

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

dr Irena S. Arandžević

Vrste, filogenetske karakteristike i
genetička osnova rezistencije
multirezistentnih sojeva *Mycobacterium*
tuberculosis kompleksa izolovanih u Srbiji

Doktorska disertacija

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

dr Irena S. Arandjelović

Species, phylogenetic lineages and genetic
basis of resistance in multidrug-resistant
Mycobacterium tuberculosis complex
strains isolated in Serbia

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

Mentor:

prof. dr Dragana Vuković, profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Komisija u sastavu:

prof. dr Ivana Dakić, profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

prof. dr Vesna Škodrić-Trifunović, profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

prof. dr Branislava Savić, profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

prof. dr Dejan Krnjaić, profesor Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

prof. dr Lidija Ristić, profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu

Datum odbrane doktorske disertacije:_____

Mojoj porodici

ZAHVALNOST

Doktorska disertacija „Vrste, filogenetske karakteristike i genetička osnova rezistencije multirezistentnih sojeva Mycobacterium tuberculosis kompleksa izolovanih u Srbiji“ urađena je na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i u laboratoriji Molecular Mycobacteriology Group, Forschungszentrum Borstel, Nemačka. Svoj intelektualni i drugi doprinos u procesu izrade ove disertacije nesebično je dalo više osoba, kojima ovom prilikom izražavam duboku zahvalnost.

Mentoru, prof. dr Dragani Vuković, zahvaljujem na želji i entuzijazmu da prvobitna ideja o ovoj disertaciji bude ispunjena u potpunosti, kao i poverenju sa kojim me prvi put poslala u Borstel. Hvala na strpljenju, vremenu, savetima i svim naporima koje je uložila, kako tokom izrade ove teze, tako i tokom pisanja naučnih radova, kako bih naučila da naučni problem sagledam kao celinu čiji svaki deo nosi jedinstvenu poruku. Beskrajno hvala na sugestijama kako da postanem dobar predavač i nastavnik i kako da razumem mikrobiologiju na pravi način.

Prof. Dr. Stefan Niemann zahvaljujem na pozivu i spremnosti da me uključi u rad laboratorije kojom rukovodi i jedinstvenoj prilici da od najboljih naučim metodologiju klasičnih tehnika genotipizacije i sekvenciranja genoma. Prof. Dr. Thierry Wirth zahvaljujem na nesebičnoj pomoći u vezi sa procenom evolutivne starosti TUR klastera. Posebno hvala Matthias Merker na vremenu i strpljenju koje je izdvojio da zajedno analiziramo rezultate sekvenciranja genoma, konstruktivnim diskusijama i neumornom optimizmu. Veliko hvala Thomas Kohl na pomoći u optimizaciji DNK za sekvenciranje genoma i izdvajanju SNP. Hvala lab. teh. Julia Zallet, Tanja Uben i Tanja Struve Sonnenschein, koje su me naučile da se i komplikovano sekvenciranje genoma može izvoditi sa osmehom na licu.

Prof. dr Branislavi Savić hvala na prilici da budem deo njenog tima i velikoj podršci u svim segmentima profesionalnog rada.

Prof. dr Ivani Dakić, prof. dr Lidiji Ristić, prof. dr Vesni Škodrić-Trifunović i prof. dr Dejanu Krnjaiću, članovima Komisije, najiskrenije se zahvaljujem na konkretnim sugestijama i savetima koji su doprineli konačnom oblikovanju ove disertacije.

Dr Radmili Ćurčić, beskrajno hvala na dragocenom vremenu koje je izdvojila da mi pomogne u pretraživanju Nacionalne baze obolelih od MDR TB i ogromnoj podršci koju mi je pružala tokom svih dana našeg zajedničkog „detektivskog“ rada. Zahvaljujem se dr Ljiljani Ušan-Miličković na ljubaznosti i pomoći tokom pretrage medicinske dokumentacije pacijenata hospitalizovanih u Specijalnoj bolnici za plućne bolesti „Budislav Babić“ Bela Crkva.

Dr Gordani Stefanović, dr Ljiljani Tomić, dr Bojani Luković i laboratorijskom osoblju Nacionalne Referentne Laboratorije za tuberkulozu Srbije zahvaljujem na izuzetnoj stručnoj saradnji i pomoći tokom pripreme bakterijskih kultura za molekularnu identifikaciju. Posebno hvala lab. teh. Zorici Marinković, za nesebičnu pomoć tokom pripreme kultura za postupak izolovanja genomske DNK.

Prof. dr Aleksandri Knežević zahvaljujem na velikom trudu koji je uložila da mi pomogne tokom optimizacije protokola za izolovanje genomske DNK sojeva M. tuberculosis. Veliko hvala asist. dr Ivanu Soldatoviću, koji je sve moje ideje uspeo da pretvori u statističke analize.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici, onima koji me iskreno vole i svim srcem veruju u mene. Mama i tata, hvala na upornosti sa kojom ste me usmeravali ka pravim vrednostima, bezbrižnosti koju i dalje nosim i beskrajnoj ljubavi koja će me zauvek čuvati. Mom Vladi, hvala što je uvek uz mene, uvek ima rešenje za nerešivo i daje sve od sebe da neprestano budem nasmejana. Igoru, Jovani i Davidu, hvala na nepresušnoj pozitivnoj energiji i neverovatnoj podršci. Hvala što ćete biti ponosni i znati da je posveta doktorske disertacije samo pokušaj da vam skromno uzvratim za sve što činite za mene.

Vrste, filogenetske karakteristike i genetička osnova rezistencije multirezistentnih sojeva *Mycobacterium tuberculosis* kompleksa izolovanih u Srbiji

Rezime

Jedan od najvećih problema sa kojim se suočavaju programi kontrole tuberkuloze (TB) je širenje multirezistentnih (MDR) sojeva *Mycobacterium tuberculosis* kompleksa (MTK), odnosno sojeva rezistentnih najmanje na rifampicin i izoniazid, dva najvažnija antituberkulotika (ATL). Molekularno genetička karakterizacija MDR sojeva MTK prisutnih u datoj populaciji predstavlja važan korak u uspostavljanju adekvatnih mera kontrole MDR TB, ali ciljana istraživanja genoma MDR sojeva izolovanih u Srbiji do sada nisu rađena. Stoga su ovim istraživanjem obuhvaćeni svi MDR sojevi MTK izolovani u Srbiji tokom poslednjih šest godina i izvršena je molekularna identifikacija do nivoa vrste, genotipizacija izolata u cilju sagledavanja njihove filogenetske strukture i karakteristika transmisije, kao i detekcija mutacija odgovornih za rezistenciju na ATL. Za istraživanje su formirane dve kolekcije sojeva: svi MDR sojevi MTK izolovani u Srbiji u periodu 01.01.2008.-31.05.2014. godina (115 sojeva) i svi sojevi MTK izolovani od pacijenata obolelih od plućne TB u Srbiji tokom perioda 01.12.2010.-30.11.2011. godina (971 soj). Molekularna identifikacija ispitivanih sojeva MTK izvršena je primenom komercijalnog eseja zasnovanog na reakciji reverzne hibridizacije. Za genotipizaciju MDR sojeva MTK korišćene su konvencionalne tehnike spoligotipizacija i MIRU-VNTR tipizacija, a sekvenciranje genoma nove generacije (NGS) izvršeno je na Illumina MiSeq sekvencatoru, tehnikom sekvenciranja putem sinteze i reverzibilnih terminatora. Klasteri MDR sojeva MTK identifikovani primenom klasičnih tehnika genotipizacije definisani su kao grupe od najmanje dva soja sa identičnim genotipovima, a klasteri definisani na osnovu rezultata NGS kao grupe sojeva čiji su se genomi razlikovali u ≤ 12 polimorfizama pojedinačnih nukleotida (SNP). Identifikacija faktora rizika za transmisiju MDR TB u Srbiji izvedena je na osnovu poređenja demografskih, kliničkih, epidemioloških i laboratorijskih karakteristika pacijenata čiji su izolati bili svrstani u klastere i pacijenata čiji su MDR sojevi imali jedinstvene genotipove. Izvršena je sveobuhvatna analiza rezultata sekvenciranja gena koji se smatraju ključnim za rezistenciju na ATL prve i druge linije. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da svi ispitivani MDR sojevi pripadaju vrsti *M. tuberculosis* i da ne postoji razlika u profilima vrsta MTK koje izazivaju TB i MDR TB

u Srbiji. Ispitivani MDR sojevi su na osnovu rezultata genotipizacije klasifikovani u šest genotipova, odnosno TUR, Clade 1, Haarlem, Beijing, S i Ural. S obzirom na to da je čak 36,1% izolata pripadalo genotipu TUR, pokazano je da je ključna filogenetska linija za širenje MDR TB u Srbiji TUR, što je jedinstven nalaz za sojeve ovog genotipa na globalnom nivou. Ustanovljeno je da je 66,7% ispitivanih MDR sojeva bilo grupisano u 11 klastera, pri čemu je preko 50% sojeva grupisanih u klastere pripadalo TUR genotipu. Step en grupisanja ispitivanih MDR sojeva u klastere iznosio je 56,5%, što je jasan pokazatelj suboptimalne kontrole širenja MDR TB u našoj zemlji. Ključni model transmisije MDR TB u Srbiji je intrahospitalna transmisija, a shizofrenija kao komorbiditet i hospitalizacija u Specijalnoj bolnici za plućne bolesti „Budislav Babić“ Bela Crkva identifikovani su kao faktori rizika za aktivnu transmisiju MDR TB. Detektovano je ukupno 170 mutacija u 33 gena povezana sa rezistencijom na ATL prve i druge linije i ustanovljeni su molekularni markeri rezistencije na ATL za MDR sojeve MTK izolovane u Srbiji. Mutacije najviših učestalosti bile su S450L *rpoB*, S315T *katG*, Q497R *embB*, K43R *rpsL*, V7G *pncA* i A576T *embA*. Pokazano je da čak 12 detektovanih mutacija rezistencije ne utiče negativno na sposobnost transmisije ispitivanih MDR sojeva. U genomima 82% MDR sojeva svrstanih u klastere dokazane su kompenzatorne mutacije *rpoA* i *rpoC* gena, što je dodatna potvrda velike sposobnosti transmisije MDR sojeva MTK prisutnih u Srbiji. Analizom evolucije klastera TUR izolata pokazano je da je ancestralni TUR soj imao *katG* S315T, *rpsL* K43R, *embB* Q497R, *embA* A576T i *gyrA* V742L mutacije. Ovaj pre-MDR TUR ancestor evoluirao je u dve grane, uzastopnim sticanjem multiplih SNP u genima rezistencije i kompenzatornih SNP u *rpoA* i *rpoC* genima. Procenjeno je da zajednički ancestor sojeva jedne grane TUR klastera datira iz 1992. godine, a druge grane iz 2002. godine. Rezultati ovog istraživanja, pre svega izuzetno visok step en aktivne transmisije MDR sojeva *M. tuberculosis*, utvrđeni putevi transmisije i otkrivanje molekularne osnove rezistencije na ATL, predstavljaju korisne smernice za uspostavljanje adekvatnih mera za uspešnu kontrolu transmisije MDR TB u Srbiji.

Ključne reči: *Mycobacterium tuberculosis* kompleks, multirezistentna tuberkuloza, filogenetska struktura, antituberkulotici, rezistencija

Naučna oblast: medicina

Species, phylogenetic lineages and genetic basis of resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex strains isolated in Serbia

Abstract

The spread of multidrug-resistant (MDR) *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) strains, defined as resistant to at least the two most important antituberculous drugs isoniazid and rifampicin, is a major threat for tuberculosis (TB) control programmes. Molecular genetic characterization of MDR MTBC strains circulating in a population is essential to guide establishment of efficient MDR TB control strategies, but no such analysis of MDR MTBC strains isolated in Serbia has been performed so far. Therefore, this research included a representative collection of MDR MTBC strains isolated in Serbia, and molecular identification to the species level, comprehensive genotyping, and detection of mutations in genes conferring resistance to the first- and second-line anti-TB drugs were performed.

The research included two collections of MTBC strains: all MDR MTBC strains isolated in Serbia from January 1st 2008 to May 31st 2014 (115 strains), and all MTBC strains isolated from patients diagnosed with pulmonary TB in Serbia from December 1st 2010 to November 30th 2011 (971 strains). Molecular identification of all MTBC strains was performed by using a commercial assay based on reverse hybridization. Spoligotyping and MIRU-VNTR methods were used as classical genotyping techniques, while next generation sequencing (NGS) by synthesis and reversible terminators was performed using the Illumina MiSeq sequencer. In classical genotyping analyses, a cluster was defined as a minimum of two strains harbouring identical genotype pattern. Genomic clusters were defined where no more than 12 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) separated a patient isolate from that of at least one other patient in the cluster. Risk factors for active transmission of MDR TB in Serbia were identified by comparison of demographic, clinical, epidemiologic, and laboratory characteristics of patients whose strains were grouped in clusters and patients whose strains exhibited unique genotypes. Comprehensive analysis of mutations detected in genes associated with resistance to anti-TB drugs was performed.

All MTBC strains analysed in this research were identified as *M. tuberculosis* species, which clearly shows that causative agents of TB and MDR TB in Serbia have identical species profile. NGS analysis revealed a presence of six genotypes among MDR MTBC

strains, namely TUR, Clade 1, Beijing, Haarlem, S, and Ural. Since as much as 36.1% of all MDR isolates were classified as TUR lineage, it is obvious that TUR genotype is crucial for MDR TB transmission in Serbia. Such association between the TUR genotype and transmission of MDR TB has not been previously described. A total of 66.7% of MDR strains were grouped into 11 clusters, while more than 50% of the clustered isolates belonged to the TUR genotype. The clustering rate of 56.5% clearly indicates suboptimal control of MDR TB transmission in our country. Nosocomial transmission was established as the key mode of MDR TB transmission in Serbia, while schizophrenia as a comorbidity and hospitalization in Special hospital for pulmonary diseases „Budislav Babić“ Bela Crkva were identified as risk factors for active transmission of MDR TB. We detected 170 mutations in 33 genes associated with resistance to the first- and second-line anti-TB drugs, and identified molecular markers of resistance in MDR MTBC strains isolated in Serbia. The most frequent resistance mutations in MDR MTBC strains investigated were S450L *rpoB*, S315T *katG*, Q497R *embB*, K43R *rpsL*, V7G *pncA*, and A576T *embA*. Our results showed that 12 resistance mutations do not interfere with transmission of MDR MTBC strains isolated in Serbia. Compensatory mutations in *rpoA* and *rpoC* genes were detected in genomes of 82% clustered MDR isolates, thus confirming a great transmissibility of MDR MTBC strains circulating in Serbia. The evolutionary analysis of the TUR cluster showed that ancestral TUR isolate was characterized by *katG* S315T, *rpsL* K43R, *embB* Q497R, *embA* A576T and *gyrA* V742L mutations. This pre-MDR strain further evolved into two branches by consecutive acquiring of multiple resistance and compensatory mutations. It was estimated that common ancestors of MDR strains that belong to the two descendant branches date from 1992, and 2002, respectively.

Results of this research, in particular high level of active MDR TB transmission, recognized transmission routes, and detection of molecular basis of resistance to anti-TB drugs, are useful guidelines for establishment of appropriate control measures in order to successfully prevent transmission of MDR TB in Serbia.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis* complex, multidrug-resistant tuberculosis, phylogenetic structure, antituberculosis drugs, resistance

Scientific field: medicine

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Patogeneza TB	2
1.2. Epidemiologija TB	4
1.2.1. Epidemiologija i značaj MDR TB	5
1.3. Laboratorijska dijagnostika TB.....	7
1.3.1. Molekularna identifikacija sojeva MTK do nivoa vrste/podvrste	9
1.4. Osnovne karakteristike bakterija roda <i>Mycobacterium</i>	10
1.5. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleks	11
1.5.1. <i>M. tuberculosis</i> sensu stricto	12
1.5.2. <i>M. africanum</i>	13
1.5.3. <i>M. bovis</i>	13
1.5.4. <i>M. bovis</i> BCG.....	14
1.5.5. <i>M. canettii</i>	15
1.5.6. <i>M. caprae</i>	16
1.5.7. <i>M. microti</i>	16
1.5.8. <i>M. orygis</i>	17
1.5.9. <i>M. pinnipedii</i>	17
1.5.10. <i>M. mungi</i>	18
1.5.11. <i>M. suricattae</i>	18
1.5.12. Bacil šimpanzi.....	18
1.6. Genom sojeva MTK.....	19
1.6.1. DNK polimorfizmi u genomu sojeva MTK	20
1.6.1.1. Mobilni genski elementi.....	20
1.6.1.1.1. Polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata insercije	

<i>sekvence IS6110</i>	21
1.6.1.2. <i>Ponavljane DNK sekvence</i>	22
1.6.1.2.1. <i>CRISPRs (eng. clustered regularly interspaced short palindromic repeats)</i>	22
1.6.1.2.1.1. <i>Spejser oligonukleotid tipizacija</i>	23
1.6.1.2.2. <i>Minisatelitske sekvence</i>	24
1.6.1.2.2.1. <i>MIRU-VNTR (eng. mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat)</i>	25
1.6.1.3. <i>Polimorfizmi velikih sekvenci (LSP)</i>	26
1.6.1.4. <i>Polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (SNP)</i>	27
1.6.1.4.1. <i>Prednosti SNP u odnosu na druge molekularne markere u genomu sojeva MTK u molekularno epidemiološkim studijama</i>	28
1.6.1.4.2. <i>NGS</i>	30
1.6.1.4.3. <i>Illumina platforma za sekvenciranje genoma</i>	31
1.7. <i>Značaj genotipizacije sojeva MTK</i>	33
1.7.1. <i>Različiti aspekti primene NGS u ispitivanju genomskog diverziteta MTK</i>	34
1.7.2. <i>Filogeografska populaciona struktura MTK</i>	37
1.7.3. <i>Evolucija MTK</i>	39
1.7.3.1. <i>Evolutivni scenario I</i>	39
1.7.3.2. <i>Evolutivni scenario II</i>	39
1.7.3.3. <i>Evolutivni scenario III</i>	41
1.7.3.4. <i>Evolutivni scenario IV</i>	42
1.8. <i>Rezistencija sojeva MTK na antituberkulotike</i>	43
1.8.1. <i>Molekularni mehanizmi rezistencije na antituberkulotike prve linije</i>	45
1.8.1.1. <i>Rifampicin</i>	45
1.8.1.2. <i>Isoniazid</i>	46

1.8.1.3. Streptomycin	47
1.8.1.4. Etambutol	48
1.8.1.5. Pirazinamid	49
1.8.2. Molekularni mehanizmi rezistencije na antituberkulotike druge linije	49
1.8.2.1. Fluorohinoloni	49
1.8.2.2. Etionamid, protionamid i tioamidi	50
1.8.2.3. Para-aminosalicilna kiselina	51
1.8.2.4. Aminoglikozidi i ciklični peptidi	52
1.8.2.5. Cikloserin	53
1.8.3. Molekularni mehanizmi rezistencije na antituberkulotike treće linije	53
1.8.3.1. Linezolid	53
1.8.4. „Fitnes“ sojeva MTK koji nose mutacije u genima povezanim sa rezistencijom na antituberkulotike	53
1.9. TB i MDR TB u Srbiji	56
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	60
3. MATERIJAL I METODE	62
3.1. Studijska populacija pacijenata	63
3.2. Kolekcije MTK izolata	64
3.3. Molekularna identifikacija MTK izolata	65
3.3.1. Ekstrakcija DNK sojeva MTK	65
3.3.2. Amplifikacija DNK sojeva MTK primenom multipleks PCR reakcije	66
3.3.3. Reverzna hibridizacija PCR produkata	66
3.4. Genotipizacija MDR sojeva MTK primenom konvencionalnih tehnika genotipizacije	67
3.4.1. Ekstrakcija DNK MDR sojeva MTK.....	68
3.4.2. Spoligotipizacija MDR sojeva MTK	69

3.4.2.1. PCR	69
3.4.2.2. Hibridizacija	69
3.4.3. MIRU-VNTR genotipizacija MDR sojeva MTK	72
3.4.3.1. PCR	72
3.4.3.2. Priprema PCR produkata za kapilarnu elektroforezu	72
3.4.3.3. Kapilarna elektroforeza	73
3.4.4. Analiza rezultata spoligotipizacije i MIRU-VNTR genotipizacije	73
3.4.4.1. Konstruisanje filogenetskog stabla na osnovu rezultata spoligotipizacije i MIRU-VNTR genotipizacije	73
3.4.4.2. Definisanje klastera na osnovu rezultata spoligotipizacije i MIRU-VNTR genotipizacije	74
3.5. Genotipizacija sekvenciranjem genoma MDR sojeva MTK	74
3.5.1. Tagmentacija DNK	75
3.5.2. PCR	75
3.5.3. Prečišćavanje PCR produkata	76
3.5.4. Normalizacija Nextera XT biblioteka	77
3.5.5. Postavljanje biblioteka u Illumina MiSeq sekvenator	77
3.5.6. Analize rezultata sekvenciranja	78
3.5.6.1. Mapiranje sekvenci genoma MDR sojeva MTK	78
3.5.6.2. Pokrivenost genoma MDR sojeva MTK	78
3.5.6.3. Identifikacija SNP	78
3.5.6.4. Konstruisanje filogenetskih stabala na osnovu profila SNP	79
3.5.6.5. Definisanje klastera na osnovu rezultata NGS	79
3.5.6.6. Procena evolutivne starosti NGS klastera	79
3.6. Tumačenje rezultata genotipizacije u kontekstu transmisije MDR sojeva MTK	80
3.7. Ispitivanje genetičke osnove rezistencije na antituberkulotike prve i druge linije	

kod MDR sojeva MTK	80
3.8. Statistička analiza podataka	82
4. REZULTATI.....	83
4.1. Identifikacija vrsta MTK izazivača MDR TB i TB u populaciji u Srbiji	84
4.2. Filogenetska struktura MDR sojeva MTB	85
4.2.1. Filogenetska struktura MDR sojeva MTB na osnovu rezultata spoligotipizacije i MIRU-VNTR	85
4.2.2. Filogenetska struktura MDR sojeva MTB na osnovu rezultata NGS	89
4.3. Tumačenje rezultata klasičnih tehnika genotipizacije i NGS u kontekstu karakteristika transmisije lokalnih MDR sojeva MTB	93
4.3.1. Grupisanje MDR sojeva MTB u klastere na osnovu rezultata spoligotipizacije i MIRU/VNTR genotipizacije	93
4.3.2. Grupisanje MDR sojeva MTB u klastere na osnovu rezultata NGS	95
4.3.3. Karakteristike ispitivane populacije pacijenata	100
4.3.4. Udruženost genotipova MDR sojeva MTB i karakteristika pacijenata	102
4.3.5. Epidemiološke veze između pacijenata iz čijih uzoraka su izolovani MDR sojevi MTB grupisani u klasterima i oblici transmisije MDR TB u Srbiji	105
4.3.6. Faktori rizika za transmisiju MDR sojeva MTB u Srbiji	111
4.4. Genetička osnova rezistencije MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji na ATL prve i druge linije	113
4.4.1. Fenotipski profili osetljivosti MDR sojeva MTB u Srbiji	113
4.4.2. Mutacije u genomima MDR sojeva MTB povezane sa rezistencijom na ATL	116
4.4.3. Korelacija ustanovljenih genotipova rezistencije i filogenetskih genotipova MDR sojeva MTB	118
4.4.4. Filogenetski informativni SNP detektovani u genima povezanim sa rezistencijom na ATL MDR sojeva MTB	120

4.4.5. Mutacije gena povezanih sa rezistencijom na ATL prve linije kod MDR sojeva MTB	122
4.4.5.1. Mutacije gena povezanih sa rezistencijom na R	122
4.4.5.2. Kompenzatorne mutacije u okviru <i>rpoC</i> i <i>rpoA</i> gena.....	122
4.4.5.3. Mutacije gena povezanih sa rezistencijom na I.....	123
4.4.5.4. Mutacije gena povezanih sa rezistencijom na S.....	125
4.4.5.5. Mutacije gena povezanih sa rezistencijom na E	126
4.4.5.6. Mutacije gena povezanih sa rezistencijom na Z.....	128
4.4.6. Mutacije gena povezanih sa rezistencijom na ATL druge linije kod MDR sojeva MTB	130
4.4.6.1. Mutacije gena povezanih sa rezistencijom na FLQ	130
4.4.6.2. Mutacije gena povezanih sa rezistencijom na ETH	131
4.4.6.3. Mutacije gena povezanih sa rezistencijom na PAS	133
4.4.6.4. Mutacije gena povezanih sa rezistencijom na AM, KM i CM	133
4.4.6.5. Mutacije gena povezanih sa rezistencijom na CS i linezolid	134
4.4.7. Udruženost filogenetskih genotipova sa pojedinačnim mutacijama u genima rezistencije MDR sojeva MTB	134
4.4.8. Genotipski i fenotipski profili rezistencije na ATL MDR sojeva MTB svrstanih u klastere	135
4.4.8.1. Genotipski profili rezistencije MDR sojeva MTB grupisanih u Beijing klasterima	136
4.4.8.2. Genotipski profili rezistencije MDR sojeva MTB grupisanih u S klaster	137
4.4.8.3. Genotipski profili rezistencije MDR sojeva MTB grupisanih u Haarlem klasterima	138
4.4.8.4. Genotipski profili rezistencije MDR sojeva MTB grupisanih u Clade 1 klasterima	140

