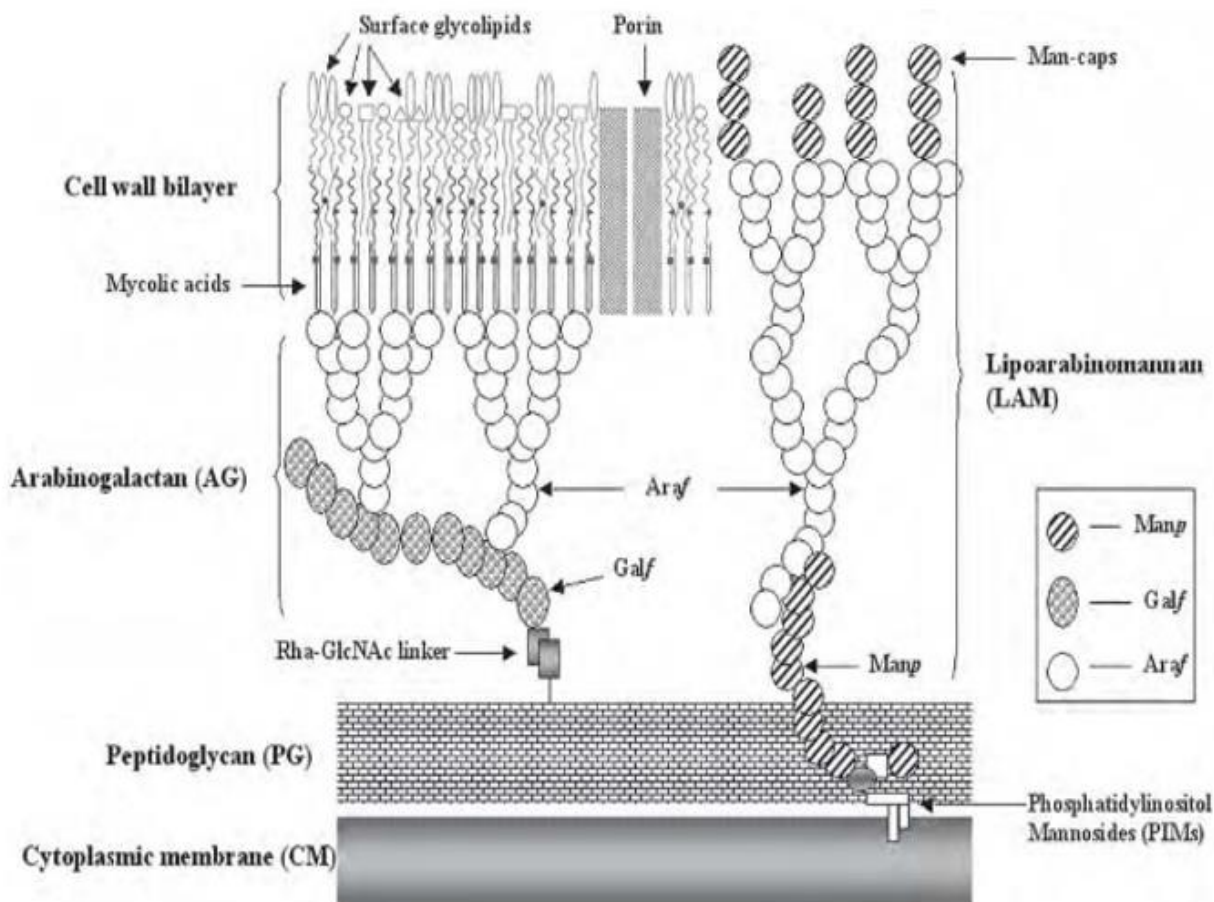
(време на една генерација изнесува 15-20 часа), растот е бавен и потребни се 2-6 недели за колониите да станат видливи, а се препорачува инкубација и до 12 недели [26]. Колониите се конвексни, дебели, рапави и груби, различни по големина и пигментирани (бели – до бледо-темножолти, жолти или крем) [Слика 9]. Култивирање може да се врши и на агар базиран медиум – т.н. Middlebrook подлога [28].

Отпорност. МТВ е отпорна бактерија. Преживува во млекото. Високорезистентна е на сушење. На темно може да живее со месеци, а на директна сончева светлина угинува за 5 минути. Многу е осетлива на топлина – на 70°C угинува за 5 мин., пастеризацијата ги уништува токму поради осетливоста на топлина [27]. Во искашлок, многу се отпорни на бази и киселини (H₂SO₄, HCl, KOH, NaOH). Осетливи се на формалдехид, глутаралдехид и алкохол.

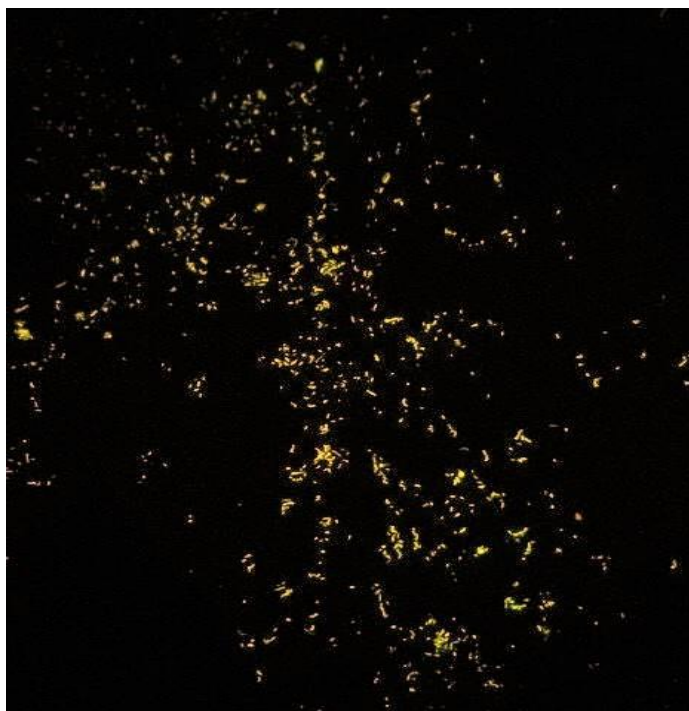
Антигенска структура. Антигените се класифицираат како солубилни (цитоплазматски) и несолубилни (врсани за клеточниот сид). По состав се протеини или јаглени хидрати. Туберкулин е екстракт од бактеријата кој содржи специфичен протеин што може да предизвика посебен вид доцна алергиска реакција. Со прочистување на туберкулинот е добиен PPD (purified protein derivate, прочистен протеински дериват), кој се користи за изведување на Mantoux-кожниот тест.

Геном. Геномот на МТВ е комплетно секвенциониран. Го сочинува еден кружен хромозом – кој се состои од 4 403 837 bp (base pairs), содржи 4246 гени и G+C 65, 60 mol% [26]. Првиот комплетно секвенциониран микобактериски геном, достапен на научната заедница е геномот на *M. tuberculosis* H37Rv [Слика 10]. Овој сој, кој изворно бил изолиран од пациент со белодробна туберкулоза во 1905 година, е широко прифатен и проучуван како референтен сој на *M. tuberculosis* кој со текот на годините во потполност ја сочувал вируленцијата [16, 31].

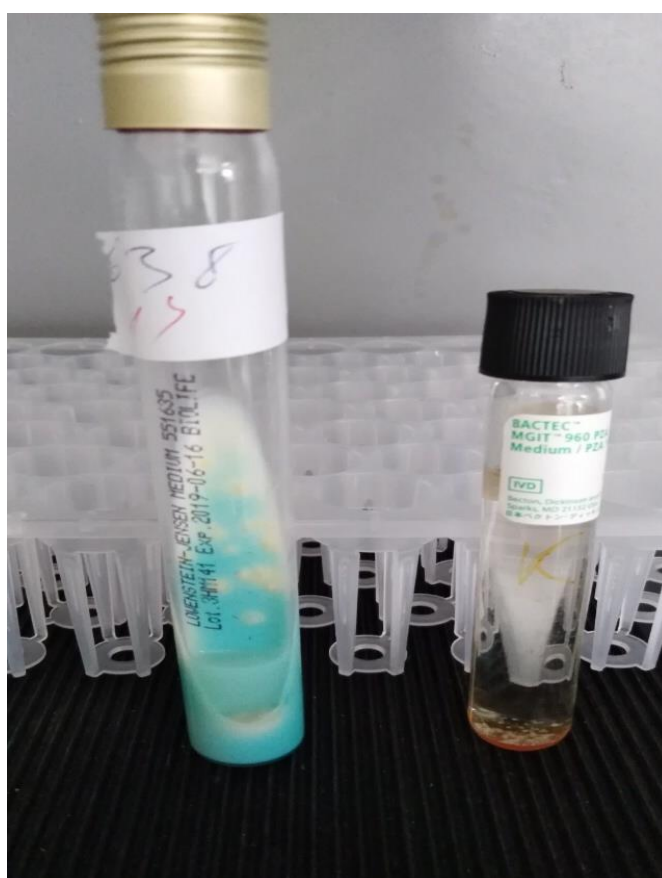
Вируленција. Клеточниот сид богат со липиди (миколична киселина) е одговорен за резистенцијата и главен фактор на вируленцијата. Во белите дробови, макрофагите ги фагоцитираат туберкулозните бацили – но не се способни да ги дигестираат. Клеточниот сид ја спречува фузијата на фагозомот со лизозомот во фаголизозом. Туберкулозните бацили можат да се размножуваат во макрофагите [26].



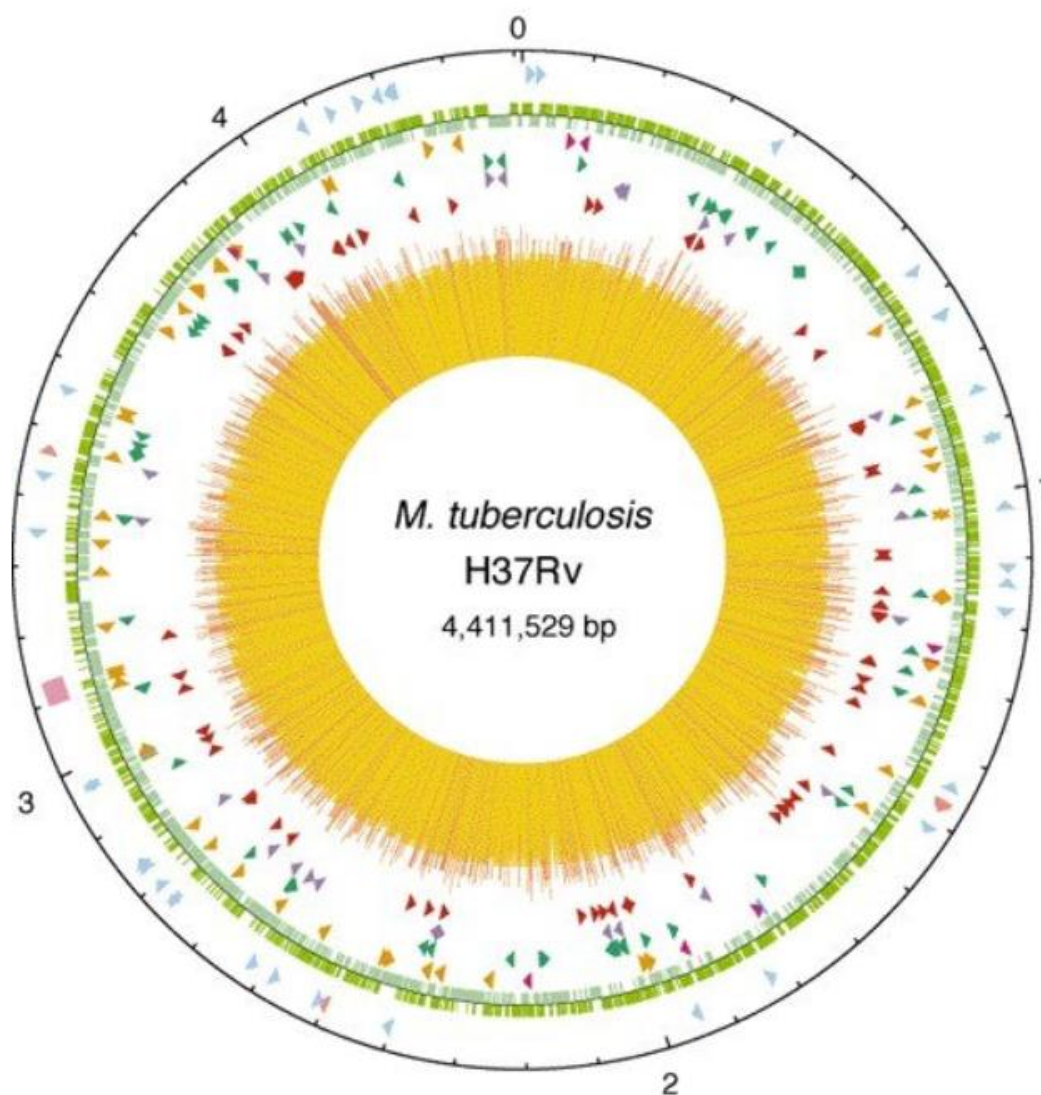
Слика 7. Структура на клеточниот ѕид на микобактериите. Сржта на клеточниот ѕид ја сочинуваат три ковалентно поврзани полимери: пептидогликан, арабиногалактан и миколични киселини. Липидите на клеточниот ѕид формираат асиметричен липиден двослој, чијшто внатрешен слој се состои исклучиво од миколични киселини, додека надворешниот слој го сочинуваат екстрактибилни гликолипиди. Се смета дека липоарабиномананот ги поврзува клеточниот ѕид и цитоплазматската мембрана преку „сидро“ од фосфатидилинозитол, вметнато во клеточната мембрана (според референца бр. 7)



Слика 8. *Mycobacterium tuberculosis*: аурамин-О бојење, флуоресцентна микроскопија (извор: ИБЗТ)



Слика 9. *Mycobacterium tuberculosis*: култура на подлога по Löwenstein–Jensen (лево) и ВАСТЕС МГИТ 960 (десно) (извор: ИБЗТ)



Слика 10. Циркуларна мапа на хромозомот на *M. tuberculosis* H37Rv. Надворешниот круг ја покажува скалата во Mb (mega base), при што со „0“ е означен почетокот на репликација. Првиот круг од надвор ги маркира позициите на стабилните RNA гени (tRNA, транспортна рибонуклеинска киселина - се сини, а другите се розови) и директниот повторувачки регион (розов квадрат); вториот круг однатре го покажува кодирањето (според референца бр. 16).

Патогеност за луѓето [26]. Туберкулозата е специфично заболување кое најчесто се пренесува преку респираторниот систем (повеќе од 90%), а поретко преку системот за варење, кожата и другите слузокожи. Ретко, може да предизвика болест кај животните. Туберкулозата се јавува во форма на:

- белодробна (пулмонална) туберкулоза
- вонбелодробна (екстрапулмонална) туберкулоза – каде практично може да биде зафатен било кој орган.

Микробиолошка дијагноза [26]. Се поставува со:

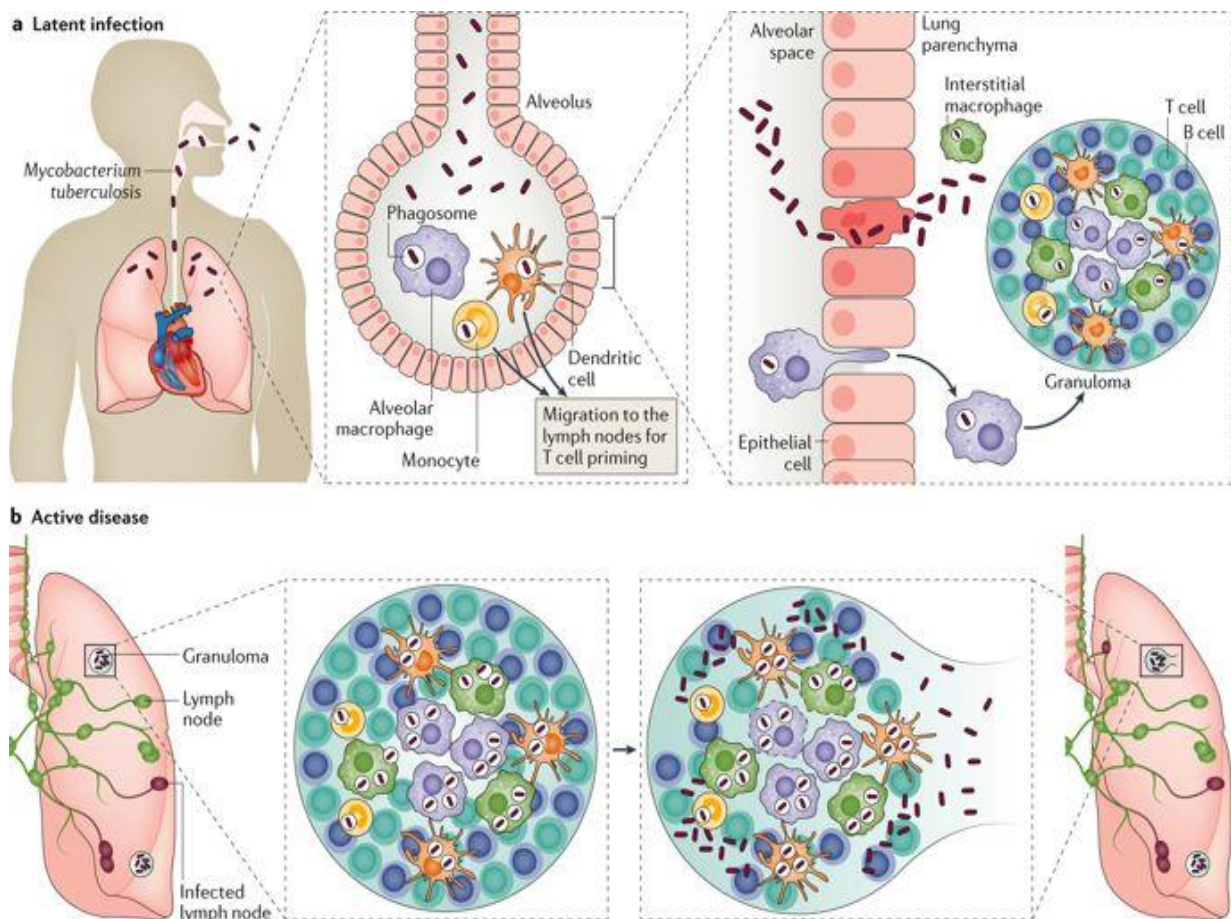
1. Микроскопија. Се испитуваат биолошки примероци (најчесто спутум), кои се третираат со 3% КОН и NaOH заради ликвефакција и деконтаминација, а потоа центрифугирање (хомогенизација). Се прави размаска која се бои со едно од погоре наведените боења.
2. Култивирање на подлога по Löwenstein–Jensen (6-12 недели).
3. Молекуларна дијагностика (Polymerase chain reaction, PCR). Постојат различни методи за брза молекуларна дијагностика, со високо ниво на сензитивност и специфичност.
4. Имунолошки тестови. Mantoux-кожен тест и IGRA (Interferon-gamma releasing assay, интерферон-гама ослободувачки тест) тестови за индиректно докажување на латентна туберкулозна инфекција.

Вируленцијата на бацилот на туберкулоза првенствено се должи на неговата способност за преживување во макрофагите отколку на способноста за продукција на токсични супстанции. Во механизмот на вируленцијата на МТВС се инволвирани повеќе фактори, со комплексна и комплицирана меѓусебна интеракција, што сè уште не е доволно разјаснета [27].

Во човечкиот организам бацилот на туберкулоза индуцира клеточно-посредуван имун одговор. Присуството на Т-помагачки лимфоцити од типот Т_H-1 овозможува заштитен имун одговор, додека Т_H-2 клетките ја олеснуваат реакцијата на преосетливост со оштетување на ткивото и прогресија на болеста [27]. Во текот на инфекцијата природата на имуниот одговор се менува, поради што хуманата туберкулоза е поделена на примарна и постпримарна ТБ, со сосема различна патолошка слика [27].

1.5. Белодробна туберкулоза – инфекција, патогенеза и клинички карактеристики

Инфекција и патогенеза. Туберкулозата е аерогена инфективна болест предизвикана од *Mycobacterium tuberculosis*. Се пренесува од болен на здрав човек по аероген пат, преку инфективни јадра (Flügge-ови капки) кои ја содржат бактеријата и кои се доволно мали (пречник од 1-5 μm) за да доспеат во белодробните алвеоли по пат на инхалација [32] [слика 11]. Овие капки се создаваат при кашлање, кивање, зборување или пеење. Болен од активна туберкулоза кој не се лекува инфицира околу 10-15 луѓе во тек на една година. Веројатноста за пренос на инфекцијата од едно на друго лице зависи од инфективната доза (број на инфективни јадра кои болниот ги исфрла од белите дробови, и концентрацијата на вијабилни туберкулозни бацили во нив), времетраењето на експозицијата, вируленцијата на МТВС и имунолошкиот статус на домаќинот [33, 34]. Туберкулозната инфекција почнува кога микобактериите – по пат на инхалација на инфективни јадра - ќе доспеат во белодробните алвеоли, каде што ги инвадираат и се реплицираат во алвеоларните макрофаги. Еден туберкулозен бацил поминува низ 5-6 репликациски циклуси во алвеоларниот макрофаг во тек на 5-6 дена, што резултира со некроза на макрофагот и инвазија на нови алвеоларни макрофаги од страна на реплицираните бацили [35]. Алвеоларните макрофаги ги фагоцитираат инхалираните микобактерии, и влегуваат во интеракција со Т-лимфоцитите, што резултира со диференцијација на макрофагите во епителоидни хистиоцити [36]. Кај лица со интактен имун систем, епителоидните хистиоцити и активираните лимфоцити агрегираат со формирање на гранулом – кој ги ограничува мултипликацијата и ширењето на бактериите [33]. Важно својство на туберкулозниот гранулом е развојот на некроза во центарот, каде што се концентрираат туберкулозните бацили [33]. Во грануломот, CD4 Т-лимфоцитите (ефекторски Т-клетки) секретираат цитокини, како интерферон- γ , кои ги активираат макрофагите за да ги уништат бактериите со кои претходно се инфицирани. CD8 Т-лимфоцитите (цитотоксични Т-клетки) исто така можат директно да ги убијат инфицираните клетки [34]. Кај најголемиот број лица со интактен имунолошки систем, пролиферацијата на бактериите запира штом ќе се развие клеточно-посредуван имун одговор. Но, бактериите не секогаш се елиминираат од грануломот и мал број вијабилни бацили може да перзистираат во т.н. dormant-состојба, што резултира со латентна туберкулозна инфекција (ЛТБИ) [34].



Nature Reviews | Disease Primers

Слика 11. Инфекција со *Mycobacterium tuberculosis*. а. Латентна инфекција. Инфекцијата почнува со инхалација на туберкулозните бацили во белите дробови – сè до алвеолите, каде што алвеоларните макрофаги ги фагоцитираат. Ако оваа прва линија на одбрана не успее да ги елиминира бактериите, *M. tuberculosis* продира во интерстицијалното белодробно ткиво, директно - преку инфекција на алвеоларниот епител, или индиректно - фагоцитирани во макрофагите кои мигрираат во белодробниот паренхим. Дендритичните клетки или инфламаторните моноцити го транспортираат *M. tuberculosis* до белодробните лимфни јазли, каде што се среќава со Т-лимфоцитите. Ова води до регрутација на имуни клетки, вклучувајќи Б и Т-лимфоцити, во белодробниот паренхим и формирање на гранулом. б. Активна болест. Бацилите се реплицираат во грануломот. Ако бактериската концентрација стане преголема, грануломот нема да може и натаму да ја ограничува инфекцијата и бактериите ќе се расеат во регионалните лимфни јазли и евентуално во други органи, вклучувајќи го и мозокот. Во оваа фаза, бацилите можат да влезат во крвотокот или повторно во респираторниот тракт и од тука во околината. Така инфицираниот домаќин станува заразен за околината, и има симптоми – односно има активна туберкуозна болест (преземено од референца бр.9).

Примарна и пост-примарна туберкулоза (секундарна ТБ; реактивирана ТБ; релапс на ТБ). Примарниот локус на инфекција во белите дробови се вика Ghon-ово огниште [37, 38]. Тоа може да се зголемува – како што напредува болеста – или, што е многу почесто, да се излекува односно да заздриви. Процесот на излекување може да резултира со видлива фиброза која може да содржи фокуси на калцификација. Во раната фаза на инфекцијата, пред да се развие клеточниот имун одговор, бактериите се шират преку лимфните патишта во регионалните медијастинални и хиларни лимфни јазли и преку крвните садови т.е. хематогено на оддалечени места во телото. Комбинацијата на Ghon-ово огниште и зафатените лимфни јазли, вообичаено од десната страна, е позната како Ranke-ов комплекс (примарен комплекс) [39, 40, 41]. Иако примарниот комплекс понекогаш може да се види на рендгенграфија на бели дробови, во најголем број случаи иницијалната туберкулозна инфекција е клинички и радиографски инапаратна [33, 38].

Во најголем број случаи специфичниот имунолошки одговор е адекватен за да ја лимитира натамошната репликација на туберкулозните бацили, домаќинот останува асимптоматски и лезиите заздравуваат. Кај околу 5% од инфицираните индивидуи, имунолошкиот одговор е неадекватен, т.е. контролата на реплицирачките бактерии е несоодветна, и се развива клинички активна болест – состојба позната како „прогресивна примарна инфекција“ односно „примарна туберкулоза“ [33, 34]. Ризикот од прогресија на инфекцијата во болест е најголем во првите две години од животот и во тој период се појавуваат 50% од случаите [33, 42]. Иако примарната туберкулоза е позната како болест на детската возраст, таа може да се јави и кај адултната популација [34]. Кај најголемиот број од инфицираните (90%), туберкулозната инфекција останува клинички асимптоматска и без можност за микробиолошка потврда во тек на многу години (латентна туберкулозна инфекција, ЛТБИ) [42]. Кај дополнителни 5% од инфицираната популација, многу години по иницијалната инфекција доаѓа до ендогена реактивација на примарната инфекција, т.е. на ЛТБИ и се развива болест (т.н. „постпримарна туберкулоза“) [33, 34, 42].

Некои болести и состојби можат да ја редуцираат способноста на домаќинот да одговори на присуството на микроорганизмот и кај нив веројатноста од развој на болест е поголема. Ризикот од реактивација го зголемуваат силикоза, дијабетес, болести асоцирани со имunosупресија (како ХИВ-инфекција), имunosупресивна терапија (кортикостероиди, други имunosупресивни лекови), екстреми во возраста, малнутриција, карцином, бубрежна болест во краен стадиум. Исто така, ризикот од развој на туберкулоза е поголем во првите две години од животот [33]. Кај одредени ризични

групи постои зголемен ризик од ендогена реактивација на ЛТБИ и прогресија во активна болест. Потребно е тие да се идентификуваат и да се преземат соодветни профилактивно-тераписки мерки [43].

Контроверзијата на ендогена реактивација наспроти егзогена реинфекција во континуитет ја следи туберкулозата [34, 44, 45, 46, 47]. Реинфекција се однесува на состојба која се развива како последица на неодамнешна повторна експозиција (суперинфекција) со туберкулозни бацили. Егзогената реинфекција е досега документирана и кај лица без позната имунокомпромитација и кај лица со напредната ХИВ-инфекција [48-50]. Резултатите од молекуларните епидемиолошки студии покажуваат дека егзогената реинфекција изгледа е главната причина за туберкулоза кај возрасните и дека кај пациенти со активна туберкулоза во области со висока инциденца на болеста се присутни мултипли инфекции [51-53]. Реинфекцијата придонесува во голема мера за глобалниот товар на туберкулозата, особено во ендемските области за ТБ [51, 52], но точната пропорција на учество на реинфекцијата останува непозната. Според метаанализата на Fok et al. од 2008 година [54] на претходни популациски епидемиолошки студии, кластери на инфекција (неодамнешна инфекција – што индицира примарна ТБ или ТБ поради реинфекција) учествуваат со медијана од 38,7% во туберкулозната инфекција. Со други зборови, случаите на туберкулоза поради далечна инфекција или реактивација на инфекцијата претставуваат повеќе од 60% од сите случаи на ТБ. Оттука, постпримарната туберкулоза, која се јавува многу години по примоеинфекцијата кај околу 5% од инфицираните [33, 34, 42] е резултат на ендогена реактивација на инфекцијата, но во ~ 40% треба да се смета на нова т.е. егзогена реинфекција [47].

Реактивираната туберкулоза има тенденција примарно да ги зафати апикалните и постериорните сегменти на горните белодробни резени и супериорните сегменти на долните резени. Оваа локација веројатно се должи на комбинацијата од релативно повисок кислороден притисок и послаба лимфатична дренажа во овие регии [34, 39, 40]. За разлика од местото на примарна инфекција, каде што заздравувањето/излекувањето е правило, реактивираната туберкулоза покажува тенденција за прогресија. Главните абнормалности се прогресивна инфламација и некроза, честопати со формирање на комуникација со дишните патишта и создавање на каверна. Ендобронхијалната дисеминација на некротичен материјал од каверната може да резултира со туберкулозна инфекција во истиот или во другите резени [39, 41]. Хематогената дисеминација може да резултира со милијарна туберкулоза [9, 34, 35, 39, 40]

Клинички карактеристики. Болните лица со активна белодробна туберкулоза можат да бидат асимптоматски, да имаат блага или прогресивна непродуктивна/продуктивна кашлица, или да имаат мултипни симптоми – вклучувајќи покачена телесна температура, малаксаност, замор, загуба во телесна тежина, ноќно потење и кашлица проследена со примеси на крв во искашлокот. Ако се открие рано и навремено се лекува, болниот бргу станува неинфективен за околината и болеста на крај завршува со излекување [9, 27, 33, 34, 42, 46, 55].

Иако туберкулозата практично може да го зафати кој било орган, од аспект на јавното здравје и контролата на инфекцијата, белодробната туберкулоза е најважниот облик – токму поради инфективноста за околината. Една од најважните имунолошко-патолошки карактеристики на активната болест е формирањето каверни. Овие структури имаат тенденција да содржат голема концентрација на туберкулозни бацили, и отука кавернозната туберкулоза е најинфективниот облик на болеста. Вонбелодробната туберкулоза начелно е неинфективна и поради тоа има помало јавно-здравствено значење [2, 56]. Стапката на трансмисија на болеста од микроскопски-позитивните пациенти е многу висока (од 40 до 60%) [38]. Она што е загрижувачко е трансмисијата на туберкулоза од микроскопски-негативните пациенти со активна болест, кое е јасно документирано [38, 57-61]. Во контекст на претходното, туберкулозата претставува голем јавно-здравствен проблем и поради фактот што приближно 1/4 до 1/3 од светската популација има ЛТБИ, претставувајќи на тој начин природен резервоар на овој патоген [5, 8].

1.6. Резистенција кај микобактериите

Кај микобактериите постојат два типа резистенција: интринзична и стекната [62].

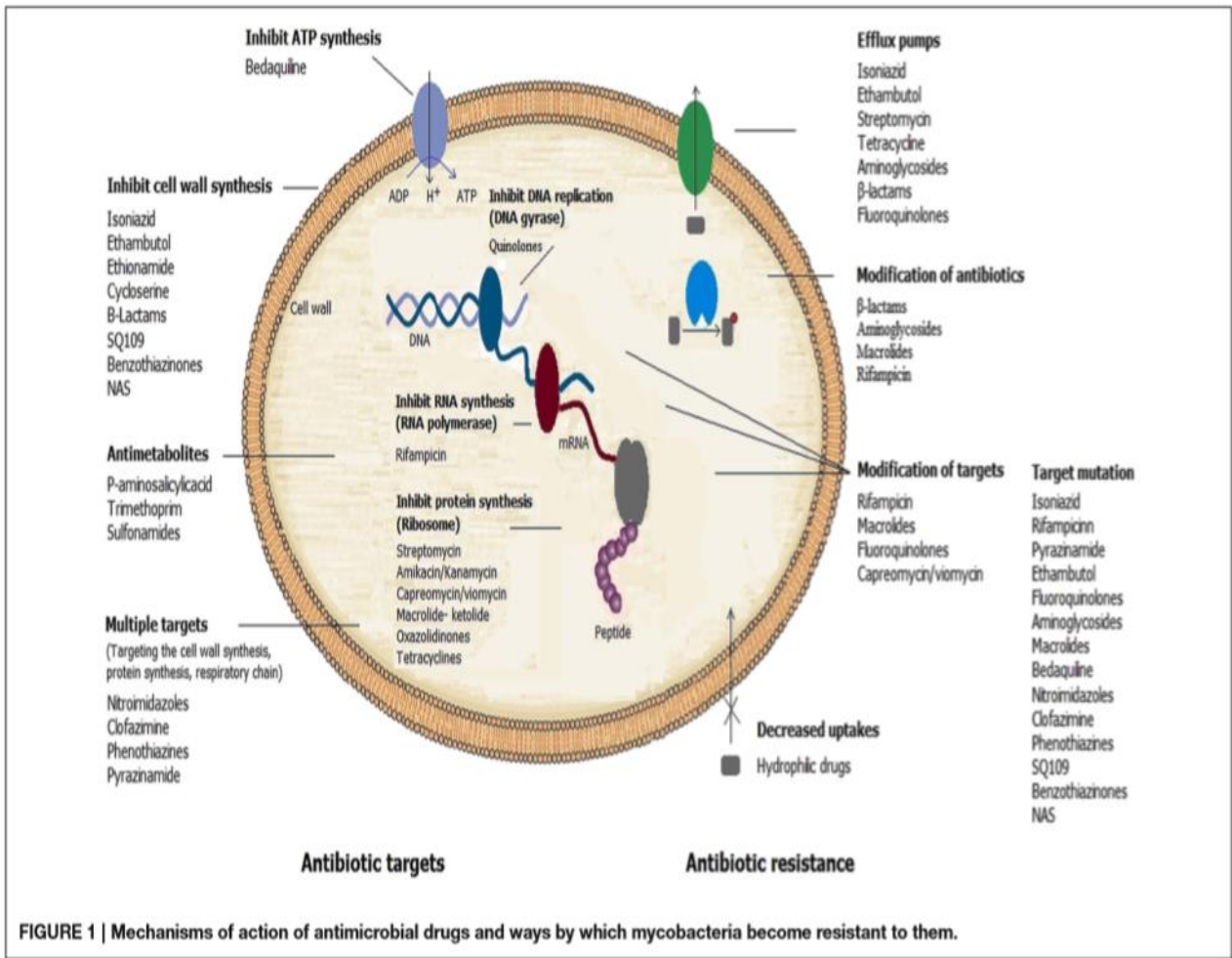
А. Механизми на интринзична резистенција:

1. Спречување на пристапот на лекот до неговиот таргет т.е. целно место (непропустливост на клеточниот ѕид, дормантност и латенција, порин-каналите и ефлукс-пумпи)
2. Модификација на таргетот т.е. целното место на дејствување на антибиотиците
3. Модификација на антибиотиците (ензимска деградација на антибиотикот; ензимска модификација на антибиотикот)
4. Активација на транскрипциски регулатор

Б. Стекната резистенција. Антимикробните лекови се врзуваат специфично и со висок афинитет за нивните целни места („target“), и на тој начин ја оневозможуваат нормалната активност на таргетот. Промена во структурата на таргетот ќе го спречи врзувањето на лекот за неговото целно место, што резултира со појава на резистенција. За разлика од другите бактерии каде што стекнатата резистенција генерално настанува со хоризонтален трансфер посредуван од мобилни генетски елементи, кај микобактериите стекнатата резистенција главно настанува како последица на спонтани мутации во хромозомските гени кои ги кодираат таргетите. Механизмите на резистенција на микобактериите се сумирани во Слика 12. Кај МТВС се опишани точкести мутации асоцирани со резистенција за сите лекови од прва линија (рифампицин, изониазид, пиразинамид и етамбутол), како и за неколку лекови од втора линија и некои понови лекови (флуорохинолони, макролиди и бедакилин, соодветно) [63-65].

Механизми на резистенција на лекови кај *Mycobacterium tuberculosis*

Резистенцијата на лекови кај клиничките соеви на МТВС во најголем дел се должи на хромозомски мутации (стекната резистенција) [66]. Се смета дека ова е примарниот механизам на резистенција кон рифампицин и изониазид, двата најмоќни антитуберкулотски лекови [62]. Главните механизми кои доведуваат до резистенција на лекови вклучуваат: алтерација на целното место на лекот, прекумерна експресија на целното место на лекот, прекин на активација на пролекот и активација на ефлукс-пумпа [67]. Во Табела 1 и Табела 2 се сумирани главните генски локуси на МТВС инволвирани во резистенцијата на лекови, механизмите на резистенција и нивната честота.



Слика 12. Механизми на резистенција на микобактериите кон антимиќробни лекови (според референца бр. 62).

Табела 1. Гени асоцирани со резистенција на *Mycobacterium tuberculosis* кон антитуберкулотски лекови (превод од референца бр. 66)

Лек	Ген асоциран со резистенција	Застапеност (%)	Функција на генот	Реф.
Рифампицин	<i>rpoB</i>	95-99	β -субединица на RNA-полимераза	6, 7
Изониазид	<i>katG</i>	60-95	Каталаза-пероксидаза	8, 9
	<i>inhA</i>	8-43	Промотор регион за 2 транс-еноил-ацил носач протеин редуктаза	10, 11
Етамбутол	<i>embB</i>	40-68	Арабинозил-трансфераза	12
	<i>ubiA</i>	9,5-45,5	5-Фосфо- α -d-рибоза-1-дифосфат: декапренил-фосфат 5-фосфорибозилтрансфераза	13
Стрептомицин	<i>rpsL</i>	70-85	Рибозомски протеин S12	14, 15
	<i>Rrs</i>	70-85	16S rRNA	14
	<i>gidB</i>	Н/Д	Претпоставена 16S rRNA метил-трансфераза	16
Хинолони	<i>gyrA</i>	97-98	Субединица А на DNA-гираза	17
	<i>gyrB</i>	Н/Д	Субединица В на DNA-гираза	18
Амино-гликозиди	<i>Rrs</i>	86-97	16S rRNA	19
	<i>Eis</i>	Н/Д	Аминогликозид ацетил-трансфераза	20
Пиразинамид	<i>pncA</i>	до 99	Конверзија на амид	21
	<i>rpsA</i>		Рибозомски протеин S1	
	<i>panD</i>		Аспартат декарбоксилаза	
	<i>clpC1</i>		Протеаза	
Циклосерин	<i>Ald</i>	Н/Д	L-аланин дехидрогеназа	22
	<i>Alr</i>	Н/Д	Аланин рацемаза	22, 23
Пара-амино салицилна киселина	<i>folC</i>	Н/Д	Дихидрофолат синтетаза	24
	<i>dfrA</i>	Н/Д	Дихидрофолат редуктаза	25
	<i>thyA</i>	37	Тимидилат синтетаза	24
Линезолид	<i>rplC</i>		50S рибозомски протеин L3	26
	<i>Rrl</i>		23S rRNA ген	27
Клофазимин	<i>rv0678</i>	Н/Д ¹	Транскрипциски регулатор за репресирање на експресијата на мултисупстрат-ефлукс-пумпата MmpL5	28, 29
	<i>rv1979c</i>		Можна пермеаза	
	<i>rv2535c</i>		PerQ претпоставена аминокептидаза	
Бедаквилин	<i>rv0678</i>	Н/Д ¹	Транскрипциски регулатор за репресирање на експресијата на мултисупстрат-ефлукс-пумпата MmpL5	28, 30
	<i>atpE</i>	Н/Д ²	F0-субединица на АТФ-синтетаза	31
Деламанид	<i>ddn</i>	Н/Д	Деазафлавин-зависна нитроредуктаза	32
	<i>fgd1</i>	Н/Д	Глукоза-6-фосфат дехидрогеназа	33
	<i>fbiA</i>	Н/Д ³	Протеин FbiA за биосинтеза на флавин кофактор F ₄₂₀	34
	<i>fbiB</i>	Н/Д ²	Протеин FbiB за биосинтеза на флавин кофактор F ₄₂₀	35
	<i>fbiC</i>	Н/Д ²	Протеин FbiC за биосинтеза на флавин кофактор F ₄₂₀	35

АТФ, аденозин трифосфат; Н/Д, не е достапно; RNA, рибонуклеинска киселина; rRNA, рибозомска RNA; реф., референца; ¹ = врз база на лабораториски сој, еден клинички изолат; ² = лабораториски сој/соєви; ³ = врз база на еден клинички изолат.

Табела 2. Целно место („target“) и механизам на дејство на антитуберкулотските лекови кај *Mycobacterium tuberculosis* (според референца бр. 62)

Agent	Mode of action	Target	Proven utility for (MIC µg/ml)	Gene	Gene function	Most prevalent mutation
Isoniazid	Inhibition of mycolic acid synthesis	Mycolic acids	<i>M. tuberculosis</i> (0.02–0.1 in 7H10)	<i>katG</i>	Catalase-peroxidase	Ser-315-Thr
				<i>inhA</i>	Enoyl ACP reductase	C-15-T SNP
				<i>Ndh</i>	NADH dehydrogenase II	Arg-13-Cys, Val-18-Ala
				<i>ahpC</i>	Alkyl hidroperoxidase	C-39-T, G-9-A, SNPs
Rifampicin	Inhibition of RNA polymerase	RNA polymerase	<i>M. tuberculosis</i> (1 in 7H10) <i>M. kansasii</i> (2) <i>M. marinum</i> (1)	<i>kasA</i>	b-ketoacyl-ACP synthase	Gly-269-Ser
				<i>rpoB</i>	B-subunit of RNA polymerase	Ser-450-Leu
Pyrazinamide	Inhibition of energy production and trans-translation	Fatty acid synthase-I, ribosomal protein S1	<i>M. tuberculosis</i> (16–50 in L)	<i>pncA</i>	Pyrazinamidase	Asp-12-Ala/Asn, Leu-85-Pro
				<i>rpsA</i>	S1 ribosomal protein	Deletion Ala438, Thr-5-Ala
				<i>panD</i>	Aspartate decarboxylase	Ala-128-Ser, Val-138-Ala
Ethambutol	Inhibition of arabinogalactan synthesis	Arabinosyl transferases	<i>M. tuberculosis</i> (5 in 7H10) <i>M. kansasii</i> (5) <i>M. marinum</i> (5)	<i>embCAB</i>	Arabinosyl transferases	Met-306-Val/Ile/Leu
Streptomycin	Inhibition of protein synthesis	30S ribosomal subunit	<i>M. tuberculosis</i> (2–10 in 7H10)	<i>rpsL rrs</i>	S12 ribosomal protein 16S	Lis-43-Arg
				<i>gidB</i>	rRNA 16S rRNAmethyltransferase	A-1401-G SNP Leu-16-Arg
Amikacin/Kanamycin	Inhibition of protein synthesis	30S ribosomal subunit	<i>M. tuberculosis</i> (5 in 7H10)	<i>Rvs</i>	16S rRNA	A-1401-G SNP
				<i>M. kansasii</i> (32)	<i>Eis</i>	Aminoglycoside acetyltransferase

Табела 2 (продолжува). Целно место („target“) и механизам на дејство на антитуберкулотските лекови кај *Mycobacterium tuberculosis* (според референца бр. 62)

Agent	Mode of action	Target	Proven utility for (MIC µg/ml)	Gene	Gene function	Most prevalent mutation
Capreomycin/viomycin	Inhibition of protein synthesis	30S and 50S ribosome subunits	<i>M. tuberculosis</i> (10 in 7H10)	<i>rrs</i>	16S rRNA	A-1401-G SNP
				<i>tylA</i>	rRNA methyltransferase	G-223-T SNP
				<i>Eis</i>	Aminoglycoside acetyltransferase	G-37-T, C-12-T SNPs
Ethionamide	Inhibition of mycolic acid synthesis	Mycolic acids	<i>M. tuberculosis</i> (5 in 7H10)	<i>ethA</i>	Monooxygenase	Leu-397-Arg, Leu-328-Met
				<i>inhA</i>	Enoyl-ACP reductase	Ile-21-Thr/Val, Ser-94-Ala
				<i>Ndh</i>	NADH dehydrogenase	Arg-13-Cys, Val-18-Ala
				<i>mshA</i>	Glycosyl transferase	Val-171-Gly, Aal-187-Val
Fluoroquinolones	Inhibition of DNA gyrase	DNA gyrase	<i>M. tuberculosis</i> (2 in 7H10)	<i>gyrA</i>	DNA gyrase subunit A	Ala-90-Val, Asp-94-Gly/Tyr
				<i>M. kansasii</i> (2)	<i>gyrB</i>	DNA gyrase subunit B
P-aminosalicylic acid (PAS)	Inhibition of folate synthesis	Thymidylate synthase, Dihydrofolate synthase, Dihydrofolate reductases	<i>M. tuberculosis</i> (2 in 7H10)	<i>thyA</i>	Thymidylate synthase	Thr-202-Ala, Val-261-Gly
				<i>folC</i>	Dihydrofolate synthase	Glu-153-Aal, Asn-73-Ser
				<i>ribD</i>	Dihydrofolate reductases	G-11-A SNP
Cycloserine	Inhibition of peptidoglycan synthesis	Alanine racemase, D-Alanine-D-alanine ligase, D-serine/L- and D-alanine/glycine/D-cycloserine proton symporter, L-alanine dehydrogenase	<i>M. tuberculosis</i> (5-10 in BACTEC)	<i>alr</i>	Alanine racemase	G-10-T SNP
				<i>ddl</i>	D-Alanine-D-alanine ligase	-
				<i>cycA Ald</i>	D-serine/L- and D-alanine/glycine/D-cycloserine proton symporter	Gly-122-Ser
					L-alanine dehydrogenase	

Табела 2 (продолжува). Целно место („target“) и механизам на дејство на антитуберкулотските лекови кај *Mycobacterium tuberculosis* (според референца бр. 62)

Agent	Mode of action	Target	Proven utility for (MIC µg/ml)	Gene	Gene function	Most prevalent mutation
					D-alanine/glycine/D-cycloserine proton symporter	
					L-alanine dehydrogenase	
Macrolide- ketolide	Inhibition of protein synthesis	50S ribosomal subunit	<i>M. avium</i> (8–16 in BACTEC)	<i>rrl</i>	23S ribosomal RNA	A-2058-T, A-2059-C SNPs
Clofazimine	Interfering with redox	NADH dehydrogenase	<i>M. tuberculosis</i> (1)	<i>rv0678</i>	Transcriptional regulator	G193 deletion, C-466-T SNPs
	Cycling, causing membrane destabilization and production of reactive oxygen species			<i>rv2535c</i> <i>rv1979c</i>	Peptidase Permease	G-265-T SNP T-1052-C SNP
Oxazolidinones (Linezolid, Sutezolid [PNU-100480] and AZD5847)	Inhibition of protein synthesis	50S ribosomal subunit	<i>M. tuberculosis</i> (4–8)	<i>rplC</i>	23S ribosomal rRNA 50S ribosomal protein L3	G-2061-T, G-2576-T, G-2270-T T-460-C
B-Lactams (In combination with betaactamase inhibitor)	Inhibition of peptidoglycan synthesis	Transpeptidases	<i>M. tuberculosis</i> (NR) RGM (128)	<i>blaC ponA</i> <i>Pbp</i>	beta-lactamase Penicillin-binding Proteins Penicillin-binding proteins	---
Tetracyclines and glycylycyclines	Inhibition of protein synthesis	30S ribosomal subunit	RGM (8–16)	<i>16S rRNA gene</i>	16S rRNA	-
Trimethoprim and sulfonamides	Inhibition of folate synthesis	Dihydrofolate reductase, Dihydropteroate synthetase	RGM (64)	<i>dhfrA :sulI and folP1</i>	Dihydrofolate reductase Dihydropteroate synthetase	-
Bedaquiline (TMC207)	Inhibition of ATP synthesis	ATP synthase	<i>M. tuberculosis</i> (0.25)	<i>atpE</i>	ATP synthase	Ala-63-Pro, Ile-66-Met
Nitroimidazoles (PA-824 [Pretomanid] and OPC-67683 [Delamanid])	Inhibition of cell wall lipid and protein synthesis	Dehydrogenase, Nitroreductase	<i>M. tuberculosis</i> (0.5)	<i>Rv0407</i> <i>Rv3547</i>	Dehydrogenase Nitroreductase	--
SQ109	Inhibition of lipid synthesis	Mycolic acids	<i>M. tuberculosis</i> (0.5)	<i>mmpL3</i>	Membrane transporter	-
Phenothiazines (Thioridazine and Chlorpromazine)	Inhibition of calcium transport, inhibition of type II NADH	-	<i>M. tuberculosis</i> (1–32)	-	-	-
Benzothiazinones (BTZ043)	Inhibition of cell wall arabinans synthesis	Nitroreductase, Decaprenylphosphoryl epimerase	<i>M. tuberculosis</i> (6)	<i>nhxB</i> <i>dpvE1</i>	Nitroreductase Decaprenylphosphoryl epimerase	- -
NAS-21 and NAS-91	Inhibition of mycolic acid synthesis	FAS-II dehydratase	<i>M. tuberculosis</i> (NR)	<i>rv0636</i>	FAS-II dehydratase	-

RGM, rapidly growing mycobacteria; SNP, single nucleotide polymorphism; NR, not reported.

Резистенција кон антитуберкулотски лекови од прва линија. Основниот, стандарден шестмесечен тераписки режим за лекување на туберкулоза го сочинуваат следниве четири лекови кои се применуваат перорално: рифампицин (rifampicin, RIF) и изониазид (isoniazid, INH) како клучни („core“), и пиразинамид (pyrazinamide, PZA) и етамбутол (ethambutol, EMB) како додатни („add-on“) лекови [68, 69].

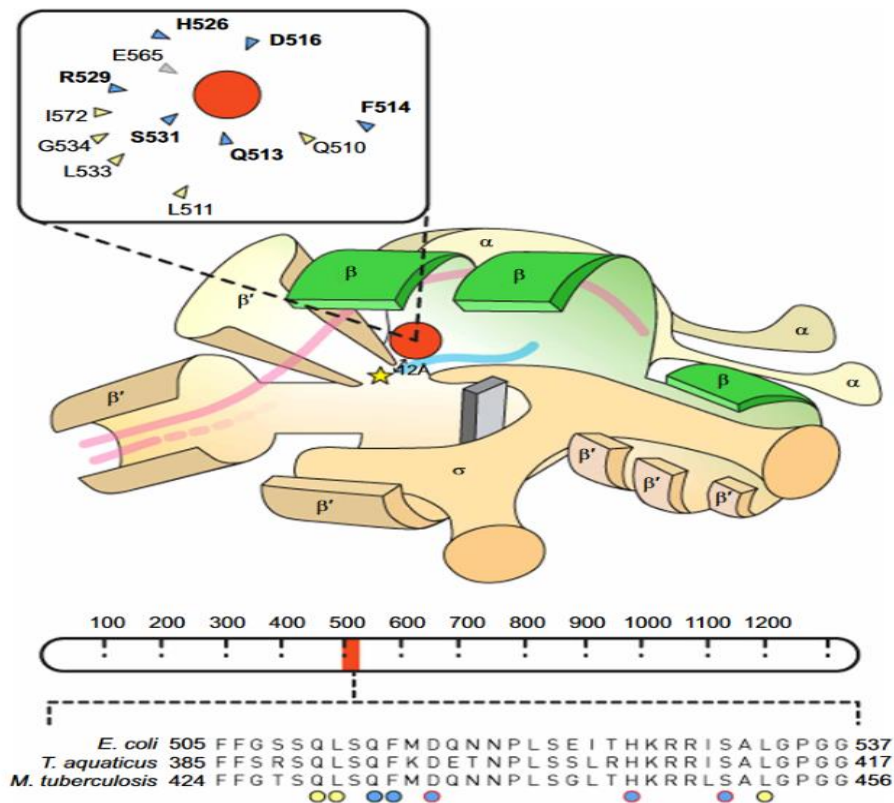
Рифампицин е воведен како антитуберкулотик во 1972 година [66]. Показува висока бактерицидна активност и кон растечките и кон нерастечките туберкулозни бацили и има стерилизирачки ефект кон МТВ [66, 67]. Специфичното целно место („target“) за антимикуробното дејство на рифампицинот е β -субединицата на ензимот RNA-полимераза – за која се врзува рифампицинот и на тој начин ја инхибира елонгацијата односно синтезата на messenger-RNA (mRNA, информациска рибонуклеинска киселина) [Слика 13] [70, 71, 72]. Мутација во *rpoB* генот - кој ја кодира RNA-полимеразата – предизвикува структурна алтерација во β -субединицата на овој ензим, што резултира со неможност рифампицинот да се врзе за своето целно место, односно со резистенција на рифампицин [73].

Повеќе од 95% (т.е. околу 96%) на рифампицин-резистентни изолати на МТВС имаат мутации во структурниот 81-bp „hot-spot region“ на *rpoB* генот кој ја кодира β -субединицата на RNA-полимеразата [62, 74]. Тоа е т.н. rifampicin-resistance-determining region (RRDR, регион кој ја определува резистенцијата кон рифампицин), кој се протега од кодонот 426 (т.е. 507) до кодонот 452 (т.е. 533) на *rpoB* генот [73]. Мутациите во позициите т.е. кодоните 450, 445 и 435 (аналогно – 531, 526 и 516) се најчестите мутации асоцирани со резистенција на рифампицин [67, 75, 76]. Меѓутоа, неодамнешни студии рапортираат за одреден број мутации вон RRDR – како што се V170F и I491F [77].

Изониазид (Iso-nicotinyl-hydrazide) е воведен во 1952 година. Има способност да атакува мултипли цели кај МТВС [78], а примарно – *InhA*-ензимот (enoyl-acyl carrier протеин редуктаза). Изониазидот е пролек за кој е потребна активација со ензимот катализа/пероксидаза (KatG) [79]- кодиран од *KatG* генот - при што се добива високо-активно соединение – isonicotinic-acyl radical или ањон. Ова соединение потоа реагира со nicotin-amid adenine dinucleotide H, формирајќи INH (nicotinoyl)-NAD комплекс.

Активираниот комплекс цврсто се врзува за enoyl-acyl carrier протеин редуктазата (*InhA*) и ја инхибира, инхибирајќи ја на тој начин синтезата на миколчна киселина во клеточниот сид [80]. Изониазидот е активен само кон метаболички активните туберкулозни бацили, но не и кон нерастечките бацили (перзистери) [67].

Резистенцијата на INH е комплексен процес, и е асоцирана со мутации во повеќе гени (*katG*, *inhA*, *ahpC*, *kasA* и *ndh*) [64]. Најчестиот механизам на резистенција на изониазид се мутации во *katG* генот, што резултира со редуцирана активност на ензимот каталаза/пероксидаза [79, 81]. Најголем број на INH-резистентни соеви се асоцирани со несинонимни мутации во кодонтот 315 во *KatG*; меѓу нив S315T-мутацијата е со највисока преваленца и учествува со 60-95% од вкупната изониазид-резистенција кај клиничките изолати [66, 78]. *KatG* S315 мутациите обично не доведуваат до комплетна елиминација на активноста на каталазата, и таквите соеви можат и натаму да ги задржат адаптивбилноста и вируленцијата, со што се објаснува нивната честа појава меѓу клиничките изолати.



Слика 13. Шематски приказ на структурата на RNA-полимераза, вклучително и RRDR регионот. *rpoB*-кодираната β -субединица е обоена зелено. Жолтата ѕвезда е активното место на ензимот, а црвениот круг е молекулата на RIF која се врзува за активното место и ја инхибира транскрипцијата. Хеликсот на DNA е претставен со розови линии и откога ќе се „одвитка“ се гледа само едниот хеликс кој е модел за транскрипцијата. Сината линија ја претставува растечкиот синџир на RNA – продукт на транскрипцијата. Под цртежот се шематски прикажани *rpoB* генот кој ја кодира β -субединицата на RNA-полимеразата, со кодонтите и аминокиселинската секвенца на RRDR регионот (според референца бр. 71).

Пиразинамид. Пиразинамидот (PZA) е во широка употреба како антитуберкулотик од 1972 година. Пиразинамидот е парадоксален лек со уникатна активност во третманот на ТБ. Вообичаено, антибиотиците ги убиваат или инхибираат растечките бактерии. Пиразинамидот ги убива само нерастечките бацили (перзистери) и покажува слаба активност кон растечките бактерии [67]. Поради тоа, пиразинамидот има критична улога во актуелниот антитуберкулотски режим со лекови од прва линија – неговата стерилизирачка активност му овозможува да ја елиминира популацијата на бацили-перзистери кои другите антитуберкулотски лекови не можат да ги убијат. Оттука, пиразинамидот е 'рбетот на краткиот тераписки режим за туберкулоза, и е важен лек за скратување на тераписките режими [62, 66].

Пиразинамидот е пролек за чија антимицробна активност е неопходна активација со МТВС-ензимот пиразинамидаза (PSase)/никотинамидаза, кодирана од *pncA* генот [82]. Овој ензим по пат на хидролиза го трансформира пиразинамидот во неговата активна форма – пиразиноична киселина (pyrazononic acid, POA), предизвикувајќи цитоплазматска ацидификација и деплеција на мембранскиот потенцијал [67, 82]. Пиразинамидот манифестира мултипни ефекти на *M. tuberculosis*, вклучувајќи интерференција со енергетската продукција во мембраната и инхибиција на транс-транслацијата преку таргетирање на рибозомскиот протеин S1 (RpsA) инволвиран во овој процес [67, 83]. Потребни се дополнителни студии за разјаснување на врската меѓу механизмот на дејство на пиразинамидот и неговите целни места [66].

Генерално, се смета дека активноста на пиразинамид е зависна од кисела рН [84, 85]. Но, неодамна е рапортирано дека активноста на пиразинамидот може да биде независна од киселата рН и интрабактериската ацидификација [86, 87]. Последново може да предизвика конфузија затоа што оваа опсервација не значи дека пиразинамидот генерално функционира во неутрална рН, независно од метаболичкиот статус на туберкулозните бацили. Тоа повеќе би значело дека бактерискиот метаболички статус е важен во детерминацијата на активноста на пиразинамид, односно дека кај дормантните бактерии – перзистери со низок метаболизам пиразинамидот може да покаже активност дури и при речиси неутрална рН, иако би се очекувало да манифестира поголема активност при кисела рН [66].

Мутациите во *pncA* генот резултираат со загуба на активноста на PZase, и се примарниот молекуларен механизам за резистенција на пиразинамид во клиничките соеви [82, 88, 89]. Мутациите во *pncA* генот се различни по природа и расеани по

должината на целиот ген (во должина од 561 bp) - што е уникатна особина на резистенцијата на пипразинамид, плус дополнителни мутации откриени во промотор-регионите. Освен тоа, не сите мутации во *pncA* генот се врзани со резистенција на МТВС на пипразинамид [66]. Студиите исто така индицираат дека мутации во *rpsA* (кој го кодира рибозомскиот протеин S1) и *panD* (кој ја кодира аспартат декарбоксилазата) гените се одговорни за резистенција на PZA [83]. Во механизмот на резистенција на пипразинамид се инволвирани и дополнителни генски локуси и мутации [62, 66, 67]

Најголемиот број на пипразинамид-резистентни МТВС соеви (72–99%, во просек 85%) имаат мутации во *pncA* генот [67, 90, 89], но некои немаат. Последните имаат мутации во таргетот *RpsA* – кои се обично асоцирани со ниско ниво на резистенција на пипразинамид (MIC 200-300 µg/ml PZA) [67, 83].

Етамбутол. За разлика од претходните три антитуберкулотски лекови од прва линија кои имаат бактерицидна активност, етамбутолот (EMB) е бактериостатски лек. Во актуелниот стандарден шестмесечен тераписки режим етамбутолот игра улога во превенција на појава на резистенција [62, 66]. Примарно го таргетира ензимот арабинозил-трансфераза кодиран од *embCAB* оперонот. Ензимот е инволвиран во синтезата на арабиногалактан, па според тоа механизмот на дејство на етамбутол е инхибиција на синтезата на арабиногалактан во клеточниот сид на МТВ [91, 92].

Резистенцијата кон етамбутол главно се должи на несинонимни мутации во *embCAB* оперонот – поточно *embB* генот, особено во кодоните 306, 406 и 497 на *embB* [92-94]. Најчеста мутација во клиничките изолати резистентни на етамбутол е онаа во *embB* кодон 306 и таа се сретнува до 68% од резистентните соеви. Од сите мутации асоцирани со резистенција на етамбутол, најчеста е *embB* M306V [66, 67]

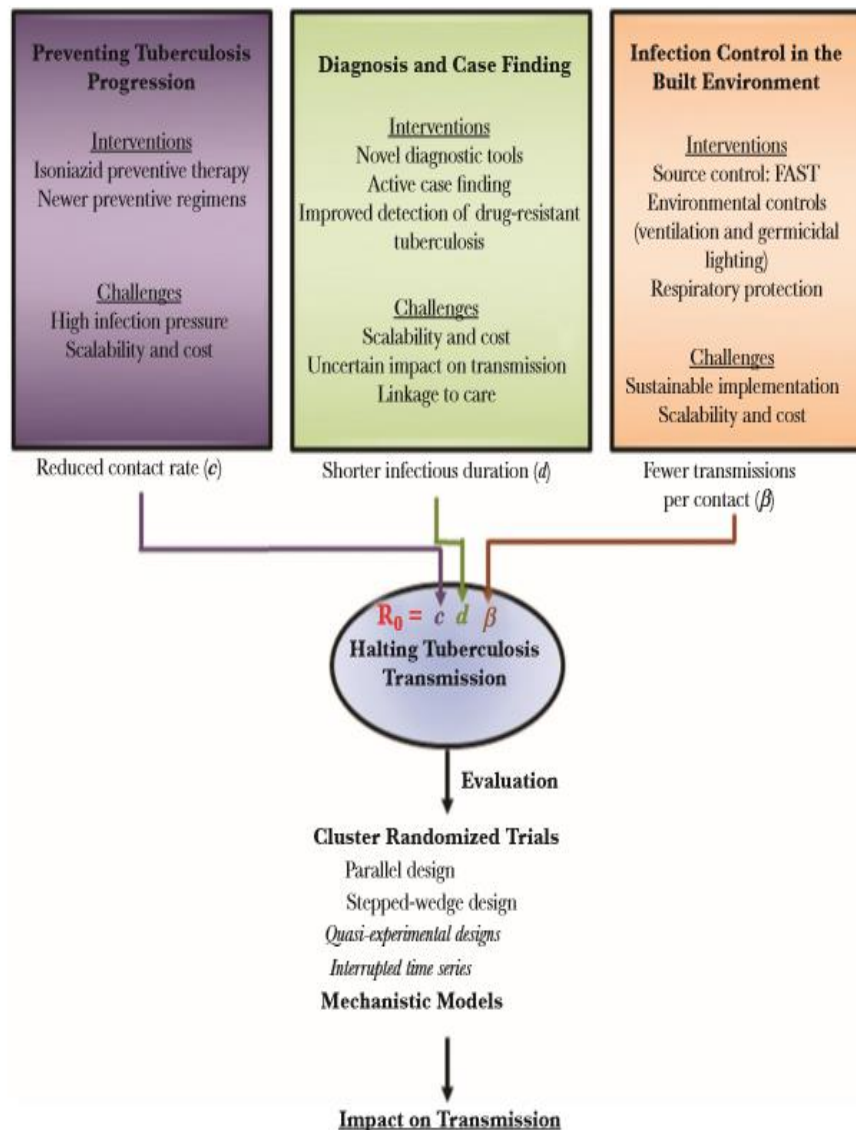
Одредени аминокиселински промени во *EmbB306* резултираат со резистенција на EMB, но други имаат мал ефект врз резистенцијата на етамбутол [67, 95]. Покрај тоа, околу 35% од соевите резистентни на етамбутол (MIC 10 µg/ml) немаат мутации во *embB* [67], што сугерира други механизми на резистенција. Неодамна е пронајдено дека мутациите во *ubiA*, кој ја кодира декапренил-фосфат 5-фосфорибозилтрансферазата (DPPR-синтетаза, *ubiA*) инволвирана во синтезата на клеточниот сид, се одговорни за (по)високо ниво на резистенција на МТВС на етамбутол, во комбинација со *embB* мутациите [94-96].

