

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE
ĀRSTNIECĪBAS PROGRAMMA

***Mycobacterium tuberculosis* multirezistences noteikšanas
metodes**

DIPLOMDARBS

Autore: **Estere Alpe**

Studenta apliecības Nr.: ea13054

Darba vadītāja: Dr. med. Iveta Līduma

RĪGA, 2019

Kopsavilkums

Darba aktualitāte: Neskatoties uz to, ka šobrīd ir pieejami vairāki TB kontroles mehānismi gan slimības diagnosticēšanai, gan ārstēšanai, un multirezistentās tuberkulozes prevalence samazinās, tā joprojām ir aktuāla problēma. Ņemot vērā, ka rezistence pret tuberkulozi dažādos reģionos krasi atšķiras, svarīgi noskaidrot tās pašreizējo situāciju Latvijā un konkrētāk analizēt pret kuriem no anti-tuberkulozes medikamentiem rezistence ir sastopama visbiežāk.

Darba mērķis: Noteikt *M. tuberculosis* multirezistentu celmu prevalenci un salīdzināt fenotipiskās un genotipiskās multirezistences noteikšanas metodes.

Metodes un materiāli: Diplomdarbā tika iekļauti dati par *M. tuberculosis* jutību pret dažādiem anti-tuberkulozes medikamentiem, kas iegūti izmantojot fenotipiskos zāļu jutības testus un genotipisko *M.tuberculosis*/Rifampicīna testu (*GeneXpert*). Iegūtie dati tika apstrādāti, izmantojot *Microsoft Office Excel v16.4*.

Rezultāti un secinājumi:

1. Ar *GeneXpert* no 3666 veiktajiem testiem tuberkulozes izraisošo baktēriju klātbūtne tika konstatēta 356 jeb 9.71 % paraugos.
2. No 4089 ZJT pēc fenotipisko īpašību noteikšanas 849 jeb 20.76 % testos novērojama rezistence pret vismaz vienu no pirmās rindas, otrās rindas vai jaunās paaudzes medikamentiem.
3. Ar *GeneXpert* noteiktā rifampicīna rezistences prevalence ir 13.2% (n=356), savukārt ar fenotipiskajām metodēm noteiktā – 17.35% (n=634).
4. Visbiežāk rezistence sastopama pret otrās rindas medikamentu kapreomicīnu (37.75%) un pirmās rindas medikamentiem: izoniazīdu (34.55%) un pirazinamīdu (34.55%).

Atslēgas vārdi: *M. tuberculosis*, *GeneXpert*, *MDR-TB*,

Summary

Overview: Despite multitude of means for the diagnosis and treatment of tuberculosis and the decreased prevalence of multidrug-resistant tuberculosis, the disease still persists. Given that tuberculosis resistance varies greatly from region to region, it is important to clarify its current situation in Latvia, and, more specifically, to analyze the strain prevalence and the treatment efficacy for some of the most common anti-tuberculosis drugs.

Aim of the thesis: To determine the prevalence of *M.tuberculosis* multidrug-resistant strains and to compare phenotypic and genotypic multi-resistance detection methods.

Methods and Materials: Data on the susceptibility of *M.tuberculosis* to various anti-tuberculosis drugs was obtained by standardized phenotypic drug-sensitivity tests and a genotypic *M.tuberculosis* / Rifampicin (GeneXpert) analysis. The resulting data was tabulated and analyzed using Microsoft Office Excel v16.4.

Results and Conclusions:

1. Representing 3666 separate GeneXpert samples, the presence of tuberculosis-causing bacteria was detected in 356 or 9.71% of samples.
2. By standardized 4089 ZJT phenotype drug-resistance detection, 849 or 20.76% of the tests were resistant to at least one of the first-line, second-line, or new-generation drugs.
3. The prevalence of rifampicin resistance determined by GeneXpert was 13.2% (n = 356), whereas that of phenotypic methods was 17.35% (n = 634), suggesting an underreporting by the GeneXpert system.
4. Resistance most commonly occurred with capreomycin (37.75%) and the first-line drugs: isoniazid (34.55%) and pyrazinamide (34.55%).

Keywords: *M. tuberculosis*, GeneXpert, MDR-TB

Saturs

Kopsavilkums	2
Summary.....	2
Saturs	4
Apzīmējumu saraksts.....	6
Ievads.....	8
1.Literatūras apskats	10
1.1 Mikobaktēriju vispārējais apskats	10
1.1.1. Šūnapvalks.....	10
1.1.2. Krāsošanas īpatnības.....	11
1.1.3. Augšanas īpatnības	12
1.1.4 Mikobaktēriju uzsējumi uz barotnēm	12
1.2. Identifikācijas metodes	13
1.3. M. tuberculosis genoms	14
1.4. M. tuberculosis patoģenēze	15
1.4.1. M.tuberculosis patoģenēzes vispārējie principi.....	15
1.4.2 Alveolāro makrofāgu inficēšanās	15
1.5 Virulences faktori	17
1.6 Tuberkulozes diagnostika	20
1.7. Klīniskās izpausmes	22
1.7.1. Primāra tuberkuloze.....	22
1.7.2. Latenta tuberkuloze	23
1.7.3. Sekundāra tuberkuloze	25
1.7.4. Miliāra tuberkuloze.....	25
1.7.5. Tuberkuloze un HIV	26
1.8. Tuberkulozes izplatības kontrole un prevencija un ārstēšanas metodes.....	27
1.8.1. DOTS kontroles stratēģija	27
1.8.2. Tuberkulozes vakcīna	28
1.9. Dažādu antimikrobo līdzekļu iedarbība uz M. tuberculosis un rezistences molekulārie mehānismi.....	29
1.9.1. Pirmās rindas medikamenti	29
1.9.2. Otrās rindas medikamenti.....	32
1.9.3. Jaunās paaudzes anti-tuberkulozes medikamenti	34

1.9.3 Rezistences attīstības mehānismi’	34
1.10. Multi-rezistenta M. tuberculosis.....	36
1.11. Tuberkulozes izplatība pasaulē un Latvijā	38
2. Materiāli un metodes	42
2.1. Zāļu jutības tests	42
2.2. Medikamentu sagatavošana	43
2.3. Lēvenšteina-Jensena barotnes uzsējumi	44
2.4. Middlebrook 7H11 agars	45
2.5. Automatizētā Bactec MGIT 960 sistēma.....	46
2.6. Rezultātu interpretācija šķidrās barotnēs	47
2.7. GeneXpert® sistēma.....	48
2.8. Piederumi.....	49
2.10. Statistiskā analīze	50
3. Rezultāti.....	51
4. Diskusija	59
5. Secinājumi	62
Izmantotā literatūra.....	64

Apzīmējumu saraksts

- AIDS** - Iegūts imūndeficīta sindroms
- Anti- TB** – anti-tuberkulozes
- Anti- TNF** – Anti - Tumora nekrozes faktors
- ARB** - Acidorezistentas baktērijas
- ART** – Antiretrovirāla terapija
- ASV** – Amerikas Savienotās valstis
- ATP** - adenozintrifosfāts
- BCG** - Bacille Calmette-Guerin vakcīna
- CAMPs** – katjoniskais antimikrobiālais peptīds
- CNS** - centrālā nervu sistēma
- DCs** - dendrītiskās šūnas
- DNS** - Dezoksiribonukleīnskābe
- DOTS** - Tuberkulozes apkarošanas stratēģija
- GC**- augšanas kontrole
- GU** – augšanas vienība
- HIV** – cilvēka imūndeficīta vīruss
- I/V** – intravenozi
- IGN** – γ – interferons gamma
- iNOS** – inducējama oksīdu sintāze
- LAM** – Lipoarabinomannāns
- LJ** - Lēvenšteina- Jensena barotne
- LTBI** - latentā tuberkulozes infekcija
- Mce1A** – mikobakteriālais šūnas ieejas proteīns
- MDR-TB** – Multirezidenta tuberkuloze
- MGIT** – Mikobakteriālās augšanas indikatorcaurule
- MHC** - galvenais histokompatibilitātes komplekss
- MIC** - minimālā inhibējošā koncentrācija
- mL** – mililitri
- MTB** - Mycobacteria tuberculosis
- NAD** – nikotīnamīd-adenīn-dinukleotīds
- NADPH** -Nikotīnamīd-adenīn-dinukleotīdfosfāts
- PĶR** - Polimerāzes ķēdes reakcija

PVO – Pasaules Veselības organizācija

PZA – pirazinamīds

RAKUS - Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīca

RIF – Rifampicīns

RNS – Ribonukleīnskābe

RTG - rentgenogrāfija

SPKC - Slimību profilakse un kontroles centrs

TAT – argģinģna transports

TB – tuberkuloze

TCRS - divkomponentu regulģšanas sistģma

XDR-TB - Ekstensģvi rezistenta tuberkuloze

ZJT - zģģu jģģģbas tests

μg – mikrograms

μL – mikrolitrs

Ievads

Problēmas aktualitāte: Tuberkulozes (TB) etioloģiskais aģents tika atklāts jau 1882.gadā, tomēr tas joprojām saglabājies kā nopietns sabiedrības veselības drauds, ik gadu nogalinot gandrīz 2 miljonus cilvēku. Šobrīd ir pieejami vairāki TB kontroles mehānismi, proti, ir pieejamas gan diagnostikas metodes, gan medikamenti ārstēšanai, gan vakcīna, kas pasargā no smagas formas saslimšanas bērībā. Tomēr, šie mehānismi ir nepietiekami sekojošu iemeslu dēļ:

1. TB diagnoze ekonomiski vāji attīstītās valstīs tiek korekti uzstādīta vien pusē no visiem TB gadījumiem.
2. TB terapija ir komplikēta, ilglaicīga un nereti pacientu līdzestība ir zema, kas, savukārt, rezultējas ar jaunu rezistentu baktēriju celmu attīstību.
3. Vienīgā pieejamā vakcīna (*M. bovis* BCG) tika izstrādāta gandrīz gadsimtu atpakaļ un nodrošina ierobežotu aizsardzību, turklāt, galvenokārt, bērībā. Tā nepasargā pret plaušu tuberkulozi pieaugušus indivīdus, tādējādi šī vakcīna neietekmē MTB transmisiju. (Gengenbacher et al. 2012)

Tuberkulozes izplatības palielināšanās rietumu valstīs tiek saistīta, galvenokārt, ar HIV izplatības palielināšanos, imigrāciju un zāļu rezistenci. Savukārt, saslimstība ar multirezistentu tuberkulozi (MDR-TB) Eiropā tiek saistīta ar diviem galvenajiem mehānismiem:

1. Pirmreizēju inficēšanos ar multirezistentu *M. tuberculosis* celmu baktērijām transmisijas ceļā.
2. Multi-rezistentu celmu selekcija, ko inducē nesekmīga primārā TB terapija (Pradipta et al. 2018)

2006. gadā veiktā meta-analīzē tika secināts, ka galvenais determinējošais MDR-TB izplatības riska faktors Eiropā ir tieši *M.tuberculosis* celmu mutācija pēc pirmreizējas terapijas. Papildus tam, tika secināts, ka lielāks risks, ka izveidosies jauni rezistenti celmi bija tieši ārpus eiropas dzimušiem indivīdiem, pacientiem, kas jaunāki par 65 un HIV pozitīviem pacientiem. (Faustini et al. 2006)

Augstākminēto iemeslu dēļ, TB izraisītāju medikamentu jutības noteikšana ir ārkārtīgi svarīga pirms terapijas uzsākšanas, jo MDR-TB un XDR-TB izplatība ietekmē gan terapijas ilgumu, gan nepieciešamos finanšu līdzekļus TB ārstēšanai, gan jaunu rezistentu celmu attīstīšanos un izplatību. Šī tēma ir īpaši aktuāla laikā, kad arvien plašāk tiek runāts par jaunu antimikrobo līdzekļu trūkumu un pieaugošo mikroorganismu rezistenci pasaulē kopumā.

Darba mērķis: Noteikt *M. tuberculosis* multirezistentu celmu prevalenci un salīdzināt fenotipiskās un genotipiskās multirezistences noteikšanas metodes.

Darba uzdevumi:

1. Iegūt datus par MDR-TB prevalenci, izmantojot molekulārās diagnostikas (GeneXpert) metodi.
2. Iegūt datus par dažādu *M. tuberculosis* rezistentu celmu izplatību, izmantojot fenotipiskās zāļu jutības noteikšanas metodes pamatojoties uz ZJT medikamentu kritisko koncentrācijas metodi.
3. Noskaidrot rezistences izplatību pret pirmās un otrās rindas medikamentiem.
4. Noteikt pret kuru no anti-tuberkulozes medikamentiem pirmajā un otrajā medikamentu rindā ir visbiežāk sastopamā rezistence.
5. Salīdzināt rifampicīna rezistences prevalenci starp genotipisko un fenotipisko diagnostisko metodi.

1.Literatūras apskats

1.1 Mikobaktēriju vispārējais apskats

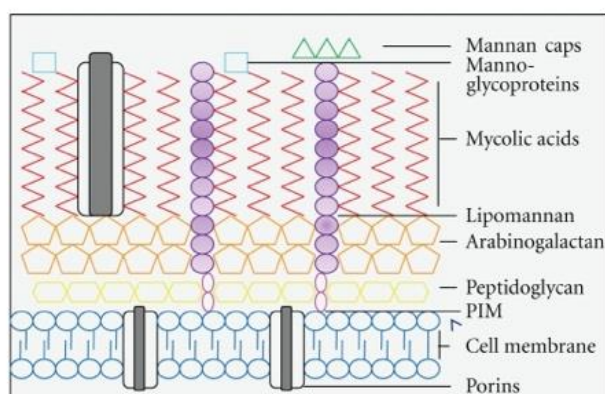
Mycobacterium tuberculosis pieder *Mycobacterium* ģints, kas sevī, savukārt, ietver vairāk kā 50 citus mikroorganismus, kas nereti tiek apvienoti zem nosaukuma: netuberkulozās mikobaktērijas. Tuberkuloze (TB) tiek definēta kā slimība, kuru izraisa *M.tuberculosis* kompleksa baktērijas. Pie šī kompleksa pieskaita: *M. tuberculosis*, *M.bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caneti* (Van Soolingen 1997), *M. caprae*, *M. pinnipedii* un *M. orygis*. (Soolingen et al. 2012)

1.1.1. Šūnapvalks

Īpatnējais šūnas apvalks ir viena no galvenajām *mycobacterium* ģints diferenciacijas īpatnībām. Mikobaktēriju šūnapvalks sastāv no:

1. Serdes slāņa, kas sastāv no 3 galvenajām pamatkomponentēm – kovalenti savā starpā saistītām makromolekulēm, proti – peptidoglikāna, arabinogalaktāna un mikolskābēm,
2. lipopolisaharīdu un lipoarabinomannāna (LAM) slāņa, kas saistīts ar plazmas membrānu, (McNeil, Brennan et al. 1991)
3. virspusējākā mikobakteriālās ārējās membrānas slāņa (MOM), kas sastāv no lipīdu dubultslāņa. (Hoffmann C et al. 2008)

Mikolskābes (beta-hidroksi taukskābes) ir galvenais šūnu sienas komponents, kas sastāda gandrīz 50% no visas šūnas apvalka masas. Šī strukturālā īpatnība definē *mycobacterium* ģinti. Mikolskābes saista nevien glikolipīdus, bet arī proteīnu molekulas ar šūnas apvalka ārējo slāni, veidojot īpatnēju šūnas sienas kompleksu. Tiek uzskatīts, ka glikolipīdu komponenti ir iesaistīti mikobaktēriju pavedienu veidošanā, ar kuru palīdzību tuberkulozās nūjiņas var ‘salīpt’ kopā veidojot mikroskopā redzamo tipisko ainu. (Mackowiak 2007)



Attēls 1.1. Mikobaktēriju šūnu sienas struktūra

Iegūts no: https://www.researchgate.net/figure/The-structure-of-the-Mycobacterium-tuberculosis-cell-wall-This-figure-shows-a-schematic_fig1_51156793

1.1.2. Krāsošanas īpatnības

Iepriekš aprakstītās šūnu sienā esošās komponentes piedalās *Mycobacterium* ģints tipisko krāsošanas īpašību veidošanā. Mikobaktēriju ģints organismi krāsojas pozitīvi ar Gram-krāsošanas metodi, tomēr šie mikroorganismi nevar tikt klasificēti ne kā gram pozitīvi, ne gram negatīvi organismi skābju rezistences dēļ. Mikolskābju struktūras dēļ mikobaktērijām piemīt rezistence pret atkrāsošanu ar skābām bāzēm pēc to krāsošanas ar noteiktām anilīna krāsām. Šo īpašību dēļ šīs baktērijas sauc par skābes-rezistentām nūjiņām (angl. *acid fast bacillus* (*AFB*)).

Pasaulē visplašāk, īpaši attīstības valstīs, kur laboratoriju pieejamība ir ierobežota, izmantotā *mycobacterium* diagnostiskā metode skābes rezistences īpašības dēļ, ir tieši mikroskopēšana pēc *Ziehl-Neelsen* vai *Kinyoun* metodes. Lai uztriepes preparātu uzskatītu par pozitīvu, jābūt redzamām vismaz 10^4 koloniju formējošām vienībām mililitrā (CFU)/ml. (Yari et al. 2016) Mikroskopēšana, preparātu krāsojot ar fluorohromu krāsu, piemēram, auramīnu O, ir vienkāršāka un apmēram 10-kārt efektīvāka. Tomēr, mikobaktērijas mikroskopējot, nav iespējams atšķirt *M. tuberculosis* no citām, netuberkulozajām mikobaktērijām. (Pfyffer, 2015)

1.1.3. Augšanas īpatnības

Viena no *M. tuberculosis* īpašībām, kas to atšķir no citām baktērijām ir to lēnā augšana. Mākslīgās barotnēs un dzīvnieku audos, replikācijas laiks ir apmēram 20-24 stundas. Salīdzinājumam *Escherichia coli*, piemēram, vairojas ik 20 minūtes. (*Tuberculosis*. Springer, 2004)

1.1.4 Mikobaktēriju uzsējumi uz barotnēm

M. tuberculosis kultivēšanai tiek izmantotas dažādas mākslīgas barotnes, cietās barotnes uz kartupeļu un olu bāzes, piemēram Lēvenšteina-Jensena barotne vai albumīna agarā bāzes, piemēram, *Middlebrook 7H10*, *7H11* barotne. (Kent PT, Kubica GP 1985) Šķidrās barotnes, piemēram, *Middlebrook 7H9*, savukārt tiek izmantotas subkultūru kultivēšanai un *bacillus* pavairošanai, lai no tiem atdalītu DNS tālākai molekulārajai diagnostikai. Barotnes uzsējums aug apmēram 3-4 nedēļas, atkarībā no sākotnējā uzsēto mikroorganismu daudzuma preparātā. (Madkour, Saif 2011)

Lai paātrinātu *Mycobacterium* mikroorganismu kultivēšanas procesu, kā arī uzlabotu diagnostikas sensitivitāti, ir izstrādātas automatizētas sistēmas. Kā piemēri minamas *BACTEC 460* un *BACTEC 960* automatizētās diagnostikas sistēmas. *BACTEC 460* sistēma izmanto barotnes uz *Middlebrook 7H12* un *7H9* barotņu bāzes, pievienojot 14 palmitīnskābes un antibiotiku maisījumu (*PANTA*). *PANTA* antibiotiku maisījums satur – polimiksīnu B, amfotericīnu B, nalidiksīnskābi, trimetoprimu un azlocillīnu. Šis antibiotiku maisījums tiek izmantots, lai ierobežotu citu mikroorganismu augšanu barotnē. (Hanna BA 1995) Lai inhibētu citu *M. tuberculosis* kompleksa organismu augšanu uz barotnes, piemēram *M. Bovis*, tiek papildus pievienots NAP (*p-nitro-alpha-acetylamino-beta-hydroxypropiophenone*), taču NAP pievienošana neļauj diferencēt *M. tuberculosis* no citiem ne-tuberkulozajiem *mycobacterium* pārstāvjiem.

Kā indikators *M. tuberculosis* koloniju augšanai tiek noteikts to izdalītais 14C palmitīnskābes metabolisma reakciju rezultātā. Izmantojot šo augstāk minēto sistēmu, uzsējumu rezultātus var noteikti jau pēc vidēji 14.8 dienām. (Tortoli et al. 1999) Tomēr, augsto

ekipējuma izmaksu dēļ un radioaktīvu materiālu nepieciešamības dēļ, BACTEC 460 sistēmas pielietojums ir ierobežots.