4.4.8.5. Genotipski profili rezistencije MDR sojeva MTB grupisanih u Ural klaster	140
4.4.8.6. Genotipski profili rezistencije MDR sojeva MTB grupisanih u TUR klaster	141
4.4.8.6.1. Evolucija TUR klastera MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji	144
4.4.8.6.2. Procena evolutivne starosti TUR klastera MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji.....	146
4.4.8.6.3. Mogući uzroci klonske ekspanzije MDR sojeva MTB TUR genotipa u Srbiji	148
4.4.9. Procena sposobnosti transmisije MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji...	149
5. DISKUSIJA.....	153
5.1. Vrste/podvrste MTK kao uzročnici MDR TB u populaciji u Srbiji	155
5.2. Filogenetska struktura MDR sojeva MTB u Srbiji	160
5.2.1. TUR genotip MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji.....	161
5.2.2. Clade 1 grupa genotipova MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji	163
5.2.3. Haarlem genotip MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji	166
5.2.4. Beijing genotip MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji	167
5.2.5. S genotip MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji.....	171
5.2.6. Ural genotip MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji.....	171
5.3. Karakteristike transmisije MDR sojeva MTB u Srbiji	173
5.4. Genetička osnova rezistencije MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji	183
5.4.1. Fenotipski profili rezistencije MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji	183
5.4.2. Genotipski profili rezistencije MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji	188
5.4.2.1. Genetička osnova rezistencije na R kod MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji	189
5.4.2.2. Genetička osnova rezistencije na I kod MDR sojeva MTB izolovanih u	

Srbiji	190
5.4.2.3. <i>Genetička osnova rezistencije na S kod MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji</i>	191
5.4.2.4. <i>Genetička osnova rezistencije na E kod MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji</i>	193
5.4.2.5. <i>Genetička osnova rezistencije na Z kod MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji</i>	195
5.4.2.6. <i>Genetička osnova rezistencije na FLQ kod MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji</i>	196
5.4.2.7. <i>Genetička osnova rezistencije na ETH kod MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji</i>	198
5.4.2.8. <i>Genetička osnova rezistencije na AM i CM kod MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji</i>	199
5.4.3. <i>Kompenzatorne mutacije u genomima MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji</i>	200
5.5. <i>Evolucija TUR klastera MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji</i>	201
6. ZAKLJUČCI	204
7. LITERATURA	207
8. PRILOZI	239
Prilog 1	240
Prilog 2	244
Prilog 3	246
Prilog 4	248
Prilog 5	253
Prilog 6	256
Prilog 7	259
Prilog 8	265

1. Uvod

Izazivači tuberkuloze (TB), bolesti koja danas još uvek predstavlja globalni zdravstveni problem od velikog značaja, su striktno patogene mikobakterije koje pripadaju *Mycobacterium tuberculosis* kompleksu (MTK). Iako se stopa mortaliteta TB u periodu od 1990. do 2013. godine smanjila za čak 45%, MTK je danas još uvek drugi vodeći uzrok smrti od infektivnih bolesti na globalnom nivou, posle virusa humane imunodeficijencije (HIV) (WHO 2014). Jedan od najvećih problema sa kojim se suočavaju programi kontrole TB je pojava i širenje multirezistentnih (eng. multidrug resistant, MDR) sojeva MTK. MDR sojevi definisani su kao sojevi MTK rezistentni najmanje na rifampicin i izoniazid, dva najvažnija i najefikasnija antituberkulotika prve linije. Situaciju dodatno komplikuje pojava ekstenzivno rezistentnih (eng. extensively drug resistant, XDR) sojeva, koji predstavljaju MDR sojeve sa dodatnom rezistencijom na fluorohinolone i na bar jedan od injekcionih antituberkulotika druge linije (amikacin, kanamicin ili kapreomicin). TB izazvanu MDR sojevima MTK, u poređenju sa TB izazvanom osetljivim sojevima MTK, karakteriše znatno češći neuspeh terapije, duža hospitalizacija, značajno lošija prognoza i viša stopa mortaliteta. Osim toga, lečenje MDR TB traje najmanje 18 do 24 meseca, praćeno je ozbiljnim neželjenim posledicama i značajno je skuplje od lečenja TB izazvane osetljivim sojevima MTK (WHO 2014; ECDC 2015). Savremena kontrola MDR TB obuhvata čitav niz mera, koje se velikim delom zasnivaju na rezultatima istraživanja vezanim za izazivača odnosno MDR sojeve MTK. Posebno važni elementi ovih istraživanja su različiti aspekti molekularno genetičke karakterizacije MDR sojeva, kao što su specijacija članova MTK, genotipizacija MDR izolata MTK u cilju sagledavanja njihove filogenetske strukture i dinamike transmisije i detekcija mutacija odgovornih za pojavu rezistencije na antituberkulotike.

1.1. Patogeneza TB

Patogeneza TB predstavlja veoma složen proces čiji ishod zavisi od kompleksne interakcije soja MTK i imunskog odgovora domaćina. Glavni izvor infekcije predstavljaju osobe sa plućnom TB, a infekcija se najčešće prenosi inhalacijom infektivnog aerosola. S obzirom na to da bacili TB u aerosolu ostaju vijabilni satima i da infektivna doza iznosi od jednog do 10 bacila, TB se smatra visoko kontagioznom bolešću. Nakon inhalacije i uspešnog prolaska kroz gornje respiratorne puteve, *M.*

tuberculosis ulazi u plućne alveole, odnosno u alveolarne makrofage i dendritične ćelije. Ključni korak u kontroli infekcije predstavlja aktivacija Th1 imunskog odgovora domaćina, koji uključuje TCD4+, TCD8+, Tγβ limfocite, oslobađanje proinflammatoryh citokina IL-2, IL-12, IL-18, TNF-α, IFN-γ i hemokina IL-8, monocitnog hemoatraktant proteina-1 (MCP-1) i makrofag inflamatornog proteina-1alfa (MIP-1α) (Co i sar. 2004). Alveolarni makrofagi, epiteloidne ćelije i Langhansove gigantske ćelije zajedno sa intracelularnim mikobakterijama formiraju centralno jezgro nekrotične mase, koje je okruženo gustim slojem makrofaga, TCD4+, TCD8+ i NK ćelijama. Ova struktura nosi naziv granulom i njena osnovna funkcija u organizmu domaćina je prevencija daljeg širenja bacila TB. Da li će i u kojoj meri doći do eliminacije bacila i kakav će biti ishod infekcije, zavisi od intenziteta i kvaliteta T ćelijskog odgovora u granulomu, odnosno sposobnosti bacila da ometaju prezentaciju antigena T limfocitima (Co i sar. 2004; Ahmad i sar. 2011). Takođe, perzistencija bacila TB u granulomu zavisi od metaboličkih promena u samom bacilu, ali i promena metabolizma domaćina do kojih bar delom dolazi usled dejstva bakterijskih efektorskih proteina i glikolipida (Harding i sar. 2011). Bacili su u granulomu izloženi hipoksiji, nedostatku hranljivih materija, niskoj pH vrednosti i inhibiciji respiracije usled prisustva azot oksida, a svi ovi faktori dovode do ekspresije gena koji bacile TB transformišu u tzv. dormante ili uspavane bacile (Gideon i Flynn 2011). Dormanti nemaju sposobnost replikacije, obavljaju minimum metaboličkih aktivnosti i otporni su na imunski odgovor. Ukoliko se pojave pogodni uslovi, dolazi do reaktivacije dormanata, što dovodi do nastanka primarne odnosno aktivne TB posle nekoliko nedelja, meseci, godina ili decenija nakon primarne infekcije (Gideon i Flynn 2011; Harding i sar. 2011).

Rizik od razvoja TB nakon inicijalne infekcije iznosi do 10%, a faktori koji dovode do progresije bolesti iz latentne u aktivnu formu još uvek nisu do kraja poznati. Različiti oblici deficita T ćelijskog imunskog odgovora su jedan od ključnih prepoznatih faktora i, u tom smislu, pod posebno visokim rizikom su: osobe sa HIV koinfekcijom; primaoci imunosupresivne terapije; osobe sa malnutricijom; oboleli od malignih oboljenja, insulin zavisnog dijabetesa, insuficijencije bubrega i alkoholizma (Lin i Flynn 2010; Gideon i Flynn 2011; Pawlowski i sar. 2012).

1.2. Epidemiologija TB

Prema posljednjem izveštaju Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO), od TB je tokom 2013. godine obolelo devet miliona, a umrlo jedan i po milion ljudi (WHO 2014). Devet miliona obolelih na globalnom nivou je ekvivalentno globalnoj incidenciji oboljevanja od TB od 126/100.000. Najveći broj slučajeva TB zabeležen je na području Azije (56%) i Afrike (29%), dok su istočni Mediteran (8%), Evropa (4%) i Severna Amerika (3%) regioni sa najmanjim brojem obolelih. Stopa incidencije TB značajno se razlikuje među geografskim područjima. U razvijenim državama, kao što su države zapadne Evrope, Severne Amerike, Japan i Australija, stopa incidencije iznosi do 10/100.000. Nasuprot tome, u nekim državama Afrike, kao što su na primer Svazilend, Lesoto i Republika Južna Afrika svake godine od TB oboli jedna od 100 osoba (stopa incidencije 1.000/100.000) (WHO 2014).

Prema izveštaju SZO i Evropskog centra za kontrolu i prevenciju bolesti (eng. European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) za 2013. godinu, stopa incidencije TB u Evropi iznosila je 39/100.000, dok je stopa prevalencije bila 51/100.000. Od 2000. godine vrednosti incidencije i prevalencije TB na području Evrope kontinuirano opadaju, ali su i dalje ispod očekivanih vrednosti i do 2015. godine nije postignuta planirana redukcija oboljevanja od TB. Najviši broj obolelih od TB u Evropi zabeležen je u 18 država, koje su označene kao države visokog prioriteta (Bugarska, Estonija, Litvanija, Letonija, Rumunija, Jermenija, Azerbejdžan, Belorusija, Gruzija, Kazahstan, Kirgistan, Moldavija, Rusija, Tadžikistan, Turska, Turkmenistan, Ukrajina, Uzbekistan). Pokazatelji opterećenja TB u navedenim državama visokog prioriteta su: 85% vrednosti ukupne incidencije TB u Evropi; 86% vrednosti ukupne prevalencije; i 90% ukupnog mortaliteta od TB u Evropi. Pored toga, u ovim zemljama se registruje čak 90% slučajeva TB-HIV koinfekcije, kao i 99,5% svih slučajeva MDR TB u Evropi (WHO 2014; ECDC 2015).

Stopa mortaliteta od TB u Evropi je tokom 2013. godine iznosila 4,1/100.000 među HIV negativnim osobama, pri čemu je mortalitet najviši u Turkmenistanu, Moldaviji i Ukrajini, dok je stopa mortaliteta u državama Evropske Unije (EU) ispod 1/100.000. Od ukupnog broja smrtnih slučajeva, 45% je na području Rusije. Ukupno 5,8% obolelih od TB je HIV pozitivno, pri čemu najviše osoba sa TB-HIV koinfekcijom živi na području Letonije, Portugala, Ukrajine, Estonije i Francuske (ECDC 2015).

1.2.1. Epidemiologija i značaj MDR TB

Procena SZO je da je tokom 2013. godine na globalnom nivou 3,5% novoobolelih i 20,5% prethodno lečenih obolelo od MDR TB, što znači da je procenjeni broj osoba obolelih od ove bolesti 480.000. Najveći broj obolelih osoba potiče iz Indije, Kine i Rusije (Tabela 1) (WHO 2014).

Tabela 1. Incidencija TB i MDR TB u izabranim državama u 2013. godini. Preuzeto iz Millard i sar. 2015.

Izabrana država/kategorija	Broj novih slučajeva		% (95 CI) slučajeva sa MDR TB	
	TB	MDR TB	novooboleli	prethodno lečeni
visoko opterećenje*, visoka rezistencija**				
Rusija	130.000	41.000	19 (14-25)	49 (40-59)
Kina	980.000	54.000	5,7 (4,5-7)	26 (22-30)
Indija	2.100.000	61.000	2,2 (1,9-2,6)	15 (11-19)
Južna Afrika	450.000	6.800	1,8 (1,4-2,3)	6,7 (5,4-8,2)
nisko opterećenje, visoka rezistencija				
Belorusija	65.000	1.790	35 (33-37)	55 (52-57)
Ukrajina	44.000	9.400	14 (14-15)	32 (31-33)
nisko opterećenje, niska rezistencija				
Peru	38.000	2.050	3,9 (3,6-4,2)	35 (33-37)
Velika Britanija	8.300	69	1,4 (1-1,7)	5,7 (3,2-9,4)
SAD	11.000	108	1,2 (0,98-1,6)	3,9 (1,9-7,1)

* 22 države sa najvećim brojem obolelih od TB; ** 27 država sa najvećim brojem obolelih od MDR TB; CI=interval poverenja.

Broj slučajeva MDR TB koji su prijavljeni SZO znatno je manji od procenjene vrednosti i iznosi 136.000. Ključni razlog disproporcije između procenjenog i prijavljenog broja obolelih je činjenica da u velikom broju zemalja/regiona ne postoji mogućnost izvođenja testa ispitivanja osetljivosti na antituberkulotike, posebno kada je reč o nerazvijenim državama Afrike i jugoistočne Azije.

Najvažniji faktori rizika za oboljevanje od MDR TB navedeni su u Tabeli 2.

Tabela 2. Faktori rizika za oboljevanje od MDR TB (WHO Companion handbook 2014).

Faktor rizika	Komentar
Neuspeh ponovljene terapije antituberkuloticima prve linije (SHREZ)	pacijenti sa pozitivnim mikroskopskim nalazom sputuma na kraju ponovljene terapije
Izloženost izvoru MDR TB	bliski kontakti osoba obolelih od MDR TB
Neuspeh primene novog režima za lečenje TB	pacijenti sa pozitivnim mikroskopskim nalazom

(HREZ)	sputuma pet i više meseci od početka terapije
Neuspeh lečenja u vanbolničkim uslovima	/
Pacijenti sa pozitivnim mikroskopskim nalazom sputuma dva i više meseci od početka terapije antituberkuloticima prve linije	/
Relaps ili ponovno započinjanje terapije pacijenata koji su bili izgubljeni iz praćenja, a bez prethodnog neuspeha terapije	/
Boravak u institucijama sa MDR TB epidemijom ili visokom prevalencijom MDR TB	utočišta za beskućnike, zatvori, zdravstveni radnici
Boravak u državama sa visokom prevalencijom MDR TB	/
Istorija upotrebe antituberkulotika lošeg ili nepoznatog kvaliteta	/
Lečenje u okviru nacionalnih programa za TB sa niskim stepenom operativnosti	povremeni ili kontinuirani nedostatak antituberkulotika
Komorbiditeti udruženi sa malapsorpcijom ili dijarejom	/
HIV	/

S=streptomycin; H=izoniazid; R=rifampicin; E=etambutol; Z=pirazinamid.

Prema procenama SZO, od MDR TB je tokom 2013. godine umrlo 210.000 ljudi (WHO 2014). Ključni faktori koji doprinose visokom mortalitetu MDR TB su suboptimalna dijagnostika ove bolesti odnosno nemogućnost postavljanja dijagnoze, kasno postavljanje dijagnoze, dug vremenski period između postavljanja dijagnoze i početka lečenja i, naravno, nedostupni i skupi lekovi praćeni velikim brojem sporednih neželjenih reakcija. Od 136.000 prijavljenih pacijenata sa MDR TB, lečenje je započeto kod 97.000 odnosno kod 71%. Međutim, broj pacijenata kojima je započeta terapija MDR TB zabrinjavajuće je mali u odnosu na procenjenih 480.000 obolelih od ove bolesti. Poslednja dostupna procena za uspešnost lečenja MDR TB je za 2011. godinu i na globalnom nivou iznosi 48%. Najviši procenat uspeha terapije zabeležen je u državama istočnog Mediterana (64%), a najniži (manje od 50%) u Africi i Evropi. U državama u kojima se izvodi test ispitivanja osetljivosti na antituberkulotike druge linije primenjuju se individualni terapijski režimi, ali većina država nema ovu mogućnost i lečenje MDR TB podrazumeva primenu empirijskih terapijskih režima. Do transmisije MDR TB sa obolelih na osobe iz okruženja najčešće dolazi pre započinjanja terapije, zbog čega se rano postavljanje dijagnoze i pravovremeno uvođenje adekvatne terapije smatraju presudno značajnim za uspešnu kontrolu ovog oblika TB (Millard i sar. 2015). Procena na globalnom nivou je da oko 9% obolelih od MDR TB ima XDR TB, a do kraja 2013. godine je čak 100 država prijavilo bar jedan slučaj XDR TB (WHO 2014). Najveći broj obolelih od XDR TB zabeležen je u sledećim državama: Litvaniji (24,8%

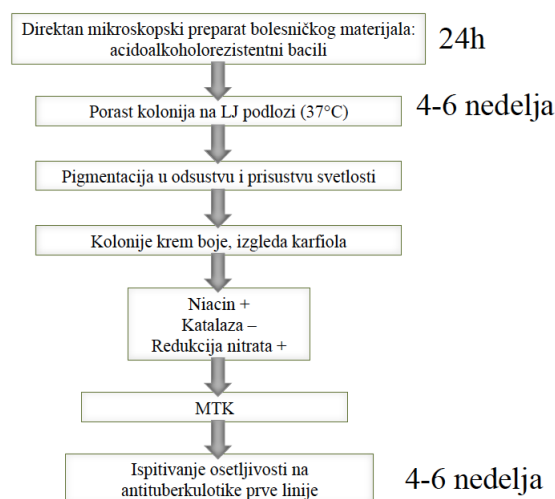
od ukupnog broja pacijenata sa MDR TB), Kazahstanu (22,7%), Letoniji (21,7%), Tadžikistanu (21%) i Gruziji (20%). Lečenje XDR TB je uspešno kod približno 20% lečenih pacijenata. Najviši procenat umrlih zabeležen je u Južnoj Africi (40%) i smatra se da je ovako visok mortalitet posledica TB-HIV koinfekcije (WHO 2014).

Kada je u pitanju epidemiologija MDR TB u Evropi, procenjeno je da je tokom 2013. godine obolelo 75.000 osoba (ECDC 2015). Ukupan broj prijavljenih slučajeva je 34.941, što je 46,6% od procenjenog broja. Prevalencija MDR TB u Evropi među novoobolelima bila je 16,9%, a među prethodno lečenim 48%. Stopa uspešnosti terapije MDR TB u Evropi iznosi 46%, pri čemu je u državama EU prosečna stopa uspešnosti čak i manja (38,1%). Najveći uspeh u lečenju MDR TB imaju Norveška i Švedska (75%), zatim Kazahstan (74,3%) i Belgija (73,3%). Od ukupnog broja obolelih od MDR TB u Evropi tokom 2013. godine umrlo je 14,7% pacijenata. Od XDR TB su tokom iste godine obolele 532 osobe, što je ekvivalentno prevalenciji XDR TB od 12,7% među obolelima od MDR TB. Interesantno je da države EU imaju višu prevalenciju XDR TB (17,8%) od država koje ne pripadaju EU (11,6%), ali takođe i veći broj izolata za koje je urađen test ispitivanja osetljivosti na drugu liniju antituberkulotika (62,9%/55,1%). Procena je da lečenje XDR TB u Evropi uspešno završi samo jedna od četiri osobe (ECDC 2015).

1.3. Laboratorijska dijagnostika TB

Konvencionalni pristup u laboratorijskoj dijagnostici TB zasniva se na izolovanju uzročnika na čvrstim odnosno tečnim hranljivim podlogama, identifikaciji na osnovu mikroskopskih, kulturelnih i biohemijskih karakteristika i detekciji rasta bacila TB u prisustvu antituberkulotika na hranljivim podlogama (Slika 1). S obzirom da je vreme jedne generacije mikobakterija značajno duže nego kod većine bakterijskih patogena i da kod članova MTK iznosi čak 20-22h, za izolovanje bacila TB na hranljivoj podlozi i ispitivanje osetljivosti na antituberkulotike potrebno je po četiri do šest nedelja. Drugim rečima, sa izuzetkom pregleda direktnog preparata bolesničkog materijala, rezultati svih ostalih segmenata konvencionalne dijagnostike dostupni su tek nakon više nedelja. Osim toga, na osnovu mikroskopskih (formiranje cord faktora), kulturelnih (karakteristike porasta na Löwenstein-Jensen (LJ) podlozi) i fiziološko biohemijskih karakteristika (sposobnost produkcije niacina, katalaze, ureaze i pirazinamidaze,

redukcije nitrata, rasta u prisustvu p-nitrobenzoične kiseline i hidrazida tiofen-2-karboksilne kiseline), često nije moguće identifikovati članove MTK do nivoa vrste/podvrste, a nekada ni diferencirati vrste MTK od vrsta netuberkuloznih mikobakterija (NTM) (Parsons i sar. 2011; Ahmad i Mokaddas 2014).



Slika 1. Algoritam konvencionalne bakteriološke dijagnostike TB.

Uvođenjem tečnih podloga sa različitim automatizovanim sistemima za ranu detekciju porasta mikobakterija u algoritam laboratorijske dijagnostike TB, vreme izolovanja iz bolesničkog materijala je skraćeno na 9-14 dana, dok su rezultati testa za ispitivanje osetljivosti na antituberkulotike dostupni za oko 7 dana. Posebno značajan pomak u laboratorijskoj dijagnostici TB je uvođenje brzih metoda za identifikaciju vrsta/podvrsta MTK i detekciju mutacija gena koje najčešće dovode do nastanka rezistencije na antituberkulotike direktno u kliničkom materijalu i u kulturama na čvrstim odnosno u tečnim podlogama (Parsons i sar. 2011; Drobniewski i sar. 2013; Ahmad i Mokaddas 2014). Brze metode primarno su zasnovane na amplifikaciji nukleinskih kiselina (eng. Nucleic Acid Amplification Tests, NAATs), često u kombinaciji sa visoko specifičnim sistemima za detekciju, poput hibridizacije sa specifičnim oligonukleotidnim probama. Iako je izolovanje bacila TB na čvrstoj hranljivoj podlozi još uvek „zlatni standard“, osnovne prednosti molekularne u odnosu na klasičnu bakteriološku dijagnostiku su dostupnost rezultata za nekoliko sati i precizna identifikacija članova MTK do nivoa vrste. Imajući u vidu da brza i precizna dijagnostika predstavljaju važne segmente

uspešne kontrole TB, visoko senzitivne i specifične molekularne tehnike postale su metod izbora za identifikaciju sojeva MTK do nivoa vrste/podvrste.

1.3.1. Molekularna identifikacija sojeva MTK do nivoa vrste/podvrste

Pored brojnih „in house” tehnika amplifikacije, za identifikaciju MTK najčešće se koriste standardizovani komercijalno dostupni testovi zasnovani na principu PCR-a (Amplikor PCR esej; Roche Molecular Systems), real-time PCR-a (Xpert MTB/RIF, Cepheid Inc.), amplifikacije putem transkripcije (Amplified MTD esej, Gene-Probe Inc. i GenoType Mycobacteria Direct esej, Hain Lifescience), amplifikacije putem uklanjanja lanca (BD ProbeTec esej, Becton Dickinson), izotermalne amplifikacije putem DNK petlje (LAMP, Eiken Chemical Co.) i reverzne hibridizacije (INNO-LiPA Rif.TB, Innogenetics). Većina ovih testova bazirana je na detekciji 16S rDNK, karakteriše ih visoka senzitivnost i specifičnost (90 do 100%), a rezultati su dostupni nakon dva do osam sati. Međutim, glavni nedostatak svih ovih metoda je nemogućnost identifikacije sojeva MTK do nivoa vrste/podvrste (Parsons i sar. 2011; Drobniewski i sar. 2013). Od svih trenutno dostupnih komercijalnih molekularnih testova, samo GenoType MTBC (Hain Lifescience) test omogućava identifikaciju sojeva MTK do nivoa vrste/podvrste. U pitanju je standardizovan test, koji se zasniva na reverznoj hibridizaciji multipleks PCR DNK amplikona sa specifičnim probama imobilisanim na nitroceluloznoj traci. Test identifikuje vrste MTK putem detekcije 23S rDNK kompleks specifične sekvence, sekvenci specifičnih za određene vrste u okviru *gyrB* gena i regiona diferencijacije 1 (eng. region of difference 1, RD1). Rezultati testa dostupni su za oko 5 sati, senzitivnost iznosi 93-96%, a specifičnost 98-100% (Padilla i sar. 2004; Richter i sar. 2004; Kurtoglu i sar. 2014).

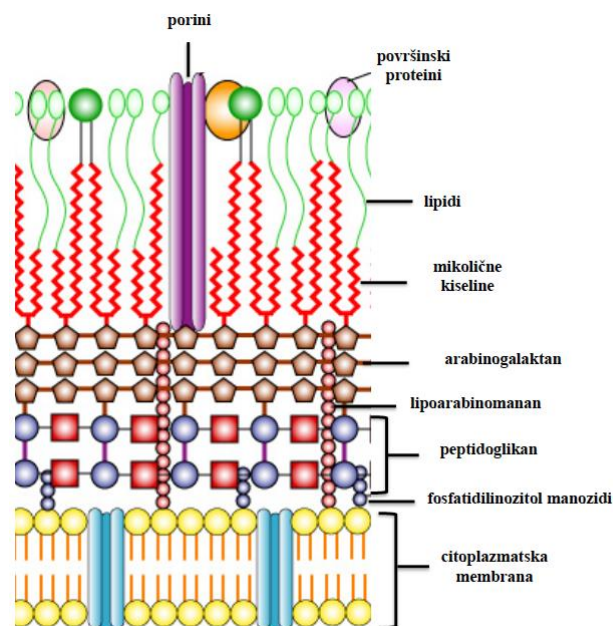
Primena molekularnih tehnika omogućava rano postavljanje dijagnoze, rano započinjanje adekvatne terapije, poboljšanje ishoda lečenja i posledično smanjenje obima transmisije bolesti (CDC 2009; Drobniewski i sar. 2013). Posebno važan doprinos molekularnih metoda u kontroli MDR i XDR TB predstavlja primena metoda genotipizacije i sekvenciranja nove generacije u cilju detaljnog sagledavanja filogeografskih populacionih karakteristika, genetičke osnove rezistencije i otkrivanja puteva transmisije MDR i XDR sojeva MTK na lokalnom i globalnom nivou (Schürch i

van Soolingen 2012; Drobniewski i sar. 2013). Ove metode detaljno su opisane u poglavlju 1.6.