Појавата на мутации во *embB* кај клинички резистентните изолати на етамбутол е конзистентна на глобално ниво, додека појавата на мутации во *ubiA* кај етамбутол-резистентните соеви варира во зависност од географскиот регион [94].

Иако е воспоставена каузална поврзаност меѓу несинонимни мутации во *embB* и *ubiA* со резистенција кон етамбутол, со несинонимни мутации во *embB* може да се објаснат само 40–68% од појавата на резистенција на етамбутол на глобално ниво [97, 98]. Уште повеќе, во мултипни студии е потврдена појавата на етамбутол-чувствителни клинички изолати со несинонимни мутации во *embB* M306V или M306I. Ваквите дискрепанци можеби се должат на несоодветни критични концентрации (critical concentration, CC) т.е. повисоки отколку епидемиолошката cut-off вредност (epidemiological cut-off value, ECOFF) [66].

1.7. Дијагноза на туберкулоза и детекција на резистенција кон анти-туберкулотски лекови

Рана, брза и точна дијагноза на туберкулозата и испитување на резистенција кон анти-туберкулотски лекови се есенцијални мерки на контрола на инфекцијата кај оваа болест во јавно-здравствениот систем. Со нив се обезбедува брзо отпочнување на соодветна терапија [34], а со тоа се прекинува синџирот на трансмисија – односно појавата на нови случаи на активна туберкулоза и зголемувањето на резервоарот на ЛТБИ [99] [Слика 14]. Ако се земе предвид дека трансмисијата на болеста во најголем дел се одвива во периодот од неколку недели до месеци пред дијагностицирање на болеста, на овој начин се скратува периодот на предтераписка инфективност на болните од туберкулоза. Сепак, бројката на недијагностицирани случаи глобално на годишно ниво е огромна и изнесува 30-40% од вкупниот проценет број на болни со туберкулоза, односно 70-75% од бројот на болни со мултирезистентна туберкулоза (Multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB) (процентите се однесуваат на бројка од 10 милиони и 558 000 за 2017 година, соодветно). Оваа дијагностичката „празнина“ (gap), првенствено во регионите без активно откривање на болните со ТБ и без соодветни и достапни дијагностички методи [8, 100], претставува огромен резервоар за непречена трансмисија на болеста [101, 102].



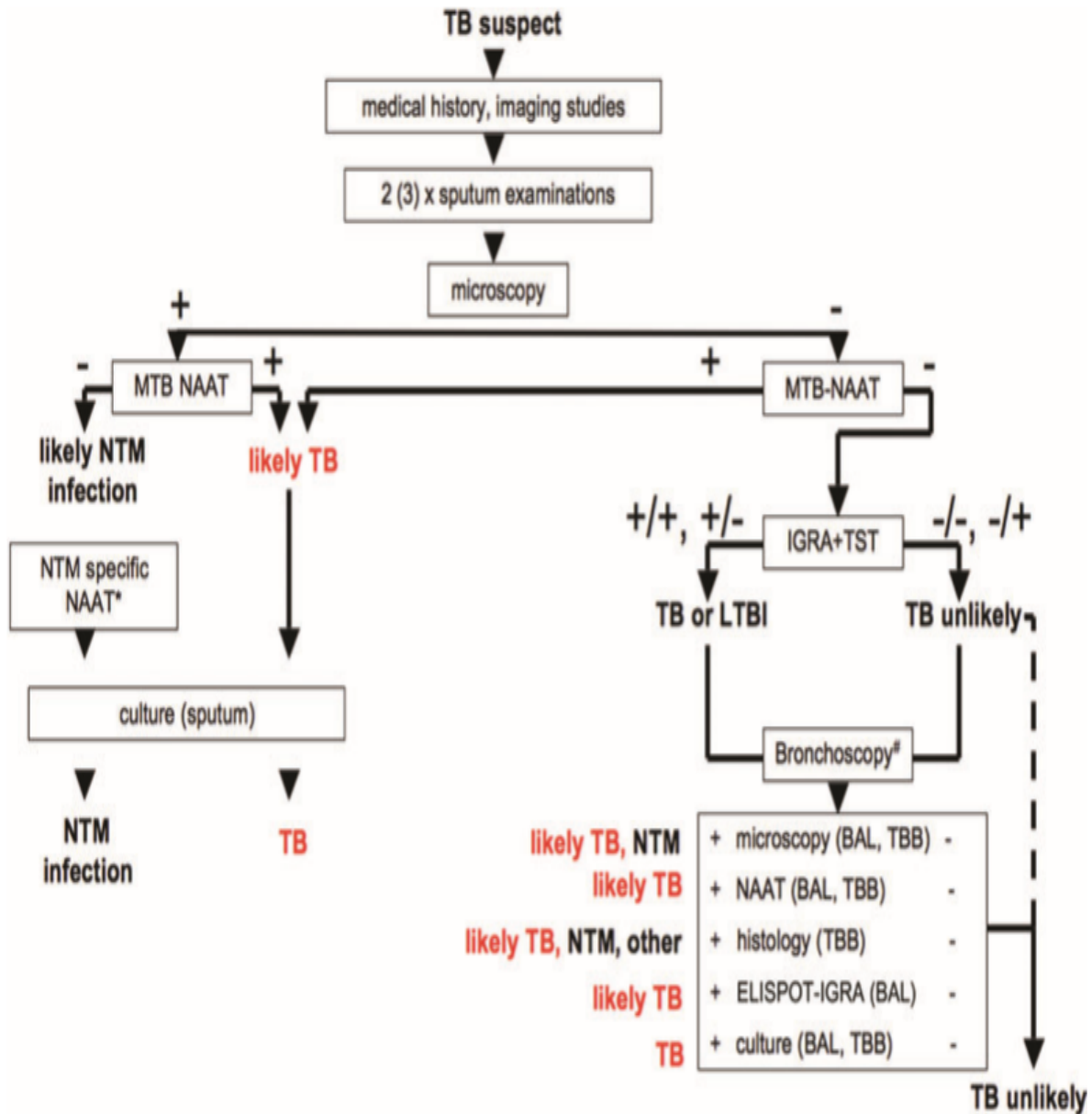
Слика 14. Мерки за прекин на трансмисијата на болеста: спречување на прогресија на ЛТБИ во активна болест, брза дијагноза на туберкулоза и детекција на резистенција, и респираторни мерки (според референца бр. 99)

Како и кај секоја болест, и кај туберкулозата дијагнозата почнува со поставување на сомневање за туберкулоза [103]. Комплетната дијагностичка проценка на туберкулозата опфаќа: добивање детални анамнестички податоци, физикален преглед, употреба на радиолошки техники и микробиолошки испитувања [104, 105]. По потреба, можат да се прават и дополнителни испитувања (бронхоскопија, биопсија со хистопатолошка потврда на присуство на казеифицирачки грануломи итн.). Сумирано, методите за дијагноза на туберкулоза се прикажани во Табела 3, а алгоритмот за дијагностичка евалуација е прикажан на Слика 15.

Табела 3: Дијагностички алатки за туберкулоза (адаптирано од референца бр. 103)

	ТБ-болест	Латентна ТБ-инфекција
„Од страна на микроорганизмот“	<ul style="list-style-type: none"> - Микроскопија на директен препарат од спутум (светлосна/ флуоресцентна /LED) - Културелно испитување - NAATs - Хистопатологија 	
„Од страна на домаќинот“	<ul style="list-style-type: none"> - Историја на болест и физикален преглед - Нативна рендгенграфија на граден кош → напредни радиолошки техники - (TST/IGRA) - (Серологија) 	<ul style="list-style-type: none"> - Контакт со болни од ТБ, физикален преглед - нативна рендгенграфија на граден кош (исклучување на белодробна ТБ) - TST - IGRA

IGRA (Interferon-Gamma Release Assay, интерферон-гама ослободувачки тест); LED, Light Emitting Diode; NAATs (Nucleic Acid Amplification Tests, тестови на амплификација на нуклеински киселини); TST (Tuberculin Skin Test, туберкулински кожен тест)



Слика 15. Дијагностички алгоритам за туберкулоза во клиничка практика. За микробиолошка дијагноза се потребни два примероци на спутум [106-110]; најдобро еден да биде ран утрински примерок на спутум, бидејќи се смета дека содржи највисока концентрација на туберкулозни бацили [109, 111]. Се користат за микроскопско и културелно испитување со фенотипска DST. Молекуларниот тест (Xpert MTB/RIF) може да се изработи во еден од примероците доколку задоволува по волумен и квалитет, во спротивно се изведува во трет примерок на спутум (преземено од референца бр. 106).

*BAL (Bronchoalveolar lavage, бронхоалвеоларна лаважа); IGRA (Interferon-Gamma Release Assay, интерферон-гама ослободувачки тест); NAATs (Nucleic Acid Amplification Tests, тестови на амплификација на нуклеински киселини); TST (Tuberculin Skin Test, туберкулински кожен тест); NTM (Nontuberculous mycobacteria, нетуберкулозни микобактерии); TBB (Transbronchial biopsy, трансbronхијална биопсија);

1. Анамнестички податоци:

- симптоми и нивно времетраење. Најчестиот симптом на белодробна туберкулоза е кашлица со или без продукција на спутум, која трае подолго од 2-3 недели [107, 112], додека хемоптизиите не се толку чести. Кашлицата е чест симптом кај многу респираторни болести кои мора да се исклучат диференцијално-дијагностички, првенствено акутните долнореспираторни инфекции и акутна егзацербација на хронична опструктивна белодробна болест. Дополнително може да се јават потење, температура, загуба на апетит и телесна тежина, а кај вонбелодробната туберкулоза и орган-специфични симптоми [106]. Болеста може да се манифестира и без специфични симптоми, особено кај имунокомпромитираните [107, 113].

- постоење на ризик-фактори: епидемиолошки ризик (контакт со болен од туберкулоза, туберкулоза во семејството, претходно лекување поради туберкулоза, патување во региони со висока преваленца на туберкулоза), употреба на алкохол, дрога и цигари, дијабетес и имунокомпромитирачки фактори [103, 107, 112, 114] [Табела 4].

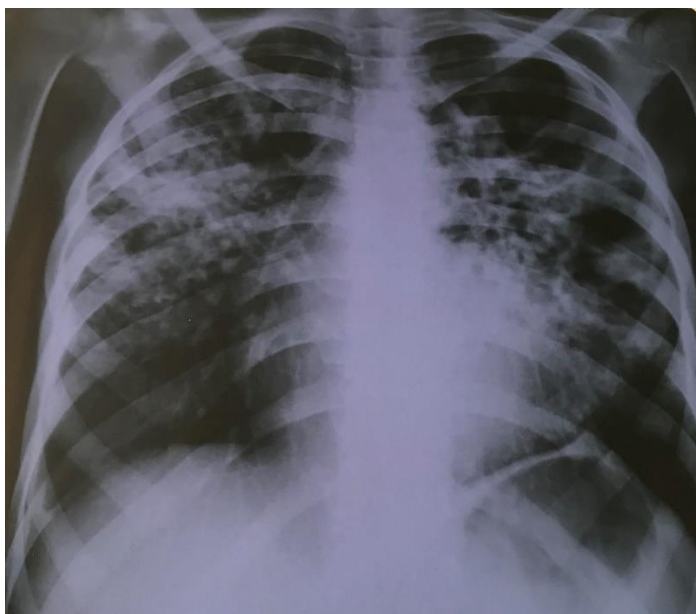
Табела 4. Ризик-фактори за туберкулозна инфекција и активна туберкулоза (превод од референца бр. 114).

Продолжена изложеност на болен од ТБ кој е позитивен на директен микроскопски препарат од спутум
Земја на потекло: повисок ризик кај лица родени во Азија, Африка и Јужна Америка
ХИВ-коинфекција
Употреба на имunosупресиви: системски кортикостероиди, биолошка терапија (како анти-TNF- α лекови)
Потхранетост
Дијабетес
Млада возраст
Пушење цигари
Прекумерна употреба на алкохол
Малигни болести
Професионална експозиција (пр. здравствени работници)
Интравенска употреба на дроги
Пренаселеност
Аерозагадување во домот
Бездомништво
Низок социо-економски статус

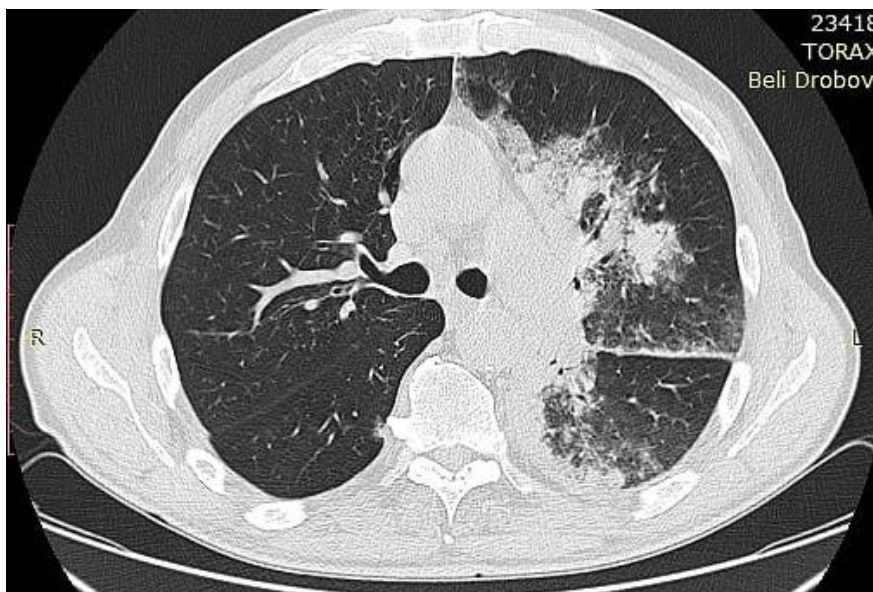
TNF, Tumour Necrosis Factor

2. Физикален преглед

3. Радиолошки испитувања: нативна рендгенграфија на градни органи и според индикација – компјутеризирана томографија (КТ) на граден кош [34, 39-41,104,115]. Рендгенграфијата е широко употребуван метод за активна туберкулоза и може уште повеќе да добие на значење со имплементацијата на дигиталната радиологија и компјутерски/софтверски асистирани интерпретација [116, 117] [Слика 16, 17].



Слика 16. Радиолошки наод кај белодробна туберкулоза, нативна рендгенграфија на граден кош (извор: ИБЗТ)



Слика 17. Радиолошки наод кај белодробна туберкулоза, компјутеризирана томографија (извор: ИБЗТ)

4. Микробиолошки методи за дијагноза на туберкулоза и испитување на чувствителност кон антитуберкулотски лекови

Дефинитивната дијагноза на туберкулозата се поставува со докажување на присуството на предизвикувачот во биолошки примерок земен од пациентот; кај белодробната туберкулоза тоа е спутум. Во моментот на пишување на оваа теза, валидирани беа две главни групи методи за дијагноза на активна туберкулоза: класични (микроскопија и култивирање на микобактерии) и молекуларни методи (таргетираат одредени секвенци на нуклеинските киселини на МТВС, т.н. Nucleic Acid Amplification Tests, NAATs) [101]. Растот на микобактерии во култура задолжително подлежи на идентификација на изолатот и класично (фенотипско) испитување на чувствителност на изолираниот сој кон антитуберкулотски лекови од прва и втора линија. Со оглед на фактот што валидираните молекуларни методи истовремено вршат и идентификација на МТВС и испитување на чувствителност на одредени антитуберкулотици, тие ќе бидат опишани во посебно поглавје. Во Табела 5 се дадени методите за детекција на *Mycobacterium tuberculosis* и испитување на резистенција на антибиотици, одобрени од СЗО [108].

Табела 5. Методи препорачани од СЗО за детекција на *M. tuberculosis* и резистенција на антитуберкулотски лекови (според референца бр. 108)

TEST OR PROCEDURE	DESCRIPTION	LABORATORY TURNAROUND TIME ^a	COMMENTS
Smear microscopy	Conventional light microscopy with Ziehl–Neelsen staining	24 hours	Less sensitive than fluorescence microscopy.
	Conventional fluorescence microscopy (using mercury vapour lamps)		Requires a quartz halogen or mercury vapour lamp. Microscopes are expensive. Requires a dark room.
	LED fluorescence microscopy		LED microscopy is about 10% more sensitive and the observation time is significantly shorter than for conventional light microscopy. LED conversion kits for light microscopes are available. A dark room is not needed. LED fluorescence microscopy should be introduced using a phased-in approach and eventually replace examination of Ziehl–Neelsen stained smears by light microscopy. Direct smear microscopy may be done in a low-risk level TB laboratory (Table 14). The processing of samples for concentrated smear microscopy should be done in a moderate risk-level TB laboratory (Table 14).
Culture using solid media	Löwenstein–Jensen medium	3 weeks on average for smear-positive samples 4–8 weeks on average for smear-negative samples	Egg-based medium. Acceptable level of contamination 3–5%. Processing of samples for inoculating cultures should be done in a moderate risk-level TB laboratory (Table 14).
	Middlebrook 7H10 or 7H11 media		Agar-based medium. Acceptable level of contamination 3–5%. Processing of samples for inoculating cultures should be done in a moderate risk-level TB laboratory (Table 14).
Culture using liquid media	Commercial and non-commercial test systems ^c	8–10 days for smear-positive samples 2–6 weeks for smear-negative samples	Liquid TB culture methods are susceptible to contamination. Acceptable level of contamination 8–10%. Processing of samples for inoculating cultures should be done in a moderate risk-level TB laboratory (Table 14). A commercial example of an automated TB culture system is the BACTEC™ MGIT™ 960 TB System (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, USA).

Табела 5 (продолжува). Методи препорачани од СЗО за детекција на *M. tuberculosis* и резистенција на антитуберкулотски лекови (според референца бр. 108)

TEST OR PROCEDURE	DESCRIPTION	LABORATORY TURNAROUND TIME ^a	COMMENTS
Immunochromatographic assay for rapid species identification	Commercial test systems to be performed on bacteria recovered from solid or liquid cultures	15 minutes (testing time)	Rapid identification of MTB isolated from solid or liquid cultures. Because of the need to process cultures, testing should be done in a high risk-level TB laboratory (Table 14). Commercial examples of this test include: <ul style="list-style-type: none"> • Capilia TB-Neo[®] (Taunus Laboratories, Numazu, Japan) • TB Ag MPT64 Rapid Test[®] (SD Bioline, Kyonggi-do, South Korea) • TBcID[®] (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, USA)
Phenotypic DST using solid media – 1st line	Löwenstein–Jensen or Middlebrook 7H10 or 7H11 media	3–4 weeks from positive culture (indirect DST)	Capacity to perform DST at least to rifampicin and isoniazid is needed. Recommended critical concentrations are found in the critical concentration table. ^c
Phenotypic DST using liquid media – 1st line	Commercial and non-commercial test systems ^d	1–3 weeks from positive culture (indirect DST)	Because of the need to process cultures, testing should be done in a high risk-level TB laboratory (Table 14).
Phenotypic DST using solid media – 2nd line	Löwenstein–Jensen or Middlebrook 7H10 or 7H11 media	3–4 weeks from positive culture (indirect DST)	Capacity to perform DST at least to a second-line injectable drug (SLID) and a fluoroquinolone (FQ) is needed. ^e Recommended critical concentrations are found in the critical concentration table. ^c
Phenotypic DST using liquid media – 2nd line	Commercial and non-commercial test systems ^d	1–3 weeks from positive culture (indirect DST)	Because of the need to process cultures, testing should be done in a high risk-level TB laboratory (Table 14).
Molecular testing	Xpert MTB/RIF assay Detects MTB and assesses resistance to rifampicin using real-time PCR	2 hours (testing time)	The Xpert MTB/RIF assay is suitable for all levels of the health system, although certain operational requirements apply, such as uninterrupted power supply and temperature controlled setting. Acceptable level of errors <3%. This test may be used rather than conventional microscopy and culture as the initial diagnostic test in all adults and children being evaluated for pulmonary TB. As a priority, the test should be used as the initial diagnostic test for in adults and children being evaluated for MDR-TB or HIV-associated TB.

Табела 5 (продолжува). Методи препорачани од СЗО за детекција на *M. tuberculosis* и резистенција на антитуберкулотски лекови (според референца бр. 108)

TEST OR PROCEDURE	DESCRIPTION	LABORATORY TURNAROUND TIME*	COMMENTS
Molecular testing (continued)	Xpert MTB/RIF assay (continued)		<p>The test should be used in preference to microscopy and culture as the initial diagnostic test using cerebrospinal fluid (CSF) specimens from patients being evaluated for TB meningitis, and may be used as a replacement test for usual practice (including microscopy, culture or histopathology) for testing specific non-respiratory specimens (lymph nodes and other tissues) from patients being evaluated for extrapulmonary TB.</p> <p>The test is suitable for use in a peripheral health centre level where microscopy is performed, given similar biosafety requirements (e.g., low risk, Table 14).</p> <p>The Xpert MTB/RIF[®] assay is commercially available (Cepheid, Sunnyvale, USA).</p>
	<p>First-line line probe assay (FL-LPA)</p> <p>Detects MTB and assesses resistance to rifampicin and isoniazid</p> <p>DNA targets are amplified by PCR and hybridized to immobilized oligonucleotide targets; results can be read visually or using an automated reader</p>	1–2 days (testing time). Batching of samples may increase turnaround time	<p>FL-LPA is suitable for use on culture isolates and AFB smear-positive sputum specimens</p> <p>Commercial FL-LPAs may be used as the initial test, instead of phenotypic culture-based DST, to detect resistance to rifampicin and isoniazid.</p> <p>Because of the need to process samples, direct testing of AFB smear-positive sputum specimens should be done in a moderate risk-level TB laboratory and testing of cultures done in a high risk-level TB laboratory (Table 14).</p> <p>Commercial examples of this test are the GenoType[®] MTBDRplus (Hain Lifescience, Nehren, Germany) and the NTM+MDRTB Detection Kit (NIPRO Corporation, Osaka, Japan) tests.</p>

Микроскопија. Се состои во директно докажување на микроорганизмот со специјални боења: боење по Ziehl-Neelsen за ацидо-алкохол-резистентни бактерии (ZN), и флуорохром боења (аурамин-О). Препаратите обоени по ZN се микроскопираат со светлосен микроскоп (ZN микроскопија), а оние со аурамин-О – со флуоресцентен микроскоп [26-28, 30, 105, 108, 118, 119].

Микроскопијата на *M. tuberculosis* е воведена во далечната 1882 година, од страна на Robert Koch [120]. И ден-денес микроскопијата на спутум е најважната метода за дијагноза на белодробна туберкулоза во земјите со ниски и средни приходи, затоа што претставува евтина, брза, едноставна, широко достапна и високо специфична метода за МТВС [121]. Но микроскопијата има недоволна дијагностичка ефикасност бидејќи со неа туберкулозните бацили можат да се докажат во спутумот кај ограничен број пациенти со активна ТБ [34].

Прагот за детекција на АFB во спутум при оптимални услови изнесува 5000-10000 бацили/милилитар примерок [105, 118, 119, 122]. Споредено со културата, директната микроскопија на препарати боени по Ziehl-Neelsen (ZN микроскопија) покажува ниска сензитивност од 22-43% за еден примерок, со максимална вредност до 60% при оптимални услови [123, 124]. Во региони со висока преваленца, ZN микроскопијата покажува висока специфичност, но широко варијабилна сензитивност (20-80%) [101, 121, 125]. Честопати сензитивноста е дополнително намалена поради технички и оперативни ограничувања [126], а особено во случај кога се работи за примероци добиени од деца (кои неможат/не знаат спонтано да продуцираат спутум) или ХИВ-позитивни лица (т.н. „рауси-bacillary“ спутум) [127, 128]. Во споредба со директен препарат подготвен од необработен спутум, претходното процесирање на спутумот со центрифугирање (т.е. концентрирање на бацилите) и деконтаминација со варикина/NaOH ја зголемува сензитивноста во просек за 18% (CI 95%: 11-26%) [125, 129].

Флуоресцентната микроскопија е во просек за 10% посензитивна од конвенционалната (95% CI: 5–15%) и речиси 98% специфична [121]. Но за разлика од светлосната (директна, класична), флуоресцентната микроскопија е поскапа, бара честа замена на скапата живина ламба во микроскопот, непрекинато напојување со струја и темна просторија за микроскопирање [121]. Со LED (light emitting diode)-базираната флуоресцентна микроскопија, овие недостатоци се надминати и таа е денес во широка употреба. Трите методи се разликуваат и според времето потребно за микроскопирање,

односно интерпретација на препаратите – просечното време за аурамин-О–LED-микроскопија е три пати пократко од она за ZN [101, 130].

Значајно е што со микроскопијата се откриваат најинфективните пациенти со белодробна туберкулоза. Имено, пациентите со позитивен наод на директен микроскопски препарат имаат најголема бактериска концентрација во спутумот при што степенот на позитивитет го одразува бројот на присутни туберкулозни бацили во примерокот [104, 105, 109, 119, 131-134]. Исто така, микроскопијата сè уште е општоприфатен биомаркер за следење на ефектот од терапијата [68, 111, 135]. Недостаток е што микроскопијата не разликува вијабилни од мртви бацили, не ги разликува туберкулозните бацили од нетуберкулозните микобактерии и други ацидо-алкохол-резистентни микроорганизми (пр. *Rhodococcus*, *Nocardia*, etc.) и не дава информација за резистенцијата [105, 118, 119, 135]. Оттука, дефинитивна дијагноза на туберкулозата може да се постави само со култивирање на *M. tuberculosis* од примерок земен од пациентот [115]. Но поставувањето дијагноза на туберкулоза може да биде отежнато, главно поради долготрајноста на култивирањето на овој бавнорастечки микроорганизам.

Култивирање. Култивирањето на туберкулозните бацили може да се изведе на цврста или во течна подлога. СЗО-препорачани цврсти подлоги за култивирање на микобактерии се подлогата по Löwenstein–Jensen (базирана на јајце) и Middlebrook 7H10 и 7H11 подлогите (агар-базирани подлоги) [108] [Табела 5]. Постојат повеќе комерцијални и некомерцијални течни подлоги, како што се Mycobacterial Growth Indicator Tube (MGIT; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) и VacT/ALERT MB (bioMérieux, Durham, NC) [101], кои се употребуваат во полуавтоматизирани или потполно автоматизирани системи [120]. Изолатот на *M. tuberculosis* во култура е потребен во клиничката медицина за детално испитување на неговата чувствителност кон антитуберкулозици (drug susceptibility testing, DST) и во епидемиолошките студии за генотипизација. Профилот на резистенција е потребен за правилно лекување, а генотипизацијата – за откривање на патот на трансмисија на болеста и истражување на епидемски избивања [101].

Примероците – како што е спутумот – кои се контаминирани со нормална флора, најпрво подлежат на деконтаминација со употреба на NaOH/NALC-Na-цитрат – кој бргу ги убива брзорастечките бактерии и фунгите, а има ограничен ефект врз вијабилноста на микобактериите [101, 119]. Продолжено или изложување на микобактериите на висока концентрација на NaOH го редуцира нивното закрепнување, така што мора да се

воспостави баланс меѓу можноста за прекумерна деконтаминација (со што се намалува приносот на културата на микобактерии) и недоволна деконтаминација (што резултира со култури кои не можат да се интерпретираат поради прекумерен раст на бактерии и фунги).

Наспроти ниската стапка на раст на МТВС, културелното испитување е за околу 100 пати посензитивна метода од микроскопијата. Имено, за добивање на позитивна култура, потребно е присуство на 10-100 бацили/ml, односно само 10-100 формирани колонии од микроорганизмот (colony formig units, CFU)/ml [105, 115, 136, 137]. Но, култивирањето на микобактериите е финансиски и временски зависно, бара високо ниво на биобезбедност (biosafety level 3) [138], соодветна инфраструктура и одржување, непрекинато снабдување со струја, добро обучен персонал и брз транспорт на примероците до лабораторијата за да се одржи вијабилноста на бацилите (максимум 4 дена – ако се чуваат во фрижидер) [101, 139]. Од аспект на времето потребно за раст и детекција на растот на микобактерии (time-to-detection, TTD), течната култура има пократко време на обрт. Во просек, растот на туберкулозните бацили на цврста подлога може да се очекува за 3-8 недели, а на течна за 1-6 недели, во зависност од бактериската концентрација во примерокот [Табела 5].

Култивирањето на цврста подлога е поевтина метода од онаа во течна подлога. Покрај тоа, нуди опција за пролонгирана инкубација и опсервација на бацилите [120]. Течната култура, пак, е помалку склона на контаминација со други бактерии и фунги, посензитивна е (за 10% ја зголемува детекцијата т.е. изолацијата) и поедноставна (растот се детектира автоматски со мониторирање на флуоресценцијата, пропорционално на потрошувачката на кислород во подлогата) [101, 119, 120, 139].

По добивање на позитивна култура, неопходно е да се изврши идентификација на пораснатите микобактерии, односно разликување на *M. tuberculosis* од нетуберкулозните микобактерии како и од други ацидо-алкохол-резистентни микроорганизми [105, 108, 118, 119]. Идентификацијата е неопходна поради терапевска одлука и за проценка на времетраењето на респираторната изолација [107, 120] во просторија со негативен притисок, која е многу скапа [140]. Оваа мерка е неопходна додека се чека резултатот од микроскопијата, а и потоа кај АФВ-позитивните пациенти, особено ако станува збор за MDR-ТВ. Биохемиските методи за идентификација денес се заменети со молекуларни и имунохроматографски. Идентификацијата на МТВС со LPA (Line probe assays) е можна, но е скапа. Постојат неколку имунохроматографски методи кои се високосензитивни и

специфични за *M. tuberculosis* complex, а се едноставни, брзи и евтини [Табела 5] [101, 141].

Со културелното испитување се докажува присуство на вијабилни бацили на *M. tuberculosis*, односно се поставува дијагноза на туберкулоза [119]. Заедно со микроскопијата, културелното испитување служи како биомаркер за следење на ефектот од терапијата [68, 111, 135]. Поради високата сензитивност и специфичност, култивирањето на туберкулозните бацили се смета за „златен стандард“ за детекција на *M. tuberculosis* [105, 108]. Сепак, културелното испитување нема 100% специфичност и сензитивност, и околу 20% од случаите на туберкулоза годишно остануваат без културелна потврда [107, 142-146].

Фенотипско испитување на чувствителност кон антитуберкулотски лекови (Phenotypic drug-susceptibility testing, pDST). Интернационално прифатениот „златен стандард“ за дијагноза на резистентна туберкулоза е демонстрација на растот МТВС во култури инокуирани со соодветен антитуберкулотски лек. pDST се вбројува во класичните микробиолошки методи и во моментот е референтна метода („златен стандард“) за испитување на чувствителност на лекови кај *M. tuberculosis* [66]. Се изведува *in vitro* – при што се тестира капацитетот на одреден лек за инхибиција на бактерискиот раст, а резултатот се употребува *in vivo* - како сурогат за предвидување на успехот од терапијата. Веродостојноста на резултатите варира во зависност од испитуваниот лек, употребената концентрација на бактерии, употребениот медиум и времето на инкубација [66]. За изведување на pDST се неопходни истите технички лабораториски предуслови како и при културелното испитување.

Во 1960-тите, Canetti за првпат ја испитал можноста за изведување на pDST за МТВС, со цел да ги предвиди чувствителноста и одговорот кон терапијата. Т.н. пропорционален метод е базиран на опсервацијата дека присуството на $\geq 1\%$ бактерии резистентни на специфичен лек *in vitro* е асоцирано со клинички неуспех кога тој лек се употребува во терапискиот режим. Овој принцип сè уште е камен-темелник на pDST за *M. tuberculosis* во однос на антитуберкулотски лекови, на цврста или течна подлога [147].

pDST може да се изведе како директен и индиректен метод:

1. Директен метод. Се изведува во обилен процесирани примерок позитивен на директен микроскопски препарат (најчесто спутум), каде што се очекува брз одговор. Генерално е поевтин, главно евалуиран за рифампицин и изониазид, но слабо стандардизиран. Тука се вбројуваат колориметриските методи како nitrat-reductase assay (NRA) и microscopic observation drug susceptibility (MODS) есејот.

2. Индиректен метод. Се изведува во изолат од култура, со претходна идентификација на сојот како МТВС. Се изведува на цврсти и течни подлоги кои се користат и за култивирање на микобактериите:

- агар-пропорционален метод на Middlebrook подлога (7H10 и 7H11) е референтен стандарден метод за рDST во Соединетите Американски Држави [118]

- пропорционален метод на Löwenstein–Jensen подлога. Во широка употреба е во земји кои се високооптоварени со ТБ, поради ниското чинење и можноста да се продуцира „in house“. Резултатите се добиваат подоцна поради бавниот раст на МТВС на цврсти подлоги [66, 108] [Табела 5].

- течните подлоги се збогатени и овозможуваат побрз раст на микобактериите, со истовремена инхибиција на растот на контаминиращки бактерии (додаток на коктел од антибиотици) [119]. Течната подлога Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) заедно со Bactec 960 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) е денес најшироко употребуваниот автоматизиран систем [148-150]. Значително го подобрува времето на обрт, и ги подобрува стандардизацијата и изведбата на рDST за *M. tuberculosis* во целиот свет; овозможува испитување на чувствителност кон антитуберкулозици од прва и втора линија [104]. Резултатите се достапни по 5-14 дена. За речиси сите лекови што се употребуваат во терапијата на туберкулозата, постојат готови подлоги со стандардни или провизорни критични концентрации (critical concentrations, CC) [66, 151].

Концентрација на лековите кај рDST. Фенотипското испитување на чувствителност вообичаено се изведува со тестирање на една концентрација на лекот, наречена критична концентрација (critical concentration, CC). CC кореспондира со ECOFF (epidemiological cut-off value) – дефинирана како минимална инхибиторна концентрација (minimal inhibitory concentration, MIC) за соевите кои фенотипски се чувствителни и реагираат на терапијата [152, 153]. Во апсолутни бројки, CC варира во зависност од употребениот медиум и протоколот за тестирање [151, 154].

Механизмите на резистенција се разликуваат во нивниот капацитет за зголемување на MIC, од неколку пати до неколку стотини пати од ECOFF. Ниското ниво на резистенција би требало да се идентификува со тестирање на концентрации повисоки од CC. Кај соевите со ниско ниво на резистенција, употребата на повисоки дози на лекот е асоцирана со позитивен исход во лекувањето [151, 155-161]. Рифампицинонот,

изониазидот и флуорокинолоните се антитуберкулозици кои може да се употребуваат во повисоки дози.

Репродуцибилноста на резултатите од фенотипското испитување на чувствителност кон антитуберкулозици е добра за рифампицин, изониазид, флуорохинолоните и парентералните лекови од втора линија. За пиразинамидот и етамбутолот – кои се дел од тераписките режими со лекови од прва линија и краткиот режим за MDR-TB – и натаму е проблематична [68, 69, 162]. Фенотипското испитување на резистенција за пиразинамид може да се изведува само во течна подлога. Тешкотиите со одржување на големината на инокулумот, како и на киселата рН која е неопходна за соодветна активност на лекот, влијаат врз резултатот, и поради тоа лажната резистенција на пиразинамид е чест проблем при рDST. Во однос на етамбутолот, неколку автори рапортираат за дискрепанција меѓу резултатите добиени во различни медиуми, за што се потребни дополнителни студии [66].

Молекуларни методи: детекција на *M. tuberculosis* и генотипско испитување на чувствителност кон антитуберкулотски лекови (Genotypic drug-susceptibility testing, gDST).

За добивање на дефинитивен резултат со класичните методи, т.е. изолација на МТВС и дефинирање на профилот на чувствителност на изолираниот сој со рDST на цврста подлога, потребно е долго време (од 7 до 12 недели) [Табела 5]. Кај резистентните форми на туберкулоза ова подразбира неефикасен третман во тек на неколку месеци – што води кон влошување на здравствената состојба на пациентот, континуирана трансмисија на резистентниот сој во заедницата и потенцијална селекција на соеви со уште поголема резистенција [163].

Во ера на експанзија на резистентни форми на туберкулоза [8], методологијата во последната деценија е ориентирана кон брза детекција на МТВС и резистентните соеви, давајќи ѝ предност на детекцијата на генотипот наместо на фенотипот. Фундаментален концепт на сите молекуларни тестови е да го предвидат биолошкиот фенотип (т.е. профилот на резистенција) врз основа на генетската мутација или варијанта што ќе ја откријат.

Генетската база за стекнатата резистенција кај *M. tuberculosis* се промени (single nucleotide polymorphism, SNP; делеции и инсерции) во хромозомот на туберкулозниот бацил [62, 67, 101, 164-168]. Фактот што стекнатата резистенција на МТВС на лекови се должи на хромозомски мутации – а не на хоризонтален или плазмидски трансфер на

генетски материјал – го поедноставува развојот на соодветни молекуларни дијагностички методи.

Молекуларните методи за дијагноза на туберкулозата се базираат на амплификација и детекција на DNA секвенци (Nucleic acid amplification techniques, техники на амплификација на нуклеински киселини) специфични за идентификација на *M. tuberculosis* complex, со или без истовремено таргетирање на гени во геномот на микобактериите кои корелираат со резистенција кон одредени антитуберкулотски лекови [105, 118, 169]. Молекуларните методи можат да ги детектираат мутациите асоцирани со резистенција на два начина: директно – со DNA-секвенционирање, и индиректно – без DNA-секвенционирање, т.е. со проба-базирани методи. Главната разлика е тоа што проба-базираните методи можат да го откријат присуството на мутација во генот, но немаат капацитет за идентификација на специфични мутации (со мал исклучок кај Line probe assays, LPA). За разлика од нив, методите на секвенционирање идентификуваат специфични мутации [118]. Иако DNA-секвенционирањето може да биде попредиктивно за резистенција на антитуберкулотици, во моментот не е евалуирано и валидирано од СЗО [108].

Молекуларните методи за дијагноза на туберкулозата и gDST имаат неколку значајни предности: директно тестирање на *M. tuberculosis* и резистенцијата, едноставна употреба, намалување на биобезбедносниот ризик од манипулација со живи микобактерии [170, 171] и скратување на времето до добивање на резултат [66]. Со тестирање на клиничките примероци со брзите молекуларни методи резултатите се добиваат за само неколку часа – наспроти неколку недели потребни за класичните микробиолошки методи [172, 173].

До денес, од Светската здравствена организација се официјално одобрени две групи молекуларни методи за брза детекција на МТВС и испитување на резистенција на антитуберкулотски лекови: Line Probe Assays (LPA) – одобрени во 2008 година, и Xpert MTB/RIF технологијата – одобрена во 2010 година [169, 171, 174-178].

Табела 6. Молекуларни тестови за детекција и испитување на чувствителност на МТВС, според генските локуси кои се анализираат со тестот (адаптирано од референца бр. 66)

Цел („target“)					
Тест	Лек	Ген	Регион	Детекција на „див тип“ (wild type, WT) секвенца	Детекција на мутација (MUT)
GT-MTBDR _{plus} ver. 1	RIF	<i>rpoB</i>	RRDR	8 WT probes	4 MUT probes (D435V, H445Y, H445D, S450L)
	INH	<i>katG</i>	Codon 315 region	1 WT probe	2 MUT probes (S315T, nucleotide substitutions agc/acc and agc/aca)
GT-MTBDR _{plus} ver. 2	RIF	<i>inhA</i> <i>rpoB</i>	Promoter region RRDR	2 WT probes 8 WT probes	4 MUT probes (c-15t, a-16g, t-8c, t-8a)
	INH	<i>katG</i>	Codon 315 region	1 WT probe	2 MUT probes (S315T, nucleotidic substitutions agc/acc and agc/aca)
NTM + MTBDRTB	RIF	<i>inhA</i> <i>rpoB</i>	Promoter region RRDR	2 WT probes 5 WT probes	4 MUT probes (c-15t, a-16g, t-8c, t-8a)
	INH	<i>katG</i>	Codon 315 region	4 WT probes	2 MUT probes (S315T, S315N)
GT-MTBDRs/ ver. 1	FQ	<i>inhA</i> <i>gyrA</i>	Promoter region QRDR	1 WT probes 3 WT probes	4 MUT probes (c-15t, a-16g, t-8c, t-8a)
	SLID	<i>rrs</i>	1400 region	2 WT probes	6 MUT probes (A90V, S91P, D94A, D94N/Y, D94G, D94H)
GT-MTBDRs/ ver. 2	EMB	<i>embB</i>	Codon 306 region	1 WT probe	2 MUT probes (M306V, M306I)
	FQ	<i>gyrA</i>	QRDR	3 WT probes	6 MUT probes (A90V, S91P, D94A, D94N/Y, D94G, D94H)
		<i>gyrB</i>	QRDR	1 WT probe	2 MUT probes (N499D, E501V)
	SLID	<i>rrs</i>	1400 region	2 WT probes	2 MUT probes (a1401g, g1484t)
	KAN	<i>eis</i>	Promoter region	3 WT probes	1 MUT (c-14t)
Genoscholar PZA-TB II	PZA	<i>pncA</i>	Entire gene	48 WT probes	No specific probe available
Xpert MTB/RIF	RIF	<i>rpoB</i>	RRDR	5 WT probes	No specific probe available
Xpert MTB/RIF Ultra	RIF	<i>rpoB</i>	RRDR	4 WT probes	No specific probe available

Line Probe Assays (LPA, молекуларни тестови со линеарни проби). Во 2008 година, СЗО ја вовеле употребата на молекуларни тестови - т.н. Line Probe Assays (LPA) - за брза и веродостојна детекција на *M. tuberculosis* complex и на резистенцијата на неговите соеви кон рифампицин и изониазид [175].

Комерцијални LPA достапни на пазарот се: GenoType MTBDR_{plus} V1 и V2 (Hain Lifescience, Nehren, Germany) и Nipro NTM + MDRTB detection kit 2 (Nipro Corporation, Токуо, Јапан) за детекција на МТВ со резистенција на рифампицин и изониазид (*rpoB* RRDR, *katG* регион Ser315, *inhA* промотер); GenoType MTBDR_{sl} V1 и V2 (Hain Lifescience) за идентификација на мутации на МТВ асоцирани со резистенција на флуорохинолони (*gyrA* quinolone resistance determining region, QRDR, и *gyrB* QRDR во V2) и инјектабилни антитуберкулотски лекови од втора линија (*rrs* region 1400, и *eis* promoter во V2, со исклучување на *embB* асоциран со резистенција на етамбутол, а вклучен во V1) [Табела 6] [179].

Genotype MTBDR*plus* assay ver.1 и ver.2 (Hain Lifescience, Nehren, Germany) е официјално препорачан за дијагноза на MDR-TB од СЗО. Во поновата верзија генскиот дијапазон е проширен на *inhA* промотор регионот – со уште 4 мутации и 2 див тип (wild type, WT) проби. Со тестот може да се евалуира, покрај AFB-позитивен примерок на спутум и клинички изолати, и AFB-негативен примерок на спутум [Табела 6] [179-181].

Genotype MTBDR*sl* (Hain Lifescience) е единствениот тест одобрен од СЗО во 2016 година за брза детекција на МТВС и резистенција на флуорохинолони и инјектабилни анти tubеркулозици од втора линија. Има клиничкото значење кај пациентите со рифампицин-резистенција, или потврдена MDR-TB и може да влијае врз критичната одлука за отпочнување на скратен наместо стандарден режим за MDR-TB [179, 182].

Polymerase chain reaction (PCR), GeneXpert-платформа и Xpert МТВ/RIF тест (Xpert). Полимеразно-верижна реакција (Polymerase chain reaction, PCR) е првиот и до денешен ден најчесто и најшироко употребуван NAAT. Т.н. GeneXpert-платформа од 2004 година го поедноставува молекуларното тестирање со потполна автоматизација и интегрирање на процесите кај PCR-базираните молекуларни тестови (екстракција на DNA, амплификација, детекција на амплифициран продукт), со истовремено одвивање на амплификацијата и детекцијата (real-time PCR, полимеразно-верижна реакција во реално време) [174, 179-181].

Лансирањето на GeneXpert МТВ/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) есејот – базиран на оваа платформа – во 2009 год. се смета за значаен напредок во борбата против туберкулозата. За прв пат е понуден молекуларен тест за туберкулоза кој е едноставен и апликабилен дури и вон конвенционални лабораториски услови, надминувајќи ги на тој начин главните лимитирачки фактори кај молекуларните тестови за ТБ (комплицираност на процедурата и биолошка сигурност при манипулација со *Mycobacterium tuberculosis*) [171].

Во периодот на истражување за оваа докторска дисертација, Cepheid ја промовираше следната генерација на Xpert-есеј (Xpert Ultra), за која СЗО во 2017 година изготви иницијално истражување со препораки [183].

Секвенционирање на геномот на *Mycobacterium tuberculosis* (Whole Genome Sequencing, WGS) [66, 165, 180, 181, 184-192].

Секвенционирањето на геномот на *M. tuberculosis* е релативно нов метод. Тоа е технологија што би требало да ги обедини двете клучни потреби во однос на испитувањето на МТВС („all in one“, „сè во едно“): дијагноза на резистентна туберкулоза и анализа на МТВС-кластери. Во однос на првото, со WGS може истовремено да

детектираат резистенција-асоцирани мутации за сите антитуберкулотски лекови; се добиваат податоци за генетски феномени како хетерорезистенција, инфекција со мешани соеви, ниско ниво и високо ниво на резистенција, тивки („silent“) и спорни („disputed“) мутации. Суштината на WGS е да го предвиди фенотипот (т.е. профилот на резистенција) врз основа на детекција на генотипот – и со тоа да понуди индивидуализиран третман на болеста, приспособен за секој пациент посебно (т.н. персонализирана медицина, „precision medicine“) наместо на унифициран пристап за сите пациенти. Во однос на второто, WGS-технологијата овозможува опсежни епидемиолошки испитувања (одредување на генотипот на МТВС, т.е. генетската заднина и класификација на соевите, испитување на епидемски избивања и трансмисија, лабораториски инциденти и вкрстена контаминација).

Постојат две класи секвенционери: прва генерација и втора генерација (позната и како Next Generation Sequencing, NGS). Првиот секвенционира релативно бавно, но е поевтин (~65 USA\$ по бактериски геном) и попродуктивен. Вториот е побрз (може да секвенционира мултипли геноми за помалку од еден ден), но е поскап (~150 USA\$ по бактериски геном, за Illumina® MiSeq) и помалку продуктивен.

За разлика од брзите молекуларни тестови кои таргетираат точно определени генски локуси и мутации, WGS теоретски може да ги идентификува сите мутации одеднаш и да го предвиди функционалниот ефект од нив, т.е. дали ќе предизвикаат резистенција на некој антитуберкулотски лек. Меѓутоа, овој потенцијално револуционерен метод се соочува со повеќе сериозни ограничувања кои мора да се надминат:

- WGS е култура т.е. временски зависен метод. Поради неколку технички пречки (на прво место присуство на хумана DNA и DNA од други бактерии – која влегува во реакција со реагенсите за секвенционирање и ги троши), WGS преобладава во МТВС-DNA екстрахирана од бацили во култура. Со овој пристап, практично нема разлика во времето до добивање на резултат со WGS и со рDST. Оттука, идеално би било WGS да се изведува директно во клинички примерок (како што тоа се прави со Xpert). Досега, објавени се само неколку вакви студии, со различен степен на успешност. Овој пристап не е стандардизиран и сè уште е голем предизвик.

- Количината на потребната DNA за подготовка на библиотека на секвенци е специфична за платформата за секвенционирање што се употребува и за начинот и реагенсите што се употребуваат, но мора да биде висококвалитетна и со сочуван интегритет.

- Точност во предикција на фенотипската резистенција. За да биде финансиски исплатлива, WGS треба комплетно да го замени рDST (аналогно на идејата Хперт да ја замени микроскопијата). Точноста ја детерминираат и ја ограничуваат: моќта за детекција на SNP, тип и фреквенција на грешки во секвенционирањето (кои се различни кај различни технологии на WGS), параметри на квалитетот (длабочина на препокривање, препокривање на целиот геном). Точноста во предикција на резистенцијата е исто така лимитирана и од актуелното знаење за резистенција-асоцираните мутации. Првичните резултати за точноста на испитувањето на чувствителност за INH, RIF, EMB и PZA се ветувачки. Но потребни се опсежни студии и долготрајно истражување за споредба со фенотипското испитување на резистенција, пред културата да се замени со секвенционирање.

- До денес се проучени и познати голем број механизми на резистенција (генски локуси и резистенција-асоцирани мутации во нив). На овие сознанија се засноваат молекуларните методи за испитување на резистенцијата, што значи дека тие не можат да ги откријат оние случаи на резистенција што се вон нивниот опсег. Кај 10-40% од резистентните соеви механизмите на резистенција се непознати. WGS може да помогне во нивна детекција, но тоа е долгорочен процес.

- Цена на чинење. Неопходна е огромна капитална инвестиција за инфраструктура за WGS, што е особено проблем за земјите во развој (цена на Illumina MiniSeq и MiniSeq портабилни секвенционери во јануари 2017: ~ 50.000 USA\$ и 100.000 USA\$, соодветно, без потрошниот материјал). Покрај софистицираната апаратура, потребен е и посебно обучен персонал.

- Нема унифицирана методологија за изведба, што ги отежнува споредувањето и репродуцибилноста на резултатите во различни лаборатории. Не може да го квантифицира степенот на резистенција што го носат поедини мутации.

- Нема унифицирана методологија за интерпретација на добиените информации. Постојат различни платформи, софтвери и алатки за споредба на добиените податоци од секвенционирањето со референтниот МТВС сој, што апсолутно зависи од биотехнологијата и биоинформатичарите. Оттука, клиничката апликабилност не е стандардизирана за точна и сигурна предикција на резистенцијата врз основа на WGS. И овој дел од целокупниот процес е временски зависен („од екстракција на DNA - до анализа на податоците“).

Поради сето претходно кажано, широката имплементација на овај метод,

особено онаму каде што е најпотребен – во високооптоварените региони со туберкулоза – ќе биде вистинскиот предизвик. Оттука, актуелниот статус на е примарно научноистражувачки и пред информациите добиени со WGS да почнат рутински да се применуваат во клиничка практика, потребно е да се отстранат недостатоците (точност, брзина, ресурси).

1.8. Терапија на туберкулоза

Лекувањето на туберкулозата се спроведува според микробиолошките резултати, т.е. резултатите од генотипско и/или фенотипско испитување на чувствителност на изолираниот сој на МТВС [66, 107, 179, 193]. Ефектот на терапијата се следи примарно со микробиолошки методи (микроскопија и култура), до завршување на терапијата и категоризирање на исходот од лекувањето [55, 68, 107, 112, 111, 135].

Интернационално прифатениот режим со лекови од прва линија (претходно познат и како „категија 1“) кај лица што не биле болни од туберкулоза во минатото, се состои од: инцијална/интензивна фаза (два месеца комбинација на RIF, INH, PZA, EMB) и континуирана фаза (четири месеци комбинација од RIF, INH), или со симболи - 2HRZE/4HR [Табела 7, 8] [68, 107, 134].

Табела 7. Препорачани дози на антигуберкулотски лекови од прва линија за возрасни (превод од референца бр. 68)

Лек	Препорачана доза			
	Дневна доза		Три пати неделно	
	Доза и ранг на дозирање (mg/kg телесна маса)	Максимум (mg)	Доза и ранг на дозирање (mg/kg телесна маса)	Максимум на ден (mg)
Изониазид	5 (4-6)	300	10 (8-12)	900
Рифампицин	10 (8-12)	600	10 (8-12)	600
Пиразинамид	25 (20-30)	-	35 (30-40)	-
Етамбутол	15 (15-20)	-	30 (25-35)	-
Стрептомицин	15 (12-18)		15 (12-18)	1000

Табела 8. Стандарден тераписки режим за новозаболен од туберкулоза (според референца бр. 68)

Интензивна фаза на лекувањето	Континуирана фаза на лекувањето
- 2 месеци - Комбинација: INH, RIF, EMB и PZA	- 4 месеци Комбинација: INH и RIF

Кај лица што повторно се лекуваат од туберкулоза, до неодамна се применуваше режим на лекување со пет лекови од прва линија (претходно познат и како „категија 2“), составен од иницијална/интензивна фаза (два месеца комбинација на RIF, INH, PZA, EMB, SM; еден месец комбинација на RIF, INH, PZA, EMB) и континуирана фаза (пет месеци комбинација на RIF, INH, EMB), или со симболи 2HRZES/HRZE/5HRE [134]. Со последните препораки на СЗО од 2017 година за лекување на чувствителни форми на туберкулоза, кај оваа група пациенти веќе не треба да се препишува овој режим на лекување и одлуката за терапија треба да се базира врз DST (тестирање на чувствителност кон лекови) [68, 194].

Рифампицин е клучниот лек за туберкулоза во антитуберкулотскиот тераписки режим со лекови од прва линија [8]. Рифампициноот е бактерициден лек и е најпотентниот лек со стерилизирачки ефект на сите туберкулозни бацили – реплицирачки и нереплицирачки, интрацелуларно и екстрацелуларно, со добра пенетрација во казеозните фокуси [134, 195]. Изониазидот и рифампициноот се најмоќните бактерицидни антитуберкулотски лекови, заедно активни кон сите популации на бацили. Во осумдесеттите години, токму овие два лека овозможиле скратување на режимот за туберкулоза од 18 на 9 месеци [195].

Соевите на *Mycobacterium tuberculosis* complex со истовремена резистенција на изониазид и рифампицин се означуваат како мултирезистентни, а формата на туберкулоза предизвикана од нив – мултирезистентна туберкулоза (Multi-drug resistant tuberculosis, MDR-TB) [55]. Овие пациенти и пациентите со резистенција кон рифампицин (rifampicin-resistance, RR) се лекуваат според препораките на СЗО со индивидуализиран режим кој содржи лекови од втора линија и т.н. „add-on“ антитуберкулотски лекови [Табела 9] [69]. Изборот на лекови треба да се базира на резултатите од DST (тестирање на чувствителност кон лекови), бидејќи емпирискиот третман може да ја амплифицира резистенцијата понатаму. За превенција на селекција на резистентни мутанти на *M. tuberculosis*, треба да се почитува есенцијалното правило „никогаш да не се додава еден ефективен лек на неуспешен тераписки режим“ [69, 107, 180, 196]. Во интензивната фаза на т.н. „Longer regimen“ (подолготраен режим) за лекување на MDR-TB која е препорачано да трае 8 месеци, се комбинираат најмалку 5 ефективни антитуберкулотски лекови (пиразинамид и четири „core“ лекови од втора линија); вкупното времетраење на лекувањето е 20-24 месеци. Постои и т.н. „Shorter regimen“ (покроткотраен режим) кој трае 9-12 месеци, но може да се спроведува кај селектирана група пациенти, според строго определени критериуми. Се состои од

комбинирање на уште поголем број лекови (4-6 месеци комбинација од канамицин/амикацин, моксифлоксацин, протионамид/етионамид, клофазимин, пиразинамид, високи дози изониазид, етамбутол; пет месеци комбинација од моксифлоксацин, клофазимин, пиразинамид, етамбутол) – или со симболи – 4-6 Km(Am)-Mfx-Pto(Eto)-Cfz-Z-Hhigh-dose-E/5 Mfx-Cfz-Z-E [69, 107, 197].

Во август 2018 година СЗО ги објави најновите препораки за лекување на RR/MDR-TB, со нова класификација на лекови наменети за долг режим на лекување базирана на односот ефективност-сигурност [Табела 10, 11] [197] . Покрај тоа, во континуитет се одвиваат клиничките истражувања на нови лекови за третман на туберкулозата [198].

Табела 9. Лекови за лекување на RR/MDR-TB според препораките на СЗО од 2016 година (превод од референца бр. 69)

Група*	Лек	Кратенка
Група „А“: Флуорохинолони	Левифлоксацин	Lfx
	Моксифлоксацин	Mfx
	Гатифлоксацин	Gfx
Група „В“: Инјектабилни лекови од втора линија	Амикацин	Am
	Капреомицин	Cm
	Канамицин	Km
	(Стрептомицин)	(S)
Група „С“: Други „core“ лекови од втора линија	Етионамид/Протионамид	Eto/Pto
	Циклосерин/Теризидон	Cs/Trd
	Линезолид	Lzd
	Клофазимин	Cfz
Група „D“: „Add-on“ лекови (не се дел од „core“ режимот за MDR-TB)	D1 Пиразинамид	Z
	Етамбутол	E
	Високи дози на изониазид	H ^h
D2	Бедаквилин	Bdq
	Деламанид	Dlm
D3	Пара-аминосалицилна киселина	PAS
	Имипенем-Циластатин	Ipm
	Меропенем	Mpm
	Амоксицилин-клавуланат	Amx-Clv
	(Тиацетазон)	(T)

Лековите се наменети за т.н. „подолготраен“ режим

Табела 10. Лекови за лекување на RR/MDR-TB според препораките на СЗО од 2018 година (превод од референца бр. 197)

Група	Лек	Кратенка
Група „А“: се вклучуваат сите три лекови	Левифлоксацин ИЛИ Моксифлоксацин	Lfx Mfx
	Бедаквилин	Bdq
	Линезолид	Lzd
Група „В“: се додава(ат) еден или двата лека	Клофазимин	Cfz
	Циклосерин ИЛИ Теризидон	Cs Trd
Група „С“: Се додаваат за да се комплетира режимот, и кога лековите од група „А“ и група „В“ не може да се употребат	Етамбутол	E
	Деламанид	Dlm
	Пиразинамид	Z
	Имипенем-Циластатин ИЛИ Меропенем	Ipm-Cln Mpm
	Амикацин (ИЛИ Стрептомицин)	Am S
	Етионамид ИЛИ Протионамид	Eto Pto
	Пара-аминосалицилна киселина	PAS

Лековите се наменети за т.н. „подолготраен“ режим

Табела 11. Споредба на лековите за лекување на RR/MDR-TB (препораки на СЗО за 2018 vs препораки на СЗО за 2016 година; адаптирано од референца бр. 69 и бр. 197)

Група	Лек	Кратенка	Група	Лек	Кратенка
Група „А“: Флуорохинолони	Левифлоксацин	Lfx	Група „А“: се вклучуваат сите три лекови	Левифлоксацин ИЛИ Моксифлоксацин	Lfx Mfx
	Моксифлоксацин	Mfx		Бедаквилин	Bdq
	Гатифлоксацин	Gfx		Линезолид	Lzd
Група „В“: Инјектабилни лекови од втора линија	Амикацин	Am	Група „В“: се додава(ат) еден или два лека	Клофазимин	Cfz
	Капреомицин	Cm		Циклосерин ИЛИ Теризидон	Cs Trd
	Канамицин	Km	Група „С“: Се додаваат за да се комплетира режимот, и кога лековите од група „А“ и група „В“ не може да се употребат	Етамбутол	E
	(Стрептомицин)	(S)		Деламанид	Dlm
Група „С“: Други „core“ лекови од втора линија	Етионамид/Протионамид	Eto/Pto	Пиразинамид	Z	
	Циклосерин/Теризидон	Cs/Trd	Имипенем-Циластатин ИЛИ Меропенем	Ipm-Cln Mpm	
Група „D“: „Add-on“ лекови (не се дел од „core“ режимот за MDR-TB)	Линезолид	Lzd	Амикацин (ИЛИ Стрептомицин)	Am S	
	Клофазимин	Cfz	Етионамид ИЛИ Протионамид	Eto Pto	
	D2 Бедаквилин	Bdq	Пара-аминосалицилна киселина	PAS	
	Деламанид	Dlm	Имипенем-Циластатин	Ipm	
D3 Пара-аминосалицилна киселина	PAS	Меропенем	Mpm		
		Амоксицилин-клавуланат (Тиацетзаон)	Amx-Clv (T)		

Лековите се наменети за т.н. „подолготраен“ режим

1.9. Лоцирање на проблемот и мотив за изработка на докторската дисертација

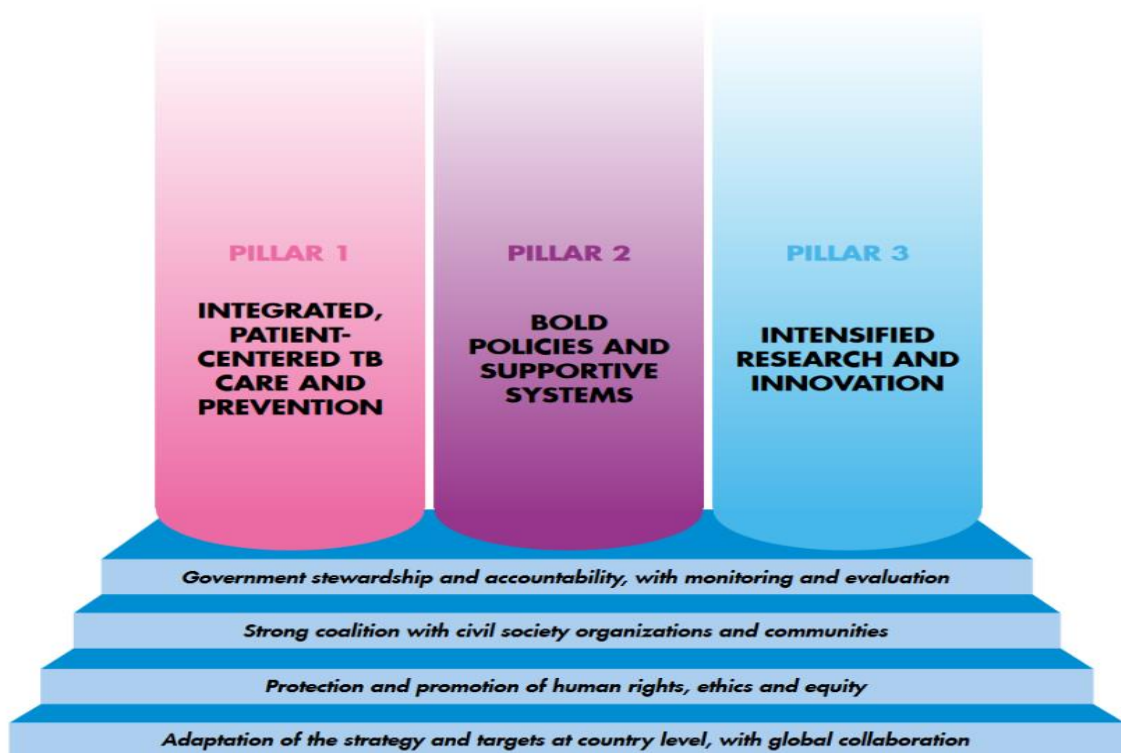
Глобалниот товар на туберкулозата. Туберкулозата е единствена инфективна болест што е прогласена за глобална итност од страна на Светската здравствена организација. Се проценува дека меѓу една третина и една четвртина од светската популација е латентно инфицирана со *Mycobacterium tuberculosis*, а секоја година се регистрираат околу 9 милиони нови случаи на туберкулоза [8, 199]. Приближно 2 милиони годишно умираат поради туберкулоза, со што *M. tuberculosis* се вбројува меѓу десетте главни причини за смрт во светот и е глобална водечка причина за смрт предизвикана од еден единствен микроорганизам – пред HIV/AIDS [8, 106]. Ваквата состојба примарно се поврзува со (не)достапноста на дијагностички методи и соодветни антитуберкулотски лекови во одредени земји и региони, како и со експанзијата на резистентни форми на туберкулоза.