Savukārt, *BACTEC MGIT 960* ir pilnībā automatizēta sistēma, kas izmanto skābekļa sensora fluorescenci, lai noteiktu mikobaktēriju augšanu kultūrā. Tā sastāv no rutēnija pentahidrātā impregnētas silikona gumijas, kas kalpo kā skābekļa sensors. Rutēnija pentahidrāts vienlaikus kalpo kā fluorescences slāpejošs materiāls. Tā kā baktērijas metabolizē skābekli, tad šķidrā barotnē vizuāli iespējams novērtēt fluorescences izmaiņas. (Cruciani et al. 2004)

Pie, uz buljona bāzētajām sistēmām, minamas arī tādas sistēmas kā *Septi-Chek AFB* (BBL). Tā ir bifāziska sistēma, kas sastāv no noslēgtas pudeles ar modificētu *Middlebrook 7H9* agaru un lāpstiņas, kas noklāta ar cietu agaru, piemēram *Middlebrook 7H11* vai Lēvenšteina-Jensena barotni. (D'Amato et al. 1991)

1.2. Identifikācijas metodes

Kad mikroorganismi ir izolēti, tiek veikta to identifikācija, kuras pamatā var tikt lietotas *mycobacterium* morfoloģiskās un bioķīmiskās īpašības. Tomēr, mūsdienās daudzus konvencionāli izmantotos testus ir aizvietojušas uz DNS detekciju bāzētas metodes. *M.tuberculosis* identificē pēc tām raksturīgajām raupjajām, nepigmentētajām, pavedienveida kolonijām, kas aug uz albumīna bāzētā agara. Šīm baktērijām raksturīgs arī pozitīvs niacīna tests, vājā katalāzes aktivitāte, kas tiek inaktivēta 68°C temperatūrā, un nitrātu reducēšana. *M. simiae* ir vienīgā lēni augošā *mycobacterium* pārstāve, kurai arī, neskaitot *M.tuberculosis*, ir raksturīgs pozitīvs niacīna tests. (Sommers. 1978) Jāmin, ka, kaut arī visas *mycobacterium* mikroorganismi spēj producēt niacīnu, niacīna tests lielākoties ir negatīvs. Šī testa pozitivitāti tieši *M. tuberculosis* baktēriju gadījumā pamato ar atšķirīgo NAD biosintēzē iesaistīto enzīmu aktivitāti. Niacīna akumulācija *M.tuberculosis* baktērijās tiek pamatota ar nikotīnamidāzes (*nicotinamidase*), kas konvertē nikotīnamīdu niacīnā augsto aktivitāti, savukārt enzīms, kas pārstādā niacīnu NAD ir daudz zemāka kā citiem *mycobacterium* ģints pārstāvjiem. (Vilcheze et al. 2010)

M.tuberculosis diferenciacijai no TB kompleksam piederošās *M. bovis* tiek izmantots pirazinamidāzes producēšanas tests, kā arī jutības noteikšana pret tiofēna-2-karboksil skābes hidrazīdu (TCH). *M. bovis* atšķirībā no *M. tuberculosis* neekspresē pirazinamidāzi (vai

nikotinamidāzi) un ir jutīgs pret TCH zemākās koncentrācijās (>5cm/ml). Vienlaikus, svarīgi akcentēt, ka šī diferenciāldiagnostikā izmantotā īpašība nevar tikt uzskatīta par 100% specifisku, jo *M.tuberculosis* organismiem, ar nukleotīda punktveida mutāciju *pncA* (pirzinamidāzes kodējošā gēna) gēnā, pirazinamidāzes aktivitāte ir zema vai nav vispār. Šādi *M. tuberculosis* celmi ir rezistenti pret *pirazinamīdu*, kas ir viens no pirmās rindas anti-TB terapijas medikamentiem. (Scorpio, Zhang 1996)

1.3. *M. tuberculosis* genoms

M. tuberculosis pilna genoma sekvenca pirmo reizi tika noteikta 1998. gadā *H37Rv* baktērijas tipam. Pēc genoma pilnīgas sekvenčēšanas tika identificētas *M. tuberculosis* genomam raksturīgās īpašības. Genoms satur apmēram 4411529 bāzu pārus, apmēram 4000 dažādu gēnu. 65.5% no visa genoma satura veido G+C bāzes (guanīns un citozīns). Identificēti vairāki gēni, kas nodrošina lipīdu biosintēzi un metabolismu, kas sakrīt ar šūnas apvalka morfoloģisko struktūru. *M. tuberculosis* genomā identificēti arī gēni, kas atbild par lipīdu un poliketīdu biosintēzes enzīmu ekspresiju, kā arī vairāk kā 250 taukskābju deģenerācijas enzīmu kodējošu gēnu sekvenču, kas tipiski raksturīgs zīdītājiem un augiem. *M. tuberculosis* genomā identificēti vien 11 bāzu pāru, kas atbildīgi par TCRS. (*two-component-regulatory system*). Salīdzinājumam, *E.coli* genomā tādu ir vairāk kā 30. TCRS ir nozīmīgs signāl-transdukcijas mediators, kas iesaistīts baktēriju ārējās vides izmaiņu uztveršanas spējā. (Cole et al. 1999)

Apmēram 10% no visiem *M. tuberculosis* gēniem nodrošina divu ar glicīnu piesātinātu proteīnu grupu ekspresiju, proti: PE (prolīna-glutamīna motīvu grupa), PPE (prolīna-prolīna-glutamīna motīvu grupa). Šie gēni satur PGSR sekvences (polimorfās, ar guanīnu un citozīnu piesātinātas atkārtotojošās sekvences) un polimorfās tandēm-atkārtotojošās sekvences. Kaut arī šo gēnu grupu ekspresēto proteīnu funkcijas joprojām nav izprastas, to sekvenēšana tiek izmantota *M. tuberculosis* klīnisko izolātu tipēšanai. (Groenen et al. 1993) Interesanti, ka identificēts, ka *M. marinum* – baktērija, kas izraisa tuberkulozi zivīm un abiniekiem – šos proteīnus pastiprināti izdala atrodoties granulomās un makrofāgos. (Ramakrishnan et al. 2000)

1.4. *M. tuberculosis* patoģenēze

1.4.1. *M.tuberculosis* patoģenēzes vispārējie principi

Tuberkulozes infekcijas transmisija notiek, galvenokārt, gaisa-pilienu ceļā. Individam ieelpojot ar *M. tuberculosis* inficētas aerosola daļiņas, baktērijas nokļūst plaušu alveolās, kur primāro aizsardzību pret patogēniem nodrošina makrofāgi un dendrītiskās šūnas. Šādu inficēto aerosola daļiņu izmērs svārstās vidēji starp vienu līdz pieciem mikroniem. (Sepkowitz 1996)

Tuberkulozes infekcijas avots ir jau inficēti indivīdi ar plaušu, bronhu un augšējo elpceļu tuberkulozi, kuriem, visbiežāk, krēpu iztriepē var tikt apstiprināta acidorezistentu baktēriju klātesamība. No elpceļiem, mikobaktērijas apkārtējā vidē var nonākt inficētajam individam klepojot, runājot vai šķaudot. Ja pacientam tuberkulozes klātesamība tiek atklāta tikai veicot krēpu uzspējumu, iespēja inficēties ir ievērojami mazāka. (Tostmann et al. 2008) Teorētiski, inficēšanās var notikt arī no indivīda ar negatīvu tuberkulozei raksturīgo atradni. Rets, tomēr iespējams, ir arī vertikāls inficēšanās ceļš, kad ar tuberkulozi inficētas mātes auglis inficējas transplacentārā ceļā, kas var rezultēties iedzimtā tuberkulozē.

Pēc inficēšanās caur elpceļiem plaušu parenhīmā subpleirāli attīstas primārs tuberkulozā iekaisuma perēklis, kam seko imūnās atbildes reakcijas veidošanās, kas norisinās pēc šūnu vēlīnā tipa hipersensitivitātes reakcijas principiem. Šādas imunitātes attīstība notiek 2-10 nedēļu laikā kopš inficēšanās brīža. Šāds imunitātes mehānisms nodrošina *M. tuberculosis* tālākās izplatības un vairošanās ierobežošanu, jo *M. tuberculosis* implementācijas lokalizācijās veidojas granulomas. (SPKC 2014)

1.4.2 Alveolāro makrofāgu inficēšanās

Kā zināms, makrofāgi ir tās šūnas, kas nodrošina primāro aizsardzību pret mikrobioloģiskajiem iebrucējiem. (Shiloh. 2000) Mikroorganismus makrofāgi uzņem fagocitozes ceļā: procesā, kurā, vispirms, tiek veidotas membrānas invaginācijas, kas rezultājas

fagosomu veidošanā. Fagosoma ir daļa no makrofāgu intracelulārās transporta sistēmas, kā arī lokalizācija, kurā tiek izvērstas saimniekorganisma aizsargreakcijas. (Gruenberg, Stenmark. 2004) Mikroorganismi, kas nokļuvuši fagosomās tiek pakļauti skābai videi, reakīvā skābekļa un slāpekļa iedarbībai, hidrolītisko enzīmu un katjonisko antimikrobiālo peptīdu (CAMPs) iedarbībai. Skābais pH līmenis fagosomās nodrošina dažādu enzīmu, kas degradē bakteriālos lipīdus un proteīnus, aktivitāti. Vienlaikus, šāda vide nomāc arī mikroorganismu metabolismu. Reaktīvo skābekli un slāpekli, kurus producē fagosomālie enzīmi, tostarp NADPH fagocītu oksidāze un iNOS (inducējamā oksīdu sintāze) kaitē notvertajiem mikroorganismiem, modificējot to DNS, lipīdu, tiolus, tirozīna sānu ķēdes, aktīvos metal-atkarīgos proteīnus. Mikroorganismu iznīcināšanas reakcijās ir iesaistītas arī CAMPs, kas, izmaina mikroorganismu membrānu caurlaidību. Svarīgi atcerēties, ka ar iNOS, reaktīvo skābekli un slāpekli saistītās reakcijas var potenciāli būt atšķirīgas cilvēkiem salīdzinot ar laboratorijas peļu modeļos novērotajām. Pēdējiem baktēriju destrūkcijas un attīrīšanas procesa soļiem ir nepieciešama fagolizosomālā saplūšana. Visus iepriekš aprakstītos baktēriju destrūkcijas ceļus ietekmē saimniekorganisma imunitāte. Citokīni, tādi kā interferons-gamma (IFN- γ), nodrošina makrofāgu aktivāciju, tādējādi ļaujot organismam kontrolēt intracelulāri sagremotos mikroorganismus. (North, Jung 2004)

Fagosomas saturs var tālāk tikt virzīts antigēnu prezentācijas ceļam. *Mycobacterium tuberculosis* komponentus, īpaši to sekretētos proteīnus, procesē makrofāgi un dendrītiskās šūnas (DCs). Peptīdi, kas radušies procesēšanas rezultātā tālāk mijiedarbojas ar MHC (*Major histocompatibility complex*), kas ļauj šūnām veidot adekvātu adaptīvās imunitātes atbildi. (Pieters et al. 2007) No šī fakta varam secināt, ka arī T limfocītiem ir kritiska nozīme *Mycobacterium tuberculosis* kontroles mehānismos, īpaši latentās fāzes infekcijas laikā. T-šūnu nespējas adekvāti uzturēt imūnās kontroles mehānismu rezultātā, TB var re-aktivēties.

Cilvēki inficējas ar *Mycobacterium tuberculosis*, inhalējot aerosola pilienu, kas satur šīs baktērijas. (Cambi et al. 2005) Primārajā infekcijas lokalizācijā – plaušās – *Mycobacterium* nūjiņas fagocītē alveolārie makrofāgi, kuri ir programmēti cīnīties un iznīcināt mikroorganismus. Tomēr, *Mycobacterium tuberculosis* spēj makrofāgos izdzīvot. Unikālā mikobaktēriju šūnu sienas un šūnapvalka kompozīcija ļauj tām iekļūt makrofāgos, izmantojot dažādus receptorus. Pie šiem receptoriem kā būtiski ir uzskatāmi Fc, komplekta, vai mannozes receptori kā arī *DC-SIGN* intracelulārās adhēzijas molekulas. (Rysset et al. 2009) Daži receptori ļauj iekļūt makrofāgos neaktivizējot aizsargmehānismus (CR), bet daži receptori, piemēram (FcR), izraisa imūnās reakcijas. Iekļūstot mikobaktērijām neaktivizētos makrofāgos, tās izraisa fagosomu nobriešanas procesu traucējumus. (Divangahi et al. 2009)

Fagosomu nobriešana ir ārkārtīgi sarežģīts un komplikēts process, kura laikā, fagosomas, pēc mikroorganismu, kas nav *Mycobacterium tuberculosis*, vai citu daļiņu aptveršanas mijiedarbojas ar endosomām, sekretorajām organelām, multivezikulārajiem ķermenīšiem un endoplazmatisko tīklu. (Yates et al. 2005) Kad fagosomas nobriešanas process ir beidzies, fagosomā notiek vides paskābināšanas, kas notiek apmēram 10-20 minūtes. Šos vides skābināšanas procesus mediē protonu-sūkņi, kas neintralizē neitrālo pH līdz apmēram pH 5.0. (Schnappinger 2009) Taču, kā minēts, *Mycobacterium tuberculosis*, izraisa šo procesu traucējumus. (van der Wel et al. 2007) Fagosomas, kas nesatur *M. tuberculosis*, bet satur inertas daļiņas, saplūst ar lizosomu apmēram 1.5 stundu laikā. MtB vides paskābināšanas procesus aptur pie apmēram pH 6.4, kas ir tuvu neitrālas vides rādītājiem (atšķirībā no termināli nobriedušām, ar lizosomu saplūdušām fagosomām). (Vergne et al. 2006) Tā rezultātā, MtB spēj šajās fagosomās izdzīvot, kas pierādīts balstoties uz MtB ko-lokalizēšanu makrofāgos, izmantojot fluorescences metodes. Nesenos pētījumos ir atklāts, ka *M. tuberculosis* spēj migrēt no fagosomas uz makrofāgu citozolu. Pie organisma aizsardzības mehānismiem minama arī apoptoze un autofāģija. Apoptoze ir stingri regulēts process, kuru kontrolē paša organisma, ar aizsardzību saistīti mehānismi. Turpretī nekrozi izraisa eksogēni izraisīti bojājumi, kas var sniegt labumu patogēniem. Eksperimentālos TB pētījumos uz pelēm ir iegūti dati, kas liecina, ka virulentie *M. tuberculosis* celmi spēj inhibēt apoptozi, mijiedarbojoties ar dažādiem anti-apoptozes gēniem, kā arī prostaglandīnu E2. (Chan J et al. 1991)

1.5 Virulences faktori

Sekojošie *M.tuberculosis* produkti ir tikuši aprakstīti kā virulences faktori, pirms molekulārās bioloģijas metožu ieviešanas:

1. Mikolskābes glikolipīdi un trehalozes dimikolāts jeb *cord* faktors, kas ierosina granulomu veidošanos. (Rastogi 1988)
2. Katalāzes-peroksidāze, kas iesaistīta rezistencē pret saimniekorganisma šūnu oksidatīvajām aizsargreakcijām.
3. Sulfatīdi un trehalozes dimikolāts, kas tiešā veidā iedarbojas toksiski uz saimniekorganisma šūnām.
4. Lipoarabinomannāns (LAM), kas inducē citokīnu izdali un iesaistīts rezistences veidošanā pret saimniekorganisma šūnu oksidatīvajām aizsargreakcijām. (Chan et al. 1991; Smith 2003)

Augstākminētie virulences faktori ir identificēti vairākās *Mycobacterium* sugās, tādēļ to specifiskā loma *M. tuberculosis* patogēnēzē nav skaidra.

Kopš molekulārās bioloģijas metožu ieviešanas, ir identificēti vēl daudzi citi virulences faktori, kurus nereti definē kā bakteriālus produktus, kuru darbības traucējumu ierosināšana, samazina baktēriju spēju iekļūt zīdītāju šūnās *in-vitro*, samazina to augšanas spējas uz mākslībām barotnēm vai iekš zīdītāju šūnām, novājina to spēju izraisīt infekcijas, samazina to spēju inducēt citokīnu izdali, un samazina to spēju izraisīt izmaiņas saimniekorganisma šūnās.

M. tuberculosis gadījumā, pie šādiem faktoriem pieskaita šūnu sienas lipīdus, proteīnus un to regulējošos faktoros, sekretētos proteīnus un to regulējošas molekulas, lipīda transportierus; metabolās kaskādes u.c. Virulences faktori var arī tikt identificēti arī pēc epidemioloģiskiem pētījumiem, salīdzinot *M. tuberculosis* celmus, kas iesaistīti sabiedrībā esošos uzliesmojumos ar celmiem, kas retāk sastopami klīniski vai ar laboratorijas celmiem. (Cantrell et al. 2008)

Viena no biežākajiem intracelulāro patogēnu virulences fenotipu pētīšanas metodēm, ir virsmas molekulu, kas mediē to iekļūšanu ne-fagocitiskajās šūnās, identificēšana. (Falkow S. et al. 1985) Pirmais ar šādu metodi identificētais virulences faktors bija invazīns, ko identificēja *Yersinia Pseudotuberculosis* (Isberg et al. 1985) baktērijām. 90. gadu sākumā ar līdzīgu metodi tika identificēts Mce1A (*mycobacterial cell entry protein*) proteīns, kas ļāva ne-patogēnām *E. coli* invadēt *HeLa* šūnās. (Cole et al. 1998) *M. tuberculosis* spējas iekļūt epiteliālās šūnās nozīme tuberkulozes patogēnēzē nav skaidra, taču lielākā daļa pētījumu, kas saistīti ar *M. tuberculosis* ir koncentrēti uz to spējam iedarboties uz fagocitārām šūnām (makrofāgiem un dendrītiskajām šūnām). Tomēr, būtu svarīgi pieminēt, ka primārā plaušu tuberkulozes inficēšanās lokalizācija ir alveolārā telpa, kuru izklāj I un II tipa pneimocīti. Līdz ar to, ir pamats uzskatīt, ka *M. tuberculosis* vispirms saskaras un iekļūst pneimocītos un tikai vēlāk makrofāgos. (Castranova et al. 1988) Taču jāmin arī, ka joprojām ir maz datu par *in-vivo M. tuberculosis* mijiedarbību ar alveolārajām epitēlija šūnām.

Mce1A kodē gēns, kas atrodas 13-gēnu operon-saturošos gēnos, kas saistīti ar integrālo šūnu sienu proteīnu kodēšanu. Zināms, ka izraisot bojājumus šajā operonā, pastiprinās šo baktēriju virulences spējas. Šis novērojums varētu būt saistīts ar *M. tuberculosis* spēju izraisīt latentu infekciju *in-vivo*. (Cole et al. 1998; Uchida et al. 2007)

Ir identificēti vēl trīs mce1 operona homologi (mce2,mce3,mce4), kas atrodas citur hromosomās ar līdzīgu izkārtojumu. Filogenomiskie mce operonu pētījumi liecina, ka tie, iespējams, saistīti ar ATP-saistošajiem kasetes (ABC) transportieriem, kas, iespējams, ir iesaistīti lipīdu importēšanā; savukārt, mce4, varētu būt iesaistīts tieši holesterola importēšanā. (Pandey et al. 2008) Funkcionāli *fadD5* gēna, kas kodē tauku acil-koenzīmu A (CoA) sintētāzi,

izraisīti bojājumi *mce1* operonā, novājina *M. tuberculosis* pelēs un samazina to augšana ātrumu barotnē, kurā mikolskābe ir vienīgā oglekļa saturošā molekula. (Dunphy et al. 2010) Šie pētījumi, savukārt, ir noveduši pie hipotēzes, ka *M. tuberculosis*, iespējams, metabolizē dzīvotnespējīgo *M. tuberculosis* mikolskābes iekš granulomām, tādējādi nodrošinot to spēju ilglaicīgi izdzīvot. *Mce1* operons tiek saistīts ar transport-sistēmas kodēšanu, kas nodrošina spēju importēt uz šūnas sienas virspusējiem slāņiem esošās mikolskābes. (Forellad et al. 2014) Laboratoriskos pētījumos izraisīti bojājumi *mce1* operonā ir saistīti ar izmaiņām vairāk nekā 400 dažādos lipīdu tipos. (Queiroz et al. 2015)

Funkcionālā *mce2* un *mce3* operonu loma joprojām nav līdz galam izprasta, tomēr ir atklāts, ka *mce4* operons nodrošina mikobaktēriju spēju transportēt holesterolu un, iespējams, tas palīdz nodrošināt *M. tuberculosis* dzīvotspēju tuberukulozes infekcijas hroniskajā fāzē. (Forrelad et al. 2013)

Kā zināms, lipīdi ir nozīmīgs oglekļa avots, kas ļauj ražot enerģiju. Izmaiņas šūnu sienu lipīdu molekulu struktūrā, kompozīcijā un metabolismā ir saistītas ar atšķirīgiem klīniskajiem iznākumiem. (Queiroz, Riley 2017) *In-vivo*, infekcijas hroniskajā fāzē, *M. tuberculosis* aktīvāk metabolizē lipīdus, nekā ogļhidrātus. (Bloch, Segal 1956) Šīs metabolisma izmaiņas tiek nodrošinātas ar izmaiņām krebsa ciklā, izmantojot glioksilāta šuntu, kad pieejamais oglekļa substrata daudzums kļūst ierobežots. (McKinney et al. 2000)

M. tuberculosis šūnu sienas sastāvā ietilpst trīs dažādu klašu mikolskābes (alpha, keto un metoksi mikolāti). Relatīvā oksigenēto mikolātu kombinācija ietekmē *M. tuberculosis* spēju augt makrofāgos un *in-vivo*. (Yuan Y et al. 1998) Laboratoriskos pētījumos uz pelēm ir atklāts, ka *M. tuberculosis* mutants, kuram trūkst trans-ciklopropāna gredzeni (*cmaA2* mutants) tā metoksi un keto-mikolskābēs, kļūst hipervirulents, savukārt, ja trans-ciklopropāna gredzeni iztrūkst alfa-mikolskābēs, baktērija kļūst novājināta. (Glickman et al. 2000) Jāmin, ka arī citas lipīdu molekulas, tostarp lipoglikāni, sulfolipīdi un ftiocerola dimikocerosāts ietekmē saimniekorganisma iedzimto un iegūto imūno reakciju aktivitāti. (Brightbill et al. 1999; Cox et al. 1999)

Transpozonu mutaģenēzes metodes ir ļāvušas identificēt vēl vairākus gēnus, kas saistīti ar virulences īpatnībēm. Pie šiem gēniem minami gēni, kas kodē proteīnu sekrēcijas sistēmas, kā arī iesaistīti lipīdu biosintēzi. Pie *M. tuberculosis* sekrēcijas sistēmām pieder:

1. *ESX-1* sistēma, kas saistīta ar *ESAT-6* un *CFP-10* immunodominanto proteīnu sekrēciju. Izmantojot peļu slimības modeļus, atklāts, ka šī sistēma ir saistīta ar *M. tuberculosis* spēju izkļūt no makrogāgu fagosomas citoplazmā. Šo sistēmu kodē *RD-1* gēns un ir pierādīts, ka bojājot šo gēnu, tiek novājināta *M. tuberculosis* spēja izdzīvot makrofāgos. BCG (Bacille

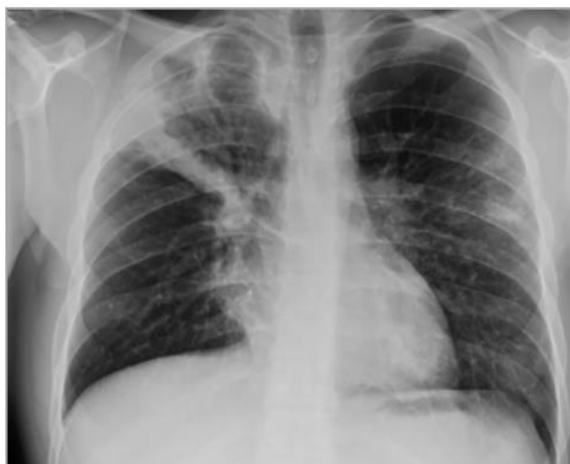
Calmette-Guerin) izmantoto *M. tuberculosis* celmos, šis gēns iztrūkst. (Champion PA et al. 2007)

2. *SEC* sekrēcijas sistēma. Šīs sistēmas funkcijas nav izpētītas, taču zināms, ka šāda sistēma identificētas visās baktēriju sugās.
3. Arginīna transport (TAT) sistēma. Arī šīs sistēmas nozīme patoģenēzē joprojām nav skaidra, tomēr zināms, ka tā nodrošina plazmas membrānas proteīnu substrātu translokāciju. Zināms arī, ka šāda sistēma atrodama citos patogēnos mikroorganismos, tostarp *Pseudomonas aeruginosa*, EHEC (enterohemorāģiska *Escherichia coli*), *E. coli*, *Legionella pneumophila*. (Voulhoux et al 2001)

1.6 Tuberkulozes diagnostika

Tuberkulozes diagnostika var tikt iedalīta divās grupās: pasīvajā tuberkulozes diagnostikā, kad tiek izmeklētas personas ar aktīviem tuberkulozei raksturīgiem simptomiem un aktīvajā diagnostikā, kad tiek izmeklētas personas, kurām ir augsts risks inficēties ar tuberkulozi.