1.4. Osnovne karakteristike bakterija roda *Mycobacterium*

Rod *Mycobacterium* je jedini rod familije Mycobacteriaceae i predstavlja jedan od najbrojnijih rodova carstva Actinobacteria. Rod obuhvata 172 vrste i 13 podvrsta (<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>), ali to svakako nije definitivni broj jer se redovno otkrivaju i prijavljuju nove vrste. Striktno patogeni predstavnici roda *Mycobacterium* su članovi MTK i *M. leprae*, dok su sve ostale vrste roda uslovno patogene ili saprofitne bakterije koje se označavaju kao NTM. Mikobakterije su aerobni, nepokretni, asporogeni, pravi ili lako savijeni Gram pozitivni bacili veličine 0,2-0,6×1-10 μm. Specifične osobine pripadnika roda *Mycobacterium* su acidoalkoholorezistencija, prisustvo mikoličnih kiselina sa 60 do 90 ugljenikovih atoma i visok sadržaj (61-71%) guanina (G) i citozina (C) u DNK (Murray 2013). Ćelijski zid mikobakterija predstavlja kompleksnu trodimenzionalnu strukturu, koju čine jezgro ćelijskog zida i dvoslojna spoljašnja membrana (Brennan i sar. 2003; Mishra i sar. 2011; Bansal-Mutalik i Nikaido 2014). Jezgro ćelijskog zida čini mikolil-arabinogalaktan-peptidoglikanski (mAGP) kompleks, građen od N-glikoziliranog peptidoglikana kovalentno vezanog za heteropolisaharid D-arabino-D-galaktan, koji je esterifikovan dugim lancima (C60 do C90) β-hidroksilnih masnih kiselina, odnosno mikoličnih kiselina. U sastavu spoljašnje membrane nalaze se lipidi i proteini, prevashodno fosfatidil-mio-inozitol manozidi (PIMs), lipomanan (LM) i lipoarabinomanan (LAM) (Slika 2). mAGP je od ključnog značaja za vijabilnost mikobakterija, dok lipidi, proteini i glikolipidi imaju ulogu efektorskih molekula u patogenezi oboljenja koje ove bakterije izazivaju (Brennan i sar. 2003; Mishra i sar. 2011).

Zahvaljujući hidrofobnoj mreži mikoličnih kiselina i kompleksa lipida koji čine 30 do 40% mase ćelijskog omotača, mikobakterije su rezistentne na brojna dezinfekciona sredstva i antimikrobne agense (Brennan i sar. 2003). Takođe, ovakva građa ćelijskog zida čini ih otpornim na odbojavanje rastvorima kiselina i alkohola, zbog čega spadaju u grupu acidoalkoholorezistentnih bacila (Brennan i sar. 2003; Murray 2013).



Slika 2. Shematski prikaz ćelijskih omotača mikobakterija.

1.5. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks

MTK obuhvata vrstu *M. tuberculosis* i grupu mikobakterija koje su blisko srodne ovoj vrsti. Svi članovi ovog kompleksa smatraju se mogućim izazivačima TB. Članovi MTK su genetički visoko monomorfne vrste odnosno podvrste i predstavljaju jedan od najekstremnijih primera visokog stepena homologije na nivou genoma u bakteriologiji. Ovu pojavu najbolje ilustruje činjenica da su genske i intergenske regije u okviru rDNK operona među članovima MTK kompletno konzervirane (Frothingham i sar. 1994). Takođe, učestalost alelskih varijacija, odnosno substitucija sinonimnih nukleotida u genomima pripadnika MTK iznosi oko 0,01-0,03%, zbog čega su mnogi strukturni geni visoko konzervirani (Achtman 2012). Zbog niskog stepena alelskog diverziteta, MTK se smatra izuzetno klonalnim kompleksom, među čijim aktuelnim članovima nije dokazan horizontalni transfer gena (HTG), inače uobičajeni mehanizam promenljivosti genoma bakterija. Prema nekim autorima, međutim, genomi vrsta/podvrsta MTK predstavljaju grupe gena stečenih putem HTG od mikobakterija iz okruženja, koji se dešavao na različitim filogenetskim nivoima pre klonalne ekspanzije, odnosno nastanka MTK (Gutierrez i sar. 2005; Veyrier i sar. 2009; Namouchi i sar. 2012). U odsustvu HTG, genomi sojeva MTK menjaju se isključivo putem insercija mobilnih genskih elemenata, ponavljanja DNK sekvenci, polimorfizama velikih sekvenci (eng. Large

Sequence Polymorphisms, LSP) i/ili polimorfizama pojedinačnih nukleotida (eng. Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) (Brosch i sar. 2002; Garcia-Betancur i sar. 2012).

Prema aktuelnoj taksonomskoj shemi, MTK obuhvata striktno humane patogene *M. tuberculosis* sensu stricto i *M. africanum*, kao i osam vrsta odnosno podvrsta koje su primarni patogeni životinja: *M. bovis* (goveda), *M. caprae* (ovce i koze), *M. microti* (glodari), *M. pinnipedii* (foke i morski lavovi), *M. mungi* (mungosi), *M. orygis* (familija Bovidae), *M. suricattae* (merkati) i bacil šimpanzi. *M. canettii*, primarno humani patogen ranije klasifikovan u MTK, danas se, zajedno sa ostalim tzv. glatkim bacilima, smatra neklonalnim evolutivnim klasterom bacila TB, čiji kompletan spektar domaćina još uvek nije poznat (Wirth i sar. 2008; Garcia-Betancur i sar. 2012; Boritsch i sar. 2014).

Pored razlika u pogledu tropizma za domaćine, članovi MTK razlikuju se i u pogledu virulencije i profila osetljivosti na antituberkulotike (Wirth i sar. 2008; Garcia-Betancur i sar. 2012). Tako je, na primer, dokazano da su sojevi MTK izolovani od pacijenata u Indiji manje virulentni od sojeva iz Velike Britanije (Coscolla i Gagneux, 2010), kao i da je *M. africanum* manje virulentan od *M. tuberculosis* (de Jong i sar. 2008), ali da češće izaziva infekcije HIV pozitivnih osoba (de Jong i sar. 2010). Takođe, pokazano je da *M. tuberculosis* ima veću sposobnost za sticanje rezistencije na antituberkulotike od vrste *M. africanum* (Yeboah-Manu i sar. 2011), među čijim sojevima do sada nije opisana multipla rezistencija na antituberkulotike (Isea-Pena i sar. 2012; Bentley i sar. 2012). Pripadnici MTK pokazuju i znatne razlike u načinima transmisije. Za razliku od vrsta *M. tuberculosis* i *M. africanum* koje se prenose isključivo interhumanom transmisijom, infekcija *M. bovis* može se preneti i kao zoonoza i interhumanom transmisijom (Evans i sar. 2007; Müller i sar. 2013 b). Prema tome, iako je vrsta *M. tuberculosis* nesumnjivo najznačajniji izazivač TB ljudi, poznavanje drugih vrsta i podvrsta MTK koje se u datoj populaciji javljaju kao izazivači TB, a posebno MDR TB, ima jasne kliničke i epidemiološke implikacije.

1.5.1. *M. tuberculosis sensu stricto*

M. tuberculosis je prva identifikovana vrsta MTK i još uvek daleko najvažniji uzročnik TB ljudi na globalnom nivou. Ovu vrstu otkrio je i opisao u svom epohalnom delu pod

nazivom „Die Aetiologie der Tuberkulose” Robert Koch 1882. godine (Koch 1882). Uprkos brojnim saznanjima koja su proteklih 130 godina sticana o ovoj vrsti MTK, interakciji sa čovekom i oboljenju koje izaziva, tek nakon višegodišnjih istraživanja genoma *M. tuberculosis* stekli smo precizniji uvid u poreklo, biogeografske i populacione karakteristike ove vrste. Sve navedene karakteristike *M. tuberculosis* sensu stricto detaljno su opisane u narednim poglavljima.

1.5.2. *M. africanum*

Vrsta *M. africanum* prvi put je identifikovana u Senegalu 1968. godine (Castets i sar. 1968). Na osnovu geografskog porekla i biohemijskih karakteristika ova vrsta je prvobitno podeljena na dve podvrste: *M. africanum* I, dominantnu u zapadnoj Africi i fenotipski sličnu *M. bovis*, i *M. africanum* II, izolovanu na području istočne Afrike i fenotipski sličnu *M. tuberculosis*. Usled nemogućnosti precizne identifikacije samo na osnovu biohemijskih karakteristika, definitivna diferencijacija u okviru vrste *M. africanum* postignuta je tek primenom molekularnih metoda. Prema trenutno važećoj klasifikaciji, vrsta *M. africanum* obuhvata dve zapadnoafričke linije (MAF1 i MAF2), koje su predominantne u zapadnoj Africi gde izazivaju oko polovine svih slučajeva humane TB (Mostowy i sar. 2004; de Jong i sar. 2010). Nekadašnja istočnoafrička grupa sojeva reklasifikovana je u Uganda genotip *M. tuberculosis* sensu stricto (Niemann i sar. 2004). Na osnovu rezultata sekvenciranja genoma *M. africanum*, pretpostavlja se da je ova vrsta prošla sličan evolutivni scenario kao *M. bovis* odnosno da je prvobitno bila adaptirana na životinje, da bi kasnije došlo do adaptacije na savremene ekološke niše (Bentley i sar. 2012). Ipak, do danas nije detektovan nijedan animalni rezervoar *M. africanum* i ova vrsta se izoluje prevashodno iz uzoraka stanovnika zapadne Afrike i emigranata iz ovog područja (Bentley i sar. 2012; Isea-Peña i sar. 2012).

1.5.3. *M. bovis*

Vrsta *M. bovis* je prvi put diferencirana od vrste *M. tuberculosis* 1970. godine na osnovu kulturnih i biohemijskih karakteristika, kao i urođene rezistencije na pirazinamid (Karlson i Lessel, 1970). Iako je adaptirana na širok spektar domaćina, ova vrsta primarno izaziva TB goveda, a na čoveka se može preneti kao zoonoza, ali i

interhumanom transmisijom infektivnim aerosolom (Evans i sar. 2007; Müller i sar. 2013 b). Procenjuje se da je početkom 20. veka vrsta *M. bovis* bila uzročnik oko 30% svih slučajeva humane TB, da bi, nakon uvođenja obavezne pasterizacije i drugih kontrolnih mera, u razvijenim zemljama ova vrednost pala na 1 do 2% (Gibson i sar. 2004; Hlavsa i sar. 2005). Prema poslednjim procenama, vrednost incidencije TB kao zoonoze na globalnom nivou je 7/100.000 (Müller i sar. 2013 b). Na osnovu filogeografskih karateristika, vrsta *M. bovis* obuhvata tri klonalna kompleksa sa različitom geografskom distribucijom. Afrički kompleks 1 dominantno je prisutan u centralno-zapadnoj Africi, afrički kompleks 2 u istočnoj Africi, dok evropski kompleks 1 ima globalnu distribuciju i do sada je identifikovan na području britanskih ostrva, nekadašnjih britanskih kolonija, Amerike, Kazahstana i Koreje (Smith i sar. 2012). *M. bovis* je najznačajnija vrsta MTK posle *M. tuberculosis* kada je reč o multiploj rezistenciji na antituberkulotike. Pored toga što su urođeno rezistentni na pirazinamid, pokazano je da su sojevi koji pripadaju ovoj vrsti MTK značajno udruženi sa stečenom rezistencijom na rifampicin i izoniazid u SAD (Yuen i sar. 2013). Osim toga, sojevi *M. bovis* odgovorni su i za jednu od najvećih epidemija XDR TB, koja je trajala čak četiri godine u Španiji (Samper i Martin 2007; Perez-Lago i sar. 2014).

1.5.4. *M. bovis* BCG

Bacil Calmette-Guérin (BCG) je atenuisani soj *M. bovis*, koji su izolovali Calmette i Guérin nakon 230 *in vitro* pasaža virulentnog soja *M. bovis* tokom 13 godina. BCG vakcina je prva vakcina protiv TB, u primeni od 1921. godine, a prema preporukama SZO 1974. godine uključena je u obavezni program imunizacije i još uvek predstavlja jedinu dostupnu vakcinu za prevenciju TB (Liu i sar. 2009; Montagnani i sar. 2014). Rezultatima brojnih meta-analiza dokazano je da je efikasnost BCG vakcine u prevenciji nastanka teških oblika TB u dečjem uzrastu, uključujući TB meningitis i milijarnu TB, preko 80%. Međutim, procenjena efikasnost u zaštiti od nastanka plućne TB u različitim studijama iznosi od 0 do 80%. Razlozi drastično različite efikasnosti BCG vakcine u različitim populacijama objašnjavaju se brojnim faktorima, od genskih i antigenskih razlika u BCG sojevima, preko uticaja izloženosti ispitivane populacije određenim vrstama NTM, do razlika između kliničkih sojeva *M. tuberculosis* koji su doveli do nastanka TB (Liu i sar. 2009; Montagnani i sar. 2014). Pored toga, pokazano

je da kod imunodeficientnih osoba BCG vakcina može dovesti do nastanka ozbiljne, diseminovane forme TB, zbog čega se ova vakcina više ne koristi za imunizaciju HIV pozitivnih osoba. Kako su države u kojima je TB endemska bolest zapravo iste one u kojima se registruje najviša incidencija HIV infekcije, ovo je još jedan od nedostataka BCG vakcine odnosno još jedan razlog za razvoj novih efikasnijih i sigurnijih vakcina za prevenciju TB (Montagnani i sar. 2014).

1.5.5. *M. canettii*

Naziv *M. canettii* prvi put se pojavljuje u studiji van Soolingena i saradnika, koji su 1997. godine izolovali neobičan soj mikobakterija iz bioptata cervikalnog limfnog nodusa dvogodišnjeg dečaka iz Somalije. Biohemijske karakteristike i sekvenca 16S rRNK ovog soja u potpunosti su odgovarale karakteristikama ostalih, do tada poznatih članova MTK. Međutim, za razliku od njih, ovaj soj je imao glatke, staklaste kolonije, kraće vreme jedne generacije (17h) i jedinstvenu građu glikolipida i lipooligosaharida ćelijskog zida (van Soolingen i sar. 1997). Ovakve kulturne karakteristike i građa ćelijskog zida odgovarale su karakteristikama soja TB koji je 27 godina ranije opisao Georges Canetti, u čiju čast ova vrsta dobija naziv *M. canettii*.

M. canettii spada u veoma retke glatke bacile TB, koji su do sada izolovani jedino iz uzoraka pacijenata medicinskih centara u Džibutiju (Gutierrez i sar. 2005; Fabre i sar. 2010; Blouin i sar. 2014) i pacijenata koji su poreklom iz zemalja roga Afrike ili u nekoj vezi sa ovim područjem (van Soolingen i sar. 1997; Somoskovi i sar. 2009). Međutim, iako je ova vrsta manje virulentna od *M. tuberculosis*, izoluje se relativno retko i ima striktnu geografsku distribuciju, genom *M. canettii* karakteriše znatno veći genski diverzitet od genoma svih ostalih članova MTK (Supply i sar. 2013). Genom *M. canettii* je za oko 20% veći od genoma ostalih bacila TB, a značajan deo genskih sekvenci ova vrsta je stekla usled HTG od NTM, verovatno putem konjugacije i/ili transdukcije (Gutierrez i sar. 2005; Supply i sar. 2013). Imajući u vidu ovakve karakteristike genoma kao i odsustvo dokaza o interhumanoj transmisiji, *M. canettii* se smatra najbližijim pretpostavljenoj predačkoj vrsti bacila TB, iz koje su klonalnom ekspanzijom nastali ostali članovi MTK (Supply i sar. 2013; Boritsch i sar. 2014).

1.5.6. *M. caprae*

Vrsta *M. caprae* prepoznata je kao izazivač TB koza 1999. godine i prvobitno je klasifikovana kao podvrsta *M. tuberculosis* (Aranaz i sar. 1999). Tri godine kasnije, izvršena je reklasifikacija u podvrstu *M. bovis*, na osnovu kulturnih, biohemijskih i genskih karakteristika (Niemann i sar. 2002), a 2003. godine *M. caprae* dobija status vrste MTK, na osnovu prisustva jedinstvenih SNPs u okviru *gyrB* gena (Aranaz i sar. 2003). Ova vrsta izolovana je iz uzoraka velikog broja životinja, prevashodno koza, goveda i crvenih jelena, a na čoveka se prenosi kao zoonoza (Prodinger i sar. 2002). Uprkos brojnim sličnostima između *M. caprae* i *M. bovis*, zbog kojih se ove dve vrste MTK danas smatraju epidemiološkim blizancima, *M. caprae* je evolutivno starija, ređe izaziva TB ljudi i nema globalnu distribuciju, već se predominantno izoluje na području Evrope (Prodinger i sar. 2014).

1.5.7. *M. microti*

Prirodni rezervoar vrste *M. microti* su mali glodari, primarno poljski miševi, a sporadični slučajevi infekcije opisani su i kod mačaka, lama, pasa i brojnih drugih sisara (van Soolingen i sar. 1998). Iako dugo nije smatran izazivačem humane TB, *M. microti* je prvi put izolovan kao uzročnik plućne TB čoveka 1998. godine (Foudraine i sar. 1998). Od tada, u svetu je iz humanih uzoraka izolovano samo 27 sojeva ove vrste, kako imunokompromitovanih tako i imunokompetentnih osoba (Kremer i sar. 1998; Niemann i sar. 2000; Panteix i sar. 2010). Iako se zna da *M. microti* najčešće dovodi do nastanka plućnog oblika humane TB, nijednim epidemiološkim istraživanjem do sada nije dokazana transmisija sa životinja na ljude, niti je pronađen izvor humanih infekcija. Ipak, smatra se da do transmisije infekcije na čoveka dolazi uglavnom usled kontakta sa poljskim miševima i mačkama, dok je interhumana transmisija izuzetno retka (Kipar i sar. 2014).

M. microti spada u ekstremno spororastuće mikobakterije i ovu vrstu je na osnovu kulturnih i biohemijskih karakteristika nemoguće razlikovati od ostalih članova MTK. Stoga se smatra da je procenjena stopa obolevanja ljudi od TB izazvane ovom vrstom MTK ispod stvarnih vrednosti (Kremer i sar. 1998; van Soolingen i sar. 1998; Niemann i sar. 2000; Panteix i sar. 2010). Ovakvom stavu u prilog ide i činjenica da su plućne forme TB izazvane *M. tuberculosis* i *M. microti* klinički gotovo identične. Iz tog razloga

je primena molekularnih tehnika u preciznoj identifikaciji i diferencijaciji *M. microti* od ostalih članova MTK od posebnog značaja (Kremer i sar. 1998; Niemann i sar. 2000; Kipar i sar. 2014).

Interesantno je da je takozvani dassie bacil, prvi put izolovan 1960. godine iz hiraka, malih sisara biljojeda koji naseljavaju južnu Afriku i Srednji Istok, po svojim morfološkim karakteristikama izuzetno sličan vrsti *M. microti* (Mostowy i sar. 2005). Međutim, do sada nije opisan nijedan slučaj TB izazvane ovom bakterijom i dassie bacil nikada nije dobio status vrste odnosno podvrste MTK.

1.5.8. *M. orygis*

Karakteristike *M. orygis* pominju se u literaturi od 1994. godine, kada je ova vrsta smatrana vrstom *M. bovis* (van Soolingen i sar. 1994). Do diferencijacije *M. orygis* od *M. bovis* i ostalih bacila TB dolazi nekoliko godina kasnije (Brosch i sar. 2002; Mostowy i sar. 2005), da bi 2012. godine ova vrsta konačno bila klasifikovana u MTK na osnovu molekularnih i filogenetskih karakteristika (van Ingen i sar. 2012). Po svojim morfološkim karakteristikama, *M. orygis* najbliži je vrsti *M. microti*, ali nije virulentan za glodare. *M. orygis* izolovan je iz uzoraka različitih vrsta životinja familije Bovidae iz istočne Afrike i sa Arabijskog poluostrva, majmuna i krava iz južne Azije, ali definitivni spektar domaćina ove vrste još uvek nije poznat. Transmisija *M. orygis* sa životinja na ljude opisana je na području južne Azije i čovek je smatran slučajnim domaćinom ove vrste (van Ingen i sar. 2012). Međutim, nakon identifikacije *M. orygis* u uzorcima osoba obolelih od TB na Novom Zelandu i dokazane transmisije sa čoveka na krave (Dawson i sar. 2012), otvoreno je i pitanje moguće interhumane transmisije *M. orygis*.

1.5.9. *M. pinnipedii*

M. pinnipedii je na osnovu fenotipskih i genotipskih karakteristika klasifikovan kao vrsta MTK 2003. godine (Cousins i sar. 2003). Infekcije ljudi do sada su opisane samo kod trenera morskih sisara u zoološkim vrtovima (Kiers i sar. 2008). Međutim, nedavno je ova vrsta MTK izolovana i iz uzoraka goveda na Novom Zelandu (Loeffler i sar. 2014). Stoga se smatra da je spektar domaćina za ovu vrstu MTK širi nego što se ranije mislilo.

1.5.10. *M. mungi*

M. mungi je 2010. godine izolovan iz uzoraka šarenih mungosa koji žive u bliskom kontaktu sa ljudima u Bocvani i iste godine je klasifikovan kao posebna vrsta MTK (Alexander i sar. 2010). Filogenetski ova vrsta nalazi se između vrsta *M. africanum* i *M. orygis*, ali ima nekoliko jedinstvenih ekoloških karakteristika u odnosu na ostale članove MTK. Do nastanka TB izazvane *M. mungi* dolazi usled transmisije iz okruženja, a ne respiratornim putem. Pored toga, ova vrsta dovodi do akutne infekcije životinja sa visokom stopom mortaliteta. Iako transmisija na ljude još uvek nije nedvosmisleno dokazana, postoje pretpostavke da je epidemija TB u ekstremno izolovanim grupacijama ljudi u basenu Amazona u Brazilu, koji nikada ranije nisu bili u kontaktu sa bacilima TB, moguće izazvana vrstom *M. mungi* (Alexander i sar. 2010).

1.5.11. *M. suricattae*

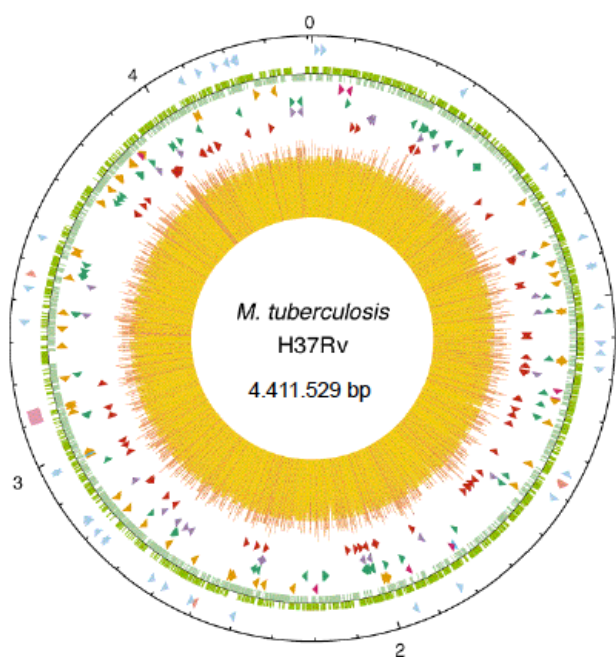
Ova vrsta prvobitno je opisana kao vrsta *M. tuberculosis*, kada su bacili slični bacilu TB po prvi put izolovani iz uzoraka slobodnoživećih merkata u oblasti Kalahari pustinje 2002. godine. Nakon reklasifikacije u vrstu *M. bovis*, 2013. godine vrsta je izdvojena kao posebna vrsta MTK pod nazivom *M. suricattae* (Parsons i sar. 2013). Genske karakteristike *M. suricattae* najbližnije su karakteristikama dassie bacila i *M. mungi*, a promene jedinstvene za ovu vrstu smatraju se posledicom selektivne evolucije do koje je došlo tokom adaptacije na život u merkatima. Slučajevi humane TB izazvane vrstom *M. suricattae* do sada nisu opisani (Parsons i sar. 2013).

1.5.12. Bacil šimpanzi

Poslednji otkriven bacil TB izolovan je iz uzoraka divlje šimpanze 2013. godine u Nacionalnom parku Taï u Obali Slonovače (Coscolla i sar. 2013). S obzirom da su ekološke karakteristike ovog bacila još uvek velikim delom nepoznate, bacil nije zvanično klasifikovan u MTK i za sada nosi naziv „bacil šimpanzi”. Među osobama koje su bile u bliskom kontaktu sa obolelom životinjom u Nacionalnom parku nije bilo inficiranih, tako da transmisija na ljude nije dokazana. Bacil šimpanzi filogenetski je najbližiji vrstama *M. africanum*, *M. orygis* i *M. mungi*, ali otkrivanje detaljne povezanosti između ovih vrsta i procena rizika transmisije bacila šimpanzi na čoveka ostaju predmeti budućih istraživanja (Coscolla i sar. 2013).