Во 1993 година, СЗО го направи првиот голем чекор во борбата со оваа прастара болест, соочувајќи се со фактот дека туберкулозата е една од најзапоставените јавно-здравствени кризи и декларирајќи ја како „глобална итност“ [200]. Потоа sukcesивно следуваа неколку стратегии, со цел да се воспостави контрола на туберкулозата: „DOTS“ (Directly Observed Therapy Strategy) во 1995 година, „Stop TB“ една деценија подоцна и последната – „The End TB“ стратегијата во 2014 година. Во 2000 година, во Милениумските развојни цели (Millennium Development Goals, MDGs) беше вклучена опиплива и конкретна цел – до 2015 година да се запре растот на инциденцата на туберкулозата и таа да почне да опаѓа [201]. Навистина, до 2015 година тенденцијата на раст на инциденцата на туберкулозата беше запрена и почна да бележи лесно опаѓање. Глобално просечната стапка на опаѓање на инциденцата на туберкулозата изнесува 1,5% годишно во периодот 2000-2017 година, односно 1,8% во тек на 2016 и 2017 година [8]. Стапката на смртност бележи намалување од вкупно 47% во периодот 1990-2014 година [202] и се проценува дека во периодот 2000-2015 година третманот на болеста спречил 49 милиони смртни случаи во светот поради туберкулоза [203].

Стратегијата за борба со туберкулозата денес е заокружена со „End TB strategy“ на СЗО од 2014 година и Одржливи развојни цели (Sustainable Development Goals, SDGs) на Обединетите нации од 2015 година, чија суштина е елиминација на глобалната епидемија на туберкулоза преку постигнување на следниве цели: намалување на морталитетот од туберкулоза за 90% и намалување на инциденцата на туберкулозата за 80%, до 2030 година [204] [Табела 12, 13; Графикон 3; Слика 18]. Борбата со

резистенцијата на причинителот на туберкулозата - *M. tuberculosis* - на антимиќробни лекови е стожерот за постигнување на целите на оваа стратегија, и поради тоа на „раната дијагноза на туберкулозата, со универзално тестирање на чувствителност кон антитуберкулозици“ ѝ е дадена примарната позиција во првиот столб на оваа стратегија [Табела 13] [204]. Во континуитет со „End TB Strategy“, Берлинската декларација на лидерите на G20 од 2017 година апострофира дека резистенцијата на антимиќробни лекови претставува растечка закана за јавното здравје и економскиот раст во светски рамки и дека истражувањето и развојот на брзи дијагностички методи и лекови за резистентни форми на туберкулозата, покрај другите болести и микроорганизми, треба да бидат интернационален приоритет [205].

И покрај овој значен прогрес, туберкулозата и натаму е огромен проблем и глобална закана за јавното здравје, особено во ниско и средноприходните земји [201]. Практичната реализација во откривање и лекување на активната туберкулоза и латентната туберкулозна инфекција – како клучни фактори за контрола на туберкулозата – во реалноста е сè уште далеку под проценките на СЗО [8], а експанзијата на резистентни форми како посебна категорија на туберкулоза им дава дополнителна тежина на овие критични проблеми.



Слика 18: Столбови и принципи на „End-TB Strategy“ (според референца бр.204)

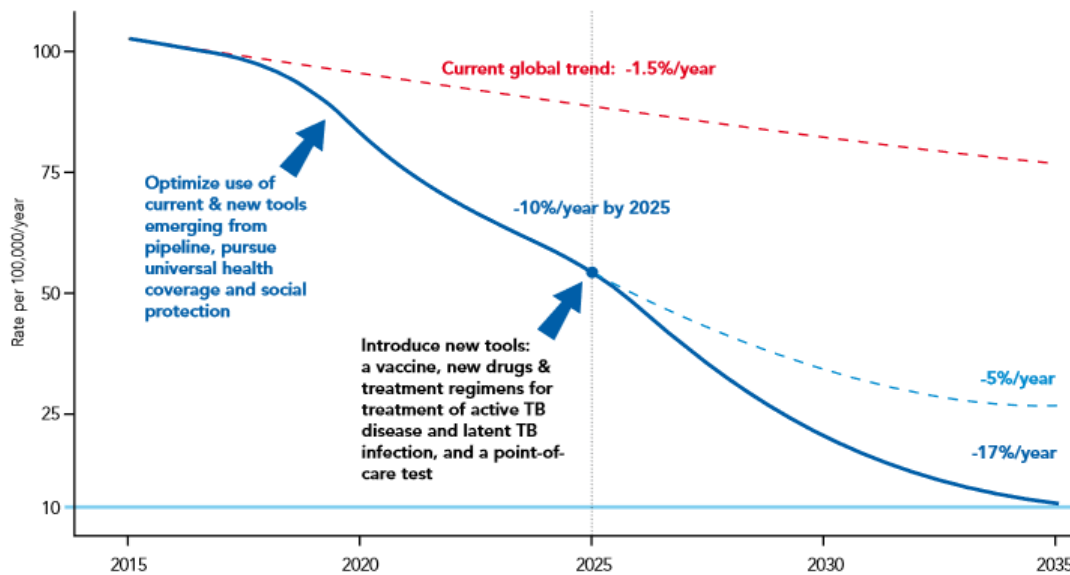
Табела 12. Цели на SDGs (Sustainable development goals) и „End TB Strategy“ (според референца бр. 204)

VISION	A world free of tuberculosis – zero deaths, disease and suffering due to tuberculosis			
GOAL	End the global tuberculosis epidemic			
INDICATORS	MILESTONES		TARGETS	
	2020	2025	SDG 2030	END TB 2035
Reduction in number of TB deaths compared with 2015 (%)	35%	75%	90%	95%
Reduction in TB incidence rate compared with 2015 (%)	20% (<85/100 000)	50% (<55/100 000)	80% (<20/100 000)	90% (<10/100 000)
TB-affected families facing catastrophic costs due to TB (%)	Zero	Zero	Zero	Zero

Табела 13. Принципи и компоненти на „End TB Strategy“ (според референца бр. 204)

PRINCIPLES
<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Government stewardship and accountability, with monitoring and evaluation</i> 2. <i>Strong coalition with civil society organizations and communities</i> 3. <i>Protection and promotion of human rights, ethics and equity</i> 4. <i>Adaptation of the strategy and targets at country level, with global collaboration</i>
PILLARS AND COMPONENTS
<ol style="list-style-type: none"> 1. INTEGRATED, PATIENT-CENTRED CARE AND PREVENTION <ol style="list-style-type: none"> A. Early diagnosis of tuberculosis including universal drug-susceptibility testing, and systematic screening of contacts and high-risk groups B. Treatment of all people with tuberculosis including drug-resistant tuberculosis, and patient support C. Collaborative tuberculosis/HIV activities, and management of co-morbidities D. Preventive treatment of persons at high risk, and vaccination against tuberculosis 2. BOLD POLICIES AND SUPPORTIVE SYSTEMS <ol style="list-style-type: none"> A. Political commitment with adequate resources for tuberculosis care and prevention B. Engagement of communities, civil society organizations, and public and private care providers C. Universal health coverage policy, and regulatory frameworks for case notification, vital registration, quality and rational use of medicines, and infection control D. Social protection, poverty alleviation and actions on other determinants of tuberculosis 3. INTENSIFIED RESEARCH AND INNOVATION <ol style="list-style-type: none"> A. Discovery, development and rapid uptake of new tools, interventions and strategies B. Research to optimize implementation and impact, and promote innovations

Desired decline in global TB incidence rates to reach the 2035 targets



Графикон 3. Очекувано глобално опаѓање на инциденцата на туберкулоза, за постигнување на целите на „End TB Strategy“ (според референца бр. 204)

Како стигнавме до актуелната ситуација со резистенција? Резистенцијата кон анти-туберкулотски лекови е резултат на спонтани мутации во геномот на *M. tuberculosis*, а не на хоризонтален трансфер на гени [164, 167, 168]. Овие мутации асоцирани со резистенција се случуваат во гени кои кодираат таргет-рецептори или конвертирачки ензими за анти-туберкулотскиот лек [62, 67, 165] и се јавуваат со предвидливи стапки за секој од лековите (на пр. за рифампицин е 10^{-8} , а за изониазид е 10^{-6}) [167].

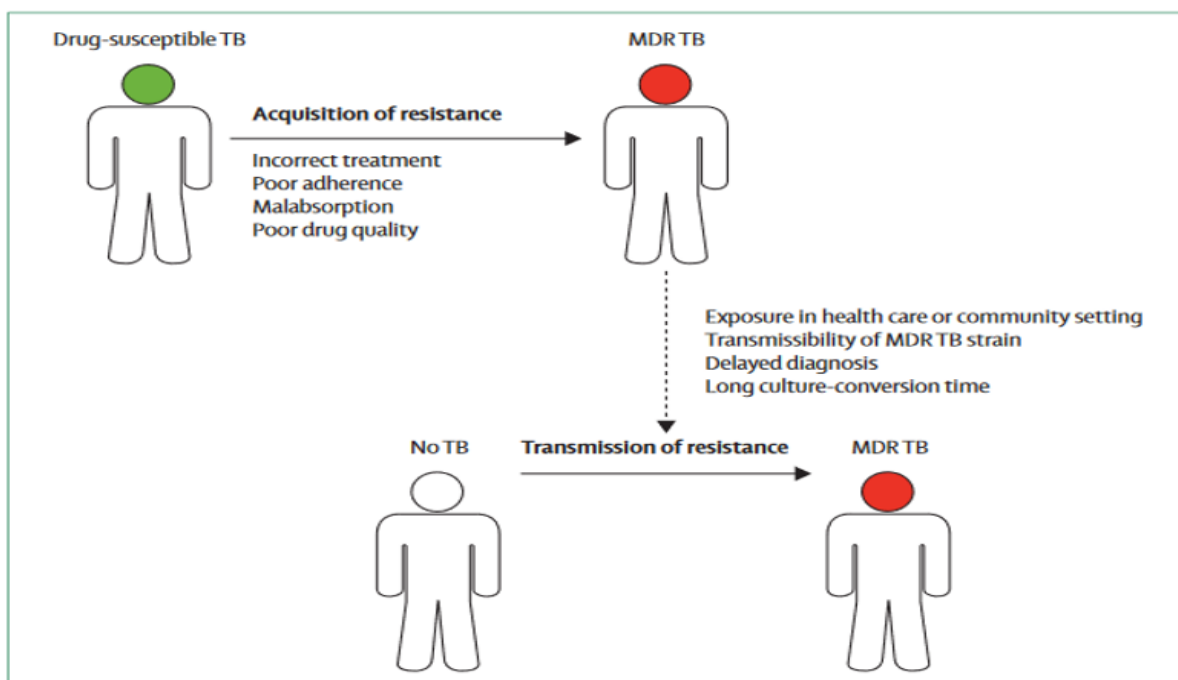
Кај пациенти со активна болест, субпопулациите на резистентни бацили се појавуваат спонтано [206], но во присуство на форсирана селекција предизвикана од лекови (т.н. „drug-selection pressure“) може да прераснат во доминантен сој [207]. Оттука, се смета дека туберкулозата резистентна на лекови е артифициелно создадена од човекот („man-made occurrence“), односно е продукт на несоодветен третман на болеста [Слика 19] [67, 166]. Лековите за терапија на туберкулозата ја уништуваат популацијата на чувствителни бацили, што пак им овозможува клонална експанзија на резистентните соеви. Со ваквата селекција, резистентните микроорганизми се мултиплицираат и

стануваат доминантна популација, отпорна на терапијата; на пример, изониазид-монтерапијата ги селектира изониазид-резистентните мутанти и им овозможува да се мултиплицираат [Слика 20] [207, 208]. Овој процес се нарекува стекната или секундарна резистенција, и е основа за правилото „никогаш да не се додава еден лек на неуспешен тераписки режим“ [Слика 20] [188, 209, 210].

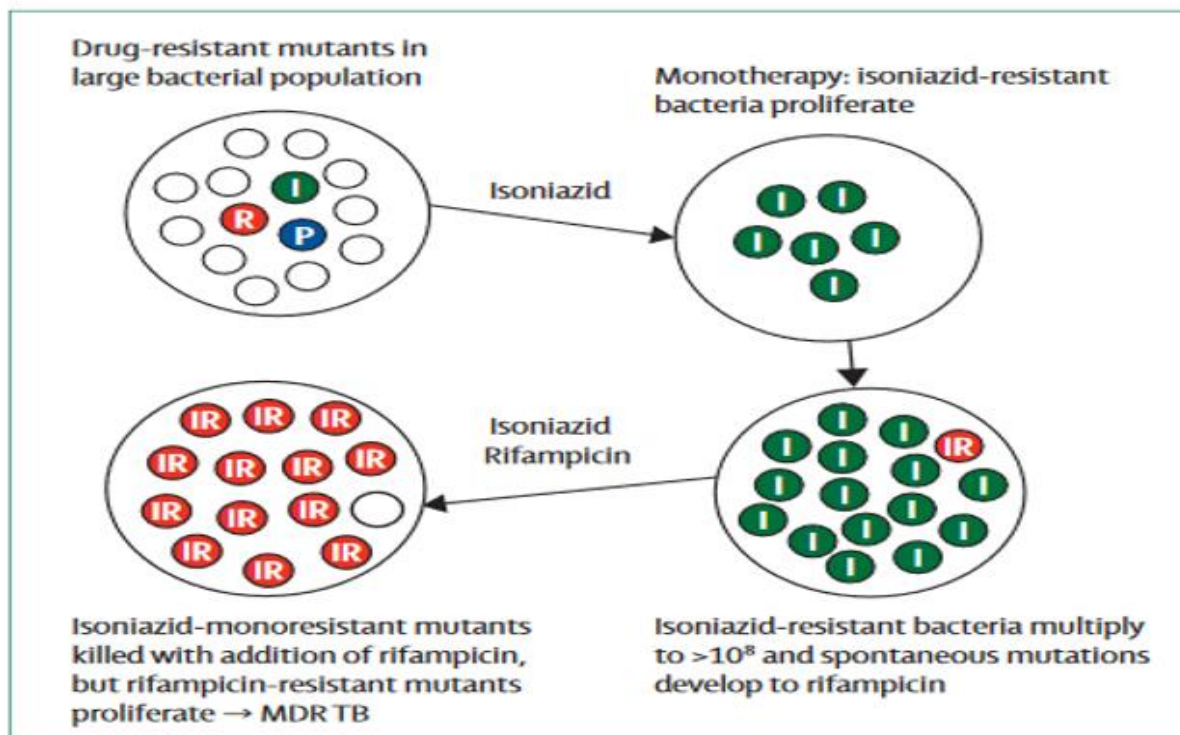
Еднаш создадени, резистентните соеви можат да се пренесуваат од човек на човек на ист начин како и чувствителните, резултирајќи со појава на резистентни форми на туберкулоза кај лица кои никогаш во животот не биле експонирани на антитуберкулотски лекови (т.н. примарна резистенција) [Слика 19] [188, 211-213]. Бидејќи мутациите асоцирани со резистенција може да бидат неповолни за самиот микроорганизам и проследени со намалување на адаптивбилноста (т.н. „fitness-cost“), многу истражувачи во почетокот претпоставувале дека резистентните соеви имаат редуцирана вируленција и/или способност за трансмисија, за да може да се пренесуваат понатаму [188, 214-216]. Но неодамнешните истражувања покажаа дека мутациите асоцирани со резистенција честопати се следени или придружени со дополнителни мутации, кои можат да ги компензираат штетните ефекти на првите, воспоставувајќи го иницијалниот капацитет за раст на бацилите [217-219, 165, 188]. Иако некои епидемиолошки студии покажуваат дека резистентните соеви се помалку преносливи од чувствителните, други го покажуваат сосема спротивното [220]. Изгледа дека одредени специфични генотипови (пр. W/Beijing генотипот) и одредени мутации асоцирани со резистенција или компензаторни мутации (пр. позиција 315 of *katG* генот) се важен фактор за преносливоста на одредени резистентни соеви на *M. tuberculosis* [166, 221, 222]. Клинички фактори, пак, кои ја промовираат преносливоста на туберкулозата резистентна на лекови се користење на конвенционални DST и недоволната потенција на лековите од втора линија, што резултира со задоцнета дијагноза и пролонгирање на времето потребно за стерилизација на културите од спутум, соодветно [166, 223]. Сепак, за потполно расветлување на ефектот на мутациите асоцирани со резистенција врз трансмисивноста на болеста се потребни дополнителни студии [166, 224] и засега ова прашање останува отворено [188].

Глобалната епидемија на туберкулозата резистентна на лекови се должи на комбинација од стекната резистенција и примарна трансмисија [166, 213, 225-227]. Иако релативното учество на секоја од нив може единствено да се проценува, податоците сè повеќе зборуваат дека примарната трансмисија на MDR-TB и XDR-TB (Extensively-resistant tuberculosis, екстензивно-резистентна туберкулоза) е актуелната движечка сила

на ширењето на резистенцијата, особено во земјите кои се високооптоварени со туберкулоза, како Кина, Индија и Јужна Африка [188, 228, 229]. Многубројни студии ја потврдуваат трансмисијата на резистентни форми на туберкулоза [209, 211, 213, 226, 239]. Неодамнешните систематски прегледи на литературата укажуваат на асоцијација меѓу примарната резистенција на *M. tuberculosis* и ХИВ-коинфекцијата, сугерирајќи трансмисија на резистентни форми на туберкулоза како сигнификантен предизвик за третирање на оваа популација на пациенти [231, 232]. Националното истражување на туберкулоза резистентна на лекови во Кина од 2012 година индицира дека значаен број на MDR-TB и XDR-TB случаи се должат на активна трансмисија на (главно) Beijing генотипот, а слична е состојбата и во Европа и Африка [233-235]. Поради ваквиот загрижувачки развој на настаните, неопходни се дополнителни студии за идентификација на механизмите за создавање резистенција, еволуција и адаптација на овие резистентни вирулентни соеви на *M. tuberculosis* во домаќинот и на нивната преносливост. Од нив би произлегле поефикасни мерки за превенција на трансмисијата на туберкулозата и ескалација на резистенцијата [67, 166].



Слика 19. Механизам на развој на резистенција кај туберкулозата: аквизиција на резистенција во тек на несоодветен третман и трансмисија на примарно резистентен сој на MDR-TB (според референца бр. 166)



Слика 20. Механизам на развој на резистенција кај *M. tuberculosis*: аквизиција на резистенција во тек на несоодветен третман – селекција на резистентни клонови на бацили (според референца бр. 166)

Резистентни форми на туберкулоза: димензионирање на проблемот

Појавата и ширењето на резистентни форми на туберкулоза претставуваат растечки глобален јавно-здравствен проблем [8, 56, 68, 236]. Главна закана за контрола на туберкулозната инфекција се мултирезистентната и екстензивно-резистентната ТБ и ниедна земја не е поштедена од овој ризик. По дефиниција, мултирезистентна туберкулоза (Multidrug-resistant TB, MDR-TB) е предизвикана од соеви на *M. tuberculosis* резистентни најмалку кон изониазид и рифампицин, т.е. кон двата најважни анти-туберкулотски лекови од прва линија, додека екстензивно-резистентна туберкулоза (Extensively drug-resistant TB, XDR-TB) подразбира MDR-TB плус резистенција кон некој од флуорохинолоните и најмалку еден од парентералните анти-туберкулотски лекови од втора линија [199].

Во периодот 2009-2016 година, бројот на пациенти со MDR-TB бележи пораст од над 20% на годишно ниво (во апсолутни бројки – од 250 000 на 490 000), делумно и поради напредокот во брзата дијагностика и молекуларното или фенотипското тестирање на чувствителност кон лекови [Графикон 4] [203, 236, 237].

Според проценката на СЗО, 5% од сите случаи на туберкулоза на глобално ниво отпаѓаат на MDR-TB [238]. Се проценува дека годишно се јавуваат околу 500 000 случаи на MDR-TB, преобладајќи во земјите на Источна Европа и Азија [199]. Пропорцијата е повисока кај претходно лекуваните и за 2017 година изнесува 18%, наспроти 3,5% кај новите случаи на туберкулоза - но на вторите отпаѓа најголемиот дел од популацијата на болни со туберкулоза [8]. За 2017 година проценката изнесува 558 000 случаи на рифампицин-резистентна туберкулоза (Rifampicin-resistant tuberculosis, RR-TB) од кои 82% се MDR-TB. Од нив, откриени и регистрирани се само една четвртина, т.е. 160 684 случаи [8]. Пропорцијата на XDR-TB меѓу MDR-TB случаите изнесува 8,5%.

Во 2017 се регистрирани 10 800 случаи на XDR-TB во 77 земји, но реалниот број е веројатно многу поголем. Од нив, 88% се во европскиот регион и регионот на Југоисточна Азија [Табела 14]. Во пет земји се регистрирани најголем број од случаите: Белорусија (525), Индија (2650), Руската Федерација (3661), Јужна Африка (747) и Украина (1097).

Географската дистрибуција на MDR-TB е многу варијабилна и се состои од неколку жаришни точки во ниско и средноприходните земји, од Источна Европа до Азија. Во 2017 година, најголем број на MDR-TB/RR-TB е рапортиран од Југоисточна Азија (51 788), а потоа во европскиот регион (48 299) [Табела 14] [8]. Во регионот на Западен Пацифик, регистрирани се 24 699 случаи на MDR/RR-TB. Во три земји се регистрирани речиси половина од случаите со MDR/RR-TB во светот (47%): Индија (24%), Кина (13%) и Руската Федерација (10%) [Слика 21] [8]. Во Европа, повеќе од 50% од случаите со рекурентна туберкулоза се MDR-TB или XDR-TB [236].

Математичкото моделирање предвидува пораст на MDR-TB меѓу инцидентните случаи на туберкулоза и на XDR-TB меѓу инцидентните случаи на MDR-TB во земјите кои се високооптоварени со туберкулоза во следните децении [236]. Но во свет во кој неограниченото патување и миграцијата ја поттикнуваат трансмисијата на туберкулозата преку границите, многу е веројатно дека во блиска иднина глобалната мапа на MDR-TB и XDR-TB ќе претрпи сигнификантни промени, непоштедувајќи ниту една земја. Оттука, туберкулозата и нејзините резистентни форми не се индивидуален проблем на поединечни земји, туку глобална закана за јавното здравје [188].

Стапките на смртност од MDR-TB и XDR-TB изнесуваат 15% и 26%, соодветно, но реалните стапки се веројатно двојно поголеми – ако се земе предвид морталитетот кај оние со исход „изгубени од следење“ (WHO Global report on TB, 2018, кохорта 2015) [8]. Некои пациенти со MDR-TB/XDR-TB и исход „неуспех од лекувањето“ можат да живеат

со месеци претставувајќи перманентен извор на инфекција и трансмисија на резистентни соеви на *M. tuberculosis* [239]. Наспроти овие загрижувачки факти, во земји каде што на располагање стојат нови дијагностички методи и терапевтски можности за креирање на индивидуализиран третман, постигнат е драматичен напредок во исходот на лекување на MDR-TB/XDR-TB [240, 241].

Во 2017 година кај 30% од вкупно регистрираните пациенти со туберкулоза (кај 24% нови и 70% претходно лекувани) е извршено тестирање за резистенција на рифампицин, додека 50% од пациентите регистрирани како MDR-TB биле тестирани за резистенција на флуорохинолони и инјектабилни антитуберкулозици од втора линија [8] – што е далеку под потребното за ефикасна контрола на туберкулозата. Слично на тоа, не повеќе од 20% од болните со MDR-TB имаат пристап до соодветен третман [9, 10, 242, 243].

Лекувањето на лицата инфицирани со MDR-TB соеви е тешко, со намалена веројатност за излекување и опстојување на овие лица како перманентен извор на инфекција [239, 244]. Во споредба со антитуберкулотските лекови од прва линија, лековите од втора линија – кои се употребуваат во терапијата на MDR-TB – се помалку ефикасни, потоксични се, послабо се толерираат и се поскапи (вообичаено 2000 – 5000 USA\$ по пациент) [199]. Лекувањето е долготрајно – од 20 до 24 месеци со вообичаениот терапевтски режим за MDR-TB; дури и со скратениот режим (т.н. Bangladesh-regime) лекувањето трае 12 месеци – но со уште поголем број лекови во комбинација [69, 107, 197, 199]. Ова покажува дека резистентните форми ја компромитираат контролата на туберкулозата и преку економскиот ефект: во Соединетите Американски Држави, се проценува дека болничкото лекување на MDR-TB чини во просек 81.000 USA\$, а за XDR-TB – 285.000 USA\$ [188]. Под оптимални услови, стапката на излекување кај туберкулоза чувствителна на лекови надминува 90%; за MDR-TB стапката на излекување ретко надминува 70% [245]. Во 2017 кај 139 114 (87%) од откриените е отпочнат режим на лекување со лекови од втора линија, но тоа сè уште претставува само 25% од проценетите 558 000 со RR/MDR-TB. Кина и Индија учествуваат со 40%, а заедно со уште други 8 земји – со 75% во глобалната дијагностичко-терапевтска празнина („gap“). Успехот во лекувањето и натаму останува низок. Според извештајот на СЗО за 2018 година, само 55% од пациентите со MDR-TB и 34% од пациентите со XDR-TB успешно го завршиле предвидениот третман (кохорта 2015 година); ако се почитуваат дефинициите за исход од лекувањето на СЗО, веројатно е дека бројот на оние што се „излекувани“ е помал (кохорта 2015) [8].

Препораките на СЗО за надминување на проблемот со резистентни форми на туберкулоза и воспоставување контрола на инфекцијата опфаќаат итно унапредување на капацитетите на микобактериолошките лаборатории за културелно испитување на чувствителност (во земјите каде што не постои) и воведување нови, молекуларни тестови за детекција на резистенцијата кон АТЛ [175, 246]. Консензусот на СЗО од 2014 година препорачува развој на едноставни и евтини тестови кои не бараат посебни услови за изведба, со потенцијал да ја заменат микроскопијата, и кои при првиот контакт со пациентот ќе овозможат брз DST и проценка - за лекување со лекови од прва линија или потреба од натамошно испитување на резистенција (т.н. Target Product Profiles, TTPs) [247].

Брзата детекција на MDR-TB овозможува навремен третман со соодветни лекови, со што се редуцираат морбидитетот, морталитетот и натамошната трансмисија на инфекцијата, како и економските трошоци и појавата на XDR-TB [166, 188, 236]. Молекуларните методи за детекција на резистенцијата на соевите на *Mycobacterium tuberculosis complex* кон АТЛ се создадени со цел да овозможат предикција на резистенцијата врз база на мутациите асоцирани со резистенција за помалку од 24 часа и потенцијално се најбрзите методи за детекција на резистенција кон лекови воопшто [173, 192, 248-253]. Тие се логичен производ на низа генетски испитувања и проучување на резистенцијата на *Mycobacterium tuberculosis complex* на антитуберкулотските лекови на молекуларно ниво. До денес се откриени и опишани многу мутации одговорни за резистенција, особено кај лековите од прва линија [254].

Во последните години, програмската имплементација на молекуларните тестови во светот драматично го редуцираше времето потребно за рутинска дијагноза на туберкулозата [249, 252, 255, 256]. Детекцијата на мутациите асоцирани со резистенција овозможува брза проценка на чувствителноста на антитуберкулотските лекови и помага во изборот на антитуберкулотици – со цел да се подобри лекувањето на пациентите [254, 257].

Молекуларни техники за брза дијагноза на туберкулоза и детекција на резистенција кон антитуберкулотски лекови, прифатени и препорачани од СЗО се: Line Probe Assays (LPAs) во 2008 година [175] и Xpert MTB/RIF есејот во 2010 година [169, 174] (опишани претходно во поглавјето за дијагноза на туберкулозата). Комплексноста, чинењето и потребата од софистицирана лабораториска инфраструктура ја ограничуваат пошироката имплементација на LPA. Од друга страна, Xpert MTB/RIF есејот е едноставен за изведување, комплетно автоматизиран и за него се доволни стандардни

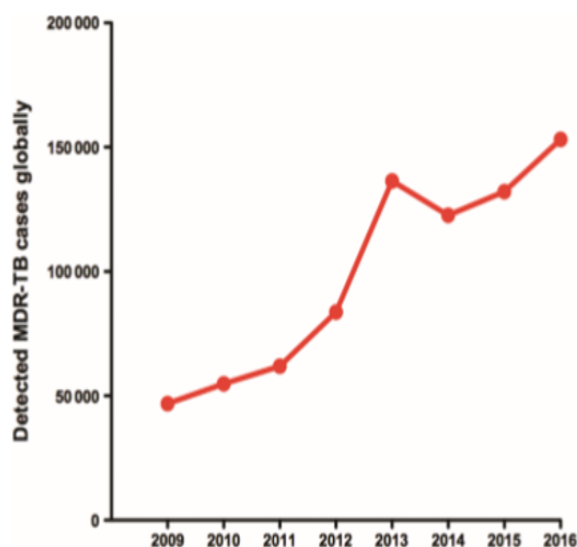
лабораториски услови. Позитивните резултати од неговата примена, иако во релативно краток временски период (2011-2013 година), се сумирани во Прирачникот на СЗО за имплементација на Xpert MTB/RIF од 2014 година и резултираа со проширување на препораките за негова употреба, односно можност за примена на тестот како иницијална дијагностичка алатка практично кај сите возрасни лица кај кои постои сомневање за туберкулоза [171, 177].

Табела 14. Регистрирани случаи на туберкулоза, ХИВ-позитивна туберкулоза и MDR/RR-TB во 2017 година, глобално (превод од референца бр. 8)

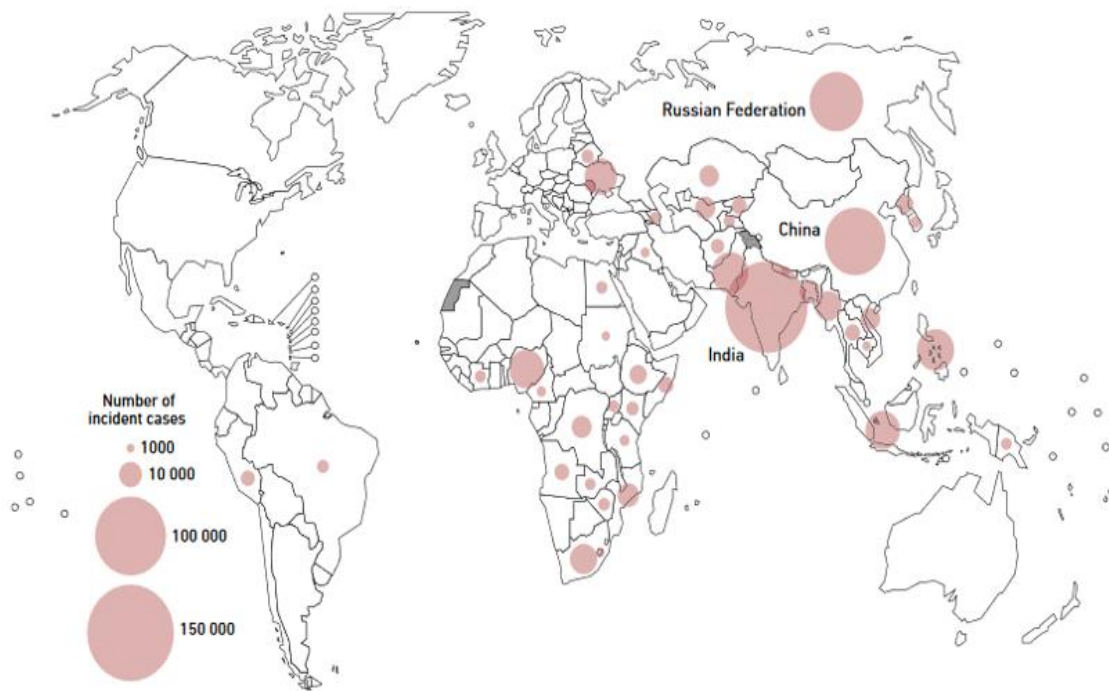
	Вкупно нотифицирани	*Нови и релапси	Белодробна ТБ (нови и релапси)		Вонбелодроб на ТБ (нови и релапси; %)	ХИВ-позитивни (нови и релапси)	RR/MDR-TB	XDR-TB
			Број	Бактериолошки потврдени (%)				
Африка	1 323 450	1 294 321	1 088 909	66%	16%	344 093	26 845	867
Јужна и Северна Америка	243 064	228 943	194 228	78%	15%	20 487	4 084	121
Источен Медитеран	536 185	523 494	396 945	53%	24%	1 327	4 969	168
Европа	264 563	220 832	185 826	64%	16%	24 722	48 299	6 758
Југоисточна Азија	2 965 311	2 826 486	2 403 901	59%	15%	61 832	51 788	2 755
Западен Пацифик	1 375 550	1 350 202	1 244 213	39%	8%	12 172	24 699	131
Глобално	6 708 123	6 444 278	5 514 022	56%	14%	464 633	160 684	10 800

*Во нови и релапси се вклучени и случаите за кои не е позната историјата на лекување, а не се вклучени повторно регистрираните случаи (повторно лекувани после „претходен неуспех од лекувањето“ или „изгубени од следење“; „други претходно лекувани“ чиј исход од последното лекување не е познат или документиран).

Drug-resistant tuberculosis



Графикон 4. Број на пациенти идентификувани со MDR-TB (период 2009-2016 година, Светска здравствена организација) (според референца бр. 236)

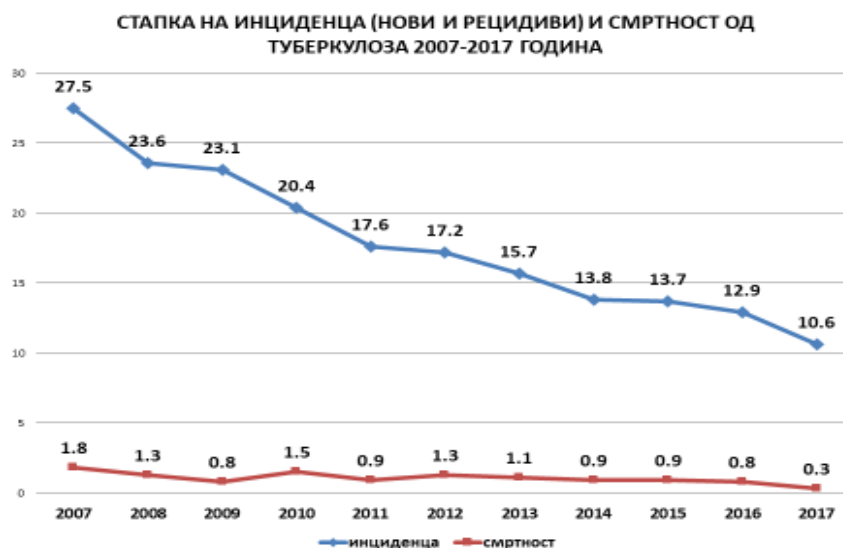


Слика 21. Проценета инциденца на MDR/RR-TB во светот во 2017 година, во земји со најмалку 1000 случаи годишно (според референца бр. 8).

Состојбата со туберкулоза во Република Македонија

Основните статистички и демографски податоци на Република Македонија за туберкулоза се прикажани на Графикон 5, 6, 7 и 8 [258]. Република Македонија е земја со инциденца на туберкулоза во постепено и континуирано опаѓање (10,6/100 000 за 2017 година) [Графикон 5] [8, 258, 259] и многу ниска стапка на MDR-TB (0,048/100 000 за 2017 година) [Графикон 9] [8, 258, 260]. Во периодот 2005-2015 година се регистрирани вкупно 37 пациенти со MDR-TB и еден со XDR-TB. Во периодот 2007-2015 година се регистрирани вкупно 138 изолати на резистентни соеви од кои 27 MDR, еден XDR и 13 рифампицин-резистентни [8, 258, 259]. Меѓутоа, поради присуство на фактори кои го фаворизираат ширењето на MDR-TB (потенцијал за трансмисија на инфекцијата, долготрајно и скапо лекување, интензивни миграциски процеси), не смее да се потцени можноста од компромитирање на контролата на инфекција, и покрај поволниот статистички тренд. Во согласност со препораките на СЗО [175, 246, 247], Институтот за белодробни заболувања и туберкулоза - Скопје во 2014 година го воведо првиот

потполно автоматизиран, real-time PCR (полимеразно-верижна реакција во реално време) базиран молекуларен тест за брза дијагноза на туберкулоза и истовремена детекција на резистенција кон рифампицин во Република Македонија - Xpert® MTB/RIF assay (Cepheid Inc., Sunnyvale, CA, USA), наменет за детекција на *Mycobacterium tuberculosis* complex и најчестите мутации во неговиот *rpoB* ген [169, 174].

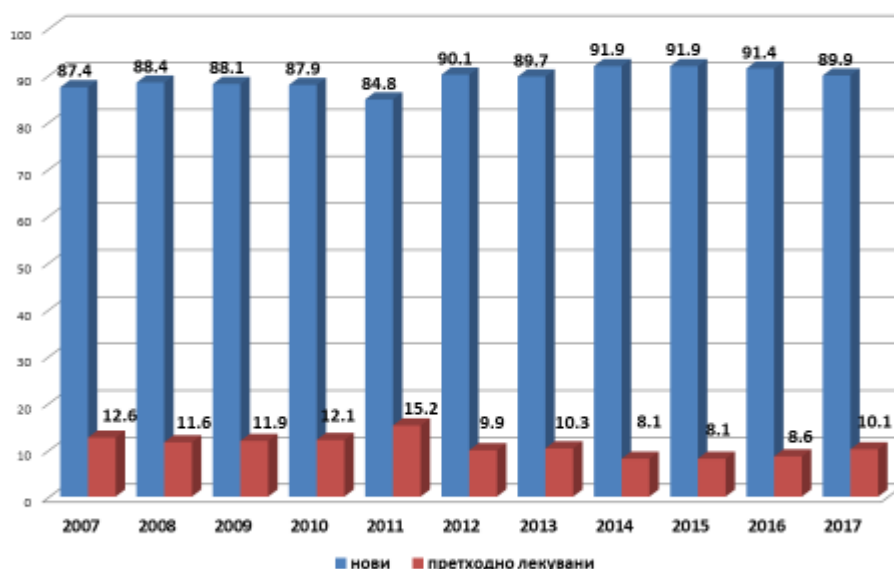


Графикон 5. Стапка на инциденца и морталитет од туберкулоза во Република Македонија (период 2007-2017 година) (според референца бр. 258)



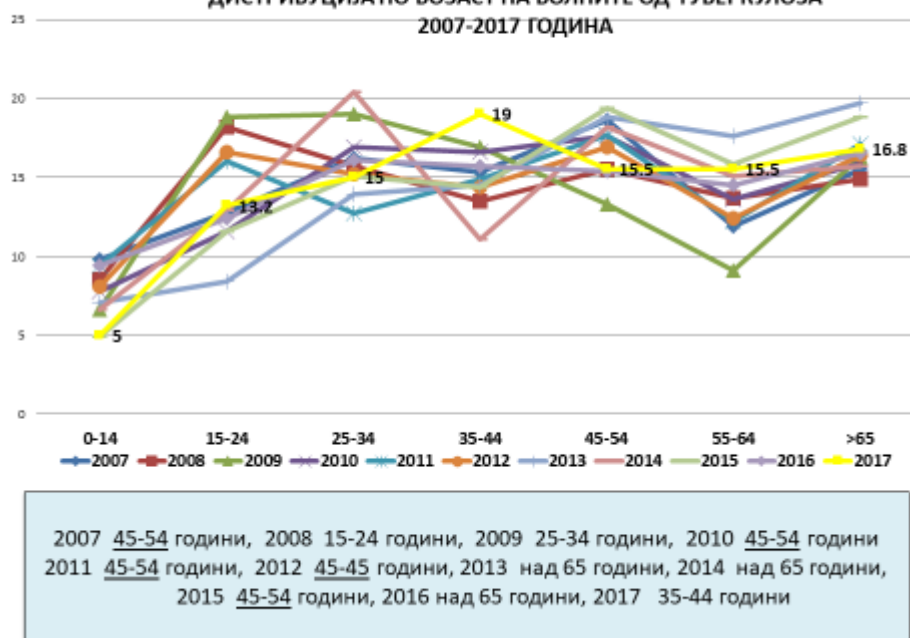
Графикон 6. Дистрибуција по пол на болните од туберкулоза во Република Македонија (период 2007-2017 година) (според референца бр. 258)

ПРОЦЕНТ НА НОВИ И ПРЕТХОДНО ЛЕКУВАНИ ОД ВКУПНО РЕГИСТРИРАНИТЕ БОЛНИ ОД ТУБЕРКУЛОЗА ВО РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА 2007-2017 ГОДИНА

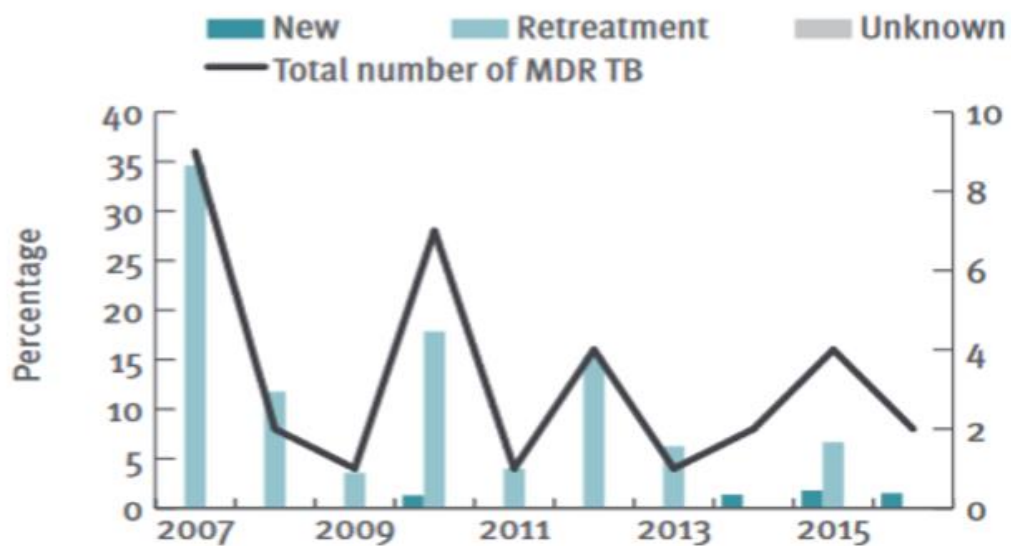


Графикон 7. Процент на нови и претходно лекувани од туберкулоза во Република Македонија (период 2007-2017 година) (според референца бр. 258)

ДИСТРИБУЦИЈА ПО ВОЗАСТ НА БОЛНИТЕ ОД ТУБЕРКУЛОЗА 2007-2017 ГОДИНА



Графикон 8. Дистрибуција по возраст на болните од туберкулоза во Република Македонија (период 2007-2017 година) (според референца бр. 258).



Графикон 9. Случаи на MDR-TB според историјата за претходно лекување во Република Македонија (2007-2015 година) (според референца бр. 260)

Мотив за истражување и цели на докторската дисертација

Сумирано од сето претходно кажано и од долгогодишната практика, третманот на резистентна туберкулоза со стандардни антитуберкулотски лекови од прва линија, наместо со тераписки режим дизајниран според резистенцијата, значи дека пациентите примаат неадекватна терапија во тек на 12 недели. Со тоа се зголемува ризикот од неуспех на терапијата или смртен исход, терапискиот режим – неспособен да го убие МТВС – ја амплифицира резистенцијата кон лековите кон кои првичните изолати биле чувствителни, а пациентите остануваат инфективни, фаворизирајќи ја трансмисијата на резистентни соеви на блиските контакти.

Во споредба со микробиолошкиот „златен стандард“ за изолација на микобактериите и испитување на нивната чувствителност кон антитуберкулотски лекови за кој се потребни 6 односно 12 недели соодветно, за добивање на резултатот со Xpert МТВ/RIF тестот се потребни 2 часа. Брзата идентификација на причинителот и детекцијата на резистенција на рифампицин, значително би ги забрзале дијагнозата и изборот на ефикасен (т.е. соодветен и навремен) антитуберкулотски режим. Долгорочните ефекти, пак, би биле подобрена контрола на инфекцијата, активен епидемиолошки надзор на резистенцијата, и активно откривање, следење и превенција на трансмисијата на MDR-соевите.

Во поглед на добивање лажно-негативни наоди за резистенција, треба да се земе предвид постоењето на големи варијации во циркулирачките соеви на МТВС во различни географски региони во светот [8, 18, 20, 71, 261-267]. Секоја микобактериолошка лабораторија во своите истражувања практично го детектира локалното *milieu* т.е. фреквенцијата на најчестите генотипови на МТВС, а појавата на лажно-негативни резултати е очекуван феномен, кој се должи на уникатните генски мутации [268, 269]. Оттука, неопходна е локално валидирање на молекуларниот тест во различни региони во светот, со цел да се осигура негова прифатлива изведба.

Мотивот за изработка на оваа студија е веродостојно да се презентира можноста за правилна тераписка одлука од самиот почеток на лекувањето на туберкулозата и да се добие пресек на состојбата со чувствителност (односно резистенција) на соевите на *Mycobacterium tuberculosis complex* изолирани на територија на Република Македонија кон рифампицин. Посебен предизвик претставува фактот што на територијата на Република Македонија досега не е направено вакво истражување и што со оваа докторска дисертација за првпат во нашата земја ќе се евалуира еден молекуларен тест за туберкулоза.

2. ЦЕЛИ НА ДОКТОРСКАТА ДИСЕРТАЦИЈА

1. Да се утврди дијагностичката вредност на Xpert® МТВ/RIF есејот (Cepheid Inc., Sunnyvale, CA, USA) за рана дијагноза на белодробна туберкулоза, т.е. молекуларна идентификација на *Mycobacterium tuberculosis* complex.

2. Да се утврди дијагностичката вредност на Xpert® МТВ/RIF есејот (Cepheid Inc., Sunnyvale, CA, USA) за брза детекција на резистенција на изолираниот сој на *Mycobacterium tuberculosis* complex кон рифампицин.

3. Да се добие пресек на состојбата со чувствителност (односно резистенција) на соевите на *Mycobacterium tuberculosis* complex на територијата на Република Македонија кон рифампицин.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

Во истражувањето се почитуваа етичките начела на: Декларацијата од Хелсинки на Светската медицинска асоцијација за етичките принципи на медицински истражувања во кои се вклучени луѓе, Извештајот од Белмонт – за етичките принципи и насоки за заштита на хумани субјекти при истражување, и Универзалната декларација за биоетика и човекови права на УНЕСКО. Се придржувавме до критериумите на Добра клиничка практика, Законот за здравствена заштита на Република Македонија и Законот за правата на пациентите во Република Македонија.

3.1. Институција (локација) на студијата

Студијата опфати вкупно 180 пациенти со белодробна туберкулоза, лекувани болнички и/или амбулантски во Институтот за белодробни заболувања и туберкулоза – Скопје.

3.2. Дизајн на студијата

3.2.1. Студијата беше составена од два дела: прв – ретроспективен, и втор – проспективен. Имено, вклучувањето испитаници беше почнато на 1.1.2016 година, а студијата заврши на 31.12.2017 година.

3.2.2. Во периодот опфатен со студијата беа систематски вклучени сите испитаници со белодробна туберкулоза кај кои е изведен Xpert MTB/RIF тестот, а кои ги исполнуваа инклузивните критериуми. Начинот на селекција произлегува од фактот што иако последната препорака на Светската здравствена организација од 2014 година дава слобода, односно можност за употреба на тестот како иницијална дијагностичка алатка практично кај сите возрасни лица кај кои постои сомневање за туберкулоза [171], сепак одлуката за негово назначување е оставена на клиничката проценка на лекарот што го лекува пациентот.

3.2.3. Критериуми за влез во студијата.

3.2.3.1. Инклузивни критериуми:

- белодробна туберкулоза, дијагностицирана со класични микробиолошки методи и/или со молекуларен тест
- возраст ≥ 16 години
- способност за давање на информирана согласност
- комплетна микробиолошка анализа (класична и со молекуларен тест) во ист респираторен примерок
- извршено ХИВ-советување

3.2.3.2. Ексклузивни критериуми:

- микробиолошка анализа (класична и со молекуларен тест) во различни респираторни примероци

3.3. Кај испитаниците во студијата беше спроведен стандарден протокол за дијагноза и следење на пациенти со туберкулоза кој се користи во Институтот за белодробни заболувања и туберкулоза – Скопје, кој ги почитува препораките на Светската здравствена организација и вклучува: анамнестички податоци со епидемиолошка анкета (контакт со болни од инфективна форма на ТБ, претходно лекување од ТБ, семејна анамнеза за ТБ и патување во земји со висок ризик за ТБ); физикален преглед; лабораториски анализи во крв (седиментација на еритроцити, крвна слика, гликемија, проценка на хепатална и ренална функција) и урина (биохемиски, седимент); рендгенграфија на граден кош (нативна и/или компјутеризирана томографија) и микробиолошко испитување на спутум и други клинички примероци (класични и молекуларни методи) [55, 68, 69, 134, 197]. Сомневање за белодробна туберкулоза беше поставено според клиничките параметри и радиолошките наоди, додека болеста беше потврдена со микробиолошко испитување на респираторен примерок (со класични микробиолошки методи и/или со молекуларен тест). Сите испитаници во студијата беа лекувани со стандарден тераписки режим за туберкулоза со четири или пет антитуберкулотски лекови од прва линија (т.н. прво или повторно лекување, соодветно) [68, 69, 134, 197]. Според медицинска индикација и клиничка проценка, во лекувањето беа употребени и антитуберкулотски лекови од втора линија, односно индивидуален тераписки режим адаптиран на потребите на пациентот. Периодот на следење на испитаниците во текот на студијата изнесуваше минимум 6 месеци, т.е. до завршување на стандардниот тераписки режим за туберкулоза. Кај испитаниците со индивидуален тераписки режим и/или резистентна форма на туберкулоза со лекување подолго од 6 месеци, следењето траеше подолго (24 месеци кај пациенти со мултирезистентна форма на туберкулоза) и беше завршено во ноември 2018 година.

3.4. Клинички примероци за микробиолошка анализа

Во студијата, како клинички примерок беше користен респираторен примерок (спутум и/или бронхоаспират). Собирањето спутум се вршеше рано наутро, во стерилен пластичен контејнер [270, 271], а на другите примероци според стандарден протокол за интервенција со која е земен примерокот. Испитаниците беа информирани дека е потребно да остават два примерока на спутум за анализа: прв (ран) утрински примерок и уште еден примерок половина до еден час после првиот (за комплетна микробиолошка анализа со класични методи). Клиничките примероци беа собирани пред почетокот на анти tubеркулотската терапија. Целокупната обработка на примероците се изведуваше во Националната референтна лабораторија за туберкулоза, во рамките на Институтот за белодробни заболувања и туберкулоза - Скопје. Во респираторниот примерок што е предмет на оваа докторска дисертација (прв ран утрински примерок на спутум или бронхоаспират) беа изведени класични дијагностички методи (микроскопско испитување и културелно испитување) и молекуларен тест (Xpert MTB/RIF).

3.5. Протокол за обработка на примероците

Респираторните примероци беа изложени на дигестија и деконтаминација со конвенционален N-acetyl-L-cysteine–NaOH метод по Kubica (крајна NaOH концентрација, 1%) [272]. По деконтаминацијата, концентрираниот седимент беше ресуспендиран во 1,0 до 1,5 ml стерилен фосфатен пуфер (pH 7,0).

3.5.1. Класични методи

3.5.1.1. Флуоресцентна микроскопија. Од седиментот беа приготвени директни препарати, обоени според Auramine-O Fluorochrome Acid-fast Staining Procedure [273] и микроскопирани со флуоресцентна микроскопија. Интерпретацијата и семиквантитативната градација на позитивните резултати се опишани во соодветна литература [274].

3.5.1.2. За култивација и детекција на растот на микобактерии седиментот од сите примероци беше инокулиран во цврста подлога (Löwenstein-Jensen, LJ) [119]. Интерпретацијата и семиквантитативната градација на позитивните резултати се опишани во соодветна литература [275]. Инокулацијата на течна подлога (ВАСТЕС MGIT 960 метод; Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD) беше спроведена како комплементарна метода, во зависност од техничките околности (достапност на подлогата) и според препораките на производителот [276]. По порастот на културите, беше извршена идентификација на пораснатите колонии за *Mycobacterium tuberculosis*

complex и изолираниите соеви се тестираа за чувствителност на антитуберкулотски лекови од прва линија.

3.5.1.3. Идентификација на соевите на *Mycobacterium tuberculosis* complex во култура. За идентификација и диференцијација на соевите на МТВС во пораснатите култури беа употребени генски проби (GEN-PROBE®AMPLIFIED™ *Mycobacterium Tuberculosis* Direct (MTD) според препораката на производителот [277].

3.5.1.4. Испитување на чувствителност кон рифампицин и другите антитуберкулотски лекови од прва линија со класичен метод. Чувствителноста на изолираните соеви на МТВС на рифампицин се испитуваше на цврста хранителна подлога (индиректен пропорционален метод на подлога по Löwenstein-Jensen) [147]. Тестовите се изведуваа со стандардна критична концентрација на рифампицин (40 µg/ml). Истовремено се испитуваше и чувствителноста на изониазид, етамбутол и стрептомицин, со истиот метод и соодветни стандардни критични концентрации за секој од антитуберкулотските лекови.

3.5.2. Молекуларни тестови

3.5.2.1. Xpert MTB/RIF тест. Од молекуларните методи, во студијата беше евалуиран Xpert® MTB/RIF есејот (Cepheid Inc, Sunnyvale, CA, USA), според препораките на производителот [278]. GeneXpert-системот и Xpert MTB/RIF-тестот се потполно автоматизирана платформа за DNA-тестирање, која може истовремено и точно да го детектира присуството на МТВС-DNA, како и мутациите во кодоните 426-452 во регионот од генот *rpoB* кој ја определува резистенцијата кон рифампицин (rifampicine-resistance-determining-region, RRDR), и тоа за помалку од два часа [179]. Се применува директно на клинички примероци [249]. Поради високата специфичност, се препорачува за употреба и кај примероци со негативен наод на директен препарат, и кај вонбелодробни примероци [171, 279].

Во оваа студија за изведување на Xpert тестот беше употребен истиот респираторен примерок од кој е приготвен седиментот за конвенционално микроскопско и културелно испитување.

Принцип. Xpert MTB/RIF есејот е автоматизиран *in vitro* дијагностички тест базиран врз вгнездена полимеразно-верижна реакција во реално време (nested real-time PCR) и е наменет за семиквантитативна детекција на *Mycobacterium tuberculosis* complex и квалитативна детекција на резистенцијата кон рифампицин. Користи технологија на молекуларни проби наречени molecular-beacons [280], со кои во текот на PCR-реакцијата се таргетираат секвенците од див тип (WT, wild-type) во регионот RRDR на генот *rpoB*.

Во тестот се вклучени три специфични прајмерски парови и пет уникатни молекуларни проби, со цел да се обезбеди висок степен на специфичност. Прајмерите кај овој тест се користат за амплификација на секвенца од *rpoB* генот во која е содржан основниот регион (core region) со должина од 81-bp. Пробите кои се користат во тестот се дизајнирани за да направат диференцијација меѓу конзервираната секвенца од дивниот тип (WT, wild-type) наспроти мутациите во основниот регион (core region) кои се асоцирани со резистенција на рифампицин. Оттаму, кај овој тест, не се користат проби за таргетирање на специфични мутации.

Апаратура и потрошен материјал. Тестот се изведува со дијагностичката апаратура Cepheid GeneXpert® Instrument System која ги автоматизира и интегрира процесирањето на примерокот, амплификацијата на нуклеинските киселини и детекцијата на целната секвенца, со употреба на реверзна транскрипција и полимеразно-верижна реакција во реално време (RT-PCR), во еден чекор и без дополнителни манипулации. Системот се состои од инструментот GeneXpert (кој ги контролира реагенсите во кертрицот и ја изведува real-time PCR анализата), персонален компјутер и софтвер за изведување на тестот и визуализација на резултатите. Во системот се употребуваат пластични диспозабилни (за една употреба) Xpert кертрици MTB/RIF, кои ги содржат PCR и RT-PCR реагенсите и во кои се одвиваат амплификацијата и RT-PCR. Кертриците се автономни (самостојни), со што се минимизира можноста за вкрстена контаминација меѓу примероците.

Во Xpert MTB/RIF есејот се вклучени реагенси за детекција на MTBC и резистенција кон рифампицин во суров примерок на спутум и во концентриран седимент од спутум. Во кертрицот се вклучени и две контроли: контрола на процесирањето на примерокот (Sample Processing Control = SPC) и контрола на пробите (Probe Check Control = PCC). Првата е наменета за проверка на адекватното процесирање на целните бактерии и мониторинг на присуството на инхибитори на PCR-реакцијата. Втората контрола ги верифицира рехидратацијата на реагенсите, исполнетоста на PCR-тубата во кертрицот, интегритетот на пробата и стабилноста на бојата.

Процедура. Протоколот се состои од мануелен и автоматизиран дел. Мануелниот дел вклучува: 1. додавање на Xpert MTB/RIF-реагенс во испитуваниот примерок во определен сооднос, за третирање на примерокот, 2. протресување на мешавината, 3. инкубација на мешавината на собна температура, 4. повторно мешање, 5. пипетирање на одреден волумен од вака обработениот примерок во кертрицот, 6. внесување на затворениот кертриц во GeneXpert инструментот. Автоматизираниот дел следува по

мануелниот: со помош на специјалниот софтвер кој е дел од опремата, се селектира автоматизиран протокол за детекција на *Mycobacterium tuberculosis*, по што сите последователни фази се одвиваат автоматски. Сите нагодувања во тестот се предмет на автоматска калкулација според Xpert MTB/RIF-протоколот и не може да бидат модифицирани од страна на оној што ја извршува процедурата [Слика 22].

Интерпретација на резултатите. Xpert MTB/RIF есејот врши симултана детекција на МТВС и на присуството на резистенција кон рифампицин по пат на амплификација на МТВС-специфична секвенца во *rpoB* генот, која потоа се тестира со пет соодветни молекуларни проби (molecular beacons; А-Е) за мутации во регионот RRDR на генот *rpoB*. Секоја од пробите е означена со различна флуорохромна молекула. Системот GeneXpert врши автоматска интерпретација на измерените флуоресцентни сигнали врз основа на вградените алгоритми за пресметување. Резултатите се добиваат за помалку од 2 часа.

Циклусот на прагот (cycle threshold, Ct) се дефинира како број на PCR-циклуси после кој секоја од петте проби се смета за позитивна, и овозможува семиквантитативна анализа на примерокот. Пониските Ct-вредности одразуваат повисока почетна концентрација на DNA во примерокот, и обратно - повисоките Ct-вредности одразуваат пониска почетна концентрација на DNA во примерокот. За анализа на Xpert MTB/RIF податоците, максималниот валиден праг на сајклерот (cycle threshold, Ct) е подесен на 39,0 за пробите А, В и С, односно на 36,0 за пробите D и E. Во зависност од Ct, односно ΔCt max и ΔCt min вредностите на пробите, во резултатот од тестот се детектира присуството или отсуство на на *M. tuberculosis*, а при позитивниот резултат и квалитативното присуство на резистенција кон рифампицин.

Ако е детектирана целната DNA од МТВ, тогаш тестот е позитивен за МТВ и резултатот се отчитува како „МТВ е детектиран“. Во овој случај Xpert MTB/RIF дава семиквантитативен резултат дефиниран според производителот на следниот начин: позитивен-многу ниско (cycle threshold (C_t) >28), позитивен-ниско (C_t 22–28), позитивен-средно (C_t 16–22) или позитивен-високо (C_t <16). Кај позитивниот тест, резултатите за резистенција кон рифампицин може да бидат:

- резистенција кон рифампицин ДЕКТИРАНА: присутна е мутација во *rpoB* генот која е во опсегот на валидни ΔCt вредности
- резистенција кон рифампицин НЕ Е ДЕТЕКТИРАНА: не е детектирана мутација во *rpoB* генот
- резистенција кон рифампицин НЕОПРЕДЕЛЕНА: поради многу ниска

концентрација на МТВ не може да се детектира резистенција кон рифампицин.