Tuberkulozes diagnostika pamatojas uz pacienta sūdzībām, anamnēzi (ieskaitot epidanamnēzi) kā arī objektīvo atradni. Visbiežāk pasaulē izmantotās objektīvās atradnes metodes ir krūškurvja orgānu radioloģiska izmeklēšana, piemēram rentgens, kompjūtertomogrāfija vai magnētiskā rezonanse. Attēldiagnostiskā izmeklēšana tiek veikta plaušām, kauliem u.c. orgāniem. Pie tipiskām atradnēm radioloģiskos izmeklējumos minami infiltratīvi perēkļi dažādos plaušu segmentos, visbiežāk I, II un IV, kā arī destrūkcijas dobumi, disseminācijas perēkļi. Tomēr primāras plaušu tuberkulozes gadījumā, nereti tipiskā atradne var iztrūkt, īpaši latentas tuberkulozes infekcijas gadījumā.



Attēls 1.2. Plaušu tuberkulozes radioloģiskā atradne

Pieejams tīmeklī: <https://www.ajronline.org/doi/full/10.2214/AJR.14.13483>

Agrīnu slimības stadiju diagnosticēšanai un diagnozes apstiprināšanai tiek izmantotas bakterioloģiskās izmeklēšanas metodes, piemēram krēpu bakterioloģiskā izmeklēšana. Iegūtos krēpu paraugus var gan mikroskopēt, gan izmantot, lai veiktu uzsējumus un noteikt to zāļu jutību, vai, piemēram, noteikti DNS, izmantojot GeneXpert genotipiskās analīzes.

Pie citām objektīvajām izmeklēšanas metodēm minamas arī tādas instrumentālās metodes kā bronhoskopija, torakoskopija, video-asistēta torakoskopija, torakocentēze un mediastinoskopija. Tomēr jāmin, ka šādas instrumentālās metodes izmanto galvenokārt bakterioloģiski negatīvas tuberkulozes gadījumos. (Latvijas Tuberkulozes un plaušu slimību ārstu asociācija, 2014).

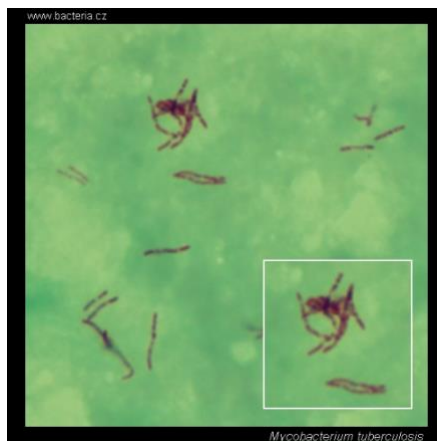
Atsevišķi būtu jāmin arī latentas tuberkulozes infekcijas diagnostika, kas, galvenokārt, balstās uz ādas tuberkulīna testu un Interferona-Gamma noteikšanu asinīs. Šāda diagnostika būtu jāveic pacientiem, kam palielināts tuberkulozes inficēšanās risks, piemēram:

1. Individīdi, kam ir bijis kontakts ar pacientu, kuram ir aktīva, neārstēta plaušu tuberkuloze.
2. Intravenozo narkotiku lietotāji
3. Veselības aprūpes darbinieki, kam paaugstināts risks saskarties ar tuberkulozes inficētiem pacientiem

Tāpat šāda diagnostika būtu jāveic iepriekš ārstētiem pacientiem ar augstu tuberkulozes reaktivācijas risku, tostarp: (Horsburg et al. 2011)

1. HIV pozitīviem pacientiem
2. Imunokompromitētiem pacientiem (tostarp pacientiem, kam veikta transplantācija, kuri saņēmuši ķīmijterapiju vai slimo ar jebkuru citu imunokompromitējošu saslimšanu)

3. Pacientiem, kas saņēmuši *TNF-alpha* inhibitorus
4. Pacientiem ar terminālu nieru mazspēju
5. Smēķētājiem, kas izsmēķē vairāk kā vienu cigarešu paciņu dienā
6. Pacientiem, kas saņēmuši sistēmiskus glikokortikoīdus.



Attēls 1.3 *M. tuberculosis* mikroskopā krāsots pēc Ziehl-Neelsen

1.7. Klīniskās izpausmes

1.7.1. Primāra tuberkuloze

Termins primāra tuberkuloze apzīmē jaunu TB infekciju vai aktīvu slimību pacientam, kas inficējies ar *M. tuberculosis* pirmo reizi. Lielākā daļa ar TM inficēto cilvēku nekad nesaslimst ar tuberkulozi.

Šāda primārā inficēšanās var noritēt gan simptomātiski, gan asimptomātiski. Lai arī nereti pēc inficēšanās tuberkuloze kļūst neaktīva, aktīvas infekcijas gadījumā tuberkulozes izpausmes saistītas, galvenokārt, ar plaušām. Plaušu tuberkulozei raksturīgs plaušu bojājums, ar vai bez citas lokalizācijas orgānu vai sistēmu bojājuma. Tuberkuloze var skart gandrīz jebkuru citu orgānu sistēmu, tostarp limfmezglus, CNS, aknas, kaulus, urīnceļu traktu un kuņģa – zarnu traktu. Pie tipiskām klīniskajām izpausmēm pieskaitāmas: klepus, svara zudums, drudzis, nakts svīšana, hemoptīze (asins spļaušana), sāpes krūtīs (var rasties arī akūtas perikardīta tuberkulozes gadījumā). Vecākiem cilvēkiem ar aktīvu tuberkulozi var nebūt tipisko pazīmju un simptomu. Visbiežāk tuberkulozes simptomi izpaužas pakāpeniski. Viens no pirmajiem simptomiem visbiežāk ir klepus, kas sākotnēji ir sauss, mazproduktīvs, bet, slimībai progresējot, pievienojas krēpu atklepošana un asins piejaukums krēpās. Tuberkulozes gadījumā klepus nav pašlimitējošs un īpaša uzmanība būtu jāpievērš klepum, kas ilgst vairāk kā trīs

nedēļas. Asins atklepošana un svara zudums ir vieni no galvenajiem simptomiem, kas tipiski tuberkulozei. Par saslimšanu ar tuberkulozi var liecināt arī tādi konstitucionālie simptomi kā slikta apetīte, nespēks un nogurums kā arī var būt sāpes krūtīs, īpaši pacientiem ar subpleurālu iesaisti vai elpas trūkums. Objektīvi krūškurvja auskultācija var būt bez izmaiņām, tādēļ liela nozīme ir radioloģiskajiem izmeklējumiem, īpaši RTG. (Heemskerk et al. 2015)

1.7.2. Latenta tuberkuloze

Latentā tuberkulozes infekcija (LTBI) veidojas kā pastāvīgas imūnās atbildes reakcija uz stimulāciju, ko izraisa *M. tuberculosis* antigēni bez pierādījumiem par klīniski izteiktu aktīvu tuberkulozi. Latentas tuberkulozes pacients ir inficēts ar *M. tuberculosis*, bet tam nav aktīvas slimības izpausmju. LTBI progresē slimībā tikai 5-10% pieaugušu cilvēku ar normālu imūnsistēmu viņu dzīves laikā. Tomēr, nākotnē tā var attīstīties aktīvā tuberkulozes formā. Persona ar latento tuberkulozi ir asimptomātiska un arī nespēj inficēt citas personas. LTBT ir klīniska diagnoze, kurai ir divi galvenie kritēriji:

1. Anamnēzē primāra tuberkulozes infekcija.
2. Izslēgta aktīva infekcija.

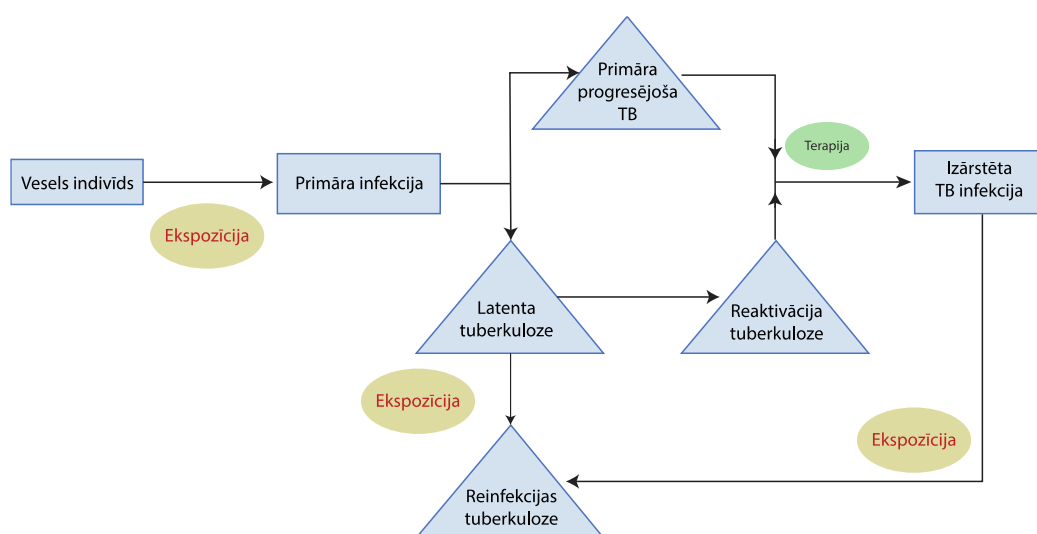
Pieejamie testi, lai pierādītu iepriekšējo TB infekciju ietver tuberkulīna ādas testu un interferona-gamma testu. Tie nosaka imūnās sensibilizācijas (IV tipa hipersensitivitātes reakcija) paaugstinātu jutību pret mikobaktērijas proteīna antigēniem, kas var rasties pēc mikobaktērijas iedarbības. (American Journal of Respiratory Critical Care Medicine, 2000)

IFN- γ (gamma interferona) izdales tests ir *CE IVD* sertificēts diagnostikas tests, kurš novērtē izmeklējamās personas imūno šūnu jeb T limfocītu atbildes reakciju uz mikobaktērijas peptīdu antigēniem *ESAT-6* un *CFP-10*. Ja imūnās sistēmas šūnas iepriekš ir saskārušās ar mikobaktēriju peptīdu antigēniem, tad tās izdalīs IFN- γ . Testa rezultāti tiek noteikti ar pavisam vienkāršu enzīmu imūnsorbijas testa (ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) palīdzību. (Madhukar et al. 2016)

Latentu tuberkulozi rekomendē ārsēt pacientiem, kas ir HIV-pozitīvi, kas dzīvo vai ir kontaktā ar HIV-pozitīvu indivīdu, zīdaiņus un bērnus līdz piecu gadu vecumam, pacientus, kas ir konaktā ar TB pacientu un, piemēram, pacientiem, kam uzsākta immunosupresējoša anti-TNF ārstēšana, saņem dialīzi, gatavojas transplantācijai, jo šādām pacientu grupām ir vislielākais risks attīstīties aktīvai TB slimībai. (Latvijas Tuberkulozes un plaušu slimību ārstu asociācija, 2014)

1.7.3. Sekundāra tuberkuloze

Sekundāra TB veidojas endogēnas TB infekcijas reaktivācijas rezultātā (reaktivācijas tuberkuloze), ja ir infekcijas progresēšanas riska faktori vai atkārtotas inficēšanās dēļ (reinfekcijas tuberkuloze). Sekundāro plaušu TB raksturo plaušu parenhīmas infiltrāti, kas satur audu destrukcijas dēļ radušos dobumus. Pacientiem bez imūnsupresijas 75–80% gadījumu reaktivācija sākas plaušās, biežāk augšdaivas 1.,2. segmentā un apakšdaivas 6. segmentā. (Jerrold J. Ellner, Goldman 2016)



Attēls 1.4. Sekundāras tuberkulozes attīstības ceļi.

1.7.4. Miliāra tuberkuloze

Miliāra tuberkuloze (TB) ir diseminēta tuberkulozes forma, kad *M. tuberculosis* izplatās hematogēnā ceļā. Miliārās tuberkulozes izpausmes var attīstīties kādā atsevišķā organā (<5%), vai multiplos orgānos (>90%), tostarp smadzenēs. Miliārās tuberkulozes gadījumā, raksturīgs liels *M. tuberculosis* slogs, kas beidzas letāli, ja netiek ārstēts. Līdz 25% pacientu ar miliāru TB var būt meningāla iesaistīšanās. Turklāt, svarīgi atcerēties, ka miliārās tuberkulozes izpausmes var imitēt daudzu slimību raksturīgas izpausmes un tās nereti ir nespecifiskas, kas var apgrūtināt diagnostiku. (Hussain et al. 2004)

Pēc TB bacīļu iedarbības un ieelpošanas plaušās tiek izveidots primārs plaušu komplekss, kam seko plaušu limfāngīta un hiliārā limfadenopātijas attīstība. Pēc sākotnējās TB bacīļu ieelpošanas miliārā tuberkuloze var attīstīties gan kā primārā, gan sekundāra tuberkuloze. Izplatītie limfmezgli sastāv no centrālās nekrozes un perifēri novietotiem epitelioidajiem

audiem un saistaudiem. Krūškurvja pārskata rentgenā miliārai tuberkulozei raksturīgi disseminēti mezgli, kas, atšķirībā no primāras plaušu tuberkulozes, retāk ir kalcificēti. Pacienti ar miliāru tuberkulozi dažu dienu, nedēļu laikā vai dažu mēnešu laikā var rasties progresējoši simptomi. Tipiskākie simptomi ir vājums, nogurums, svara zudums, galvassāpes, drudzis, klepus, ģeneralizēta limfadenopātija (40%), hepatomegālija (40%), splenomegālija (15%), pankreatīts (<5%), var rasties multiorgānu disfunkcija. (Maartens et al. 1990)

1.7.5. Tuberkuloze un HIV

HIV inficētam tuberkulozes pacientam var nebūt tipiskas TB izpausmes. Biežākie simptomi ir neskaidrs drudzis un svara zudums, kā arī biežāk vērojamas ārpusplaušu TB formas. Savukārt, klepus ar pozitīvu ARB atradi krēpās ir retāk sastopams, salīdzinot ar HIV negatīviem TB pacientiem.

HIV inficētiem pacientiem nereti krēpu analīžu rezultāti un radioloģisko izmeklējumu atradne var būt atipiski, tādējādi apgrūtinot diagnostiku. Biežāk sastopamas ir miliāras slimības formas. Sekundārās TB izpausmes forma atkarīga no imūnsupresijas līmeņa. Agrīnās HIV stadijās tā var neatšķirties no TB HIV negatīvām personām, savukārt vēlīnās HIV stadijās, kad CD4+ šūnu skaits ir mazāks par 200 μ L, bieži novēro sekundāru, pēc pirmās plaušu TB tipa noritošu plaušu TB. Līdz 50% gadījumu reaktivācija sākas ārpus plaušām lokalizētās granulomās, kas izveidojušās primārās inficēšanās laikā, un pieaug ārpusplaušu TB gadījumu skaits.

Pasaules veselības organizācijas ieteikumos aprakstīts, ka pacientiem ar aktīvu tuberkulozi būtu jāsaņem anti-retrovirālā terapija (ART) neatkarīgi no CD4+ šūnu skaita, kā arī ART terapija būtu jāuzsāk 2-8 nedēļu laikā kopš tuberkulozes terapijas uzsākšanas, nevis sekvenčiāli pēc tuberkulozes terapijas pabeigšanas. Vienmēr svarīgi ir arī izvērtēt anti-TB un ART medikamentu potenciālo savstarpējo mijiedarbību. Vienlaikus jāuzsver, ka ART un anti-TB terapiju nebūtu vēlams uzsākt vienlaicīgi, bet gan ar noteiktu intervālu, kas atkarīgs no CD4+ šūnu skaita un klīniskajām izpausmēm. Piemēram:

1. Pacientiem, kam CD4+ šūnu skaits mazāks par 50 šūnām uz μ L, ART būtu jāuzsāk divu nedēļu laikā kopš anti-TB terapijas uzsākšanas.
2. Pacientiem, kam CD4+ šūnu skaits lielāks par 50 šūnām uz μ L, ART būtu jāuzsāk astoņu nedēļu laikā kopš anti-TB terapijas uzsākšanas.

3. Pacientiem, kam CD4+ šūnu skaits lielāks par 50 šūnām uz μL , ART būtu jāuzsāk astoņu nedēļu laikā kopš anti-TB terapijas uzsākšanas.
4. Pacientiem ar CNS iesaisti, ART terapija būtu jāatliek uz vismaz 8 nedēļām kopš anti-TB terapijas uzsākšanas. (Pasaules Veselības Organizācijas vadlīnijas, 2018)

Papildus, būtu jāizvērtē risks, ka attīstīsies IRIS jeb immūnās rekonstitūcijas iekaisuma sindroms. Proti, visiem pacientiem, kam CD4+ šūnu skaits ir zem 100 šūnām uz μL un ART terapija uzsākta 30 dienu periodā kopš anti-TB terapijas uzsākšanas, būtu papildus jāsaņem prednizolons. (Meintjes et al. 2018)

Svarīgi ņemt vērā arī to, ka latentā tuberkuloze biežāk pāriet aktīvā tuberkulozes slimības formā HIV pozitīviem pacientiem, nekā cilvēkiem bez HIV. TB slimība var izraisīt arī HIV infekcijas stāvokļa pasliktināšanos. Tuberkuloze (TB) un HIV infekcijas izraisa milzīgu slogu veselības aprūpes sistēmām un rada īpašas diagnostiskas un terapeitiskas problēmas. Infekcija ar HIV ir vispēcīgākais zināms riska faktors, kas predisponē uz *Mycobacterium tuberculosis* infekciju un progresēšanu uz aktīvu slimību, kas palielina latentās TB reaktivācijas risku apmēram 20 reizes. TB ir arī visbiežākais ar AIDS asociētais nāves cēlonis. Līdz ar to, visiem HIV inficētiem pacientiem ar latentu tuberkulozi būtu vēlams uzsākt anti-tuberkulozes terapiju, kuras režīms atkarīgs no (Pasaules veselības organizācija, 2018)

1.8. Tuberkulozes izplatības kontrole un prevencija un ārstēšanas metodes

1.8.1. DOTS kontroles stratēģija

TB ietekmē visu vecumu cilvēkus, bet vissmagāk skar 20 līdz 45 gadu vecumu. Tie ir strādājoši vīrieši un sievietes ekonomiski izdevīgākajos dzīves gados. Tiek lēsts, ka no trīs miljardiem cilvēku, kas nodarbināti visā pasaulē, gandrīz 12 miljoni cilvēku dzīvo ar aktīvā TB attīstības risku. Pētījumi liecina, ka vidēji darbinieks ar TB zaudē trīs-četrus mēnešus ilgu darbu, kā rezultātā var rasties zaudējumi 20-30% apmērā no ikgadējiem mājsaimniecības ienākumiem. TB rada lielas izmaksas darba devējiem un rada darba struktūras traucējumus, samazina darba efektivitāti sakarā ar augsto ārstēšanas izmaksu un ievērojāmo netiešo izmaksu dēļ, piemēram, darbinieku aizstāšanai un pārkvalificēšanai. Pēdējas aplēses rāda, ka visā pasaulē TB ir atbildīgs par darba ņēmēju produktivitātes samazināšanos, kas ik gadu izmaksā aptuveni 12 miljardus ASV dolāru.

Ņemot vērā šo statistiku, kā arī nopietno rezistento celmu izplatības problēmu, tuberkulozes ārstēšana un kontrole prasa ne vien terapiju tā klasiskajā izpratnē, bet arī valsts

augstākajā līmenī ieviestu kontroles stratēģiju. Šāda kontroles stratēģija ir DOTS (*Direct Observed Treatment Short course*), kas izstrādāta starptautiskā līmenī, sadarbojoties galvenajiem tuberkulozes un sabiedrības veselības, epidemioloģijas ekspertiem. Šī stratēģija nosaka, ka efektīvākais veids kā ierobežot tuberkulozes izplatību populācijā ir ārstēt visus krēpu uztriepes pozitīvos tuberkulozes gadījumus.

DOTS sastāv no piecām stratēģiskām komponentēm:

1. **Ilgstoša politika un ekonomiska apņemšanās**, kas nosaka, ka atbilstoši finansiālie līdzekļi un administratīvais atbalsts tuberkulozes ārstēšanai var samazināt tuberkulozes prevalenci.
2. **Kvalitatīva krēpu uztriepe kā nozīmīga izmeklēšanas metode**. Šis ir īpaši svarīgs punkts, jo, kā zināms, pacienti ar pozitīvu krēpas uztriepi rada vislielāko infekcijas transmisijas risku.
3. **Standartizēts īsstermiņa tuberkulozes ārstēšanas kurss (SCC) sešu līdz deviņu mēnešu garumā, kas norisinās tiešā veselības aprūpes speciālista uzraudzībā**. Terapija tiešā uzraudzībā ir īpaši svarīga, lai nodrošinātu pareizo medikamentu saņemšanu, pareizajā laikā visu terapijas laiku.
4. **Regulāra, nepārtraukta augstas kvalitātes anti-TB medikamentu piegāde**, tādējādi nodrošinot, ka kvalitatīvi, standartam atbilstoši TB terapijas medikamenti ir pieejami visiem un vienmēr.
5. **Standartizēta tuberkulozes gadījumu reģistrēšana un ziņošana**. Palīdz sekot katram inficētā pacienta stāvoklim un pārraudzīt programmas darbības kvalitāti. (PVO, 1993)

1.8.2. Tuberkulozes vakcīna

Tuberkulozes prevencijas nolūkos jau kopš 1921. gada tiek izmantota BCG vakcīna. BCG jeb *Bacille Calmette-Guérin* ir dzīvs *Mycobacterium bovis* celms, kurš tika izveidots ar mērķi pielietot to kā novājinātu dzīvo vakcīnu tuberkulozes un citu mikobakteriju izraisīto infekciju prevencijai. Arī 2019. gadā tā joprojām ir vienīgā pieejamā tuberkulozes vakcīna.