1.6. Genom sojeva MTK

Prvi kompletno sekvenciran genom mikobakterija bio je genom referentnog soja *M. tuberculosis* H37Rv, koji je zadržao virulenciju od vremena izolovanja 1905. godine. Sekvencu genoma *M. tuberculosis* H37Rv objavili su Cole i saradnici 1998. godine, čime počinje serija projekata sekvenciranja mikobakterijskih genoma. Genom *M. tuberculosis* H37Rv obuhvata 4.411.529 bp. Ustanovljeno je da genom kodira sintezu 4.000 proteina i 50 RNK molekula (Slika 3) (Cole i sar. 1998). Sadržaj G i C iznosi 65,6%, a čak 8% genoma kodira sintezu molekula uključenih u metabolizam lipida i preko 100 enzima koji učestvuju u metabolisanju razgradnih produkata ćelijske membrane domaćina (Cole i sar. 1998). Oko 3,4% genoma čine mobilni genski elementi, profagi phiR1 i phiR2 i insercione sekvence, dok 7,1% ukupnog broja gena kodira 169 proteina iz familija ProGlu (PE) i ProProGlu (PPE), koje se smatraju ključnim za patogenost *M. tuberculosis*. Genom *M. tuberculosis* obuhvata i veliku *mce* gensku familiju, koja kodira Mce proteine odgovorne za ulazak bakterije u ćelije sisara, kao i *esx* familiju koja kodira ESX familiju proteina, takode jednu od najzaslužnijih za patogenost *M. tuberculosis* (Cole i sar. 1998; Cole 2002; Bottai i sar. 2014).



Slika 3. Kružna mapa genoma *M. tuberculosis* H37Rv. 0 = početno mesto replikacije; prvi prsten = pozicija stabilnih RNK gena (tRNK - plavo, ostale RNK - ružičasto) i region direktnog ponavljanja (ružičast kvadrat); drugi prsten = kodirajuće sekvence (u smeru kazaljke na satu - tamno zeleno; suprotno od smera kazaljke na satu - svetlo zeleno); treći prsten = ponavljane

DNK sekvence (insercione sekvence - narandžasto; 13E12 REP familija gena - tamno ružičasto; profag - plavo); četvrti prsten = PPE familija gena (zeleno); peti prsten = PE familija gena (ljubičasto); šesti prsten = PGRS sekvenca (tamno crveno). Histogram (centar) predstavlja sadržaj G+C (<65% - žuto; >65% - crveno). Preuzeto iz Cole i sar. 1998.

Jedna od glavnih razlika između MTK i ostalih patogenih bakterija jeste sposobnost preživljavanja sojeva MTK u različitim nepovoljnim uslovima spoljašnje sredine. Opstanak mikobakterija u takvim uslovima primarno je posledica regulacije ekspresije gena, odnosno transkripcije. U poređenju sa promoterom *Escherichia coli*, promoter *M. tuberculosis* je znatno varijabilniji, što je verovatno posledica visokog sadržaja G+C, ali i velikog broja sigma faktora koji prepoznaju više različitih promoter sekvenci. Osim toga, u mikobakterijskom promoteru identifikovani su brojni regulatorni motivi koji regulišu transkripciju u skladu sa promenama u spoljašnjoj sredini. Kako je upravo promoter ključni regulator transkripcije i nivoa genske ekspresije, zahvaljujući jedinstvenim karakteristikama svog promotera, mikobakterije reaguju brzo i specifično na različite uslove spoljašnje sredine, odnosno stadijume infekcije u organizmu čoveka (Newton-Foot i sar. 2013).

1.6.1. DNK polimorfizmi u genomu sojeva MTK

Promene u genomima sojeva MTK dešavaju se usled insercija mobilnih genskih elemenata, ponavljanja DNK sekvenci, polimorfizama velikih sekvenci i/ili polimorfizama pojedinačnih nukleotida.

1.6.1.1. Mobilni genski elementi

Jedan od najčešćih uzroka genotipskog i posledično fenotipskog diverziteta sojeva MTK predstavljaju mobilni genski elementi, odnosno insercione sekvence (IS). U genomima sojeva MTK može se naći 46 IS, od kojih su najčešće IS6110, IS1081 i IS1547. IS6110, koju su prvobitno opisali Thierry i saradnici (Thierry i sar. 1990), do sada je najdetaljnije proučena. IS6110 pripada IS3 grupi mobilnih genskih elemenata, duga je 1361 bp i kodira sintezu transpozaze (McEvoy i sar. 2007). U familiji Mycobacteriaceae, ova IS prisutna je isključivo u genomima sojeva MTK, a po svojim karakteristikama zapravo je homolog IS3411 *E. coli* (Dale 1995). Osim sojeva *M. bovis*, koji imaju od jedne do pet kopija IS6110 (Otal i sar. 2008), svi ostali sojevi MTK mogu

imati od 0 do 25 kopija (Brosch i sar. 2000). Kako se IS6110 može pojaviti u različitom broju kopija i na različitim lokacijama u genomu sojeva MTK i s obzirom da je stabilna oko tri godine u genomu, ovaj molekularni marker izuzetno je koristan u epidemiološkim istraživanjima TB kao i u specijaciji sojeva MTK (van Soolingen i sar. 1991; van Embden i sar. 1993; Kremer i sar. 1999; Schürch i van Soolingen 2012).

U genomima sojeva MTK IS6110 najčešće se nalazi u DR regionu (McEvoy i sar. 2007), regionima za fosfolipazu C (Vera-Cabrera i sar. 2001) i PPE familiju gena (McEvoy i sar. 2009), intergenskom regionu između DnaA i DnaN gena (Turcios i sar. 2009) i IS1547 (Fang i sar. 1999). S obzirom da je insercija u DR lokusu prisutna kod skoro svih do sada analiziranih sojeva MTK, DR lokus se smatra prvobitnim mestom insercije IS6110, koja se desila u ranoj evoluciji MTK (Thorne i sar. 2011), a ovo otkriće dovelo je do razvoja metode za tipizaciju MTK pod nazivom spoligotipizacija. Pored integracije IS6110 u kodirajuće regione, koja dovodi do promene ekspresije gena, i homologe rekombinacije dve kopije IS6110, koja vodi u deleciju, posledice insercije IS6110 mogu biti promena promoterske aktivnosti, ushodne regulacije gena, kao i pojava rezistencije na antituberkulotike (Soto i sar. 2004; McEvoy i sar. 2007). Integracija u okviru regiona PPE gena i fosfilipaze C dovodi do promene virulencije sojeva MTK (Vera-Cabrera i sar. 2001; McEvoy i sar. 2009), dok delecija *plcA* gena usled rekombinacije IS6110 dovodi do smanjenog kapaciteta sojeva MTK za nastanak plućne TB (Kato-Maeda i sar. 2001). Broj kopija IS6110 takođe utiče i na transmisibilnost sojeva MTK. Tako se, na primer, izrazita sposobnost transmisije Beijing linije *M. tuberculosis* dovodi u vezu sa prisustvom većeg broja kopija IS6110 (Alonso i sar. 2013).

1.6.1.1.1. Polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata insercione sekvence IS6110

Polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata insercione sekvence IS6110 (eng. restriction fragment length polymorphism, RFLP IS6110), zasnovan na principu Southern blot hibridizacije, detektuje broj kopija i distribuciju IS6110 u genomu sojeva MTK (van Embden i sar. 1993; Barnes i Cave 2003; Schürch i van Soolingen 2012). Iako je dosta dugo važio za „zlatni standard” genotipizacije sojeva MTK, ovaj metod je tehnički vrlo zahtevan i ima malu diskriminatornu moć za sojeve sa malim brojem (≤ 5) kopija IS6110. Uprkos nedostacima zbog kojih je ova metoda danas uglavnom

zamenjena spoligotipizacijom i MIRU-VNTR genotipizacijom, primena RFLP IS6110 značajno je unapredila razumevanje različitih aspekata TB na globalnom nivou, poput transmisione dinamike sojeva MTK, diferencijacije egzogene reinfekcije od endogene reaktivacije i, posebno, aktivne transmisije MDR TB (Barnes i Cave 2003; Sougakoff 2011; Schürch i van Soolingen 2012; Jagielski i sar. 2014 b).

1.6.1.2. Ponavljane DNK sekvence

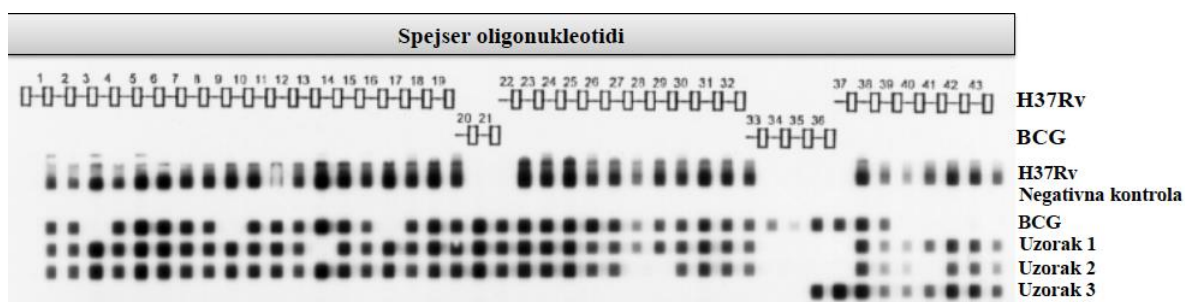
1.6.1.2.1. CRISPRs (eng. clustered regularly interspaced short palindromic repeats)

CRISPRs su ponavljane sekvence koje se sastoje od uparenih ponovaka (eng. direct repeats, DRs) dužine od 23 do 55 bp, između kojih se nalaze spejser sekvence slične dužine. Ovaj tip ponavljanih sekvenci ima funkciju adaptivnog odbrambenog sistema, koji sprečava integraciju stranih DNK molekula u genom MTK (Shariat i Dudley 2014). Kako sticanje „otpornosti“ na strane DNK sekvence zavisi od informacija koje one nose, čak i blisko povezani sojevi bakterija, kao što su članovi MTK, razlikuju se u broju DRs i prisustvu odnosno odsustvu spejser sekvenci (Groenen i sar. 1993; Kamerbeek i sar. 1997; Karginov i sar. 2010).

Među članovima MTK, DR lokus prvi put je identifikovan u genomu *M. bovis* BCG P3 (Hermans i sar. 1991). DR lokus članova MTK obuhvata seriju visoko konzerviranih direktnih ponovaka dužine 36 bp, između kojih se nalaze jedinstvene, nerepetitivne spejser sekvence dužine od 34 do 41 bp. Polimorfizam CRISPRs u genomima sojeva MTK, odnosno nedostatak spejsera, najverovatnije je posledica delecije usled homologe rekombinacije između susednih ili udaljenih DRs i transpozicije IS6110, koja je prisutna u DR lokusima većine sojeva MTK (McEvoy i sar. 2007). S obzirom da su DRs visoko konzervirani među sojevima MTK, svaka kopija DR u DR lokusu predstavlja potencijalni target za PCR amplifikaciju, a na osnovu polimorfizma DR mogu se diferencirati vrste odnosno podvrste i glavne filogenetske linije MTK (Kamerbeek i sar. 1997). Tako na primer, *M. tuberculosis* karakteriše odsustvo spejsera na pozicijama od 33 do 36, *M. bovis* na pozicijama od 39 do 43, *M. bovis* BCG na pozicijama 3, 9 i 16, dok Beijing linija *M. tuberculosis* ima spejsere samo na pozicijama od 35 do 43 (van Soolingen i sar. 2001).

1.6.1.2.1.1. Spejser oligonukleotid tipizacija

Spejser oligonukleotid tipizacija, odnosno spoligotipizacija, zasnovana je na detekciji prisustva odnosno odsustva 43 različite spejser sekvence u genomima članova MTK. Metod obuhvata amplifikaciju DR regiona, nakon čega sledi hibridizacija PCR produkata sa 43 spejser oligonukleotida kovalentno vezana za membranu, koji predstavljaju polimorfne spejser sekvence identifikovane u genomima *M. tuberculosis* H37Rv (spejseri 1-19, 22-32 i 37-43) i *M. bovis* BCG (spejseri 20-21 i 33-36). Kako je jedan od prajmera, a samim tim i PCR produkt, obeležen biotinom, rezultat hibridizacije moguće je detektovati uz pomoć sistema streptavidin-peroksidaze putem hemiluminescencije i vizuelizovati rezultat autoradiografski (Slika 4) (Kamerbeek i sar. 1997).



Slika 4. Primer rezultata spoligotipizacije (prikazani spoligotipovi *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG i tri klinička izolata).

Spoligotipizacija je tehnički relativno jednostavan i reproducibilan metod, a rezultati su dostupni za dva dana. Metod je moguće primeniti direktno u kliničkim uzorcima, živim i nevijabilnim kulturama MTK, preparatima bojenim po Ziehl-Neelsen-u i parafinskim kalupima tkiva (Jagielski i sar. 2014 b). S obzirom na visoku stabilnost DR lokusa, odnosno spor molekularni sat ovog markera, rezultati spoligotipizacije smatraju se pouzdanim. Naime, pokazano je da sojevi *M. tuberculosis* izolovani iz uzoraka istog pacijenta tokom relapsa ili infekcije različite lokalizacije, čak i u rasponu od nekoliko godina, pokazuju identične spoligotipove (Niemann i sar. 1999). Rezultati ove metode dostupni su u binarnom formatu, zahvaljujući čemu se mogu jednostavno interpretirati i porediti između laboratorija (Dale i sar. 2001). Prva internacionalna baza spoligotipova, pod nazivom SITVIT, dostupna je od 2006. godine (Brudey i sar. 2006) i obuhvata

5.309 spoligotipova od ukupno 39.609 izolata MTK poreklom iz 121 države (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo>).

Standardna metodologija spoligotipizacije značajno je unapređena uvođenjem dve nove tehnike tokom poslednjih nekoliko godina. Luminex tehnologija zasnovana je na primeni sintetičkih spejser oligonukleotidnih proba imobilisanih na mikrosferama, detekciji rezultata putem primene fluorohroma vezanih za perle i hibridizacije sa PCR produktom. Ovakvom modifikacijom standardnog pristupa u izvođenju spoligotipizacije izbegnuta je primena membrane i subjektivnost u interpretaciji rezultata, a omogućava istovremeno ispitivanje 96 izolata, u poređenju sa maksimalno 45 u standardnom protokolu (Cowan i sar. 2004; Zhang i sar. 2010). Takođe, tradicionalna tehnologija unapređena je i pojavom eseja zasnovanog na kombinaciji spoligotipizacije sa multipleks prajmerima i MALDI-TOF MS (eng. automated matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry) sistema. U poređenju sa klasičnom spoligotipizacijom, ovakav pristup omogućava jednostavnije izvođenje i analizu podataka, ali zbog cene opreme još uvek nema široku primenu (Honisch i sar. 2010).

Iako se može efikasno koristiti za tipizaciju sojeva sa ≤ 5 kopija IS6110, spoligotipizacija ipak detektuje promene koje postoje u manje od 0,1% genoma MTK i, u poređenju sa RFLP IS6110, ima manju diskriminatornu moć. Iz tog razloga, važeća strategija genotipizacije sojeva MTK podrazumeva primenu spoligotipizacije kao skrining metode, a zatim primenu neke od metoda koje karakteriše veća diskriminatorna moć (Sougakoff 2011; Schürch i van Soolingen 2012; Jagielski i sar. 2014 b).

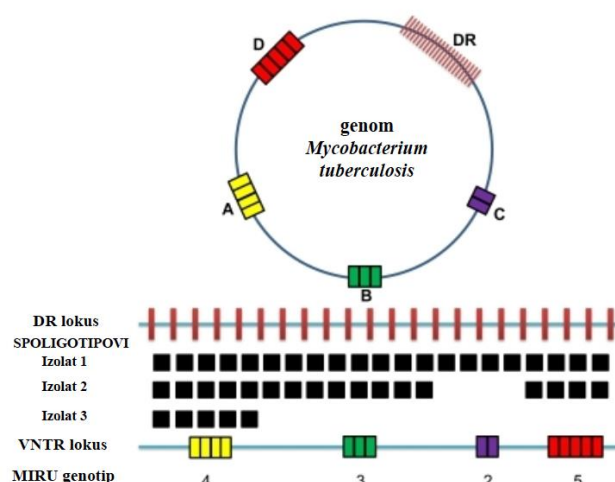
1.6.1.2.2. Minisatelitske sekvence

M. tuberculosis je jedna od prvih vrsta bakterija u čijem genomu su otkriveni tandem (upareni) ponovci, koji podsećaju na minisatelitske lokuse eukariotskog genoma (Hermans i sar. 1992). Po analogiji sa humanim i životinjskim lokusima, nazvani su lokusi varijabilnog broja tandem ponovaka (eng. variable number of tandem repeats, VNTR).

1.6.1.2.2.1. MIRU-VNTR (eng. mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat)

U okviru projekta sekvenciranja genoma *M. tuberculosis* H37Rv otkrivena je nova klasa VNTR elemenata, nazvana mikobakterijske ponavljane jedinice koje se smenjuju (eng. mycobacterial interspersed repetitive units, MIRU). MIRU elemente prvi su opisali Supply i saradnici 1997. godine, kao tandem ponovke od 46 do 101 bp raspoređene na 41 lokusu u hromozomu *M. tuberculosis* H37Rv (Supply i sar. 1997). Utvrđeno je da 12 MIRU lokusa pokazuje varijacije u broju kopija tandem ponovaka, zbog čega su ovi lokusi odabrani za genotipizaciju izolata *M. tuberculosis* primenom metode pod nazivom MIRU-VNTR (Supply i sar. 2000; Mazars i sar. 2001). MIRU-VNTR genotipizacija podrazumeva PCR amplifikaciju specifičnog MIRU lokusa i određivanje veličine amplikona putem gel elektroforeze ili, nakon multipleks PCR-a, u automatizovanom sekvenatoru. Kako je dužina MIRU ponovaka poznata, veličina amplikona predstavlja broj amplifikovanih MIRU kopija. Krajni rezultat je numerički kod predstavljen nizom cifara, koje odgovaraju broju ponovaka u svakom analiziranom lokusu (Slika 5). Zahvaljujući tome, rezultati MIRU-VNTR genotipizacije mogu se jednostavno porediti između laboratorija i deponovati u baze za epidemiološke i populacione genetičke studije (Weniger i sar. 2012).

MIRU-VNTR sa 12 lokusa ima veću diskriminatornu moć za sojeve sa malim brojem IS6110 kopija od RFLP IS6110, ali se ipak ne koristi kao jedini metod genotipizacije jer može preceniti broj realnih epidemioloških veza, posebno u velikim populacionim studijama (Cowan i sar. 2005). U cilju prevazilaženja ovog ograničenja, 2006. godine predložen je novi set sa 24 MIRU-VNTR lokusa za genotipizaciju MTK sojeva (Supply i sar. 2006). Kako 24 MIRU-VNTR i RFLP IS6110 imaju jednaku diskriminatornu moć (Oelemann i sar. 2007), a 24 MIRU-VNTR je jednostavniji za izvođenje i znatno kraće traje, ova tehnika postala je potencijalni novi „zlatni standard” za genotipizaciju sojeva MTK (Sougakoff 2011; Schürch i van Soolingen 2012; Jagielski i sar. 2014 b).



Slika 5. Shematski prikaz rezultata spoligotipizacije i MIRU-VNTR genotipizacije.

Dostupna je i internacionalna baza spoligotipova i MIRU-VNTR tipova SITVITWEB (Demay i sar. 2012), koja trenutno obuhvata 65.582 klinička izolata iz 153 države (http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/)

1.6.1.3. Polimorfizmi velikih sekvenci (LSP)

Iako su metode genotipizacije zasnovane na detekciji mobilnih i repetitivnih DNK sekvenci od neprocenljivog značaja za detekciju transmisije TB, molekularni markeri ovih metoda ipak se menjaju relativno brzo i njihove promene nisu nezavisni evolutivni događaji. Primenu ovih metoda prati fenomen homoplazije, odnosno detekcija identičnih genotipova među filogenetski nepovezanim sojevima MTK, koji nastaje kao posledica konvergentne evolucije (Warren i sar. 2002; Filliol i sar. 2006; Schürch i van Soolingen 2012; Jagielski i sar. 2014 b). S obzirom da je nedvosmislena identifikacija filogenetskih linija uslov za precizno definisanje filogenetskih odnosa, molekularni markeri moraju biti jedinstvene i, ukoliko je moguće, ireverzibilne promene u genomu. Filogenetski informativni markeri u genomima MTK, koji delimično zadovoljavaju ove kriterijume su LSP. LSP obuhvataju insercije i delecije (eng. InDels) i predstavljaju jedan od glavnih uzroka varijabilnosti genoma sojeva MTK (Alland i sar. 2007). Ovi polimorfizmi nastaju kao rezultat rekombinacije ili transpozicije insercionih sekvenci (prevashodno IS6110), ekspanzije ponavljanih DNK sekvenci ili replikacionih grešaka na bazi ponavljanih motiva, što dovodi do uklanjanja grupa gena ili skraćivanja

kodirajućih sekvenci (Brosch i sar. 2002; Garcia-Betancur i sar. 2012; Schürch i van Soolingen 2012).

Na osnovu analize delecija, nazvanih regioni diferencijacije (RDs), u genomima 875 sojeva MTK iz 80 država je po prvi put definisana globalna filogeografska populaciona struktura MTK (Brosch i sar. 2002), koja je kasnije potvrđena rezultatima analize SNP (Gagneux i Small 2007). Prema rezultatima ove analize, svakoj od šest glavnih filogenetskih linija MTK odgovara određena geografska regija (Hirsh i sar. 2004; Gagneux i sar. 2006 b; Gagneux i Small 2007). Neki LSP predstavljaju jedinstvene evolutivne promene, dok su neki prisutni u genomima sojeva koji pripadaju različitim filogenetskim linijama usled selektivnog pritiska (Alland i sar. 2007). Iz tog razloga, LSP se ipak smatraju lošijim filogenetskim markerima od SNP (Filliol i sar. 2006). Međutim, pokazano je da su određeni LSP povezani sa određenim epidemiološkim i kliničkim karakteristikama sojeva MTK. Pojedini LSP povezani su sa nastankom vanplućnih oblika TB, dok su neki odgovorni za izbegavanje imunskog odgovora domaćina, nastanak rezistencije na antituberkulotike i pojavu MDR TB, bržu progresiju iz latentne u aktivnu formu TB i poboljšanje sposobnosti transmisije sojeva MTK (Kong i sar. 2005; Malik i Godfrey-Faussett 2005; Gagneux i sar. 2006 b; Gagneux i Small 2007).

1.6.1.4. Polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (SNP)

SNP je varijacija u sekvenci DNK koja podrazumeva razliku u jednom nukleotidu (A, T, C ili G) na određenoj poziciji u genomima pripadnika date vrste. Prvi opis populacione strukture MTK zasnovan na analizi SNP u okviru *katG* i *gyrA* gena objavljen je 1997. godine (Sreevatsan i sar. 1997). Tokom poslednjih godina studije koje se bave analizama ovih molekularnih markera postaju predominantne u različitim aspektima istraživanja genoma MTK (Gutacker i sar. 2002; Filliol i sar. 2006; Comas i sar. 2009; Comas i Gagneux 2009; Homolka i sar. 2012; Casali i sar. 2014; Coscolla i sar 2015; Merker i sar. 2015).

SNP su, pored LSP, najvažniji uzrok varijabilnosti genoma sojeva MTK, a najčešće se dešavaju u kodirajućim regionima (Comas i sar. 2010; Stucki i Gagneux 2013). U zavisnosti od toga da li dovode do promena u redosledu aminokiselina, SNP mogu biti sinonimni i nesinonimni. Nesinonimni SNP imaju veći uticaj na „fitnes“ sojeva MTK i

samim tim su pod snažnijim selektivnim pritiskom od sinonimnih, koji su najčešće funkcionalno neutralni (Stucki i Gagneux 2013). Pokazano je da su dve trećine SNP u kliničkim izolatima MTK nesinonimni i da u oko 40% slučajeva nastaju na pozicijama koje su visoko konzervirane u genomima ostalih mikobakterija, zbog čega ove promene najčešće utiču na funkciju gena (Hershberg i sar. 2008; Borrell i Gagneux 2011).

Za razliku od mobilnih i ponavljanih DNK sekvenci, SNP su distribuirani po celom genomu sojeva MTK, u intra i intergenskim regijama. Karakteriše ih niža stopa reverznih mutacija i homoplazije, u poređenju sa ostalim molekularnim markerima. Zbog svih navedenih karakteristika, SNP se smatraju najpouzdanijim markerima za specijaciju vrsta/podvrsta i ispitivanje filogenetskih karakteristika MTK (Gagneux i Small 2007; Hershberg i sar. 2008; Comas i sar. 2010; Schürch i van Soolingen 2012).

Najdetaljnije proučeni SNP u genomima sojeva MTK su mutacije koje dovode do pojave rezistencije na antituberkulotike prve i druge linije (<https://tbdreamdb.com>; Sandgren i sar. 2009), koje će biti detaljno objašnjene u narednom poglavlju. Jedan od najznačajnijih pomaka u razumevanju mehanizama rezistencije sojeva MTK napravljen je upravo zahvaljujući analizi SNP. Na osnovu ove analize pokazano je da *M. tuberculosis* može steći rezistenciju i tokom perioda latencije, što je najverovatnije posledica povećanog oksidativnog stresa usled imunskog odgovora domaćina (Ford i sar. 2011). Ipak, većina SNP u genomima sojeva MTK nisu povezani sa rezistencijom na antituberkulotike. Od više hiljada do sada identifikovanih SNP u genomima sojeva MTK, funkcionalni efekti su otkriveni kod manjine. Neki od prepoznatih funkcionalnih efekata odnose se na ćelijske i fenotipske promene sa kliničkim posledicama, ali jasno je da tek počinjemo da sagledavamo uticaj ovih genskih promena na biologiju sojeva MTK i njihov odnos sa domaćinom (Stucki i Gagneux 2013).