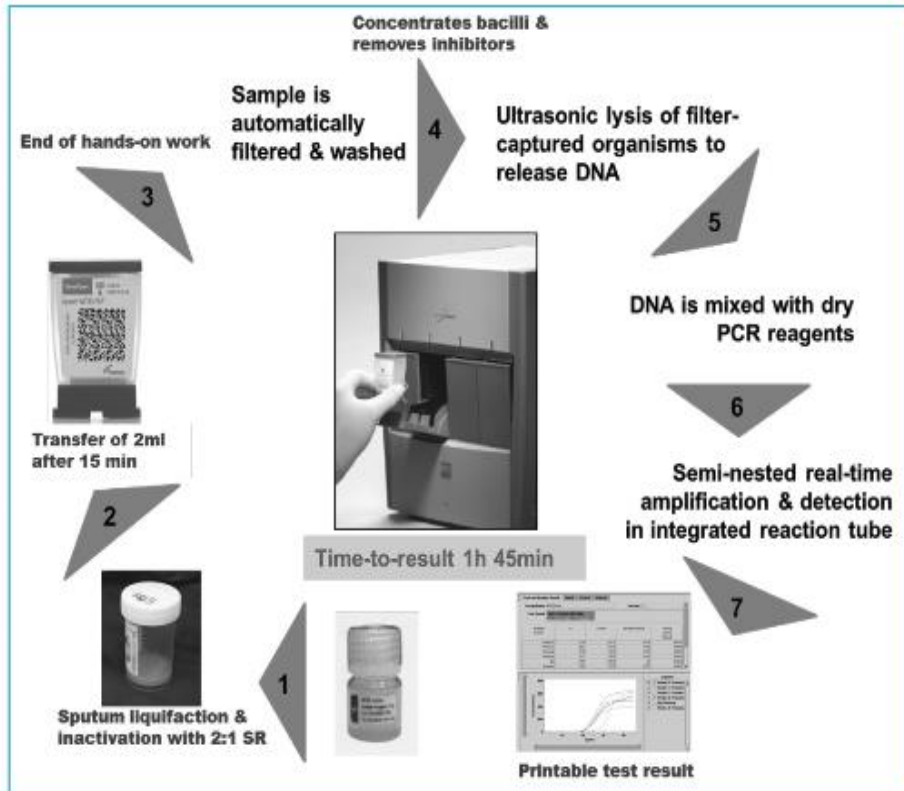
Ако не е детектирана целната DNA од МТВ, а SPC ги исполнува потребните критериуми и сите PCC се уредни („pass“), тогаш тестот е негативен и резултатот се отчитува како „МТВ не е детектиран“.

При добивање на резултат означен како „НЕВАЛИДЕН“ или „ГРЕШКА“, потребно е тестот да се повтори. Невалидниот резултат индицира неуспешна SPC (неисполнување на критериумите, несоодветно процесирање на примерокот или инхибиција на PCR), додека грешката во резултатот индицира неуспешна PCC и прекин на процесот на тестирање.

3.5.2.1. Line probe assays (LPA, молекуларни тестови со линеарни проби). LPA се DNA-стрип тестови базирани на мултиплекс PCR-амплификација на специфични региони во геномот на МТВС со користење на биотинилирани прајмери, по што следува реверзна хибридизација на PCR-продуктите (ампликоните) со олигонуклеотидни проби фиксирани на нитроцелулозни ленти (strips). Хибридизацијата потоа се детектира со колориметриска реакција. Резистенцијата се детектира како отсуство на врзување на пробите специфични за дивиот тип (WT, wild type), како и со врзување со пробите што таргетираат специфични мутации [Табела 6].

Од молекуларните тестови со линеарни проби (LPA, од Line probe assay), по индикација (т.е. претходна детекција на резистенција кон рифампицин со класични методи или со Xpert MTB/RIF), беа користени Genotype MTBDRplus™, version 2.0 и Genotype MTBDRsl™ (Nehren, Germany, Hain Lifescience, GmbH) според препораките на производителот [281, 282].

Во молекуларните тестови со кои е вршено истражувањето во оваа докторска теза е користен *E.coli* нумеричкиот систем на мутации во регионот RRDR на генот *groB*. Оттука, во натамошниот текст, особено во презентирањето на резултатите и во делот за дискусија, за означување на *groB* мутациите ќе биде користен овој систем.



Слика 22. Чекори при изведување на Xpert MTB/RIF тестот (според референца бр. 174)

СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА

Демографските, клиничките и лабораториските податоци, како и молекуларните параметри од пациентите, се анализирани со примена на стандардните дескриптивни, аналитички биваријантни и мултиваријантни статистички методи.

Нормалната дистрибуција на нумеричките вредности беше пресметана со Shapiro-Wilk тестот. Споредбата на разликите во континуираните вредности меѓу две серии податоци од пациентите беше определувана со Student-овиот t -тест кај параметриските вредности со нормална дистрибуција, односно со Mann-Whitney U-тестот при постоење на отстапувања од нормалната дистрибуција на вредностите на соодветниот параметар. При споредба на повеќе од две серии континуирани вредности користени се Wilcoxon-овиот тест при нормалната дистрибуција, односно Kruskal-Wallis-овиот тест при постоење на отстапувања од истата.

Статистичката значајност на разликите меѓу повеќекратни параметриски податоци е евалуирана со анализата на варијансата (ANOVA - *Analysis of variance*), а за присуството на кофактор меѓу мултипните варијабли е користена анализата на коваријансата (ANCOVA - *Analysis of covariance*).

Фреквенциите на бинарните (дихотомични) податоци се анализирани со Fisher-овиот егзактен тест, при што е определен и релативниот однос на шанси - *odds ratio*. Пресметките на интервалот на доверливост *CI (confidence interval)* се вршени при 95%, односно при $p < 0,05$. Споредбата на разликите на бинарните (дихотомични) податоци меѓу подгрупите пациенти е пресметана со логистичката анализа при што статистичката сигнификантност е определувана со Wald-овиот тест. При оваа анализа, конструирана е и ROC-кривата (*receiver operating characteristic*) и пресметана е површината под истата (*area under curve*) како податок што го покажува односот на сензитивноста кон специфичноста на тестот.

Пресметани и споредени се сензитивноста, специфичноста, позитивната (PPV) и негативната предиктивна вредност (NPV), стапките на точна класификација, на лажно позитивни и негативни резултати и други параметри меѓу поединечните тестови, како и групите сродни тестови: класични микробиолошки и молекуларниот Xpert-тест.

Споредбата на временскиот интервал од засевањето на примерокот од пациентот, до добивањето позитивен резултат од микробиолошката анализа (TTP - *time to positivity*) со квантитативните вредности од молекуларниот Xpert-тест и други слични споредби се вршени со Kaplan-Meier-овата анализа.

За статистички сигнификантни се сметаа вредностите на $p < 0,05$, додека за високо сигнификантни тие што се помали од 0,01.

Резултатите од статистичките анализи се прикажани табеларно, како и со соодветни графикони. За статистичките пресметки беше користен софтверскиот додаток XLSTAT 2016 инсталиран на Microsoft Excel.

Етички аспекти

За изведување на студијата претходно се обезбедени согласност од Етичката комисија при Медицинскиот факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје, писмена согласност од Институтот за белодробни заболувања и туберкулоза - Скопје каде што се одвиваше студијата и потпишана информирана согласност од испитаниците вклучени во студијата.

4. РЕЗУЛТАТИ

Во оваа студија, анализирани се клиничките и микробиолошките податоци од 180 пациенти со белодробна туберкулоза. Пет пациенти се лекувани два пати поради белодробна туберкулоза во временскиот период опфатен со студијата, поради што за нив се анализирани по два респираторни примероци. Според тоа, анализирани се 185 респираторни примероци.

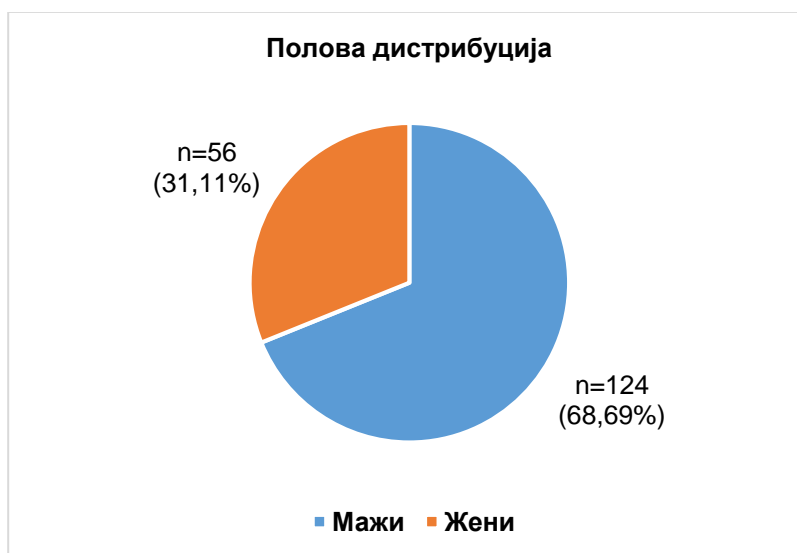
4.1. Приказ на демографските податоци на пациентите

4.1.1. Полова структура

Испитуваната група пациенти со белодробна туберкулоза се состоеше од 180 пациенти, од кои 124 од машки и 56 од женски пол (Табела 15 и Графикон 10).

Табела 15. Полова застапеност

Пол	N	%
Мажи	124	68,89
Жени	56	31,11
Вкупно пациенти	180	100,00



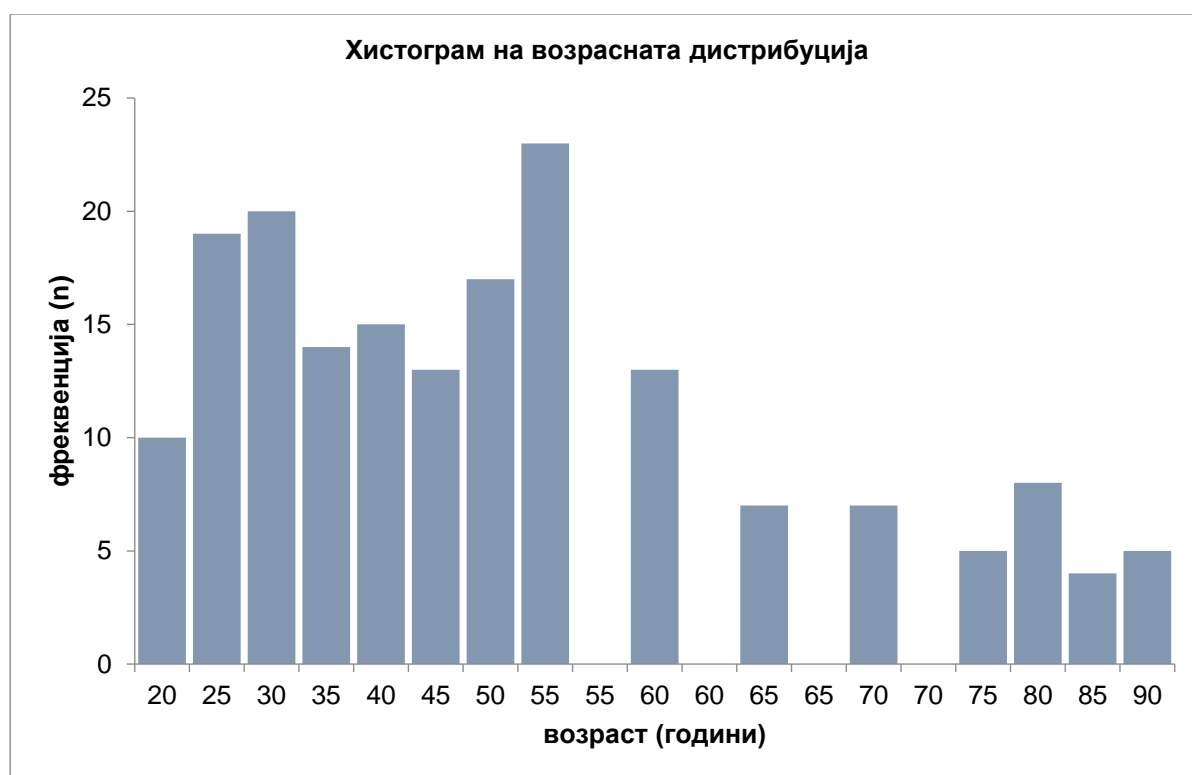
Графикон 10. Полова застапеност кај пациентите

4.1.2. Возрасна структура

Просекот и опсегот на возраста, како и дистрибуцијата на возрасните фреквенции кај пациентите со белодробна туберкулоза се прикажани во **Табела 16** и **Графикон 11**.

Табела 16. Возрасна структура

Возраст	Години
Просечна	45,69
Стандардна девијација	18,48
Минимална	16
Максимална	89



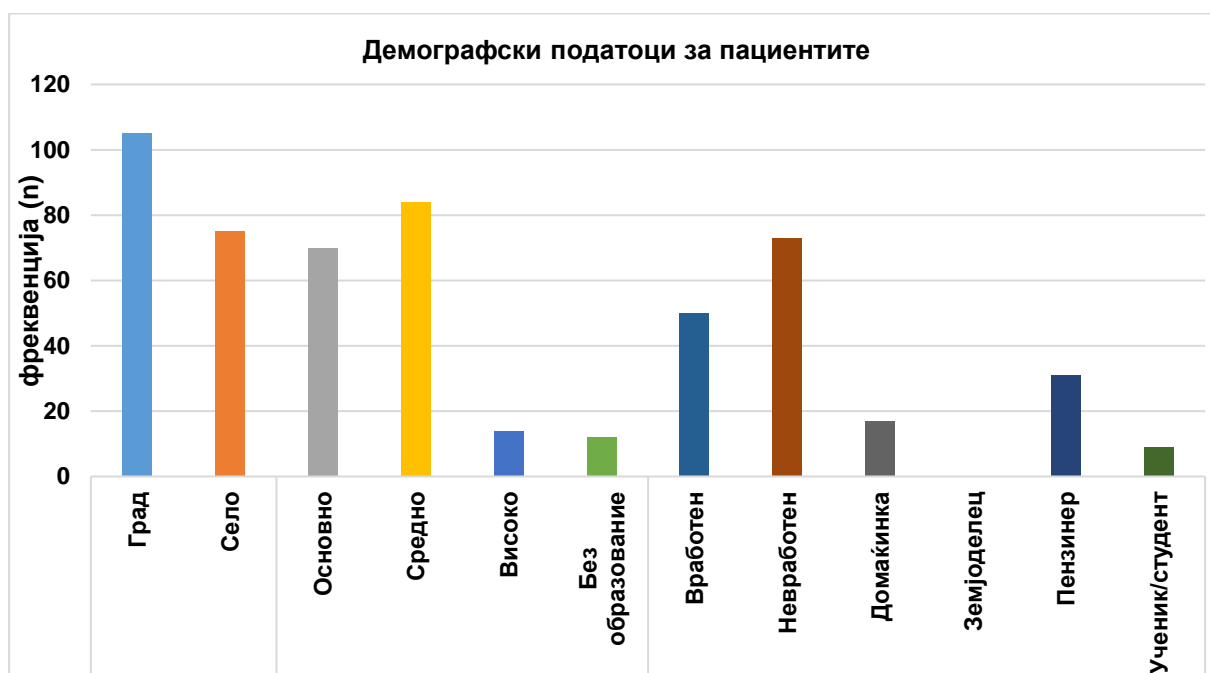
Графикон 11. Хистограм на возрасната структура на пациентите

Според прикажаните податоци, евидентно е дека во испитуваната група доминира помладата популација, со двофазна возрасна дистрибуција (пик на возраст од 20-30 години, и 45-55 години).

4.1.3. Структурата на пациентите според местото на живеење, образование и занимање е прикажана во Табела 17 и Графикон 12.

Табела 17. Демографски податоци за пациентите

	n	%
Место на живеење		
Град	105	58,33
Село	75	41,67
Вкупно пациенти	180	100,00
Образование		
Основно	70	38,89
Средно	84	46,66
Високо	14	7,78
Без образование	12	6,67
Вкупно пациенти	180	100,00
Занимање		
Вработен	50	27,78
Невработен	73	40,56
Домаќинка	17	9,44
Земјоделец	0	0,00
Пензионер	31	17,22
Ученик/студент	9	5,00
Вкупно пациенти	180	100,00



Графикон 12. Хистограм на структура на пациентите според местото на живеење, образование и занимање

Според прикажаните податоци, евидентно е дека во испитуваната група доминира урбаната популација, со средно образование и без вработување.

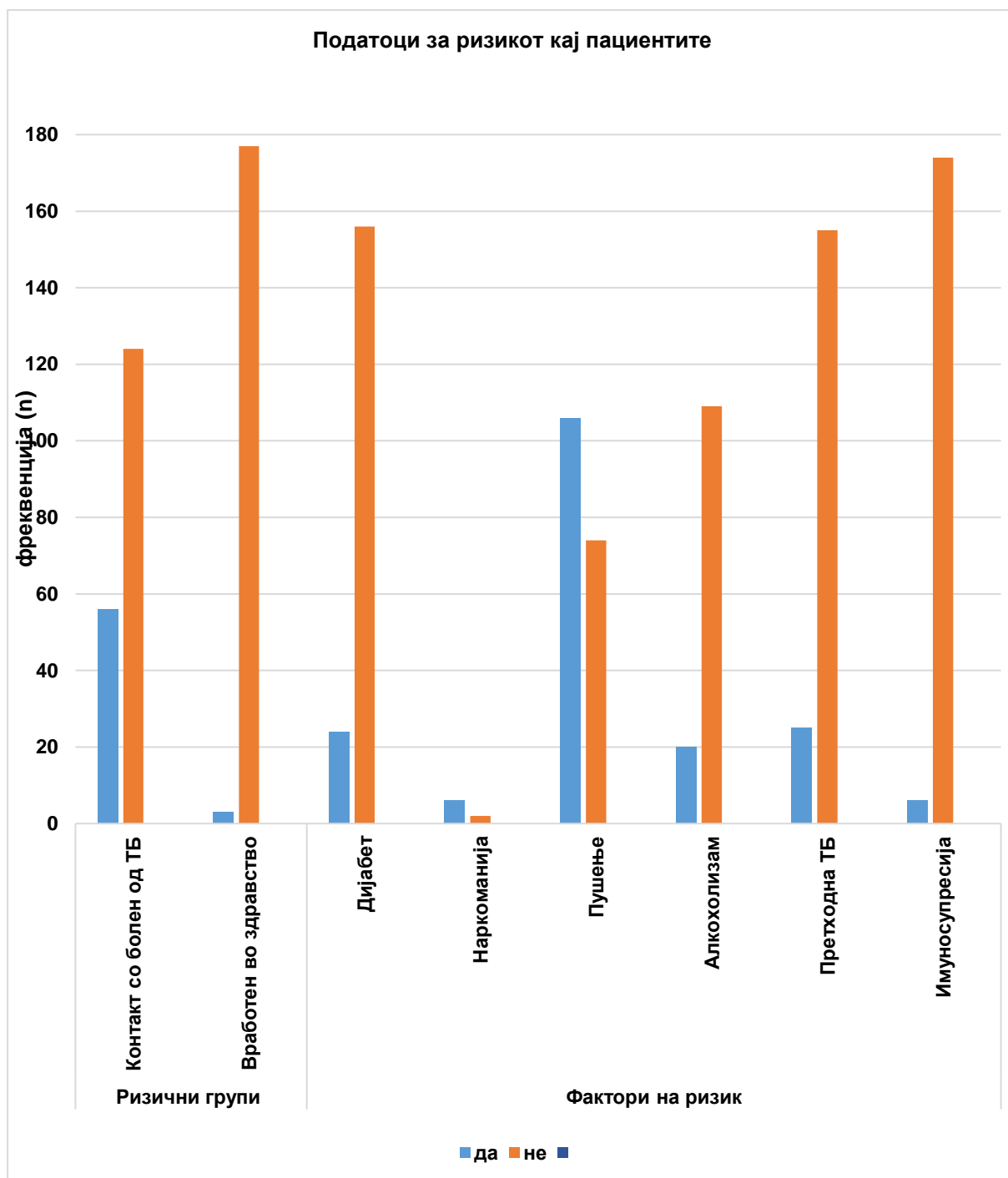
4.2. Клинички карактеристики на болеста

4.2.1. Во Табела 18 и Графикон 13 се прикажани структурата на пациентите според припадност на ризична група и присуство на ризик-фактори за туберкулоза.

Табела 18. Структура на пациентите според ризична група и ризик-фактори за туберкулоза

Присуство на ризик	Да		не		Вкупно	
	n	%	n	%	n	%
Ризични групи						
Контакт со болен од ТБ:			124	68,89	180	100,00
- < 2 години	25	13,89				
- > 2 години	31	17,22				
- вкупно	56	31,11				
Вработен во здравство	3	1,67	177	98,33	180	100,00
Фактори на ризик						
Дијабетес	24	13,33	156	86,67	180	100,00
Наркоманија	6	3,33	174	96,67	180	100,00
Пушење	106	58,89	74	41,11	180	100,00
Алкохолизам	20	11,11	160	88,89	180	100,00
Претходно лекување/ дијагноза за ТБ	27	15,00	153	85,00	180	100,00
Имуносупресија	6	3,33	174	96,67	180	100,00

Графикон 13. Структура на пациентите според ризична група и ризик-фактори за туберкулоза

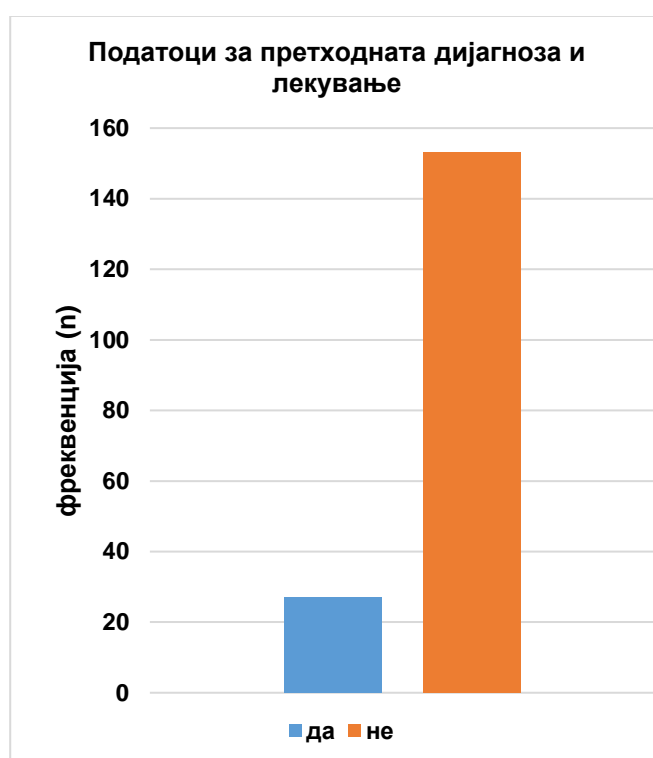


Од прикажаните податоци евидентна е висока застапеност од 31,11% на пациентите кои дале анамнестички податок за претходен близок контакт со болен од туберкулоза, како и доминацијата на пушачи во испитуваната група – со 58,89%.

4.2.2. Структурата на пациентите според историја на претходна дијагноза и лекување од туберкулоза е прикажана во Табела 19 и Графикон 14.

Табела 19. Структура на пациентите според претходна дијагноза и лекување од туберкулоза

Податоци за претходната дијагноза и лекување од ТБ	Претходна дијагноза и лекување	
	N	%
Да	27	15,00
Не	153	85,00
Вкупно пациенти	180	100,00



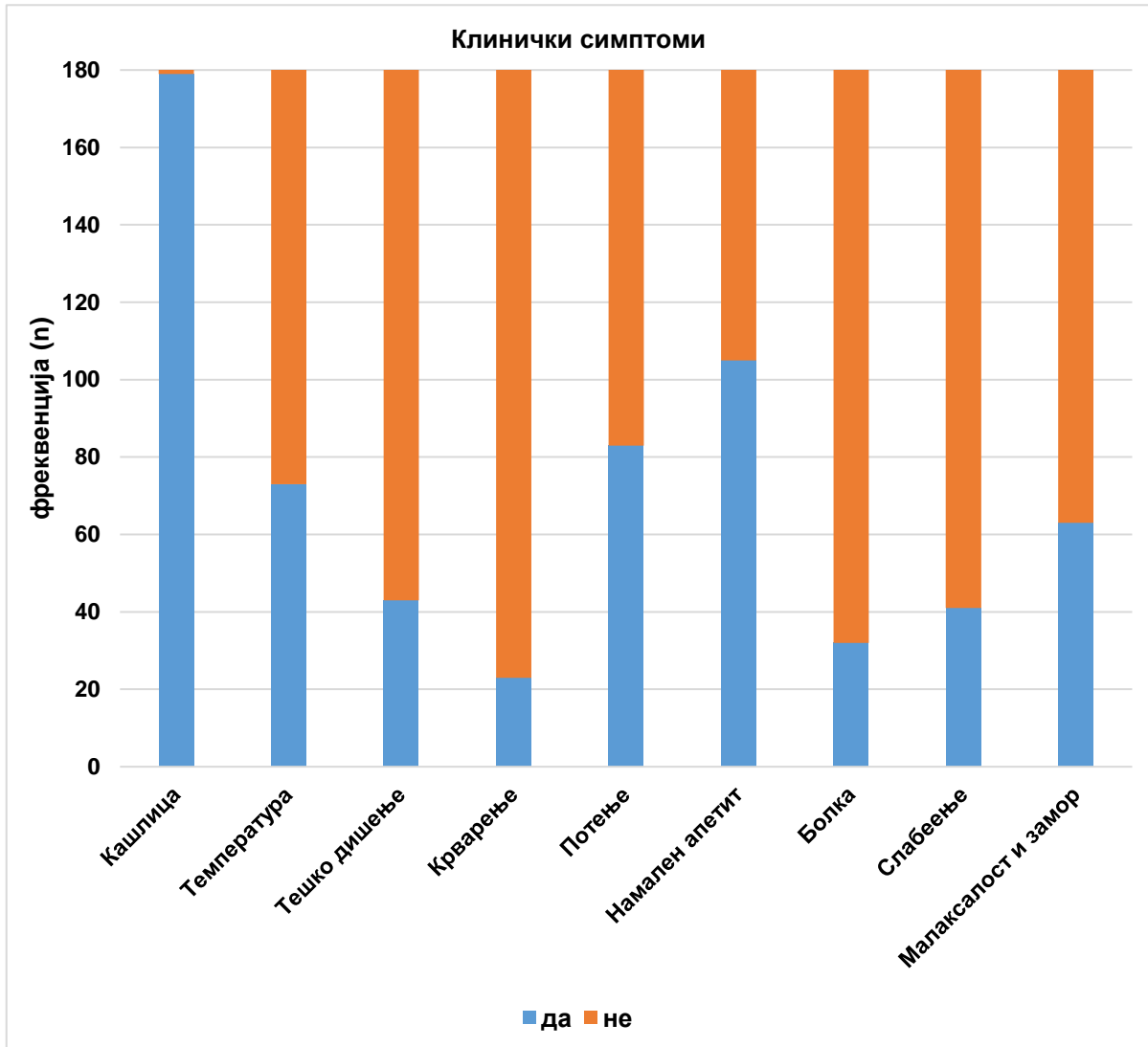
Графикон 14. Структура на пациентите според претходна дијагноза и лекување од туберкулоза

Од прикажаните податоци се гледа дека во испитуваната група 27 пациенти (15%) биле претходно лекувани од туберкулоза. Во оваа група пет пациенти биле лекувани претходно во 2016 година.

4.2.3. Структурата на пациентите според клиничката слика е прикажана во Табела 20 и Графикон 15.

Табела 20. Структура на пациентите според клиничките симптоми

Клинички симптоми	Да		Не		Вкупно пациент/лекување	
	n	%	N	%	n	%
Кашлица	179	96,76	6	3,24	185	100,00
Температура	73	39,46	112	60,54	185	100,00
Тешко дишење	43	23,24	142	76,76	185	100,00
Крвавење од дишни патишта	23	12,43	162	87,57	185	100,00
Потење	83	44,86	102	55,14	185	100,00
Намален апетит	105	56,76	80	43,34	185	100,00
Болка	32	17,30	153	82,70	185	100,00
Слабење	41	22,16	144	77,84	185	100,00
Малаксаност и замор	63	34,05	122	65,95	185	100,00



Графикон 15. Структура на пациентите според клинички симптоми

Од прикажаните податоци се гледа дека во клиничката симптоматологија на пациентите доминираат кашлицата и намалениот апетит.

4.2.4. Структурата на пациентите според времетраење на клиничките симптоми до почетокот на лекувањето е прикажана во **Табела 21** и **Графикон 16**.

Табела 21. Траење на клинички симптоми до почетокот на лекувањето

Траење на клинички симптоми до почетокот на лекувањето	n	%
0-2 недели	14	7,57
до 1 месец	49	26,49
до 2 месеца	46	24,86
>2 месеца	76	41,08
Вкупно пациент/лекување	185	100,00



Графикон 16. Траење на клинички симптоми до почетокот на лекувањето

Од прикажаните податоци се гледа дека доминира групата пациенти со најдолго времетраење на симптомите до отпочнување со терапија за туберкулоза (> 2 месеца, 41,08%).

4.2.5. Клиничките податоци за туберкулоза се прикажани во **Табела 22** (дијагноза) и **Табела 23** (лекување), и **графиконите 17 и 18**, соодветно.

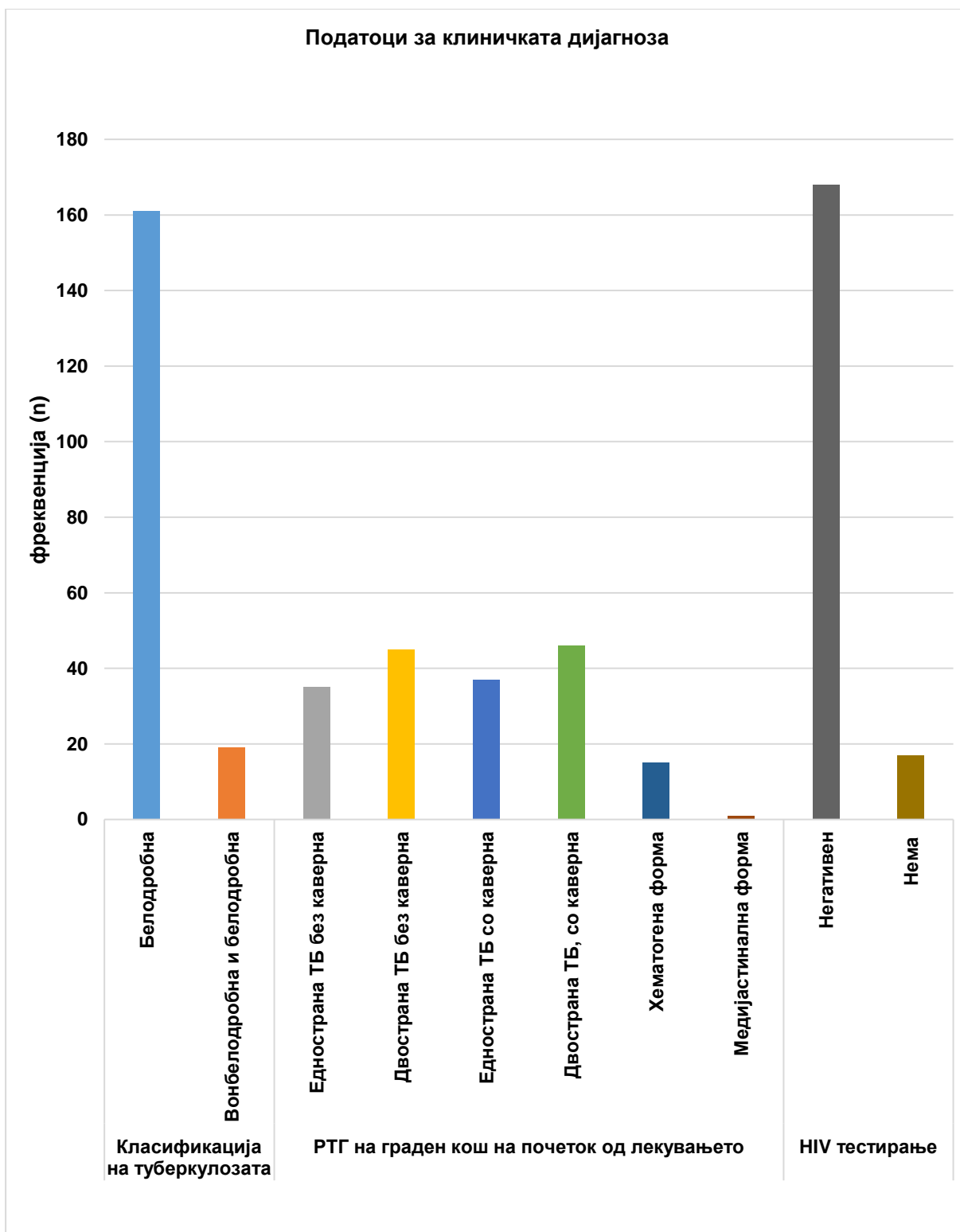
Табела 22. Клинички податоци за туберкулоза – дијагноза

Податоци за клиничката дијагноза	n	%
Класификација на туберкулозата		
Белодробна	166	89,73
Вонбелодробна и белодробна	19	10,27
Вкупно пациент/лекување	185	100,00
Рендгенграфија (РТГ) на градни органи на почеток од лекувањето		
Еднострана ТБ без каверна	35	18,92
Двострана ТБ без каверна	45	24,32
Еднострана ТБ со каверна	37	20,00
Двострана ТБ со каверна	46	24,86
Хематогена форма	15	8,11
Медијастинална форма	1	0,54
Нема РТГ	6	3,25
Вкупно пациент/лекување	185	100,00
ХИВ-тестирање		
Негативен	168	90,81
Нема	17	9,18
Вкупно пациент/лекување	185	100,00

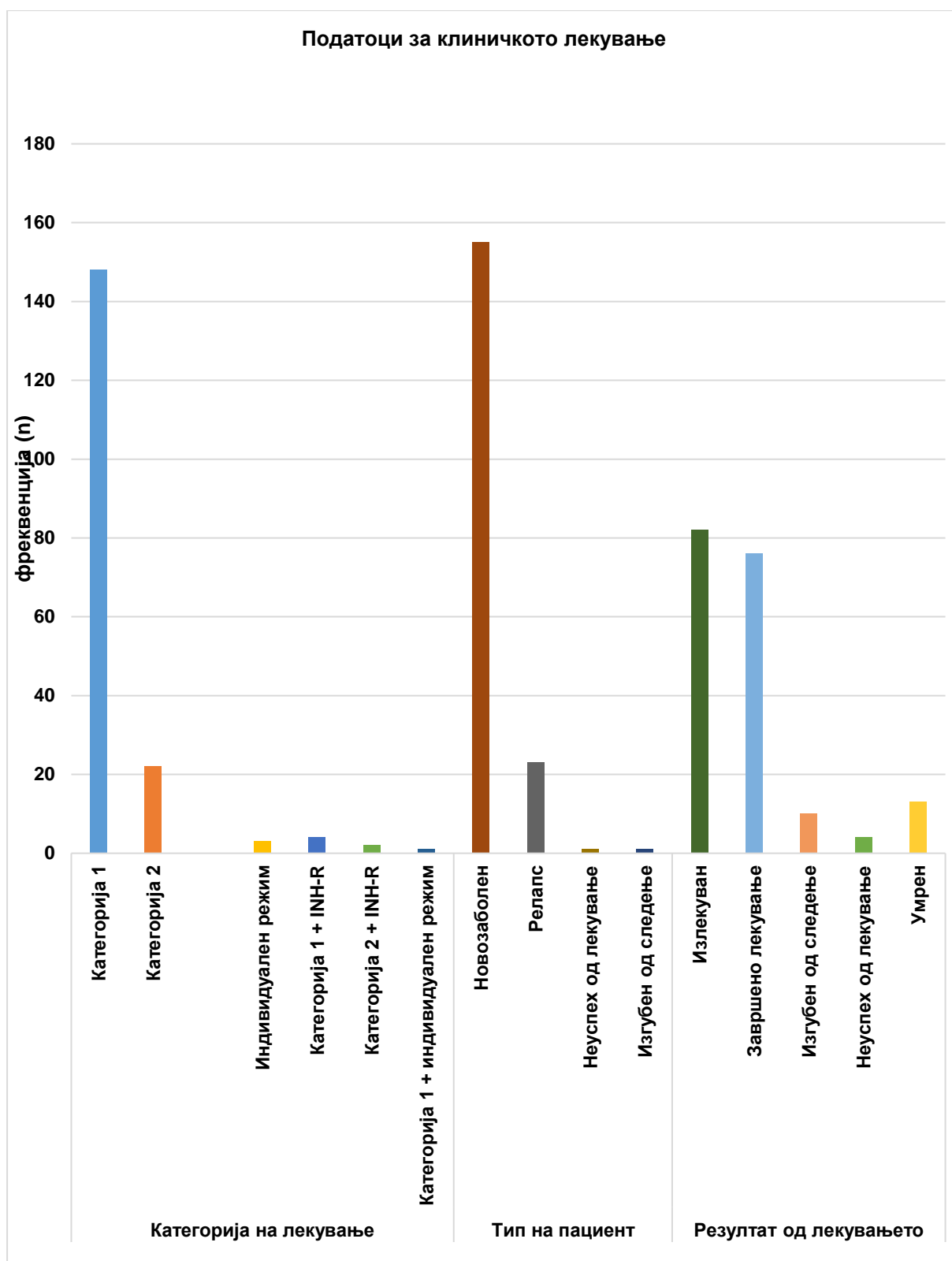
Табела 23. Клинички податоци за туберкулоза – лекување

Податоци за клиничкото лекување	n	%
Категорија на лекување		
Категорија 1	148	80,00
Категорија 2	25	13,52
Индивидуален режим	3	1,62
Категорија 1 + INH-R	4	2,16
Категорија 2 + INH-R	2	1,08
Категорија 1 + индивидуален режим	3	1,62
Вкупно пациент/лекување	185	100,00
Тип на пациент		
Новозаболен	156	84,32
Релапс	26	14,06
Неуспех од лекување	1	0,54
Изгубен од следење	2	1,08
Вкупно пациент/лекување	185	100,00
Исход од лекувањето *		
Излекуван	82	44,32
Завршено лекување	76	41,08
Изгубен од следење	10	5,41
Неуспех од лекување	4	2,16
Умрен	13	7,03
Вкупно пациент/лекување	185	100,00
Нус-појави и несакани ефекти од лековите		
Да	20	10,81
Не	165	89,19
Вкупно пациент/лекување	185	100,00
Коморбидитети		
Да	86	46,49
Не	99	53,51
Вкупно пациент/лекување	185	100,00

INH-R, тераписки режим за изониазид-резистенција;
 категорија 1, шестмесечен тераписки режим (2HRZE/4HR);
 категорија 2, осуммесечен тераписки режим (2HRZES/HRZE/5HRE);
 *исход од лекување (според референца бр. 55).



Графикон 17. Клинички податоци за туберкулоза – дијагноза



Графикон 18. Клинички податоци за туберкулоза – лекување

Од прикажаните податоци може да се види дека доминираат новозаболени пациенти со белодробна туберкулоза. Во однос на лекувањето, најголем процент (85,40%) успешно го завршиле предвидениот тераписки режим. Во испитуваниот примерок не се откриени пациенти со туберкулоза-ХИВ-коинфекција.

4.3. Микробиолошка дијагноза на белодробна туберкулоза

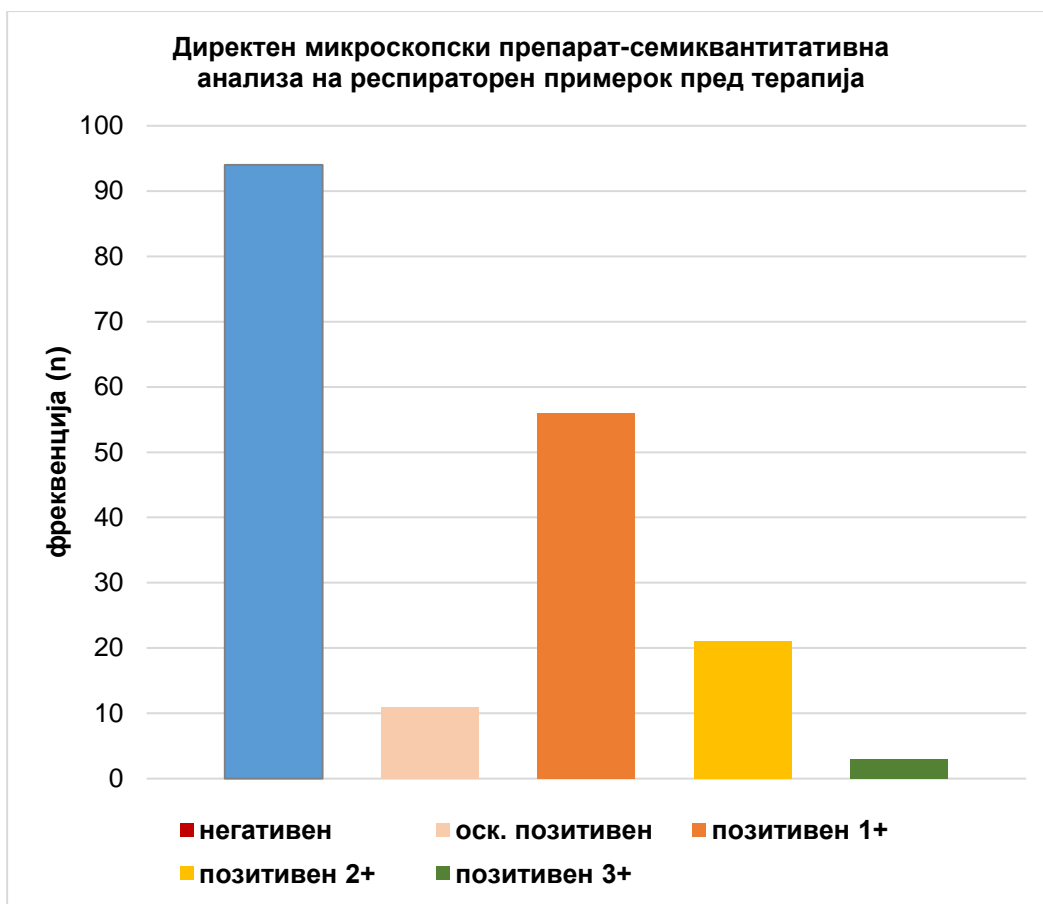
Во студијата се анализирани 185 респираторни примероци: 178 примероци на спутум и 7 примероци на бронхоаспират.

4.3.1. Класични микробиолошки методи за дијагноза на туберкулоза

4.3.1.1. Флуоресцентна микроскопија (директен микроскопски препарат). Резултатите од флуоресцентната микроскопија се прикажани во Табела 24 и Графикон 19. Кај 91 (49,19%) примерок е добиен АFB-позитивен наод на флуоресцентна микроскопија, со следнава градација на позитивитетот: 11 (5,95%) примероци оскудно позитивни, 56 (30,27%) примероци (1+) позитивни, 21 (11,35%) примерок (2+) позитивен и 3 (1,62%) примероци (3+) позитивни. Кај 94 (50,81%) од примероците е добиен ARB-негативен наод на флуоресцентна микроскопија.

Табела 24. Семиквантитативна микроскопска анализа на респираторен примерок пред терапија (според референца бр. 274)

Респираторен примерок пред третман		
Директен микроскопски препарат	n	%
негативен	94	50,81
оскудно позитивен	11	5,95
позитивен 1+	56	30,27
позитивен 2+	21	11,35
позитивен 3+	3	1,62
Вкупно примероци	185	100,00



Графикон 19. Семиквантитативна микроскопска анализа на респираторен примерок пред терапија

4.3.1.2. Културелно испитување. Кај сите испитувани примероци (185) е направена посевка на цврста подлога (Löwenstein-Jensen), а кај 144 примероци (77,84%) е направена и посевка на течна подлога (BACTEC MGIT 960). Кај 128 (69,19%) примероци е добиен позитивен наод во цврста, а кај 111 (60%) во течна култура. Во пет примероци на цврста и пет на течна култура, резултатот не беше интерпретабилен поради контаминација. Во сите позитивни култури е извршена идентификација на МТВС со хроматографски метод. Градацијата на степенот на позитивитет во култура на цврста подлога (Löwenstein-Jensen) е прикажана во **Табела 25** и **Графикон 20**. Резултатите од културелното испитување на цврста и течна подлога се прикажани во **Табела 26**.

Табела 25. Семиквантитативна културелна анализа на респираторен примерок пред терапија (Löwenstein-Jensen цврста подлога) (според референца бр. 275)

Респираторен примерок пред терапија		
Култура на подлога по Löwenstein-Jensen	N	%
негативен	52	28,11
позитивен +	16	8,65
позитивен 1+	44	23,78
позитивен 2+	38	20,55
позитивен 3+	26	14,05
позитивен 4+	4	2,16
контаминиран	5	2,70
Вкупно примероци	185	100,00



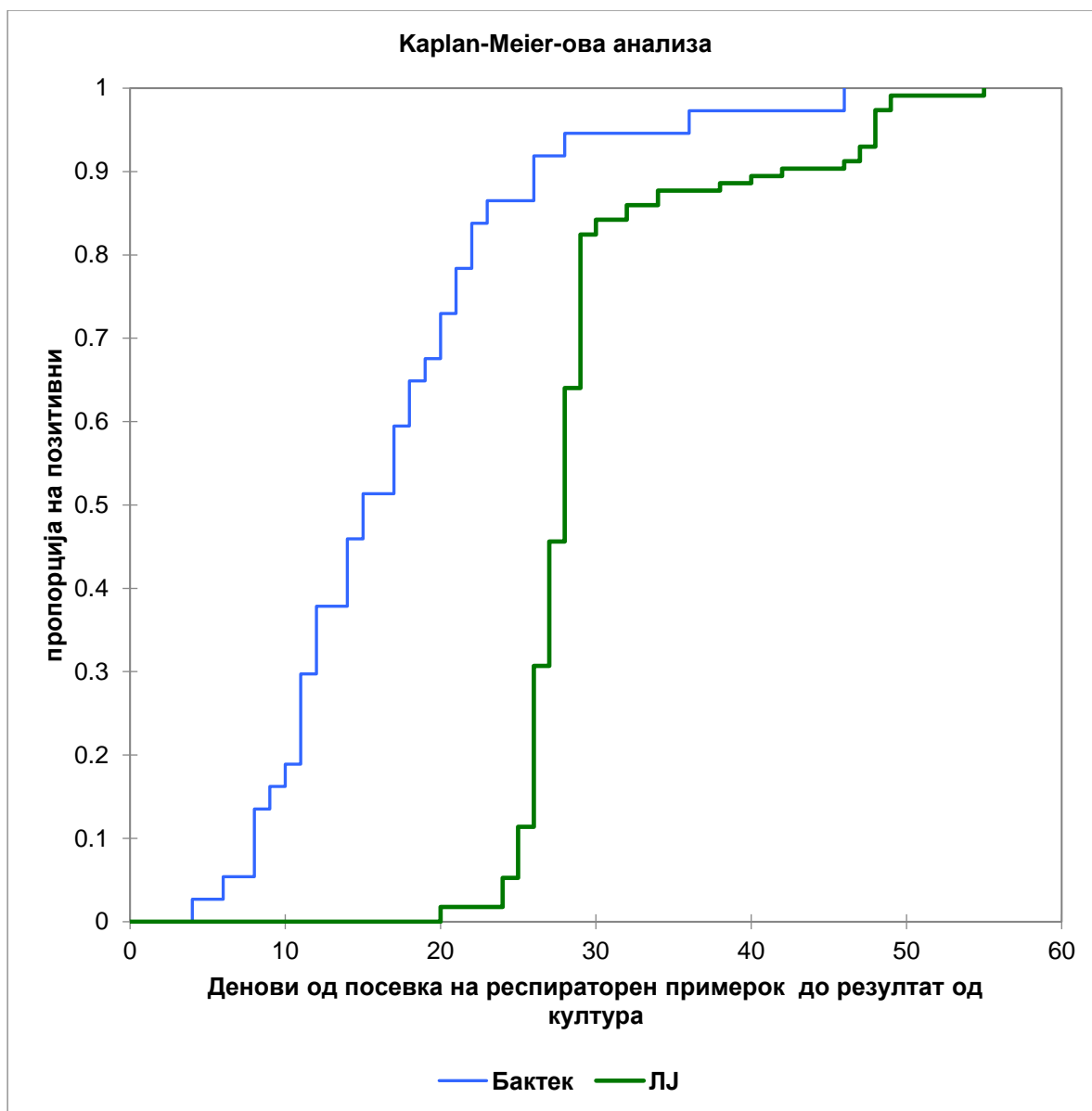
Графикон 20. Семиквантитативна културелна анализа на респираторен примерок пред терапија (Löwenstein-Jensen цврста подлога)

Табела 26. Културелно испитување на респираторен примерок пред терапија на цврста (Löwenstein-Jensen) и течна (BACTEC MGIT 960) подлога

	Цврста подлога (Löwenstein-Jensen) ¹				
Течна подлога (BACTEC MGIT 960)	Примероци ²	Позитивни	Негативни	Контаминирани	Вкупно
	Позитивни	87 (60,42%)	21 (14,58%)	3 (2,08%)	111 (77,08)
	Негативни	6 (4,17%)	22 (15,28%)	/	28 (19,45%)
	Контаминирани	3 (2,08%)	/	2 (1,39%)	5 (3,47%)
	Вкупно	96 (66,67%)	33 (29,86%)	5 (3,47%)	144 (100%)

¹41 примерок од 185 е културелно испитуван само на цврста подлога по Löwenstein-Jensen

²Процентот се однесува на групата примероци испитувани и на цврста и на течна подлога



Графикон 21. Споредба на „време до позитивитет“ меѓу течна (BACTEC MGIT 960) и цврста подлога (Löwenstein-Jensen)

На **Графикон 21** е прикажана споредбата на „време до позитивитет“ меѓу течната (BACTEC MGIT 960) и цврстата подлога (Löwenstein-Jensen). Од Kaplan-Meier-овата анализа може да се заклучи дека растот на микобактерии на течна подлога почнува порано (во првите 5 дена од посевката) - споредено со цврстата подлога (20-ти ден), и бележи постепен пораст на позитивитетот, со формирање на плато околу 25-тиот ден.

4.3.1.3. Класични фенотипски микробиолошки методи за детекција на резистенција

Резултатите од испитување на чувствителност кон антитуберкулотски лекови од прва линија (рифампицин, изониазид, етамбутол и стрептомицин) со индиректен пропорционален метод на подлога по Löwenstein-Jensen, како и времетраењето на овој тест, се прикажани во Табела 27, 28, 29 и 30, и Графикон 22, 23 и 24.

Табела 27. Тип на позитивна култура за анализа на чувствителност на антитуберкулотски лекови

Тип на позитивна култура од која е анализирана резистенцијата	n	%
Цврста подлога (Löwenstein–Jensen)	114	61,62
Течна подлога (ВАСТЕС MGIT 960)	38	20,54
Нема позитивна култура од респираторниот примерок пред терапија	33	17,84
Вкупно примероци	185	100,00

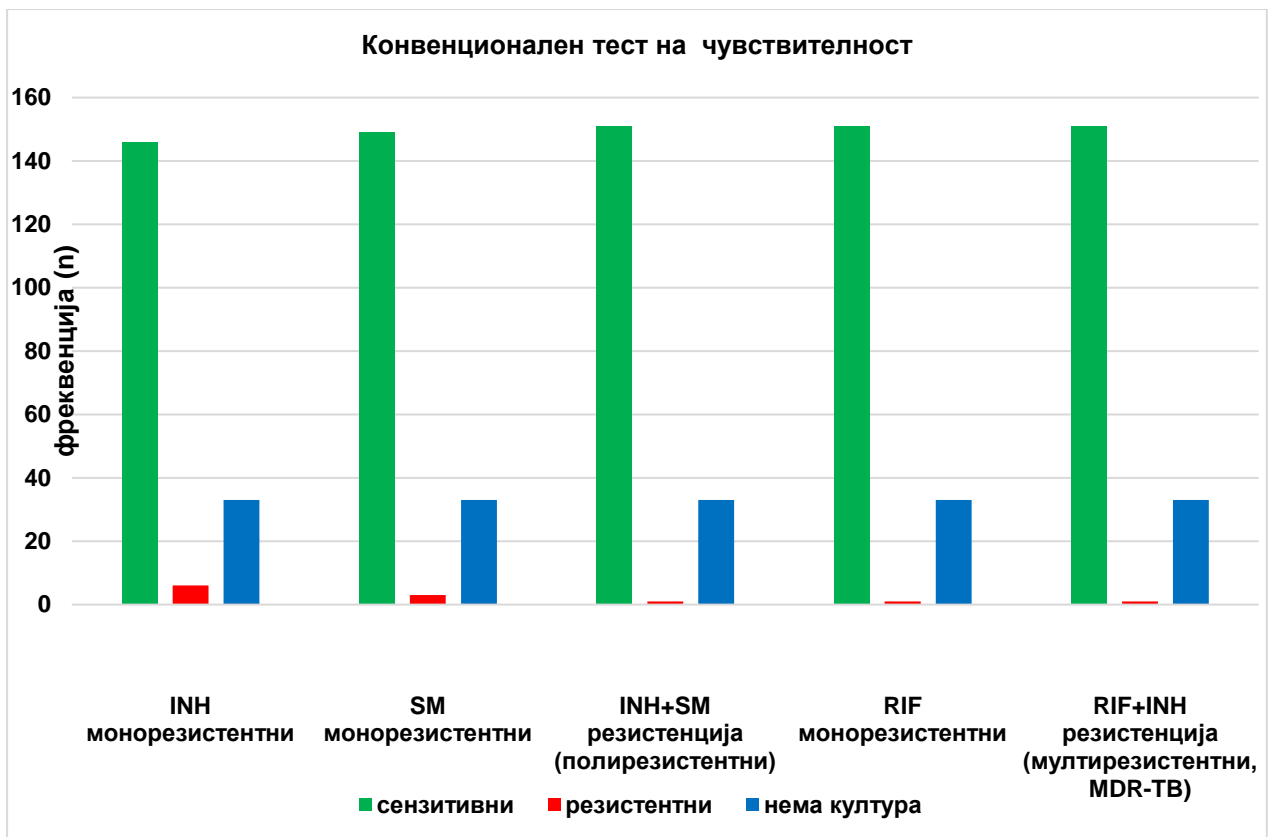
Табела 28. Структура на изолати според резистенцијата со конвенционален тест на чувствителност на антитуберкулотици од прва линија

Конвенционален тест на чувствителност	сензитивни		резистентни		нема култура		вкупно	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Изониазид (INH)	144	77,84	8	4,32	33	17,84	185	100,00
Рифампицин (RIF)	150	81,08	2	1,08	33	17,84	185	100,00
Етамбутол (EMB)	152	82,16	0	0,00	33	17,84	185	100,00
Стрептомицин (SM)	148	80,00	4	2,16	33	17,84	185	100,00

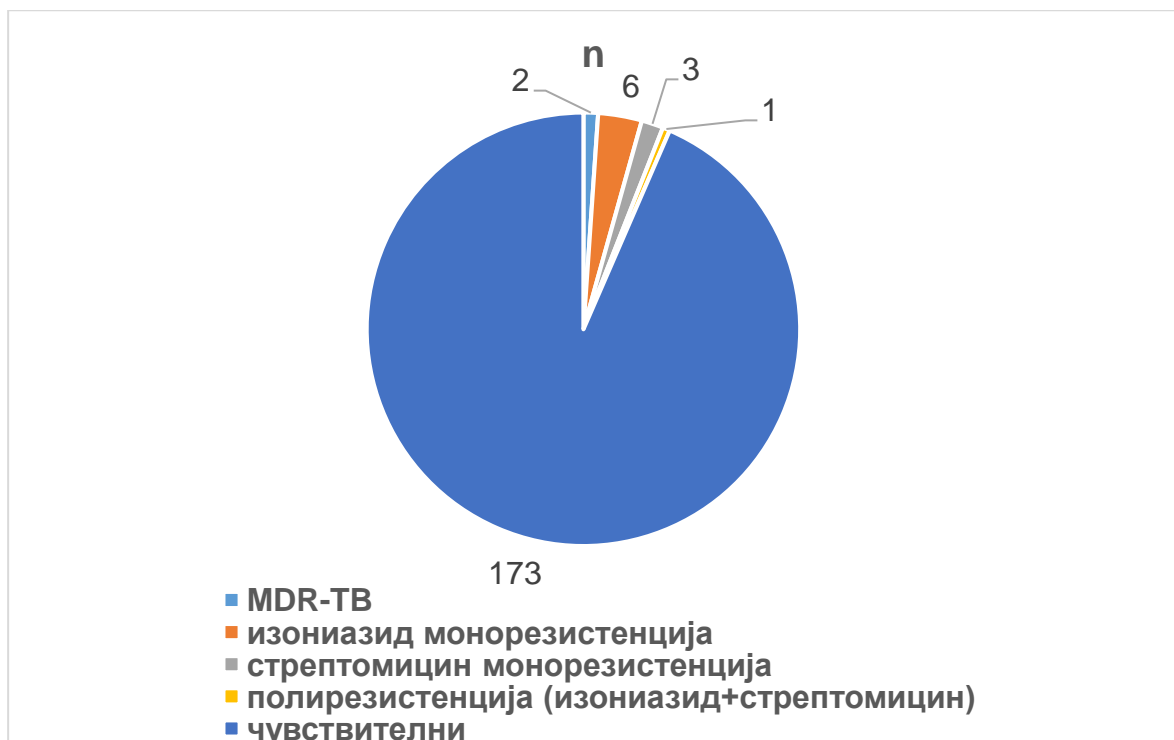
Табела 29. Структура на пациенти според резистенцијата со конвенционален тест на чувствителност на антитуберкулотици од прва линија

Број на пациенти според тип на резистенција	n	%
Изониазид монорезистентни	6	3,24
Стрептомицин монорезистентни	3	1,62
Полирезистентни (изониазид+стрептомицин резистенција)	1	0,54
Рифампицин монорезистентни	1*	0,54
Мултирезистентни (рифампицин+изониазид резистенција, MDR-TB)	1	0,54
Вкупно	12	6,48

*Кај пациентот е утврдена резистенција на изониазид со молекуларен тест; клинички е следен и лекуван како пациент со мултирезистентна туберкулоза (MDR-TB).

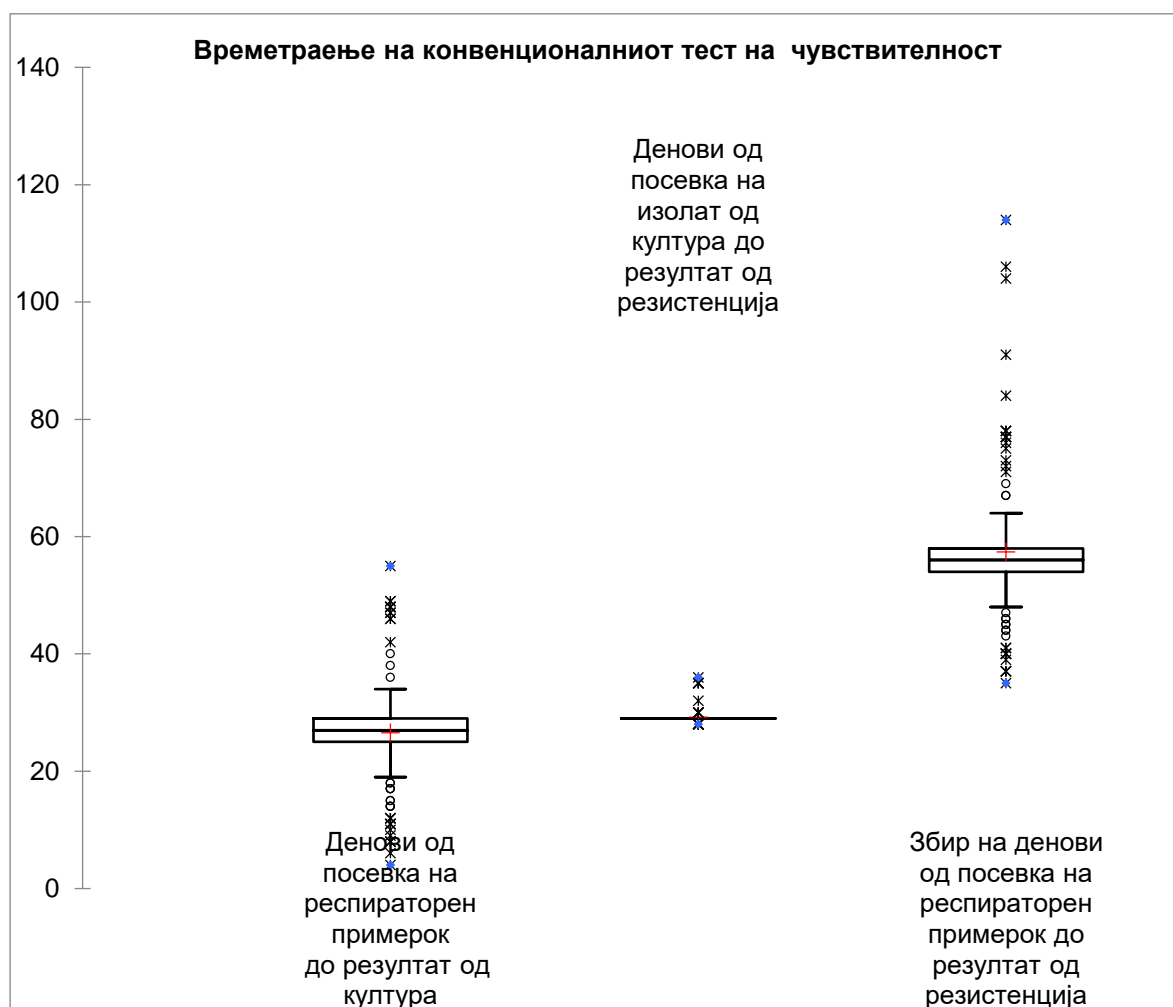


Графикон 22. Конвенционален тест на чувствителност на антитуберкулотски лекови од прва линија



Графикон 23. Удел на резистентните примероци во испитуваната група

Од прикажаните податоци се гледа дека со конвенционален метод на испитување на чувствителност на антитуберкулотски лекови е откриена резистенција на: изониазид (8 изолати), рифампицин (два изолати) и стрептомицин (четири изолати). Еден од изолатите е истовремено резистентен на изониазид и стрептомицин (полирезистенција), и еден е истовремено резистентен на изониазид и рифампицин (мултирезистентен сој, болест класифицирана како MDR-TB). Кај вториот сој резистентен на рифампицин од изолатот е дополнително направен молекуларен тест (MTBDR*plus*, Cepheid Hain LifeScience), со кој е потврдена резистенција и на изониазид. Според овој комбиниран резултат рифампицин-резистенција (конвенционален метод) и изониазид-резистенција (молекуларен метод), и вториот сој е класифициран како мултирезистентен, а болеста како MDR-TB.