BCG vakcīna ir pasaulē visbiežāk ievadītā vakcīna, kuru saņēmuši vairāk kā trīs miljardi indivīdu, kā arī tā ir noteikta kā daļa no obligātās jaundzimušo vakcinācijas plāna. (PVO, 2018)

Kaut arī BCG vakcīna pret inficēšanos ar tuberkulozi pilnībā nepasargā, tā ievērojami samazina smagu slimības izpausmju, tostarp miliāras tuberkulozes, CNS tuberkulozes attīstības

risku, samazina inficēšanās risku ar citiem mikobaktēriju celmiem, kā arī samazinājusi mazu bērnu tuberkulozes izraisītas mirstības prevalence. (Kumar et al. 2016)

Neskaitot tuberkulozes prevenciju, BCG vakcina tiek pielietota arī lepras prevencijai, *Buruli* čūlu prevencijai, kā arī kā immunostimulants urīnpūšļa karcinomas terapijā. (Lancet, 1996)

BCG vakcīna tiek ievadīta intradermāli vai intrakutāni, bet, tā kā inficēšanās un sensitizācija notiek tieši elpceļos, šobrīd norisinās pētījumi par respiratoru vakcīnas administrēšanas veidu. (Jeyanathan et al. 2010)

Latvijā BCG vakcinācija tiek veikta visiem jaundzimušajiem no otrās līdz piektajai dzīves dienai.

Sakarā ar to, ka BCG ir “dzīvā vakcīna”, svarīgi uzsvērt, ka šai vakcīnai pastāv kontraindikācijas. Šo vakcīnu nevajadzētu saņemt immunokompromitētiem pacientiem, pacientiem ar HIV infekciju, iedzimtu immunodefīcītu, maligniem procesiem, vai pacientiem, kas saņem immunosupresīvu terapiju (glikokortikoīdus un TNF-Alpha blokatorus). Tāpat, kaut arī nav datu par nelabvēlīgu ietekmi uz augli, grūtniecības laikā šo vakcīnu nevajadzētu administrēt sakarā ar fizioloģisko immunosupresīvo stāvokli. (Pasaules veselības organizācija, 2018; Latvijas Tuberkulozes un plaušu slimību ārstu asociācija, 2014)

1.9. Dažādu antimikrobo līdzekļu iedarbība uz *M. tuberculosis* un rezistences molekulārie mehānismi

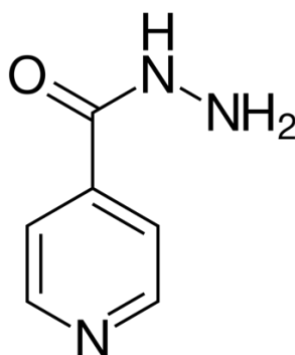
1.9.1. Pirmās rindas medikamenti

Tuberkulozes ārstēšanā pielietotie medikamenti ir klasificēti pirmās un otrās rindas medikamentos. Pie pirmās rindas medikamentiem ir pieskaitāmi: izoniazīds, rifampicīns, pirazinamīds un etambutols. Latvijā Ir noteikti standarta tuberkulozes ārstēšanas kursi, pirmreizējiem saslimšanas gadījumiem tie ir vidēji sešus mēnešus, multirezistentiem tuberkulozes gadījumiem – 20 mēneši, tomēr katrs gadījums tiek skatīts individuāli un tiek lemts vai nepieciešams ārstēšanas kursu pagarināt. Ja tuberkulozes patients ir infekciozs un atrodas stacionārā, sākumā līdz abacilēšanai viņš nonāk izolatorā. Tiklīdz patients ir abacilēts, izolācijas režīms tiek atcelts un patients var turpināt ārstēties vai nu stacionārā vai ambulatori

Pirmreizējas TB patients intensīvās ārstēšanas fāzes sākumā saņem visus četrus pirmās rindas medikamentus divus līdz trīs mēnešus. Šajā laikā tiek panākta abacilēšanās vairumam

pacientu. Ilgstošās ārstēšanas fāze laikā pacients turpina lietot izoniazīdu un rifampicīnu. Šī ārstēšanas fāze ilgst vismaz četrus mēnešus. (Zhang Y et al. 2005)

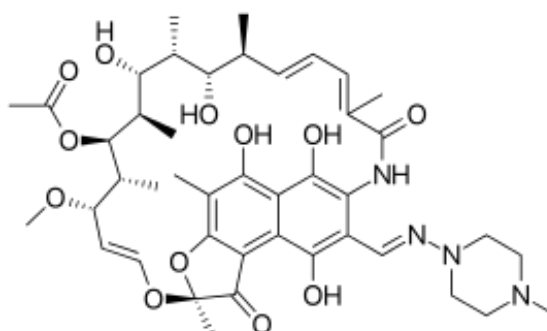
Viens no nozīmīgākajiem tuberkulozes ārstēšanas medikamentiem ir **izoniazīds**. Izoniazīda ķīmiskā struktūra ir relatīvi vienkārša – tas sastāv no piridīna gredzena un hidrazīna grupas. Tā minimālā inhibējošā koncentrācija (MIC) pret *M. tuberculosis* ir 0.02-0.20 µg/mL. Izoniazīda baktericidālā iedarbība ir izteikti tikai mikobaktērijām to aktīvas dalīšanās fāzē, taču uz lēni augošām mikobaktērijām izoniazīda ietekme ir krietni vājāka. Izoniazīds ir “*pro-drug*”, kurš jāaktivizē. Tā aktivizāciju veic enzīms katalāzes peroksidāze (KatG), ko izdala *M. tuberculosis*. Aktivācijas rezultātā tiek izdalīti skābekļa atvasināti brīvie radikāļi, tostarp superoksīds, ūdeņraža peroksīds un peroksinitrīts, kā arī organiskie brīvie radikāļi, kas inhibē mikolskābju veidošanos, izraisa DNS bojājumus un tam sekojošu mikroorganismu bojāeju.



Attēls 1.1.. Izoniazīda ķīmiskā struktūra

Iegūts no: https://en.wikipedia.org/wiki/Isoniazid#/media/File:Isoniazid_skeletal.svg

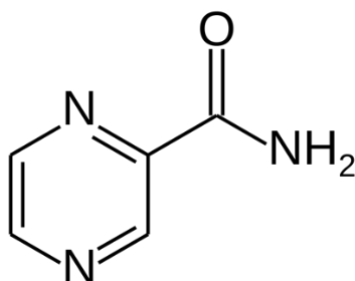
Vēlviens nozīmīgs pirmās rindas medikaments ir **rifampicīns**, kurš lietots jau kopš 1966. Gada. Rifampicīna MIC uz *M. tuberculosis* ir 0.05-0.50 µg/mL. Tam piemīt baktericidāla iedarbība, kas iznīcina gan augošus, metaboli aktīvus mikroorganismus, gan mikobaktērijas to stacionārajā fāzē, kad to metabolā aktivitāte ir samazināta. Kombinējot rifampicīnu ar izoniazīdu, terapijas ilgums saīsinās līdz 6 mēnešiem. Rifampīna darbības pamatā ir tā iedarbība uz gēnu transkripciju. Tas bloķē DNS-atkarīgās RNS polimerāzes darbību, kas, savukārt, neļauj mikobaktērijām sintezēt messenger-RNS un proteīnus, tādējādi izraisot bojāeju. (Tuberculosis. Edinb. 2008; Blumberg et al. 2003)



Attēls 1.2. Rifampicīna ķīmiskā struktūra

Iegūts no: https://en.wikipedia.org/wiki/Rifampicin#/media/File:Rifampicin_structure.svg

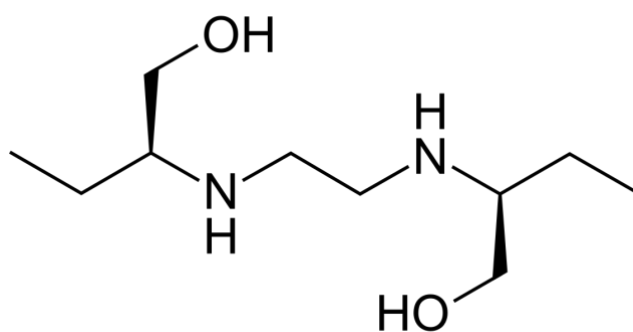
Pirazinamīda, nikotīnskābes derivāta, molekulārā struktūra ir līdzīga izoniazīda struktūrai. Neskatoties uz strukturālo līdzību *M. tuberculosis* šķērs-rezistence pret pirazaminamīdu un izoniazīdu nav konstatēta. Šis medikaments pirmo reizi sintezēts 1936. gadā un kā antituberkulozes medikaments sākts lietot 1952. gadā. Pirazinamīda MIC ir 6.25-50 µg/mL pie pH 5.5. Tam piemīt baktericidāla iedarbība ar potentu sterilizācijas efektu. Pirazinamīds tiek uzskatīts par efektīvāko medikamentu, kas spēj iznīcināt mikobaktērijas sporādiskajā multiplikācijas fāzē, proti – tas spēj iznīcināt arī mikroorganismus, kas jau ir fagocitēti makrofāgos. Jāpiebilst, ka *M. tuberculosis* ir vienīgais mikroorganisms, kas jau ir fagocitēti makrofāgos. Jāpiebilst, ka *M. tuberculosis* ir vienīgais mikroorganisms, kas uzņēmīgs pret pirazinamīdu. (PVO, 2010) Šis medikaments, tāpat kā izoniazīds ir “*pro-drug*”, kas jākonvertē tā aktīvajā formā – piranzinoīdskābē. Šo konvertāciju veic bakteriālie enzīmi – nikotinamidāze un piranzinamidāze. Šī medikamenta darbības mehānisms joprojām tiek aktīvi pētīts, taču tiek uzskatīts, ka tas iekļūst mikobaktērijās pasīvā ceļā un pēctam tiek konvertēts tā aktīvajā formā. Mikobaktēriju nefektīvā efluksa mehānisma dēļ, šī medikamenta koncentrācija citoplazmā palielinās. Akumulācijas rezultātā, mikobaktēriju intracelulārais pH līmenis krīt, kā rezultātā tiek inaktivēti dažādi enzīmi, tostarp taukskābju sintēze, kas, savukārt, ir ļoti svarīga taukskābju sintēzē, tādējādi arī mikolskābju biosintēzē. (Di Perri, Bonora, 2004)



Attēls 1.3. Piranzinamīda ķīmiskā struktūra

Iegūts no: <https://en.wikipedia.org/wiki/Pyrazinamide#/media/File:Pyrazinamide.svg>

Etambutols, kas pirmo reizi tika sintezēts 1961. gadā tiek lietots tuberkulozes terapijā jau kopš 1966. gada. Tā MIC pret *M. tuberculosis* ir 1-5 µg/mL. Etambutols iedarbojas gan intracelulārā, gan ekstracelulārā esošām mikobaktērijām un ir visefektīvākais uz tām, kad tās aktīvi dalās. Tam ir, galvenokārt, bakteriostatiska iedarbība. Etambutola darbības mehānisma pamatā ir tā iedarbība uz arabinogalaktāna, viena no šūnu sienas polisaharīda, biosintēzi. Tas inhibē arabinosiltransferāzi: enzīmu, kas mediē arabinozes polimerizāciju arabinogalaktānā. (Chan E. et al. 2003)



Attēls 1.4. Etambutola ķīmiskā struktūra

Iegūts no: <https://en.wikipedia.org/wiki/Ethambutol#/media/File:Ethambutol.svg>

Anti-tuberkulozes medikaments	Darbības mehānisms
Izoniazīds	Mikolskābju sintēzes inhibīcija. DNS bojājumi
Rifampicīns	DNS-atkarīgās RNS polimerāzes inhibīcija
Piranzinamīds	Mikobaktēriju intracelulārā pH līmeņa izmaiņšana, inhibējot svarīgu šūnu sienas komponentu sintēzi.
Etambutols	Arabinosiltransferāzes inhibīcija

Attēls 1.5. Pirmās rindas anti-tuberkulozes medikamenti un to darbības mehānisms.

1.9.2. Otrās rindas medikamenti

Gadījumos, kad tiek konstatēti *M. Tuberculosis* celmi, kas rezistenti pret kādu no pirmās rindas medikamentiem vai pacientam konstatēta nepanesamība pret kādu no pirmās rindas medikamentiem, tiek izmantoti otrās rindas antituberkulozes medikamenti. Pie šiem medikamentiem pieskaitāmi: Nātrija paraaminosalicilāts, cikloserīns, kapreomicīns, bedakvilīns kā arī fluorohinoloni (kanamicīns, amikacīns, levofloksacīns, moksifloksacīns) un linezolidi. Tomēr, būtiski uzsvērt, ka visiem šiem medikamentiem ir būtiski lietošanas ierobežojumi. Tie, pirmkārt, ir mazāk efektīvi, tiem ir izteiktāka toksiskā iedarbība, kā arī augstākas izmaksas. (PVO vadlīnijas. 2010; Tuberculosis. Edinb. 2008)

Fluorohinoloni, levofloksacīns un moksifloksacīns, ir visplašāk pielietotie un tiek uzskatīti par nozīmīgākajiem otrās rindas medikamentiem, jo tiem piemīt spēcīga baktericīdā iedarbība pret *MDR-TB M. tuberculosis* celmiem *in-vitro*. Kaut arī agrāko pētījumu dati liecināja, ka četrus mēnešu terapijas režīmā, aizvietojot izoniazīdu vai etambutolu ar moksifloksacīnu, var ātrāk panākt mikobaktēriju negatīvas krēpu uztriepes, šobrīd trešās fāzes klīniskajā pētījumā secināts, ka šādas terapijas kombinācijas recidīvu risks ir augstāks nekā standarta sešu mēnešu terapijas režīmā. Šīs grupas medikamentu darbības mehānisma pamatā ir DNS girāžu – topoizomerāzes II un topoizomerāzes IV – inhibīcija.

Kanamicīns, amikamicīns un kapreomicīns dažkārt tiek saukti par otrās rindas injicējamiem medikamentiem jeb SLI (*Second-line-injectable*). Pasaules veselības organizācijas *MDR-TB* terapijas vadlīnijās minēts, ka vismaz viens no šiem medikamentiem ir jāiekļauj sešu mēnešu intensīvās terapijas fāzē. Šie medikamenti jāievada parenterāli, jo tie netiek absorbēti gastrointestinālajā traktā. Šo medikamentu darbības mehānisma pamatā ir proteīnu sintēzes inhibīcija, kas tiek panākta medikamentam saistoties ar 16S rRNS un S12 RNS saistošo proteīnu. (PVO Vadlīnijas, 2010; Y Ho et al. 1997;)

Etionamīds jeb 2-etiltioizonikotinamīds ir izonikotīnskābes derivāts, kas strukturāli atgādina izoniazīdu. Tā kā etionamīds ir *pro-drug*, tā darbībai nepieciešama aktivizācija ar monooksigenāzi, kuru, savukārt, kodē ethA gēns. Darbības mehānisma pamatā ir mikolskābes sintēzes kavēšana, kas tiek panākta ietekmējot enoil-ACP reduktāzes darbību. (L Fu; Schinnik 2007)

Anti-tuberkulozes medikamenti	Darbības mehānisms
Fluorohinoloni: levofloksacīns un moksifloksacīns	DNS girāzes inhibīcija
Kanamicīns, amikacīns, kapreomicīns	Proteīnu sintēzes inhibīcija, saistoties ar rRNS
Etionamīds	Mikolskābju biosintēzes inhibīcija

Attēls 1.6.. Otrās rindas anti-tuberkulozes medikamenti un to darbības mehānismi

1.9.3. Jaunās paaudzes anti-tuberkulozes medikamenti

Bedakvilīns, kurš apstiprināts lietošanai vien 2012. gadā kā viens no kombinētās terapijas medikamentiem var tikt lietots tikai tiešā uzraudzībā, kā arī tas tiek nozīmēts tikai pacientiem ar *MDR-TB*, kas sasnieguši 18 gadu vecumu. Šo medikamentu lieto tikai tad, ja pacients nespēj panest citus otrās rindas medikamentus vai, ja *M. tuberculosis* celms nav uzņēmīgs pret citiem otrās rindas medikamentiem. Bedakvilīns ir diarilhinolons, kura darbības mehānisma pamatā ir ATP sintēzes inhibīcija. *In-vitro*, šim medikamentam ir pierādīta gan baktericidāla, gan sterilizējoša iedarbība gan uz mikobaktēriju, kas aktīvi dalās, gan tām, kuru dalīšanās aktivitāte zema. (Diacon et al. 2009)

Cikloserīns, kas apstiprināts lietošanai jau 1956. gadā, ir medikaments, kura darbība var būt gan baktericidāla, gan bakteriostatiska, atkarībā no tā koncentrācijas. Tas ir D-alanīna strukurāls analogs, kurš, savukārt ir nepieciešams peptidoglikānu sintēzē. Cikloserīns inhibē L-alanīna racemāzes un D-alanīna sintēzes darbību, tādējādi inhibējot peptidoglikāna slāņa sintēzi. Tas rezultējas ar novājinātu mikroorganisma šūnu sienu un tā līzi. (Zumla et al. 2013;)

Linezolid ir viens no jaunās paaudzes anti-tuberkulozes medikamentiem, kas pieder pie oksazolidinonu klases medikamentiem. Šis medikaments ir kļuvis par nozīmīgu medikamentu ne vien *MDR-TB* un *XDR-TB* gadījumos, bet arī citu gram-pozitīvu baktēriju izraisītu infekciju, tostarp vankomicīna-rezistentu enterokoku ārstēšana. Tā darbības mehānisma pamatā ir proteīnu sintēzes inhibīcija, tam saistoties ar 50S ribosomas subvienību (Acala et al. 2003; Cabrera et al. 2006)

Delamanīds ir dihidro-nitroimidazooksazola derivāts, kura darbības mehānisma pamatā ir specifisko mikolskābju – ketomikolskābes un metoksimikolskābes – sintēzes inhibīcija. Delamanīds ir *pro-drug*, kura aktivācijai nepieciešams enzīms – dezaflavīna atkarīgā nitroreduktāze. Aktīvā darbība piemīt šī medikamenta metabolisma starpproduktam, kas reaģē ar desnitro-imidazooksazola derivātu un inhibējoši iedarbojas uz augstāk minēto mikolskābju produkciju. (Xavier, Lakshmanan 2014)

1.9.3 Rezistences attīstības mehānismi

Kopš dažādu molekulārbioloģisko diagnostikas metožu ienākšanas praksē, ir uzlabojusies izpratne par *M. tuberculosis* zāļu rezistences molekulārajiem mehānismiem. Tas

ir īpaši svarīgi laikā, kad arvien plašāka ir dažādu zāļu rezistentu *M. tuberculosis* celmu izplatība. Viena no šādām klīniski izmantotajām sistēmām ir, piemēram *GeneXpert* – nukleīnkābju amplifikācijas testa sistēma.

Aktīvas plaušu TB gadījumā, mikobaktēriju daudzums plaušu dobumā variē robežās no 107 līdz 10⁹ CFU/ml. (Armstrong et al. 1975) Tiek uzskatīts, ka izoniazīds (INH) spēj iznīcināt lielāko daļu mikobaktēriju, to aktīvas dalīšanās fāzē, taču, kad liela daļa šīs populācijas ir iznīcināta, izoniazīda baktericīdās darbības efektivitāte strauji krītas (visbiežāk, 72h laikā kopš medikamenta uzsākšanas). In-vitro infekcijas modeļu pētījumos patiešām ir pierādīta šī hipotēze. Šīs efektivitātes samazināšanās tiek skaidrota ar zāļu-rezistentu izolātu savairošanos. (Gumbo et al. 2007) Rezistences pret izoniazīdu attīstība tiek saistīta ar izmaiņām katG un/vai inhA gēnos. Šīs alterācijas ir sastopamas gandrīz 90% no visiem identificētajiem pret izoniazīdu rezistentajiem mikroorganismiem. Jau 1950. gadā tika atklāts, ka *M. tuberculosis* celmi, kas nespēj producēt katalāzi ir visbiežāk rezistenti pret izoniazīdu Vēlāk tika atklāts arī gēns, kas atbildīgs par katalāzes produkciju - katG. (Tung-Yiu, Eric Leung 2018)

inhA gēns kodē proteīnu reduktāzi, kas iesaistīta mikolskābu sintēzē. Ir pierādīts, ka punktveida mutācijas inhA gēna producētajā enzīmā samazina jutību pret izoniazīdu līdz pat 17 reizēm. inhA kodē proteīnu reduktāzi (*long-chain enoyl carrier protein reductase*), kura iesaistīta mikolskābju sintēzes procesos. Zināms, ka izoniazīds spēj saistīties ar inhA proteīnu tikai pēc tā aktivācijas ar katalāzi. inhA *Up-regulation* pastiprina izoniazīda efektivitāti pret *M. tuberculosis*, savukārt inhA mutācijas samazina izoniazīda spēju saistīties ar inhA proteīnu, tādējādi palielinot rezistences spējas pret izoniazīdu. (Vilcheze et al. 2006; Rozwarski et al. 1998)

Rifampīns ir viens no nozīmīgākajiem medikamentiem tuberkulozes terapijā, taču rezistence pret šo medikamentu ievērojami pagarina un padara terapiju sarežģītāku. Kā minēts, tā darbības mehānisma pamatā ir tā spēja saistīties ar RNS polimerāzi, tādējādi iejaucoties transkripcijas un RNS prolongācijas procesos. Mutācijas gēnā rpoB, kas kodē mikobaktēriju RNS polimerāzi, ir identificēts kā galvenais cēlonis rezistences attīstībā pret šo medikamentu. (Miller et al. 1994) Jau 1993. Gadā veiktā pētījumā tika atklāts, ka rpoB gēna mutācijas sastopamas apmēram 95% no visiem pret rifampicīnu rezistentajiem mikroorganismiem. Šobrīd pieejamās diagnostikas metodes ļauj noteikt rezistenci pret šo medikamentu relatīvi ātri (dažu stundu laikā), piemēram izmantojot *GeneXpert*. (Telenti et al. 1993)

Pirazinamīda rezistences attīstības pamatā ir mutācijas pncA gēnā, kas kodē pirazinamidāzi. ASV veiktā pētījumā tika secināts, ka apmēram 90% gadījumos no klīniski izolētajiem pret pirazinamīdi rezistentajiem mikroorganismiem, var tikt identificētas jebkāda

daudzuma mutācijas *pncA* gēnā. Jāmin arī, ka 10% no rezistentajiem mikroorganismiem bez šīs mutācijas tika identificēti kā viltus-rezistenti vai daļēji rezistenti. (Scorpio et al. 1993)

Etambutola, kas, kā minēts, inhibē mikobaktēriju šūnu sienas biosintēzi, rezistences pamatā ir identificētas mutācijas *embB* gēnā. Zināms, ka šis gēns kodē arabinozil transferāzi, enzīmu, kas polimerizē arabinozi arabinānā un tālāk arabinogalaktānā. Arabinogalaktāns, kā zināms, ir nozīmīga mikobaktēriju šūnu sienas komponente. Zināms, ka palielināta arabinozil-transferāzes produkcija vai aktivitāte ir saistīta ar etambutola darbības novājināšanos. (Belanger et al. 1996)

Streptomicīna rezistences mehānismu pamatā ir atklātas alterācijas ribosomālajā RNS S12 un 16S segmentos. Tas skaidrojams ar to, ka streptomicīns inhibē mikroorganismu mRNS translāciju, taču ja RNS ir izmainīts, streptomicīns kļūst neefektīvs. Šīs alterācijas var izraisīt *rpsL* un *rrs* gēnu mutācijās. (Honore, Cole 1994)

Šobrīd identificēta arī rezistence pret otrās-rindas anti-tuberkulozajiem medikamentiem, ieskaitot etionamīdu un fluorohinolongrupas medikamentiem. Fluorohinolonu grupas medikamentu rezistence saistīta ar *gyrA* un *gyrB* gēnu mutācijām. Šie gēni kodē enzīmus – DNS girāzes, kas, vienlaikus, ir fluorohinolonu iedarbības mērķis, līdz ar to mutācijas to kodējošajos genos izraisa nejutību pret fluohinolonu grupas medikamentiem. (Cambau et al. 1994) Etionamīda, kas struktūras ziņā līdzīgs izoniazīdam, rezistence, savukārt saistīta, līdzīgi kā izoniazīda gadījumā, ar mutācijām *inhA* gēnā, taču ne *katG* gēnā. (Benerjee et al. 1994)

1.10. Multi-rezidenta *M. tuberculosis*.

Dažādu spontānu mutāciju rezultātā, ir radušies divi zāļu rezistenti tuberkulozes tipi: MDR-TB jeb multirezidenta tuberkuloze un XDR-TB jeb ekstensīvi rezidenta tuberkuloze. MDR-TB tiek definēta kā TB, kuru izraisa baktērijas celmi, kas ir rezistenti pret vismaz izoniazīdu un rifampicīnu, savukārt XDR-TB kā TB, kuras ierosinātājs ir rezistents pret izoniazīdu un rifampicīnu kā arī pret jebkuru no fluorohinolonu grupas medikamentu un jebkuru no otrās rindas medikamentiem, piemēram amikacīnu, kanamicīnu, kapreomicīnu.