1.6.1.4.1. Prednosti SNP u odnosu na druge molekularne markere u genomu sojeva MTK u molekularno epidemiološkim studijama

Kao što je navedeno, stabilnost genotipova tokom vremena zavisi od evolutivne stope, odnosno molekularnog sata molekularnog markera, a genska stabilnost markera presudno utiče na diskriminatornu moć metoda genotipizacije. U skladu sa tim, idealni molekularni marker mogao bi se definisati kao onaj čiji je molekularni sat dovoljno brz da se na osnovu njega mogu razlikovati sojevi izolovani iz uzoraka epidemiološki

nepovezanih osoba, ali koji je u isto vreme dovoljno spor da omogući identifikaciju sojeva izolovanih od osoba sa dokazanom epidemiološkom vezom (van der Spuy i sar. 2003). Jasno je da bi primena metoda zasnovanih na detekciji molekularnih markera koji evoluiraju prebrzo mogla dovesti do neprepoznavanja nedavne transmisije između obolelih, dok metode koje su zasnovane na primeni „presporih“ markera mogu dovesti do lažne detekcije transmisije. Sa druge strane, za razlikovanje reaktivacije od reinfekcije neophodna je primena markera sa brzim molekularnim satom, dok je praćenje puteva transmisije i evolucije sojeva MTK moguće jedino ispitivanjem markera sa sporim molekularnim satom. Tako je, na primer, poluživot IS6110 kraći od poluživota DR lokusa (Kremer i sar. 1999; Niemann i sar. 1999), dok je molekularni sat MIRU-VNTR lokusa sporiji od IS6110 (Savine i sar. 2002). Najčešće korišćene metode genotipizacije MTK, RFLP IS6110, spoligotipizacija i MIRU-VNTR, koje sa baziraju na detekciji mobilnih i ponavljanih DNK sekvenci, karakteriše latentni rizik od konvergentne evolucije, verovatno usled visoke učestalosti mutacija, nenasumične integracije IS6110 i favorizovanja određenih mutacija. Konvergentna evolucija predstavlja tip evolucije tokom kog u organizmima evoluiraju slične strukture ili funkcije, uprkos tome što su ancesori tih istih organizama potpuno različiti i nepovezani. Drugim rečima, sojevi MTK mogu imati iste RFLP IS6110, spoligo i MIRU-VNTR profile, a da zapravo uopšte nisu u filogenetskoj vezi. Zbog toga je korist od primene ovih metoda, prema nekim autorima, ograničena (Schürch i van Soolingen 2012).

Jedan od dokaza nedostataka klasičnih metoda genotipizacije predstavlja detekcija diskretnih promena genotipskih profila sojeva *M. tuberculosis* koji su izolovani iz uzoraka epidemiološki povezanih pacijenata, kao i sojeva izolovanih iz uzoraka istog pacijenta u različitim vremenskim periodima (Cave i sar. 2005; Al-Hajoj i sar. 2010). Osim toga, identifikacija potpuno ili skoro identičnih genotipova sojeva MTK poreklom od dve osobe, čak i ako su identifikovani primenom najdiskriminativnijih tehnika genotipizacije, nije apsolutni dokaz nedavne transmisije. Ovakav rezultat takođe može biti posledica simultane reaktivacije prethodno stečene infekcije istim genotipom (koincidencija vremena), regionalne predominacije datog genotipa tokom vremena ili laboratorijske kontaminacije (Seidler i sar. 2004). Takođe, identični genotipovi ne ukazuju obavezno na klonalnost, čak i kada su rezultat detekcije više genskih markera,

što je najbolje ilustrovano u studiji Niemann i saradnika (2009). U okviru ovog istraživanja izvršeno je poređenje kompletnih genoma dva Beijing genotipa iz Karakalpakstana, od kojih je jedan bio osjetljiv na antituberkulotike, a drugi MDR. Oba izolata imala su identičan IS6110 RFLP profil i iste alele u 23 od 24 MIRU-VNTR lokusa, ali su se ipak razlikovali u 130 SNP i jednom LSP. Rezultati ove studije dokazuju da se izolati *M. tuberculosis* koji imaju identične genotipske profile ipak mogu značajno razlikovati na nivou genoma, što može dovesti do pogrešne interpretacije stepena transmisije u određenoj populaciji i/ili pogrešne diferencijacije između relapsa i reinfekcije.

Na osnovu svega navedenog jasno je da još uvek ne postoji idealan metod genotipizacije sojeva MTK. Smatra se da je za detaljno ispitivanje filogenije MTK i donošenje validnih epidemioloških zaključaka u vezi sa etiologijom, spektrom domaćina i transmisijom TB neophodno sekvenciranje celog genoma primenom tehnika sekvenciranja nove generacije (eng. whole genome next generation sequencing, NGS), koje se predominantno zasniva na analizi SNP. Zbog čitavog niza prednosti nad klasičnim tehnikama genotipizacije, očekuje se da će ovaj metod u bliskoj budućnosti postati novi zlatni standard za tipizaciju sojeva MTK (Schürch i van Soolingen 2012; Jagielski i sar. 2014 b).

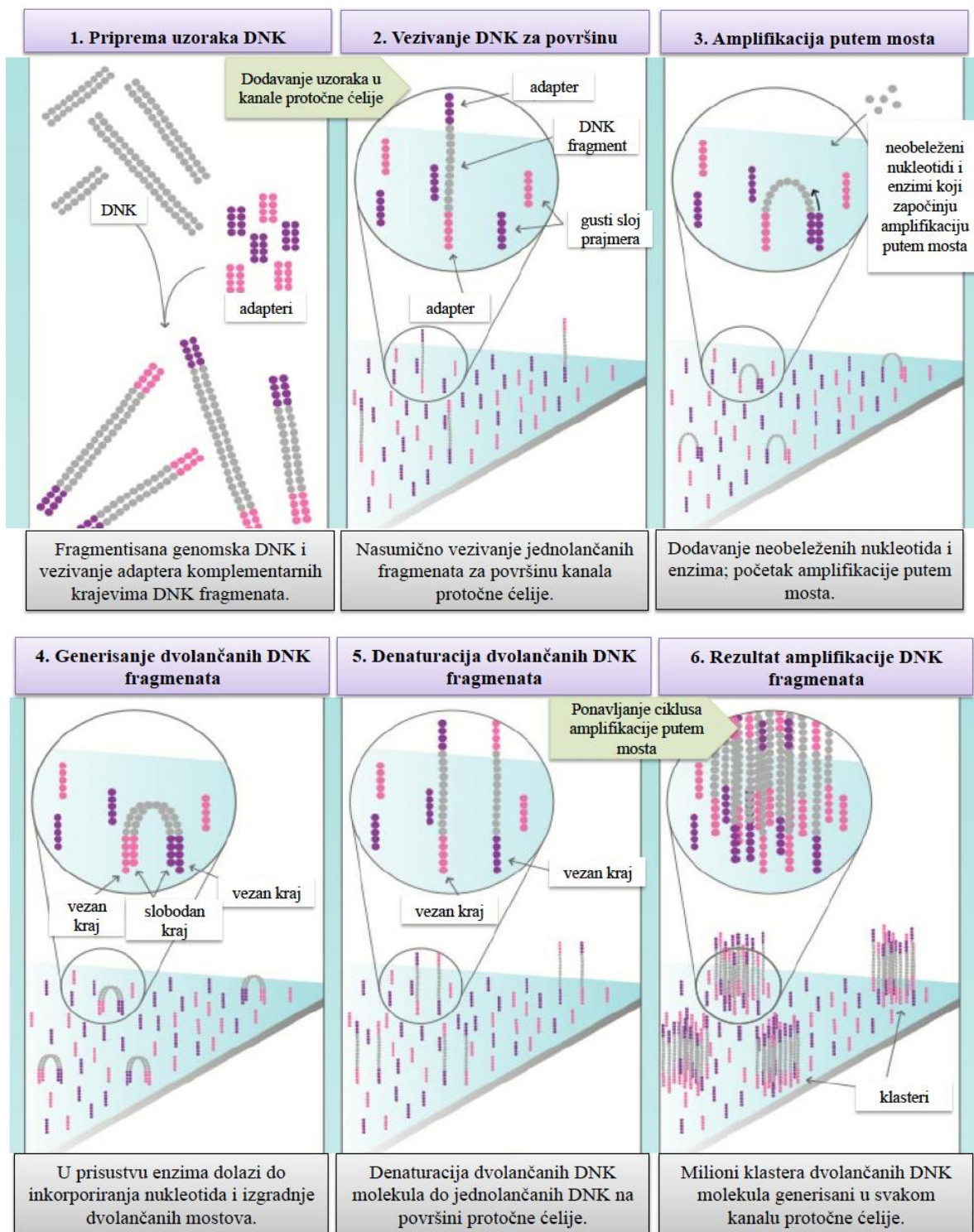
1.6.1.4.2. NGS

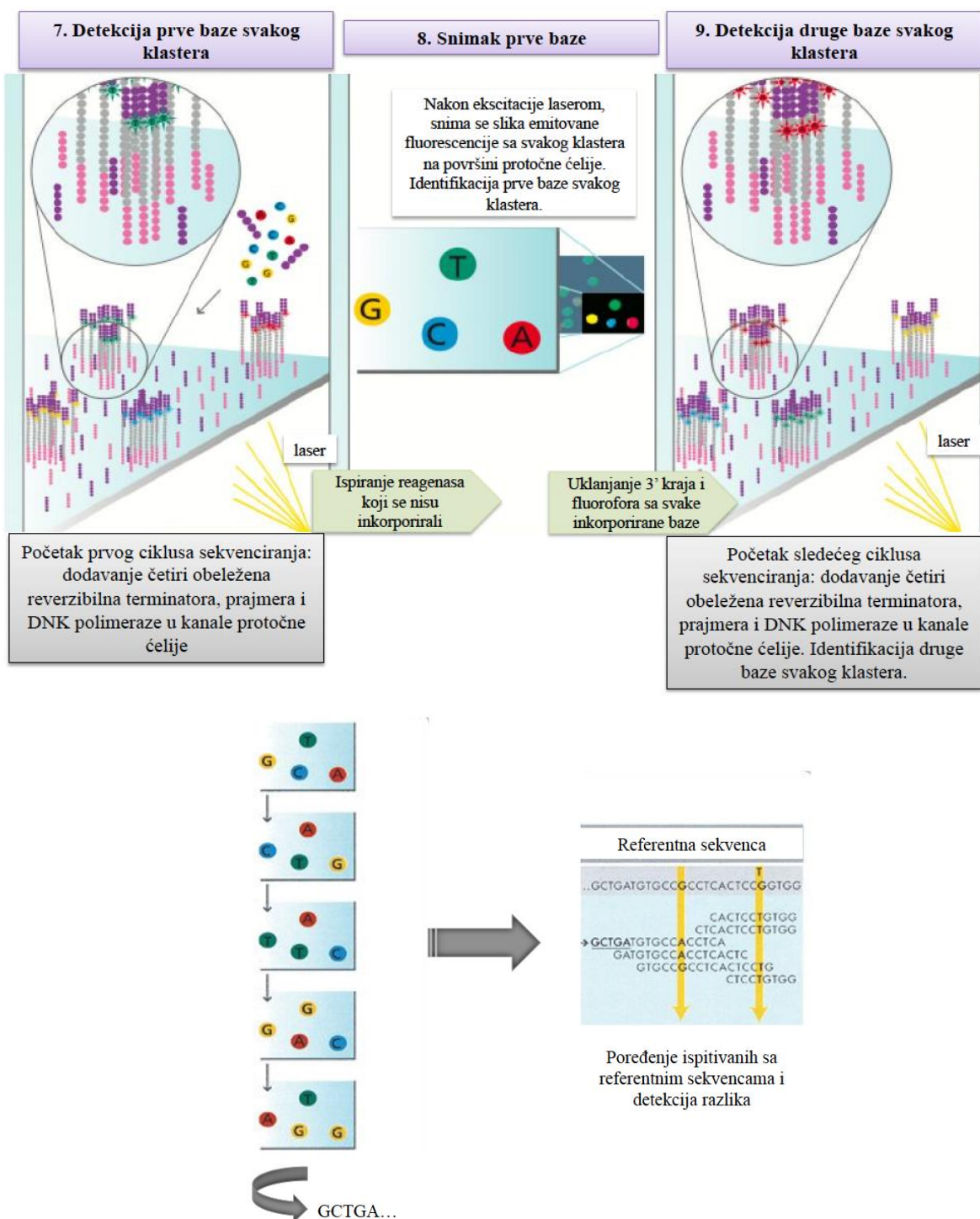
Nakon uspešnog sekvenciranja i objavljivanja kompletne sekvence humanog genoma 2004. godine, tradicionalno Sanger sekvenciranje postepeno zamenjuju platforme za sekvenciranje nove generacije. One se pojavljuju kao odgovor na zahteve za jeftinom, brzom i preciznom metodom, koja će omogućiti sekvenciranje velikog broja kompletnih genoma u kratkom vremenskom periodu. Prva platforma nove generacije pojavljuje se 2005. godine, da bi tokom proteklih nekoliko godina došlo do ekspanzije brojnih platformi zasnovanih na različitim tehnologijama. Danas je moguće sekvencirati na stotine gigabaza za samo nekoliko sati. Činjenica da je sekvencu genoma, koja nosi praktično sve informacije o bakteriji, moguće dobiti za tako kratak vremenski period, učinila je NGS nezamenljivom metodom u savremenoj kliničkoj mikrobiologiji (Didelot i sar. 2012; Xuan i sar. 2013). Kada je reč o TB, trenutno je u toku preko 200 projekata zasnovanih na primeni NGS, koji se bave različitim aspektima ovog oboljenja

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>). Rezultati ovakvih istraživanja, zajedno sa novim bioinformatičkim algoritmima, postaju nezamenljiv resurs za dalje otkrivanje evolucije, epidemiologije, mehanizama rezistencije na antibiotike i fenotipskih varijabilnosti izazivača TB.

1.6.1.4.3. Illumina platforma za sekvenciranje genoma

Jedna od najčešće korišćenih platformi za sekvenciranje nove generacije jeste Illumina platforma za sekvenciranje genoma. Zasniva se na primeni tehnike sekvenciranja putem sinteze i reverzibilnih terminatora (Bentley i sar. 2008; Turcatti i sar. 2008). Nakon pripreme DNK biblioteka optimalne veličine (koje služe kao obrasci za sekvenciranje), adapteri se vezuju za oba kraja DNK fragmenata, kako bi jednolančani DNK fragmenti mogli da se vežu za površinu protočne ćelije. Za umnožavanje DNK fragmenata koristi se amplifikacija putem mosta (eng. bridge amplification), koja podrazumeva dodavanje neobeđenih nukleotida i enzima u cilju produkcije klastera identičnih DNK lanaca. Nakon amplifikacije DNK lanaca na površini protočnih ćelija, počinje sekvenciranje tako što DNK polimeraza inkorporira fluorescentno obeležene, reverzibilne terminator nukleotide. Svaki nukleotid obeležen je drugačijom fluorescentnom bojom i, u svakom ciklusu sekvenciranja, na lanac DNK dodaje se pojedinačan obeležen dNTP. Fluorescentni obeleživač nukleotida predstavlja terminator polimerizacije, tako da se posle inkorporacije svakog dNTP fluorescentna boja slika radi identifikacije baze, a zatim enzimski odvaja, kako bi se inkorporirao sledeći nukleotid. Optički instrument beleži emitovanu fluorescenciju u svakom ciklusu sekvenciranja, a kako je svaki nukleotid komplementaran DNK obrascu, rezultat je niz baza, odnosno sekvenci DNK obrazaca. Illumina MiSeq sekvenator čita 150 bp sa svakog kraja DNK obrasca (Slika 6) (Dark 2013; Xuan i sar. 2013).





Slika 6. Shematski prikaz postupka sekvenciranja genomske DNK u Illumina MiSeq sekvenatoru (preuzeto iz Illumina sequencing technology, 2010).

1.7. Značaj genotipizacije sojeva MTK

Za razliku od većine drugih bakterijskih patogena koji imaju sposobnost HTG, striktno klonalna priroda MTK uslovljava isključivo vertikalnu, odnosno transmisiju genskog

materijala sa majke na ćerke ćelije. Klonalnost MTK olakšava filogenetske analize ovog kompleksa vrsta/podvrsta, jer su isključivi uzrok varijabilnosti genomske mutacije.

Mogućnosti primene rezultata genotipizacije sojeva MTK su veoma široke. Primenom metoda genotipizacije moguće je otkriti i utvrditi: evolutivne karakteristike MTK; filogenetske linije/genotipove; globalnu i regionalnu geografsku distribuciju genotipova MTK i posledičnu specifičnu vezu između određenih genotipova bacila TB i određenih populacija ljudi; puteve transmisije sojeva MTK u populaciji; epidemije i mikroepidemije TB; faktore rizika za transmisiju TB; problem razlikovanja reaktivacije od egzogene reinfekcije; laboratorijsku kontaminaciju; i širenje visoko rizičnih sojeva, kao što su MDR i XDR sojevi MTK (Barnes i Cave 2003; Sougakoff 2011; Schürch i van Soolingen 2012; Jagielski i sar. 2014 b). Tipičan primer uspešne primene klasičnih tehnika genotipizacije MTK, RFLP IS6110, spoligotipizacije i MIRU-VNTR, su epidemiološka istraživanja odnosno detekcija lanaca transmisije TB, razlikovanje relapsa od reinfekcije i detekcija laboratorijske kontaminacije (Barnes i Cave 2003; Sougakoff 2011; Schürch i van Soolingen 2012; Jagielski i sar. 2014 b). Međutim, kao što je navedeno, ove metode zbog mogućnosti homoplazije nisu optimalne za filogenetska istraživanja i ispitivanje evolucije MTK. Ključnim molekularnim markerima za filogenetsko-evolutivne analize MTK smatraju se LSPs i SNPs, a sekvenciranje genoma primenom NGS u kombinaciji sa komparativnom genomikom i populaciono genetičkim ispitivanjima je jedini način da se otkrije i eventualno predvidi uticaj genskih polimorfizama na fenotipske karakteristike kliničkih sojeva MTK (Filliol i sar. 2006; Gagneux i sar. 2006 b; Gutacker i sar. 2006; Comas i sar. 2009; Comas i Gagneux 2009; Coscolla i sar. 2010). Poznavanje filogeografske strukture i njenog uticaja na fenotip sojeva MTK je od velikog značaja za razvoj novih dijagnostičkih metoda, lekova i vakcina za TB (Gagneux i Small 2007; Cubillos-Ruiz i sar. 2010). Sumirano, detaljan uvid u odnos između genotipova i fenotipova sojeva MTK predstavlja neophodan doprinos razvoju novih mera kontrole, prevencije i, u konačnom ishodu, moguće eradikacije TB.

1.7.1. Različiti aspekti primene NGS u ispitivanju genomskog diverziteta MTK

Ubrzo nakon kompletiranja sekvence genoma laboratorijskog soja *M. tuberculosis* H37Rv (Cole i sar. 1998), sekvenciran je i genom kliničkog izolata *M. tuberculosis*

CDC 1551. U pitanju je soj izolovan u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) tokom epidemije TB u periodu 1994-1996. godina (Valway i sar. 1998; Fleischmann i sar. 2002). Na osnovu komparacije ova dva genoma identifikovano je 1075 SNP i 86 LSP većih od 10 bp. Analizom identifikovanih LSP kod 169 kliničkih izolata, utvrđeno je da su genomi kliničkih sojeva *M. tuberculosis* daleko varijabilniji nego što se očekivalo (Fleischmann i sar. 2002). Saznanje da laboratorijski sojevi pokazuju manje specifičnih polimorfizama od kliničkih izolata, ukazalo je na uticaj selektivnog pritiska humanog imunskog odgovora na varijabilnost sojeva MTK. Detekcijom specifičnih polimorfizama dokazana je i povezanost određenih insercija i delecija sa pojedinim filogenetskim linijama, odnosno ustanovljeno je da se ove promene mogu uspešno koristiti kao markeri za genotipizaciju i praćenje sojeva (Cubillos-Ruiz i sar. 2008; Cubillos-Ruiz i sar. 2010; Abadia i sar. 2010). Takođe, pokazano je da pojedini polimorfizmi, koji su prethodno smatrani odgovornim za nastanak rezistencije sojeva MTK na antituberkulotike, zapravo predstavljaju filogenetski informativne SNPs (Cubillos-Ruiz i sar. 2010).

Povezanost glavnih filogenetskih linija MTK sa određenim geografskim regijama nedvosmisleno ukazuje na koevoluciju genotipova bacila TB i ljudi, kao i na proces adaptacije patogena koji svakako podrazumeva i izmene na nivou genoma. U prilog koevolucije čoveka i bacila TB govori i činjenica da među osobama inficiranim ovom bakterijom samo do 10% razvije bolest tokom života. Takođe, spektar manifestacija bolesti je širok i značajno se razlikuje među individuama, od samoograničavajuće respiratorne infekcije, preko ekstraplućnih manifestacija do diseminovane bolesti. Ovakva situacija jasno ukazuje na istovremeni uticaj određenih predisponirajućih faktora od strane organizma domaćina i genskih varijacija samog bacila TB na ishod infekcije (Di Pietrantonio i sar. 2011; Kodaman i sar. 2014). Jedan od najboljih primera uticaja genske pozadine sojeva MTK na ishod infekcije je Beijing linija. U pitanju je genotip čija je povećana virulencija udružena sa produkcijom fenol glikolipida (PGL), koji nije prisutan kod drugih linija MTK, a značajno utiče na imunski odgovor domaćina (Parwati i sar. 2010; Hanekom i sar. 2011). PGL se smatra faktorom koji značajno doprinosi većoj sposobnosti transmisije ovog genotipa odnosno češćoj pojavi epidemija izazvanih ovim genotipom u poređenju sa drugim filogenetskim linijama MTK. U pogledu uticaja varijabilnosti rezistentnih sojeva MTK na ishod infekcije,

izvanredan primer predstavlja istraživanje uzroka epidemije izazvane XDR sojem *M. tuberculosis* u KwaZulu-Natal (KZN) regiji u južnom delu Afrike. Ishod ove epidemije bio je poražavajući: od 53 pacijenta koinficirana HIV-om, 52 su umrle za samo 16 dana (Gandhi i sar. 2006). Nakon analize sekvenciranih genoma XDR, MDR i osetljivih KZN sojeva, zaključeno je da je epidemija posledica eksplozivne klonalne ekspanzije samo jednog, primarno XDR soja *M. tuberculosis*, a ne evolucije MDR u XDR sticanjem mutacija u genima rezistencije na antituberkulotike, kako je prvobitno pretpostavljeno (Ioerger i sar. 2009).

Uticaj faktora domaćina na ishod infekcije izazvane sojevima MTK ilustrovan je u publikaciji Comas i saradnika (2010), koji su pokazali da sekvence *M. tuberculosis* za prepoznavanje humanih T ćelijskih epitopa pokazuju izrazito malo varijacija i da su visoko konzervirane u odnosu na ostatak genoma. Sugerisano je da su ove sekvence, nasuprot očekivanjima, pod negativnom selekcijom odnosno da je prepoznavanje od strane imunskog sistema za *M. tuberculosis* zapravo korisno (Comas i sar. 2010). Jedno od mogućih objašnjenja je da je T ćelijski odgovor domaćina neophodan sojevima *M. tuberculosis* za uspostavljanje latentne infekcije. Tome u prilog govori činjenica da infekcija bacilom TB HIV pozitivnih osoba značajno brže progredira u aktivno oboljenje, dok se kod imunokompetentnih sa normalnim T ćelijskim odgovorom uspostavlja latentna infekcija, koja tek nakon nekoliko decenija može preći u aktivnu formu (Daley i sar. 1992). Pored toga, T ćelijski odgovor značajno doprinosi interhumanoj transmisiji sojeva MTK, posebno kod kavernozne TB koja rezultira većim brojem sekundarnih slučajeva od svih drugih formi (Rodrigo i sar. 1997), a veoma retko se javlja kod HIV pozitivnih (Mukadi i sar. 1993). Odsustvo varijacija u sekvencama za T ćelijske epitope na neki način daje sojevima MTK prednost u odnosu na domaćina, jer povećava njihovu sposobnost transmisije. Slične karakteristike ima HIV, za koji je dokazano da povećava svoju virulenciju ne da bi se intenzivnije replikovao u domaćinu, već da bi povećao verovatnoću sopstvene transmisije (Comas i sar. 2010). Svakako da ovakva saznanja imaju veoma veliki značaj u razvoju novih vakcina protiv TB (Kaufmann 2011).