Графикон 24. Времетраење на конвенционалниот тест на чувствителност

Табела 30. Времетраење на конвенционалниот тест на чувствителност

	Просечно денови	Ранг (денови)
Времетраење од посевка на респираторен примерок до пораст на култура	28,10	4-55
Времетраење од посевка на респираторен примерок до резултат од резистенција со класичен метод	59,28	44-106

Од Графикон 24 и Табела 30 се гледа дека во просек се потребни 28,10 дена за да се добие пораст на микобактериите во култура од која ќе се изработи класичниот (фенотипски) тест на резистенција. Вкупното време потребно за добивање на резултатите од посевката на респираторниот примерок, со овој тест изнесува во просек 59, 28 дена.

Табела 31. Време до почнување со терапија

	Денови до издавање на резултат од културелно испитување	Денови до почеток на анти tubеркулотска терапија	Негативен наод (микроскопија и молекуларен тест) пред терапија	
			n	%
Просечно*	34,94	38,69	16	8,65
Стандардна девијација	12,10	14,03		
Минимално	17	21		
Максимално	50	63		

*вредноста се однесува на пациентите со негативен наод на микроскопија и молекуларен тест во респираторниот примерок пред терапија

Табела 32. Стратификација на респираторните примероци според директниот микроскопски препарат и Xpert MTB/RIF тестот пред почеток на терапија

Параметар	Директен микроскопски препарат					
	позитивни		негативни		Вкупно	
	n	% *	n	% *	n	% *
Xpert позитивни	89	48,11	78	42,16	167	90,27
Xpert негативни	2	1,08	16	8,65	18	9,73
Вкупно	91	49,29	94	50,81	185	100

*процентот се однесува во однос на вкупниот број примероци n=185 (100%)

Од Табела 31 и 32 може да се види дека кај 16 од 185 примероци (8,65%) е добиен негативен наод на микроскопија и молекуларен тест во респираторниот примерок пред терапија. Кај оваа група просечното време за издавање на резултатот од културелно испитување изнесува 34,94 дена, а антитуберкулотската терапија е почната во просек 38,69 дена по добивање на позитивен наод од културелно испитување. Кај останатите 169/185 (91,35%) примероци времето до почеток на терапија изнесува 1 ден – односно терапијата е отпочната според наодот од: Хpert МТВ/RIF тестот (78/185; 42,16%), директниот микроскопски препарат (2/185; 1,08%) или и двете методи (89/185; 48,11%).

4.3.2. Молекуларни методи за дијагноза на туберкулоза и детекција на резистенција на антитуберкулотски лекови

Резултатите од детекција на *Mycobacterium tuberculosis* complex и резистенција на рифампицин во респираторен примерок се дадени во Табела 33 и Табела 34, соодветно. Од податоците може да се види дека Хpert-тестот го детектирал МТВС кај 90,27% од респираторните примероци и во еден примерок (0,54%) детектирал резистенција кон рифампицин.

Табела 33. Детекција на МТВС со Хpert МТВ/RIF во респираторен примерок

Хpert МТВ/RIF (детекција на МТВС)	n	%
МТВС позитивен	167	90,27
МТВС негативен	18	9,73
Вкупно	185	100,00

*МТВС = *Mycobacterium tuberculosis* complex

Табела 34. Детекција на резистенција кон рифампицин со Хpert МТВ/RIF во респираторен примерок

Хpert МТВ/RIF (резистенција на рифампицин)	n	%
Сензитивен	181	97,84
Неодреден	3	1,62
Резистентен	1	0,54
Вкупно	185	100,00

На сликите 23, 24, 25, 26 и 27 се прикажани оригинални резултати од испитувањето со молекуларен тест – Xpert MTB/RIF и MTBDRplus – во респираторни примероци во оваа студија (од нормален наод до наод за мултирезистентна туберкулоза, MDR-TB).

GeneXpert PC

Test Report

Sample ID: bal
 Test Type: Specimen
 Sample Type:

Assay Information

Assay	Assay Version	Assay Type
Xpert MTB-RIF Assay G4	5	In Vitro Diagnostic

Test Result: **MTB NOT DETECTED**

Test and Analyte Result

Analyte Name	Ct	EndPt	Analyte Result	Probe Check Result
Probe D	0.0	0.0	NEG	PASS
Probe C	0.0	3.0	NEG	PASS
Probe E	0.0	-2.0	NEG	PASS
Probe B	0.0	5.0	NEG	PASS
SPC	23.6	228.0	PASS	PASS
Probe A	0.0	0.0	NEG	PASS
QC-1	0.0	0.0	NEG	PASS
QC-2	0.0	0.0	NEG	PASS

Слика 23. Резултат од Xpert MTB/RIF тест: уреден наод (извор: ИБЗТ; анализа во бронхоаспират)

GeneXpert PC

Test Report

Sample ID: sputum
 Test Type: Specimen
 Sample Type:

Assay Information

Assay	Assay Version	Assay Type
Xpert MTB-RIF Assay G4	5	In Vitro Diagnostic

Test Result: **MTB DETECTED HIGH;**
Rif Resistance NOT DETECTED

Test and Analyte Result

Analyte Name	Ct	EndPt	Analyte Result	Probe Check Result
Probe D	16.9	263.0	POS	PASS
Probe C	15.8	262.0	POS	PASS
Probe E	16.9	143.0	POS	PASS
Probe B	16.9	146.0	POS	PASS
SPC	26.0	263.0	NA	PASS
Probe A	15.3	176.0	POS	PASS
QC-1	0.0	0.0	NEG	PASS
QC-2	0.0	0.0	NEG	PASS

Слика 24. Резултат од Хперт МТВ/РИФ-тест: детекција на МТВС-сој кој е чувствителен на рифампицин (извор: ИБЗТ; анализа во спутум)

GeneXpert PC

Test Report

Sample ID: sputum
 Test Type: Specimen
 Sample Type:

Assay Information

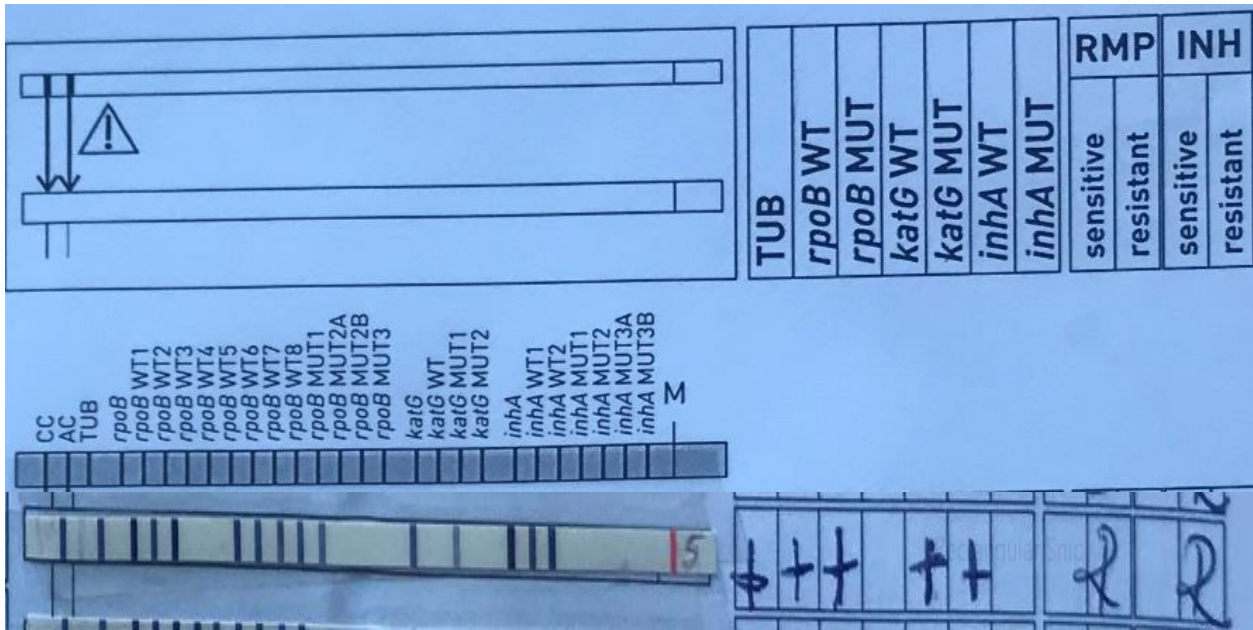
Assay	Assay Version	Assay Type
Xpert MTB-RIF Assay G4	5	In Vitro Diagnostic

Test Result: **MTB DETECTED LOW;**
Rif Resistance DETECTED

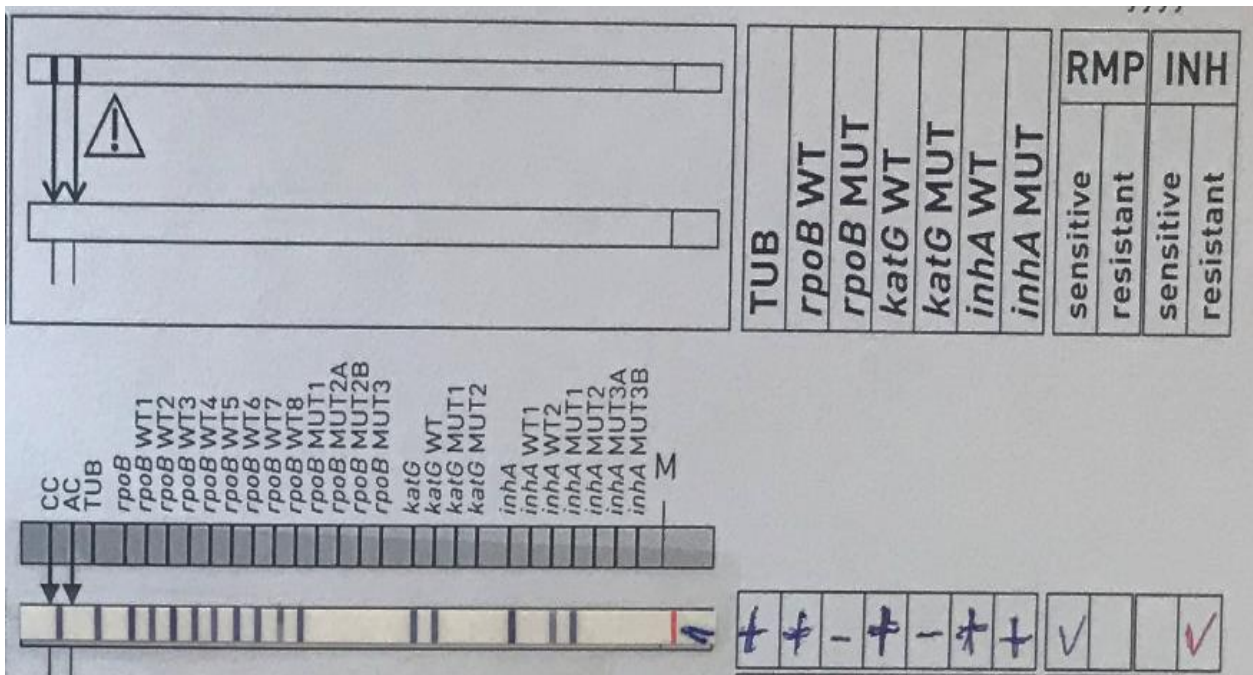
Test and Analyte Result

Analyte Name	Ct	EndPt	Analyte Result	Probe Check Result
Probe D	26.0	149.0	POS	PASS
Probe C	25.0	163.0	POS	PASS
Probe E	25.8	127.0	POS	PASS
Probe B	39.2	21.0	NEG	PASS
SPC	24.1	259.0	NA	PASS
Probe A	24.5	106.0	POS	PASS
QC-1	0.0	0.0	NEG	PASS
QC-2	0.0	0.0	NEG	PASS

Слика 25. Резултат од Хперт МТВ/РИФ-тест: детекција на МТВС-сој кој е резистентен кон рифампицин (извор: ИБЗТ, пациент бр. 1; анализа во спутум)



Слика 26. Резултат од MTBDRplus тест: детекција на MTBC-сој кој е резистентен на рифампицин и изониазид (извор: ИБЗТ, пациент бр. 1; анализа во спутум)



Слика 27. Резултат од MTBDRplus тест: детекција на MTBC-сој кој е резистентен на изониазид (извор: ИБЗТ, пациент бр. 2; анализа на изолат од култура на подлога по Löwenstein-Jensen)

За интерпретација на резултатите од овие молекуларни тестови, потребно е познавање на секвенцата на гените на *M. tuberculosis* кои се испитуваат со тестовите и нумеричкиот систем што се користи за нивно означување. Традиционалниот и специес-специфичниот номенклатурен нумерички систем на кодони и мутации во генот *rpoB* на *M. tuberculosis* и неговата примена кај молекуларните тестови Xpert MTB/RIF и MBDR_{plus} се прикажани во Табела 35.

Табела 35. Номенклатурен нумерички систем на кодони и мутации во генот *rpoB* на *Mycobacterium tuberculosis* (според Andre et al., 2017)

	Специес-специфичен систем (базиран врз секвенцата на генот <i>rpoB</i> во референтниот сој на <i>M. tuberculosis</i> , H37Rv)	Традиционален систем (базиран врз генската секвенца на <i>E. coli</i>)	Xpert MTB/RIF (проба)	MTBDR _{plus} (проба)
Кодон/ мутација	426-431	507-512	A	
	430-436	511-517	B	
	435-442	516-523	C	
	442-449	523-530	D	
	447-452	528-533	E	
	424-428	505-509		WT1
	429-432	510-513		WT2
	432-436	513-517		WT2-WT3
	436-438	517-519		WT3-WT4
	435-441	516-522		WT4-WT5
	437-444	518-525		WT5-WT6
	445-448	526-529		WT7
	449-452	530-533		WT8
	D435V	D516V		MUT1
	H445Y	H526Y		MUT2A
	H445D	H526D		MUT2B
	S450L	S531L		MUT3

4.4. Класични и молекуларни методи за дијагноза на туберкулоза и детекција на резистенција на анти-туберкулотски лекови – основни статистички параметри

Во Табела 36 се прикажани кумулативно (бинарно) резултатите од микробиолошката дијагноза на белодробна туберкулоза со класични и со молекуларни методи. Кај 7 примероци (3,78%) е добиен негативен наод за класичните методи и молекуларниот тест во испитуваниот примерок, додека дијагнозата е потврдена микробиолошки-културелно во друг респираторен примерок земен во тек на актуелната терапија за белодробна туберкулоза. Во Табела 37 е направена стратификација на

пациентите на подгрупи според наодот од микробиолошките методи за дијагноза на туберкулозата (класични и молекуларни).

Табела 36. Микробиолошка дијагноза на туберкулоза (конвенционална и молекуларна)

Респираторен примерок пред терапија	Директен микроскопски препарат		Цврста култура Löwenstein-Jensen		Течна култура (ВАСТЕС MGIT 960)		Класична микробиолошка детекција (директен микро. препарат или култура)		Молекуларна анализа Xpert MTB/RIF *		Детекција со кој било микро. тест (класичен или Xpert)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	N	%
Примероци												
Позитивни	91	49,19	128	69,19	111	60,00	157	84,86	167	90,27	178	96,22
Негативни	94	50,81	52	28,11	28	15,14	28	15,14	18	9,73	7	3,78
Контаминирани	0	0,00	5	2,70	5	2,70	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Вкупно примероци	185	100,00	185	100,00	144	77,84	185	100,00	185	100,00	185	100,00

*Кај 18 од 185 примероци е позитивен само молекуларниот тест Xpert MTB/RIF.

Табела 37. Стратификација на респираторните примероци и пациентите според микробиолошката анализа (класична и молекуларна) за дијагноза на туберкулоза

Параметар	Култура позитивни ¹					
	Директен микроскопски препарат					
	Позитивни		негативни		Вкупно	
	n	% *	N	% *	n	% *
Хpert позитивни	84	45,41	57	30,81	141	76,22
Хpert негативни	2	1,08	9	4,86	11	5,95
Вкупно	86	46,49	66	35,68	152	82,16
Параметар	Култура негативни ²					
	Директен микроскопски препарат					
	Позитивни		Негативни ⁴		Вкупно	
	n	% *	N	% *	n	% *
Хpert позитивни	4	2,16	20	10,81	24	12,97
Хpert негативни	0	0,00	7	3,78	7	3,78
Вкупно	4	2,16	27	14,59	31	16,76
Параметар	Култура контаминирана ³					
	Директен микроскопски препарат					
	Позитивни		Негативни ⁴		Вкупно	
	n	% *	N	% *	n	% *
Хpert позитивни	1	0,54	1	0,54	2	1,08
Хpert негативни	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Вкупно	1	0,54	1	0,54	2	1,08

* процентот е пресметуван во однос на вкупниот број примероци n=185 (100%)

¹Позитивен наод на цврста (LJ) и/или течна (BT) подлога; ²Негативен наод на цврста (LJ) и/или течна (BT) подлога

³Контаминација на цврста (LJ) и течна (BT) подлога од истиот респираторен примерок

⁴ По еден пациент со Хpert позитивен наод има културелна потврда за ТБ во друг респираторен примерок

Табела 38. Структура на пациенти со позитивен Xpert MTB/RIF-тест и негативна класична микробиолошка анализа, според претходно лекување од ТБ*

Пациент бр.	Период меѓу претходно и актуелно лекување од ТБ	Xpert MTB/RIF (семиквантитативен резултат според Ct вредност) ¹
1	Не е претходно лекуван	Многу ниско
2	Не е претходно лекуван	Ниско
3	Не е претходно лекуван	Многу ниско
4	Не е претходно лекуван	Многу ниско
5	Не е претходно лекуван	Многу ниско
6	Не е претходно лекуван	Ниско
7	Не е претходно лекуван	Многу ниско
8	Не е претходно лекуван	Многу ниско
9	Не е претходно лекуван	Многу ниско
10	Не е претходно лекуван	Многу ниско
11	3 години	Многу ниско
12	9 месеци	Ниско
13	1 месец	Ниско
14	1 година	Многу ниско
15	4 месеци	Многу ниско
16	6 месеци	Ниско
17	21 година	Многу ниско
18	4 месеци	Ниско

*Категоријата „негативна класична микробиолошка анализа“ е дефинирана како негативен наод од микроскопското и културелното испитување на респираторниот примерок.

¹ Позитивитет на Ct вредност: многу ниско (Ct >28), ниско (Ct 22–28), средно (Ct 16–22), високо (Ct <16).

Во Табела 39 и Табела 40 се прикажани сензитивноста, специфичноста, негативната и прозитивната предиктивна вредност на директниот микроскопски препарат и Xprt MTB-RIF тестот во однос на „златниот стандард“ – културелното испитување.

Табела 39. Сензитивност, специфичност, позитивна предиктивна вредност и негативна предиктивна вредност за директен микроскопски препарат во однос на културелно испитување

	Вредност	95% CI
Сензитивност	57,24%	48,97% - 65,22%
Специфичност	87,10 %	70,17% - 96,37%
Стапка на лажно позитивни	4,44	1,76 - 11,19
Стапка на лажно негативни	0,49	0,39 - 0,62
Позитивна предиктивна вредност (PPV)	95,60%	89,61% - 98,21%
Негативна предиктивна вредност (NPV)	29,35 %	24,84% - 34,30%
Точност	62,30%	54,85% - 69,34
Релативен ризик (RR)	4,4359	1,7592 - 11,1850
Однос на шанси (OR)	9,0346	3,0129 – 27,0914

Табела 40. Сензитивност, специфичност, позитивна предиктивна вредност и негативна предиктивна вредност за Xpert MTB/RIF во однос на културелно испитување

	Вредност	95% CI
Сензитивност	92,76%	87,42% - 96,33%
Специфичност	22,58 %	9,59% - 41,10%
Стапка на лажно позитивни	1,20	0,99 - 1,46
Стапка на лажно негативни	0,32	0,13 - 0,76
Позитивна предиктивна вредност (PPV)	85,45%	82,86% - 87,72%
Негативна предиктивна вредност (NPV)	38,89 %	21,13% - 60,19%
Точност	80,87%	74,42% - 0,00%
Релативен ризик (RR)	1,1982	0,9857 - 1,4565
Однос на шанси (OR)	3,7386	1,3191 - 10,5965

Во Табела 41 е евалуирана сензитивноста на директниот микроскопски препарат и тестот Xpert MTB/RIF кај различни подгрупи примероци и т.н. додадена вредност на Xpert (Δ Xpert) во однос на директниот микроскопски препарат.

Табела 41. Сензитивност на директниот микроскопски препарат и Xpert MTB/IF тестот

		Сензитивност					
		Сите примероци (n=185)	Сите позитивни примероци (n=91)	Сите негативни примероци (n=94)	Култура позитивни примероци (n=152)	Микроскопски позитивни-култура позитивни (n=86)	Микроскопски негативни-култура позитивни (n=66)
Xpert MTB/RIF	n	167	89	78	141	84	57
	%	(90,27%)	(97,80%)	(82,98%)	(92,76%)	(97,67%)	(86,36%)
Директен микроскопски препарат	n	91			86		
	%	(49,19%)			(56,58%)		
Δ Xpert		41,08%			36,18%		

Δ Xpert = додадена вредност на Xpert MTB/RIF

4.5. Корелација на резултатите од Xpert MTB/RIF тестот со конвенционалните фенотипски методи

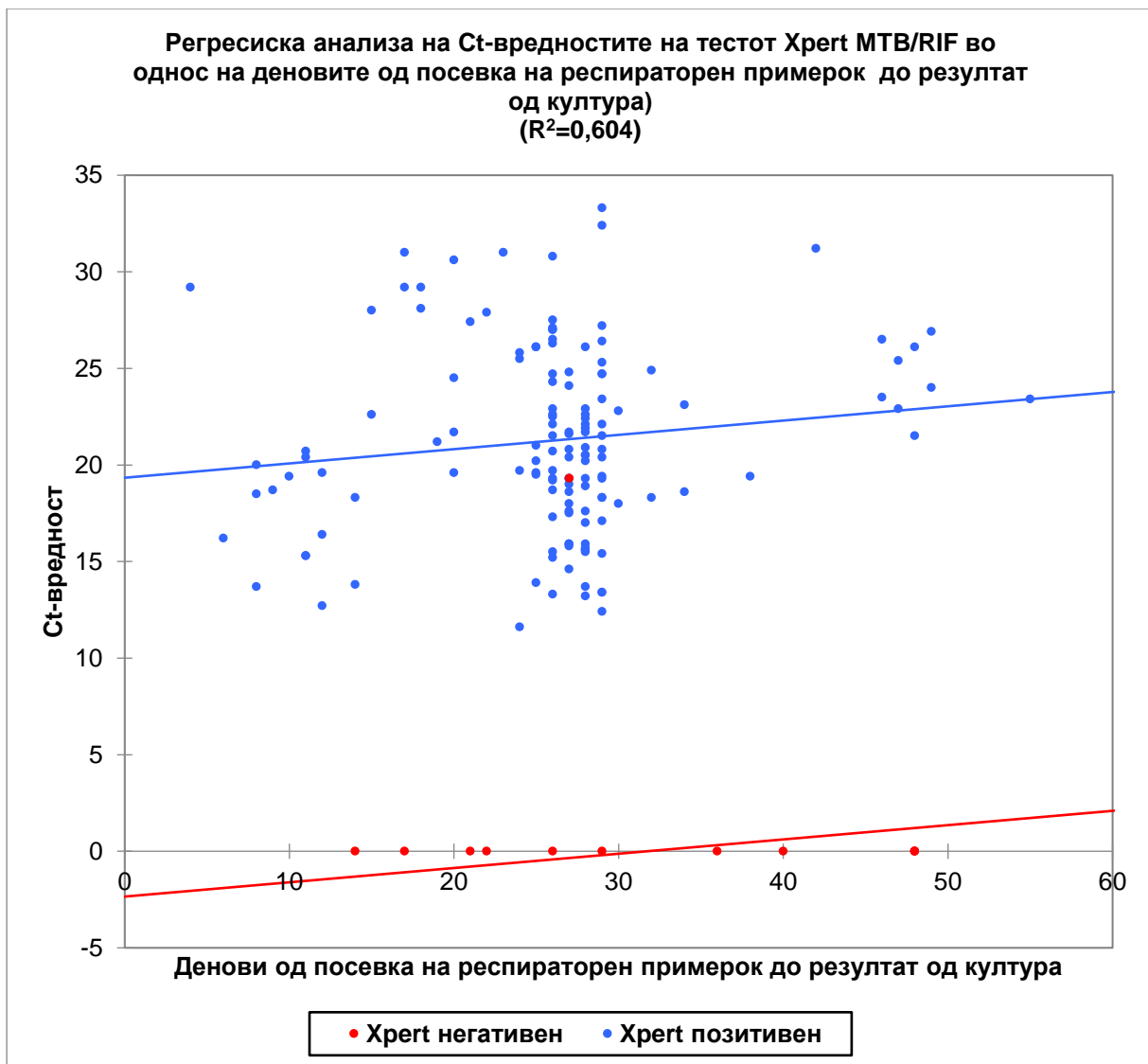
4.5.1. Корелацијата на Ct-вредностите на тестот Xpert MTB/RIF со деновите од посевка на респираторниот примерок до позитивен резултат во култура е прикажана во **Табела 42**, **Графикон 25** и **Графикон 26**, соодветно.

Табела 42. Линеарна регресишка анализа на семиквантитативните културелни резултати во однос на Ct-вредностите од тестот Xpert MTB/RIF

	Моделни параметри						Стандардизирани коефициенти		ANCOVA
	Вредност	SE	T	p	95% CI-долна	95% CI-горна	Вредност	SE	p
Пресек	19,338	1,148	16,839	< 0,0001	17,068	21,607	/	/	< 0,0001
Денови до позитивитет*	0,074	0,041	1,787	0,076	-0,008	0,156	0,094	0,052	
Xpert-негативен	-21,686	1,445	-15,003	< 0,0001	-24,542	-18,829	-0,787	0,052	
Xpert-позитивен	0,000	0,000	/	/	/	/	0,000	0,000	

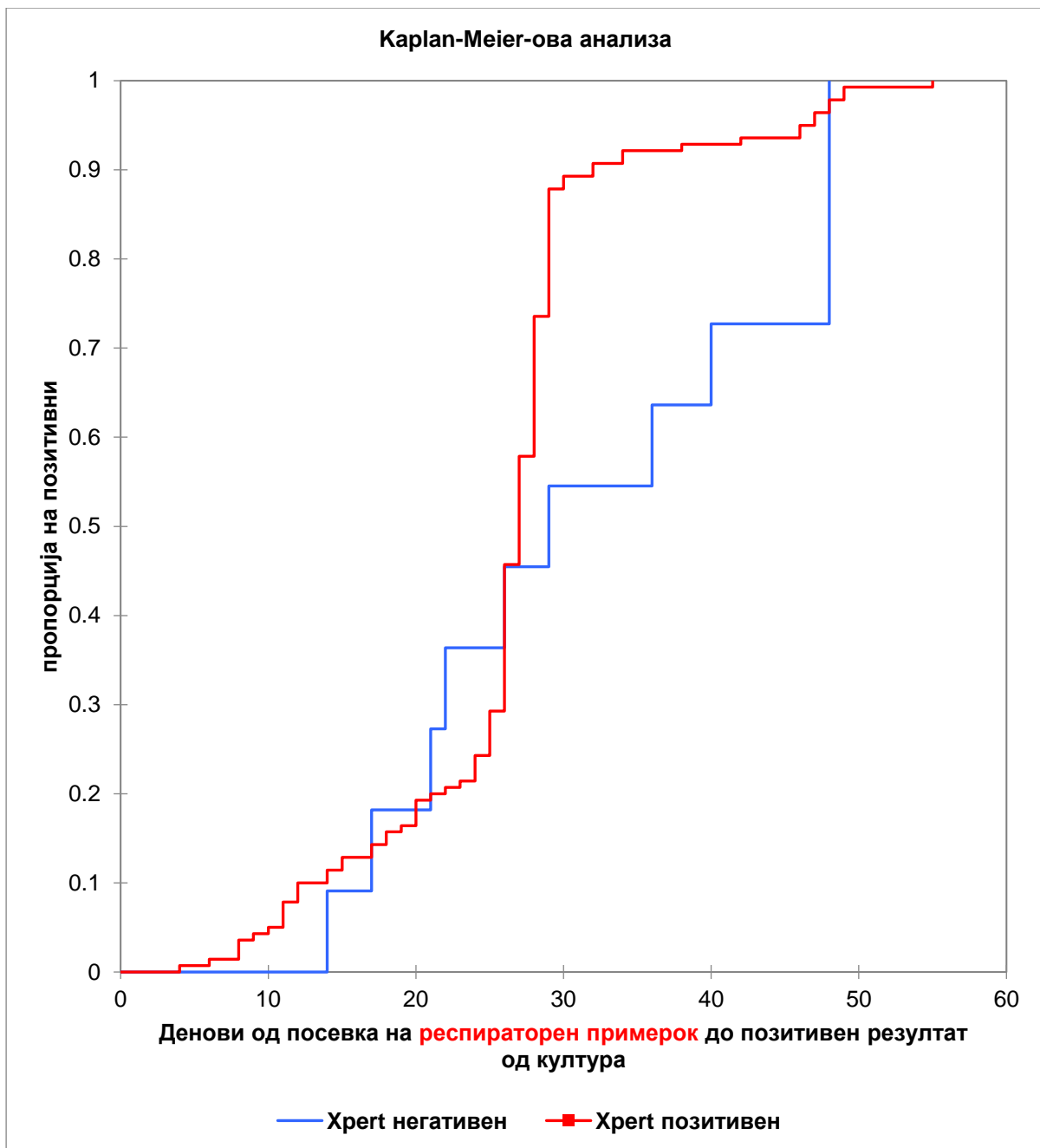
*Денови до позитивитет, денови од посевка на респираторен примерок до резултат од култура; SE, стандардна грешка; 95% CI, граници на интервалот на доверливост при 95%; ANCOVA, анализа на коваријансата.

Од резултатите во **Табела 42** може да се види дека линеарната регресишка анализа на семиквантитативните културелни податоци со Ct-вредностите од Xpert-тестот покажа високо сигнификантна разлика пресметана со анализа на коваријансата (ANCOVA-тест).



Графикон 25. Регресиска анализа на Ct-вредностите на тестот Xpert MTB/RIF во однос на деновите од посевка на респираторен примерок до резултат од култура

Од прикажаните резултати може да се види дека постои статистички значајна корелација на Ct-вредностите на тестот Xpert MTB/RIF со деновите од посевка на респираторниот примерок до позитивен резултат од култура ($p < 0,0001$), односно постои позитивна корелација меѓу поголемата бактериска концентрација во респираторниот примерок (изразена преку Ct вредноста на Xpert) и пократкото време до добивање на позитивен наод во култура.



Графикон 26. Зависност на позитивитетот на Хpert MTB/RIF од „време до позитивитет“ во култура

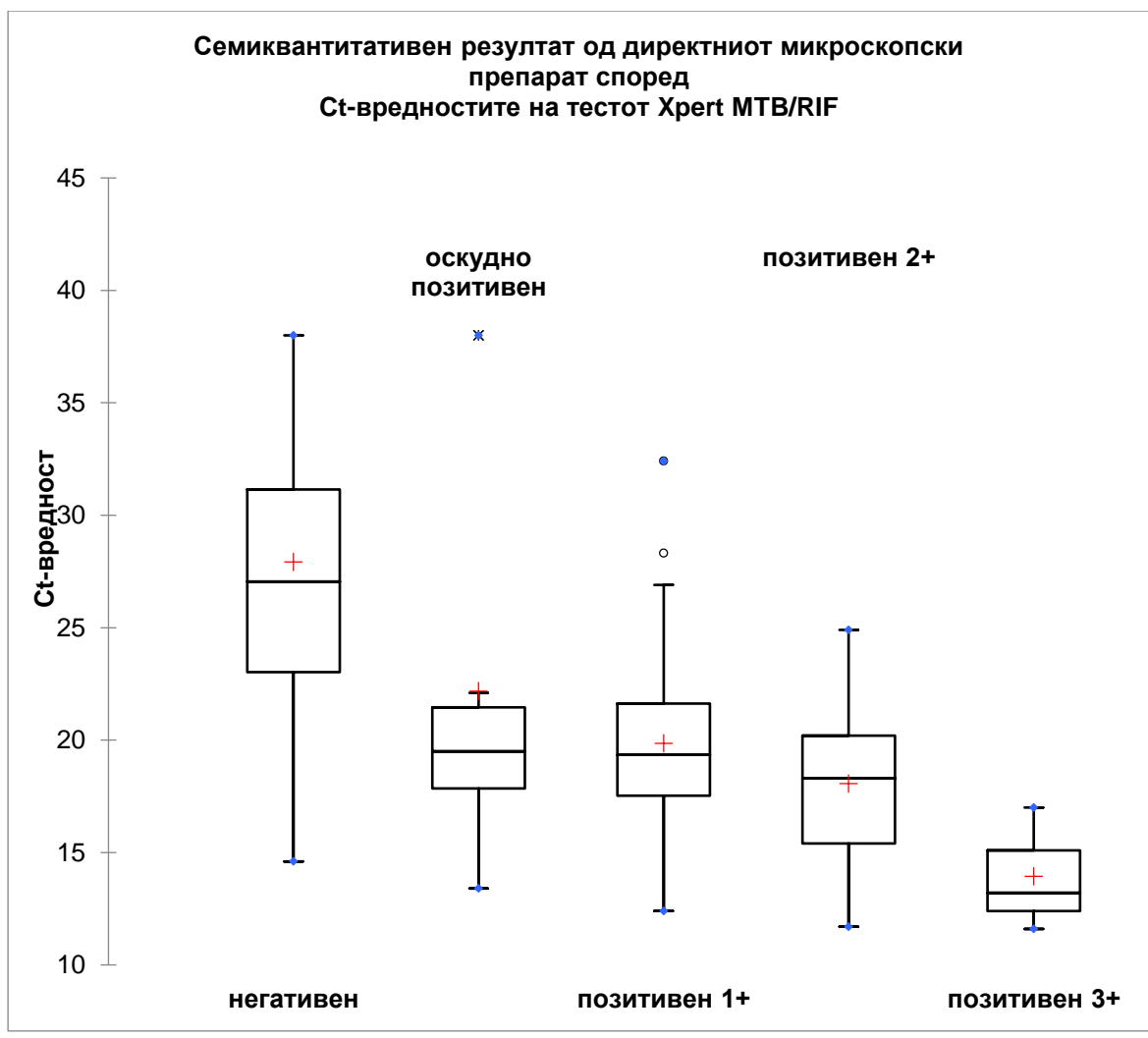
Kaplan-Meier-овата анализа покажува дека кај Хpert позитивните респираторни примероци позитивниот резултат на културелното испитување се постигнува за пократко време и пропорционално на степенот на позитивитет на Хpert, споредено со Хpert негативните примероци.

4.5.2. Корелацијата на Ct-вредностите на тестот Xpert MTB/RIF како одраз на бациларната концентрација во респираторниот примерок, со семиквантитативните резултати од директниот микроскопски препарат е прикажана во Табела 43 и Графикон 27, 28 и 29.

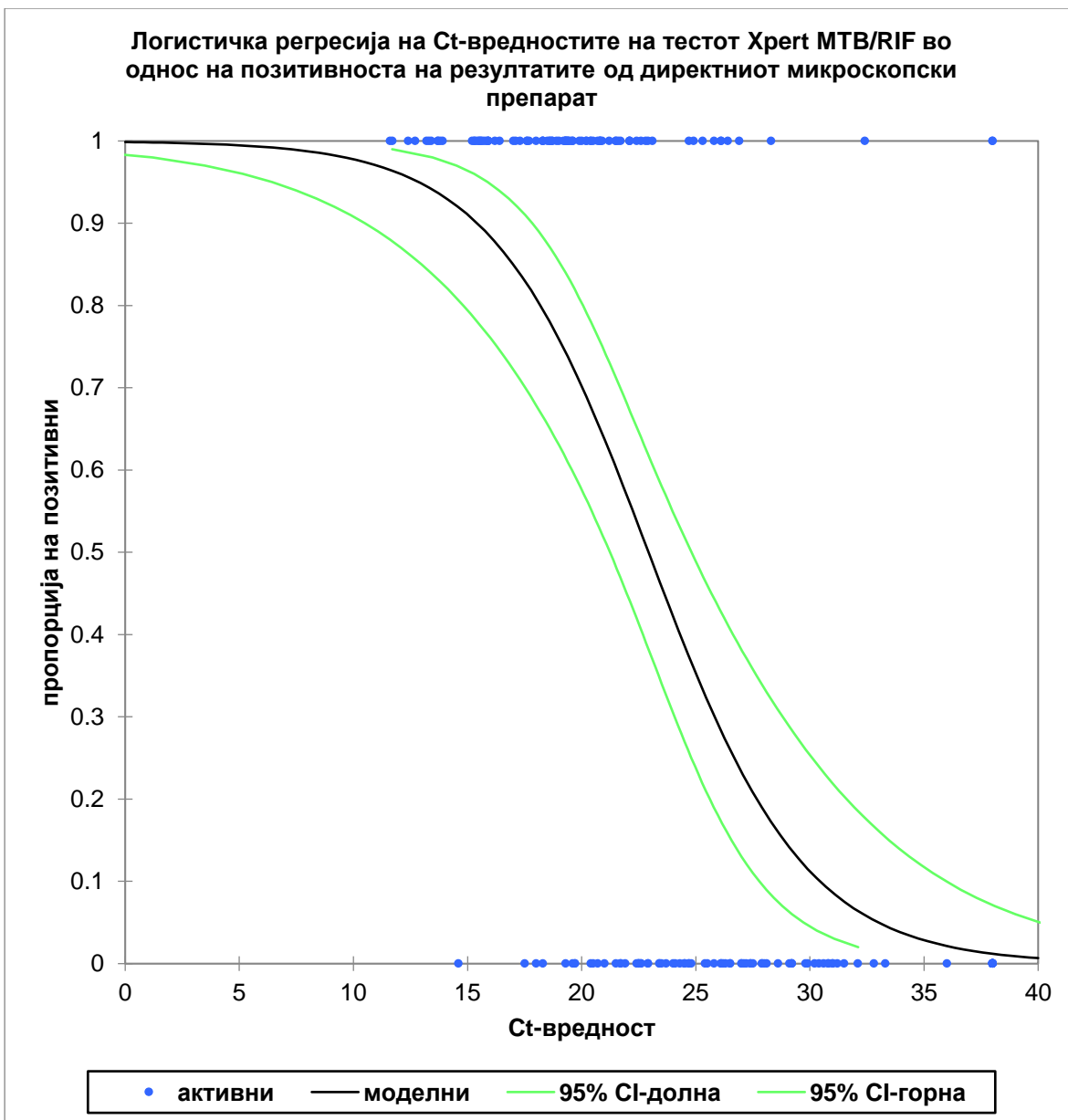
Табела 43. Дескриптивна статистичка анализа на Ct-вредностите на тестот Xpert MTB/RIF во однос на семиквантитативниот степен на позитивитет на директниот микроскопски препарат

Параметар	Негативен	Оскудно позитивен	Позитивен 1+	Позитивен 2+	Позитивен 3+	Kruskal-Wallis-ов тест
AFB наод (број на примероци)	94	11	56	21	3	<i>P</i>
Минимална Ct вредност	14,60	13,40	12,40	11,70	11,60	< 0,0001
Максимална Ct вредност	38,00	38,00	32,40	24,90	17,00	
Прв квантил	23,03	17,85	17,53	15,40	12,40	
Медијана	27,05	19,50	19,35	18,30	13,20	
Трет квантил	31,15	21,45	21,63	20,20	15,10	
Аритметичка средина	27,92	22,16	19,84	18,06	13,93	
Варијанса	38,88	67,41	16,16	14,00	7,69	
Стандардна девијација	6,24	8,21	4,02	3,74	2,77	

Анализите покажуваат дека постои статистичка значајност во разликите меѓу Ct-вредностите на тестот Xpert MTB/RIF и семиквантитативните резултати на директниот микроскопски препарат (двонасочен Kruskal-Wallis-ов тест; $p < 0,0001$). Тоа значи дека постои позитивна корелација меѓу двете методи за проценка на бактериската концентрација во спутумот – рангот на Ct-вредности на тестот Xpert MTB/RIF и степенот на позитивитет во резултатите од директниот микроскопски препарат.

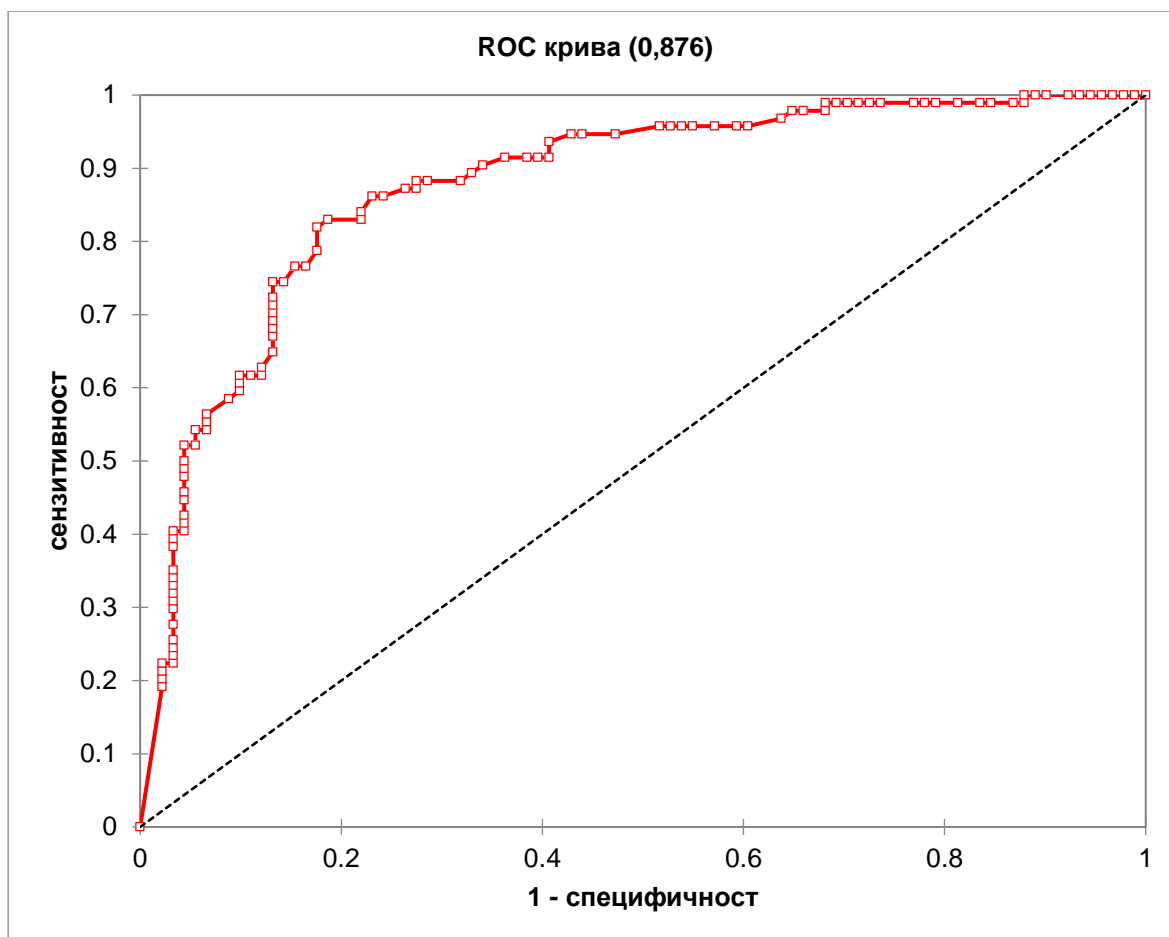


Графикон 27. Семиквантитативен микроскопски резултат на директниот препарат според Ct-вредностите на тестот Xpert MTB/RIF



Графикон 28. Логистичка регресија на Ct-вредностите на тестот Xpert MTB/RIF во однос на позитивноста на резултатите од директниот микроскопски препарат

Логистичката регресииска анализа на Ct-вредностите на тестот Xpert MTB/RIF во однос на семиквантитативните резултати на директниот микроскопски препарат покажа високосигнификантна разлика (Waldov-тест; $p < 0,0001$). Тоа значи дека постои позитивна корелација меѓу двете методи за проценка на бактериската концентрација во спутумот – рангот на Ct-вредности на тестот Xpert MTB/RIF и степенот на позитивитет на резултатите од директниот микроскопски препарат.



Графикон 29. Површината под кривата укажува на мошне солиден однос на сензитивноста и специфичноста на евалуираниот тест

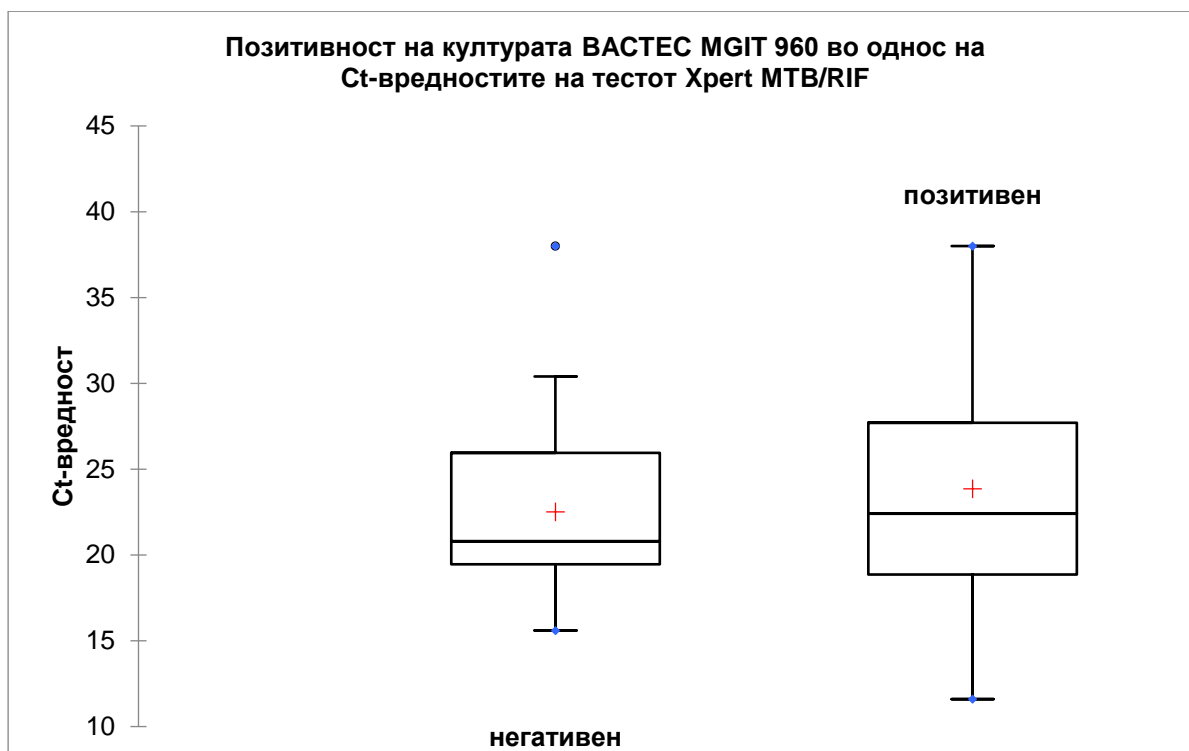
Регресиската анализа на семиквантитативниот микроскопски резултати на директниот препарат во однос на Ct-вредностите од Xpert-тестот покажа високо сигнификантна разлика со анализата на варијансата (ANOVA-тест; $p < 0,0001$). Тоа значи дека постои позитивна корелација меѓу двете методи за проценка на бактериската концентрација во спутумот – рангот на Ct-вредности на тестот Xpert MTB/RIF и степенот на позитивитет на микроскопските резултати од директниот препарат.

4.5.3. Корелацијата на Ct-вредностите на тестот Xpert MTB/RIF со позитивитетот на течната култура (BACTEC MGIT 960) е прикажана во **Табела 44** и **Графикон 30, 31 и 32.**

Табела 44. Дескриптивна статистичка анализа на Ct-вредностите на тестот Xpert MTB/RIF во однос на позитивноста на течната култура (BACTEC MGIT 960)

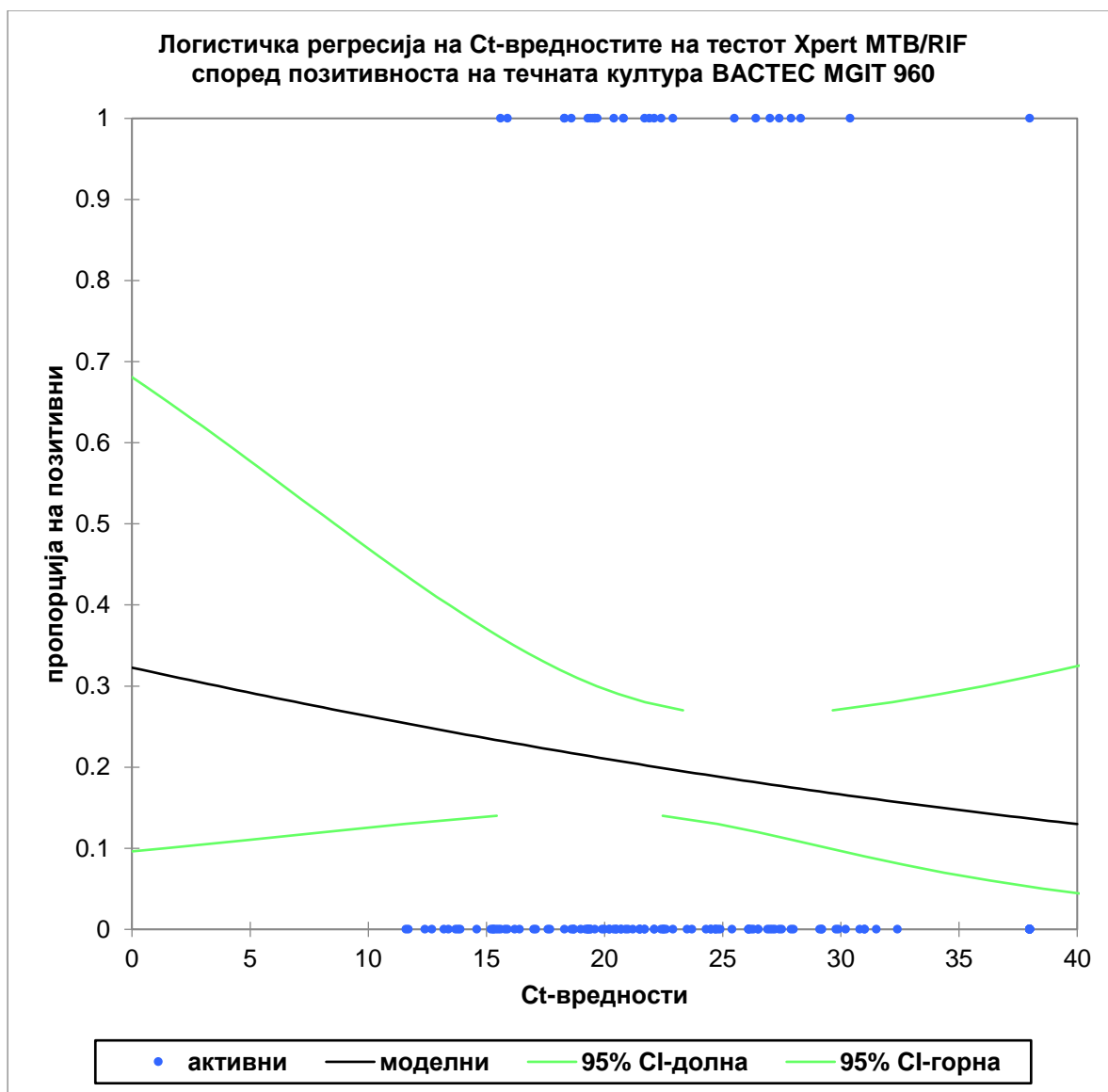
Параметар	Негативен	Позитивен	Mann-Whitney-ов тест
Течна култура (број на примероци) *	28	111	<i>p</i>
Минимална Ct вредност	15,60	11,60	0,551
Максимална Ct вредност	38,00	38,00	
Прв квантил	19,45	18,85	
Медијана	20,80	22,40	
Трет квантил	25,95	27,70	
Аритметичка средина	22,51	23,86	
Варијанса	24,64	55,35	
Стандардна девијација	4,96	7,44	

*Не се анализирани примероците со негативен резултат од BACTEC MGIT 960 културата



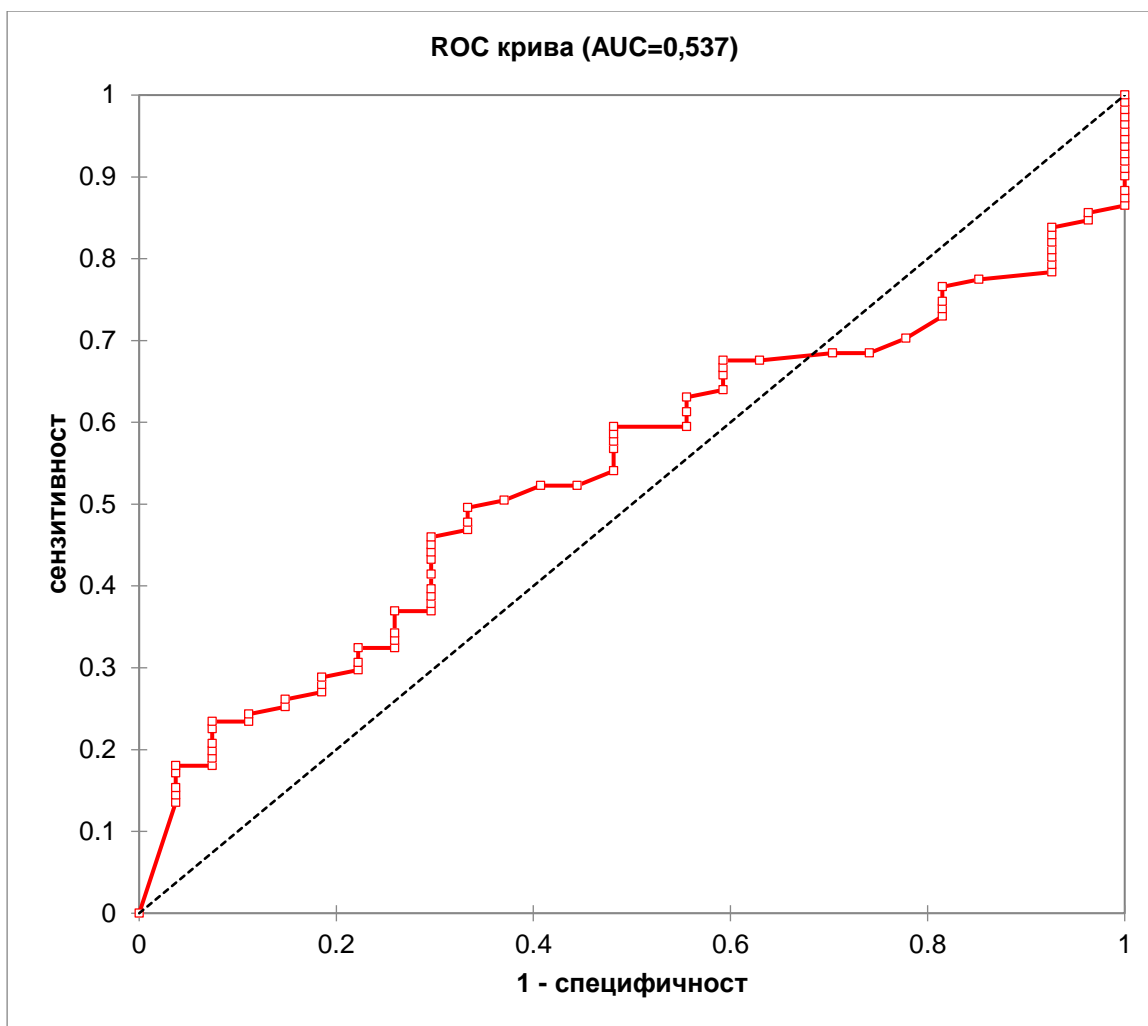
Графикон 30. Позитивност на течната култура (BACTEC MGIT 960) во однос на Ct-вредностите на тестот Xpert MTB/RIF

Резултатите од анализираните податоци покажуваат дека нема статистичка значајност на разликите меѓу Ct-вредностите на тестот Xpert MTB/RIF и позитивноста на течната култура (BACTEC MGIT 960), односно нема сигнификантна разлика со двонасочниот статистички тест според Mann-Whitney ($p=0,551$).



Графикон 31. Логистичка регресиска анализа на Ct-вредностите на тестот Xpert MTB/RIF во однос на позитивноста на течната култура (BACTEC MGIT 960)
 *95% CI = граници на интервалот на доверливост при 95%.

Логистичката регресиска анализа на Ct-вредностите на тестот Xpert MTB/RIF во однос на позитивноста на течната култура BACTEC MGIT 960 покажа дека нема статистичка сигнификантост во разликите меѓу овие две методи (Waldov-тест: $p=0,368$). Тоа значи дека не постои корелација меѓу рангот на Ct-вредности на тестот Xpert MTB/RIF како репрезент на бактериската концентрација во респираторниот примерок од една страна и позитивноста на течната култура (BACTEC MGIT 960) од друга страна.



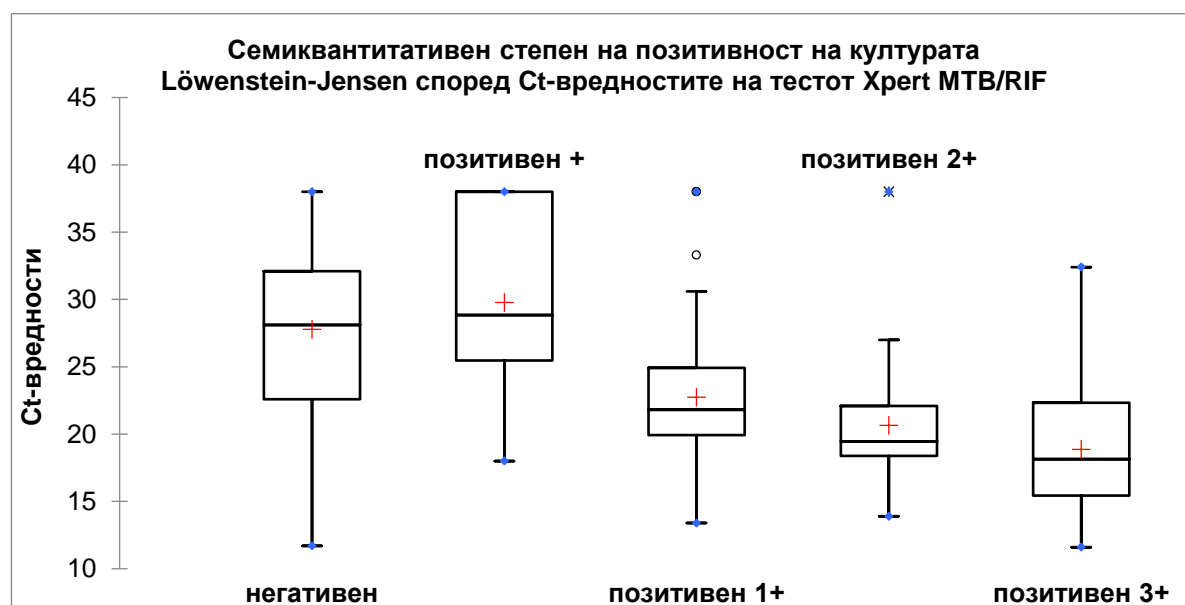
Графикон 32. Површината под кривата укажува на релативно слаб однос на сензитивноста и специфичноста на евалуираниот тест

4.5.4. Корелацијата на Ct-вредностите на тестот Xpert MTB/RIF со семиквантитативните резултати од културелното испитување на цврста подлога (Löwenstein-Jensen) е прикажана во Табела 45 и Графикон 33, 34 и 35.