Pēc PVO aprēķiniem, pasaulē ir konstatēti apmēram 500,000 MDR-TB gadījumi. (PVO, 2013) Šāda tipa tuberkulozes izplatība gaisa-pilienu ceļā apdraud visus, kas nonāk kontaktā ar inficētajām personām, tostarp ģimenes locekļus, cilvēkus sabiedriskās vietās, kā arī veselības aprūpes personālu. Primārās zāļu rezistences izplatība ir straujāka starp HIV-inficētiem pacientiem, kuri ir uzņēmīgāki pret šo slimību, tādējādi arī ātrāk spēj kļūt par transmisijas avotu.

(PVO, 2013) Pētījumos, kas apskatījuši MDR-TB uzliesmojumus, atklāts, ka vairāk kā 90% MDR-TB inficēto ir vienlaikus bijuši HIV pozitīvi un letalitātes rādītāji ir bijuši robežā starp 70-90%. Taču HIV-negatīviem pacientiem, ar MDR-TB, klīniskie iznākumi ir daudz labāki. Ar zāļu rezistentu *M.tuberculosis* celmu attīstības riska faktori:

1. Iepriekš neveiksmīgi ārstēta tuberkuloze
2. HIV infekcija
3. Injicējāmo medikamentu lietošana
4. Kontakts ar MDR-TB inficētiem pacientiem
5. Nesena imigrācija no reģioniem ar augstu MDR-TB/XDR-TB izplatību
6. Anamnēzē slimības, kas rezultējas ar dobumu veidošanos plaušās.
7. Malabsorbcija, kas saistīta gastrektomiju vai *ileum bypass* operācijām.

Potenciālo MDR-TB gadījumu ātrākai identifikācijai, veselības aprūpes darbiniekiem būtu jābūt informētiem par rezistentes prevalenci sabiedrībā un riska faktoriem, kas saistīti ar MDR-TB izplatību. Ātra MDR-TB inficēto pacientu identifikācija un izolācija, kā arī kontroles mehānismu ievērošana var ievērojami samazināt nozokomiālās MDR-TB transmiju. Zāļu rezistentas TB terapija var būt ievērojami sarežģītāka līdz ar to ir svarīgi, ka tiek pieaicināti speciālisti – ftiziatri ar pieredzi otrās rindas medikamentu lietošanā. Galvenais terapijas princips: lietot vismaz 3 medikamentus pret kuru mikroorganisms ir uzņēmīgs un medikamentus, kuri iepriekš terapijā nav pielietoti (ja patients jau ir bijis inficēts un ārstēts iepriekš). Vienam no šiem medikamentiem būtu jābūt injicējamam (kanamicīns, amikamicīns, kapreomicīns). Zāļu rezistenti *M.tuberculosis* celmi, kas rezistenti tikai pret izoniazīdu var tikt ārstēti ar rifampicīnu, piranzinamīdu un etambutolu. (Ellner et al. 1995)

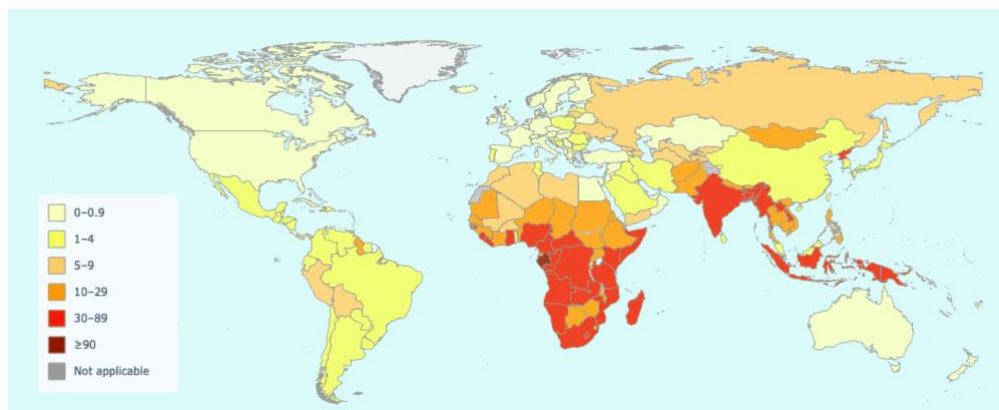
XDR-TB jeb ekstensīvi rezistentā tuberkuloze pirmo reizi tika atklāta pacientam ar HIV AIDS stadijā Dienvidāfrikā 2005. gadā. XDR-TB ir nopietns sabiedrības veselības drauds Āfrikā, Āzijā un bijušās padomju-savienības reģionos. XDR-TB tiek atklāta apmēram 10% no visiem ar zāļu rezistentiem tuberkulozes inficētiem pacientiem. XDR-TB celmu virulence ir līdzīga kā zāļu jutīgai tuberkulozei un slimība neprogresē straujāk. Ņemot vērā to pret cik daudz medikamentiem ir attīstījusies rezistence, šāds tuberkulozes tips ir kļuvis īpaši bīstams, īpaši immunokompromitētiem pacientiem, piemēram AIDS slimniekiem. Īpaša uzmanība jāvērs uz atklājumu, ka apmēram 33% no visiem AIDS pacientiem, kas inficēti ar zāļu rezistentu tuberkulozi ir atklāti ekstensīvi rezistenti *M.tuberculosis* celmi. Šajā populācijas daļā arī letalitātes rādītāji, diemžēl, saglabājas augsti, jo pieejamais terapijas medikamentu klāsts ir ļoti ierobežots. Epidemioloģijas eksperti uzskata, ka īpaša vērība būtu jāpievērš tieši neatliekamās medicīnas nodaļām, kurās var potenciāli nonākt pacienti ar XDR-TB, kas iepriekš nav

identificēti, kas ieceļojuši no endēmiskiem reģioniem, jo nereti šajās nodaļās gaidīšanas laiks pacientiem ir relatīvi ilgs, tādējādi šīs nodaļas var potenciāli būt nozīmīgas transmisijas lokalizācijas. (Matteelli et al. 2014)

1.11. Tuberkulozes izplatība pasaulē un Latvijā

Šobrīd pasaulē ar Tuberkulozi inficēti gandrīz 1.7 miljardi cilvēku jeb 25% no visas pasaules populācijas, balstoties uz PVO aprēķiniem. Tuberkulozes incidences pīķis tika sasniegts 2003. gadā un kopš tā laika saslimstība pamazām mazinās. Pēc PVO datiem, 2017. gadā ar tuberkulozi saslima 10 miljoni cilvēki un 1.6 miljoni gāja bojā.

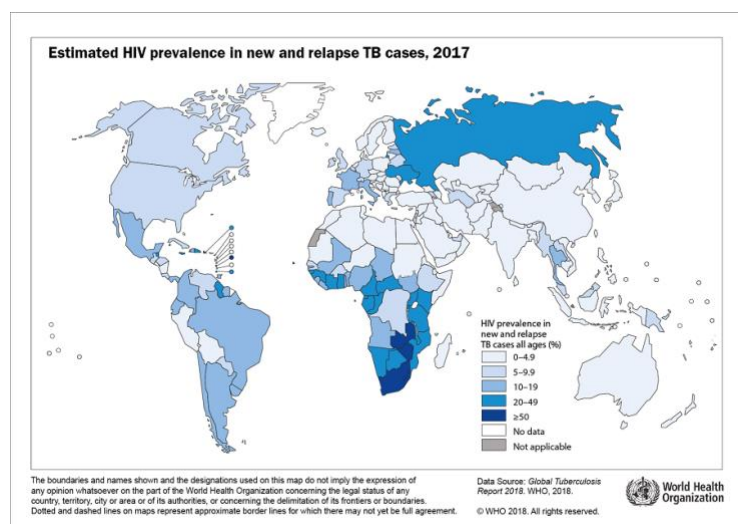
Tuberkulozes epidemioloģiskie rādītāji ir atkarībā no lokalizācijas. Augstākie saslimstības rādītāji ir novēroti sub-sahāras reģionā afrikā, Indijā un Āzijas dienvidaustrumu salās (100 gadījumu uz 100,000 iedzīvotājiem). Vidēji saslimstības rādītāji ir Ķīnā, Centrālamerikā un Dienvidamerikā, Austrumeiropā un Ziemeļāfrikā ar vidēji 26 gadījumiem uz 100,000 iedzīvotājiem. Relatīvi zemi saslimstības rādītāji (<25 gadījumiem uz 100,000 iedzīvotājiem) ir vērojami ASV, rietumeiropā, Kanādā, Japānā, Austrālijā. (PVO, 2018)



Attēls 1.7. Tuberkulozes prevalences uz 100,000 iedzīvotājiem 2017. Gads (izņemot HIV/TB gadījumus).

Legūts no: http://gamapservers.who.int/gho/interactive_charts/tb/cases/atlas.html

Nabadzība, HIV un zāļu rezistence ir galvenie faktori, kas predisponējuši uz globālo tuberkulozes epidēmiju. Apmēram 95% no visiem tuberkulozes gadījumiem tiek konstatēti attīstības valstīs. Apmēram viens no deviņiem inficēšanās gadījumiem ir saistīts ar HIV no kuriem 72% tiek konstatēti āfrikā. Gadā tiek konstatēti arī apmēram 558000 jaunu MDR-TB gadījumi. (Corbett et al. 2006; Wright et al. 2002; PVO 2018)

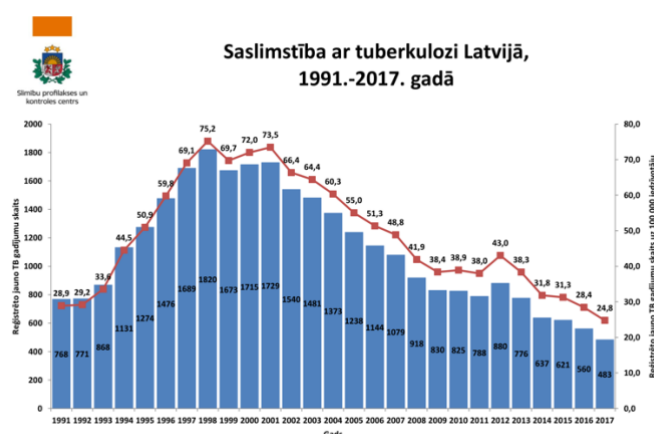


Attēls 1.8. TB/HIV gadījumu prevalence pasaulē 2017. Gadā

Iegūts no: https://www.who.int/gho/tb/tb_015.png

Pēc slimību profilakses un kontroles centra datiem, 2017. gadā Latvijā tikuši atklāti 483 jauni inficēšanās gadījumi jeb 24,8 gadījumi uz 100,000 iedzīvotājiem, no kuriem 36 (7.453%) bijuši MDR-TB gadījumu. No visiem šiem gadījumiem, 483 inficēto bijuši vīrieši, bet 150 sievietes. Inficējušies arī bērni vecumā līdz 17 gadiem – 5 zēni un 11 meitenes, kā arī viens bērns, kas nebija sasniedzis viena gada vecumu. (SPKC 2017)

Salīdzinājumam, 2016. gadā diagnosticēti 560 jeb 25.4 gadījumu uz 100,000 iedzīvotāju no kuriem 46 (8.21%) bijuši MDR-TB, bet 2015. Gadā 621 jeb 31.3 gadījumu uz 100,000 iedzīvotājiem no kuriem MDR-TB bijuši 56 (9.01%).

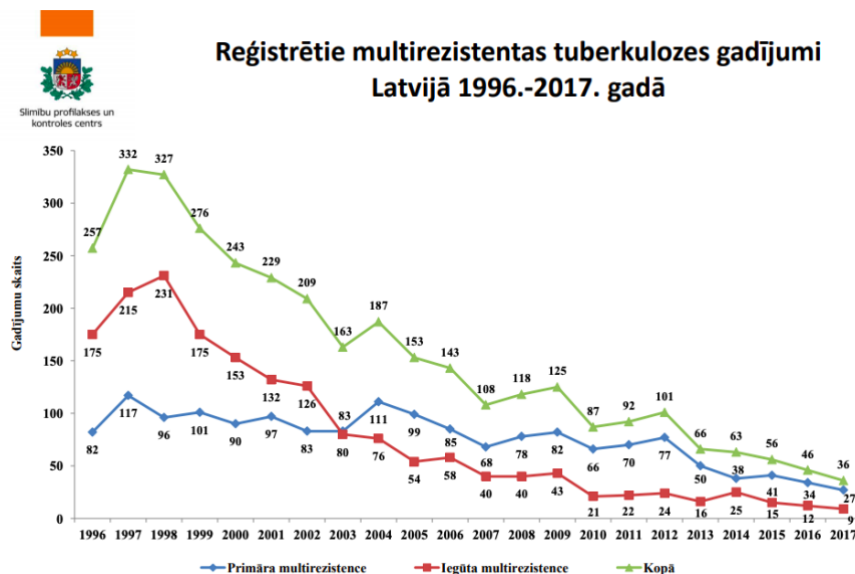


Attēls 1.9. Saslimstība ar tuberkulozi Latvijā 1991.-2017. Gadā

Iegūts no:

https://www.spkc.gov.lv/upload/Infekcijas%20slim%C4%ABbas/Tuberkuloze/Datu%20vizualiz%C4%81cija/1_saslimstiba_2017.pdf

Augstākie rādītāji pēc inficēto skaita Latvijā bijuši 1998. gadā, kad kopā atklāti 1820 jauni gadījumi jeb 75,2 gadījumi uz katrām 100,000 iedzīvotājiem, no kuriem 327 bijuši MDR-TB gadījumi. Statistikā vērojams, ka kopš 2001. gada, jaunu saslimšanas gadījumu skaits ir ik gadu samazinājies. (SPKC 2017; PVO 2017)



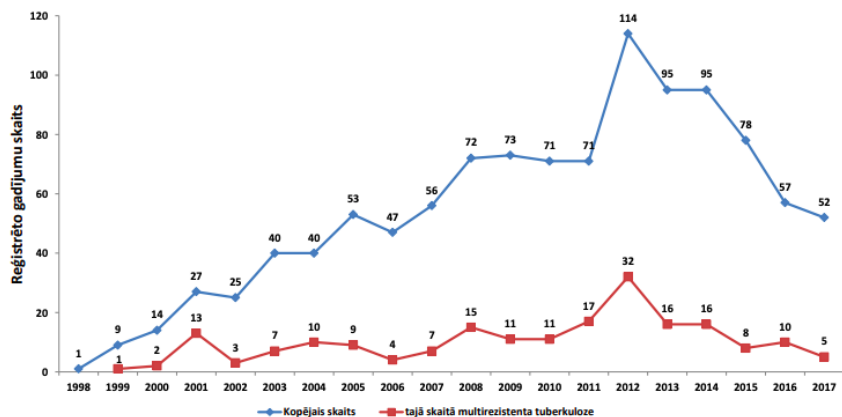
Attēls 1.10. Reģistrētie multirezistentas tuberkulozes gadījumi Latvijā 1996.-2017. Gadā

Iegūts no:

https://www.spkc.gov.lv/upload/Infekcijas%20slim%C4%ABas/Tuberkuloze/Datu%20vizualiz%C4%81cija/8_mrtb_2017.pdf

Kā zināms, HIV infekcija palielina risku inficēties ar tuberkulozi, kā arī palielina risku, ka attīstīsies smagas slimības formas. 2018. gadā 52 jeb 10.3% no visiem reģistrētajiem tuberkulozes gadījumiem bija saistīti ar HIV infekciju. Salīdzinājumam, 2016. gadā šādi gadījumi bijuši 57. (10.17%) bet 2015. gadā 78 (12.56%). (SPKC 2017).

Reģistrētie TB/HIV gadījumi Latvijā, 1998.-2017. gadā



Attēls 1.11. Reģistrētie TB/HIV gadījumi Latvijā 1998.-2017. Gadā

Iegūts no:

https://www.spkc.gov.lv/upload/Infekcijas%20slim%C4%ABbas/Tuberkuloze/Datu%20vizualiz%C4%81cija/7_tb_hiv_2017.pdf

4. Materiāli un metodes

Diplomdarba praktiskā daļa tika izstrādāta Tuberkulozes un plaušu slimību centra Mikobakterioloģiskajā laboratorijā. Materiāla ievākšanu un rezistences noteikšanu veica laboratorijas speciālisti, ievērojot visus nepieciešamos piesardzības pasākumus.

Darba mērķis bija noteikt *M. tuberculosis* multirezistentu celmu prevalenci RAKUS Plaušu un tuberkulozes slimnīcā laika periodā no 01.01.2018. līdz 31.12.2018, un salīdzināt fenotipiskās un genotipiskās multirezistences noteikšanas metodes .

Darba uzdevumu izpildīšanas process tika veikts inokulējot vienādus standartizēta uzsējuma materiāla daudzumus uz barotnes ar un bez testa medikamentiem. Tādā veidā tika novērota un analizēta zāļu jutība. Medikamentu testēšana tika veikta uz Lēvenšteina Jensena cietajām barotnēm, *Middlebrook 7H11* agara un automatizētajā Bactec *MGIT 960* sistēmā.

Ar šīm metodēm tiek testēti pirmās rindas medikamenti (izoniazīds, rifampicīns, etambutols, pirazinamīds), kā arī otrās rindas medikamenti (kanamicīns, amikacīns, kapreomicīns, ofloksacīns, moksifloksacīns, levofloksacīns, etionamīds, cikloserīns, linezolīds) un jaunie medikamenti (delamanīds un bedahilīns).

Ar *GeneXpert*® sistēmu tika veikta genotipiskā diagnostika uz tuberkulozi un atklāta rifampicīna rezistence.

Darba veikšanas procesā iepazinos ar pieejamajiem rezistences noteikšanas metodēm, palīdzēju sagatavot materiālus to apstrādei, veicu medikamentu sagatavošanu testēšana, nolasīju iegūtos rezultātus un patstāvīgi tos analizēju.

Pētījuma laikā netika apstrādāti un izmantoti pacienta personīgie dati.

2.1. Zāļu jutības tests

Zāļu jutības tests (ZJT) ir nepieciešams, lai noteiktu tuberkulozes pacientiem optimālāko ārstēšanas režīmu, kā arī, lai sekotu rezistentu celmu izplatībai un tuberkulozes epidemioloģijai. Kopš 2008. gada PVO iesaka lietot noteiktas medikamentu kritiskās koncentrācijas katrai barotnei.

Medikament u grupa	Medikamenti	Kritiskā koncentrācija (µg/ml)			
		Lēvenšteina- Jensena	Middlebrook 7H10 ^b	Middlebrook 7H11 ^b	MGIT960
I grupa 1.rindas p/o medikamenti	Izonizaīds	0.2	0.2	0.2	0.1
	Rifampicīns	40.0	1.0	1.0	1.0
	Etambutols	2.0	5.0	7.5	5.0
	Pirazinamīds	-	-	-	100.0
II grupa 2.rindas i/v medikamenti	Streptomicīns	4.0	2.0	2.0	1.0
	Kanamicīns	30.0	5.0	6.0	2.5
	Amikacīns	30.0	4.0	-	1.0
	Kapreomicīns	40.0	4.0	-	2.5
III grupa Fluorohinolo ni	Ofloksacīns	4.0	2.0	2.0	2.0
	Levofloksacīns	-	1.0	-	1.5
	Moksifloksacīns	-	0.5/2.0	-	0.5/2.0
IV grupa 2.rindas p/o medikamenti	Etionamīds	40.0	5.0	10.0	5.0
	Protionamīds	40.0	-	-	2.5
	Cikloserīns	30.0	-	-	-
	Para- aminosalicilskābe	1.0	2.0	8.0	4.0

Tabula 2.1. Anti tuberkulozes Medikamentu jutības kritiskās koncentrācijas.

Adaptēta no:

http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/Updated%20critical%20concentration%20table_1st%20and%202nd%20line%20drugs.pdf

2.2. Medikamentu sagatavošana

Veicot testu sākumā tiek sagatavots medikamentu šķīdums. Medikamentu pulverus iegūst no komerciāliem avotiem vai farmaceitiskām kompānijām, kas ražo konkrētos

medikamentus. Pieļaujamie medikamenti tiek marķēti ar ģenērisko nosaukumu, aktīvās vielas saturu (kas parasti tiek izteikts medikamenta mikrogramos [μg] uz pulvera mg), kā arī derīguma termiņu. Pulveri tiek uzglabāti saskaņā ar ražotāja rekomendācijām vai pie -20°C vai zemākas temperatūras eksikatorā. Kad eksikators tiek izņemts no saldētavas, pirms atvēršanas tam ir jāsasniedz istabas temperatūra, lai novērstu ūdens kondensāciju. Pretmikrobu pulveris jānosver uz analītiskiem svāriem, kas ir kalibrēti. Lai aprēķinātu piemērotu šķīdinātāja daudzumu, kas ir nepieciešams, lai iegūtu nepieciešamo koncentrāciju, ir jāņem vērā medikamenta pulvera aktivitāte.