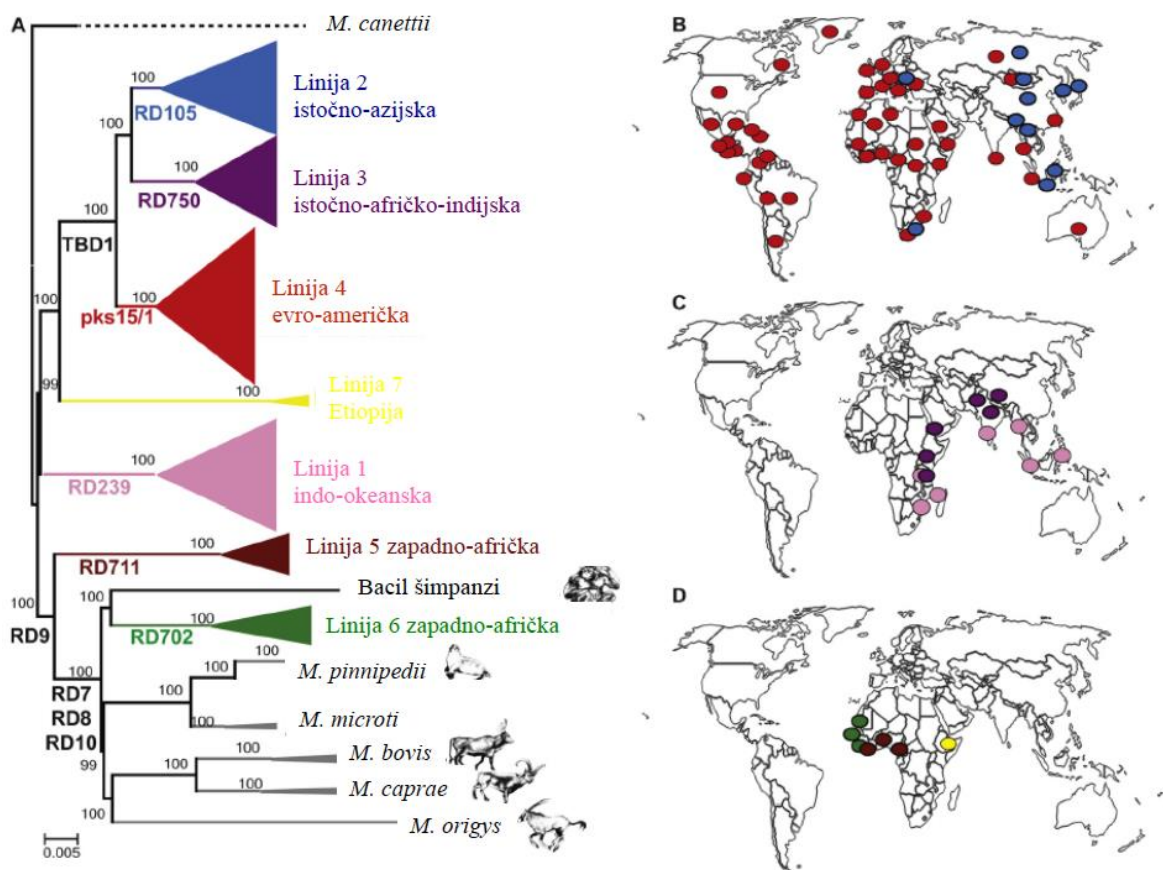
Uloga NGS postaje nezamenljiva i u istraživanjima vezanim za razvoj novih lekova za TB, koji bi mogli skratiti režim terapije, delovati na perzistentne bacile i sprečiti širenje TB rezistentne na lekove (Barot i sar. 2013). S obzirom na dokazanu varijabilnost

sojeva MTK, jasno je da se efikasnost lekova na sojeve razlikuje u zavisnosti od njihove genske pozadine, što je i pokazano na primeru određenih lekova u razvoju i Haarlem linije (Cubillos-Ruiz i sar. 2010). Aktuelni pristup u otkrivanju novih antituberkulotika nezamisliv je bez ekstenzivne analize cirkulišućih sojeva MTK u populacijama, nakon čega sledi identifikacija targeta u genomu, celocelijski skrining i reinženjering poznatih hemijskih molekula (Koul i sar. 2011).

1.7.2. Filogeografska populaciona struktura MTK

Na osnovu analize LSP i SNP, u okviru MTK definisano je sedam glavnih i preko 50 filogenetskih podlinija. Glavne filogenetske linije MTK su (Slika 7):

- linija 1 (indo-oceanska), rasprostranjena oko Indijskog okeana, obuhvata istočno-afričko-indijsku (EAI) i MANU linije;
- linija 2 (istočno-azijska), obuhvata Beijing liniju sa visokom prevalencijom u zemljama istočne, jugoistočne Azije i Rusiji;
- linija 3 (istočno-afričko-indijska), prevalentna u istočnoj Africi, severnoj Indiji i Pakistanu, obuhvata centralno-azijsku liniju (CAS);
- linija 4 (evro-američka), prevalentna u Evropi i Americi, širi se ka Africi i zemljama srednjeg istoka; podeljena na linije T, Haarlem, latino-američko-mediteransku (LAM), S i X, koje obuhvataju 34 podlinije;
- linija 5 (zapadno afrička 1) i linija 6 (zapadno afrička 2), prevalentne u različitim delovima zapadne Afrike;
- linija 7, identifikovana u Etiopiji i kod emigranata iz Etiopije.



Slika 7. A) Stablo maksimalne verovatnoće MTK (brojevi na granama označavaju bootstrap vrednosti nakon 1.000 replikacija; koren stabla – *M. canettii* kao spoljna grupa); B-D) dominantne linije MTK po državama; panel B – najrasprostranjenije linije; panel C – srednje rasprostranjene linije; panel D – najmanje rasprostranjene linije. Modifikacija slike iz Coscolla i Gagneux 2014.

Pored očiglednih razlika u geografskoj distribuciji, genske linije i podlinije sojeva MTK razlikuju se i prema patobiološkim karakteristikama, kao što su sposobnost transmisije, tip interakcije na relaciji domaćin-patogen, brzina akumulacije mutacija odgovornih za pojavu rezistencije na antituberkulotike, klinička prezentacija TB i osetljivost na BCG vakcinu (Brosch i sar. 2002; Gagneux i sar. 2006 b; Gagneux i Small 2007; Comas i sar. 2009; Demay i sar. 2012; Ford i sar. 2013; Comas i sar. 2013; Firdessa i sar. 2013). Prema tome, jasno je da poznavanje filogeografske populacione strukture sojeva MTK, pored nesumnjivog naučnog značaja, ima i konkretne praktične medicinske i epidemiološke implikacije.

Ključne filogenetske linije i podlinije MTK za globalnu ekspanziju MDR TB su Beijing, Haarlem, LAM i T (Sougakoff 2011), pri čemu se Beijing posebno izdvaja visokom stopom učestalosti mutacija odgovornih za pojavu rezistencije na izoniazid i rifampicin (Ford i sar. 2013). U Evropi je, na primer, u Portugaliji predominantna linija LAM, u Francuskoj Haarlem i LAM, u Turskoj T, Haarlem i TUR, a u Rusiji i pribaltičkim zemljama linija Beijing (Sougakoff 2011). Filogenetske karakteristike lokalnih MDR sojeva MTK još uvek su nepoznate za veliki broj zemalja, uključujući i zemlje jugoistočne Evrope. Dosadašnja istraživanja sojeva MTK u ovom regionu, bez posebnog osvrta na MDR sojeve, pokazala su prisustvo linija odnosno podlinija T, Haarlem, LAM, S i X (Demay i sar. 2012).

1.7.3. Evolucija MTK

1.7.3.1. Evolutivni scenario I

Prema prvom scenariju o evoluciji MTK, izolati MTK podeljeni su u tri glavne filogenetske grupe za koje se smatra da potiču od istog ancestor, koji je najbliži vrsti *M. bovis*. Prema ovom scenariju, MTK je prošao kroz evolutivno „usko grlo” pre oko 10.000 do 15.000 godina, a vrsta *M. tuberculosis* je evoluirala od *M. bovis* usled adaptacije životinjskog patogena na organizam čoveka. *M. tuberculosis* postaje humani patogen u periodu prelaska Paleolita u Neolit, odnosno kada čovek počinje da se bavi poljoprivredom i pripitomljava životinje (Stead i sar. 1995; Sreevatsan i sar. 1997).

1.7.3.2. Evolutivni scenario II

Prema ovom scenariju, *M. canettii* je nastao od ancestor MTK pre svih drugih poznatih članova ovog kompleksa, a progenitor modernih *M. tuberculosis* sojeva već je bio humani patogen kada su se *M. africanum* i *M. bovis* odvojile od *M. tuberculosis*. Sojevi *M. tuberculosis* podeljeni su na ancestralne sojeve, koji imaju TbD1 region u genomima, i moderne sojeve, u čijim genomima je usled delecije došlo do gubitka TbD1. Ancestralni sojevi *M. tuberculosis* danas su predominantni u endemskim krajevima (Afrika i Indija), dok moderni sojevi imaju globalnu geografsku distribuciju (Brosch i sar. 2002).

U poređenju sa genomom *M. canettii*, genom *M. tuberculosis* karakteriše daleko niži odnos sinonimnih i nesinonimnih substitucija, što govori u prilog nedavne ekspanzije ove vrste. Drugim rečima, MTK se sastoji od uspešne klonske populacije koja je nastala od mnogo starije i veće vrste koju su činili *M. canettii* i drugi glatki bacili, a koja je nazvana *M. prototuberculosis*. Genomi članova MTK, uprkos trenutnoj klonalnoj i visoko konzerviranoj strukturi, zapravo predstavljaju mešavine genskih sekvenci koje su rezultat nekadašnjih multiplih HTG između progenitora bacila TB. Očigledno odsustvo rekombinacija među modernim sojevima MTK prema mišljenju nekih autora može imati nekoliko objašnjenja: od gubitka kapaciteta sojeva MTK za HTG, preko mogućnosti da se HTG dešava među modernim bacilima TB, ali veoma retko, do pretpostavke da se ekološka niša današnjih sojeva MTK značajno razlikuje od niše *M. prototuberculosis* i ne pruža mogućnosti za HTG. Kako su skoro svi glatki bacili izolovani do trenutka objave ovih rezultata poticali iz istočne Afrike, a *M. canettii* i *M. tuberculosis* su striktno humani patogeni, pretpostavljeno je da je i *M. prototuberculosis* bio humani patogen, da potiče iz istočne Afrike i da je star oko tri miliona godina, koliko i ljudski rod. Migracije ljudi van Afrike u ostale delove sveta pratila je i ekspanzija MTK, što dovodi do globalne distribucije ovog kompleksa (Gutierrez i sar. 2005). To potvrđuju i rezultati Gagneux i saradnika (2006 b), u čijoj studiji je prvi put objavljena filogeografska populaciona struktura MTK. Za razliku od svih ostalih područja, na kojima je registrovano postojanje najviše dve različite linije *M. tuberculosis*, na području Afrike detektovano je prisustvo svih šest linija (Gutierrez i sar. 2005; Gagneux i sar. 2006 b). Sa prvim migracijama ljudi sa afričkog kontinenta, pre oko 50.000 godina, počinje i širenje MTK u ostale delove sveta, od Indijskog okeana, preko severne Evrope i zapadne Indije do istočne Azije. Povećanjem populacija ljudi u ovim regijama dolazi do stvaranja povoljne ekološke niše za klonalnu ekspanziju pojedinih linija MTK, a sa daljim migracijama ljudi, trgovinom i osvajanjima van ovih delova sveta i širenja ovih linija u druga geografska područja.

Herhsberg i saradnici (2008), međutim, dokazuju da između ancestralnih i modernih linija MTK postoje mnogo izraženije razlike nego što je zaključeno na osnovu analize delecija. Iako životinjski patogeni MTK zapravo predstavljaju ekotipove adaptirane na veliki broj različitih životinjskih vrsta, ispostavilo se da je genski diverzitet među humanim patogenima ovog kompleksa izražen koliko i diverzitet među životinjskim.

Uzrok ovakvog diverziteta je visok odnos nesinonimnih i sinonimnih SNP koji je dokazan u genomima svih striktno humanih patogena MTK osim *M. canettii*, a koji postoji usled redukcije negativne selekcije. Usled smanjene negativne selekcije i akumulacije nesinonimnih SNP, čak oko 40% promena aminokiselina ima funkcionalne posledice. Klonalnost, odsustvo HTG, serija „uskih grla” kroz koje humani patogeni MTK, posebno *M. tuberculosis*, prolaze tokom transmisije infekcije, filogeografska populaciona struktura i činjenica da različite lezije u plućima inficiranih individua mogu nositi genski udaljene subklonove istog soja, smatraju se ključnim faktorima koji dovode do smanjenja veličine populacije MTK i redukcije negativne selekcije. U maloj populaciji organizama, nasumični genski drift dešava se češće od prirodne selekcije, zahvaljujući čemu mutacije, koje bi u velikoj populaciji organizama bile eliminisane prirodnom selekcijom, dovode do funkcionalnih posledica, odnosno velikog funkcionalnog diverziteta vrsta MTK. Redukcija selektivnog pritiska je prema nekim autorima uzrok i širenja MDR TB. Naime, mutacije u genima rezistencije često negativno utiču na sposobnost transmisije sojeva *M. tuberculosis*, ali usled redukovane negativne selekcije ove biološki „skupe” mutacije mogu perzistirati i u odsustvu antibiotika. Kako je kompleksna veza *M. tuberculosis* sa humanim demografskim i migratornim događajima jasno dokazana, ovakvi efekti smanjene negativne selekcije na bacil TB mogli bi, zajedno sa stalnim povećanjem veličine humane populacije, urbanizacijom i globalnom mobilnošću ljudi, pogoršati globalno epidemiološko stanje MDR TB (Herhsberg i sar. 2008).

1.7.3.3. Evolutivni scenario III

Napredak tehnika NGS prati veliki broj filogenetskih studija o MTK čiji rezultati pružaju detaljniji uvid u karakteristike genoma članova MTK i njihove evolutivne odnose. Comas i saradnici (2013) dokazuju da su vrste MTK adaptirane na životinje filogenetski najbližije filogenetskoj liniji 6. Analize SNP potvrđuju klonalnost i afričko poreklo MTK (Brosch i sar. 2002; Hirsh i sar. 2004; Comas i Gagneux 2007; Hershberg i sar. 2008), a poređenjem filogenije MTK sa stablom konstruisanim iz 4.955 mitohondrijskih genoma, koji predstavljaju glavne humane haplogrupe, potvrđena je i paralelna koevolucija čoveka i MTK (Comas i sar. 2013). Međutim, prema NGS analizama, MTK je adaptiran na organizam čoveka pre 70.000 godina, a na ekspanziju

ovog kompleksa dominantan uticaj je imalo povećanje gustine humane populacije, koje je pratilo osnivanje naseobina tokom neolitsko demografske tranzicije (Comas i sar. 2013).

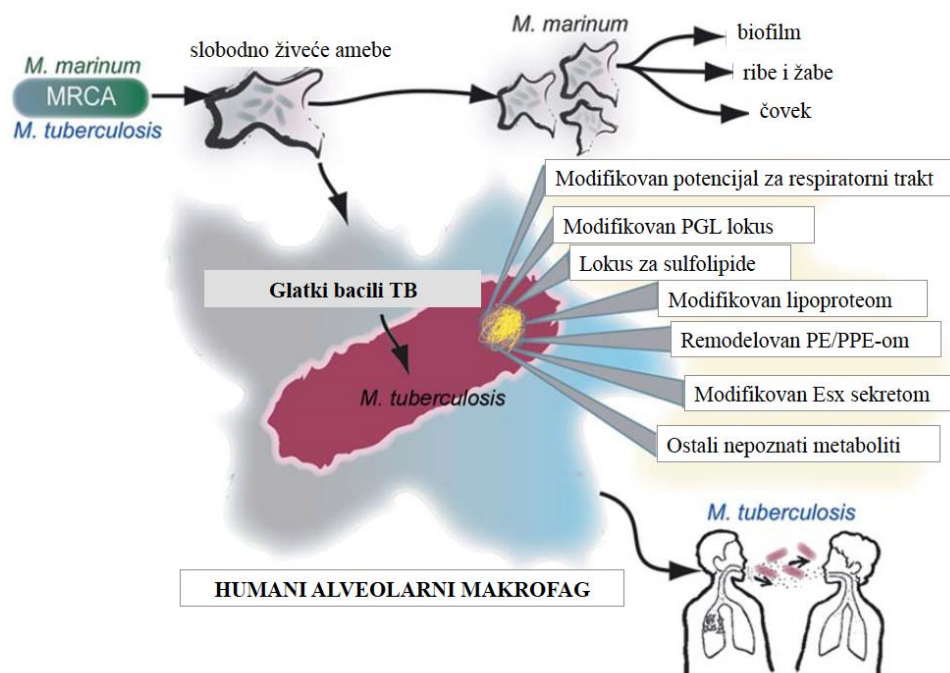
Coscolla i saradnici (2013) u studiji u kojoj je otkrivena poslednji član MTK, bacil šimpanzi, dovode u pitanje dotadašnju tvrdnju da je ancestor *M. tuberculosis* bio humani patogen i ističu mogućnost da je imao širi spektar domaćina, uključujući pre svega divlje životinje i druge sisare. Ovaj stav potvrđen je i rezultatima studije Bos i saradnika (2014) koji su sekvencirali genome bacila TB iz ostataka humanih skeleta iz Perua starih 1.000 godina i pokazali da su ovi genomi najbliži genomu *M. pinnipedii*, dok se od genoma modernih sojeva *M. tuberculosis* značajno razlikuju. Prema ovoj studiji, zajednički ancestor MTK star je oko 6.000 godina, a do njegove transmisije na čoveka dolazi preko morskih sisara.

1.7.3.4. Evolutivni scenario IV

NGS analize genoma NTM otvorile su niz novih spekulacija o poreklu i evoluciji MTK. Prema ovom scenariju, *M. tuberculosis*, *M. marinum* i *M. ulcerans* su evoluirali od zajedničkog ancestoru iz okruženja, s tim što su bacili TB paralelno gubili određene gene i dobili čak 600 novih gena putem HTG, kako bi se specijalizovali za život u organizmu čoveka i drugih sisara (Stinear i sar. 2008). Imajući u vidu da je prirodno stanište *M. marinum* vodena sredina u kojoj ova vrsta parazitira u slobodno živećim amebama, može se pretpostaviti da je adaptacija na život u protozoama verovatno podstakla kasniju adaptaciju na intracelularni život u humanim makrofagima (Bottai i sar. 2014). Rezultati istraživanja zasnovanih na poređenju genoma *M. tuberculosis* i *M. kansasii*, ukazuju da je *M. tuberculosis* stekao najmanje 137 gena putem HTG od *M. kansasii* i da je sličniji ovoj nego vrstama *M. marinum* i *M. ulcerans* (Veyrier i sar. 2009; Veyrier i sar. 2011).

Donekle različiti zaključci autora koji su poredili genome *M. tuberculosis* sa genomima vrsta NTM mogu se objasniti time da relativna filogenetska pozicija organizma može varirati u skladu sa različitim evolutivnim istorijama gena analiziranih u različitim studijama. Sumirano, poslednji predložen evolutivni scenario za MTK podrazumeva da je *M. tuberculosis*, nakon odvajanja od NTM, prošao bifazni evolutivni proces koji je

istovremeno obuhvatio povećanje genoma putem sticanja gena i duplikacija i redukciju veličine genoma putem delecija (Slika 8) (Bottai i sar. 2014).



Slika 8. Makro i mikroevolucija bacila TB. U prvoj evolutivnoj fazi vrste NTM slične *M. kansasii* stižu nove gene putem HTG, koji im omogućavaju adaptaciju na intracelularnu nišu usled čega dolazi do stvaranja profesionalnog patogena, odnosno bacila TB. U drugoj fazi nastaju različite vrste odnosno podvrste MTK putem mutacija i delecija DNK. Preuzeto iz Bottai i sar. 2014.

1.8. Rezistencija sojeva MTK na antituberkulotike

Posebno veliki problem u kontroli TB predstavlja rezistencija sojeva MTK na antituberkulotike (ATL). ATL su klasifikovani u tri linije i pet grupa (Tabela 3) (WHO 2010; Zumla i sar. 2013).

Primarna (urođena) rezistencija sojeva MTK na ATL nastaje kao posledica spontanih mutacija u okviru određenih gena, koje se u svakoj populaciji bacila javljaju sa učestalošću oko 10^{-9} . S obzirom da se mutacije dešavaju na hromozomskim genima koji nisu povezani, verovatnoća da bacil bude primarno rezistentan na dva ATL istovremeno iznosi $<10^{-18}$. Iz tog razloga, savremena terapija TB zasniva se na kombinaciji četiri ATL.

Za razliku od ostalih bakterija, kod kojih sekundarna (stečena) rezistencija na antibiotike nastaje usled horizontalnog transfera mobilnih genskih elemenata, ovaj vid

rezistencije kod sojeva MTK nastaje isključivo usled akumulacije mutacija do koje dolazi zbog specifičnih karakteristika soja i/ili faktora okoline. Stečena rezistencija sojeva MTK najčešće je posledica suboptimalnog terapijskog protokola, odnosno primene neadekvatnog terapijskog režima, odbijanja terapije od strane pacijenta ili primene neodgovarajućih doza ATL (Pasipanodia i Gumbo 2011; Da Silva i Palomino 2011).

Tabela 3. Antituberkulotici (ATL).

ATL prve linije	
Grupa 1	oralni: streptomycin, izoniazid, rifampicin, pirazinamid, etambutol, rifapentin ili rifabutin
ATL druge linije	
Grupa 2	injekcioni aminoglikozidi: amikacin, kanamicin; injekcioni ciklični peptidi: kapreomicin, viomicin
Grupa 3	oralni i injekcioni fluorohinoloni: ciprofloksacin, levofloksacin, moksifloksacin, ofloksacin, gatifloksacin
Grupa 4	oralni: para-aminosalicilna kiselina, cikloserin, terizidon, etionamid, protionamid, tioacetazon, linezolid
ATL treće linije	
Grupa 5	klofazimin, linezolid, amoksicilin i klavulanska kiselina, imipenem i cilastatin, klaritromicin

Takođe, pokazano je da terapija antiretrovirusnim lekovima menja farmakodinamska svojstva ATL (Perlman i sar. 2005), kao i da interreakcije ATL mogu povećati verovatnoću nastanka rezistencije (Louw i sar. 2011). Pored toga, određene mutacije koje su povezane sa nastankom rezistencije na jedan ATL, mogu biti uzrok ukrštene rezistencije na druge ATL (Muller i sar. 2011). Neophodno je pomenuti i fenomen fenotipske tolerancije sojeva MTK na ATL, koji je karakteristika dormanata odnosno perzistentnih bacila. Iako ne moraju biti genotipski rezistentni, dormanti zbog niskog stepena metabolizma koji ih karakteriše preživljavaju u prisustvu ATL. S obzirom da perzistencija produžava životni vek bacila, ukoliko su dormanti izloženi dejstvu antibiotika tokom latentne infekcije, povećana je verovatnoća sticanja i pozitivne selekcije mutacija koje dovode do rezistencije (Ford i sar. 2011; Müller i sar. 2013 a).

1.8.1. Molekularni mehanizmi rezistencije na antituberkulotike prve linije

1.8.1.1. Rifampicin

Rifampicin (R) je ATL prve linije koji ispoljava baktericidno dejstvo na bacile TB u fazi rasta i bacile sa niskom metaboličkom aktivnošću u stacionarnoj fazi (Sala i sar. 2010; Piccaro i sar. 2013). Učestalost spontanih mutacija koje dovode do rezistencije na R iznosi 10^{-7} - 10^{-8} (Zhang i Yew 2009; Santos 2012).

Ciljno mesto dejstva R je β subjedinica RNK polimeraze, koju kodira *rpoB* gen sojeva MTK, a krajnji efekat je blokada elongacije iRNK. Do rezistencije na R najčešće dolazi usled mutacija u regionu od 81 bp *rpoB* gena (amino kiseline 507–533) (Campbell i sar. 2001; Koch i sar. 2014), koji nosi naziv region koji determiniše rezistenciju na R (eng. rifampicin resistance-determining region, RRDR). S obzirom da je RRDR region prvi put identifikovan u genomu *E. coli* (Jin i Gross 1988), pozicije aminokiselina u okviru ovog regiona u genomima ostalih bakterija obeležavaju se u skladu sa numeracijom u RRDR *E. coli* (Telenti i sar. 1993; Koch i sar. 2014). Mutacije u RRDR regionu dovode do konformacionih promena RNK polimeraze i slabljenja afiniteta aktivnog mesta u enzimu za R, a identifikovane su kod 96% sojeva MTK rezistentnih na ovaj antibiotik (Da Silva i Palomino 2011). Zamena citozina timinom nalazi se u osnovi S531L i H526Y mutacija, koje najčešće dovode do visokog nivoa rezistencije sojeva MTK na R (Mokrousov 2004; Sandgren i sar. 2009), ali i ukrštene rezistencije na sve rifamicine (Zhang i Yew 2009). Sojevi MTK sa mutacijama na pozicijama 511, 516, 518 i 522 imaju nizak nivo rezistencije na RIF i rifapentin, a osetljivi su na rifabutin i rifalazil (Williams i sar. 1998; Zhang i Yew 2009).

U studiji Ford i saradnika (2013) pokazano je da se broj *rpoB* mutacija povezanih sa rezistencijom na R značajno razlikuje među različitim filogenetskim linijama MTK. Ova opservacija, zajedno sa rezultatima studija u kojima su identifikovane mutacije niskog nivoa rezistencije i mutacije van RRDR regiona (Matsiota-Bernard i sar. 1998; Pozzi i sar. 1999; Herrera i sar. 2003; Siu i sar. 2011) ukazuje na neophodnost daljih istraživanja doprinosa retkih mutacija *rpoB* gena u nastanku rezistencije na R (Koch i sar. 2014).

1.8.1.2. Isoniazid

Isoniazid (I) je ATL prve linije koji se sastoji iz piridinskog prstena i hidrazidne grupe, pri čemu obe strukturne komponente ispoljavaju snažno dejstvo na bacile TB u fazi rasta. Učestalost spontanih mutacija koje dovode do rezistencije sojeva MTK na ovaj antibiotik iznosi 10^{-5} - 10^{-6} bacila *in vitro* (Zhang i Yew 2009; Santos 2012).