Табела 45. Дескриптивна статистичка анализа на Ct-вредностите на тестот Xpert MTB/RIF во однос на семиквантитативниот степен на позитивитет на цврстата култура (Löwenstein-Jensen)

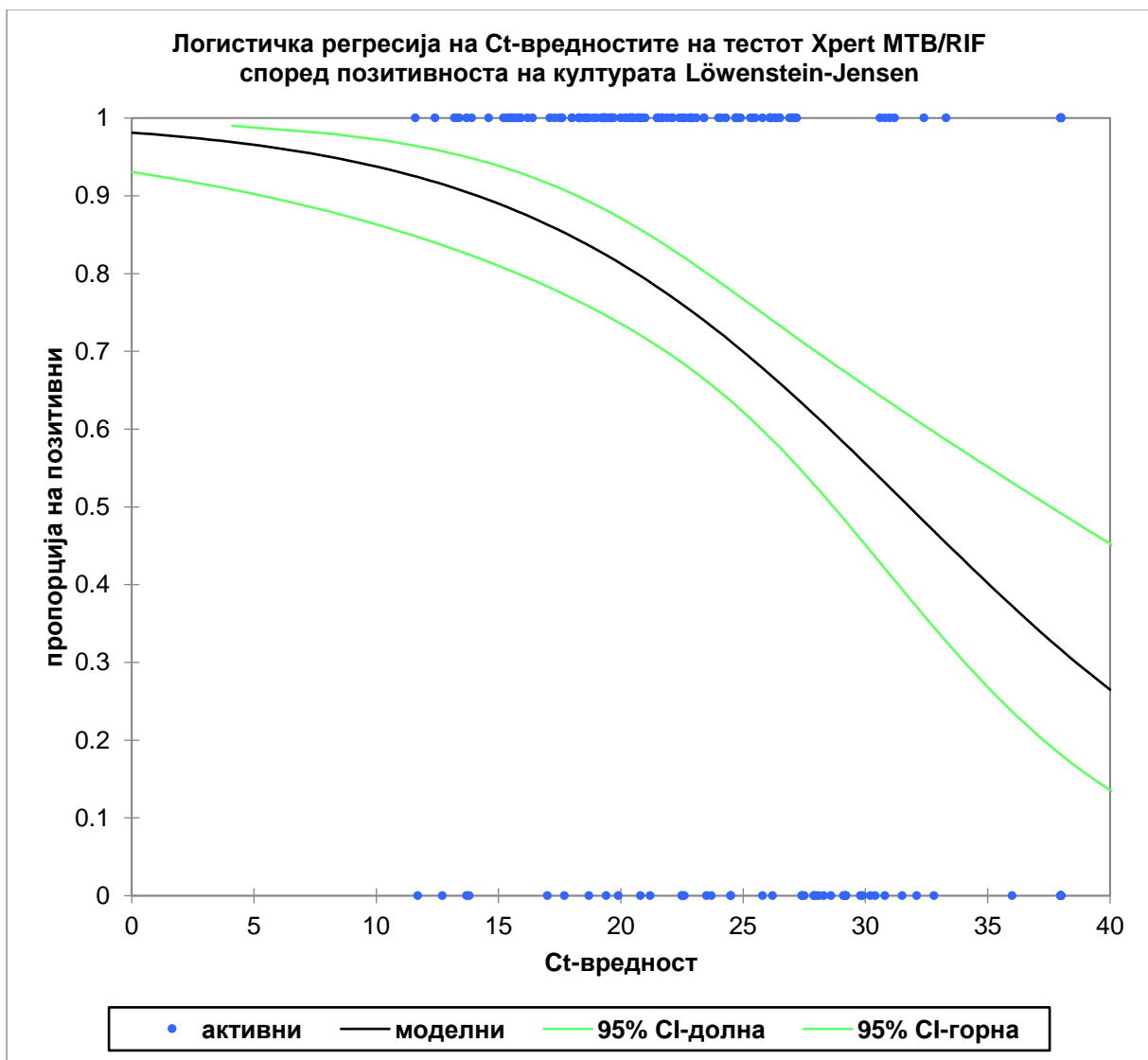
Параметар	Негативен	Позитивен +	Позитивен 1+	Позитивен 2+	Позитивен 3+	Позитивен 4+	Kruskal-Wallis-ов тест
Цврста култура (број на примероци) *	52	16	44	38	26	4	<i>p</i>
Минимална Ct вредност	11,70	18,00	13,40	13,90	11,60	13,70	< 0,0001
Максимална Ct вредност	38,00	38,00	38,00	38,00	32,40	20,40	
Прв квартил	22,60	25,48	19,93	18,38	15,43	16,63	
Медијана	28,10	28,85	21,80	19,45	18,15	18,45	
Трет квартил	32,10	38,00	24,93	22,10	22,33	19,58	
Аритметичка средина	27,77	29,76	22,73	20,64	18,85	17,75	
Варијанса	55,07	44,66	27,04	18,15	24,80	8,62	
Стандардна девијација	7,42	6,68	5,20	4,26	4,98	2,94	

* не се анализирани 5-те примероци со контаминирана култура



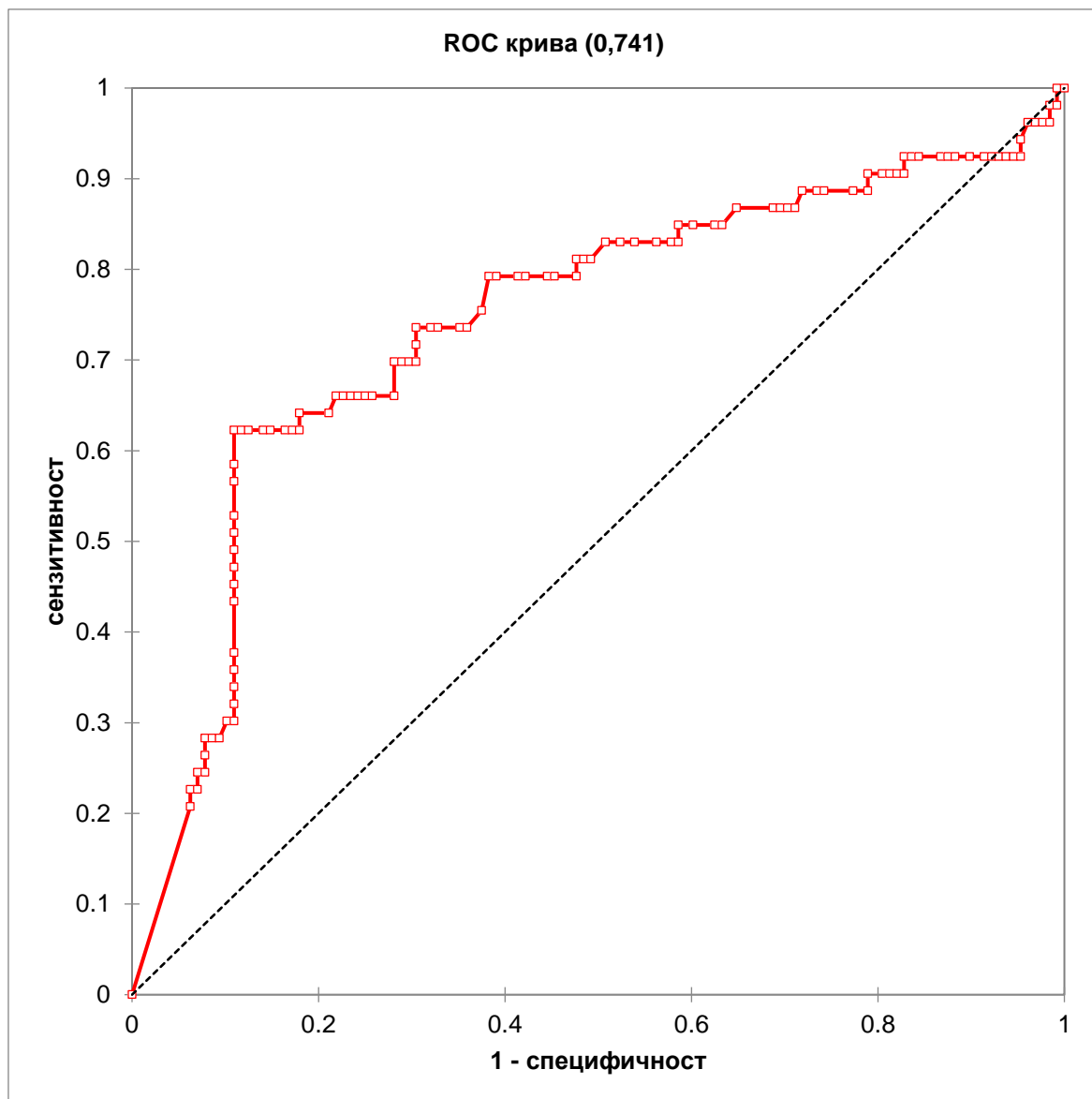
Графикон 33. Семиквантитативен резултат на култура на цврста подлога (Löwenstein-Jensen) според Ct-вредностите на тестот Xpert MTB/RIF

Анализите покажуваат дека постои статистичка значајност во разликите меѓу Ct-вредностите на тестот Xpert MTB/RIF и семиквантитативниот степен на позитивитет на култура на цврста подлога - Löwenstein-Jensen; постои високосигнификантна разлика со двонасочниот Kruskal-Wallis-ов тест ($p < 0,0001$). Тоа значи дека постои позитивна корелација меѓу двете методи за проценка на бактериската концентрација во спутумот – рангот на Ct-вредности на тестот Xpert MTB/RIF и степенот на позитивитет во резултатите од култура на цврста подлога по Löwenstein-Jensen.



Графикон 34. Логистичка регресија на Ct-вредностите на тестот Xpert MTB/RIF во однос на позитивноста на резултатите од култура на цврста подлога (Löwenstein-Jensen)

Логистичката регресиска анализа на Ct-вредностите на тестот Хpert MTB/RIF во однос на семиквантитативниот степен на позитивитет од културелното испитување на цврста подлога (Löwenstein-Jensen) покажа високосигнификантна разлика (Wald-ов тест; $p < 0,0001$). Тоа значи дека постои позитивна корелација меѓу двете методи за проценка на бактериската концентрација во спутумот – рангот на Ct-вредности на тестот Хpert MTB/RIF и степенот на позитивитет на резултатите од културелното испитување на цврста подлога (Löwenstein-Jensen).



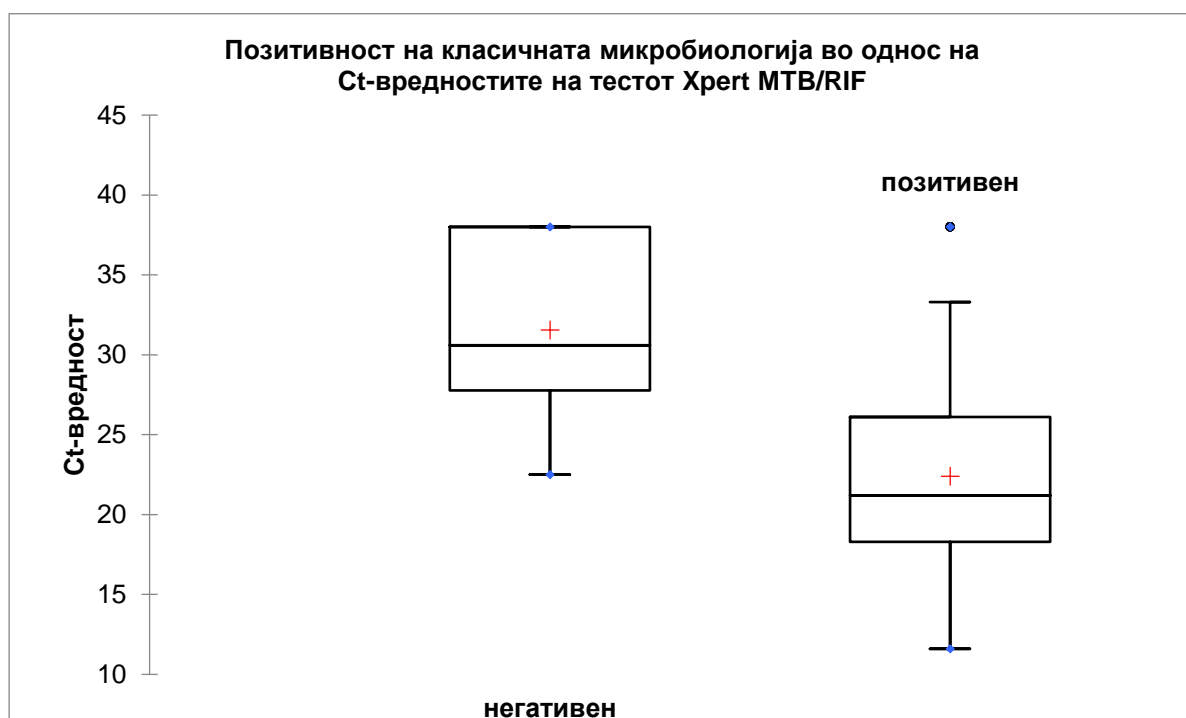
Графикон 35. Површината под кривата укажува на солиден однос на сензитивноста и специфичноста на евалуираниот тест

4.5.5. Корелација на Ct-вредностите на тестот Xpert MTB/RIF во однос на позитивноста на класичната микробиологија е прикажана во Табела 46, Графикон 36, 37 и 38.

Табела 46. Дескриптивна статистичка анализа на Ct-вредностите на тестот Xpert MTB/RIF во однос на позитивноста на класичната микробиологија

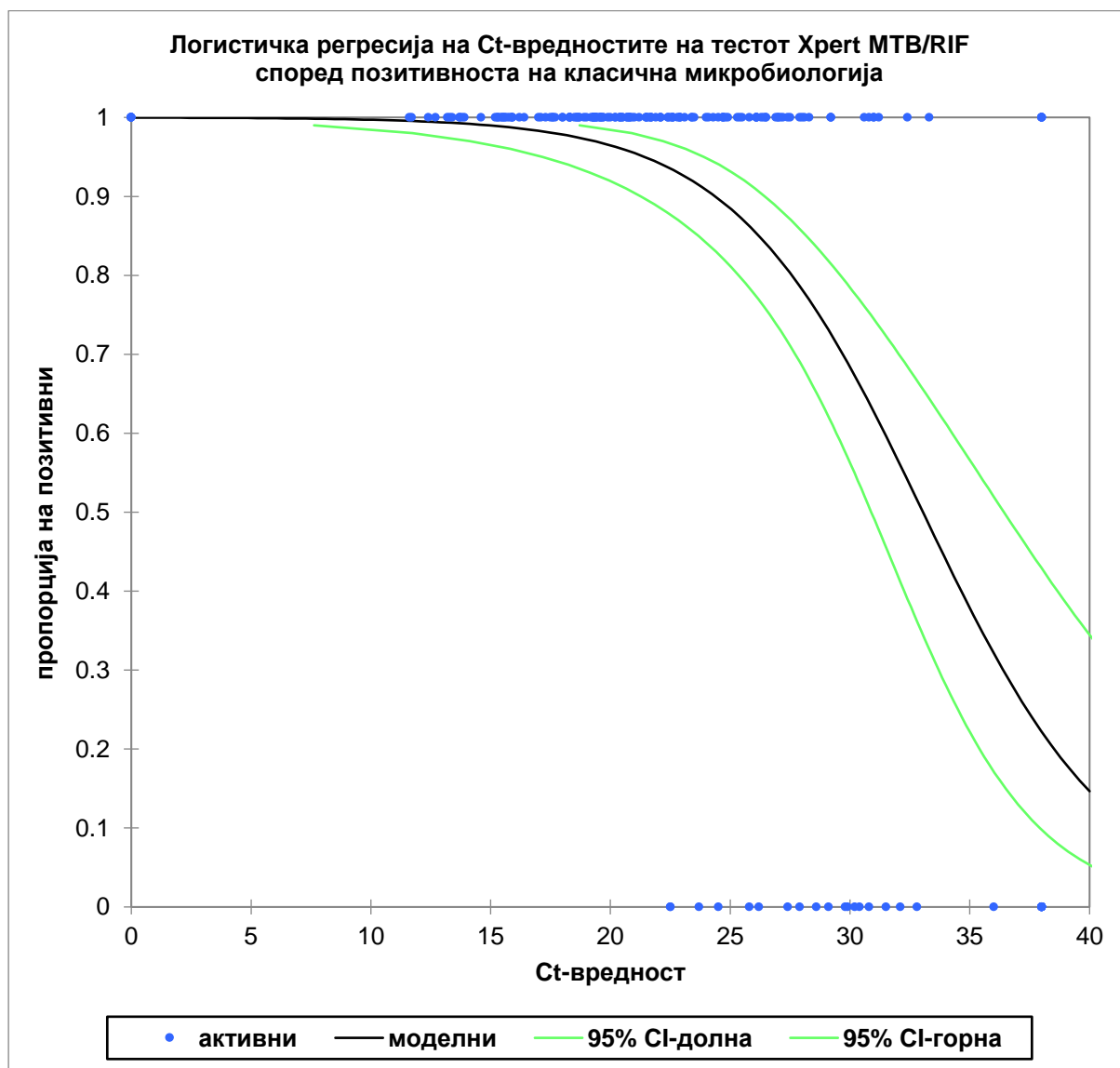
Параметар	Негативен	Позитивен	Mann-Whitney-ов тест
Култура и/или микроскопија (број на примероци)	28	157	<i>P</i>
Минимална Ct вредност	22,50	11,60	< 0,0001
Максимална Ct вредност	38,00	38,00	
Прв квантил	27,78	18,30	
Медијана	30,60	21,20	
Трет квантил	38,00	26,10	
Аритметичка средина	31,56	22,40	
Варијанса	29,17	39,58	
Стандардна девијација	5,40	6,29	

*Категоријата „класична микробиологија“ е дефинирана како позитивна кога која било од следниве три анализи е позитивна: директен микроскопски препарат, цврста култура (Löwenstein-Jensen) и течна култура (BACTEC MGIT 960)



Графикон 36. Позитивност на класична микробиологија во однос на Ct-вредностите на тестот Xpert MTB/RIF

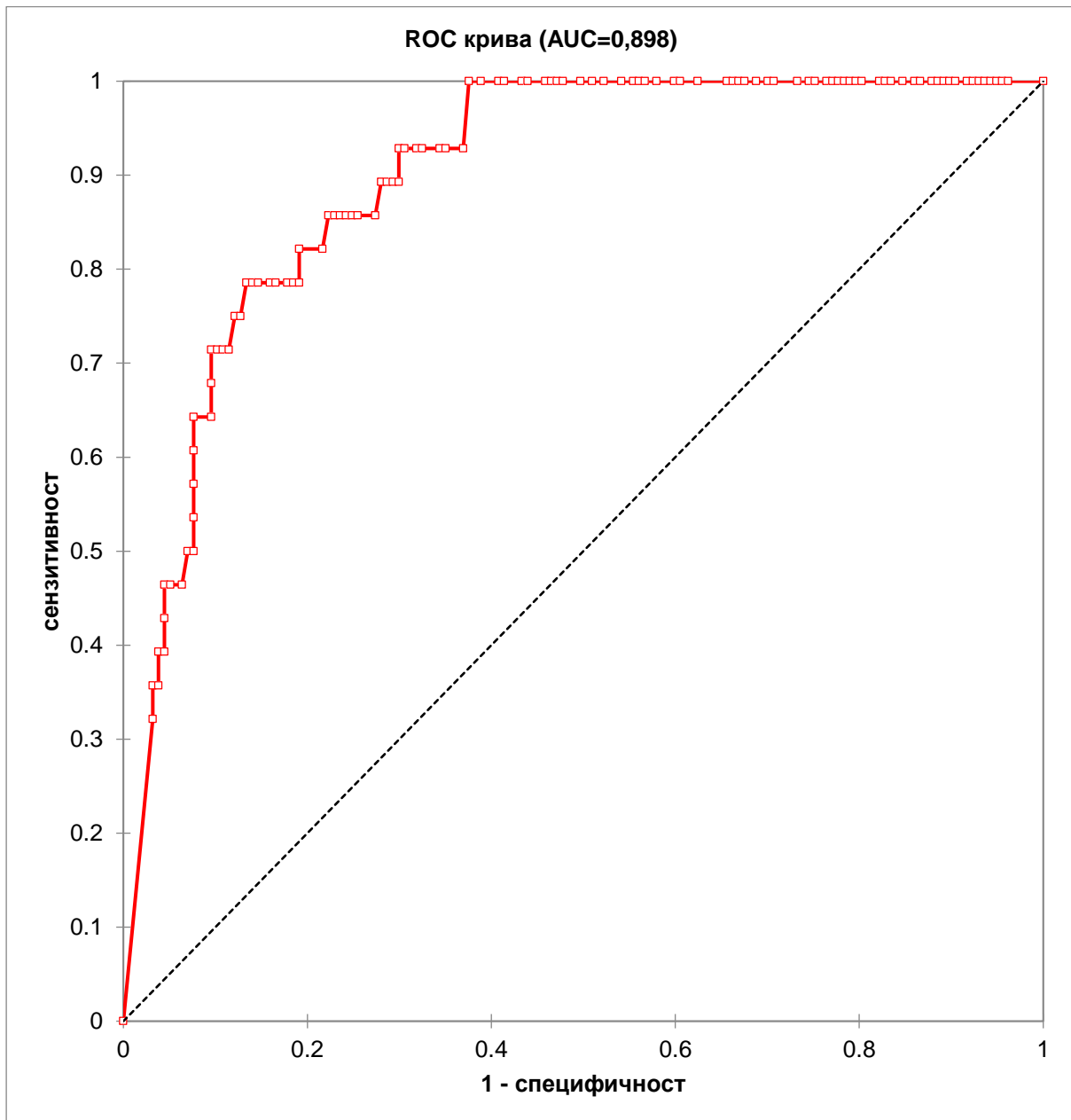
Резултатите од анализираните податоци покажуваат постоење на висока статистичка значајност во разликите меѓу Ct-вредноста на тестот Xpert MTB/RIF и позитивноста на класичната микробиологија (двонасочен Mann-Whitney тест со високо сигнификантна разлика; $p < 0,0001$). Тоа значи дека постои позитивна корелација меѓу конвенционалната дијагностика на туберкулоза и рангот на Ct-вредности на тестот Xpert MTB/RIF како репрезент на бактериската концентрација во спутумот.



Графикон 37. Логистичка регресиска анализа на Ct-вредностите на тестот Xpert MTB/RIF во однос на позитивноста на класичната микробиологија

*95% CI = граници на интервалот на доверливост при 95%; SE = стандардна грешка; OR = однос на шанси

Логистичката регресиска анализа на Ct-вредностите на тестот Xpert MTB/RIF во однос на позитивноста на класичната микробиологија покажа високосигнификантна разлика (Wald-ов тест; $p < 0,0001$). Тоа значи дека постои позитивна корелација меѓу групата на конвенционални методи за дијагноза на туберкулоза и рангот на Ct-вредности на тестот Xpert MTB/RIF како репрезент на бактериската концентрација во спутумот.



Графикон 38. Површината под кривата укажува на одличен однос на сензитивноста и специфичноста на евалуираниот тест

4.6. Споредба на поединечните класични методи и молекуларниот тест Xpert MTB/RIF со референтниот тест – детекција со кој било микробиолошки тест

4.6.1. Евалуацијата на директен микроскопски препарат во однос на референтниот тест - детекција со кој било микробиолошки тест (класичен или Xpert) е прикажана во **Табела 47**.

Табела 47. Споредба на тестот директен микроскопски препарат и референтниот тест– детекција со кој било микробиолошки тест (класичен или Xpert)

Параметар	Вредност	Граници на 95% CI	
		Долна	Горна
Сензитивност	51,12%	43,84%	58,36%
Специфичност	100,00%	59,03%	100,00%
Стапка на лажно позитивни	0,000	0,000	0,000
Стапка на лажно негативни	0,489	0,416	0,561
Позитивна предиктивна вредност (PPV)	1,000	1,000	1,000
Негативна предиктивна вредност (NPV)	0,074	0,021	0,128
Релативен ризик (RR)	1,080	1,021	1,144
Однос на шанси (OR)	/	/	/

*95% CI = интервал на доверливост при 95%

4.6.2. Евалуацијата на тестот цврста култура (Löwenstein-Jensen) во однос на референтниот тест - детекција со кој било микробиолошки тест (класичен или Xpert) е прикажана во **Табела 48**.

Табела 48. Споредба на цврста култура (Löwenstein-Jensen) и референтниот тест-детекција со кој било микробиолошки тест (класичен или Xpert)

Параметар	Вредност	Граници на 95% CI	
		Долна	Горна
Сензитивност	83,66%	76,90%	88,71%
Специфичност	100,00%	85,36%	100,00%
Стапка на лажно позитивни	0,000	0,000	0,000
Стапка на лажно негативни	0,163	0,106	0,221
Позитивна предиктивна вредност (PPV)	1,000	1,000	1,000
Негативна предиктивна вредност (NPV)	0,528	0,394	0,663
Релативен ризик (RR)	2,120	1,601	2,807
Однос на шанси (OR)	/	/	/

*95% CI = интервал на доверливост при 95%

4.6.3. Евалуацијата на тестот течна култура (ВАСТЕС MGIT 960) во однос на референтниот тест - детекција со кој било микробиолошки тест (класичен или Xpert) е прикажана во **Табела 49**.

Табела 49. Споредба на тестот течна култура (ВАСТЕС MGIT 960) и референтниот тест - детекција со кој било микробиолошки тест (класичен или Xpert)

Параметар	Вредност	Граници на 95% CI	
		Долна	Горна
Сензитивност	84,09%	76,79%	89,39%
Специфичност	100,00%	55,21%	100,00%
Стапка на лажно позитивни	0,000	0,000	0,000
Стапка на лажно негативни	0,159	0,098	0,221
Позитивна предиктивна вредност (PPV)	1,000	1,000	1,000
Негативна предиктивна вредност (NPV)	0,222	0,065	0,379
Релативен ризик (RR)	1,286	1,055	1,566
Однос на шанси (OR)	/	/	/

*95% CI = интервал на доверливост при 95%

4.6.4. Евалуација на тестот Xpert MTB/RIF во однос на референтниот тест – детекција со кој било микробиолошки тест (класичен или Xpert) е прикажана во **Табела 50**.

Табела 50. Споредба на тестот Xpert MTB/RIF и референтниот тест -детекција со кој било микробиолошки тест (класичен или Xpert)

Параметар	Вредност	Граници на 95% CI	
		Долна	Горна
Сензитивност	93,82%	89,12%	96,60%
Специфичност	100,00%	59,03%	100,00%
Стапка на лажно позитивни	0,000	0,000	0,000
Стапка на лажно негативни	0,062	0,027	0,097
Позитивна предиктивна вредност (PPV)	1,000	1,000	1,000
Негативна предиктивна вредност (NPV)	0,389	0,164	0,614
Релативен ризик (RR)	1,636	1,147	2,335
Однос на шанси (OR)	4,424	1,587	12,334

*95% CI = интервал на доверливост при 95%

Од резултатите може да се види дека при споредување на секој од употребените класични микробиолошки тестови и молекуларниот тест Xpert со референтниот тест – кој било микробиолошки тест, специфичноста има вредност 100%, а позитивната предиктивна вредност – 1. Покрај тоа, се следи постепен пораст на сензитивноста за

детекција на МТВС, почнувајќи од директниот микроскопски препарат, преку цврстата и течната култура, за највисока вредност на сензитивноста да постигне за Xpert – 93,82%.

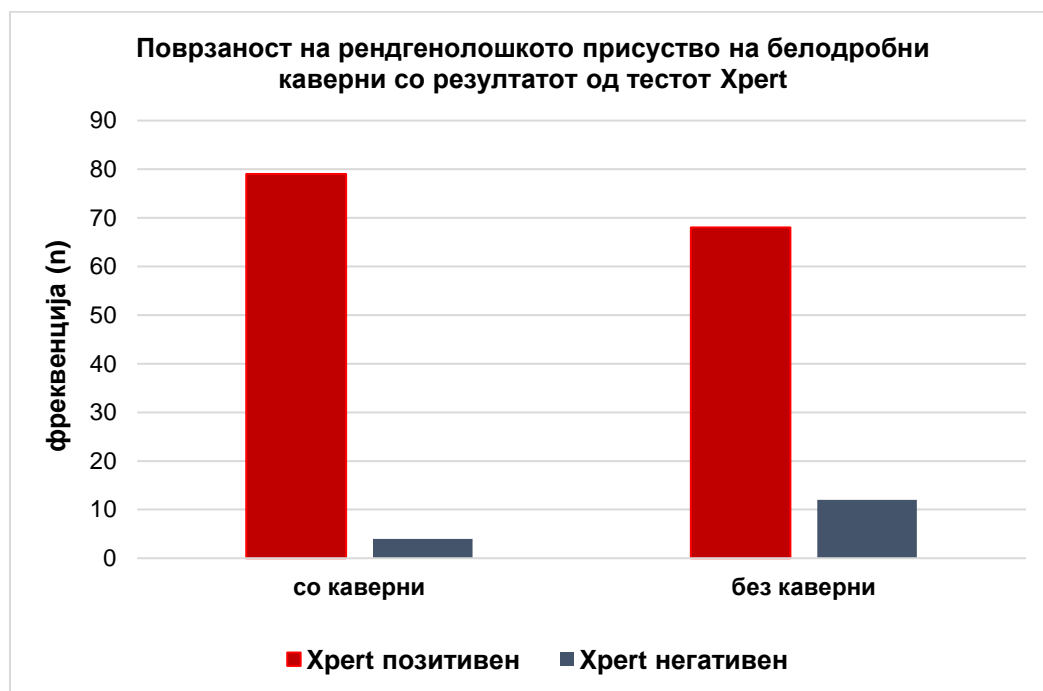
4.7. Евалуација на молекуларниот тест Xpert MTB/RIF кај значајни клинички состојби

4.7.1. Поврзаноста на рендгенолошко присуство на белодробни каверни и резултатот од Xpert MTB/RIF тестот е прикажана во Табела 51 и Графикон 39.

Табела 51. Однос меѓу рендгенолошкиот наод на кавернозна туберкулоза и резултатот од тестот Xpert MTB/RIF

РТГ присуство на белодробни каверни*	Со каверни		Без каверни		Fisher-ов тест **
	n	%	N	%	
Xpert MTB/RIF					0,036
Позитивен	79	95,18	68	85,00	
Негативен	4	4,82	12	15,00	
Вкупно пациенти	83	100,00	80	100,00	

*РТГ: пресметките се вршени само кај пациентите со рендгенографски докажана еднострана или двострана белодробна туберкулоза, без или со каверни; ** двонасочен.



Графикон 39. Однос меѓу рендгенолошкиот наод на кавернозна туберкулоза и резултатот од тестот Xpert MTB/RIF

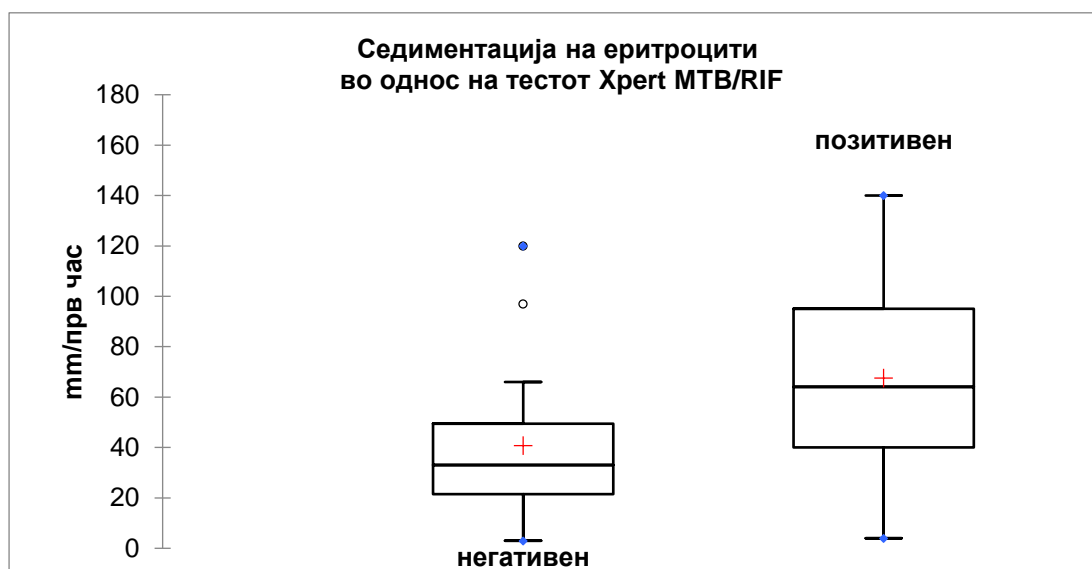
Анализата на податоците покажа постоење на високо сигнификантна поврзаност на рендгенографски докажаните еднострани или двострани белодробни каверни со резултатот од тестот Хpert MTB/RIF (позитивен или негативен) (двонасочен Fisher-ов тест; $p=0,036$).

4.7.2. Поврзаноста на покачената вредност на седиментација на еритроцити и резултатот од Хpert MTB/RIF тестот е прикажана во Табела 52 и Графикон 40.

4.7.3.

Табела 52. Дескриптивна статистичка анализа на седиментација на еритроцити според тестот Хpert MTB/RIF

Параметар	Хpert - негативен	Хpert- позитивен
Број на пациенти	15	145
Минимална	3,00	4,00
Максимална	120,00	140,00
Прв квантил	21,50	40,00
Медијана	33,00	64,00
Трет квантил	49,50	95,00
Аритметичка средина	40,87	67,61
Варијанса	1052,55	1179,89
Стандардна девијација	32,44	34,35



Графикон 40. Однос меѓу вредноста на седиментација на еритроцити и тестот Хpert MTB/RIF

Од резултатите може да се види дека постои статистичка значајност на разликите во седиментација на еритроцити (реактант на акутна фаза, маркер на инфламација) според тестот Хpert МТВ/РИФ (Mann-Whitney, $p=0,004$).

4.7.4. Дијабетес (Diabetes mellitus, шеќерна болест) и Хpert МТВ/РИФ

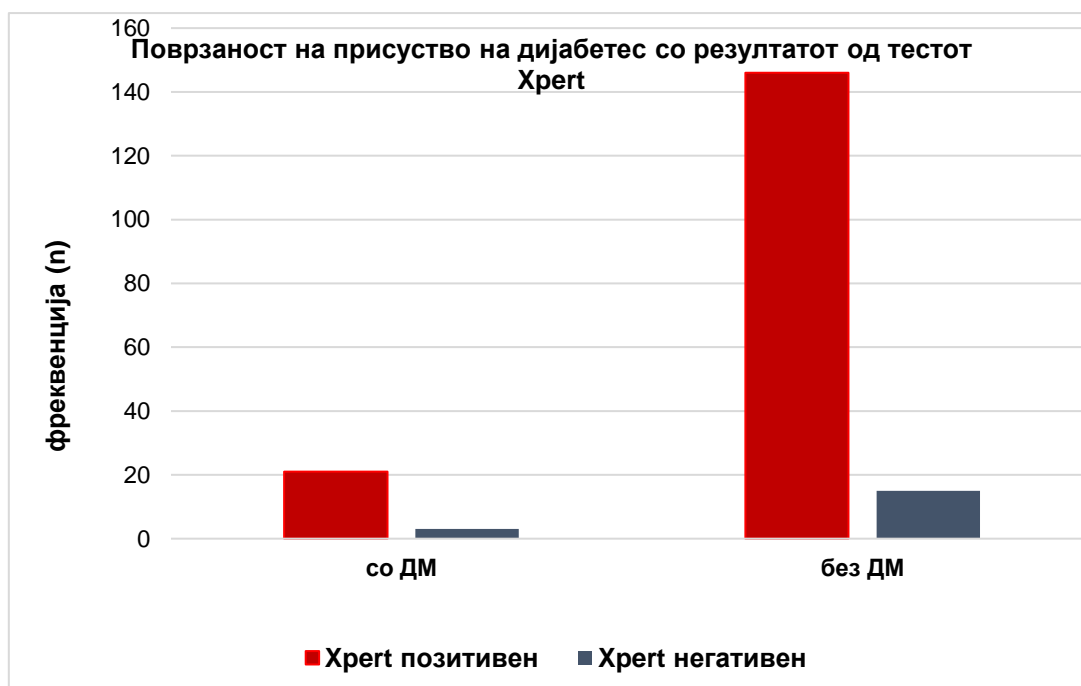
Поврзаноста на дијабетесот (ризик-фактор за туберкулоза) и резултатот од Хpert МТВ/РИФ тестот е прикажана во Табела 53 и Графикон 41.

Табела 53. Резултати од Хpert МТВ/РИФ тестот кај пациенти со и без Diabetes mellitus

Diabetes mellitus	со Diabetes mellitus		без Diabetes mellitus		Fisher-ов тест **
	n	%	N	%	
Хpert МТВ/РИФ					0,709
Позитивен	21	87,50	146	90,68	
Негативен	3	12,50	15	9,32	
Вкупно пациент/лекување	24	100,00	161	100,00	

**двонасочен

Од резултатите може да се види дека нема сигнификантна поврзаност на присуството на дијабетес со резултатот од тестот Хpert (позитивен или негативен) ($p=0,709$ со двонасочниот Fisher-ов тест).



Графикон 41. Однос меѓу присуството на дијабетес и резултатот од тестот Хpert МТВ/РИФ

4.7.5. Поврзаноста на претходно лекување (ризична група за туберкулоза) и резултатот од Xpert MTB/RIF тестот, бинарно и семиквантитативно во однос на Ct-вредностите, е прикажана во Табела 54 и 55, и Графикон 42 и 43.

Табела 54. Резултати од Xpert MTB/RIF тестот кај новозаболени и претходно лекувани од туберкулоза

Претходна дијагноза/ лекување од туберкулоза	Има		Нема		Fisher-ов тест **
	n	%	n	%	
Xpert MTB/RIF					P 0,743
Позитивен	27	93,10	140	89,74	
Негативен	2	6,90	16	10,26	
Вкупно пациент/ лекување	29	100,00	156	100,00	

**двонасочен

Од резултатите може да се види дека нема сигнификантна поврзаност на присуството на претходно лекување со резултатот од тестот Xpert (позитивен или негативен) ($p=0,743$ со двонасочниот Fisher-ов тест).

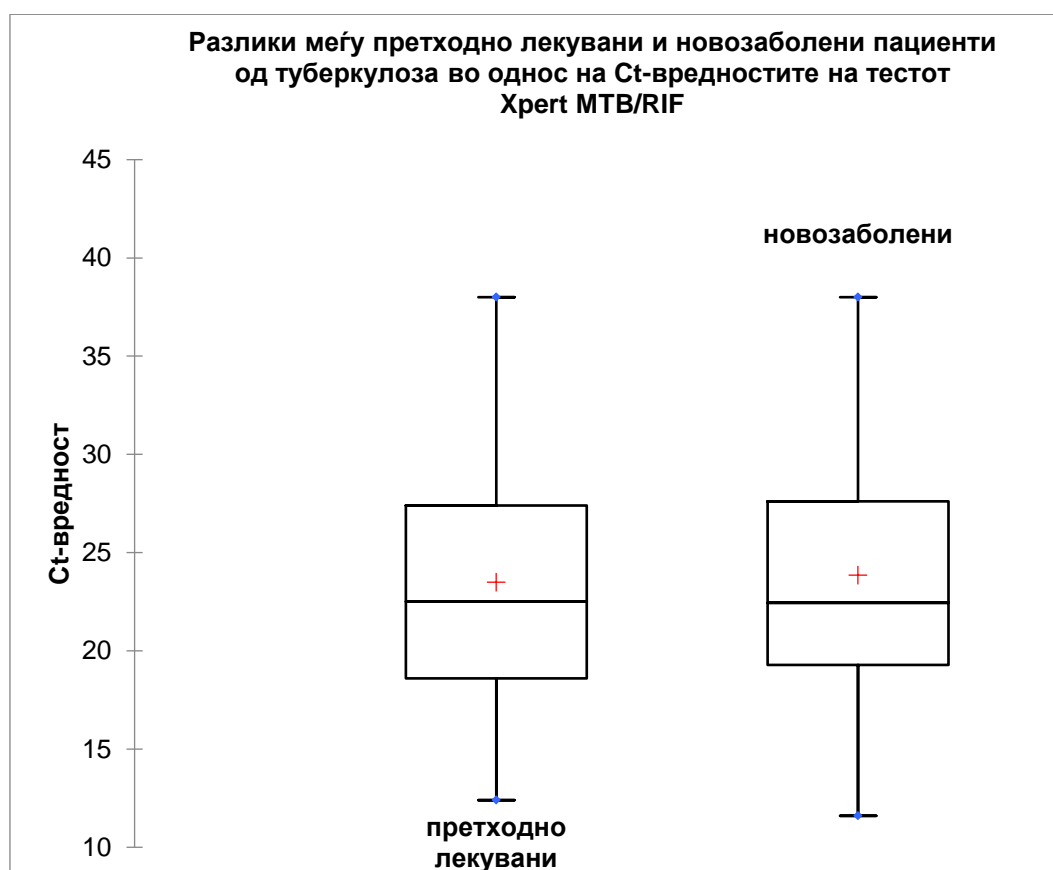


Графикон 42. Однос меѓу присуството на претходно лекување од туберкулоза и резултатот од тестот Xpert MTB/RIF

Табела 55. Однос меѓу семиквантитативните резултати (Ст-вредност) на претходно лекувани и новозаболени од туберкулоза (според пациент/лекување)

Параметар	Претходно лекувани	Новозаболени	Mann-Whitney-ов тест
Број на примероци	29	156	<i>p</i>
Минимална	12,40	11,60	0,732
Максимална	38,00	38,00	
Прв квартил	18,60	19,28	
Медијана	22,50	22,45	
Трет квартил	27,40	27,60	
Аритметичка средина	23,49	23,84	
Варијанса	54,80	47,86	
Стандардна девијација	7,40	6,92	

Статистичката анализа покажува отсуство на сигнификантни разлики меѓу Ст-вредностите на Xpert-тестот кај пациентите кои биле претходно лекувани од туберкулоза во споредба со новозаболениите ($p > 0,05$ со Mann-Whitney-ов тест).



Графикон 43. Однос на Ст-вредностите на Xpert MTB/RIF кај претходно лекувани и новозаболени од туберкулоза

5. ДИСКУСИЈА

Во оваа студија е евалуиран молекуларниот тест за брза детекција на туберкулоза и резистенција кон рифампицин (Xpert MTB/RIF, Cepheid, Sunnville, USA) [169, 171, 174, 177, 178, 278] во однос на класичните микробиолошки методи, како и клиничките карактеристики на 180 пациенти со белодробна туберкулоза. Пет пациенти се лекувани два пати во временскиот период опфатен со студијата, поради што за нив се анализирани по два респираторни примероци.

Во однос на основните демографски податоци, во студијата доминираше машката популација (во приближен сооднос 2:1), со просечна возраст од 45,69 (16-89) години и два возрастни пика (во ранг од 20-30 години и 45-55 години). Во најголем дел потекнуваа од урбана средина (58,33%), со основно и средно образование (38,89% и 46,66%, соодветно) и претежно невработени (40,56%) [Табела 15, 16, 17; Графикон 10, 11, 12]. Овие податоци во најголем дел корелираат со глобалните, како и со демографскиот тренд на туберкулоза во Република Македонија од 2007 година наваму [8, 258, 259, 260]. Составот во однос на образованието и работниот статус не е за изненадување, ако се земат предвид миграциските процеси во земјата во последните 2-3 децении [283].

Од ризичните групи за туберкулоза, дури 56/180 пациенти (31,11%) дадоа податок за близок личен контакт/контакт во семејството со болен од туберкулоза [Табела 18]. Од нив, кај 25/180 пациенти (13,89%) се работи за контакт со болен од туберкулоза во период до 2 години пред поставување на актуелната дијагноза, што може да биде значаен епидемиолошки индикатор од аспект на трансмисија на болеста и контрола на инфекција кај туберкулозата [43, 114, 188]. Од ризик-факторите асоцирани со туберкулоза, доминираше пушењето (кај 58,89% од пациентите), додека останатите (дијабетес, алкохолизам, наркоманија и имуносупресија) беа застапени во помал процент (13,33%, 11,11%, 3,33% и 3,33% соодветно) [Табела 18, Графикон 13] [13, 14, 15]. Подгрупата на претходно лекувани од туберкулоза ја сочинуваа 27/180 пациенти (15%) [Табела 19, Графикон 14], што корелира со трендот во Република Македонија во периодот 2007-2017 година (претходно лекувани во ранг од 8,1-15,2%) [Графикон 7] [258, 259]. Оваа бројка е нешто повисока во однос на бројот на претходно лекувани во 2016 и 2017 во земјата (8,6% и 10,1%, соодветно), но тоа е разбирливо кога ќе се земе предвид употребата на молекуларните тестови за детекција на резистенција на антитуберкулотски лекови кај лица претходно лекувани од туберкулоза [8, 68, 197].

Најчестиот симптом на белодробната туберкулоза во нашата студија беше кашлицата (неспецифичен респираторен симптом), додека хемоптизиите не беа толку чести (96,76% и 12,43% соодветно) [Табела 20, Графикон 15] како што е потврдено и од други автори [107, 112]. Во поглед на времетраење на симптомите, доминираше групата од 76/185 пациенти (41,08%) со период подолг од два месеца до почнување со терапија (не сметајќи го притоа времето потребно за дијагностицирање на болеста) [Табела 21, Графикон 16]. Оваа временска рамка го надминува препорачаното времетраење на кашлицата од 2-3 недели – што бара натамошна инвестиција во правец на туберкулоза [107, 112] - и претставува индикатор на потенцијална трансмисија на туберкулозата во заедницата [284].

Испитувањето на примероците со класични микробиолошки методи покажа позитивен наод на флуоресцентна микроскопија кај 91/185 (49,19%), додека кај 152/185 (82,16%) беше добиен позитивен наод во култура [Табела 37]. Во групата на микроскопски потврдена туберкулоза најголем процент примероци беа со (1+) степен на позитивитет (30,27%) [Табела 24, Графикон 19]. Структурата на културелно позитивните примероци е прикажана во табелите 26 и 36: кај 111/144 (60%) е добиен позитивен наод во течна (ВАСТЕС MGIT 960), а кај 128/185 (69,19%) во цврста култура (Löwenstein-Jensen); кај 87/144 (60,42%) примероци е добиен позитивен наод и на двете подлоги. И кај културелно позитивните примероци на цврста подлога (Löwenstein-Jensen) најзастапена беше групата со (1+) степен на позитивитет (23,78%) [Табела 25, Графикон 20]. Како одраз на повисоката сензитивност, култивирањето на течна подлога дава побрзи резултати, т.е. има пократко време до позитивитет (time to positivity, ТТР) [Графикон 21] [285].

Во контекст на екстремно високата стапка на морталитет од туберкулоза кај ХИВ-позитивните, Светската здравствена организација препорачува рутинско ХИВ-тестирање кај сите пациенти со туберкулоза [8]. Во испитуваниот примерок со ХИВ-тестирање беа опфатени 168/185 (90,81%) и кај сите тестирани беше добиен негативен резултат [Табела 22, Графикон 17]. Според тоа, коинфекцијата ХИВ-туберкулоза засега не претставува јавно-здравствен проблем во Република Македонија и нема влијание врз резултатите добиени во нашата студија, споредено со студии во услови со значајна преваленца на ХИВ [12, 143, 212, 231, 232, 244].

Во структурата на пациент-лекување најмногубројни беа примероците од новозаболени т.е. оние што прв пат се лекуваат од туберкулоза – 156/185 (84,32%), додека 29/185 (15,68%) од примероците потекнуваа од претходно лекувани пациенти

[Табела 23, Графикон 18]. Кај сите пациенти беше ординирана соодветна антитуберкулотска терапија, со следење на ефектот од терапијата според препораките и протоколите на Светската здравствена организација [55, 68, 69, 134, 197]. Кај најголем процент 158/185 (85,40%) предвидениот тераписки режим беше успешно завршен, а нус-појавите од антитуберкулотските лекови беа регистрирани кај 20/185 (10,81%), односно не беа честа манифестација. На исходот на болеста „умрен“ кај 13/185 (7,03%), секако дека имаа влијание коморбидните состојби присутни кај дури 86/185 (46,49%) од пациентите, како и возрасната структура (околу 1/3 од пациентите беа на возраст над 55 години) [Табела 23; Графикон 11, 18]. Инаку, Македонија е земја со ниска стапка на морталитет од туберкулоза (0,3/100 000 за 2017 година) [Графикон 5] [8, 258, 259, 260].

Во нашиот примерок испитавме дали постои корелација меѓу Xpert-тестот (позитивен/негативен) и неколку клинички параметри. Анализите покажаа постоење на високосигнификантна поврзаност меѓу Xpert и рендгенолошкиот наод на кавернозна туберкулоза, што е разбирливо кога ќе се земе предвид дека кавернозната туберкулоза е најинфективниот облик на болеста, а Ct-вредноста на Xpert е мерка за бациларната концентрација во спутумот [Табела 51, Графикон 39] [2, 56, 284, 286, 287]. Резултатите покажаа и статистичка значајност на разликите во седиментација на еритроцити (како реактант на акутна фаза) според тестот Xpert MTB/RIF (Mann-Whitney тест; $p=0,004$) [Табела 52, Графикон 40]. Во достапната литература не наидовме на студија за споредба бидејќи компарацијата главно се врши со други посовремени маркери на инфламацијата (CRP, procalcitonin) [288, 289]. Овој податок зборува во прилог на реестаблирање на оваа едноставна, брза и евтина метода како маркер на инфламацијата кај туберкулозата. Анализите не покажаа постоење на сигнификантна поврзаност со дијабетесот како коморбидитет, ниту со претходното лекување од туберкулоза [Табела 53, 54, 55; Графикон 41, 42, 43]. Исто така, кај претходно лекуваните беше утврдена резистенција на рифампицин ниту постоење на MDR-TB, ниту со класичните ниту со молекуларните методи. Последното не е очекуван наод, ако се земе предвид дека токму кај претходно лекуваните се очекува поголем потенцијал за детекција на резистенција [8, 68, 197, 236].

Микроскопијата на директниот препарат е вообичаен и сè уште најшироко употребуван тест за дијагноза на белодробна туберкулоза, особено во ниско и средно-приходните земји, и покрај бројните недостатоци: ниската сензитивност од 50-60% [34, 123, 124] [Табела 39], потребата од специјално обучен персонал и соодветна инфраструктура и апаратура и најмалку два примероци на спутум за анализа. Истовремено, методата не дава информација за резистенција на микобактериите, ниту

дали се работи за нетуберкулозни микобактерии (nontuberculous mycobacteria, NTM) – за кои дијагностичкиот и терапискиот пристап е различен од оној кај белодробната туберкулоза предизвикана од МТВС [123]. Микроскопијата не може да направи разлика меѓу вијабилни и невијабилни бацили, што ѝ дава потенцијал за лажно-позитивни резултати и ниска позитивна предиктивна вредност (ППВ). Во изминатата деценија, Светската здравствена организација направи напор за воспоставување на контрола на инфекцијата и надминување на растечкиот проблем со туберкулозата-резистентна на лекови по пат на имплементација на нови молекуларни техники за детекција на *M. tuberculosis* и испитување на чувствителност кон антитуберкулотски лекови. Од мноштвото молекуларни тестови кои се достапни на пазарот, СЗО официјално ги одобри и препорача следниве методи за брза дијагноза на туберкулоза и одредување на профилот на резистенција: Line Probe Assays (LPA) во 2008 година и Xpert MTB/RIF-тестот во 2010 година [169, 175, 182].

Првичните резултати (до крајот на 2010 година) од клинички контролирани валидирачки студии [249], при тестирање на еден примерок на спутум, реферираат за сензитивност на Xpert MTB/RIF од 92,2% кај култура-позитивните испитаници, односно 72,5% (90,2% ако се тестираат три примероци) кај микроскопски негативни-култура позитивните, и специфичност од 99%; детекцијата на резистенцијата кон рифампицин е со сензитивност од 99,1% и специфичност од 100%.

Од иницијалната препорака на СЗО и воведувањето на Xpert MTB/RIF во 2010 година публикувани се многу студии и повеќе прегледи кои го евалуираат тестот во споредба со класичните дијагностички методи. Најголемиот дел од нив се фокусирани на земјите со висока инциденца на туберкулоза [290-297], додека придонесот на земјите со ниска инциденца е со многу помал број рапорти [259, 298-305]. Република Македонија е земја со инциденца на туберкулоза во континуирано опаѓање, блиску до земјите со ниска инциденца (10,6/100 000 популација во 2017) [8, 258-260]. Значајно е што во оваа студија за прв пат се евалуира Xpert-тестот во Република Македонија и воопшто еден молекуларен тест за дијагноза на туберкулоза во нашата земја.

Кратко по одобрувањето од Светската здравствена организација, Ling, Zwerling и Pai направија метаанализа во која ја евалуираат изведбата на најчесто употребуваниот LPA - GenoType MTBDR [306]. Сумирано, GenoType MTBDR-тестот покажува одлична точност за резистенција кон рифампицин (кумулирана сензитивност и специфичност проценета на 98,1% и 98,7%, соодветно). За изониазид тестот покажува извонредна специфичност (99,5%), додека проценката на сензитивноста покажува умерен и

варијабилен резултат (84,3%). Слично на ова, прегледот во базата на Cochrane од јануари 2014 година, со кој се опфатени 9557 учесници во 27 студии за белодробна туберкулоза кај возрасна популација, покажува дека Xpert MTB/RIF е точен тест во поглед на детекција на резистенцијата кон рифампицин, сензитивен (95%) и специфичен (98%) [255]. Исто така, во однос на микроскопијата покажува многу поголема точност за дијагностицирање на туберкулозата: високо сензитивен (89%), ги открива речиси сите случаи и специфичен (99%). Сумираните заклучоци од авторската работна група на Cochrane се дека се работи за сензитивен и специфичен тест, кој – во споредба со директната микроскопија - значително може да ја зголеми детекцијата на МТВС кај култура-позитивните случаи. Во поглед на детекцијата на резистенција на рифампицин, се работи за тест кој обезбедува точни резултати и на тој начин дозволува рано и навремено отпочнување на терапија за MDR-TB (т.е. додека се чекаат резултатите од класичните микробиолошки методи за културелно испитување на микобактериите и фенотипското испитување на резистенција). Слично на ова, последниот обновен прирачник на СЗО за имплементација на Xpert MTB/RIF од 2013 год. содржи проширена индикација за имплементација на овој тест, односно препорака за употреба на Xpert MTB/RIF како иницијален дијагностички тест кај сите возрасни лица со сомневање за туберкулоза, давајќи му предност пред класичната микроскопија и културата кои го чинат стандардниот протокол за иницијална дијагностичка проценка кај туберкулоза [171, 177].

Метаанализата на Kaur et al. во 2016 година заклучува дека сензитивноста и специфичноста на Xpert-тестот се повисоки од микроскопијата, течната и цврстата култура, а истовремено тестот е многу помалку склон кон контаминација и при манипулацијата не носи биобезбедносен ризик [307].

Во нашата студија беше опфатен двегодишен период (2016 и 2017 година) со 185 респираторни примероци кои ги испитавме со класичните микробиолошки методи и тестот Xpert. Во споредба со културелното испитување како „златен стандард“, тестот Xpert покажа висока кумулирана сензитивност од 92,76% (95% CI: 87,42-96,33%) [Табела 40], што е слично со вредностите рапортирани од Rice [299] и повисоко од оние на Lombardi et al. [298], кои се исто така добиени со истражување во услови на ниска инциденца на туберкулоза. Со оглед дека и истражувањето на Lombardi et al. е изведено во концентриран седимент, повисоката сензитивност во нашата студија може само делумно да се објасни со начинот на обработка на примерокот; сметаме дека поголем придонес имаат изведбата на самиот тест и влијанието на добропознатите географски и

епидемиолошки разлики во циркулирачките соеви на МТВС [8, 18, 20, 71, 261-267]. Покрај влијанието врз стапката на сензитивност, варијациите во географската дистрибуција на соевите на МТВС, заедно со можноста од присуството на инхибитори на PCR и пониската бактериска концентрација кај AFB-оскудно позитивните или негативните примероци, би можеле да дадат објаснување за лажно-негативните резултати на тестот Xpert [290, 299, 308]. Имено, кај 9/152 [Табела 37] од култура позитивните примероци беше добиен негативен наод за AFB и Xpert. Од нив само кај еден примерок културата (LJ) беше со позитивитет (2+), кај два примерока (1+), а другите беа оскудно позитивни; кај три примероци една од двете култури (LJ или BT) беше контаминирана.

Кумулираната сензитивност на Xpert изнесува 92,76% кај култура-позитивните, односно 97,80% кај сите микроскопски-позитивни и 82,98% кај сите микроскопски-негативни примероци, соодветно [Табела 41]. Земајќи ја културата како „златен стандард“, сензитивноста од 97,67% кај микроскопски позитивните-култура позитивните и 86,36% кај микроскопски негативните-култура позитивните примероци е во согласност со наодите на другите истражувачи кои реферираат сензитивност во ранг 94,7-100% и 74,5-92,96% соодветно [255, 299-203, 305], и повисока [298, 304], како и со препораките на СЗО за карактеристиките што треба да ги поседува еден дијагностички тест за туберкулоза [247]. Овој резултат е многу важен поради тоа што кај микроскопски позитивните примероци овозможува разликување на МТВС од другите микобактерии и проценка на чувствителноста кон рифампицин во моментот на поставување дијагноза на туберкулоза [255, 298-301, 309].

Во поглед на микроскопски-негативните примероци, нашата студија е во рангот на вредности во досега објавени студии (од 46% до 86,55%), и тоа блиску до горната рапортирана вредност [255, 256, 308-312]. Вредноста добиена во испитуваниот примерок за сензитивност на микроскопски негативните-култура позитивни примероци е дури и повисока од онаа во прегледот од датабазата на Cochrane од 2014 година (86,36% наспроти 67%). Во нашата студија, Xpert овозможи рана детекција на туберкулозата кај 78 од вкупно 185 (42,16%) односно 78 од 94 микроскопски-негативни примероци (82,98%), и кај 57 од вкупно 152 културелно позитивни (37,5%) односно 57 од 66 (86,36%) микроскопски негативни-културелно позитивни примероци. Со ова детекцијата на белодробната туберкулоза се зголеми за 41,08% во целата кохорта односно за 36,18% во подгрупата на културелно потврдена туберкулоза, споредено со микроскопијата (т.н. „додадена вредност на Xpert“, Δ Xpert vs микроскопија) [Табела 41]. Сензитивноста на

тестот Xpert MTB/RIF кај микроскопски-негативните примероци е уште поважна, бидејќи овозможува поставување брза дијагноза на туберкулозата – односно за 2 часа од оставањето на примерокот за анализа. Крајниот ефект од изведбата на Xpert и кај микроскопски-негативните и кај микроскопски-позитивните подгрупи е рано почнување на соодветен антитуберкулотски режим на лекување, т.е. скратување на времето од 6 до 12 недели (колку што изнесува потребното време за класичните фенотипски методи на културелно испитување и DST) практично на помалку од 24 часа. Ова се однесува на 167/185 (90,27%) од пациентите од кои 89/185 (48,11%) микроскопски-позитивни и 78/185 (42,16%) микроскопски-негативни [Табела 31, 32].

Кај микроскопски негативните-Xpert позитивни примероци, употребата на Xpert го скрати времето до поставување дијагноза од 28,10 денови (колку што во просек е потребно за културелно испитување) и добивање на резултат од pDST за рифампицин од 59,28 денови (колку што во просек е потребно за индиректниот пропорционален метод) - на 1 ден [Табела 30, Графикон 24] [255, 256, 293, 297]. Кога ќе се земе предвид дека чувствителноста кон рифампицин е базичниот параметар за тераписка одлука [68, 69, 187], тогаш претходната заштеда на време за потврда на болеста и базична проценка на резистенција го прави овој пристап ефективен и исплатлив за дијагноза на белодробната туберкулоза [313].

Во студијата Xpert-тестот покажа ниска специфичност (22,58%; 95%CI: 9,59-41,10), за сметка на високата сензитивност. Нашите резултати во тој поглед отстапуваат од оние објавени од други истражувачи [298-305]. Од друга страна, тоа и не е за изненадување ако се земе предвид дека како компаратор за овој статистички параметар е земено класичното културелно испитување, кое сепак е несовршен „златен стандард“ [107, 142-146]. Имено, кај 33 примероци (17,84%) беше добиен негативен наод со културелно испитување во анализираниот респираторен примерок [Табела 27, 28; Графикон 22]. Ваквиот резултат одговара на досегашното глобално искуство, кое рапортира за 10-20 % негативен наод во култура кај пациенти со туберкулоза [107, 142-146]. За да се објаснат можните причини за ниската специфичност во споредба со културелното испитување, потребно е да се разгледа структурата на пациенти со култура-негативен наод:

1. Кај 5/33 (15,15%) од овие пациенти (4 со негативен наод од култура и 1 со контаминирана култура) во истиот респираторен примерок беше добиен позитивен наод на микроскопија и на Xpert – што зборува за присуство на туберкулозни бацили во испитуваниот примерок, но со слаба вијабилност и/или недоволна бактериска

концентрација [Табела 37] [299]. Во контекст на последното, вкупно 9 (27,27%) од овие 33 пациенти, претходно имаа анализа на друг респираторен примерок - кој не ги исполнуваше условите за да биде вклучен во студијата, но од кој беше добиен позитивен наод во култура за МТВС. Кога овој примерок би се вклучил во статистичката пресметка, специфичноста на молекуларниот тест би се зголемила на 31,82%. Понатаму, направивме компарација на секоја од употребените четири микробиолошки методи со кумулиран резултат од другите три, што во достапната литература досега не го сретнавме [Табела 47, 48, 49, 50]. Од приложената анализа може да се види постепен пораст на сензитивноста за детекција на МТВС – тргнувајќи од микроскопијата, преку испитувањето во цврста и течна култура, завршувајќи со Xpert. Финално, Xpert-тестот компариран со класичната микробиологија покажа сензитивност од 93,82% и специфичност од 100% - што корелира со наодите на другите автори [298-305].

2. Кај значајна бројка од 18 испитувани примероци (што претставува 54,55% од култура-негативните, односно 9,73% од вкупниот број примероци) молекуларниот тест Xpert беше единствениот микробиолошки метод за поставување на дијагноза на туберкулозата [Табела 36, 37, 38]. Станува збор за група пациенти со клинички, рендгенолошки и епидемиолошки високосуспектна туберкулоза, кај која класичните методи покажаа негативен резултат во испитуваниот примерок. Во клиничката практика тоа значи дека без молекуларниот тест тие би останале со недијагностицирана туберкулоза и без податок за резистенција на најважниот антитуберкулотски лек (рифампицин), врз основа на кој се донесува терапевската одлука. На тој начин би добиле група од 18 пациенти со прогресија на болеста и потенцијален извор на инфекција во заедницата. Имено, ризикот од трансмисија на туберкулозата кај микроскопски негативните пациенти е добро познат во литературата [38, 57-61].

3. На крај, вредно е да се спомне дека во текот на 2016-2017 година во Институтот за белодробни заболувања и туберкулоза во Скопје се испитани 2314 различни биолошки примероци со молекуларниот тест Xpert, од кои 1889 со валиден резултат во респираторен примерок [314]. Од 197 позитивни резултати, кај само еден е арбитарно поставено сомневање за потенцијално лажно позитивен резултат. Во групата со негативни резултати за Xpert не е поставена дијагноза за туберкулоза. Статистичката анализа на оваа група, во споредба со групата болни со туберкулоза, би покажала специфичност и негативна предиктивна вредност еднаква на 100%.

Аналитичкиот лимит на детекција со Xpert, дефиниран како минимален број бацили кои можат да се детектираат со 95% CI, изнесува 131 CFU (colony forming units,

формирани колонии од микроорганизмот)/ml спутум (95% CI: 106–176) [278, 286, 287]. Во однос на геномската DNA на *M. tuberculosis*, лимитот за детекција (95% сензитивност) изнесува 4,5 геномски копии (95% CI: 3,3-9,7) [286]. За споредба, лимитот за детекција во автоматизираната течна култура е во опсег од 10–100 CFU/ml, а за светлосната микроскопија е 5000-10 000 CFU/ml [33, 250]. Според тоа, сензитивноста на Xpert е приближно 50-100 пати поголема во однос на онаа на микроскопијата, а се приближува на онаа на течната култура [250, 315].

Ct-вредноста на тестот (Cycle threshold, циклус на прагот), која се дефинира како број на PCR-циклуси по кој секоја од петте проби се смета за позитивна, овозможува семиквантитативна мерка на бактериската концентрација во спутумот [286, 287], при што повисоките Ct-вредности рефлектираат пониска бациларна концентрација. Според тоа, бациларната концентрација на *Mycobacterium tuberculosis* корелира со статусот на директниот микроскопски препарат, времето до позитивитет на течната култура (time to culture positivity, TTP) и Ct-вредностите на Xpert [316]. Корелацијата на статусот на директниот микроскопски препарат со бациларната концентрација се користи како маркер за тежината на туберкулозата, на инфективноста на пациентот, т.е. потенцијалот за трансмисија и како водич за тераписките одлуки [68, 111, 135]. Но проценката на бациларната концентрација преку статусот на директниот микроскопски препарат е прилично крута и може само грубо да ги подели примероците на „позитивни“ и „негативни“. Покрај тоа, во средини каде што Xpert согласно со препораките на СЗО се користи како иницијален дијагностички тест за туберкулоза наместо микроскопија (пр. Јужна Африка) [178], потребна е алтернативна мерка за бациларната концентрација која би корелирала со позитивитетот на директниот микроскопски препарат, односно би била биомаркер за предикција на тежината на болеста и нејзината трансмисивност (т.е. за активно испитување на контакти). Потенцијално Ct-вредноста на Xpert би можела да биде таков маркер.