2.3.Lēvenšteina-Jensena barotnes uzsējumi

Lēvenšteina- Jensena (LJ) barotne ir cieta uz olas bāzes veidota barotne. Zāļu jutība tiek noteikta ar absolūtās koncentrācijas metodi. Izmantojamais materiāls no pacienta elpceļiem (krēpas, bronhu skalojums u.c.) tika apstrādāts ar N-acetil-L-cisteīna-NaOH, inokulēts un kultivēts uz cietās barotnes.

Visas kultūras jāpārbauda 72 stundas pēc inokulācijas, lai pārbaudītu, vai šķidrums ir pilnīgi iztvaikojis, lai nostiprinātu vāciņus, lai novērstu izžūšanu un noteiktu piesārņotājielas. Pēc tam kultūras tiek pārbaudītas katru nedēļu:

1. Pēc vienas nedēļas, lai atklātu strauji augošas mikobaktērijas, kuras var sajaukt ar *M. tuberculosis*
2. Pēc no trīs līdz četrām nedēļām, lai atklātu *M. tuberculosis* pozitīvās kultūras, kā arī citas lēni augošas mikobaktērijas, kas var būt nekaitīgi saprofīti vai potenciāli patogēni.
3. Pēc astoņām nedēļām, lai atklātu ļoti lēni augošas mikobaktērijas, tostarp *M. tuberculosis*, pirms tiek vērtēts, ka kultūra ir negatīva

Redzamās kolonijas parasti parādās no divām līdz trīs nedēļām pēc inkubācijas (*M. tuberculosis* ir lēni augošie, un tā var ilgt 3-4 nedēļas, lai nodrošinātu redzamu augšanu), bet kultūru inkubē līdz astoņām nedēļām pirms izmešanas. Kultivējot LJ barotnē $35-37^{\circ}\text{C}$ temperatūrā, *M. tuberculosis* rada raupjas, piepaceltas, paaugstinātas, sausas, pigmentētas (krēmkrāsas / bifeļkrāsas) kolonijas. *Mycobacterium tuberculosis* var noteikt, pamatojoties uz tās kolonijas īpašībām. Barotņu augšana tiek izvērtēta atbilstoši norādītajam tabulā :

Nav augšana	0
Mazāk par 50 kolonijām	Saskaitīt kolonijas
50-100 kolonijas	+
100-200 kolonijas, viegls klājums	++
200-500 kolonijas, gandrīz viss noaudzis	+++
>500 kolonijas, viss noaudzis	++++

Tabula 2.2. **Barotņu augšanas izvērtējums**

Kultūra tiek uzskatīta par **jutīgu (S)**, ja uz medikamentu saturošas barotnes nav koloniju vai ir mazāk par 1% salīdzinājumā ar augšanas kontroles stobriņu ar tādu pašu inokulātu. Kultūra tiek uzskatīta par **rezistentu (R)**, ja uz medikamentu saturošas barotnes koloniju skaits pārsniedz koloniju skaitu uz kontroles stobriņa ar tādu pašu inokulātu. Proporcija ir lielāka par 1%. Ja iegūtais rezultāts ir robežlīnijā ar 1%, tad kultūra jāuzskata par rezistentu un ir jāatkārto ZJT.

$$\frac{\text{Koloniju skaits uz medikamenta barotnes}}{\text{Koloniju skaits uz kontroles barotnes}} \times 100$$

Piemērs: kontroles barotne satur 80 baktēriju kolonijas, medikamentu saturošā barotne = 6 kolonijas. Medikamentu saturošās barotnes koloniju skaitu izdala ar kontroles barotnes koloniju skaitu, reizina ar 100. Tādējādi tiek iegūta rezistentu koloniju proporcija izteikta procentos.

2.4. Middlebrook 7H11 agars

Agara bāzes balstīta cietā barotne. Šī agara bāze satur daudz neorganisku sāļu, kas palīdz nodrošināt mikobaktērijas augšanu. Citronskābe, kas veidojas no nātrija citrāta, palīdz saglabāt neorganiskos katjonus šķīdumā. Glicerīns piegādā oglekli un enerģiju. Middlebrook OADC papildinājums (M0678) satur oleīnskābi, albumīnu u.c., kas ir enerģijas avots baktērijai. Katalāze neitralizē toksiskos peroksīdus. Albumīns aizsargā tuberkulozes baktēriju no

toksiskām vielām. Malahītzaļais nomāc citas baktērijas. Kultūra aug 2-4 nedēļas 35-37 ° C temperatūrā.

2.5. Automatizētā Bactec MGIT 960 sistēma

BD BACTEC MGIT 960 sistēma ir paredzēta liela apjoma mikobaktēriju augšanas, atklāšanas un jutīguma testēšanai, un tā ir izstrādāta, lai apmierinātu vidēja un liela apjoma laboratoriju vajadzības. Šīs sistēmas priekšrocība ir ātrāka datu nolasīšana, kas var samazināt pacientu aprūpes laiku, veselības aprūpes izmaksas un personāla izmantošanas optimizācija. Šī sistēma ir paredzēta ātrai mikobaktēriju atklāšanai visu veidu klīniskajos paraugos, izņemot asinis un urīnu. Sistēma ietver šķidru barotni, augšanas papildinājumu un antibiotiku maisījumu - PANTA.

BACTEC MGIT sistēmas sastāv no mikobaktēriju augšanas indikatora caurules, kurā atrodas mēģenes ar 110 µL fluorescējošā indikatora un 7 ml buljona. *BACTECTM MGIT* augšanas papildinājums nodrošina mikobaktērijas ar vielām, kas ir būtiskas mikobaktēriju augšanai. *BBL MGIT PANTA* satur antibakteriālu līdzekļu maisījumu, ko izmanto, lai nomāktu citu baktēriju augšanu. Fluorescējošs savienojums ir iebūvēts silikonā katra *MGIT* caurules apakšā. Šis savienojums ir jutīgs pret skābi, kas izšķīdināts buljonā. Sākotnēji lielais izšķīdušā skābekļa daudzums samazina savienojuma emisijas un var konstatēt nelielu fluorescenci. Vēlāk aktīvi elpojoši mikroorganismi patērē skābekli un ļauj noteikt fluorescenci.

Medikamentu krājuma veidošana un *MGIT* stobriņu sagatavošana tiek veikta bioloģiskās drošības skapī. Medikaments jāpapildina ar piemērotu sterila destilēta/dejonizēta ūdens daudzumu. Dažādiem medikamentiem tilpums ir atšķirīgs. Nepareiza tilpuma izmantošana anulēs šo testu rezultātus.

Veicot testu ar medikamentiem, tiek marķēti divi 7 ml stobriņi katram izolātam ar atbilstošu laboratorijas ienākošo numuru un subjekta identifikācijas numuru. Papildus marķē stobriņus ar GC (augšanas kontrole) un , piemēram, PZA (pirazinamīds). Stobriņus ievieto pareizā secībā no kreisās uz labo, t.i. GC, PZA, pievienojot *BACTEC MGIT PZA* piedevas katrā PZA stobriņā. *MGIT GC* stobriņā medikamentus nepievieno.

Medikaments	Medikamenta koncentrācija pēc papildināšanas	MGIT stobriņiem pievienotais tilpums testam	MGIT stobriņu gala koncentrācija
MGIT PZA	8000 µg/ml	100 µl	100 µg/ml
MGIT INH	8,3 µg/ml	100 µl	0,1 µg/ml
MGIT RIF	83 µg/ml	100 µl	1,0 µg/ml
MGIT EMB	415 µg/ml	100 µl	5,0 µg/ml
Levofloksacīns	166µg/ml	100 µl	2,0 µg/ml
Kanamīcīns	208 µg/ml	100 µl	2,5 µg/ml
Amikacīns	83 µg/ml	100 µl	1.0 µg/ml
Kapreomicīns	208 µg/ml	100 µl	2,5 µg/ml
Ofloksacīns	166 µg/ml	100 µl	2,0 µg/ml
Linezolid	83 µg/ml	100 µl	1,0 µg/ml
Moksifloksacīns	42 µg/ml	100 µl	0,5 µg/ml
Moksifloksacīns	166 µg/ml	100 µg/ml	

Tabula 2.3. Stobriņiem pievienojamo medikamentu koncentrācijas un tilpumi

BACTEC MGIT 960 instruments nepārtraukti kontrolē visus stobriņus attiecībā uz paaugstinātu fluorescenci. Fluorescences analīze medikamentus saturošos stobriņos salīdzinājumā ar fluorescenci augšanas kontroles stobriņā tiek izmantota jutības rezultātu noteikšanai. Kad augšanas vienība (GU) augšanas kontrolē sasniedz 400, paejot 4 – 13 dienām (SIRE vai ne-MGIT medikamenti) vai 4-21 dienām (PZA), tiek izvērtēti medikamentus saturošu flakonu GU lielumi. Rezultātu interpretācija no sistēmas:

1. **S** = Iespējams = medikamenta stobriņa GU ir mazāka par 100
2. **R** = Rezistents = medikamenta stobriņa GU ir 100 vai lielāka



Attēls 2.1. Rezultātu izvērtēšana šķidrajās barotnēs

2.6. GeneXpert® sistēma

Xpert® MTB / RIF tests ir ātrs molekulārais tests jeb PĶR-RIF tests, ko operatori var izmantot, ļaujot identificēt tuberkulozes mikobaktērijas DNS un vienlaikus novērtēt rifampicīna rezistenci 2 stundu laikā. Tam ir liela priekšrocība veselības aprūpē jo dod iespēju gandrīz uzreiz uzsākt efektīvāko ārstēšanas shēmu pacientam. Turklāt to var paveikt, izmantojot nepārstrādātus krēpu paraugus, kā arī klīniskos paraugus no ekstrapulmonālajām vietām. Papildus liels ieguvums šajā metodē ir tā spēja nolasīt mikobaktēriju nelielā daudzumā krēpās HIV pacientiem. Šī sistēma integrē un automatizē paraugu apstrādi, nukleīnskābes amplifikāciju un mērķa sekvenču noteikšanu. Sākotnēji XpertMTB / RIF testā pastiprina rpoB gēna daļu, kas satur 81 bāzes pāra “kodolu” reģionu. Zondes spēj atšķirt konservētu savvaļas tipa sekvenču un mutācijas kodolreģionā, kas ir saistītas ar rezistenci pret rifampicīnu.

Krēpas sajauc ar reaģentu, kas tiek piegādāts ar testu, un kārtidžs, kas satur šo maisījumu, tiek ievietots GeneXpert sistēmā. Visa apstrāde no šī brīža ir pilnībā automatizēta.



Attēls 2.2. GeneXpert sistēma RAKUS Plaušu un Tuberkulozes slimnīcā

2.6.1. Piederumi

1. *GeneXpert* sistēma – aprīkota ar GX2.1 programmatūru, dators, printeris, svītrkodu lasītājs un lietotāja rokasgrāmata. Ir pieejams viena, divu, četru vai 16 moduļu konfigurācija.
2. Kārtridži :
 - a. Vienreizlietojamie Xpert/MTB/RIF kārtridži.
 - b. Patstāvīgais kārtridžs, kurā tiek veikta paraugu ekstrahēšana, amplifikācija un noteikšana.
3. Tests tiek veikts II klases bioloģiskās drošības kabinetā (BSC)
4. Parauga reaģents (pieejams Xpert MTB / RIF komplektā), astoņu ml tilpuma iepakojums katrai kārtridžai.
5. Pastāvīgie marķieri.
6. Sterilas (individuāli iepakotas) vienreizējās lietošanas pipetes - ar vienu marķējumu minimālajam parauga pārneses apjomam kārtridžā (paredzēts Xpert MTB / RIF komplektā).
7. Sterili skrūvējami paraugu savākšanas konteineri / tases.



Attēls 2.5. *GeneXpert* rezistences datu izvērtēšana.

2.7. Statistiskā analīze

Ar visām iepriekšminētajām diagnostiskajām metodēm iegūtie dati tika tālāk analizēti, izmantojot datorprogrammu *Microsoft Office Excel v16.4*.

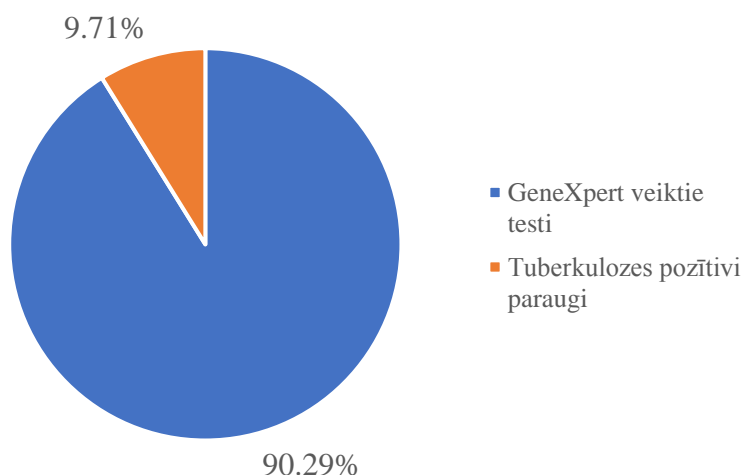
3. Rezultāti

Diplomdarba praktiskās daļas analīzē tika iekļautas divas rezultātu grupas: 2018. gadā veikto genotipisko analīžu (GeneXpert) rezultāti, kā arī fenotipiskie uzsējumu zāļu jutības testu rezultāti, kas veikti un iegūti RAKUS “Tuberkulozes un plaušu slimību centrs” Mikobakterioloģiskajā laboratorijā 2018. gadā.

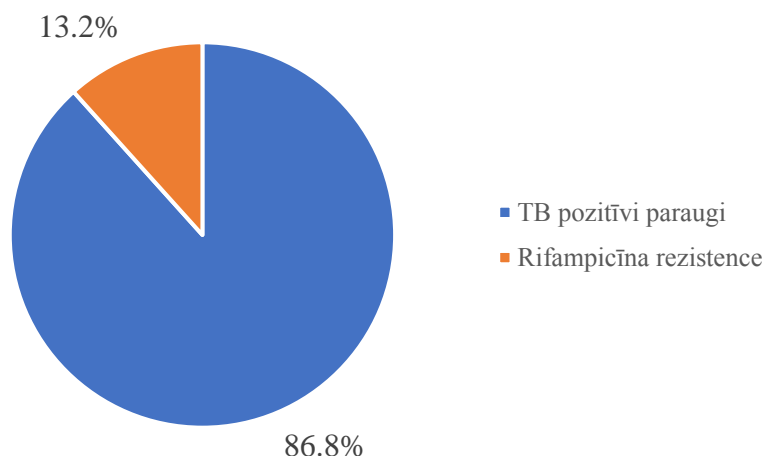
Ar *GeneXpert* 2018. gadā kopā tika veikti 3666 testi, no kuriem 356 jeb 9.71% paraugos tika konstatēta tuberkulozes izraisīgo baktēriju klātesamība. No šiem 356 tuberkulozes pozitīvajiem paraugiem, 47 jeb 13,2% tika konstatēta rezistence pret rifampicīnu. Ņemot vērā, ka monorezistence pret rifampicīnu sastopama reti (<5%), tiek pieņemts, ka visi rifampicīna rezistentie gadījumi ir uzskatāmi par MDR-TB, taču rezistences apstiprināšanai tiek veikti arī zāļu jutības testi uz barotnēm, kā arī šiem datiem jāsakrīt ar klīniskajiem un radioloģiskajiem datiem. Šie rezultāti attēloti 3.1. tabulā un 3.1. un 3.2. attēlos.

Ar GeneXpert veiktie testi 2018. gadā	Tuberkulozes pozitīvi paraugi	Rifampicīna rezistences pozitīvi testi	MDR-TB prevalence
3666	356	47	13.2%

Tabula 3.1. 2018. gadā ar GeneXpert veikto testu rezultāti.

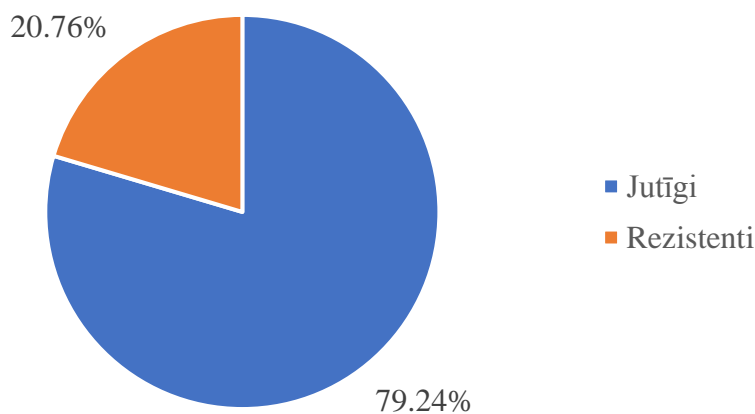


Attēls 3.1. Ar GeneXpert noteiktās tuberkulozes pozitīvo paraugu prevalence 2018. gadā.



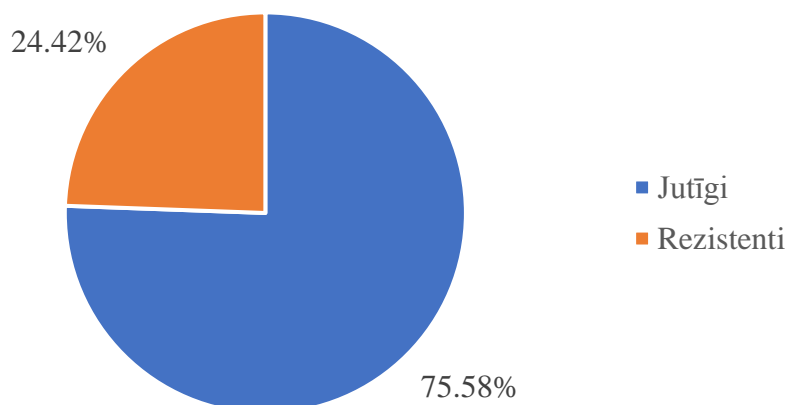
Attēls 3.2. Ar GeneXpert veikto testu rifampicīna rezistences prevalence 2018. gadā.

Statistiskajā analīzē tika iekļauti arī 4089 fenotipiskie zāļu jutības testu rezultāti, kas veikti izmantojot paraugu uzsējumus uz selektīvām barotnēm. No tiem 849 (20.76%) tika atklāta jutība pret vismaz vienu no pirmās rindas, otrās rindas vai jaunās paaudzes medikamentiem. Jāņem vērā, ka datus par 2018. gadā veiktajiem ZJT, ir iekļauti visi veiktie testi, neatkarīgi no tā, kad tuberkuloze pirmo reizi diagnosticēta, tostarp atkārtoti veiktus testus, kā arī testi var dublēties no viena pacienta parauga.



Attēls 3.3. *M.tuberculosis* fenotipiski noteiktās rezistences un jutīguma attiecība

Izmantojot ZJT, kuri balstās uz medikamentu minimālo kristisko koncentrāciju, iespējams noteikt rezistenci pret katru antituberkulozes medikamentu. No analizētajiem 2223 fenotipisko zāļu jutības testu rezultātiem pret pirmās rindas medikamentiem 543 paraugos (24.42%) tika konstatēta rezistence pret kādu no pirmās rindas medikamentiem.

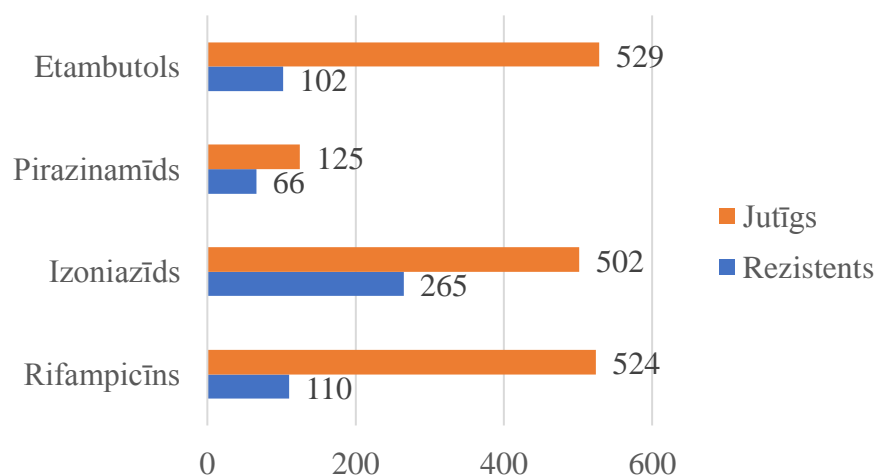


Attēls 3.4.. *M.tuberculosis* rezistences un jutīguma attiecība pret pirmās rindas anti-tuberkulozes līdzekļiem.

No tiem 16% gadījumos tika atklāta rezistence pret etambutolu, 34.55% gadījumu pret izoniazīdu, 34.55% gadījumu pret pirazinamīdu, 17.35% gadījumu pret rifampicīnu. Rezultāti par rezistenci pret pirmās rindas medikamentiem apkopoti 3.1. tabulā un 3.2. attēlā.

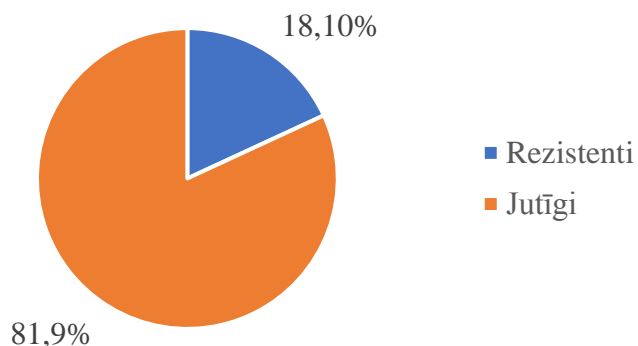
Medikaments	Rezistents		Jūtīgs (%)	Kopā, n
	n=543 (24.43%)		n=1680 (75.57%)	n=2223
Rifampicīns	110	17,35%	524	634
Izoniazīds	265	34,55%	502	767
Pirazinamīds	66	34,55%	125	191
Etambutols	102	16,16%	529	631

Tabula 3.2. *M.tuberculosis* zāļu jutība pret pirmās rindas medikamentiem



Attēls 3.5. *M. Tuberculosis* zāļu jutība pret pirmās rindas medikamentiem

Diplomdarba ietvaros no analizētajiem 1646 fenotipisko zāļu jutības testu rezultātiem pret otrās rindas medikamentiem 298 no 1646 veiktajiem testiem jeb 18.10% testēto paraugu tika konstatēta rezistence pret kādu no otrās rindas medikamentiem.