Do aktivacije I u organizmu čoveka dolazi pod uticajem enzima katalaze-peroksidaze (KatG) koju kodira *katG* gen sojeva MTK, nakon čega dolazi do oslobađanja kiseoničnih radikala i toksičnih organskih produkata, koji napadaju brojna ciljna mesta u bacilima TB. Glavno mesto dejstva I je enoil ACP reduktaza (InhA), koja učestvuje u elongaciji masnih kiselina prilikom sinteze mikolične kiseline. Aktivni produkti oslobođeni tokom aktivacije I posredovane enzimom KatG, reaguju sa nikotinamid adenin dinukleotidom (NAD(H)) da bi formirali produkt I-NAD, a zatim deluju na InhA, što rezultira prekidom sinteze mikolične kiseline (Zhang i Yew 2009; Santos 2012).

Najčešći uzrok rezistencije na I su mutacije *katG* gena, koje dovode do smanjene ekspresije ili potpunog gubitka KatG enzima. Od 50 do 95% kliničkih izolata MTK rezistentnih na I ima substituciju serina treoninom na poziciji 315 (S315T) u *katG* genu. Interesantno je da se S315T češće javlja u genomu MDR nego u genomima sojeva monorezistentnih na I (Da Silva i Palomino 2011).

Rezistencija na I često je i posledica mutacija u promoter regionu *mabA/inhA* operona (-15C→T), što dovodi do prekomerne ekspresije InhA i povećane sinteze enzima InhA. Druga mogućnost je mutacija u aktivnom mestu *inhA*, zbog čega dolazi do smanjenja afiniteta InhA za I-NAD produkt, čime je enzim zaštićen od dejstva I. Mutacije u *inhA* ili promoter regionu ovog gena dovode do niskog nivoa rezistencije na I, ređe se javljaju od *katG* mutacija, ali su češće karakteristika monorezistentnih nego MDR sojeva MTK. Osim toga, *inhA* mutacije su uzrok ukrštene rezistencije na etionamid, koji je strukturno sličan I (Leung i sar. 2006; Zhang i Yew 2009; Da Silva i Palomino 2011).

Gen *ahpC* sojeva MTK kodira alkil hidroperoksid reduktazu, koja doprinosi otpornosti bakterije na reaktivne produkte kiseonika i azota. Kod sojeva rezistentnih na I koji nemaju enzim KatG, mutacije u promoter regionu *ahpC* gena vode povećanoj produkciji *katG* enzima, odnosno kompenzuju nedostatak katalaza/peroksidaze, zbog čega mogu poslužiti kao indikator rezistencije na I (Sherman i sar. 1996; Da Silva i

Palomino 2011). Do niskog nivoa rezistencije na I može doći i usled mutacija u *mshA* genu koji kodira glikoziltransferazu. Mutacije u ovom genu takođe doprinose nastanku visokog nivoa rezistencije sojeva *M. tuberculosis* i *M. bovis* na etionamid (Vilcheze i sar. 2008; Vilcheze i sar. 2011). Mutacije *ndh* gena koje dovode do rezistencije na I i etionamid usled smanjene aktivnosti NADH dehidrogenaze su u genomu sojeva *M. tuberculosis* najčešće prisutne u kombinaciji sa mutacijama *inhA* i *katG* gena. Jedna od dve najčešće mutacije u *ndh* (V18A) detektovana je i kod sojeva osetljivih na I (Cardoso i sar. 2007). Mutacije u okviru *kasA* gena, koje dovode do prekomerne ekspresije β -ketoacil-ACP sintaze uključene u sintezu meromikolične kiseline, takođe su identifikovane u sojevima MTK rezistentnim na I (Slayden i Barry 2002). Iako su *kasA* mutacije detektovane i u sojevima osetljivim na I, ne treba isključiti uticaj ovih mutacija na nastanak rezistencije na I (Johnson i sar. 2006; Santos 2012).

Oko 20-30% izolata MTK rezistentnih na I nema mutacije u genima povezanim sa rezistencijom na ovaj antibiotik. Prema rezultatima poslednjih studija, jedno od mogućih objašnjenja je uloga efluks pumpe (Rodrigues i sar. 2012). Takođe, pokazano je da mutacije u intergenskim regionima mogu imati ulogu u nastanku rezistencije na I. Mutacije *oxyR-ahpC* regiona dovode do smanjene ekspresije *inhA* gena (Dalla-Costa i sar. 2009), dok mutacije u *furA-katG* regionu smanjuju ekspresiju *katG* gena (Ando i sar. 2011), što može biti uzrok rezistencije na I.

1.8.1.3. Streptomycin

Streptomycin (S) pripada grupi aminoglikozida i predstavlja prvi antibiotik koji je primenjen u lečenju TB. Iako prema savremenoj klasifikaciji pripada ATL druge linije, u Srbiji se ovaj antibiotik još uvek svrstava u ATL prve linije. Ciljna mesta dejstva S su 16S rRNK i ribozomalni protein S12, komponente 30S subjedinice ribozoma, a posledice aktivnosti ovog antibiotika su inhibicija započinjanja translacije, prekid sinteze proteina i smrt isključivo bacila TB u fazi rasta (Zhang i Yew 2009; Santos 2012).

Oko 70% sojeva MTK rezistentnih na S ima mutacije u genima koji kodiraju sintezu komponenti ribozoma, odnosno *rpsL* (S12) i *rrs* (16S rRNK) genima (Gillespie 2002; Zhang i Yew 2009; Prozorov i sar. 2012). Najčešća *rpsL* mutacija je substitucija lizina argininom u kodonu 43, dok mutacije *rrs* gena uglavnom nastaju na pozicijama 519-530

(Zhang i Yew 2009; Prozorov i sar. 2012). Mutacije u *gidB* genu, koji kodira 16S RNK-specifičnu metilguanozin transferazu, odgovorne su za pojavu niskog nivoa rezistencije na S kod oko 30% sojeva MTK (Okamoto i sar. 2007), ali su takođe detektovane i u sojevima osetljivim na ovaj antibiotik (Spies i sar. 2011). Pokazano je da uzrok niskog nivoa rezistencije na S kod određenog broja sojeva MTK bez mutacija u navedenim genima, može biti i eliminacija antibiotika iz bakterijske ćelije usled aktivnosti efluks pumpe (Spies i sar. 2008).

1.8.1.4. Etambutol

Etambutol (E) [(S,S')-2,2'(etilendiimino)di-1-butanol] je bakteriostatski antibiotik koji deluje na bacile TB u fazi replikacije (Zhang i Yew 2009). Ciljno mesto dejstva E je enzim arabinozil transferaza, produkt *embB* gena. E inhibira polimerizaciju arabinana i dovodi do akumulacije D-arabinofuranozil-P-dekaprenola, usled čega dolazi do prekida sinteze arabinogalaktana i povećanja propustljivosti ćelijskog zida sojeva MTK (Mikusova i sar. 1995; Zhang i Yew 2009).

Do nastanka rezistencije sojeva MTK na E najčešće dolazi usled mutacija u *embCAB* operonu, dominantno mutacija kodona 306 *embB* gena, koje su uzrok rezistencije na E kod oko 70% izolata MTK (Zhang i Yew 2009; Santos 2012). Međutim, mutacije *embB* detektovane su u 20% ispitivanih sojeva MTK osetljivih na E (Lee i sar. 2004), što pojedini autori objašnjavaju problemima vezanim za izvođenje fenotipskih testova za ispitivanje osetljivosti sojeva MTK na ovaj antibiotik (Plinke i sar. 2009). Sa druge strane, pokazano je da neke substitucije aminokiselina dovode do rezistencije na E, dok neke ne menjaju profil osetljivosti sojeva MTK na ovaj antibiotik (Safi i sar. 2008). Takođe, rezultati analiza MDR sojeva MTK osetljivih na E pokazali su da postoji udruženost mutacija *embB* kodona 306 sa rezistencijom na veći broj antituberkulotika i povećanjem sposobnosti transmisije rezistentnih sojeva MTK (Hazbon i sar. 2005). S obzirom da kod značajnog broja sojeva MTK rezistentnih na E nisu identifikovane mutacije, moguće je da postoji neki drugi mehanizam odgovoran za nastanak rezistencije na ovaj antibiotik (Zhang i Yew 2009; Da Silva i Palomino 2011).

1.8.1.5. Pirazinamid

Pirazinamid (Z) je strukturni analog nikotinamida i ispoljava baktericidno dejstvo na perzistentne bacile u sredini sa niskom pH vrednošću (pH=5,5) (Zhang i Yew 2009; Da Silva i Palomino 2011).

U prisustvu pirazinamidaze/nikotinamidaze, produkta *pncA* gena, Z prelazi u pirazinoičnu kiselinu, aktivnu formu koja ometa energetske metabolizam, snižava intraćelijski pH i inhibira brojne ćelijske funkcije sojeva MTK. Ciljno mesto dejstva Z još uvek nije identifikovano, ali se pretpostavlja da je u pitanju neki od molekula uključenih u energetske metabolizam membrane bacila TB. Međutim, brojni autori smatraju da ovaj antibiotik nema specifično ciljno mesto dejstva, već dovodi do smrti bacila TB posleđično, putem acidifikacije ćelije (Zhang i Yew 2009; Santos i sar. 2012). Sojevi *M. bovis* su urođeno rezistentni na Z zbog tačkaste mutacije C u G na poziciji nukleotida 169, odnosno substitucije amino kiseline na poziciji 57 *pncA* gena (Scorpio i Zhang 1996).

Najveći broj sojeva *M. tuberculosis* rezistentnih na PZA ima mutacije u okviru *pncA* gena (70-98%), koje dovode do gubitka aktivnosti pirazinamidaze/nikotinamidaze (Zhang i Yew 2009; Da Silva i Palomino 2011). Ipak, mali broj sojeva MTK sa niskim nivoom rezistencije na Z, nema mutacije *pncA* gena. Pokazano je da određeni broj ovakvih sojeva ima prekomernu ekspresiju *rpsA* gena do koje dovodi delecija alanina 438 na C kraju. Usled ove delecije dolazi do prekida vezivanja pirazinoične kiseline, koja inače sprečava interakciju između *rspA* i transfer iRNK i tako inhibira trans-translaciju. Prekomerna ekspresija *pncA* na taj način omogućava sojevima MTK da, zahvaljujući procesu trans-translacije, prežive u uslovima stresa i nedostatka hranljivih materija (Shi i sar. 2011). Uloga mutacija *rpsA* gena u nastanku rezistencije na Z kod kliničkih izolata MTK još uvek nije poznata (Smith i sar. 2013).

1.8.2. Molekularni mehanizmi rezistencije na antituberkulotike druge linije

1.8.2.1. Fluorohinoloni

Fluorohinoloni (FLQ) su baktericidni antibiotici, čija se aktivnost zasniva na inhibiciji DNK giraze (topoizomeraze II) i topoizomeraze IV, enzima koji omogućavaju superuvijanje DNK i rasplitanje lanaca nukleinskih kiselina za potrebe replikacije i

transkripcije. DNK giraza sojeva MTK je tetramerni A2B2 protein, pri čemu A i B subjedinice kodiraju *gyrA* i *gyrB* geni (Zhang i Yew 2009).

Rezistencija sojeva MTK na FLQ primarno je posledica mutacija *gyrA* i *gyrB* gena, koje nastaju u okviru regiona koji determinišu rezistenciju na hinolone (eng. quinolone-resistance-determining regions, QRDR). QRDR *gyrA* gena obuhvata 320 bp, a mutacije su najčešće u kodonima 90, 91 i 94, a najređe u kodonu 88 (Zhang i Yew 2009; Santos 2012). Mutacije QRDR *gyrB* gena koji obuhvata 375 bp dešavaju se znatno ređe od *gyrA* mutacija (Maruri i sar. 2012). Procenat kliničkih izolata MTK rezistentnih na FLQ koji imaju *gyr* mutacije značajno se razlikuje među studijama i iznosi od 2 do 100% (Cheng i sar. 2004; Zhang i Yew 2009). Ovaj fenomen objašnjava se razlikama u performansama testova za ispitivanje osetljivosti, ali i mogućom ulogom drugih mehanizama rezistencije na FLQ, poput povećanja propustljivosti ćelijskog zida, aktivnosti efluks pumpe, razgradnje i inaktivacije antibiotika (Zhang i Yew 2009). Moguće je da do nastanka rezistencije na ciprofloksacin i sparfloksacin dolazi i usled ekspresije MfpA proteina, koji se vezuje za DNK girazu i inhibira njenu aktivnost, zahvaljujući sličnosti sa B formom DNK (Hegde i sar. 2005). Iako je dokazan *in vitro*, značaj ovog mehanizma rezistencije na FLQ u kliničkim izolatima MTK još uvek nije poznat (Da Silva i Palomino 2011).

1.8.2.2. Etionamid, protionamid i tioamidi

Etionamid (ETH) (2-etilizonikotinamid) i protionamid (PTH) (2-etil-4-piridinkarbotioamid) su derivati izonikotinske kiseline i ispoljavaju baktericidno dejstvo na *M. tuberculosis*, *M. avium* kompleks i *M. leprae* (Zhang i Yew 2009).

Nakon aktivacije u prisustvu NADPH-specifične FAD monooksigenaze (EtaA/EthA), ETH inhibira enzim InhA i sintezu mikolične kiseline (Wang i sar. 2007). S obzirom da I i ETH imaju isto osnovno ciljno mesto delovanja, sojevi MTK su često polirezistentni na ova dva antibiotika. Pokazano je da izolati za niskim nivoom rezistencije na I često pokazuju nizak nivo rezistencije na ETH, a da su sojevi sa visokim nivoom rezistencije na I osetljivi na ETH (Morlock i sar. 2003). Ovako očigledan paradoks smatra se posledicom dejstva različitih specifičnih mehanizama koji aktiviraju I i ETH, ali i negativnom regulacijom *ethA* gena, koji kodira EtaA/EthA, od strane *ethR* (Brossier i sar. 2011).

Oko 80% izolata MTK rezistentnih na ETH ima mutacije *ethA*, *ethR*, *inhA* gena ili *inhA* promotera (Brossier i sar. 2011). Nastanak rezistencije na ovaj antibiotik kod sojeva MTK koji nemaju mutacije u navedenim genima, dovodi se u vezu sa mutacijama *ndh* i/ili *mshA* gena. Iako su *ndh* mutacije identifikovane kod određenog broja izolata *M. tuberculosis* osetljivih na I (Lee i sar. 2001; Cardoso i sar. 2007), dokazano je da dovode do rezistencije *M. smegmatis* i *M. bovis* na I i ETH. Pretpostavljeni mehanizam ove rezistencije je povećanje intracelularne koncentracije NADH i kompetitivne inhibicije vezivanja I-NAD i ETH-NAD za InhA (Vilcheze i sar. 2005). Mutacije *mshA* gena detektovane su *in vitro* kod sojeva rezistentnih na I i ETH, ali njihov uticaj na rezistenciju kliničkih izolata MTK još uvek nije dokazan (Vilcheze i sar. 2008; Vilcheze i sar. 2011).

1.8.2.3. Para-aminosalicilna kiselina

Para-aminosalicilna kiselina (PAS) se koristi u lečenju TB od sredine prošlog veka, a mehanizam dejstva ovog antibiotika otkriven je tek nedavno. Na osnovu sličnosti u strukturi PAS i prekursora para-aminobenzoične kiseline (PABA) i antagonizma ova dva molekula, prvobitno je pretpostavljeno da PAS ometa sintezu folata putem inhibicije dihidropteroat sintaze (DHPS) (Youmans i sar. 1947). Međutim, nedavno je pokazano da se PAS inkorporira u metabolički put folata putem DHPS i dihidrofolat sintaze (DHFS/folC), dovodi do produkcije antimetabolita hidroksil dihidrofolata, koji zatim inhibira DHFS (Chakraborty i sar. 2013; Zheng i sar. 2013). Drugim rečima, antibiotik imitira supstrat esencijalnog enzima dovodeći do formiranja bioaktivnog produkta, koji zatim zaustavlja metabolički put. Mutacije DHFS odnosno *folC* gena doprinose nastanku rezistencije na PAS. Takođe, u kliničkim izolatima MTK rezistentnim na PAS detektovana je prekomerna ekspresija bifunkcionalnog enzima RibD (eng. riboflavin biosynthesis protein), za koji se pretpostavlja da je funkcionalni analog DHFS (Zheng i sar. 2013).

Rezistencija laboratorijskih i kliničkih sojeva MTK na PAS dovodi se u vezu i sa mutacijama *thyA* gena, koji kodira folat-zavisnu timidilat sintazu (Fivian-Hughes i sar. 2012). Ipak, samo oko trećina sojeva MTK rezistentnih na PAS ima mutacije *thyA* (Fivian-Hughes i sar. 2012), a mutacija Thr202Ala, koja je do nedavno smatrana

najčešćom *thyA* mutacijom (Leung i sar. 2010), zapravo predstavlja filogenetski marker za LAM liniju *M. tuberculosis* (Feurreiegel i sar. 2010).

Nakon studije Zheng i saradnika (2013), u kojoj je prvi put opisana substitucija *folC* gena soja H37Rv *M. tuberculosis* rezistentnog na PAS, pokazano je da čak 70% sojeva *M. tuberculosis* H37Ra i *M. bovis* BCG kao i 9% kliničkih izolata MDR *M. tuberculosis* rezistentnih na PAS ima mutacije *folC* gena. Mutacije *folC* gena dovode do smanjene aktivnosti DHFS i blokade aktivacije i dejstva PAS (Zhao i sar. 2014). Jasno je da su dalja istraživanja neophodna u cilju detaljnijih objašnjenja genetičke osnove rezistencije na PAS.

1.8.2.4. Aminoglikozidi i ciklični peptidi

Kanamycin (KM) i amikacin (AM) pripadaju grupi aminoglikozida i dovode do prekida sinteze proteina vezujući se za 16S rRNK 30S subjediniice ribozoma, koju kodira *rrs* gen. Kapreomicin (CM) i viomicin (VM) pripadaju grupi cikličnih peptida i takođe prekidaju sintezu proteina, ali vezujući se za 2'-O-metiltransferazu (rRNK metiltransferazu), koju kodira *tlyA* gen (Da Silva i Palomino 2011).

Do rezistencije na KM i AM najčešće dovodi A1401G polimorfizam *rrs* gena (Georghiou i sar. 2012), dok mutacije promoter regiona *eis* gena, koji kodira aminoglikozid acetiltransferazu, dovode do rezistencije niskog nivoa na KM, ali ne i na AM (Zaunbrecher i sar. 2009). Do nastanka rezistencije na CM i VM dolazi usled mutacija *tlyA* i *rrs* gena (Johansen i sar. 2006). Interesantno je da mutacije *rrs* gena često dovode do ukrštene rezistencije sojeva MTK na KM, AM, CM i VM. Sojevi rezistentni na CM i VM zajedno sa *tlyA* mutacijama mogu imati C1402T ili G1484T *rrs* mutacije, dok sojevi rezistentni na CM, ali ne i na VM mogu imati mutaciju A1401 *rrs* gena. Mutacija A1401G može dovesti do rezistencije na KM i CM, ali ne i na VM (Maus i sar. 2005).

Rezultati novijih studija, međutim, ukazuju na to da ukrštena rezistencija sojeva MTK na aminoglikozide i ciklične peptide nije apsolutna i da verovatno postoje i dodatni mehanizmi rezistencije sojeva MTK na ove grupe antibiotika (Engstrom i sar. 2011; Campbell i sar. 2011).

1.8.2.5. Cikloserin

D-cikloserin (CS) inhibira sintezu peptidoglikana putem kompetitivne inhibicije alanin racemaze (Alr) i D-alanin-D-alanin ligaze. Na osnovu rezultata studija koji ukazuju na uticaj prekomerne ekspresije *alrA* na nastanak rezistencije *M. smegmatis* na D-cikloserin (Halouska i sar. 2014), pretpostavlja se da mutacije *alrA* gena takođe doprinose nastanku rezistencije sojeva MTK na ovaj antibiotik.

1.8.3. Molekularni mehanizmi rezistencije na antituberkulotike treće linije

1.8.3.1. Linezolid

Linezolid pripada grupi oksazolidinona i dovodi do prekida sinteze proteina vezujući se za 50S subjedinicu ribozoma (Bozdogan i sar. 2004; Dietze i sar. 2008). Rezistencija na linezolid detektovana je kod 1,9% kliničkih MDR izolata *M. tuberculosis* u studiji Richter i saradnika (2007), a mutacije 23S rRNK (G2061T, G2447T, G2576T) i ribozomalnog proteina L3 (T460C *rplC*) identifikovane su u *in vitro* generisanim i kliničkim izolatima MTK rezistentnim na ovaj antibiotik (Hilemann i sar. 2008; Lee i sar. 2012; Beckert i sar. 2012; Zhang i sar. 2014 a). Iako se mutacije gena za 23S rRNK trenutno smatraju ključnim za nastanak rezistencije na linezolid (Beckert i sar. 2012; Zhang i sar. 2014 a), visoka prevalencija Beijing MDR sojeva rezistentnih na ovaj antibiotik ne isključuje mogućnost uloge dodatnih mehanizama rezistencije (Zhang i sar. 2014 a).

1.8.4. „Fitnes“ sojeva MTK koji nose mutacije u genima povezanim sa rezistencijom na antituberkulotike

S obzirom da su ciljna mesta dejstva ATL produkti esencijalnih gena, jasno je da će mutacije u ovim genima ometati ključne fiziološke funkcije bakterijske ćelije. Drugim rečima, svaka mutacija povezana sa rezistencijom ima svoju cenu, odnosno „fitness cost”. U skladu sa tim, očekivano je da će u odsustvu antibiotika sojevi bez ovakvih mutacija biti sposobniji da održe životni ciklus u različitim uslovima, a sojevi koji nose multiple mutacije imati oslabljenu sposobnost transmisije, sposobnost da izazovu infekciju i perzistiraju u domaćinu. Međutim, pokazano je da mutacije koje dovode do rezistencije imaju različit „fitness cost”, odnosno da neke mutacije vrlo malo utiču ili

čak ne utiču na „fitnes“ sojeva rezistentnih na antibiotike. Interesantno je da većina kliničkih sojeva MTK ima upravo ovakve mutacije, što se objašnjava njihovom pozitivnom selekcijom (Pym i sar. 2002; Sander i sar. 2002; Gagneux i sar. 2006 a; Gagneux 2009). Osim toga, otkriven je čitav niz mutacija čija je uloga da kompenzuju negativan uticaj mutacija povezanih sa rezistencijom na „fitnes“ soja. Upravo takvi polimorfizmi smatraju se ključnim za pojavu i održavanje populacija rezistentnih bacila TB, koje će preživeti selektivne pritiske, očuvati sposobnost rasta i postati epidemiološki dominantne (Müller i sar. 2013 a; Farhat i sar. 2013; Koch i sar. 2014). Ova opservacija potvrđena je i matematičkim modelima, prema kojima uspeh MDR i XDR sojeva MTK u najvećoj meri zavisi od relativnog „fittesta“ rezistentnih u odnosu na osetljive sojeve MTK (Cohen i Murray 2004; Blower i Chou 2004).

Prvi kompenzatorni mehanizam identifikovan u genomu sojeva MTK bila je prekomerna ekspresija *ahpC* gena, koja kompenzuje mutacije *katG* gena (Sherman i sar. 1996). Nekoliko godina kasnije, u studiji Gagneux i saradnika (2009) pokazano je da 30% ispitivanih sojeva MTK rezistentnih na R, pored mutacija u *rpoB* genu, ima mutacije u *rpoA* ili *rpoC* genima, dok osetljivi sojevi te mutacije nemaju. Time je dokazano da mutacije u genima koji kodiraju ciljna mesta dejstva antibiotika ili genima koji su sa njima blisko povezani, kompenzuju „fitness cost“ sojeva MTK rezistentnih na ATL, zbog čega nose naziv kompenzatorne mutacije (Gagneux i sar. 2006 a; Comas i sar. 2012; Müller i sar. 2013 a). Da li će do pojave kompenzatorne mutacije doći ili ne, zavisi od tipa mutacije povezane sa rezistencijom, ali i genske pozadine, odnosno genotipa soja (Gagneux i sar. 2006 a; Comas i sar. 2012).

Mutacije koje dovode do rezistencije sojeva MTK mogu međusobno interreagovati i tako zajedno uticati na „fitnes“ sojeva rezistentnih na antibiotike. Ovaj fenomen poznat je pod nazivom epistaza i podrazumeva uticaj prisustva odnosno odsustva jedne mutacije na fenotipske efekte druge mutacije u istom genomu (Koch i sar. 2014). Dokazano je da epistatske interakcije u genomu sojeva MTK postoje između mutacija koje dovode do rezistencije na R i I, odnosno da tip alela koji dovodi do rezistencije na I definiše spektar mutacija koje će se pojaviti u *rpoB* genu sojeva MTK (Bergval i sar. 2012). Pozitivan epistatski odnos S315T mutacije u *katG* genu sa drugim mutacijama odgovornim za rezistenciju sojeva MTK, predstavlja jedno od mogućih objašnjenja minimalnog efekta ove mutacije na virulenciju i sposobnost transmisije sojeva MTK

(Pym i sar. 2002; Borrell i Gagneux 2011). Pozitivnom epistazom objašnjava se i udruženost različitih filogenetskih linija MTK sa određenim mutacijama povezanim sa rezistencijom na I (Gagneux 2009). Takođe, u studiji Borrell i saradnika (2013) detektovane su iste kombinacije polimorfizama u *gyrA* i *rpoB* genima kod kliničkih XDR izolata MTK, ukazujući na to da epistaza između mutacija povezanih sa rezistencijom može biti jedan od najvažnijih faktora koji doprinose „fitnesu“ MDR i XDR sojeva MTK.

U Tabeli 4 predstavljen je pregled mutacija u svim genskim regionima povezanim sa nastankom rezistencije i „fitnesom“ MTK (Sandgren i sar. 2009; Zhang i Yew 2009; Müller i sar. 2013 a; Zhang i sar. 2013).