До денес се изведени мал број студии кои покажуваат корелација на Ct-вредноста на Xpert со TTP [287, 317, 318], односно умерена корелација [319]. Различни студии [287, 308, 316-318, 320-322] рапортираат за позитивна корелација на семиквантитативната проценка на бактериската концентрација во спутумот, изразена преку Ct-вредноста на Xpert, со статусот на директниот микроскопски препарат на пациентите. Просечните Ct-вредности кај микроскопски-позитивните примероци се сигнификантно пониски отколку кај микроскопски-негативните. И Lange et al. [315] во нивната метаанализа од 2017 година нашле сигнификантно пониска просечна Ct-вредност за микроскопски-

позитивните примероци (22,0; 95% CI: 21,5–22,6) отколку за микроскопски-негативните примероци (29,3; 95% CI: 28,1–30,5), сугерирајќи cut-off Ct-вредности од 27,7 и 31,8 за предикција на позитивен директен микроскопски препарат со 85% и 95% сензитивност, соодветно. Очекувано, последново е за сметка на намалување на специфичноста (67% и 35%, соодветно) и позитивната предиктивна вредност.

Аналогно на претходното, во нашата студија утврдивме постоење на корелација меѓу бациларната концентрација во спутумот, односно Ct-вредноста на Xpert-тестот и поединечните класични микробиолошки методи. Во однос на степенот на позитивитет на директниот микроскопски препарат, постои инверзна корелација меѓу Ct- вредностите на тестот Xpert MTB/RIF и семиквантитативните микроскопски резултати на директниот препарат. Оттаму, Ct-вредностите се повисоки кај примероците со пооскудно присуство на бактериски клетки при микроскопската флуоресцентна анализа на директниот препарат од респираторен примерок (двонасочен Kruskal-Wallis-ов тест; $p < 0,0001$) [Табела 43, Графикон 27]. Логистичката регресијска анализа на Ct-вредностите на тестот Xpert MTB/RIF, во однос на семиквантитативните микроскопски резултати на директниот препарат, покажа високосигнификантна разлика (Wald-ов тест; $p < 0,0001$) [Графикон 28]. Регресијската анализа на варијансата (ANOVA-тест) на семиквантитативниот микроскопски резултат на директниот препарат во однос на Ct-вредностите од Xpert-тестот покажа високосигнификантна разлика ($p < 0,0001$), што е во согласност со наодите на погорецитираните автори. Дополнително, површината под ROC-кривата укажува на мошне солиден сооднос на сензитивноста и специфичноста на двата теста [Графикон 29]. Ова секако е охрабрувачка информација, земајќи ја предвид можноста Xpert да ја замени микроскопијата како иницијален дијагностички тест за белодробната туберкулоза. Покрај тоа, интригира можноста за користење на Ct-вредноста за проценка на инфективноста на пациентот и потенцијалот за трансмисија на болеста, како и за одредување на времетраењето на болничката респираторна изолација. Правени се и испитувања во обид Ct-вредноста да се искористи како биомаркер за следење на терапискиот ефект [320, 323]. Главното ограничување на овој пристап е неможноста на молекуларниот тест за разликување на микобактериска DNA од оштетени клетки, наспроти DNA од вијабилни бацили. За надминување на овој недостаток, правени се испитувања со обработка на клиничките примероци со Propidium Monoazide (PMA). Оваа хемиска супстанција се врзува за DNA од оштетените бацили и ја спречува нејзината амплификација со PCR, што овозможува детекција на вијабилните туберкулозни бацили во примерокот. Во моментот, во актуелната верзија на тестот, Xpert не се користи за

следење на ефектот од терапијата. Оттука, сите овие прашања остануваат отворени и за прецизен став се потребни дополнителни студии.

Линеарната регресиска анализа на коваријансата (ANCOVA-тест) на семиквантитативните културолошки податоци од цврста подлога по Löwenstein-Jensen во однос на Ct-вредностите од Xpert-тестот покажа високосигнификантна разлика ($p < 0,0001$) [Табела 45; Графикон 33, 34], односно постоење на инверзна корелација меѓу степенот на позитивитет на културата на цврста подлога (Löwenstein-Jensen) и Ct-вредноста на тестот Xpert MTB/RIF, како мерка на бактериската концентрација во спутумот. Површината под ROC-кривата укажува на солиден сооднос на сензитивноста и специфичноста на двата теста [Графикон 35]. Исто така, најдовме и статистички значајна позитивна корелација на Ct-вредностите на тестот Xpert MTB/RIF со деновите од посевка на спутумот до позитивен резултат од култура (time to positivity, TTP; $p < 0,0001$) [Табела 42, Графикон 25]. Од ова произлегува дека поголемата бактериска концентрација во спутумот (изразена преку Ct-вредноста на Xpert) корелира со пократкото време до добивање на позитивен наод во култура. На Графиконот 26 од Kaplan-Meier-овата анализа јасно се гледа дека Xpert-позитивните примероци покажуваат пораст на *M. tuberculosis* (како рефлексija на бактериската концентрација) во пократок временски период и пропорционално на степенот на позитивитет на Xpert, наспроти Xpert негативните примероци.

Во нашиот материјал, односот на Ct-вредностите на тестот Xpert MTB/RIF со позитивитетот на течната култура (ВАСТЕС MGIT 960) не покажа статистичка значајност на разликите меѓу Ct-вредностите на тестот Xpert MTB/RIF и позитивноста на течната култура, односно нема сигнификантна разлика со двонасочниот статистички тест според Mann-Whitney ($p = 0,551$) [Табела 44, Графикон 30]. Логистичката регресиска анализа на Ct-вредностите на тестот Xpert MTB/RIF во однос на позитивноста на ВАСТЕС MGIT 960 културата покажа дека нема статистичка сигнификантност во разликите меѓу овие две методи (Wald-ов тест: $p = 0,368$) [Графикон 31]. ROC-кривата укажува на релативно слаб однос на сензитивноста и специфичноста на двата теста [Графикон 32]. Тоа значи дека нема доволен сооднос на сензитивноста и специфичноста меѓу рангот на Ct-вредности на тестот Xpert MTB/RIF, како репрезент на бактериската концентрација во спутумот од една страна и позитивноста на течната култура од друга страна. Можното објаснување за ваквиот наод е дихотомноста на отчитувањето на MGIT ВАСТЕС („позитивен“ или „негативен“ наод, без можност за градиација), но не се исклучува можноста и за лабораториски пропуст (задоцнето отчитување на резултатот

или отсуство на резултатот поради релативна можност за контаминација кај овој тест и/или пребрза репликација на бацилите во подлогата). Сумирано, инхерентните разлики во принципите и механизмите на детекција на позитивен резултат при двете методи се веројатната причина за несовпаѓањето.

Анализата со двонасочниот Mann-Whitney-тест покажа постоење на висока статистичка значајност на разликите меѓу Ct-вредноста на тестот Xpert MTB/RIF и вкупната позитивност на класичната микробиологија ($p < 0,0001$). Тоа значи дека постои позитивна корелација меѓу конвенционалната дијагностика на туберкулозата (т.е. кој било од нејзините три евалуирани методи) и Ct-вредностите на Xpert MTB/RIF, како репрезент на бактериската концентрација во спутумот. Логистичката регресиска анализа со Wald-овиот тест на Ct-вредностите од Xpert, во однос на позитивноста на класичната микробиологија, покажа високосигнификантна разлика ($p < 0,0001$), што зборува за позитивна корелација меѓу групата конвенционални методи за дијагноза на туберкулоза и Ct-вредностите на Xpert-тестот, како одраз на бактериската концентрација во респираторниот примерок [Табела 46, Графикон 36, 37]. Површината под ROC-кривата укажува на одличен сооднос на сензитивноста и специфичноста на двата теста [Графикон 38].

Детекцијата на резистенција кон рифампицин е првиот чекор во протоколите и алгоритмите за дијагноза на туберкулозата [110]. Ова не е за изненадување ако се земе предвид проценката дека $> 90\%$ од соевите резистентни на рифампицин се резистентни и на изониазид [75, 175, 324, 325]. Истражувањето на СЗО за резистенцијата кон антиотуберкулотски лекови покажува дека глобално монорезистенцијата на рифампицин има ниска преваленца [326]. Оттука, во најголем број средини, резистенцијата кон рифампицин може веродостојно да се земе како сурогат-маркер за MDR-TB [174, 175, 248, 255, 327-332].

Резистенцијата кон рифампицин има едноставна молекуларна база, бидејќи практично сите резистентни соеви манифестираат мутација во *rpoB* генот, а 95% од овие мутации се лоцирани во малиот 81-bp (base pair) регион на генот (rifampicin-resistance-determining region, RRDR) [62, 73, 74]. Во пракса, тоа значи дека со таргетирање на мутациите во 81-bp „core region“ на *rpoB* генот би се откриле повеќе од 95% сите соеви резистентни на рифампицин. Оттука, релативно лесно се развиени неколку молекуларни тестови за детекција на резистенција на рифампицин [249, 252, 333].

Мутациите во *rpoB* генот асоцирани со резистенција кон рифампицин се среќаваат и кај други специеси на микобактерии (*M. leprae*, *M. kansasii*), но и кај други

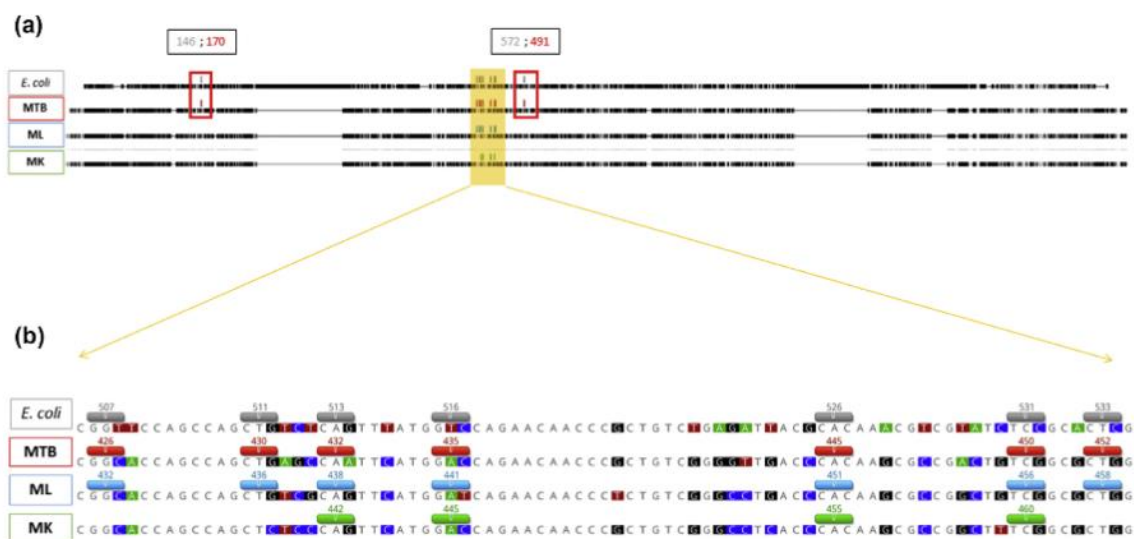
бактериски родови [73]. Овој механизам е првпат опишан во 1981 година кај *Escherichia coli* [334, 335], но клиничката релевантност на карактеризирање на *rpoB* мутациите е многу поголема за туберкулозата отколку за која било друга бактериска инфекција [336].

Во 1993 година Telenti et al. за првпат сугерираат дека резистенцијата на рифампицин кај *Mycobacterium tuberculosis* complex е асоцирана со мутации во *rpoB* генот и реферираат за висок степен на сличност во аминокиселинското кодирање меѓу неколку бактериски специеси - вклучувајќи ги *E. coli*, *M. tuberculosis* complex и *M. leprae* [74]. Бидејќи мутациите во оваа студија биле идентификувани во RRDR регионот на *E. coli*, Telenti et al. предложиле *rpoB* нумерички систем на кодони и мутации на *M. tuberculosis*, базиран на генската секвенца на *E. coli*. Овој систем бил бргу прифатен [337] и ден-денес често се користи за *M. tuberculosis* complex [Слика 28] [264, 338]. Но од актуелната перспектива, традиционалниот нумерички систем има неколку недостатоци: прво, големиот диверзитет на *rpoB* нуклеотидната секвенца го отежнува коректното реферирање на мутациите во еден нуклеотид одговорни за супституција на една со друга аминокиселина [339-341]; второ, постои низок степен на сличност меѓу *M. tuberculosis* complex и *E. coli* во генската секвенца на *rpoB* генот во RRDR - а денес има сознанија за епидемиолошки значајни мутации и надвор од RRDR, т.н. „non-RRDR“ мутации [342-344]. Оттука, не е можна едноставна нумеричка конверзија на нуклеотидната секвенца надвор од „hot-spot“ 81-bp регионот; трето, во моментот методологијата на секвенционирање за идентификација на мутациите е во фаза на транзиција од традиционалното Sanger-секвенционирање на Whole Genome Sequencing (WGS, секвенционирање на целиот геном), со тенденција второто да стане стандард за детекција на резистенција на лекови [184]. Бидејќи геномот на *Mycobacterium tuberculosis* complex референтниот сој H37Rv е стандарден сој кој се користи во цел свет [16], која било алтернативна нумеричка номенклатура на *rpoB* генот би требало да се базира на оваа секвенца [184, 343, 345]; и на крај, многу од мутациите во *rpoB* генот реферирани во досегашните клинички изолати покажуваат различни карактеристики во поглед на експресијата на фенотипска резистенција, вклучувајќи ја и варијабилната вкрстена резистенција со рифабутин. Оттука, прецизна и стандардизирана, интернационално прифатена номенклатура на локација на мутациите е есенцијална за комуникација меѓу лабораториите, размена на податоци и епидемиолошки надзор. Но уште повеќе, таа е неопходна за примена на научното знаење во клиничка практика – т.е. за дијагноза на туберкулозата и креирање на индивидуализирани терапевски режими [338, 340].

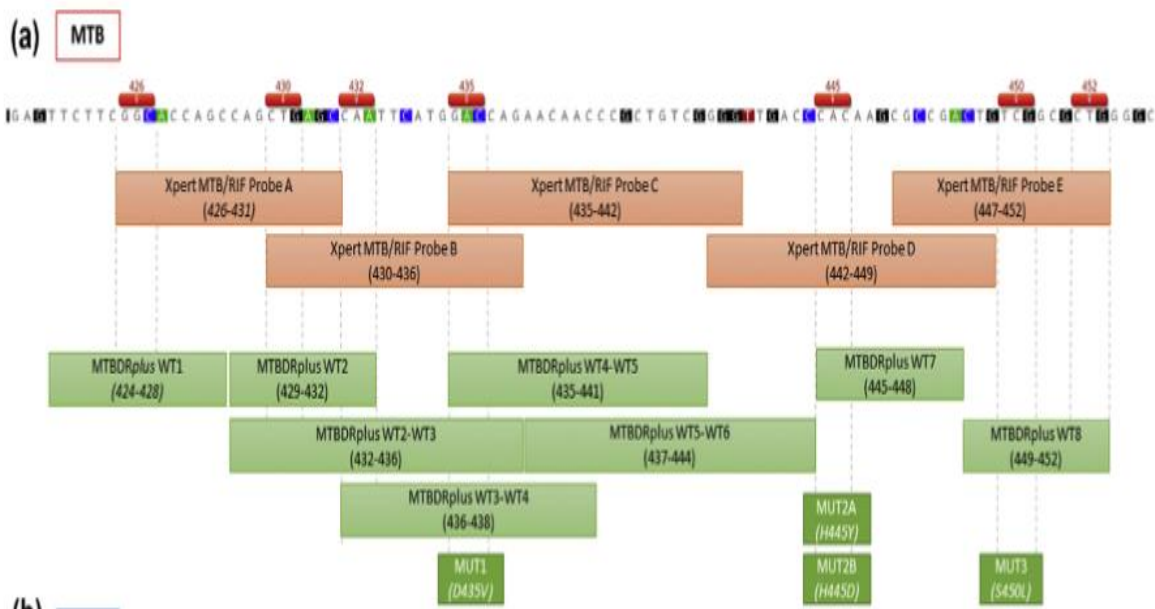
Во контекст на претходното, некои автори неодамна почнаа со употреба на специес-специфичен систем за означување на мутациите [165, 184, 343]. Ова може да биде извор на дополнителна конфузија, бидејќи една иста мутација се означува на различен начин – во зависност од авторот, годината и списанието каде што е објавен трудот. За надминување на оваа и претходно наведените тешкотии, Andre et al. во 2017 година предложија преминување на нов консензуален нумерички систем на мутациите асоцирани со резистенција, базиран на секвенцата на *rpoB* генот во референтниот сој на *Mycobacterium tuberculosis* [H37Rv] [73]. Секако дека за усвојување на овој систем ќе биде потребно време, особено што производителите на комерцијални тестови креираат сопствен систем за детекцијата на мутации (односно резистенција) и рапортирање на резултатите, како алтернатива на геномското секвенционирање [73].

Во контекст на претходното, овие тестови рапортираат за резистенција кон рифампицин врз основа на детекција на мутации во див тип (wild-type, WT) секвенцата на RRDR, со молекуларни проби наречени molecular-beacons [250, 346] или со хибридизација [251, 333]. Во тестовите се вклучени проби кои се врзуваат со WT-секвенцата, сами (Xpert MTB/RIF, Cepheid) или во комбинација со дополнителни проби кои се врзуваат за мутираните места (GenoType MTBDR*plus*, Hain Lifescience, Nehren, Germany) [Слика 23-27]. Оттука, „тивките“ мутации или мутации кои не се асоцирани со резистенција повремено може да дадат лажно-позитивни резултати [251, 262, 263, 347, 348]. Форматот на рапортирање на овие комерцијални тестови може да се спореди со специфичната секвенца опфатена со секоја проба (Xpert), или со комбинација на WT и мутациските ленти (MTBDR*plus*) – како што е илустрирано на Слика 29.

Во практика, најголем број на *rpoB*-мутации се лоцирани во кодоните 516, 526 и 531 според *E. coli* бројчаниот систем (односно 435, 445 и 450 – соодветно) на *M. tuberculosis* [73]. На пример, ако е присутна мутацијата Ser450Leu, Xpert ќе ја рапортира како „негативна проба E“ – што во превод значи дека постои мутација лоцирана меѓу позициите 447 и 452. За истата мутација, MTBDR*plus* V2.0 есејот ќе рапортира како негативна „WT8 лента“ асоцирана со позитивна „MUT3 лента“.



Слика 28. а. Нуклеотидна секвенца на *rpoB* гените на *E. coli*, *M. tuberculosis* H37Rv (MTB), *M. leprae* (ML) и *M. kansasii* (МК). RRDR-регионот е претставен со жолта лента. Со црвени правоаголници се означени мутациите асоцирани со резистенција кон рифампицин надвор од RRDR-регионот. б. Нуклеотидна секвенца на 81-bp RRDR-регионот кај овие четири бактериски специеси. Баровите врз нуклеотидната секвенца ја индицираат позицијата на седумте кодони кои најчесто се асоцирани со резистенција кон рифампицин, според специес-специфичниот номенклатурен систем (според референца бр. 73).



Слика 29. Порамнување (усогласување) на *M. tuberculosis* complex RRDR-регионот со таргетите на Xpert и MTBDRplus тестовите. Со црвени барови е означена позицијата на најчестите кодони во кои се јавуваат рифампицин-резистенција асоцирани мутации. Со портокалови барови се означени регионите опфатени со петте проби на Xpert-тестот. Со зелени барови се означени регионите опфатени со осумте wild-type (WT) и четирите мутациски ленти на MTBDRplus (според референца бр. 73).

Како одраз на ниската инциденца на MDR-TB во нашата земја, резистенцијата на рифампицин не беше високо застапена во нашата студија и е регистрирана само во два примерока (1,08%) [8, 258-260] [Табела 27, 28, 29, 33, 34; Графикон 22, 23, 24], заедно со резистенција на изониазид (MDR-TB). Како дополнителен наод беше утврдена монорезистенција на изониазид (кај 6 пациенти), монорезистенција на стрептомицин (кај 3 пациенти) и полирезистенција на стрептомицин и изониазид (кај 1 пациент).

Во првиот случај, во истиот примерок на спутум најдовме конкордантност меѓу класичниот тест за испитување на резистенција и Xpert-тестот, односно и двата теста детектираа резистенција кон рифампицин. По протокол, кај овој пациент беа направени дополнителни молекуларни тестови, и тоа за испитување на резистенција на рифампицин и изониазид (MDR-TB $plus$) – кој детектираше резистенција и кон двата антитуберкулозици, и за испитување на резистенција на втората линија на антитуберкулотски лекови (MDR-TB sl) – кој детектираше чувствителност [Слика 25, 26]. Со тоа беше добиена потврда и со gDST и со pDST дека се работи за мултирезистентен сој на MTBC што беше индикација кај пациентот да се отпочне терапија за MDR-TB. Добиениот наод од Xpert (отсуство на амплификација на пробата B, што одговара на секвенца 511-517 на RRDR) го споредивме со оној на MTBDR $plus$ (отсуство на хибридизација со WT-probe 3 и WT-probe 4, што одговара на секвенца 514-519 на RRDR; присуство на хибридизација со *rhoB*-probe MUT1, одговара на кодон D516V) и на тој начин ја идентификувавме позицијата на мутацијата одговорна за резистенција на рифампицин (кодон D516V во RRDR-регионот на *rhoB* генот).

Во 2017 година, Miotto et al. за прв пат публикуваа стандардизиран аналитички пристап за интерпретација на мутациите асоцирани со резистенција како предиктори на фенотипската резистенција кон антитуберкулотски лекови кај *M. tuberculosis* [349]. Во овој сеопфатен систематски преглед се опфатени 13424 изолати по генски локус или антитуберкулотски лек, од 43 земји, во периодот 1985-2014 година. Идентификувани се 286 мутации асоцирани со резистенција и направена градуелна класификација на доверливоста за предикција на резистенцијата (висока, умерена или индетерминирана). Споредено со фенотипските методи, за рифампицинот е добиена највисока сензитивност – 90,3% (95% CI: 89,6–90,9%). Мутацијата што ние ја идентификувавме во нашата студија (D516V) во оваа класификација ѝ припаѓа на групата на „високо-доверливи“ мутации асоцирани со резистенција на рифампицин. Со тоа, кај нашиот изолат е потврдена конкордантноста меѓу молекуларните методи и pDST. Во литературата е рапортирано дека мутацијата што ние ја идентификувавме, како и некои други мутации

во кодоните 516 и 526 на RRDR регионот на *rpoB* генот, се асоцирани со ниско ниво на резистенција кон рифампицин и чувствителност кон рифабутин. Терапијата потенцијално би можела да се базира врз високи дози на рифампицин или супституција со рифабутин [179]. Меѓутоа, техничките ограничувања (неможност за изведба на квантитативен pDST со одредување на MIC за рифампицин, недостаток на искуство со ваков тип терапија) [156, 160] и истовременото постоење на резистенција кон изониазид беа клучни при донесување на тераписката одлука и ординирање на антитуберкулотски режим за MDR-TB [69, 197].

Во вториот случај, во истиот примерок на спутум, Xpert детектирале чувствителност на рифампицин, а pDST (пропорционален метод на подлога по Löwenstein-Jensen) – резистенција кон рифампицин. Дополнителното испитување на MTBC-изолатот во култура со LPA (MTBDR*plus*) покажа чувствителност на рифампицин, но детектирале резистенција кон изониазид [Слика 24, 27]. Сумирано, резултатите од двата молекуларни тестови – Xpert и MTBDR*plus* – беа конкордантни меѓу себе во поглед на потврдата дека испитуваниот сој на MTBC е чувствителен на рифампицин, но се разликува од класичниот фенотипски пропорционален метод – кој покажа резистенција кон рифампицин. Покрај тоа, MDRTB*plus* тестот покажа дискордантен резултат во поглед на резистенцијата кон изониазид: генотипски потврдена изониазид-резистенција со фенотипска изониазид-чувствителност. Во основата на оваа фенотипско-генотипска разлика може да бидат повеќе причини. Прво, и двата молекуларни тестови го таргетираат истиот сегмент од *rpoB* генот на MTBC за детекција на MTBC и резистенција кон рифампицин – т.н. RRDR [256, 310]. Но комерцијалните молекуларни тестови во себе не содржат проби за сите можни мутации во RRDR на *rpoB* генот [263]. Имено, Xpert ги детектира мутациите како отсуство на амплификација со некоја од *rpoB*-WT (wild-type, див тип) пробите, а MTBDR*plus* како отсуство на хибридизација на некоја од *rpoB*-WT пробите и/или *rpoB*-мутант пробите. Според тоа, можно е кај сојот изолиран во нашата студија да се работи за мутација асоцирана со резистенција на рифампицин која е вон спектарот на мутации опфатени со молекуларните тестови; резистенциите вон RRDR регионот се ретки, но се познати во литературата [77]. Второ, мора да се земе предвид и можност за лабораториска грешка. Во прилог на второто оди дискордантноста меѓу pDST и gDST (LPA) во однос на резистенцијата кон изониазид, а досегашното искуство покажало добро совпаѓање со наодите на двата молекуларни тестови [350-354]. Трето, не може да се исклучи постоење на мешана популација (коегзистенција на рифампицин-чувствителни и рифампицин-

резистентни соеви) или постоење на хетерорезистенција (симултано присуство на чувствителни и резистентни клонови на истиот сој) [67, 267], при што pDST и gDST би детектирале различни субпопулации во примерокот. И четврто, можно е да се работи за нов тип мутација или механизам на резистенција, бидејќи кај 10-40% резистентни соеви механизмите на резистенција не се познати [190]. Како и да е, од тераписки аспект беше неопходно разрешување на дискрепантниот резултат меѓу молекуларниот метод Xpert и фенотипското DST, односно утврдување на клиничката релевантност на мутацијата утврдена со фенотипското DST. DNA-секвенционирање на геномот на *M. tuberculosis* (примарно на *rpoB* генот односно неговиот 81-bp core-region, и гените асоцирани со резистенција на изониазид – *katG* и *InhA* promoter region) [20, 24, 32, 33] би било решение за релативно брзо и точно да се разреши дали кај пациентот се работи за MDR-TB. Секвенционирањето на целиот геном (whole genome sequencing, WGS) и таргетираното секвенционирање (next-generation sequencing, NGS) нудат подлабока, посеопфатна и прецизна информација за генските мутации-носители на резистенција на лекови кај туберкулозата, како и квантификација на нивниот ефект [66, 165, 180, 181, 184-192, 354]. Бидејќи техничките можности на нашата лабораторија не дозволуваа секвенционирање на регионите на MTBC асоцирани со резистенција на лекови и оваа метода за MTBC не е достапна во нашата земја, реалната детекција на резистенција беше ограничена на оние мутации што веќе се вклучени во молекуларните тестови спомнати погоре и резултатите од pDST. Според тоа, арбитарно беа прифатени како точни и двата резултати – генотипскиот од молекуларните тестови, и фенотипскиот од пропорционалниот метод на LJ. Сојот беше означен како мултирезистентен и беше отпочнат тераписки режим за MDR-TB.

Не сите мутации во *rpoB* генот се асоцирани со резистенција кон рифампицин [76, 261]. На пример, мутациите на позиција E510H, L511P, D516Y, N518D, H526N и L533P не се асоцирани со резистенција кон рифампицин, и се најдени кај RIF-чувствителни соеви [76, 339]. Во одделна студија, околу 10,5% (16/133) од соевите со *rpoB* мутации идентификувани со Xpert MTB/RIF-тестот (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) како RIF-резистентни, биле евалуирани како RIF-чувствителни со фенотипска анализа на MGIT – тест (BD, Sparks, MD, USA) [261]. Ваквиот наод нè предупредува дека не смееме да се потпираме исклучиво на молекуларен тест за детекција на RIF-резистенција и сугерира дека молекуларниот тест можеби не може комплетно да го замени фенотипското испитување на чувствителност (drug susceptibility testing, DST). Од друга страна пак, една неодамнешна студија покажа дека т.н. спорни („disputed“) *rpoB* мутации – кои лесно се

откриваат со Xpert MTB/RIF тестот и LPA-тестовите, а не ги детектира фенотипскиот DST - можат да бидат одговорни за RIF-резистенција кај нови случаи на туберкулоза и да резултираат со неповолен исход од лекувањето со лекови од прва линија [338].

Мутациите во *rpoB* генот генерално резултираат со вкрстена резистенција со сите рифамицини, вклучувајќи го и рифабутинот, но некои RIF-резистентни соеви се рифабутин-чувствителни [76, 355]. Вкрстената резистенција кон рифампицин и рифабутин изгледа ги инволвира две од најчестите локации - 531 и 526, како и почетокот на *rpoB* регионот [356] и D516A-R529Q двојните мутации [76]. Мутациите на F514FF, D516V и S522L се асоцирани со резистенција кон рифампицин, но чувствителност на рифабутин [76].

Стапката на монорезистенција на рифампицин варира во различни региони и повеќето рифампицин-резистентни соеви се резистентни и на други антитуберкулотски лекови. Иако резистенцијата на рифампицин е генерално добар сурогат-маркер и предиктор за мултирезистентна туберкулоза (multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB) [174, 248, 255, 327-332], во некои средини до 10% од случаите можат да бидат монорезистентни кон рифампицин [357, 358].

Резистенцијата на рифампицин се јавува со фреквенција од $10^{-7/-8}$, но една скорешна студија покажа многу повисока фреквенција на мутации за рифампицинот – 10^{-3} за Вејџинг генотипот, споредено со 10^{-6} за EAI (East African Indian) генотипот [359]. Оваа висока фреквенција на мутации е интригирачка и можно е да е во врска со употребата на пониска концентрација на рифампицин или експозиција на рифампицин пред селекцијата на RIF-резистенција [360].

Рапортирањето за појавата на рифампицин-зависни соеви на MTBC кај некои MDR-TB соеви [361-363] е потенцијално загрижувачки и потценето. Рифампицин-зависните соеви може да имаат поголема преваленција отколку што во моментов се смета, бидејќи актуелната дијагностичка практика употребува само подлоги без додаток на лекови – такашто ќе ги занемари соевите кои растат слабо во нормален медиум за културелно испитување т.е. без рифампицин. Една неодамнешна студија во Кина сугерира дека RIF-зависните соеви се чести – односно дури до 39% (18/46) од MDR-TB соевите покажуваат феномен на рифампицин-зависност [363]. Околностите под кои се создаваат вакви соеви се недоволно јасни – но тие често се пројавуваат како MDR-TB соеви. Изгледа дека се развиваат како резултат на повторувани третмани со рифамицини кај повторно лекуваните пациенти [362] и може да бидат резултат на преклопување меѓу генотипската и фенотипската резистенција. Рифабутинот е сугериран како алтернатива

за третирање на рифампицин – резистентни соеви [72]. Но ова може да биде ризична практика, бидејќи попотентните рифамицини – како што е рифабутинот – може да водат кон развој на рифампицин-зависност и потенцијално да ја влошат болеста [362], веројатно како резултат на генетски и епигенетски промени кои ги поттикнуваат адаптивбилноста и вируленцијата на микроорганизмот.

Неодамна е направен преглед на импактот на *rpoB* мутациите врз адаптивбилноста и патогенезата на МТВС [71]. Вреди да му се посвети внимание – бидејќи резистенцијата кон рифампицин може да биде придружена со многу потешки последици, како резултат на зголемената вируленција и патогенезата. Од голем интерес би било да се одредат фреквенцијата и механизмот на рифампицин-зависност, како и придонесот на ваквите соеви за неуспехот од лекувањето. RIF-резистенцијата која се должи на *rpoB* мутации би можела да ја алтерира адаптивбилноста на МТВС; меѓутоа, како механизам на одбрана на микроорганизмот може да се појават компензаторни мутации во *rpoC* или *rpoA* гените [196, 217, 364-366].

Кај првиот од двајцата пациенти со MDR-TB во основа на резистенцијата кон изониазид е мутација во *katG* генот, детектирана со молекуларниот тест MDRTB*plus* [Слика 28]. Друг механизам инволвиран во резистенцијата на изониазид е мутација во промотор регионот на *mabA(fabG1)/inhA* оперонот што резултира со прекумерна експресија на *inhA*, и е детектирана кај вториот пациент [80, 367, 368] [Слика 27]. Таква мутација е промената на нуклеотидот c-15t во промотор регионот на *fabG1-inhA*, предизвикувајќи резистенција со механизам на титрација на лекот. Ова е втора по зачестеност мутација асоцирана со INH-резистенција [66]. За разлика од мутациите во *KatG* генот кои обично предизвикуваат високо ниво на резистенција, мутациите во *InhA* или неговиот промотор регион се обично асоцирани со ниско ниво на резистенција (minimum inhibitory concentration, MIC 0,2–1,0 µg/ml) и се поретки од *katG* мутациите [67, 78]. Иако помалку често, рапортирани се и мутации во активните места – како S94A и I194T [66].

Околу 10 % од INH-резистентните соеви со ниско ниво на резистенција немаат мутации ниту во *katG* ниту во *inhA*, што сугерира постоење на алтернативни механизми на резистенција [67, 369-171]. Алтернативно објаснување е постоење на хетерорезистенција или мешана популација, каде што пурификацијата на поединечни клонови покажува постоење на мала пропорција на резистентни клонови кои содржат *katG* мутации, меѓу сензитивните клонови со див тип (WT, wild-type) *katG* ген.

Мутациите во *inhA* не предизвикуваат само INH-резистенција, туку носат и вкрстена резистенција со структурно-сличниот лек етионамид [66, 78].

Изониазид-резистентните соеви со *katG*-делеција или мутации што водат до комплетна загуба на активноста на каталазата и резултираат со високо ниво на резистенција може да предизвикаат загуба на вируленцијата. Соевите со точкести мутации во *katG*, како што е KatG315, при кои не се губи во потполност активноста на каталазата - имаат лимитиран ефект врз адаптивбилноста или вируленцијата. Наспроти *katG*, мутациите во *inhA*, кои предизвикуваат ниско ниво на резистенција, не предизвикуваат загуба на вируленцијата [90].

Неодамнешно важно откритие поврзано со мутациите асоцирани со резистенција на изониазид е тоа што идентификацијата на т.н. „harbinger“-мутации, како што е *katG* S315T, може да служи како ран предупредувачки сигнал за појава на MDR-сој [372]. Овој наод има голем јавно-здравствен импакт, затоа што може да овозможи таргетиран третман на пациенти со пре-MDR-TB [62].

Резистенцијата на дополнителни антитуберкулотски лекови може да се надоврзе постепено, вообичаено при несоодветна терапија. Секвенционални мутации во други генски локуси резултираат со резистенција и на други антитуберкулотски лекови и на тој начин се создаваат соеви на *M. tuberculosis* кои се резистентни на повеќе лекови. Овој процес е познат како амплификација на резистенцијата [188]. На пример, терапијата на изониазид-монорезистентна туберкулоза со изониазид и рифампицин ги селектира спонтано настанатите рифампицин-резистентни мутанти, што резултира со преобладација на MDR-TB сој [Слика 20] [209, 210]. Кај пациентите без одговор на терапија со антитуберкулотици од прва линија во региони високооптоварени со туберкулоза, во недостаток на DST вообичаена практика е да се замени стандардниот тераписки режим со лекови од прва линија со проширен тераписки режим – т.н. категорија 2 на тераписки режим. Во суштина, тоа се состои од додавање на стрептомицин како единствен дополнителен лек на терапискиот режим со антитуберкулотици од прва линија [373, 374]. Предвидливо, оваа практика води кон аквизиција на натамошна резистенција на антитуберкулотици [225].

Во оваа студија, првиот случај со мултирезистентна форма на туберкулоза е добра потврда за точноста, прецизноста и репродуктивбилноста на молекуларните тестови за дијагноза на туберкулоза: со две различни молекуларни (генотипски) методи е добиен идентичен профил на резистенција во два различни примероци на спутум и подоцна потврден со класичниот rDST. Хипотетички, без испитувањето со молекуларен тест и

врз база на негативниот наод на микроскопија на спутум (ниска бактериска концентрација), кај нашиот пациент би отпочнала соодветна анти tuberculotска терапија по 12 недели, т.е. по комплетирање на наодот од рDST. Во нашиот случај, Xpert молекуларниот тест овозможи да се детектира МТВС (т.е. да се постави дијагноза на туберкулоза) и да се открие резистенција на рифампицин за 2 часа. Резистенцијата на рифампицин, како сурогат-маркер за MDR-TB [174, 248, 255, 327-332], беше индикација за проширено испитување на профилот на резистенција со други два молекуларни тестови за туберкулоза. За дополнителни 24 часа, двата LPA есеи го потврдија присуството на МТВС – но и на резистенција кон изониазид, со што беше поставена дијагноза на MDR-TB и отпочната соодветна терапија [306, 375]. Од овде јасно се гледа значењето на молекуларните тестови за навремена и точна дијагноза на туберкулозата и одредување на профилот на резистенција, особено кај микроскопски негативните случаи [8, 376-378].

Од клинички аспект, кај вториот случај постои оправдана загриженост од потенцијално пропуштање на соеви резистентни кон рифампицин, независно од употребениот метод (генотипски тест или класичен фенотипски DST). Но дискрепанцата меѓу наодите од рDST (кое важи за „златен стандард“) и gDST е добро познат проблем во клиничката и лабораториската практика [153, 352, 353], па дури и разликите меѓу рDST во течна и цврста подлога [267, 379]. Покрај гореспоменатите можни причини, во основа на фенотипско-генотипската дискрепанца при испитување на чувствителност на анти tuberculotици може да бидат и т.н. тивки („silent“) мутации и мутации асоцирани со различно ниво на резистенција (ниско или високо ниво на резистенција, односно т.н. спорни или „disputed“, наспроти неспорни или „undisputed“ мутации) [153, 265].

Одредени т.н. тивки мутации можат да бидат причина за лажна асоцијација меѓу генотипот и фенотипот. Тие може да се детектираат со молекуларните тестови, т.е. да дадат лажно позитивен наод за резистенција на рифампицин, но не се детектираат со фенотипска метода [261-263, 266, 348, 380]. Не ги модифицираат аминокиселинската секвенца и протеинската структура и не се асоцирани со резистенција. Оттука, тие не се клинички релевантни – но може да внесат забуна и да бидат причина за погрешна тераписка одлука. Позитивниот наод за резистенција на рифампицин со молекуларен тест мора промптно да се разјасни затоа што има сериозни импликации врз тераписката одлука – да се почне со анти tuberculotски режим со лекови од прва линија и со тоа да се ризикува амплификација на резистенцијата, да се почне со долготраен и многу

потоксичен тераписки режим за MDR-TB, или да не се почнува со каков било третман додека се чекаат резултатите од DST [188, 209, 210, 256, 309, 254, 381].

Одредени специфични мутации во *rpoB* генот може лесно да се пропуштат со стандардниот pDST, базиран на употреба на само една стандардна концентрација на рифампицин (лажно-негативен резултат). Кај течните подлоги (radiometric Bactec 460TB и Bactec 960 MGIT) дури до 85% од овие рифампицин-резистентни соеви се детектираат како чувствителни, додека со пропорционалниот метод на подлога по Löwenstein-Jensen овој процент е многу понизок но сè уште сигнификантен (до 30%). Во основата на ваквата дискордантност се мутации асоцирани со ниско ниво на резистенција кон рифампицин (“disputed mutations”), и мутации со гранична чувствителност. Иако е познато дека неуспехот од лекување или релапсот на болеста можат да бидат поврзани и со други фактори (т.е. не само со резистенција на рифампицин), како и тоа дека една мала пропорција на пациенти со резистентни форми на туберкулоза се излекуваат спонтано, сепак, овој тип мутации во најголем дел се клинички релевантни, односно се поврзуваат со неповолен исход на болеста (неуспех од лекувањето и релапс) [261, 338, 265, 267, 341, 379]. За детекција на оние со ниско ниво на резистенција или гранична чувствителност, потребен е квантитативен pDST со различни концентрации (т.е. MIC) на испитуваниот анти tuberculotски лек во подлогата, што секако е скапа метода, дури и за најсовремените лаборатории.

Релативната важност на секој од овие фактори треба да се утврди со внимателно дизајнирани студии [153], чии наоди ќе помогнат во точна проценка на клиничката релевантност на секоја од мутациите и врз основа на тоа и на правилна тераписка одлука.

Во контекст на претходното, клиничарот мора со внимание да го процени позитивниот наод за MTBC со молекуларен тест кај претходно лекувани пациенти. Пациентите претходно лекувани од туберкулоза можат да имаат резидуална микобактериска DNA во спутумот – екстрацелуларна, или асоцирана со неинтактни (оштетени) клетки, и според тоа, неинфективни и некултивабилни. Микобактериската DNA и позитивитетот на Xpert можат да перзистираат со години по претходното лекување [261, 262, 348, 382-385]. Малку е познато за фреквенцијата на Xpert-позитивни култура-негативните (т.е. „лажно-позитивни“) резултати кај пациентите кандидати за повторно лекување од туберкулоза, односно дали можат да се разликуваат од вистински позитивните и дали автоматскиот филтер-базиран процес на промивка кај Xpert ја редуцира „лажната позитивност“ по пат на отстранување на резидуалната DNA асоцирана со неинтактни клетки. Она што е познато се неколку досега објавени прикази

на случаи за лажно позитивен Xpert кај повторно лекувани од туберкулоза [261, 262, 348, 382, 383, 385]. Во 2018 година Theron et al. за прв пат публикуваа студија со проспективно следење на 238 пациенти по лекување од туберкулоза, со цел да се утврди местото на Xpert во разликување на вистински-позитивните (активна болест) од лажно-позитивните (т.е. културелно-негативните) случаи [384]. Резултатите од оваа, како и од претходната студија на Theron et al. од 2016 година [383] укажуваат на можност од лажно позитивен наод со Xpert кај претходно лекувани (1 од 7 случаи), како и на извесна корелација помеѓу Ct-вредноста на Xpert и времето поминато од претходниот третман со веројатноста за лажно-позитивен резултат. Периодот после претходното лекување е слаб предиктивен фактор за лажно-позитивните (период ≤ 2 години би идентификувал само 66% пациенти со лажно-позитивен наод). И Ct-вредноста има субоптимална точност за лажно-позитивните: 46% од Xpert-позитивните со Ct > 30 би биле лажно-позитивни, додека 70% од реално лажно-позитивните би се пропуштите. Нашите резултати корелираат со овие – бидејќи и во нашиот примерок не најдовме статистички значајна разлика во поглед на Xpert – ниту бинарно, ниту семиквантитативно според Ct-вредноста - меѓу групата на претходно лекувани и групата на новозаболени [Табела 54, 55; Графикон 42, 43]. Сепак, клиничарот е тој што на крајот ќе ја процени веродостојноста на позитивниот наод на Xpert кај претходно лекуваните пациенти. Кај пациенти со неконзистентен наод за релапс на туберкулоза (рендгенолошки и клинички) и Ct вредност на Xpert > 30 , одлуката за повторно лекување треба да се донесе многу внимателно [383].

Во нашиот примерок кај 18 пациенти дијагнозата беше поставена врз основа на Xpert молекуларниот тест [55] [Табела 38]. Осуммина од нив (т.е. само 8/185) биле претходно лекувани од туберкулоза, во период од 1 месец до 21 година пред актуелното лекување. Бидејќи групата е недоволно голема за подетална статистичка обработка, накратко ќе бидат изнесени најважните параметри за овие 8 пациенти. Кај четворица од нив, Ct вредноста на Xpert беше > 28 , вклучувајќи го и пациентот кој уредно завршил тераписки режим пред 21 година, но и пациент што лекувањето го завршил пред 4 месеци. Обратно, кај еден од пациентите што пред 1 месец го завршил терапискиот режим, Ct-вредноста беше < 28 . Кај осум од десетте пациенти кои не биле претходно лекувани од туберкулоза Ct вредноста на Xpert беше > 28 , а кај двајца < 28 . Во отсуство на јасна дистинкција според факторот време поминато по претходниот третман на туберкулоза и Ct-вредностите на Xpert, проценката на клиничарот во однос на повторната дијагноза на туберкулоза и лекување беше прифатена како веродостојна.

Поимите на примарна и стекната резистенција, нивната еволуција и трансмисија се во детали објаснети во воведот. Она што треба да се истакне е дека двајцата пациенти со MDR-TB во нашата студија во својата медицинска историја немаат податок за претходна туберкулоза или лекување поради туберкулоза, ниту пак друг очигледен ризик-фактор за туберкулоза или контакт со болен од туберкулоза [Табела 4] [114, 166, 188, 236, 386]. Единствениот заеднички именител им е престојот надвор од Република Македонија неколку месеци пред појава на симптомите. Оттука, следува логичен заклучок дека се работи за примарна мултирезистентна туберкулоза (MDR-TB), односно туберкулоза предизвикана со директна трансмисија на мултирезистентен сој на *M. tuberculosis* [354, 387-390]. До моментот на предавање на оваа докторска теза, едниот од пациентите успешно го заврши 24-месечниот тераписки режим. Како пример за целосна несоработка, вториот пациент во два наврата го прекинуваше лекувањето по само неколку месеци времетраење. Ова е екстреман случај (нелекувана MDR-TB) кој претставува сериозна закана за контролата на инфекција кај туберкулозата во Република Македонија, поради потенцијалот за континуирана трансмисија на мултирезистентен сој на *M. tuberculosis* во заедницата и веројатноста за амплификација на резистенцијата и развој на XDR-TB [354, 375, 390].

6. ЗАКЛУЧОЦИ

1. Xpert MTB/RIF тестот е точен и сигурен тест во поглед на детекцијата на *M. tuberculosis* и раната дијагноза на белодробна туберкулоза, особено кај микроскопски-негативните случаи. Покажува висока сензитивност во однос на микроскопијата и културелното испитување, како и висока специфичност во споредба со групата класични микробиолошки дијагностички методи за туберкулоза.
2. Позитивната корелација на Ct-вредноста на Xpert MTB/RIF, како одраз на бактериската концентрација во клиничкиот примерок, со директниот микроскопски препарат и култивирањето на цврста подлога, го покажува потенцијалот на тестот како иницијална дијагностичка алатка за туберкулоза, како и за примена во епидемиолошки цели (проценка на инфективноста на пациентот и потенцијалот за трансмисија на болеста, одредување на времетраење на болничката респираторна изолација, испитување на контакти), за што сепак се неопходни поопсежни студии.
3. Резултатот од тестот кај пациенти претходно лекувани од туберкулоза треба да се интерпретира внимателно, во рамки на клиничко-рендгенолошките наоди за секој пациент посебно, што произлегува од отсуство на статистички значајна разлика во позитивитетот и Ct-вредноста на Xpert кај нови случаи и претходно лекувани.
4. Споредено со времето потребно за културелно испитување („златен стандард“), Xpert MTB/RIF-тестот овозможува рано и навремено отпочнување на соодветна антитуберкулотска терапија и значајно го скратува времето до дијагноза и терапија.

5. Добиените резултати за детекција на резистенцијата кон рифампицин се малку на број (два примерока) за да може да се генерализираат на целата популација во Република Македонија. Анализата на резултатите за чувствителноста на рифампицин со Xpert MTB/RIF-тестот и класичниот фенотипски метод покажа дека е потребна дополнителна претпазливост во носењето терапевска одлука и сеопфатна клиничка и епидемиолошка евалуација. За утврдување на клиничката релевантност на секоја новооткриена мутација потребно е проширено тестирање со други молекуларни методи, и нејзина класификација во достапните бази на податоци.
6. Со детекција и публикување на првата мутација на *Mycobacterium tuberculosis* асоцирана со резистенција кон рифампицин, во оваа докторска дисертација е практично започнато создавањето на сопствена датабаза на вакви мутации на подрачјето на Република Македонија.
7. Ова истражување треба да се прошири и надгради во правец на компаративна студија на сите изолати на *Mycobacterium tuberculosis* на територијата на Република Македонија, меѓу класичните микробиолошки методи, молекуларните тестови и геномското секвенционирање, како и вклучување на добиените резултати во глобалната геномска датабаза на *Mycobacterium tuberculosis*.
8. Актуелната верзија на Xpert MTB/RIF не може да се користи како биомаркер за следење на терапевскиот ефект кај белодробната туберкулоза, бидејќи не може да разликува микобактериска DNA од оштетени наспроти вијабилни бацили, што би можело да се очекува да биде надминато со новите варијации во изведбата на тестот.

7. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

1. Boritsch EC, Supply P, Honoré N, Seeman T, Stinear TP, Brosch R. A glimpse into the past and predictions for the future: the molecular evolution of the tuberculosis agent. *Molecular microbiology*. 2014 Sep; 93(5):835-52.
2. Gagneux S. Host–pathogen coevolution in human tuberculosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2012 Mar 19; 367(1590):850-9.
3. Roberts CA, Pfister LA, Mays S. Letter to the editor: was tuberculosis present in *Homo erectus* in Turkey?. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists*. 2009 Jul;139(3):442-4.
4. Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, Kato-Maeda M, Parkhill J, Malla B, Berg S, Thwaites G, Yeboah-Manu D. Out-of-Africa migration and Neolithic co-expansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nature genetics*. 2013 Oct; 45(10):1176.
5. Banuls AL, Sanou A, Van Anh NT, Godreuil S. *Mycobacterium tuberculosis*: ecology and evolution of a human bacterium. *Journal of medical microbiology*. 2015 Nov 1; 64(11):1261-9.
6. Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ. Dye Ch. Tuberculosis. *Lancet*. 2003; 362:887-99.
7. Alexander DC, Liu J. Mycobacterial genomes. In *Bacterial Genomes and Infectious Diseases 2006* (pp. 151-174). Humana Press.
8. World Health Organization. Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018.
9. Pai, M., Behr, M.A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., Boehme, C.C., Ginsberg, A., Swaminathan, S., Spigelman, M., Getahun, H., et al. Tuberculosis. *Nature Reviews Disease Primers* 2016, 2, 16076. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.76>
10. Dye C. Global epidemiology of tuberculosis. *Lancet* 2006; 367:938–940.
11. Swaminathan S, Rekha B. Pediatric tuberculosis: global overview and challenges. *Clin Infect Dis*. 2010; 50:S184–94.
12. Havlir DV, Getahun H, Sanne I, Nunn P. Opportunities and Challenges for HIV Care in Overlapping HIV and TB Epidemics. *JAMA*. 2008; 300(4):423–430. doi:10.1001/jama.300.4.423.
13. Jeon CY, Murray MB. Diabetes mellitus increases the risk of active tuberculosis: a systematic review of 13 observational studies. *PLoS Med*. 2008;5(7):e152.
14. Rehm J, Samokhvalov AV, Neuman MG, et al. The association between alcohol use, alcohol use disorders and tuberculosis (TB). A systematic review. *BMC Public Health*. 2009;9:450. doi:10.1186/1471-2458-9-450.
15. Bates, M. N. et al. Risk of tuberculosis from exposure to tobacco smoke: a systematic review and meta-analysis. *Arch. Intern. Med*. 2007;167, 335–342.

16. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, Tekaia F. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998; 393:537-44.
17. Gagneux S. Genetic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. In *Pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis and its Interaction with the Host Organism 2013* (pp. 1-25). Springer, Berlin, Heidelberg.
18. Brites D, Gagneux S. Co-evolution of *Mycobacterium tuberculosis* and *Homo sapiens*. *Immunological reviews*. 2015;264(1):6-24.
19. Pardieu C, Casali N, Clark SO, Hooper R, Williams A, Velji P, Gonzalo X, Drobniewski F. Correlates between models of virulence for *Mycobacterium tuberculosis* among isolates of the Central Asian lineage: a case for lysozyme resistance testing?. *Infection and immunity*. 2015;83(6):2213-23.
20. Coscolla M, Gagneux S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. In *Seminars in immunology 2014 Dec 1* (Vol. 26, No. 6, pp. 431-444). Academic Press.
21. Coscolla M, Gagneux S. Does *M. tuberculosis* genomic diversity explain disease diversity? *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. 2010 ;7(1):e43-59.
22. Kirzinger MW, Stavrinides J. Host specificity determinants as a genetic continuum. *Trends in microbiology*. 2012; 20(2):88-93.
23. Demay C, Liens B, Burguière T, Hill V, Couvin D, Millet J, Mokrousov I, Sola C, Zozio T, Rastogi N. SITVITWEB—a publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012; 12(4):755-66.
24. Faksri K, Chaiprasert A, Pardieu C, Casali N, Palaga T, Prammananan T, Palittapongarnpim P, Prayoonwiwat N, Drobniewski F. Heterogeneity of phenotypic characteristics of the modern and ancestral Beijing strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Asian Pacific journal of allergy and immunology*. 2014;32(2):124.
25. Gupta RS, Lo B, Son J. Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus *Mycobacterium* into an emended genus *Mycobacterium* and four novel genera. *Frontiers in Microbiology*. 2018;13;9:67.
26. Пановски Н, Петровска М, Поповска К, Докиќ-Трајковска Е, Цековска Ж, Јанкоска Г, Талески В. Медицинска микробиологија и паразитологија – Специјален дел. Институт за микробиологија со паразитологија, Медицински факултет-Скопје, 2011. стр. 149-54.
27. Grange JM. *Mycobacteria and Human Disease*. Second edition. CRC Press; May 31, 1996.
28. Todar's Online Textbook on Bacteriology.
<http://textbookofbacteriology.net/tuberculosis.html> (пристапено на 12.12.2018)
29. Koch R. Die aetiologie der tuberculose. *Berl Klin Wochnschr* xix: 221-230. *Milestones in microbiology*. 1882;1556:109.
30. Karakašević B, Agolli B, Banič S, Berger-Jekić O, Brudnjak Z, Derkoš-Mikulić V, Drndarski K, Gubina M, Ivančević D, Janković-Brmbolić A, Levi-Jovović E. *Mikrobiologija i parazitologija*. Medicinska knjiga Zagreb Beograd; 1989.

31. Manca C, Tsenova L, Barry CE, Bergtold A, Freeman S, Haslett PA, Musser JM, Freedman VH, Kaplan G. Mycobacterium tuberculosis CDC1551 induces a more vigorous host response in vivo and in vitro, but is not more virulent than other clinical isolates. *The journal of immunology*. 1999; 162(11):6740-6.
32. Edwards D, Kirkpatrick CH. The immunology of mycobacterial diseases. *American Review of Respiratory Disease*. 1986; 134(5):1062-71.
33. American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 161:1376-95.
34. Jeong YJ, Lee KS. Pulmonary tuberculosis: up-to-date imaging and management. *American Journal of Roentgenology*. 2008;191(3):834-44.
35. Cardona PJ. Pathogenesis of tuberculosis and other mycobacteriosis. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*. 2018; 36(1):38.
36. Houben EN, Nguyen L, Pieters J. Interaction of pathogenic mycobacteria with the host immune system. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9:76–85.
37. Ober WB. Ghon but not forgotten: Anton Ghon and his complex. *Pathol Annu* 1983; 18 (2):79–85.
38. Piccini P, Chiappini E, Tortoli E, de Martino M, Galli L. Clinical peculiarities of tuberculosis. *BMC Infect Dis*. 2014;14 Suppl 1(Suppl 1):S4.
39. Müller NL, Franquet T, Lee KS et-al. *Imaging of pulmonary infections*. Lippincott Williams & Wilkins. (2007) ISBN:078177232X.
40. Collins J, Stern EJ. *Chest radiology, the essentials*. Lippincott Williams & Wilkins. (2007) ISBN:0781763142.
41. Naidich DP, Srichai MB, Krinsky GA. *Computed tomography and magnetic resonance of the thorax*. Lippincott Williams & Wilkins. (2007) ISBN:0781757657.
42. Zumla A, Raviglione M, Hafner R, von Reyn CF. *Tuberculosis*. *N Engl J Med*. 2013;368:745–55.
43. World Health Organization. *Guidelines on the management of latent tuberculosis infection 2015*. Geneva: World Health Organization; 2015.
44. Cardona PJ. Reactivation or reinfection in adult tuberculosis: Is that the question?. *International journal of mycobacteriology*. 2016; 5(4):400-7.
45. Marais BJ, Parker SK, Verver S, Van Rie A, Warren RM. Primary and postprimary or reactivation tuberculosis: time to revise confusing terminology?. *American Journal of Roentgenology*. 2009; 192(4):W198-.
46. Нановиќ Р. Фтизиологија. Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ – Скопје, Медицински факултет. НИО „Студентски збор“, 1984.
47. Интерна медицина. Уредник: Проф. В. Серафимоски. Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ – Скопје, Медицински факултет, 2003; (стр. 540-563).
48. Small PM, Shafer RW, Hopewell PC, et al. Exogenous reinfection with multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in patients with advanced HIV disease. *N Engl J Med* 1993; 328:1137–1144.
49. Nardell E, McInnis B, Thomas B, Weidhaas S. Exogenous reinfection with tuberculosis in a shelter for the homeless. *N Engl J Med* 1986; 315:1570–1575.

50. Stead WW, Lofgren JP, Warren E, Thomas C. Tuberculosis as an endemic and nosocomial infection among the elderly in nursing homes. *N Engl J Med* 1985; 312:1483–1487.
51. van Rie A, Warren R, Richardson M, et al. Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *N Engl J Med* 1999; 341:1174–1179.
52. Verver S, Warren RM, Munch Z, et al. Proportion of tuberculosis transmission that takes place in households in a high-incidence area. *Lancet* 2004; 363:212–214.
53. Warren RM, Victor TC, Streicher EM, et al. Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169:610–614.
54. Fok A, Numata Y, Schulzer M, FitzGerald MJ. Risk factors for clustering of tuberculosis cases: a systematic review of population-based molecular epidemiology studies. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008; 12:480–492.
55. WHO. Definitions and reporting framework for tuberculosis – 2013 revision (updated December 2014).
56. WHO 2008. Global tuberculosis control-surveillance, planning, financing. Geneva, Switzerland: WHO. (Contract No: WHO/HTM/TB/2008.393.).
57. Roberts JR, Mason BW, Paranjhoty S, Parmer SR: The transmission of tuberculosis in schools involving children 3 to 11 years of age. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 31:82-4.
58. Mtombeni S, Mahomva A, Siziya C, Sanyika C, Doolabh R, Nathoo KJ: A clinical evaluation of children under the age of five years who are household contacts of adults with sputum positive tuberculosis in Harare, Zimbabwe. *Cent Afr J Med* 2002, 48:28-32.
59. Tostmann A: Tuberculosis transmission by patients smear-negative pulmonary tuberculosis in a large cohort in The Netherlands. *Clin Infect Dis* 2008, 47:1135-1142.
60. Behr MA: Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet* 1999; 1135-1142.
61. Elwood RK, Cook VJ, Hernandez-Garduno E: Risk of tuberculosis in children from smear negative source cases. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005, 9:49-55.
62. Nasiri MJ, Haeili M, Ghazi M, Goudarzi H, Pormohammad A, Imani Fooladi AA and Feizabadi MM. New Insights in to the Intrinsic and Acquired Drug Resistance Mechanisms in *Mycobacteria*. *Front. Microbiol.* 2017. 8:681.
doi: 10.3389/fmicb.2017.00681
63. Somoskovi A., Parsons L. M., Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir. Res.* 2001; 2:164.
64. Almeida Da Silva PE, Palomino JC J Antimicrob Chemother. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. 2011; 66(7):1417-30.
65. Segala E., Sougakoff W., Nevejans-Chauffour A., Jarlier V., Petrella S. New mutations in the mycobacterial ATP synthase: new insights into the binding of the

- diarylquinoline TMC207 to the ATP synthase C-ring structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56, 2326–2334.
66. Miotto, P, Zhang, Y, Cirillo, DM, Yam, WC. Drug resistance mechanisms and drug susceptibility testing for tuberculosis. *Respirology.* 2018; 23: 1098–1113. <https://doi.org/10.1111/resp.13393>
 67. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: update 2015. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2015; 19 : 1276 – 89.
 68. World Health Organization. Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care, 2017 update. Geneva: World Health Organization, 2017.
 69. World Health Organization. Treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis 2016 update. Geneva: World Health Organization, 2016.
 70. Nguyen L. Antibiotic resistance mechanisms in M. tuberculosis: an update. *Arch. Toxicol.* 2016; 90: 1585–604.
 71. Koch A, Mizrahi V, Warner D F. The impact of drug resistance on Mycobacterium tuberculosis physiology: what can we learn from rifampicin? *Emerg Microbes Infect* 2014; 3: e17.
 72. Sirgel F A, Warren R M, Bottger E C, Klopper M, Victor T C, van Helden P D. The rationale for using rifabutin in the treatment of MDR and XDR tuberculosis outbreaks. *PLOS ONE* 2013; 8: e59414.
 73. André E, Goeminne L, Cabibbe A, Beckert P, Mukadi BK, Mathys V, Gagneux S, Niemann S, Van Ingen J, Cambau E. Consensus numbering system for the rifampicin resistance-associated rpoB gene mutations in pathogenic mycobacteria. *Clinical Microbiology and Infection.* 2017; 23(3):167-72.
 74. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis. *Lancet* 1993; 341: 647–650.
 75. Caws M, Duy PM, Tho DQ, Lan NT, Hoa DV, Farrar J. Mutations prevalent among rifampin- and isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from a hospital in Vietnam. *J. Clin. Microbiol.* 2006;44: 2333–7.
 76. Jamieson FB, Guthrie JL, Nemuchwala A, Lastovetska O, Melano RG, Mehaffy C. Profiling of rpoB mutations and MICs for rifampin and rifabutin in Mycobacterium tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52: 2157–62.
 77. Siu GK, Zhang Y, Lau TC, Lau RW, Ho PL, Yew WW, Tsui SK, Cheng VC, Yuen KY, Yam WC. Mutations outside the rifampicin resistance-determining region associated with rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011; 66: 730–3.
 78. Zhang Y, Telenti A. Genetics of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Hatfull G, Jacobs W R, ed. Washington, DC, USA: ASM Press, 2000: pp 235–254.
 79. Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis. *Nature* 1992; 358: 591–3.
 80. Rozwarski D A, Grant G A, Barton D H, Jacobs W R, Jr, Sacchettini J C. Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from Mycobacterium tuberculosis. *Science* 1998; 279: 98–102.