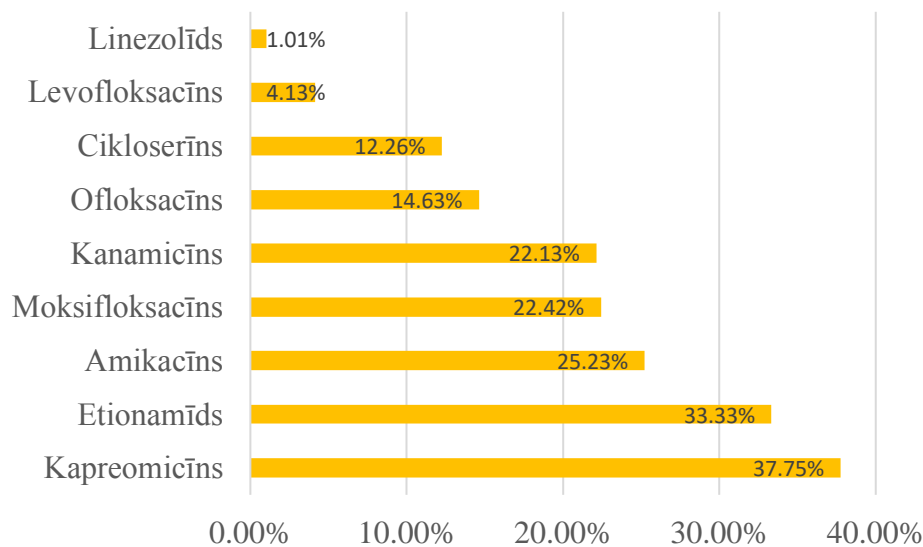


Attēls 3.6.. M. tuberculosis zāļu jutība pret otrās rindas medikamentiem

No otrās rindas medikamentiem, visbiežāk rezistence tika konstatēta pret kapreomicīnu (37%), etionamīdu (33.33%), amikacīnu (25.23%), bet visretāk pret linezolīdu. Rezultāti par rezistenci pret otrās rindas medikamentiem apkopoti 3.2. tabulā un 3.6. attēlā.

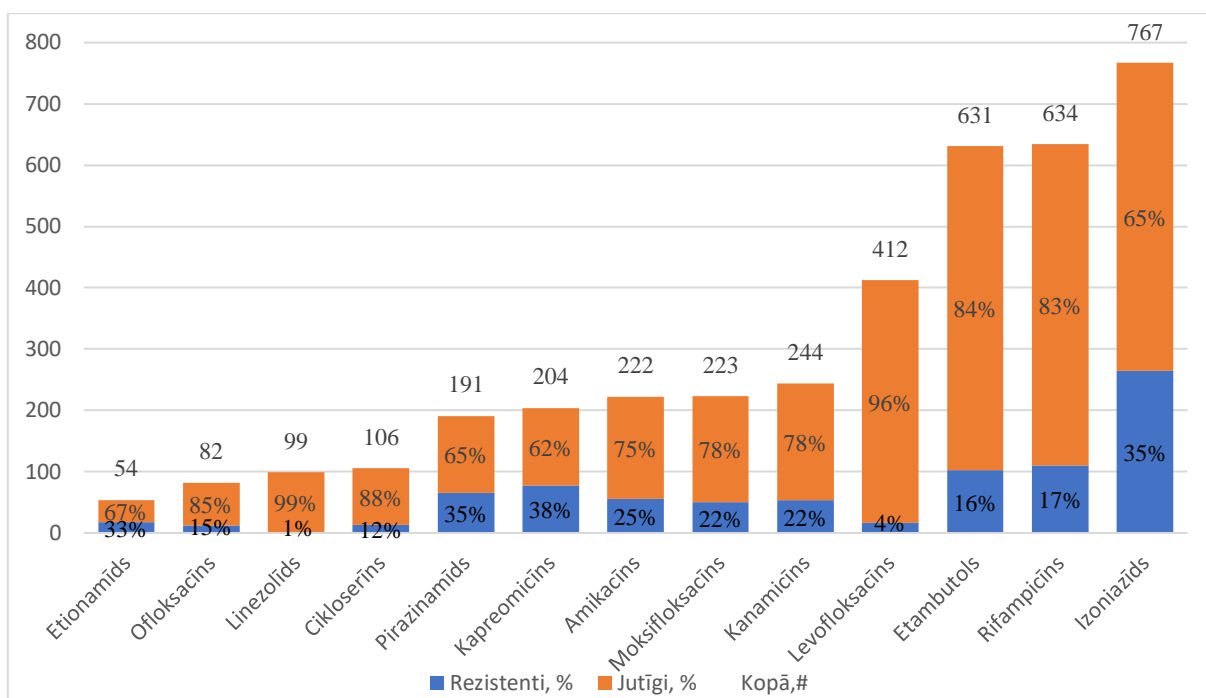
Medikaments	Rezistents		Jutīgs	Kopā
	N=298 (22,11%)		N=1348 (77,98%)	N=1646
Amikacīns	56	25.23%	166	222
Cikloserīns	13	12.26%	93	106
Etionamīds	18	33.33%	36	54
Kanamicīns	54	22.13%	190	244
Kapreomicīns	77	37.75%	127	204
Levofloksacīns	17	4.13%	395	412
Linezolīds	1	1.01%	98	99
Moksifloksacīns	50	22.42%	173	223
Ofloksacīns	12	14.63%	70	82

Tabula 3.3. M. Tuberculosis zāļu jutība pret otrās rindas medikamentiem



Attēls 3.7. M.tuberculosis zāļu jutība pret otrās rindas medikamentiem

Attēlā 3.6. attēlota gan pirmās, gan otrās rindas anti-tuberkulozes medikamentu rezistences prevalence, izteikta procentos. Kombinējot pirmās un otrās rindas medikamentu rezultātus, redzams, ka visbiežāk rezistence sastopama pret otrās rindas medikamentu kapreomicīnu (37.75%) un pirmās rindas medikamentiem: izoniazīdu (34.55%), pirazinamīdu (34.55%). Jāņem vērā arī rezistences rādītāji pret otrās rindas medikamentu etionamīdu, jo tā rezistences prevalence iegūtajos datos sasniedz 33.33%, kas ir tikai par 1.22% mazāk nekā izoniazīdam un pirazinamīdam.



Attēls 3.8. Rezistences un jutības attiecība pret pirmās un otrās rindas anti-tuberkulozes medikamentiem

Tika analizēti arī 104 zāļu jutības testu rezultāti pret jaunās paaudzes anti-tuberkulozes medikamentiem bedahilīnu un delamanīdu. Pret bedahilīnu netika atklāta rezistence, taču pret delamanīdu rezistence tika konstatēta 1 paraugā (0.96%). Rezultāti par jaunās paaudzes anti-tuberkulozes medikamentiem attēloti tabulā 3.3.

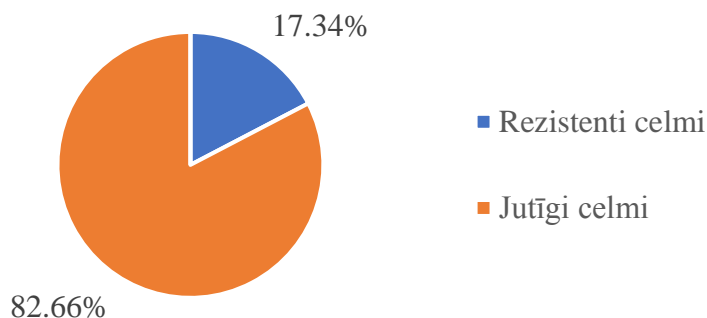
Medikaments	Rezistents		Jutīgs (%)	Kopā, n
	n=1 (0.96%)		n=103 (99.04%)	n=104
Bedahilīns	0	0.00%	104	104
Delamanīds	1	0.96%	103	104

Tabula 3.4. M. Tuberculosis zāļu jutība pret jaunās paaudzes anti-tuberkulozes medikamentiem

Ņemot vērā, ka rifampicīna monorezistenti celmi sastopami ārkārtīgi reti (vairāk kā 90% rifampicīna rezistentu *M.tuberculosis* celmu ir rezistenti arī pret izoniazīdu), visi paraugi, kuros atklāta rezistence pret rifampicīnu, diplomdarba rezultātu analīzē tika uzskatīti par multirezistentas tuberkulozes gadījumiem. (Hanna 1995; Tortoli et al. 1996) Tas attēlots tabulā 3.4. un attēlā 3.8.

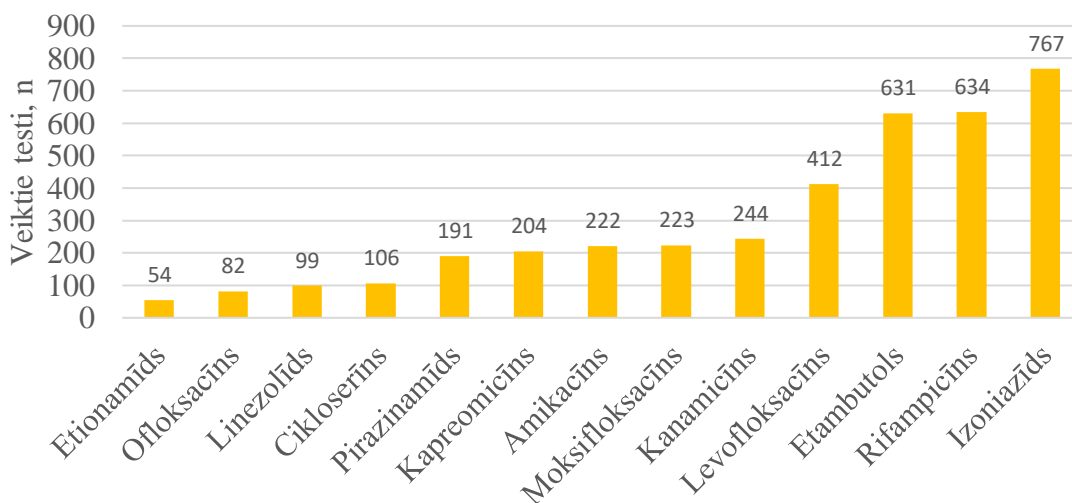
Rifampicīna rezistence	110
Kopā veiktie rifampicīna rezistences testi	634
MDR-TB, %	17.35%

Tabula 3.5. Multi-rezistentas tuberkulozes prevalence balstoties uz fenotipisko rifampicīna rezistences noteikšanu.



Attēls 3.9. Rifampicīna rezistentu un jutīgu celmu attiecība

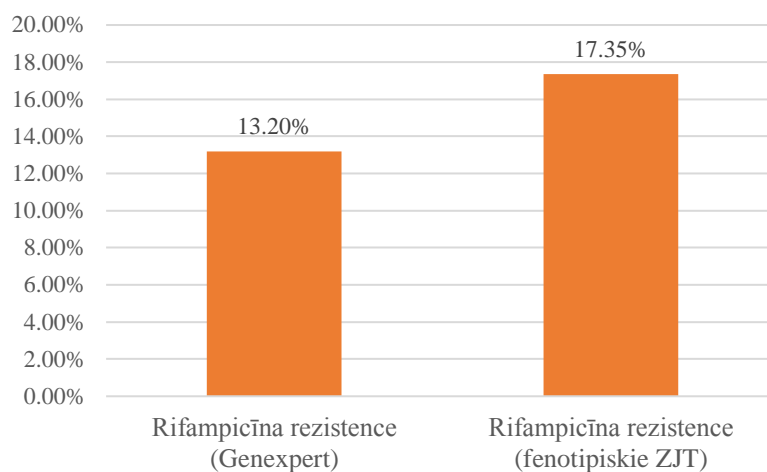
Iegūtie dati ļauj salīdzināt arī to, cik bieži pret katru medikamentu tiek veikti fenotipiskie ZJT rezistences noteikšanas testi. Pēc iegūtajiem datiem var secināt, ka visbiežāk rezistences testi tiek veikti uz pirmas rindas medikamentiem izoniazīdu, rifampicīnu, etambutolu, kā arī otrās rindas medikamentu: levofloksacīnu. Šie dati attēloti attēlā 3.9.



Attēls 3.10.. Dažādu medikamentu rezistences noteikšanai veikto testu daudzums 2018. gadā

Kā redzams, dati par MDR-TB prevalenci, balstoties uz rifampicīna rezistences noteikšanu, kas iegūti ar genotipiskajām metodēm (*GeneXpert*) un fenotipiskajām metodēm ir

atšķirīgi. Proti, ar *GeneXpert* noteiktā rifampicīna rezistences prevalence ir 13,2% (n=356), savukārt ar fenotipiskajām metodēm noteiktā – 17.35% (n=634).



Attēls 3.11. Rifampicīna rezistence (%), kas noteikta ar GeneXpert un Fenotipiskajiem zāļu jutības testiem

4. Diskusija

Pat neskatoties uz to, ka tuberkuloze tika atklāta jau pirms vairāk kā 130 gadiem, tā joprojām saglabājas kā nopietns sabiedrības veselības drauds. Tuberkuloze ir saistīta ar sarežģītu un dārgu terapijas procesu, dārgiem un sarežģītiem kontroles mehānismiem un nopietnu veselības stāvokļa apdraudējumu.

Pēc 2017. gada PVO datiem, 4.1% no visiem pasaules jaunatklātajiem tuberkulozes gadījumiem bijuši MDR-TB, taču MDR-TB prevalence ir ļoti atšķirīga dažādādos reģionos. Piemēram, ASV 2017. gadā tikai 1.9% no visiem jaunatklātajiem tuberkulozes gadījumi bijuši MDR-TB, savukārt Krievijā MDR-TB prevalence 2017. gadā pārsniegusi 18%.

Kaut arī statistikas dati liecina, ka tuberkulozes, ieskaitot MDR-TB prevalencei Latvijā ir tendence samazināties jau sākot no 1996. gada un pasaulē kopumā kopš 2003. gada, 2017. gadā ar tuberkulozi saslimuši 10 miljoni cilvēku un 1.6 miljoni gājuši bojā. Ņemot vērā, ka arvien parādās jauni rezistenti celmi, pat tādi, kas rezistenti pret jaunākās paaudzes anti-tuberkulozes medikamentiem, ir īpaši svarīgi pievērst lielāku uzmanību pielietotajiem medikamentiem un izplatītākajiem rezistentajiem celmiem, tādējādi cenšoties aizkavēt rezistences attīstību. (SPKC 2017; Pasaules Veselības organizācija 2017)

2018. gadā ar *GeneXpert* Tuberkulozes un plaušu slimību centra laboratorijā tika veikti 3666 testi. No 3666 testiem 356 paraugos tika konstatēta *M. tuberculosis* un 47 (13.2%) tika noteikti kā rifampicīna rezistenti, un šī darba kontekstā uzskatīti par multirezistentiem (MDR-TB). *GeneXpert* MTB / RIF testa rezultāti ļauj ātri un efektīvi noteikt *M.tuberculosis* klātesamību un, vienlaikus, arī rezistenci pret rifampicīnu. Rifampicīna rezistence, lai gan ne vienmēr, bet pārsvarā norāda uz MDR-TB (ko nosaka vienlaicīga rezistence arī pret izoniazīdu - citu galveno antituberkulozes līdzekli). *GeneXpert* rezultāti jāinterpretē kopā ar klīniskajiem, radiogrāfiskiem un citiem laboratorijas rezultātiem, tomēr tā ir nozīmīga diagnostikas metode, kas ļauj ātri, ar augstu sensitivitāti noteikt *m.tuberculosis* klātesamību un rifampicīna rezistenci, taču diagnozes apstiprināšanai, vienmēr būtu jāveic fenotipiskie ZJT. (Boehme et al. 2010)

Salīdzinājumam, Latvijā 2017. gadā tika reģistrēti 487 jauni tuberkulozes gadījumi balstoties uz SPKC datiem un 552 pēc PVO pieejamajiem datiem. Pēc SPKC datiem, 36 (7.453%) un pēc PVO datiem 48 (8.69%) no tiem bijuši MDR-TB gadījumi. Savukārt, 2016. gadā MDR-TB prevalence sasniegusi 8.21% (Pēc SPKC datiem) un 8.48% (pēc PVO datiem). Ņemot vērā publiski pieejamo statistiku un salīdzinot ar diplomdarbā iekļautajiem rezultātiem, jāsecina, ka MDR-TB prevalence Tuberkulozes un Plaušu Slimību Centra laboratorijā 2018. gadā ir bijusi augstāka nekā SPKC apkopotā prevalence 2016. gadā un 2017. gadā, tomēr jāņem

vērā, ka GeneXpert atradne nav pietiekama diagnozes apstiprināšanai un ir tālāk jāveic papildus fenotipiskie testi. (SPKC, 2017)

Interesanti salīdzināt iegūtos datus arī ar kaimiņvalstu pieejamo statistiku. Piemēram, Igaunijā 2017. gadā tika konstatēti 175 tuberkulozes gadījumi no kuriem 37 (21.14%) bijuši MDR-TB gadījumi, savukārt Lietuvā 1387 gadījumi, no kuriem 264 (19.03%) bijuši MDR-TB. Salīdzinot kaimiņvalstu statistiku ar diplomdarbā iegūtajiem rezultātiem, jāsecina, ka MDR-TB prevalences rādītāji Tuberkulozes un Plaušu Slimību Centra laboratorijā ir zemāka nekā kaimiņvalstīs. (PVO, 2017)

Ar fenotipiskajām metodēm noteiktā rifampicīna rezistences relatīvā prevalence bija augstāka nekā ar ģenētisko – GeneXpert metodi. Proti, fenotipiski 2018. Gadā rifampicīna rezistence tika noteikta 634 reizes, no kuriem pozitīvi bija 110 (17.35%) paraugi. Šī atšķirība varētu būt skaidrojama ar to, ka:

1. GeneXpert rifampicīna rezistenci nosaka pamatojoties ar mutācijām rpoB gēnā, kas sastopama apmēram 95% rifampicīna rezistentajiem celmu.
2. Datus par ar fenotipisko ZJT veikto metodi noteikto rifampicīna rezistenci iekļauti visi 2018. gadā veiktie testi, kas sevī var iekļaut datus arī par atkārtoti veiktiem ZJT.
3. GeneXpert tiek veikts primārai ātrākai tuberkulozes identificēšanai, taču tā nav uzskatāma par MDR-TB apstiprinošu diagnostisko metodi un materiāli ir jātestē tālākai izmeklēšanai ar ZJT.

Diplomdarbā iekļautajos rezultātos redzams arī, ka ar fenotipiskajiem ZJT, visbiežāk rezistence tika atklāta pret **kapreomicīnu (37.75%)**, pirazinamīdu (34.55%), izoniazīdu (34.55%) un etionamīdu (33.33%), savukārt, visretāk pret **linezolīdu (1.01%)** un **delamanīdu (0.96%)**. Salīdzinājumam, pēc pieejamajiem datiem, ASV visbiežāk rezistence tiek konstatēta pret Izoniazīdu (9.3%).

Augstā kapreomicīna rezistences prevalence varētu būt saistīta ar to, ka rezistenci pret otrās rindas medikamentiem parasti nosaka pacientiem, kam jau ir atklāta rezistence pret pirmās rindas medikamentiem vai riska grupas pacientiem, kuri jau iepriekš ir saņēmuši anti-tuberkulozes terapiju vai pirmreizējā ārstēšana ir bijusi nesekmīga. Savukārt zemā rezistences prevalence pret Linezolīdu un jaunās paaudzes medikamentiem varētu tikt skaidrota ar to, ka šos medikamentus iesaka lietot tikai ekstensīvi rezistentas tuberkulozes (XDR-TB) ārstēšanai, sakarā ar toksiskajām blaknēm un nepieciešamo īpašo piesardzību darbojoties ar šiem medikamentiem.

Kaut arī rezistence pret jaunākās paaudzes medikamentiem – bedakvilīnu un delamanīdu ir aprakstīta dažādās valstīs, oficiāla statistika par to nav pieejams. Zināms, ka rezistence pret šiem medikamentiem tiek uzskatīta par iegūtu XDR-TB terapijas laikā. Arī

tuberkulozes un plaušu slimību klīnikā iegūtajos datos par 2018. gadu uzrādīts viens rezistences gadījums pret delamanīdu, taču ne pret bedahilīnu. (Silke et al. 2019)

Ir svarīgi apzināt visus pacientus, kuru klīniskajā materiālā konstatēta rezistence pret jebkuru no anti-tuberkulozes medikamentu, pielāgot šo pacientu terapiju, izvērtējot riskus un ieguvumus, cenšoties pēc iespējas ierobežot rezistences izplatību. Būtiski ir ievērot infekciju kontroles pasākumus, kā arī nodrošināt valstisku tuberkulozes izplatības kontroles stratēģiju, tiešu terapijas monitorēšanu rezistentas tuberkulozes izplatību, jo rezistentas tuberkulozes terapija saistīta ar garāku terapijas procesu un augstākām terapijas izmaksām.

5. Secinājumi

1. Ar *GeneXpert* no 3666 veiktajiem testiem tuberkulozes izraisīo baktēriju klātbūtne tika konstatēta 356 jeb 9.71 % paraugos, no kuriem 47 jeb 13.2% tika konstatēta rezistence pret rifampicīnu.
2. No 4089 fenotipisko ZJT noteikšanas testiem 849 jeb 20.76 % testos novērojama rezistence pret vismaz vienu no pirmās rindas, otrās rindas vai jaunās paaudzes medikamentiem.
3. No 2223 fenotipisko zāļu jutības testu rezultātiem pret pirmās rindas medikamentiem 543 paraugos jeb 24.42% tika konstatēta rezistence pret kādu no pirmās rindas medikamentiem.
4. No 1646 fenotipisko zāļu jutības testu rezultātiem pret otrās rindas medikamentiem 298 testos jeb 18.10% tika konstatēta rezistence pret kādu no otrās rindas medikamentiem.
5. No pirmās rindas medikamentiem visbiežāk rezistence tika atklāta pret izoniazīdu – 34.55% (n=767) un pirazinamīdu 34.55% (n=191). No otrās rinda medikamentiem visbiežāk rezistence tika konstatēta pret kapreomicīnu - 37% (n=204).
6. Ar *GeneXpert* noteiktā rifampicīna rezistences prevalence ir 13,2% (n=356), savukārt ar fenotipiskajām metodēm noteiktā – 17.35% (n=634).

Pateicības

Autore izsaka pateicību par atsaucību RAKUS “Tuberkulozes un plaušu slimību klīnika”, Latvijas Universitātes mikrobioloģijas laboratorijas darbiniekiem un Ivetai Līdumai par palīdzību un atbalstu visa diplomdarba sagatavošanas laikā.

Izmantotā literatūra

1. **Slimību profilakses un kontroles centrs** “Saslimstība Ar Tuberkulozi 1991.-2017. Gadā.” Iegūts no: [www.spkc.gov.lv/upload/Infekcijas slimības/Tuberkuloze/Datu vizualizācija/1_saslimstiba_2017.pdf](http://www.spkc.gov.lv/upload/Infekcijas_slimibas/Tuberkuloze/Datu_vizualizacija/1_saslimstiba_2017.pdf). [Skatīts 15.02.2019]
2. **Slimību Profilakses Un Kontroles Centrs** “Reģistrētie TB/HIV Gadījumi Latvijā, 1998.-2017. Gadā.” Iegūts no: [www.spkc.gov.lv/upload/Infekcijas slimības/Tuberkuloze/Datu vizualizācija/7_tb_hiv_2017.pdf](http://www.spkc.gov.lv/upload/Infekcijas_slimibas/Tuberkuloze/Datu_vizualizacija/7_tb_hiv_2017.pdf). [Skatīts 11.03.2019]
3. **Latvijas tuberkulozes un plaušu slimību asociācija**. Tuberkulozes klīniskās vadlīnijas. Iegūts no” <https://spkc.gov.lv/uploads/files/551a46dd7ceab.pdf> [Skatīts 25.01.2019]
4. **Armstrong, J. A.** “Phagosome-Lysosome Interactions in Cultured Macrophages Infected with Virulent Tubercle Bacilli. Reversal of the Usual Nonfusion Pattern and Observations on Bacterial Survival.” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 142, no. 1, 1975, lpp. 1–16.
5. **Arruda, S, et al.** “Cloning of an M. Tuberculosis DNA Fragment Associated with Entry and Survival inside Cells.” *Science*, vol. 261, no. 5127, 1993, lpp. 1454–1457.
6. **Banerjee, A, et al.** “InhA, a Gene Encoding a Target for Isoniazid and Ethionamide in Mycobacterium Tuberculosis.” *Science*, vol. 263, no. 5144, 1994, lpp. 227–230.
7. **Balows, A., Hausler, W.J.J., Ohashi, M., Turano, A.** “Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases Principles and Practice”. *Springer* 2013.
8. **Belanger, A. E., et al.** “The EmbAB Genes of Mycobacterium Avium Encode an Arabinosyl Transferase Involved in Cell Wall Arabinan Biosynthesis That Is the Target for the Antimycobacterial Drug Ethambutol.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 93, no. 21, 1996, lpp. 11919–11924.
9. **Bodmer, Thomas, and Angelika Ströhle.** “Diagnosing Pulmonary Tuberculosis with the Xpert MTB/RIF Test.” *Journal of Visualized Experiments*, no. 62, 2012.
10. **Boehme Catharine, Nabeta Pamela, Hillemann Doris, Nicol Mark P.P et al.** “Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance” *N Engl J Med* 2010;
11. **Brightbill, H. D.** “Host Defense Mechanisms Triggered by Microbial Lipoproteins Through Toll-Like Receptors.” *Science*, vol. 285, no. 5428, 1999, lpp. 732–736.
12. **Cambaup, E., et al.** “Selection of a GyrA Mutant of Mycobacterium Tuberculosis Resistant to Fluoroquinolones during Treatment with Ofloxacin.” *Journal of Infectious Diseases*, vol. 170, no. 2, 1994, lpp. 479–483.

13. **Cantrell, S. A., et al.** “Community-Wide Transmission of a Strain of Mycobacterium Tuberculosis That Causes Reduced Lung Pathology in Mice.” *Journal of Medical Microbiology*, vol. 57, no. 1, 2008, lpp. 21–27.
14. **Castranova, V., et al.** “The Alveolar Type II Epithelial Cell: A Multifunctional Pneumocyte.” *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 93, no. 3, 1988, lpp. 472–483.
15. **Champion, Patricia A. Diguseppe, and Jeffery S. Cox.** “Protein Secretion Systems in Mycobacteria.” *Cellular Microbiology*, vol. 9, no. 6, 2007, lpp. 1376–1384.
16. **Cole, Stewart T.** “Learning from the Genome Sequence of Mycobacterium Tuberculosis H37Rv.” *FEBS Letters*, vol. 452, no. 1-2, 1999, lpp. 7–10.
17. **Corbett, Elizabeth L, et al.** “Tuberculosis in Sub-Saharan Africa: Opportunities, Challenges, and Change in the Era of Antiretroviral Treatment.” *The Lancet*, vol. 367, no. 9514, 2006, lpp. 926–937.
18. “Correction for Pandey and Sasseti, Mycobacterial Persistence Requires the Utilization of Host Cholesterol.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, no. 26, 2008, lpp. 9130–9130.
19. **Cox, Jeffery S., et al.** “Complex Lipid Determines Tissue-Specific Replication of Mycobacterium Tuberculosis in Mice.” *Nature*, vol. 402, no. 6757, 1999, lpp. 79–83.
20. **Cruciani, M., et al.** “Meta-Analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without Solid Media, for Detection of Mycobacteria.” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 42, no. 5, 2004, lpp. 2321–2325.
21. **D’Amato, R.F., Isenberg, H.D. Heiferts et al.** “Collaborative feasibility study of a biphasic system (Roche Septi-Chek AFB) for rapid detection and isolation of mycobacteria” *Journal of Clinical Microbiology*, 29, 1719-22
22. **Diacon, Andreas H., et al.** “The Diarylquinoline TMC207 for Multidrug-Resistant Tuberculosis.” *New England Journal of Medicine*, vol. 360, no. 23, 2009, lpp. 2397–2405.
23. “Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 161, no. 4, 2000, lpp. 1376–1395.
24. **Divangahi, Maziar, et al.** “Mycobacterium Tuberculosis Evades Macrophage Defenses by Inhibiting Plasma Membrane Repair.” *Nature Immunology*, vol. 10, no. 8, 2009, lpp. 899–906.
25. **Dunphy, Kathleen Y., et al.** “Attenuation of Mycobacterium Tuberculosis Functionally Disrupted in a Fatty Acyl–Coenzyme A Synthetase Gene fadD5.” *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 201, no. 8, 2010, pp. 1232–1239.
26. **Ellner Jerrold.** “Tuberculosis.” *Goldman’s Cecil Medicine, 25th edition., Elsevier, 2016.*

27. **Ehrt, Sabine, and Dirk Schnappinger.** “Mycobacterial Survival Strategies in the Phagosome: Defence against Host Stresses.” *Cellular Microbiology*, vol. 11, no. 8, 2009, lpp. 1170–1178.
28. **Farrar, Jeremy.** *Tuberculosis in Adults and Children.* Springer International Publish, 2015.
29. **Forrellad, Marina Andrea, et al.** “Role of the Mce1 Transporter in the Lipid Homeostasis of Mycobacterium Tuberculosis.” *Tuberculosis*, vol. 94, no. 2, 2014, lpp. 170–177.
30. **Gengenbacher, Martin, and Stefan H.e. Kaufmann.** “Mycobacterium Tuberculosis: Success through Dormancy.” *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 36, no. 3, 2012, lpp. 514–532.
31. **Glickman, Michael S, et al.** “A Novel Mycolic Acid Cyclopropane Synthetase Is Required for Cording, Persistence, and Virulence of Mycobacterium Tuberculosis.” *Molecular Cell*, vol. 5, no. 4, 2000, lpp. 717–727.
32. **Groenen, Peter M. A., et al.** “Nature of DNA Polymorphism in the Direct Repeat Cluster of Mycobacterium Tuberculosis; Application for Strain Differentiation by a Novel Typing Method.” *Molecular Microbiology*, vol. 10, no. 5, 1993, lpp. 1057–1065.
33. **Gumbo, Tawanda, et al.** “Isoniazid’s Bactericidal Activity Ceases Because of the Emergence of Resistance, Not Depletion Of Mycobacterium Tuberculosis in the Log Phase of Growth.” *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 195, no. 2, 2007, lpp. 194–201.
34. “Handbook of Anti-Tuberculosis Agents.” *Tuberculosis*, vol. 88, no. 2, Mar. 2008, lpp. 85–170.
35. **Hoffmann, C., et al.** “Disclosure of the Mycobacterial Outer Membrane: Cryo-Electron Tomography and Vitreous Sections Reveal the Lipid Bilayer Structure.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, no. 10, 2008, lpp. 3963–3967.
36. **Horsburgh, C. Robert, and Eric J. Rubin.** “Latent Tuberculosis Infection in the United States.” *New England Journal of Medicine*, vol. 364, no. 15, 2011, lpp. 1441–1448.
37. **Honore, N, and S T Cole.** “Streptomycin Resistance in Mycobacteria.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 38, no. 2, 1994, lpp. 238–242.
38. **Isberg, Ralph R., and Stanley Falkow.** “A Single Genetic Locus Encoded by Yersinia Pseudotuberculosis Permits Invasion of Cultured Animal Cells by Escherichia Coli K-12.” *Nature*, vol. 317, no. 6034, 1985, lpp. 262–264.
39. **Kumar R., Singh B., Iqbali T.** “Comparison of Tuberculous meningitis in children with or without BCG scar” *International Journal of Medical Paediatrics and Oncology*, vol. 2, no. 4, 2016 lpp. 142-145.

40. **Maartens, Gary, et al.** “Miliary Tuberculosis: Rapid Diagnosis, Hematologic Abnormalities, and Outcome in 109 Treated Adults.” *The American Journal of Medicine*, vol. 89, no. 3, 1990, pp. 291–296.
41. **Mackowiak, P. A.** “An Immigrant with a Painful Swelling in His Back.” *Clinical Infectious Diseases*, vol. 44, no. 12, 2007, pp. 1615–1616.
42. **Pai Madhukar, Marcel Behr.** “Latent Mycobacterium Tuberculosis Infection and Interferon-Gamma Release Assays.” *Microbiology Spectrum*, vol. 4, no. 5, 2016.
43. **Manir, Madkour**, editor. *Tuberculosis*. Springer, 2004.
44. **Matteelli, Alberto, et al.** “Extensively Drug-Resistant Tuberculosis: Epidemiology and Management.” *Clinical Epidemiology*, 2014, p. 111.
45. **Mackowiak, P. A.** “An Immigrant with a Painful Swelling in His Back.” *Clinical Infectious Diseases*, vol. 44, no. 12, 2007, pp. 1615–1616.
46. **Mckinney, John D., et al.** “Persistence of Mycobacterium Tuberculosis in Macrophages and Mice Requires the Glyoxylate Shunt Enzyme Isocitrate Lyase.” *Nature*, vol. 406, no. 6797, 2000, pp. 735–738.
47. **Mcneil, M.r., and P.j. Brennan.** “Structure, Function and Biogenesis of the Cell Envelope of Mycobacteria in Relation to Bacterial Physiology, Pathogenesis and Drug Resistance; Some Thoughts and Possibilities Arising from Recent Structural Information.” *Research in Microbiology*, vol. 142, no. 4, 1991, pp. 451–463.
48. **Meintjes, Graeme, et al.** “Prednisone for the Prevention of Paradoxical Tuberculosis-Associated IRIS.” *New England Journal of Medicine*, vol. 379, no. 20, 2018, pp. 1915–1925.
49. **Miller, L P, et al.** “The RpoB Gene of Mycobacterium Tuberculosis.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 38, no. 4, 1994, pp. 805–811.
50. **Moreno, Javier Rangel, et al.** “The Role of Prostaglandin E2 in the Immunopathogenesis of Experimental Pulmonary Tuberculosis.” *Immunology*, vol. 106, no. 2, 2002, pp. 257–266.
51. **Nathan C, Shiloh MU.** “Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens” *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Aug 1;97(16):8841-8
52. **R. J. North, Yu-Jin Jung.** “Immunity to tuberculosis: review” *Annu Rev Immunol*. 2004; 22:599-623.
53. **Pablos-Méndez, Ariel, et al.** “Global Surveillance for Antituberculosis-Drug Resistance, 1994–1997.” *New England Journal of Medicine*, vol. 338, no. 23, 1998, pp. 1641–1649.
54. “Paediatric European Network for Treatment of AIDS Response to 2010 Revision of World Health Organization Recommendations on ‘Antiretroviral Therapy for HIV Infection in Infants and Children.’” *HIV Medicine*, vol. 12, no. 6, 2011, pp. 385–386.

55. **Pasaules veselības organizācija.** “Report on BCG vaccine use for protection against mycobacterial infections including tuberculosis, leprosy, and other nontuberculous mycobacteria (NTM) infections. 2017. Iegūts no https://www.who.int/immunization/sage/meetings/2017/october/1_BCG_report_revised_version_online.pdf [Skatīts 01.05.2019]
56. **Pasaules veselības organizācija.** “BCG Vaccine: WHO Position Paper, February 2018 – Recommendations.” *Vaccine*, vol. 36, no. 24, 2018, lpp. 3408–3410.
57. **Pasaules veselības organizācija.** “Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care, 2017 update.” Iegūts no <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255052/1/9789241550000-eng.pdf?ua=1> [Skatīts 28.04.2019]
58. **Pasaules veselības organizācija.** “Estimated tuberculosis (TB) cases and deaths, 2000-2017: Estimated mortality of TB cases (all forms, excluding HIV) per 100 000 population, 2017” Iegūts no: http://gamapserver.who.int/gho/interactive_charts/tb/cases/atlas.html [Skatīts 25.04.2010]
59. **Jean Pieters Laleh Majlessi et al.** “Inhibition of Phagosome Maturation by Mycobacteria Does Not Interfere with Presentation of Mycobacterial Antigens by MHC Molecules” *The Journal of Immunology*, 2007, 179: 1825–1833.
60. **Pfyffer, Gaby.** “Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures.” *Manual of Clinical Microbiology*, ASM Press, 2015.
61. **Pradipta, Ivan Surya, et al.** “Risk Factors of Multidrug-Resistant Tuberculosis: A Global Systematic Review and Meta-Analysis.” *Journal of Infection*, vol. 77, no. 6, 2018, lpp. 469–478.
62. **Prasad, Rajendra, and Dhiraj Kumar Srivastava.** “Multi Drug and Extensively Drug-Resistant TB (M/XDR-TB) Management: Current Issues.” *Clinical Epidemiology and Global Health*, vol. 1, no. 3, 2013, lpp. 124–128.
63. **Queiroz, Adriano, and Lee W. Riley.** “Bacterial Immunostat: Mycobacterium Tuberculosis Lipids and Their Role in the Host Immune Response.” *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, vol. 50, no. 1, 2017, lpp. 9–18.
64. **Ramakrishnan, L.** “Granuloma-Specific Expression of Mycobacterium Virulence Proteins from the Glycine-Rich PE-PGRS Family.” *Science*, vol. 288, no. 5470, 2000, lpp. 1436–1439.
65. **Ramaswamy, S., and J.m. Musser.** “Molecular Genetic Basis of Antimicrobial Agent Resistance InMycobacterium Tuberculosis: 1998 Update.” *Tubercle and Lung Disease*, vol. 79, no. 1, 1998, lpp. 3–29.

66. **Rao, Vivek, et al.** “Mycobacterium Tuberculosis Controls Host Innate Immune Activation through Cyclopropane Modification of a Glycolipid Effector Molecule.” *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 201, no. 4, 2005, lpp. 535–543.
67. **Rastogi, Nalin, and Hugo L. David.** “Mechanisms of Pathogenicity In Mycobacteria.” *Biochimie*, vol. 70, no. 8, 1988, lpp. 1101–1120.
68. **Hanna, B A.** “Diagnosis of Tuberculosis by Microbiologic Techniques Tuberculosis.” *Tuberculosis*, by William N. Rom and Stuart M. Garay, Little, Brown, 1995.
69. **Hussain SF, Irfan M, Abbasi M, Anwer SS, Davidson S, Haqgee R, Khan JA, Islam M.** “Clinical characteristics of 110 miliary tuberculosis patients from a low HIV prevalence country.” *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004 Apr;8(4):493-9
70. **Rozwarski, D. A.** “Modification of the NADH of the Isoniazid Target (InhA) from Mycobacterium Tuberculosis.” *Science*, vol. 279, no. 5347, 1998, lpp. 98–102.
71. **Scorpio, A, et al.** “Characterization of PncA Mutations in Pyrazinamide-Resistant Mycobacterium Tuberculosis.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 41, no. 3, 1997, lpp. 540–543.
72. **Scorpio, Angelo, and Ying Zhang.** “Mutations in PncA, a Gene Encoding Pyrazinamidase/Nicotinamidase, Cause Resistance to the Antituberculous Drug Pyrazinamide in Tubercle Bacillus.” *Nature Medicine*, vol. 2, no. 6, 1996, lpp. 662–667.
73. **Segal, W.** “Comparative Study of in Vivo and in Vitro Grown Mycobacterium Tuberculosis. IV. Immunogenic Differentiation.” *Experimental Biology and Medicine*, vol. 118, no. 1, 1965, lpp. 214–218.
74. **Sepkowitz, K. A.** “How Contagious Is Tuberculosis?” *Clinical Infectious Diseases*, vol. 23, no. 5, 1996, lpp. 954–962.
75. **Smith, I.** “Mycobacterium Tuberculosis Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence.” *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 16, no. 3, 2003, lpp. 463–496.
76. **Silke, Polsfuss et al.** “Emergence of Low-Level Delamanid and Bedaquiline Resistance During Extremely Drug-Resistant Tuberculosis Treatment.” *Clinical Infectious Diseases*, 2019.
77. **Sommers, H. M.** “The Identification of Mycobacteria.” *Laboratory Medicine*, vol. 9, no. 2, 1978, lpp. 34–44.
78. **Soolingen, D. Van, et al.** “A Novel Pathogenic Taxon of the Mycobacterium Tuberculosis Complex, Canetti: Characterization of an Exceptional Isolate from Africa.” *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 47, no. 4, 1997, lpp. 1236–1245.
79. **Strydom, K., et al.** “Comparison of Three Commercial Molecular Assays for Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance among Mycobacterium Tuberculosis Isolates in a High-

- HIV-Prevalence Setting: TABLE 1.” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 53, no. 9, 2015, pp. 3032–3034.
80. *Targeted Tuberculin Testing and Treatment of Latent Tuberculosis Infection*. U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2000.
 81. **Telenti, A, et al.** “Direct, Automated Detection of Rifampin-Resistant Mycobacterium Tuberculosis by Polymerase Chain Reaction and Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 37, no. 10, 1993, pp. 2054–2058.
 82. **Tortoli, E, et al.** “Use of BACTEC MGIT 960 for Recovery of Mycobacteria from Clinical Specimens: Multicenter Study.” *Journal of Clinical Microbiology*, Nov. 1999.
 83. “The Role of BCG Vaccine in the Prevention and Control of Tuberculosis in the United States: A Joint Statement by the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis and the Advisory Committee on Immunization Practices.” *PsycEXTRA Dataset*, 1996.
 84. **Tostmann, Alma, et al.** “Tuberculosis Transmission by Patients with Smear-Negative Pulmonary Tuberculosis in a Large Cohort in The Netherlands.” *Clinical Infectious Diseases*, vol. 47, no. 9, 2008, pp. 1135–1142.
 85. **Tung-Yiu, Eric Leung.** “Molecular Epidemiology and Isoniazid Resistance Mechanism in Mycobacterium Tuberculosis.” 2018.
 86. **Uchida, Yujiro, et al.** “Accelerated Immunopathological Response of Mice Infected with Mycobacterium Tuberculosis Disrupted in the mce1 Operon Negative Transcriptional Regulator.” *Cellular Microbiology*, vol. 9, no. 5, 2007, pp. 1275–1283.
 87. “Updated Guidelines for the Use of Nucleic Acid Amplification Tests in the Diagnosis of Tuberculosis.” *Jama*, vol. 301, no. 10, 2009, pp. 1014.
 88. **van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, Pierson J, Brenner M, Peters PJ** “M. tuberculosis and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells.” *Cell*. 2007 Jun 29;129(7):1287-98.
 89. **Vergne Isabelle, et al.** “Autophagy in Immune Defense Against Mycobacterium Tuberculosis.” *Autophagy*, vol. 2, no. 3, 2006, pp. 175–178.
 90. **Vilchèze, Catherine, et al.** “Transfer of a Point Mutation in Mycobacterium Tuberculosis InhA Resolves the Target of Isoniazid.” *Nature Medicine*, vol. 12, no. 9, 2006, pp. 1027–1029.
 91. **Vilchèze C, Weinrick B, Wong KW, Chen B, Jacobs WR Jr.** “NAD⁺ auxotrophy is bacteriocidal for the tubercle bacilli.” *Mol Microbiol*. 2010;76(2):365–377.
 92. **Voulhoux, R.** “Involvement of the Twin-Arginine Translocation System in Protein Secretion via the Type II Pathway.” *The EMBO Journal*, vol. 20, no. 23, 2001, pp. 6735–6741.

93. **Wel, Nicole Van Der, et al.** “M. Tuberculosis and M. Leprae Translocate from the Phagolysosome to the Cytosol in Myeloid Cells.” *Cell*, vol. 129, no. 7, 2007, lpp. 1287–1298.
94. **Weyer, Karin, et al.** “Rapid Molecular TB Diagnosis: Evidence, Policy Making and Global Implementation of Xpert MTB/RIF.” *European Respiratory Journal*, vol. 42, no. 1, 2012, lpp. 252–271.
95. **Wright, Abigail, et al.** “Epidemiology of Antituberculosis Drug Resistance 2002–07: an Updated Analysis of the Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance.” *The Lancet*, vol. 373, no. 9678, 2009, lpp. 1861–1873.
96. **Yari, Mehran, et al.** “Assessing Relation between Sputum Smear Grading in Positive Pulmonary Tuberculosis Patients with Treatment Outcome.” *Pajouhan Scientific Journal*, vol. 14, no. 4, 2016, lpp. 1–7.
97. **Yates, Robin M., et al.** “The Kinetics of Phagosome Maturation as a Function of Phagosome/Lysosome Fusion and Acquisition of Hydrolytic Activity.” *Traffic*, vol. 6, no. 5, 2005, lpp. 413–420.
98. **Yuan, Ying, et al.** “The Effect of Oxygenated Mycolic Acid Composition on Cell Wall Function and Macrophage Growth in Mycobacterium Tuberculosis.” *Molecular Microbiology*, vol. 29, no. 6, 1998, lpp. 1449–1458.
99. **Zhang, Ying.** “The Magic Bullets And Tuberculosis Drug Targets.” *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 45, no. 1, 2005, lpp. 529–564.
100. **Zumla, Alimuddin, et al.** “The WHO 2014 Global Tuberculosis Report—Further to Go.” *The Lancet Global Health*, vol. 3, no. 1, 2015, doi:10.1016/s2214-109x(14)70361-4.