81. Hazbon M H, Brimacombe M, Bobadilla del Valle M, et al. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2640–2649.
82. Scorpio A, Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in *tubercle bacillus*. *Nat. Med.* 1996; 2: 662–7.
83. Shi W, Zhang X, Jiang X, et al. Pyrazinamide inhibits translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 2011; 333: 1630–1632.
84. McDermott W. Microbial persistence. *Yale J. Biol. Med.* 1958; 30: 257–91.
85. Zhang Y, Scorpio A, Nikaido H, Sun Z. Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J. Bacteriol.* 1999; 181: 2044–9.
86. Peterson ND, Rosen BC, Dillon NA, Baughn AD. Uncoupling environmental pH and intrabacterial acidification from pyrazinamide susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015; 59: 7320–6.
87. den Hertog AL, Menting S, Pfeldt R, Warns M, Siddiqi SH, Anthony RM. Pyrazinamide is active against *Mycobacterium tuberculosis* cultures at neutral pH and low temperature. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016; 60: 4956–60.
88. Gu, Y., Yu, X., Jiang, G., Wang, X., Ma, Y., Li, Y., et al. Pyrazinamide resistance among multidrug-resistant tuberculosis clinical isolates in a national referral center of China and its correlations with *pncA*, *rpsA*, and *panD* gene mutations. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2016; 84, 207–211.
doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.10.017
89. Jureen P, Werngren J, Toro J C, Hoffner S. Pyrazinamide resistance and *pncA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 1852–1854.
90. Wilson T M, de Lisle G W, Collins D M. Effect of *inhA* and *katG* on isoniazid resistance and virulence of *Mycobacterium bovis*. *Mol Microbiol* 1995; 15: 1009–1015.
91. Takayama K, Kilburn J. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 1493–1499.
92. Telenti A, Philipp W, Sreevatsan S, et al. The *emb* operon, a unique gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nature Med* 1997; 3: 567–570.
93. Cheng S, Cui Z, Li Y, Hu Z. Diagnostic accuracy of a molecular drug susceptibility testing method for the antituberculosis drug ethambutol: a systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52: 2913–24.
94. Lingaraju, S., Rigouts, L., Gupta, A., Lee, J., Umubyeyi, A.N., Davidow, A.L., et al. Geographic differences in the contribution of *ubiA* mutations to high level ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016; 60, 4101–4105.
doi: 10.1128/AAC.03002-15.
95. Safi H, Lingaraju S, Amin A, Kim S, Jones M, Holmes M, McNeil M, Peterson SN, Chatterjee D, Fleischmann R et al. Evolution of high-level ethambutol-resistant

- tuberculosis through interacting mutations in decaprenylphosphoryl- β -D-arabinose. *Nat. Genet.* 2013; 45: 1190–7.
96. He L, Wang X, Cui P, Jin J, Chen J, Zhang W, Zhang Y. *ubiA* (Rv3806c) encoding DPPR synthase involved in cell wall synthesis is associated with ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb.)* 2015; 95: 149–54.
 97. Engström A, Morcillo N, Imperiale B, Hoffner SE, Juréen P. Detection of first- and second-line drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates by pyrosequencing. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50: 2026–33.
 98. Li Y, Wang Y, Zhang Z, Gao H, Wang H, Cao J, Zhang S, Liu Y, Lu J, Xu Z et al. Association between *embB* codon 306 mutations, phenotypic resistance profiles, and genotypic characterization in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Hebei, China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016; 60: 7295–302.
 99. Dowdy DW, Grant AD, Dheda K, Nardell E, Fielding K, Moore DAJ. Designing and Evaluating Interventions to Halt the Transmission of Tuberculosis. *J Infect Dis.* 2017; 216(suppl_6):S654-S661.
 100. Dheda K. The Multistep Tuberculosis Diagnostic Cascade. More Than Meets the Eye. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 2017; 196(7):809-811.
 101. 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;.
 102. World Health Organization. Global tuberculosis report 2015. Geneva, World Health Organization, 2015.
 103. Norbis L, Miotto P, Alagna R, Cirillo DM. Tuberculosis: lights and shadows in the current diagnostic landscape. *New Microbiol.* 2013; 36(2):111-20.
 104. Kumar K, Kon OM. Diagnosis and treatment of tuberculosis: latest developments and future priorities. *Annals of Research Hospitals.* 2017;1(5).
 105. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Chapter 4: Diagnosis of tuberculosis disease. 2012.
<https://www.cdc.gov/tb/education/corecurr/pdf/chapter4.pdf> (последно пристапено на 15.04.2018)
 106. Lange C, Toru MO. Advances in the diagnosis of tuberculosis. *Respirology.* 2010;15(2):220-40.
 107. Migliori GB, Sotgiu G, Rosales-Klintz S, Centis R, D'Ambrosio L, Abubakar I, Bothamley G, Caminero JA, Cirillo DM, Dara M, de Vries G. ERS/ECDC Statement: European Union standards for tuberculosis care, 2017 update. *European Respiratory Journal.* 2018; 51(5):1702678.
 108. StopTB Partnership. GLI Practical Guide to TB Laboratory Strengthening. March 2017. http://stoptb.org/wg/gli/assets/documents/GLI_practical_guide.pdf (последно пристапено на 15.12.2018)
 109. World Health Organisation. Same-day diagnosis of tuberculosis by microscopy: policy statement. WHO, 2011.
 110. StopTB Partnership. GLI model TB diagnostic algorithms Revised June 2018. http://stoptb.org/wg/gli/assets/documents/GLI_algorithms.pdf

111. Tuberculosis Coalition for Technical Assistance. International Standards for Tuberculosis Care (ISTC), second edition. Tuberculosis Coalition for Technical Assistance, The Hague, 2009.
112. TB CARE I. International Standards for Tuberculosis Care. 3rd edn. The Hague, TB CARE, 2014.
113. Storla DG, Yimer S, Bjune GA. A systematic review of delay in the diagnosis and treatment of tuberculosis. *BMC Public Health* 2008; 8: 15.
114. Narasimhan P, Wood J, Macintyre CR, Mathai D. Risk factors for tuberculosis. *Pulm Med.* 2013; 2013:828939.
115. Jeong JY, Lee SK, Yim JJ. The diagnosis of pulmonary tuberculosis: a Korean perspective. *Precis Future Med.* 2017; 1(2):77-87.
116. Pande T, Pai M, Khan FA, Denkinger CM. Use of chest radiography in the 22 highest tuberculosis burden countries. *Eur Respir J* 2015; 46:1816–1819.
<http://dx.doi.org/10.1183/13993003.01064-2015>
117. Philipsen RH, Sánchez CI, Maduskar P, et al. Automated chest-radiography as a triage for Xpert testing in resource-constrained settings: a prospective study of diagnostic accuracy and costs. *Sci Rep.* 2015;5:12215.
doi:10.1038/srep12215
118. Curry International Tuberculosis Center and California Department of Public Health, 2016: Drug-Resistant Tuberculosis: A Survival Guide for Clinicians, Third Edition [31-62].
http://www.currytbcenter.ucsf.edu/sites/default/files/tb_sg3_front_matter.pdf.
(последно пристапено на 15.12.2018).
119. GLI Mycobacteriology manual. First edition, April 2014.
<https://www.who.int/tb/laboratory/mycobacteriology-laboratory-manual.pdf>
(последно пристапено на 15.12.2018).
120. Drobniewski FA, Caws M, Gibson A, Young D. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. *The Lancet infectious diseases.* 2003; 3(3):141-7.
121. Steingart KR, Henry M, Ng V, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, Urbanczik R, Perkins M, Aziz MA, Pai M. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *The Lancet infectious diseases.* 2006; 6(9):570-81.
122. Singhal R, Myneedu VP. Microscopy as a diagnostic tool in pulmonary tuberculosis. *International journal of mycobacteriology.* 2015; 4(1):1-6.
123. K. Siddiqi, M.L. Lambert, J. Walley. Clinical diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in low-income countries, the current evidence. *Lancet Infect. Dis.* 2003; 3:288-296.
124. C.A. Ganoza, J.N. Ricaldi, J. Chauca, G. Rojas, C. Munayco, J. Agapito, *et al.* Novel hypertonic saline–sodium hydroxide (HS–SH) method for decontamination and concentration of sputum samples for Mycobacterium tuberculosis microscopy and culture. *J. Med. Microbiol.* 2008; 57:1094-1098.
125. World Health Organization. Approaches to improve sputum smear microscopy for tuberculosis diagnosis. Expert group meeting report. Geneva: 31 October 2009.

126. I.U.A.T.L.D. Tuberculosis bacteriology – priorities and indications in high prevalence countries: Position of the technical staff of the tuberculosis division of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2005; 9:355-361.
127. Karstaedt AC, Jones H, Khoosal M, Crewe-Brown HH. The bacteriology of pulmonary tuberculosis in a population with high human immunodeficiency virus seroprevalence. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 1998; 2 (4):312-316.
128. Khan EA, Starke JR. Diagnosis of tuberculosis in children, increased need for better methods *Emerg. Infect. Dis.* 1995; 1 (4):115-123.
129. Steingart KR, Ng V, Henry M, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, Urbanczik R, Perkins MD, Aziz MA, Pai M. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *The Lancet infectious diseases.* 2006; 6(10):664-74.
130. M. Bhalla, Z. Sidiqi, P.P. Sharma, R. Singhal, V.P. Myneedu, R. Sarin. Performance of light-emitting diode fluorescence microscope for diagnosis of tuberculosis. *Int. J. Mycobacteriol.* 2013; 2 (3):174-178.
131. Van Deun A. What is the role of mycobacterial culture in diagnosis and case definition? In: Frieden T, ed. *Toman's tuberculosis: case detection, treatment, and monitoring—questions and answers* (2nd edn). Geneva: World Health Organization, 2004: 35–43.
132. Perkins MD. New diagnostic tools for tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4 (suppl 2): S182–88.
133. Shaw JB, Wynn-Williams N. Infectivity of pulmonary tuberculosis in relation to sputum status. *Am Rev Tuberc* 1954; 69: 724–32.
134. World Health Organisation. *Treatment of tuberculosis: guidelines – 4th edition.* WHO, 2010.
135. Goletti D, Lindestam Arlehamn CS, Scriba TJ, et al. Can we predict tuberculosis cure? What tools are available? *Eur Respir J* 2018; 52: 1801089. <https://doi.org/10.1183/13993003.01089-2018>.
136. Caulfield AJ, Wengenack NL. Diagnosis of active tuberculosis disease: From microscopy to molecular techniques. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases.* 2016; 4:33-43.
137. Pfyffer GE. Mycobacterium: general characteristics, laboratory detection, and staining procedures. In *Manual of Clinical Microbiology, Eleventh Edition* 2015 Jun 1 (pp. 536-569). American Society of Microbiology.
138. World Health Organization. *Tuberculosis laboratory biosafety manual, 2012.* Geneva: World Health Organization 2012.
139. World Health Organization. *The use of liquid medium for culture and DST, 2007.* WHO, Geneva, Switzerland.
140. Drobniowski F, Cooke M, Jordan J, Casali N, Mugwagwa T, Broda A, et al. Systematic review, meta-analysis and economic modelling of molecular diagnostic tests for antibiotic resistance in tuberculosis. *Health Technol Assess* 2015;19(34).
141. Chikamatsu K, Aono A, Yamada H, Sugamoto T, Kato T, Kazumi Y, et al. Comparative evaluation of three immuno-chromatographic identification tests for

- culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *BMC Infect Dis* 2014; 14:54.
142. NSW. National guidelines for the public health management if TB: 2014. <https://www.health.nsw.gov.au/Infectious/controlguideline/Documents/TB-SoNG-2013-NSW-edits.pdf>
 143. Sterling T, Jenkins C, Jayathilake K, Gotuzzo E, Veloso V, Cortes CP, Padgett D, Ramirez BC, Shepherd BE, McGowan C. Culture-negative TB is associated with increased mortality in HIV-infected persons. In Annual Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI); Seattle, WA, USA 2015 Feb (pp. 23-26).
 144. Nguyen MH, Levy NS, Ahuja SD, Trieu L, Proops DC, Achkar JM. Factors Associated with Sputum Culture-Negative vs Culture-Positive Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. *JAMA Netw Open*. 2019; 2 (2) : e187617. doi:10.1001/jamanetworkopen.2018.7617
 145. Tuberculosis Unit, National Infection Service, Public Health England. *Tuberculosis in England: 2018*. London, England: Public Health England; 2018.
 146. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Reported Tuberculosis in the United States, 2015. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC; 2016.
 147. Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler HT, Menon NK, Mitchison DA, Rist N, Smelev NA. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull. World Health Organ*. 1969; 41: 21 –43100.
 148. Palomino JC, Traore H, Fissette K, Portaels F. Evaluation of Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Tuberc. Lung Dis*. 1999; 3: 344–8.
 149. Goloubeva V, Lecocq M, Lassowsky P, Matthys F, Portaels F, Bastian I. Evaluation of mycobacteria growth indicator tube for direct and indirect drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from respiratory specimens in a Siberian prison hospital. *J. Clin. Microbiol*. 2001; 39: 1501–5.
 150. Rodrigues C, Jani J, Shenai S, Thakkar P, Siddiqi S, Mehta A. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against second-line drugs using the Bactec MGIT 960 System. *Int. J. Tuberc. Lung Dis*. 2008; 12: 1449–55.
 151. World Health Organization. Technical report on critical concentrations for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant tuberculosis. Geneva: World Health Organization, 2018.
 152. Kahlmeter G. The 2014 Garrod Lecture: EUCAST - are we heading towards international agreement? *J. Antimicrob. Chemother*. 2015; 70: 2427–39.
 153. 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: 154–60.
 154. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard-Second Edition*. CLSI document M24A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.

155. Katiyar SK, Bihari S, Prakash S, Mamtani M, Kulkarni H. A randomised controlled trial of high-dose isoniazid adjuvant therapy for multidrug-resistant tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2008; 12: 139–45.
156. Zhang Z, Dai F, Luo F, Zhong M, Huang Z, Hou T, Xu J. Could high-concentration rifampicin kill rifampicin-resistant *M. tuberculosis*? Rifampicin MIC test in rifampicin-resistant isolates from patients with osteoarticular tuberculosis. *J. Orthop. Surg. Res.* 2014; 9: 124.
157. Farhat MR, Mitnick CD, Franke MF, Kaur D, Sloutsky A, Murray M, Jacobson KR. Concordance of *Mycobacterium tuberculosis* fluoroquinolone resistance testing: implications for treatment. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2015; 19: 339–41.
158. Farhat MR, Jacobson KR, Franke MF, Kaur D, Sloutsky A, Mitnick CD, Murray M. Gyrase mutations are associated with variable levels of fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 2016; 54: 727–33.
159. Rieder HL, Van Deun A. Rationale for high-dose isoniazid in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2017; 21: 123–4.
160. Xu Y, Wu J, Liao S, Sun Z. Treating tuberculosis with high doses of anti-TB drugs: mechanisms and outcomes. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2017; 16: 67.
161. Farhat MR, Jacobson KR, Franke MF, Kaur D, Murray M, Mitnick CD. Fluoroquinolone resistance mutation detection is equivalent to culture-based drug sensitivity testing for predicting multidrug-resistant tuberculosis treatment outcome: a retrospective cohort study. *Clin. Infect. Dis.* 2017; 65: 1364–70.
162. Angra PK, Taylor TH, Iademarco MF, Metchock B, Astles JR, Ridderhof JC. Performance of tuberculosis drug susceptibility testing in U.S. laboratories from 1994 to 2008. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50: 1233–91.
163. Kumar K, Abubakar I. Clinical implications of the global multidrug-resistant tuberculosis epidemic. *Clin Med (Lond)* 2015;15 Suppl 6:s37-42
164. Telenti A. Genetics and pulmonary medicine. 5. Genetics of drug resistant tuberculosis. *Thorax.* 1998; 53(9):793-7.
165. Phelan J, Coll F, McNerney R, et al. *Mycobacterium tuberculosis* whole genome sequencing and protein structure modelling provides insights into anti-tuberculosis drug resistance. *BMC Med.* 2016;14:31.
doi:10.1186/s12916-016-0575-9
166. Gandhi NR, Nunn P, Dheda K, Schaaf HS, Zignol M, Van Soolingen D, Jensen P, Bayona J. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *The Lancet.* 2010; 22;375(9728):1830-43.
167. David HL. Probability distribution of drug-resistant mutants in unselected populations of *Mycobacterium tuberculosis*. *Appl Microbiol.* 1970; 20: 810–14.
168. Supply P, Warren RM, Banuls AL, et al. Linkage disequilibrium between minisatellite loci supports clonal evolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a high tuberculosis incidence area. *Mol Microbiol* 2003; 47: 529–38.
169. World Health Organization. Policy statement: automated real-time nucleic acid amplification technology for Rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system; 2011. Geneva, World Health Organization; 2011.

170. Parsons LM, Somoskövi A, Gutierrez C, Lee E, Paramasivan CN, Abimiku A, Spector S, Roscigno G, Nkengasong J. Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource-poor countries: challenges and opportunities. *Clin. Microbiol. Rev.* 2011; 24: 314–50.
171. World Health Organization. Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF assay for the: diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children. Policy_update; 2013. Geneva: World Health Organization, 2013.
172. Hillemann, D., S. Ru'sch-Gerdes, and E. Richter. Application of the GenoType MTBDR assay directly on sputum specimens. *Int. J. Tuberc.Lung Dis.* 2006; 10:1057–1059.
173. Somoskovi, A., J. Dormandy, D. Mitsani, J. Rivenburg, and M. Salfinger. Use of smear-positive samples to assess the PCR-based GenoType MTBDR assay for rapid, direct detection of the Mycobacterium tuberculosis complex as well as its resistance to isoniazid and rifampin. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:4459–4463
174. World Health Organization. Rapid implementation of the Xpert MTB/RIF diagnostic test. Technical and operational 'How-to'. Practical considerations.2011. Geneva: World Health Organization; 2011.
175. World Health Organization. Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB): policy statement; 2008. Geneva: World Health Organization; 2008.
176. World Health Organization .The use of molecular line probe assay for the detection of resistance to isoniazid and rifampicin: policy update; 2016. Geneva: World Health Organization; 2016.
177. World Health Organization. Xpert MTB/RIF implementation manual: technical and operational 'how-to'; practical considerations; 2014. Geneva: World Health Organization; 2014.
178. World Health Organization. The use of the Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis TB. Meeting Report; 2016. Geneva: World Health Organization; 2016
179. Cabibbe AM, Sotgiu G, Izco S, et al. Genotypic and phenotypic M. tuberculosis resistance: guiding clinicians to prescribe the correct regimens. *Eur Respir J* 2017; 50: 1702292
doi.org/10.1183/13993003.02292-2017.
180. Koch A, Cox H, Mizrahi V. Drug-resistant tuberculosis: challenges and opportunities for diagnosis and treatment. *Current opinion in pharmacology.* 2018; 42:7-15.
181. Nurwidya F, Handayani D, Burhan E, Yunus F. Molecular Diagnosis of Tuberculosis. *Chonnam medical journal.* 2018; 54(1):1-9.
182. World Health Organization .The use of molecular line probe assays for the detection of mutations associated with resistance to fluoroquinolones (FQs) and second-line injectable drugs (SLIDs). Policy guidance; 2016. Geneva: World Health Organization; 2016.

183. World Health Organization. WHO Meeting Report of a Technical Expert Consultation: Non-inferiority analysis of Xpert MTB/RIF Ultra compared to Xpert MTB/RIF; 2017. Geneva: World Health Organization; 2016
184. Farhat MR, Sultana R, Iartchouk O, Bozeman S, Galagan J, Sisk P, et al. Genetic determinants of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and their diagnostic value. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;194:621e3
185. Cox H, Mizrahi V. The Coming of Age of Drug-Susceptibility Testing for Tuberculosis. *The New England journal of medicine*. 2018; 11;379(15):1474.
186. Gröschel MI, Walker TM, van der Werf TS, Lange C, Niemann S, Merker M. Pathogen-based precision medicine for drug-resistant tuberculosis. *PLoS pathogens*. 2018; 18;14(10):e1007297.
187. Lee RS, Pai M. Real-time sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*: are we there yet?. *Journal of clinical microbiology*. 2017; 55(5):1249-54.
188. Dheda K, Gumbo T, Maartens G, Dooley KE, McNerney R, Murray M, Furin J, Nardell EA, London L, Lessem E, Theron G. The epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and incurable tuberculosis. *The lancet Respiratory medicine*. 2017; 5(4):291-360.
189. Papaventsis D, Casali N, Kontsevaya I, Drobniowski F, Cirillo DM, Nikolayevskyy V. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* for detection of drug resistance: a systematic review. *Clinical Microbiology and Infection*. 2017; 23(2):61-8.
190. Jeanes C, O'Grady J. Diagnosing tuberculosis in the 21st century—Dawn of a genomics revolution?. *International journal of mycobacteriology*. 2016; 5(4):384-91.
191. Coll F, Phelan J, Hill-Cawthorne GA, Nair MB, Mallard K, Ali S, Abdallah AM, Alghamdi S, Alsomali M, Ahmed AO, Portelli S. Genome-wide analysis of multi- and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature genetics*. 2018; 50(2):307-16
192. Brown AC, Bryant JM, Einer-Jensen K, Holdstock J, Houniet DT, Chan JZM, Depledge DP, Nikolayevskyy V, Broda A, Stone MJ, Christiansen MT, Williams R, McAndrew MB, Tutill H, Brown J, Melzer M, Rosmarin C, McHugh TD, Shorten RJ, Drobniowski F, Speight G, Breuer J. 2015. Rapid whole-genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates directly from clinical samples. *J Clin Microbiol* 53:2230–2237.
doi:10.1128/JCM.00486-15.
193. Brossier F, Sougakoff W, Aubry A, Bernard C, Cambau E, Jarlier V, Mougari F, Raskine L, Robert J, Veziris N. Molecular detection methods of resistance to antituberculosis drugs in *Mycobacterium tuberculosis*. *Medecine et maladies infectieuses*. 2017; 47(5):340-8.
194. Chiang CY, Trébucq A. Tuberculosis re-treatment after exclusion of rifampicin resistance. *European Respiratory Journal*. 2018; 51(2):1702282.
195. Horsburgh Jr CR, Barry III CE, Lange C. Treatment of tuberculosis. *New England Journal of Medicine*. 2015; 373(22):2149-60.

196. Hughes, D., & Brandis, G. Rifampicin Resistance: Fitness Costs and the Significance of Compensatory Evolution. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*. 2013; 2(2), 206-16.
doi:10.3390/antibiotics2020206
197. World Health Organization. Treatment guidelines for multidrug-and rifampicin-resistant tuberculosis, 2018 update.[December 2018, Pre-final text]
198. Olaru ID, von Groote-Bidlingmaier F, Heyckendorf J, Yew WW, Lange C, Chang KC. Novel drugs against tuberculosis: a clinician's perspective. *European Respiratory Journal*. 2015; 45(4):1119-31.
199. World Health Organization. StopTB Partnership. The global plan to stop TB 2011–2015: transforming the fight towards elimination of tuberculosis – reprinted with changes, 2011.
http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241500340_eng.pdf
(пристапено на 05.05.2014)
200. WHO 1994, TB: a global emergency.
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/58749/WHO_TB_94.177.pdf?sequence=1&isAllowed=y
201. Harries AD, Lin Y, Kumar AM, Satyanarayana S, Takarinda KC, Dlodlo RA, Zachariah R, Olliaro P. What can National TB Control Programmes in low-and middle-income countries do to end tuberculosis by 2030?.*Research*. 2018;7.
202. World Health Organization: Global Tuberculosis Report. WHO, Geneva, Switzerland. WHO/HTM/TB/2016.13. 2016.
203. World Health Organization: Global Tuberculosis Report. WHO, Geneva, Switzerland. WHO/HTM/TB/2017.23. 2017. Reference Source.
204. The WHO End TB Strategy. Geneva, World Health Organization, 2014.
<https://www.who.int/tb/strategy/end-tb/en/>
205. G20 Leaders' Declaration. Shaping an interconnected world, 2017. Available from URL: <https://www.g20.org/gifpeldokumente/ G20-leaders-declaration.pdf>
206. Kaplan G, Post FA, Moreira AL, et al. Mycobacterium tuberculosis growth at the cavity surface: a microenvironment with failed immunity. *Infect Immun* 2003; 71: 7099–108.
207. Post FA, Willcox PA, Mathema B, et al. Genetic polymorphism in Mycobacterium tuberculosis isolates from patients with chronic multidrug-resistant tuberculosis. *J Infect Dis* 2004; 190: 99–106.
208. van Rie A, Victor TC, Richardson M, et al. Reinfection and mixed infection cause changing Mycobacterium tuberculosis drug-resistance patterns. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 636-42.
209. Victor TC, Streicher EM, Kewley C, et al. Spread of an emerging Mycobacterium tuberculosis drug-resistant strain in the western Cape of South Africa. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007; 11: 195–201.
210. Pillay M, Sturm AW. Evolution of the extensively drug-resistant F15/LAM4/KZN strain of Mycobacterium tuberculosis in KwaZulu-Natal, South Africa. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 1409–14.

211. Rullán J, Herrera D, Cano R, et al. Nosocomial transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Spain. *Emerg Infect Dis* 1996; 2: 125–29.
212. Gandhi NR, Moll A, Sturm AW, et al. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet* 2006; 368: 1575–80.
213. Zhao M, Li X, Xu P, et al. Transmission of MDR and XDR tuberculosis in Shanghai, China. *PLoS One* 2009; 4: e4370.
214. Mariam DH, Mengistu Y, Hoffner SE, Andersson DI. Effect of *rpoB* mutations conferring rifampin resistance on fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1289–94.
215. Toungousova OS, Caugant DA, Sandven P, Mariandyshv AO, Bjune G. Impact of drug resistance on fitness of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing genotype. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004; 42: 281–90.
216. Garcia-Garcia ML, Ponce de Leon A, Jimenez-Corona ME, et al. Clinical consequences and transmissibility of drug-resistant tuberculosis in southern Mexico. *Arch Intern Med* 2000; 160: 630–36.
217. de Vos M, Muller B, Borrell S, et al. Putative compensatory mutations in the *rpoC* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* are associated with ongoing transmission. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 827–832.
218. Borrell S, Teo Y, Giardina F, et al. Epistasis between antibiotic resistance mutations drives the evolution of extensively drug-resistant tuberculosis. *Evol Med Public Health* 2013; 2013: 65–74.
219. Brandis G, Wrande M, Liljas L, Hughes D. Fitness-compensatory mutations in rifampicin-resistant RNA polymerase. *Molecular microbiology*. 2012 Jul; 85(1):142-51.
220. Toit K, Altraja A, Acosta CD, et al. A four-year nationwide molecular epidemiological study in Estonia: risk factors for tuberculosis transmission. *Public Health Action* 2014; 4 (suppl 2): S34–40.
221. Parwati I, van Crevel R, van Soolingen D. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains. *Lancet Infect Dis* 2010; 10: 103–11.
222. van Doorn HR, de Haas PE, Kremer K, Vandenbroucke-Grauls CM, Borgdorff MW, van Soolingen D. Public health impact of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains with a mutation at amino-acid position 315 of *katG*: a decade of experience in the Netherlands. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 769–75.
223. Holtz TH, Sternberg M, Kammerer S, et al. Time to sputum culture conversion in multidrug-resistant tuberculosis: predictors and relationship to treatment outcome. *Ann Intern Med* 2006; 144: 650–59.
224. Gagneux S. Fitness cost of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15 (suppl 1): 66–68.
225. Cox HS, Niemann S, Ismailov G, et al. Risk of acquired drug resistance during short-course directly observed treatment of tuberculosis in an area with high levels of drug resistance. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 1421–27.
226. Devaux I, Kremer K, Heersma H, Van Soolingen D. Clusters of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* cases, Europe. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1052–60.

227. Mlambo CK, Warren RM, Poswa X, Victor TC, Duse AG, Marais E. Genotypic diversity of extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB) in South Africa. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008; 12: 99–104.
228. Van Rie A, Warren RM. MDR tuberculosis control: time to change the dogma?. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2015; 3(12):907-9.
229. Hedt BL, van Leth F, Zignol M, Cobelens F, van Gemert W, Nhung NV, Lyepshina S, Egwaga S, Cohen T. Multidrug resistance among new tuberculosis cases: detecting local variation through lot quality-assurance sampling. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*. 2012; 23(2):293.
230. Frieden TR, Sherman LF, Maw KL, et al. A multi-institutional outbreak of highly drug-resistant tuberculosis: epidemiology and clinical outcomes. *JAMA* 1996; 276: 1229–35.
231. Suchindran S, Brouwer E S, Van Rie A. Is HIV infection a riskfactor for multi-drug resistant tuberculosis? A systematicreview. *PLOS ONE* 2009; 4 e5561.
232. Mesfin Y M, Hailemariam D, Biadgilign S, Kibret K T. Association between HIV/AIDS and multi-drug resistancetuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE* 2014; 9: e82235.
233. Zhao Y, Xu S, Wang L, et al. National survey of drug-resistant tuberculosis in China. *N Engl J Med* 2012; 366: 2161–2170.
234. Otero L, Krapp F, Tomatis C, et al. High prevalence of primary multidrug resistant tuberculosis in persons with no known risk factors. *PLOS ONE* 2011; 6: e26276.
235. Bantubani N, Kabera G, Connolly C, et al. High rates of potentially infectious tuberculosis and multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) among hospital inpatients in KwaZulu Natal, South Africa indicate risk of nosocomial transmission. *PLOS ONE* 2014; 9: e90868.
236. Lange C, Chesov D, Heyckendorf J, Leung CC, Udwardia Z, Dheda K. Drug-resistant tuberculosis: An update on disease burden, diagnosis and treatment. *Respirology*. 2018 Jul; 23(7):656-73.
237. World Health Organization. *Global tuberculosis report 2010*. Geneva: World Health Organization; 2010.
238. World Health Organization. *Drug resistant tuberculosis, Surveillance & Response. Supplement Global tuberculosis report 2014*. Geneva, World Health Organization; 2014
239. Dheda K, Limberis JD, Pietersen E, Phelan J, Esmail A, Lesosky M, Fennelly KP, Te Riele J, Mastrapa B, Streicher EM et al. Outcomes, infectiousness, and transmission dynamics of patients with extensively drug-resistant tuberculosis and home-discharged patients with programmatically incurable tuberculosis: a prospective cohort study. *Lancet Respir. Med.* 2017; 5: 269–81.
240. Olaru ID, Lange C, Indra A, Meidlinger L, Huhulescu S, Rumetshofer R. High rates of treatment success in pulmonary multidrug-resistant tuberculosis by individually tailored treatment regimens. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 2016; 13: 1271–8.
241. van Altena R, de Vries G, Haar CH, de Lange WC, Magis-Escurra C, van den Hof S, van Soolingen D, Boeree MJ, van der Werf TS. Highly successful treatment outcome of multidrug-resistant tuberculosis in the Netherlands, 2000-2009. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2015; 19: 406–12.

242. Nourzad S, Jenkins HE, Milstein M, Mitnick CD. Estimating the global burden of multidrug-resistant tuberculosis among prevalent cases of tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2017; 21:6–11.10
243. Falzon D, Jaramillo E, Wares F, Zignol M, Floyd K, Raviglione MC. Universal access to care for multidrug-resistant tuberculosis: an analysis of surveillance data. *Lancet Infect. Dis.* 2013;13: 690–7.
244. Davies PD. The world-wide increase in tuberculosis: how demographic changes, HIV infection and increasing numbers in poverty are increasing tuberculosis. *Ann Med.* 2003; 35:235-243.
245. Nathanson E, Lambregts-van C Weezenbeek, Rich ML, Gupta R, Bayona J, Kai K Blöndal, et al. Multidrug-resistant tuberculosis management in resource-limited settings. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12 (9):1389-1397.
246. Stop TB Department WHO. Seventh meeting. Strategic and technical advisory group for tuberculosis (STAG-TB) report on conclusions and recommendations, 2007; Geneva, Switzerland.
247. World Health Organization. High-priority target product profiles for new tuberculosis diagnostics. Report of a consensus meeting. Geneva: World Health Organization; 2014.
248. Watterson SA, Wilson SM, Yates MD, Drobniowski FA. Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(7):1969-73.
249. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, Allen J, Tahirli R, Blakemore R, Rustomjee R et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363: 1005–15.
250. Lawn SD, Nicol MP. Xpert® MTB/RIF assay: development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance. *Future Microbiol* 2011; 6:1067.
251. Hillemann D, Rusch-Gerdes S, Richter E. Evaluation of the GenoType MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2007; 45:2635e40.
252. Hillemann D, Weizenegger M, Kubica T, Richter E, Niemann S. Use of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol* 2005; 43:3699e703.
253. Domínguez J, Boettger EC, Cirillo D, Cobelens F, Eisenach KD, Gagneux S, Hillemann D, Horsburgh R, Molina-Moya B, Niemann S et al.; TBNET; RESIST-TB networks. Clinical implications of molecular drug resistance testing for *Mycobacterium tuberculosis*: a TBNET/RESIST-TB consensus statement. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2016; 20:24–4
254. Coll F, McNerney R, Preston M, Guerra-Assunção JA, Warry A, Hill-Cawthorn G, et al. Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences. *Genome Med.* 2015; 7:51.
255. Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults.

Cochrane Database Syst Rev. 2014;(1):CD009593. Published 2014 Jan 21.
doi:10.1002/14651858.CD009593.pub3

256. Boehme CC, Nicol MP, Nabeta P, Michael JS, Gotuzzo E, Tahirli R, Gler MT, Blakemore R, Worodria W, Gray Cet al. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multi-drug resistance: a multicentre implementation study. *Lancet* 2011; 377: 1495–505.
257. Witney AA, Gould KA, Arnold A, Coleman D, Delgado R, Dhillon J, et al. Clinical application of whole-genome sequencing to inform treatment for multidrug-resistant tuberculosis cases. *J Clin Microbiol.* 2015; 53:1473–83.
258. Централен Регистар за туберкулоза на Република Македонија.
<https://ibzhealth.org/Reports/Rezistencija.aspx> (последно пристапено на 20.02.2019)
259. European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2018 – 2016 data. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control, 2018.
260. World Health Organization. Tuberculosis country profiles.
https://extranet.who.int/sree/Reports?op=Replet&name=%2FWHO_HQ_Reports%2FG2%2FPROD%2FEXT%2FTBCountryProfile&ISO2=MK&LAN=EN&outtype=pdf. (последно пристапено на 20.02. 2019)
261. Ocheretina O, Escuyer V E, Mabou M M, et al. Correlation between genotypic and phenotypic testing for resistance to rifampin in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Haiti: investigation of cases with discrepant susceptibility results. *PLOS ONE* 2014; 9: e9056.
262. Williamson DA, Basu I, Bower J, Freeman JT, Henderson G, Roberts SA. Anevaluation of the Xpert MTB/RIF assay and detection of false-positive rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 74:207-9.
263. Alonso M, Palacios JJ, Herranz M, Penedo A, Menendez A, Bouza E. Garcia deViedma D. Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* strains with a silent mutation in *rpoB* leading to potential misassignment of resistance category. *J ClinMicrobiol* 2011; 49:2688-90.
264. Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, Murray MB. Tuberculosis drug resistance mutation database. *PLoS Med* 2009;6:e2.
265. Miotto P, Cabibbe AM, Borroni E, Degano M, Cirillo DM. Role of disputed mutations in the *rpoB* gene in interpretation of automated liquid MGIT culture results for rifampin susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2018; 56:e01599-17.
doi.org/10.1128/JCM.01599-17.
266. Van Deun A, Aung KJ, Bola V, Lebeke R, Hossain MA, de Rijk WB, Rigouts L, Gumusboga A, Torrea G, de Jong BC. Rifampin drug resistance tests for tuberculosis: challenging the gold standard. *Journal of clinical microbiology.* 2013; 51(8):2633-40.

267. Yuan X, Zhang T, Kawakami K, et al. Molecular characterization of multidrug- and extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis strains in Jiangxi, China. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(7):2404-13.
268. Van Deun A, Barrera L, Bastian I, et al. Mycobacterium tuberculosis strains with highly discordant rifampin susceptibility test results. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(11):3501-6.
269. Nikolayevskyy VV, Brown TJ, Bazhora YI, Asmolov AA, Balabanova YM, Drobniowski FA. Molecular epidemiology and prevalence of mutations conferring rifampicin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis strains from the southern Ukraine. *Clinical microbiology and infection.* 2007; 13(2):129-38.
270. International Union Against Tuberculosis and Lung Diseases. Technical guide. Sputum Examination For Tuberculosis by Direct Microscopy in Low Income Countries. Fifth edition 2000 update.
271. Handbook on TB laboratory diagnostic methods in the European Union [ECDC TECHNICAL DOCUMENT]. (2016, March). <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/tuberculosis-laboratory-diagnostic-methods-eu.pdf>
272. Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: a Guide for the level III laboratory. U.S. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA 1985.
273. Department of Health and Human services. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta. Use of fluorochrome staining for detecting acid-fast mycobacteria, December 2000
http://wwwn.cdc.gov/dls/lta/TB_Fluorochrome/fluorochrome.pdf
(пристапено на 05.05.2015)
274. World health organization. Laboratory services in tuberculosis control. Part II: Microscopy. WHO 1998.
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/65942/WHO_TB_98.258_%28part%29.pdf?sequence=2&isAllowed=y
275. World health organization. Laboratory services in tuberculosis control. Part III: Culture. WHO 1998. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/65942/WHO_TB_98.258_%28part3%29.pdf?sequence=3&isAllowed=y
276. BACTEC™ MGIT™ 960 Mycobacterial Detection System. [Package insert] <http://www.bd.com/ds/productCenter/445870.asp> (пристапено на 01.05.2015)
277. GEN-PROBE®AMPLIFIED™. Mycobacterium Tuberculosis Direct (MTD) [Package insert]. <http://www.gen-probe.com/pdfs/pi/IN0014.pdf> (пристапено на 05.05.2015)
278. Xpert® MTB/RIF assay [Package-insert-301-1404 rev. C May 2015]. Cepheid Inc., Sunnyvale, CA, USA
279. Denkinger CM, Schumacher SG, Boehme CC, Dendukuri N, Pai M, Steingart KR. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of extra-pulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur. Respir. J.* 2014; 44: 435–46.
280. Piatek AS, Tyagi S, Pol AC, Telenti A, Miller LP, Kramer FR, Alland D. Molecular beacon sequence analysis for detecting drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Nat. Biotechnol.* 1998; 16: 359–63.

281. Genotype MTBDRplus™, version 2.0 [Product insert] Nehren, Germany: Hain Lifescience, GmbH.
https://www.ghdonline.org/uploads/MTBDRplusV2_0212_304A-02-02.pdf
282. HAIN LifeScience. 2015. GenoType MTBDRsl VER 2.0 instructions for use. Document IFU-317A-01. HAIN LifeScience, Nehren, Germany. [http:// www.hain-lifescience.de/en/instructions-for-use.htm](http://www.hain-lifescience.de/en/instructions-for-use.htm)
283. Државен завод за статистика. Република Северна Македонија. Миграции.
<http://www.stat.gov.mk/Publikacii/2.4.18.06.pdf>
284. Melsew YA, Doan TN, Gambhir M, Cheng AC, McBryde E, Trauer JM. Risk factors for infectiousness of patients with tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Epidemiology & Infection*. 2018; 146(3):345-53.
285. Rageade F, Picot N, Blanc-Michaud A, Chatellier S, Mirande C, Fortin E, van Belkum A. Performance of solid and liquid culture media for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical materials: meta-analysis of recent studies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 33:867–870.
286. Helb D, Jones M, Story E, Boehme C, Wallace E, Ho K, Kop J, Owens MR, Rodgers R, Banada P, Safi H. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *Journal of clinical microbiology*. 2010; 48(1):229-37.
287. Blakemore R, Story E, Helb D, Kop J, Banada P, Owens MR, Chakravorty S, Jones M, Alland D. Evaluation of the analytical performance of the Xpert MTB/RIF assay. *Journal of clinical microbiology*. 2010; 48(7):2495-501.
288. Huang SL, Lee HC, Yu CW, Chen HC, Wang CC, Wu JY, Lee CC. Value of procalcitonin in differentiating pulmonary tuberculosis from other pulmonary infections: a meta-analysis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2014; 18(4):470-7.
289. Bashir AB, Abufatima AS, Mohamedani AA. Reactive thrombocytosis and erythrocyte sedimentation rate in patients with pulmonary tuberculosis. *Journal of Medical Laboratory and Diagnosis*. 2014; 5(3):29-34.
290. Geleta D. A., Megerssa Y. C., Gudeta A. N., Akalu G. T., Debele M. T., Tulu K. D. Xpert MTB/RIF assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis in sputum specimens in remote health care facility. *Clinical microbiology and vaccines. BMC Microbiology*. 2015; 15(1):220.
291. Thapa, A., Gurung, P., & Ghimire, G. Evaluation of Gene Xpert Mtb/Rif Assay for the Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* in Sputum of Patients Suspected of Pulmonary Tuberculosis Visiting National Tuberculosis Centre, Thimi, Bhaktapur, Nepal. *SAARC Journal of Tuberculosis, Lung Diseases and HIV/AIDS*, 2017; 13(1): 16-22.
292. Agrawal M, Bajaj A, Bhatia V, Dutt S. Comparative study of GeneXpert with ZN stain and culture in samples of suspected pulmonary tuberculosis. *J Clin Diagn Res*. 2016; 10(5):DC09-12.
293. Van Rie A, Page-Shipp L, Hanrahan CF, et al. Point-of-care Xpert® MTB/RIF for smear-negative tuberculosis suspects at a primary care clinic in South Africa. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2013; 17(3):368-72.

294. Kim CH, Hyun IG, Hwang YI, et al. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and Rifampin Resistance in Clinical Specimens Using the Xpert MTB/RIF Assay. *Ann Clin Lab Sci.* 2015; 45 (1):32-38.
295. Reechaipichitkul W, Phetsuriyawong A, Chaimanee P, Ananta P. Diagnostic test of sputum GeneXpert MTB/RIF for smear negative pulmonary tuberculosis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2016; 47(3):457–466.
296. Meyer AJ, Atuheire C, Worodria W, et al. Sputum quality and diagnostic performance of GeneXpert MTB/RIF among smear-negative adults with presumed tuberculosis in Uganda. *PLoS One.* 2017; 12(7): e0180572.
297. Kurbatova EV, Kaminski DA, Erokhin VV, Volchenkov GV, Andreevskaya SN, Chernousova LN. Performance of Cepheid® Xpert MTB/RIF® and TB-Biochip® MDR in two regions of Russia with a high prevalence of drug-resistant tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013; 32:735–743.
298. Lombardi G, Di Gregori V, Girometti N, Tadolini M, Bisognin F, Dal Monte P. Diagnosis of smear-negative tuberculosis is greatly improved by Xpert MTB/RIF. *PLoS ONE.* 2017;12(4): e0176186.
299. Rice JP, Seifert M, Moser KS, Rodwell TC. Performance of the Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis and rifampin resistance in a low-incidence, high-resource setting. *PLoS One.* 2017;12(10): e0186139.
300. Zeka AN, Tasbakan S, Cavusoglu C. Evaluation of the GeneXpert MTB/RIF assay for rapid diagnosis of tuberculosis and detection of rifampin resistance in pulmonary and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(12):4138-41.
301. Moussa HS, Bayoumi FS, Ali AM. Evaluation of GeneXpert MTB/RIF assay for direct diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Saudi Med J.* 2016; 37(10):1076-81.
302. Malbruny B, Le Marrec G, Courageux K, Leclercq R, Cattoir V. Rapid and efficient detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and non-respiratory samples. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2011; 15:553–5.
303. Bowles EC, Frey e B, van Ingen J, Mulder B, Boeree MJ, van Soolingen D. Xpert MTB/RIF®, a novel automated polymerase chain reaction-based tool for the diagnosis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2011; 15:988–9.
304. Sohn H, Aero AD, Menzies D, Behr M, Schwartzman K, Alvarez GG, et al. Xpert MTB/RIF testing in a low tuberculosis incidence, high-resource setting: limitations in accuracy and clinical impact. *Clin Infect Dis.* 2014; 58(7):970–976.
305. Opota O, Senn L, Prod'hom G, Mazza-Stalder J, Tissot F, Greub G, et al. Added value of molecular assay Xpert MTB/RIF compared to sputum smear microscopy to assess the risk of tuberculosis transmission in a low-prevalence country. *Clin Microbiol Infect.* 2016; 22(7):613–619.
306. Ling DI, Zwerling AA, Pai M. GenoType MTBDR assays for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: a meta-analysis. *European Respiratory Journal.* 2008; 32(5):1165-74.
307. Kaur R, Kachroo K, Sharma JK, Vatturi SM, Dang A. Diagnostic Accuracy of Xpert Test in Tuberculosis Detection: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Glob Infect Dis.* 2016; 8(1):32-40.

308. Armand S, Vanhuls P, Delcroix G, Courcol R, Lemaître N. Comparison of the Xpert MTB/RIF test with an IS6110-TaqMan real-time PCR assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(5):1772-6.
309. Marlowe EM, Novak-Weekley SM, Cumpio J, et al. Evaluation of the Cepheid Xpert MTB/RIF assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(4):1621–3.
310. Dorman SE, Schumacher SG, Alland D, et al. Xpert MTB/RIF Ultra for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampicin resistance: a prospective multicentre diagnostic accuracy study. *Lancet Infect Dis.* 2018; 18(1):76-84.
311. Li Q, Bao XD, Liu Y, Ou XC, Pang Y, Zhao YL. Comparison of Two Molecular Assays For Detecting Smear Negative Pulmonary Tuberculosis. *Biomed Environ Sci.* 2016; 29(4):248–253.
312. Moure R, Muñoz L, Torres M, Santin M, Martín R, Alcaide F. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and rifampin resistance in smear-negative clinical samples by use of an integrated real-time PCR method. *Journal of Clinical Microbiology.* 2011; 49(3):1137–1139.
313. Meyer-Rath G, Schnippel K, Long L, MacLeod W, Sanne I, Stevens W, et al. The impact and cost of scaling up GeneXpert MTB/RIF in South Africa. *PLoS One.* 2012; 7(5):e36966
314. Nanovic Z et al. Evaluation of the GeneXpert MTB/RIF assay for rapid diagnosis of tuberculosis and detection of rifampicin resistance in respiratory specimens. *International Medical Journal Medicus* 2019;1:7-12.
315. Lange B, Khan P, Kalmambetova G, Al-Darraji HA, Alland D, Antonenka U, Brown T, Balcells ME, Blakemore R, Denkinger CM, Dheda K. Diagnostic accuracy of the Xpert® MTB/RIF cycle threshold level to predict smear positivity: a meta-analysis. *The international journal of tuberculosis and lung disease.* 2017 ; 21(5):493-502.
316. Theron G, Peter J, Calligaro G, Meldau R, Hanrahan C, Khalfey H, Matinyenya B, Muchinga T, Smith L, Pandie S, Lenders L. Determinants of PCR performance (Xpert MTB/RIF), including bacterial load and inhibition, for TB diagnosis using specimens from different body compartments. *Scientific reports.* 2014; 4:5658.
317. Alnimr, A. M. & Hassan, M. I. Potential of two nucleic acid amplification assays for quantifying mycobacterial load in respiratory and non-respiratory specimens: A prospective study. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2014; 78, 237–241.
318. Theron G, Pinto L, Peter J, Mishra HK, Mishra HK, van Zyl-Smit R, Sharma SK, Dheda K. The use of an automated quantitative polymerase chain reaction (Xpert MTB/RIF) to predict the sputum smear status of tuberculosis patients. *Clinical infectious diseases.* 2011;1;54(3):384-8.
319. Beynon F, Theron G, Respeito D, Mambuque E, Saavedra B, Bulo H, Sanz S, Dheda K, Garcia-Basteiro AL. Correlation of Xpert MTB/RIF with measures to assess *Mycobacterium tuberculosis* bacillary burden in high HIV burden areas of Southern Africa. *Scientific reports.* 2018; 26;8(1):5201.
320. Nikolayevskyy V, Miotto P, Pimkina E, Balabanova Y, Kontsevaya I, Ignatyeva O, Ambrosi A, Skenders G, Ambrozaitis A, Kovalyov A, Sadykhova A. Utility of

- propidium monoazide viability assay as a biomarker for a tuberculosis disease. *Tuberculosis*. 2015; 1;95(2):179-85.
321. Rachow A, Zumla A, Heinrich N, Rojas-Ponce G, Mtafya B, Reither K, Ntinginya EN, O'Grady J, Huggett J, Dheda K, Boehme C. Rapid and accurate detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples by Cepheid Xpert MTB/RIF assay—a clinical validation study. *PloS one*. 2011; 29;6(6):e20458.
 322. Theron G, Peter J, van Zyl-Smit R, Mishra H, Streicher E, Murray S, Dawson R, Whitelaw A, Hoelscher M, Sharma S, Pai M. Evaluation of the Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in a high HIV prevalence setting. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2011;184(1):132-40.
 323. Miotto P, Bigoni S, Migliori GB, Matteelli A, Cirillo DM. Early tuberculosis treatment monitoring by Xpert® MTB/RIF. *European Respiratory Journal*. 2012; ; 39(5):1269-71.
 324. Gillespie SH. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agent Chemother* 2002; 46(2): 267-274
 325. Mboowa G, Namaganda C, Ssenogooba W. Rifampicin resistance mutations in the 81 bp RRDR of *rpoB* gene in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using Xpert® MTB/RIF in Kampala, Uganda: a retrospective study. *BMC Infect Dis* 2014; 14:481
 326. World Health Organization. Anti-tuberculosis Drug Resistance in the World. Report No. 4. Geneva: World Health Organization; 2008
 327. Amita Raoot, Geeta Dev. Evaluate “ Rifampicin Resistance ” as Surrogate Marker for Rapid Detection of MDR – TB Using Real -Time PCR Directly on FNAC Samples of Tuberculous Lymphadenitis. *British Journal of Medicine & Medical Research*, 2015; 9 (5):1-8.
 328. F. A. Drobniowski , S. M. Wilson The rapid diagnosis of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* — a molecular story. *J. Med. Microbiol.* - Vol. 1998; 47: 189-196.
 329. Kaur R, Jindal N, Arora S, Kataria S. Epidemiology of Rifampicin Resistant Tuberculosis and Common Mutations in *rpoB* Gene of *Mycobacterium tuberculosis*: A Retrospective Study from Six Districts of Punjab (India) Using Xpert MTB/RIF Assay. *J Lab Physicians*. 2016; 8(2):96-100.
 330. Pang Y, Lu J, Wang Y, Song Y, Wang S, Zhao Y. 2013. Study of the rifampin monoresistance mechanism in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 57:893–900.
 331. Felmler TA, Liu Q, Whelen AC, Williams D, Sommer SS, Persing DH. Genotypic detection of *Mycobacterium tuberculosis* RIF resistance: comparison of single-strand conformation polymorphism and dideoxy fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 3:1617–1623.
 332. Garcia de Viedma D, del Sol Diaz Infantes M, Lasala F, Chaves F, Alcalá L, Bouza E. New real-time PCR able to detect in a single tube multiple RIF resistance mutations and high-level isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40:988–995.
 333. Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, Mijs W, Jannes G, De Rijk P, et al. Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for

- the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:2093e8.
334. Ovchinnikov Yu A, Monastyrskaya GS, Gubanov VV, Lipkin VM, Sverdlov ED, Kiver IF, et al. Primary structure of *Escherichia coli* RNA polymerase nucleotide substitution in the beta subunit gene of the rifampicin resistant *rpoB* 255 mutant. *Mol Gen Genet* 1981;184:536e8.
 335. Jin DJ, Gross CA. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *J Mol Biol* 1988; 202:45e58.
 336. Goldstein BP. Resistance to rifampicin: a review. *J Antibiot (Tokyo)* 2014; 67:625e30
 337. Miller LP, Crawford JT, Shinnick TM. The *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:805e11.
 338. Van Deun A, Aung K J, Hossain A, et al. Disputed *rpoB* mutations can frequently cause important rifampicin resistance among new tuberculosis patients. *Int J Tuberc Lung Dis* 2015; 19: 185–190.
 339. Andres S, Hillemann D, R üsch-Gerdes S, Richter E. Occurrence of *rpoB* mutations in isoniazid-resistant but rifampin-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58:590–592.
 340. Cambau E, Viveiros M, Machado D, Raskine L, Ritter C, Tortoli E, et al. Revisiting susceptibility testing in MDR-TB by a standardized quantitative phenotypic assessment in a European multicentre study. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70:686e96.
 341. Williamson DA, Roberts SA, Bower JE, Vaughan R, Newton S, Lowe O, et al. Clinical failures associated with *rpoB* mutations in phenotypically occult multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2012; 16:216e20.
 342. Rigouts L, Nolasco O, de Rijk P, Nduwamahoro E, Van Deun A, Ramsay A, et al. Newly developed primers for comprehensive amplification of the *rpoB* gene and detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2007; 45:252e4.
 343. Sanchez-Padilla E, Merker M, Beckert P, Jochims F, Dlamini T, Kahn P, et al. Detection of drug-resistant tuberculosis by Xpert MTB/RIF in Swaziland. *N Engl J Med* 2015; 372:1181e2.
 344. Heep M, Rieger U, Beck D, Lehn N. Mutations in the beginning of the *rpoB* gene can induce resistance to rifamycins in both *Helicobacter pylori* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:1075e7.
 345. Kohl TA, Diel R, Harmsen D, Rothganger J, Walter KM, Merker M et al. Whole-genome-based *Mycobacterium tuberculosis* surveillance: a standardized, portable, and expandable approach. *J Clin Microbiol* 2014; 52:2479e86.
 346. El-Hajj HH, Marras SA, Tyagi S, Kramer FR, Alland D. Detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in a single tube with molecular beacons. *J Clin Microbiol* 2001; 39:4131-7.
 347. Mathys V, van de Vyvere M, de Droogh E, Soetaert K, Groenen G. False-positive rifampicin resistance on Xpert® MTB/RIF caused by a silent mutation in the *rpoB* gene. *Int J Tuberc Lung Dis* 2014; 18:1255-7.

348. Ocheretina O, Byrt E, Mabou MM, Royal-Mardi G, Merveille YM, Rouzier V, et al. False-positive rifampin resistant results with Xpert MTB/RIF version 4 assay in clinical samples with a low bacterial load. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016; 85:53e5
349. Miotto P, Tessema B, Tagliani E, et al. A standardised method for interpreting the association between mutations and phenotypic drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur Respir J*. 2017; 50: 1701354 [https://doi.org/10.1183/13993003.01354-2017]
350. Barnard M, van Pittius NG, Van Helden PD, Bosman M, Coetzee G, Warren RM. Diagnostic performance of Genotype® MTBDRplus Version 2 line probe assay is equivalent to the Xpert® MTB/RIF assay. *Journal of clinical microbiology*. 2012; 12:JCM-01958.
351. Kouassi KG, Riccardo A, Christian CD, André G, Férilaha C, Hortense SA, Jean-Marc A, Maria CD, Mireille D. Genotyping of mutations detected with GeneXpert. *International journal of mycobacteriology*. 2016; 1;5(2):142-7.
352. Mwanza W, Milimo D, Moyo M, Kasese N, Cheeba-Lengwe M, Munkondya S, Ayles H, De Haas P, Muyoyeta M. Discordant results between genotypic assays (Xpert MTB/RIF and Hain MTBDRplus) and BACTEC MGIT 960 system for detection of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Zambia. *BMJ Global Health*. 2017; 2(Suppl 2):A36: A36.
353. Rahman A, Sahrin M, Afrin S, Earley K, Ahmed S, Rahman SM, Banu S. Comparison of Xpert MTB/RIF assay and GenoType MTBDRplus DNA probes for detection of mutations associated with rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*. 2016; 7;11(4):e0152694
354. Umubyeyi A, Shamputa IC, Rigouts L, Dediste A, Struelens M, Portaels F. Evidence of 'amplifier effect' in pulmonary multidrug-resistant tuberculosis: report of three cases. *International journal of infectious diseases*. 2007;11(6):508–12.
doi.org/10.1016/j.ijid.2007.01.009
355. Yang B, Koga H, Ohno H, Ogawa K, Fukuda M, Hirakata Y, Maesaki S, Tomono K, Tashiro T, Kohno S. Relationship between antimycobacterial activities of rifampicin, rifabutin and KRM-1648 and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1998; 42: 621–8.
356. Tan Y, Hu Z, Zhao Y, et al. The beginning of the *rpoB* gene in addition to the rifampin resistance determination region might be needed for identifying rifampin/rifabutin cross-resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Southern China. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 81–85.
357. World Health Organization. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Third global report. Geneva: World Health Organization, 2004.
358. Coovadia YM, Mahomed S, Pillay M, Werner L, Mlisana K. Rifampicin mono-resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in KwaZulu-Natal, South Africa: a significant phenomenon in a high prevalence TB-HIV region. *PLoS One* 2013; 8: e77712

359. de Steenwinkel J E, ten Kate M T, et al. Drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and association with MDR-TB. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 660–663.
360. den Hertog A L, Menting S, van Soolingen D, Anthony R M. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype resistance to transient rifampin exposure. *Emerg Infect Dis* 2014; 20: 1932–1933.
361. Nakamura M, Harano Y, Koga T. Isolation of a strain of *M. tuberculosis* which is considered to be rifampicin-dependent, from a patient with long-lasting smear positive and culture difficult (SPCD) mycobacteria. *Kekkaku* 1990; 65: 569–574.
362. Zhong M, Zhang X, Wang Y, et al. An interesting case of rifampicin-dependent/enhanced multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010; 14: 40–44.
363. Jin H X, Fu L, Wang S, Zheng M Q, Lu Y. Study on the rifampicin-dependent characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Chinese J Antituberculosis* 2012; 34: 670–675
364. Comas I, Borrell S, Roetzer A, et al. Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase genes. *Nat Genet* 2012; 44: 106–110.
365. Casali N, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, et al. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population. *Nat Genet* 2014; 46: 279–286.
366. Palomino, J. C., & Martin, A. Drug Resistance Mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiotics* (Basel, Switzerland) 2014; 3(3): 317-40. doi:10.3390/antibiotics3030317.
367. Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, et al. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1994; 263: 227–230.
368. Cohen KA, Bishai WR, Pym AS. Molecular basis of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol. Spectr.* 2: MGM2-0036-2013. doi: 10.1128/microbiolspec. MGM2-0036-2013; 2014.
369. Campbell P J, Morlock G P, Sikes R D, et al. Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 2032–2041.
370. Guo H, Seet Q, Denkin S, Parsons L, Zhang Y. Molecular characterization of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from the USA. *J Med Microbiol* 2006; 55: 1527–1531.
371. Shekar S, Yeo Z X, Wong J C, et al. Detecting novel genetic variants associated with isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *PLOS ONE* 2014; 9: e102383.
372. Manson A. L., Cohen K. A., Abeel T., Desjardins C. A., Armstrong D. T., Barry C. E., III, et al. Genomic analysis of globally diverse *Mycobacterium tuberculosis* strains provides insights into the emergence and spread of multidrug resistance. *Nat. Genet.* 2017; 49: 395–402.
373. WHO. Treatment of tuberculosis: guidelines for national programmes. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2003.

374. Menzies D, Benedetti A, Paydar A, et al. Standardized treatment of active tuberculosis in patients with previous treatment and/or with mono-resistance to isoniazid: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 2009; 6: e1000150.
375. Atre S. An urgent need for building technical capacity for rapid diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) among new cases: A case report from Maharashtra, India. *J Infect Public Health*. 2015; 8(5):502-5.
doi.org/10.1016/j.jiph.2015.04.021.
376. Ioannidis P, Papventsis D, Karabela S, Nikolaou S, et al. Cepheid GeneXpert MTB/RIF assay for *Mycobacterium tuberculosis* detection and rifampin resistance identification in patients with substantial clinical indication of tuberculosis and smear-negative microscopy results. *J Clin Microbiol*. 2011; 49:3068–70.
doi.org/10.1128/JCM.00718-11.
377. Yano S, Kobayashi K, Ikeda T. Reminder of important clinical lesson: Multidrug-resistant tuberculosis that required 2 years for diagnosis. *BMJ case reports*. 2012; 27; 2012:bcr0220102775
378. Jonsson G, Furin J. Will molecular diagnosis of drug-resistant tuberculosis improve patient outcomes? [Perspectives]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2012; 16(1):4-5.
doi.org/10.5588/ijtld.11.0419 PMID:22236840
379. Rigouts L, Gumusboga M, de Rijk WB, Nduwamahoro E, Uwizeye C, de Jong B, Van Deun A. Rifampin resistance missed in automated liquid culture system for *Mycobacterium tuberculosis* isolates with specific *rpoB* mutations. *Journal of clinical microbiology*. 2013; 1;51(8):2641-5.
380. Mokaddas E, Ahmad S, Eldeen HS, Al-Mutairi N. Discordance between Xpert MTB/RIF assay and Bactec MGIT 960 culture system for detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a country with a low tuberculosis (TB) incidence. *Journal of clinical microbiology*. 2015; 1;53(4):1351-4.
381. Van Rie A, Mellet K, John M-A, et al. False-positive rifampicin resistance on Xpert® MTB/RIF: case report and clinical implications. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2012; 16(2): 206–8.
doi.org/10.5588/ijtld.11.0395.
382. Boyles TH, Hughes J, Cox V, Burton R, Meintjes G, Mendelson M. False-positive Xpert® MTB/RIF assays in previously treated patients: need for caution in interpreting results. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2014; 1;18(7):876-8.
383. Theron G, Venter R, Calligaro G, Smith L, Limberis J, Meldau R, Chanda D, Esmail A, Peter J, Dheda K. Xpert MTB/RIF results in patients with previous tuberculosis: can we distinguish true from false positive results?. *Clinical Infectious Diseases*. 2016; 62(8):995-1001.
384. Theron G, Venter R, Smith L, et al. False-Positive Xpert MTB/RIF Results in Retested Patients with Previous Tuberculosis: Frequency, Profile, and Prospective Clinical Outcomes. *J Clin Microbiol*. 2018; 56(3):e01696-17.
doi:10.1128/JCM.01696-17

385. Stevenson DR, Biswas JR, Lievesley A, Quinn G, Buckley J, John L, Davidson RN. False-positive Xpert® MTB/RIF more than seven years after cure. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2015; 1;19(10):1264-5.
386. Kayigire XA, Friedrich SO, van der Merwe L, Diacon AH. Acquisition of rifampin resistance in pulmonary tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017; 1;61(4):e02220-16.
387. Pfyffer GE, Strässle A, Brändli O, Shang H. Three Episodes of Tuberculosis—To Multidrug Resistance and Back to Susceptibility. *Clinical infectious diseases*. 1998; 26(1):219–20.
doi.org/10.1086/517030
388. Turett GS, Fazal BA, Justman JE, Alland D, Duncalf RM, Telzak EE. Exogenous Reinfection with Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis. *Clin Inf Dis*. 1997; 24:513–4.
doi.org/10.1093/clinids/24.3.513.
389. Tiberi S, D'Ambrosio L, De Lorenzo S, Viggiani P, Centis R, Migliori GB. Tuberculosis elimination, patients' lives and rational use of new drugs: revisited. *European Respiratory Journal*. 2016; 47(2):664–7.
doi.org/10.1183/13993003.01297-2015
390. Jeyakumar D. A case of primary drug resistant tuberculosis. *Med J Malaysia*. 2000; 55(1):129–31.