Tabela 4. Genski regioni povezani sa nastankom rezistencije na antituberkulotike.

Antibiotik	Genski region	Produkt gena	Posledica mutacija u genskom regionu
izoniazid	<i>ahpC</i>	alkil hiperperoksid reduktaza	kompensatorne mutacije
	<i>fabG</i>	3-oksoacil-tioester reduktaza	nepoznata
	<i>fadE24</i>	β -oksidacija masnih kiselina	nepoznata
	<i>inhA</i>	enoil reduktaza	izmena ciljnog mesta dejstva antibiotika
	<i>inhA</i> promoter	regulacija ekspresije <i>inhA</i>	prekomerna ekspresija ciljnog mesta dejstva antibiotika
	<i>iniA</i>	efluks pumpa	izmena aktivnosti efluks pumpe
	<i>katG</i> *	katalaza/peroksidaza	izostanak konverzije prekursora antibiotika
rifampicin	<i>rpoA</i>	α subjedinica polimeraze RNK	kompensatorne mutacije
	<i>rpoB</i> *	β subjedinica polimeraze RNK	izmena ciljnog mesta dejstva antibiotika
	<i>rpoC</i>	β' subjedinica polimeraze RNK	kompensatorne mutacije
pirazinamid	<i>pncA</i> *	nikotinamidaza	izostanak konverzije prekursora antibiotika
streptomycin	<i>gidB</i>	7-metilguanozin metiltransferaza	izmena ciljnog mesta dejstva antibiotika
	<i>rpsL</i> *	ribosomalni protein S12	izmena ciljnog mesta dejstva antibiotika
	<i>rrs</i> *	16S rRNK	izmena ciljnog mesta dejstva antibiotika
etambutol	<i>embA</i>	arabinozil transferaza	izmena ciljnog mesta dejstva antibiotika
	<i>embB</i> *	arabinozil transferaza	izmena ciljnog mesta dejstva antibiotika
	<i>embC</i>	arabinozil transferaza	izmena ciljnog mesta dejstva antibiotika
	<i>embR</i>	regulator ekspresije	prekomerna ekspresija ciljnog

Antibiotik	Genski region	Produkt gena	Posledica mutacija u genskom regionu
		<i>embCAB</i> operona	mesta dejstva antibiotika
	<i>iniA</i>	efluks pumpa	izmenjena aktivnost efluks pumpe
	<i>rmlD</i>	dTDP-4-dehidroramnoza reduktaza	nepoznata
fluorohinoloni	<i>gyrA</i> *	DNK giraza	izmena ciljnog mesta dejstva antibiotika
	<i>gyrB</i> *	DNK giraza	izmena ciljnog mesta dejstva antibiotika
kanamicin/amikacin	<i>rrs</i> *	16S rRNK	izmena ciljnog mesta dejstva antibiotika
	<i>rrs</i>	16S rRNK	kompensatorne mutacije
kapreomicin/viomycin	<i>tlyA</i>	rRNK metiltransferaza	izmena ciljnog mesta dejstva antibiotika
	<i>rrs</i> *	16S rRNK	izmena ciljnog mesta dejstva antibiotika
etionamid	<i>inhA</i>	enoil reduktaza	izmena ciljnog mesta dejstva antibiotika
	<i>inhA</i> promotor	regulacija ekspresije <i>inhA</i>	prekomerna ekspresija ciljnog mesta dejstva antibiotika
PAS	<i>thyA</i>	timidilat sintaza A	izostanak konverzije prekursora antibiotika

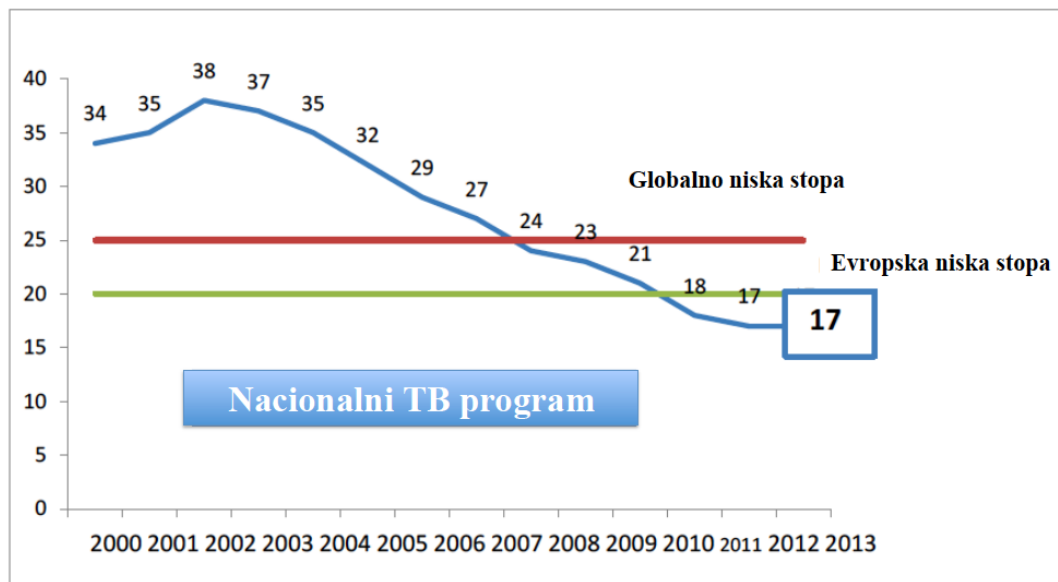
* visoko pouzdani genski regioni povezani sa rezistencijom na antituberkulotike po Sandgren i sar. 2009.

1.9. TB i MDR TB u Srbiji

Na teritoriji Srbije se od 1952. godine primenjuju mere kontrole TB propisane nacionalnim programom za TB, zahvaljujući kojima je u periodu 1956-1996. godina incidencija TB u centralnoj Srbiji smanjena sa 324/100.000 na 34,8/100.000 stanovnika (Gledović i sar. 2000).

Od 01. decembra 2004. godine, program kontrole TB sprovodio se u okviru projekta „Kontrola TB u Srbiji“, pod pokroviteljstvom Ministarstva zdravlja Republike Srbije i uz finansijsku pomoć Globalnog fonda za borbu protiv AIDS, TB i malarije. Osnovni cilj ovog projekta bio je da se incidencija TB u Srbiji smanji sa 37/100.000, koliko je iznosilo u 2003. godini, na 25/100.000 do kraja 2009. godine. Zahvaljujući uspešnom sprovođenju planiranih mera i aktivnosti, u 2009. godini postignuto je smanjenje incidencije na 23/100.000 (Izveštaj o TB u Srbiji 2010). Od 01. aprila 2010. do 31. marta 2015. godine trajao je drugi deo projekta kontrole TB u Srbiji, pod nazivom „Jačanje i povećanje dostupnosti dijagnostike i lečenja TB i MDR TB sa naglaskom na najosetljivije populacije“. Nastavljeno je smanjenje incidencije TB u Srbiji, tako da je

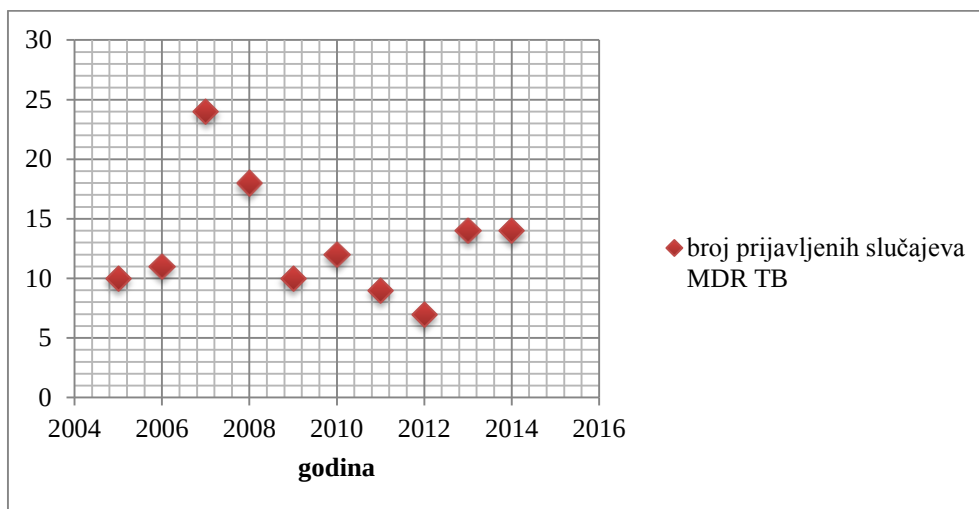
prema poslednjem dostupnom godišnjem izveštaju za 2013. godinu iznosila 17/100.000 (Slika 9) (Izveštaj o TB u Srbiji 2014).



Slika 9. Notifikacione stope TB u Srbiji od 2000. do 2013. godine. Notifikaciona stopa predstavlja broj svih prijavljenih slučajeva TB tokom jedne godine na 100.000 stanovnika. Preuzeto iz Izveštaja o TB u Srbiji za 2013. godinu.

Aktivnosti usmerene na zbrinjavanje obolelih od MDR TB započete su tokom 2007-2008. godine pripremama za uvođenje organizovanog lečenja MDR TB u Srbiji. Ciljano praćenje MDR TB u Srbiji započeto je 2008. godine, kada je po prvi put registrovan ukupan broj obolelih od MDR TB u zemlji. Iste godine formirana je i elektronska Nacionalna baza podataka o obolelima od MDR TB. Kao nadležne za dijagnostiku MDR TB određene su tri ustanove: Klinika za pulmologiju Kliničkog centra Srbije, Klinika za plućne bolesti i tuberkulozu - Knez Selo i Institut za plućne bolesti Vojvodine - Sremska Kamenica. Za stacionarno lečenje obolelih od MDR TB određeno je posebno odeljenje u Specijalnoj bolnici za plućne bolesti „Ozren“ Sokobanja, koje je renovirano 2009. godine. Tokom 2011. godine izvršena je i rekonstrukcija izdvojenog objekta Specijalne bolnice za plućne bolesti „Budislav Babić“ Bela Crkva, koji je namenjen lečenju psihijatrijskih bolesnika obolelih od MDR TB. U ovoj bolnici od 1968. godine postoji izdvojeno odeljenje za lečenje psihijatrijskih bolesnika obolelih od TB, a 95% hospitalizovanih dolazi iz psihijatrijskih ustanova u kojima su na doživotnom lečenju i u koje se vraćaju po završetku lečenja TB.

Ukupan broj laboratorijski potvrđenih slučajeva MDR TB tokom perioda od 2008. do 2014. godine u Srbiji bio je 105, pri čemu je 11 obolelih imalo XDR TB. Broj prijavljenih pacijenata sa MDR TB za poslednjih deset godina u Srbiji prikazan je u Grafikonu 1.



Grafikon 1. Broj prijavljenih pacijenata sa MDR TB u Srbiji od 2005. do 2014. godine.

Na osnovu aktuelnih vrednosti stopa incidencije TB (17/100.000) i MDR TB (<1/100.000) Srbija se svrstava u države sa niskim opterećenjem TB i MDR TB (Izveštaj o TB u Srbiji za 2013. godinu). Ipak, rezultati jedine do sada izvedene studije zasnovane na genotipizaciji sojeva MTK izolovanih u našoj zemlji ukazali su na suboptimalnu kontrolu transmisije upravo MDR TB (Vukovic i sar. 2003). U pitanju je molekularno epidemiološko istraživanje plućne TB u Beogradu zasnovano na primeni RFLP IS6110 genotipizacije. Iako su u ovom istraživanju pacijenti sa MDR TB činili samo oko 5% studijske populacije, najviši nivo aktivne transmisije pokazan je upravo za MDR sojeve. Pored toga, preliminarne analiza demografskih i epidemioloških podataka o osobama obolelim od MDR TB u Srbiji tokom perioda od 2008. do 2014. godine takođe ukazuje na suboptimalnu kontrolu MDR TB u Beogradu, ali i na mogući problem nozokomijalne transmisije MDR TB u našoj zemlji.

Jasno je da prisustvo teškog oboljenja kao što je MDR TB predstavlja veoma ozbiljnu pretnju i postavlja složene zahteve za program kontrole TB. Kao što je navedeno, uspešan program kontrole TB velikim delom zasniva se i na saznanjima dobijenim u istraživanjima koja obuhvataju molekularno genetičku karakterizaciju uzročnika bolesti. Ciljana istraživanja genoma MDR sojeva MTK izolovanih u Srbiji do sada nisu rađena.

U tom smislu, planirano istraživanje genoma lokalnih MDR sojeva MTK bi trebalo da pruži prvi sveobuhvatan uvid u vrste odnosno podvrste, filogenetsku strukturu, modele i puteve transmisije, faktore rizika za transmisiju, genetičku osnovu rezistencije i sposobnost transmisije ovih sojeva.

2. Ciljevi istraživanja

Ciljevi istraživanja su sledeći:

1. Ustanoviti koje vrste i podvrste MTK su prisutne kao izazivači MDR TB u populaciji u Srbiji i ispitati da li postoje razlike u profilima vrsta odnosno podvrsta MTK uzročnika TB i uzročnika MDR TB.
2. Ispitati filogenetsku strukturu lokalnih MDR sojeva MTK i ustanoviti koje filogenetske linije MTK su ključne za širenje MDR TB u Srbiji.
3. Ispitati puteve transmisije pojedinačnih MDR sojeva MTK, ustanoviti modele transmisije i faktore rizika za transmisiju MDR sojeva MTK u Srbiji.
4. Izvršiti detekciju i procenu učestalosti mutacija u okviru gena povezanih sa rezistencijom na antibiotike, ispitati korelaciju ustanovljenih genotipova rezistencije i filogenetskih genotipova lokalnih MDR sojeva MTK i izvršiti procenu sposobnosti transmisije ovih sojeva.

3. Materijal i metode

3.1. Studijska populacija pacijenata

Studijska populacija obuhvatila je sve pacijente kod kojih je u Srbiji tokom perioda 01.01.2008.-31.05.2014. godina laboratorijski dokazana MDR TB. U studiju je uključeno ukupno 110 pacijenata. Za 105 pacijenata istraživanjem je bio obuhvaćen jedan izolat po pacijentu. Za pet pacijenata u studiju je uključeno po dva izolata. U pitanju su pacijenti kod kojih je na osnovu kliničkih nalaza i/ili epidemioloških podataka postojala sumnja na moguću reinfekciju. Kod 108 pacijenata MDR sojevi MTK izolovani su iz respiratornih uzoraka, a kod dva pacijenta iz uzoraka urina. Na osnovu uvida u Nacionalnu bazu podataka o obolelima od MDR TB i pregleda medicinske i laboratorijske dokumentacije, za sve pacijente prikupljeni su demografski, klinički, epidemiološki i laboratorijski podaci, prikazani u Tabeli 5.

Tabela 5. Demografski, klinički, epidemiološki i laboratorijski podaci sakupljeni za pacijente uključene u istraživanje.

Demografski podaci	▪ pol ▪ godine starosti ▪ mesto prebivališta (grad i okrug) ▪ državljanstvo ▪ izbeglički status
Klinički i epidemiološki podaci	▪ istorija prethodnog lečenja (novooboleli/prethodno lečen) ▪ datum početka i završetka terapije (dužina trajanja terapije) ▪ ishod lečenja (neuspešno lečenje/lečenje u toku/smrt/završeno lečenje/uspešno lečenje/izgubljen iz praćenja) ▪ HIV status ▪ komorbiditeti ▪ socijalni faktori rizika ▪ nalaz radiografije pluća (prisustvo/odsustvo kaverne) ▪ mesto, vreme i dužina hospitalizacije
Laboratorijski podaci	▪ rezultat direktne mikroskopije (pozitivan/negativan) ▪ rezultat kultivisanja ▪ datum izolovanja MDR soja MTK iz respiratornog uzorka ▪ datum mikroskopske konverzije sputuma

3.2. Kolekcije MTK izolata

Kolekcije sojeva MTK za planirano istraživanje formirane su na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, koji je deo Nacionalne referentne laboratorije (NRL) za TB. Sakupljanje sojeva izvedeno je u saradnji sa celokupnom mrežom laboratorija za dijagnostiku TB u Srbiji, koja obuhvata 30 laboratorija i NRL. Izolati mikobakterija koji su u laboratorijama mreže preliminarno identifikovani kao MTK na osnovu mikroskopskih i kulturelnih osobina, poslani su u NRL (Mikobakteriološka laboratorija, Klinika za pulmologiju, Klinički centar Srbije) radi provere identifikacije na osnovu fenotipskih osobina i ispitivanja osetljivosti na ATL prve linije. Fenotipska ispitivanja obuhvatila su pregled mikroskopskog preparata napravljenog iz kulture, uočavanje specifičnih kulturelnih osobina i niacinski test. Osetljivost na I, R, S i E ispitivana je metodom proporcije na LJ podlozi. Osetljivost na navedene ATL kao i pirazinamid ispitivana je u Supranacionalnoj referentnoj laboratoriji (SRL) za TB (National Reference Center for Mycobacteria, Forschungszentrum Borstel, Nemačka) primenom metode proporcije na LJ podlozi i BACTEC MGIT 960 metoda (MGIT 960; Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD, SAD). Pored toga, u SRL izvršeno je i ispitivanje osetljivosti na ATL druge linije ETH, FLQ, PAS, AM, CM, KM i CS primenom istih metoda.

Na osnovu rezultata navedenih ispitivanja, formirane su dve kolekcije sojeva MTK: prva od 115 MDR sojeva MTK i druga od 971 soja MTK. Prva kolekcija obuhvata sve MDR sojeve MTK izolovane u Srbiji u periodu 01.01.2008.-31.05.2014. godina i potpuno je reprezentativna za planirano istraživanje lokalnih MDR sojeva MTK. U kolekciju MDR sojeva MTK uključeno je 105 sojeva, jedan izolat po pacijentu, a za pet pacijenata po dva izolata. Druga kolekcija je formirana radi poređenja profila vrsta i podvrsta MTK uzročnika TB i uzročnika MDR TB, a obuhvata sve sojeve MTK izolovane od pacijenata obolelih od plućne TB u Srbiji tokom perioda od 12 meseci (01.12.2010.-30.11.2011.), jedan izolat po pacijentu.

Svi sojevi MTK čuvani su kao zamrznute suspenzije u rastvoru 5% glicerola i 0,85% NaCl na -70°C, a pre izvođenja planiranih istraživanja subkultivisani su na LJ podlozi na 37°C tokom četiri nedelje.

3.3. Molekularna identifikacija MTK izolata

Molekularna identifikacija do nivoa vrste odnosno podvrste 115 MDR sojeva MTK i 971 soja MTK izvršena je na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Postupak je obuhvatio potvrdu identifikacije na nivou MTK detekcijom kompleks specifične sekvence u okviru 23S rDNK i identifikaciju do nivoa vrste i podvrste detekcijom devet species specifičnih sekvenci u *gyrB* genu. Za identifikaciju sojeva korišćen je GenoType MTBC esej (HAIN Lifescience, Nehren, Nemačka) (Kjeldsen i sar. 2009; Kurtoglu i sar. 2014).

Identifikacija izolata mikobakterija primenom GenoType MTBC testa obuhvata multipleks reakciju lančane polimerizacije (PCR) primenom odgovarajućih prajmera obeleženih biotinom, reverznu hibridizaciju PCR produkata za probe fiksirane na membrani i kolorimetrijsku detekciju hibridizovanih amplikona primenom konjugata streptavidina i alkalne fosfataze uz dodavanje odgovarajućeg substrata. Svi postupci izvedeni su u skladu sa preporukama proizvođača.

3.3.1. Ekstrakcija DNK sojeva MTK

Ekstrakcija DNK za potrebe identifikacije sojeva MTK do nivoa vrste odnosno podvrste izvedena je primenom GenoLyse kita (HAIN Lifescience). Postupak je obuhvatio sledeće korake:

- 1) po jedna eza kolonija sa LJ podloge suspendovana je u 500 µl sterilne injekcione vode u prethodno obeleženoj tubici zapremine 1,5 ml;
- 2) suspenzije su centrifugirane na $10\,000 \times g$ tokom 15 min;
- 3) nakon odlivanja supernatanta, talog je resuspendovan u 100 µl pufera za lizu (A-LYS) uz vorteksiranje;
- 4) suspenzije su inkubirane u termobloku na 95°C tokom 5 min i nakon toga centrifugirane;
- 5) u svaku suspenziju dodato je po 100 µl pufera za neutralizaciju (A-NB) uz vorteksiranje;
- 6) suspenzije su centrifugirane tokom 5 min na maksimalnoj brzini;
- 7) po 5 µl supernatanta, odnosno DNK, korišćeno je za izvođenje PCR reakcije.

3.3.2. Amplifikacija DNK sojeva MTK primenom multipleks PCR reakcije

Za svaki izolat pripremljeno je po 10 μ l AM-A rastvora (nukleotidi, Taq polimeraza, pufer) i 35 μ l AM-B rastvora (prajmeri, soli, boja). U 45 μ l miksa AM-A i AM-B dodato je po 5 μ l izolovane DNK do ukupne zapremine od 50 μ l. Parametri amplifikacije DNK bili su sledeći:

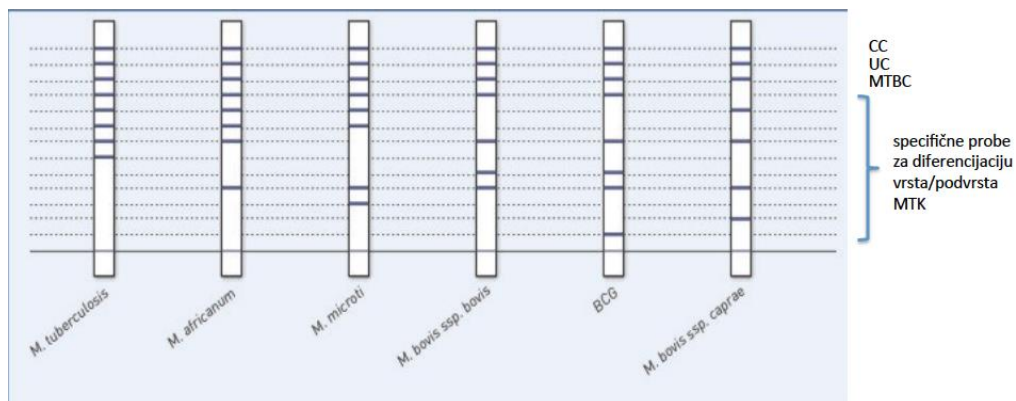
95°C	5 min		1 ciklus
95°C	30 s		10 ciklusa
58°C	2 min		
95°C	25 s		
53°C	40 s		20 ciklusa
70°C	40 s		
70°C	8 min		1 ciklus
6°C	∞		

3.3.3. Reverzna hibridizacija PCR produkata

- 1) U ugao svakog bunarčića kadice za hibridizaciju dodato je po 20 μ l rastvora za denaturaciju i 5 μ l PCR produkta, a zatim je suspenzija inkubirana na sobnoj temperaturi tokom 5 min.
- 2) U svaki bunarčić dodat je po 1 ml prethodno zagrejanog pufera za hibridizaciju i postavljena prethodno obeležena traka za hibridizaciju sa fiksiranim probama.
- 3) Kadica je postavljena u aparat za hibridizaciju TwinCubator, koji je istovremeno vodeno kupatilo i platforma za hibridizaciju, i inkubirana na 45°C tokom 30 min.
- 4) Nakon odlivanja rastvora za hibridizaciju, u svaki bunarčić je dodat po 1 ml prvog rastvora za ispiranje, a zatim je kadica sa rastvorom i trakama inkubirana u TwinCubator-u na 45°C tokom 15 min.
- 5) Nakon odlivanja prvog rastvora za ispiranje, u svaki bunarčić dodat je po 1 ml drugog rastvora za ispiranje, koji je zatim inkubiran sa trakama u TwinCubator-u na sobnoj temperaturi tokom 1 min. Svi sledeći koraci inkubiranja odvijali su se na sobnoj temperaturi.

- 6) U svaki bunarčić je zatim dodat po 1 ml konjugata streptavidin-alkalna fosfataza, prethodno rastvorenog u odgovarajućem puferu u odnosu 1:100 i rastvori su inkubirani u TwinCubator-u tokom 30 min.
- 7) Nakon odlivanja rastvora konjugata, svaka traka je isprana dva puta RIN rastvorom tokom 1 minuta i jednom destilovanom vodom tokom 1 min.
- 8) U svaki bunarčić dodat je po 1 ml substrata, koji je prethodno rastvoren u odgovarajućem puferu u odnosu 1:100.
- 9) Kadica je postavljena u TwinCubator, zaštićena od svetlosti i inkubirana 5 min.
- 10) Nakon odlivanja substrata i ispiranja destilovanom vodom dva puta po 1 min, rezultati GenoType MTBC testa interpretirani su u skladu sa preporukama proizvođača.

Primer rezultata MTBC testa prikazan je na Slici 10. MTBC traka sadrži 13 proba: 1 (CC) – kontrola konjugata koja dokazuje efikasnost vezivanja konjugata i reakciju sa substratom; 2 (UC) – univerzalna kontrola čiji je target 23S rRNK i koja detektuje Gram pozitivne bakterije sa visokim sadržajem guanina i citozina; 3 (MTBC) – proba specifična za MTK čiji target je 23S rRNK; 4-12 – species specifične probe (*gyrB* gen); i 13 – proba za *M. bovis* BCG (RD1).



Slika 10. Shematski prikaz rezultata GenoType MTBC testa.

3.4. Genotipizacija MDR sojeva MTK primenom konvencionalnih tehnika genotipizacije

Ekstrakcija DNK MDR sojeva MTK za potrebe genotipizacije izvršena je na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Genotipizacija MDR sojeva urađena je u laboratoriji Molecular Mycobacteriology

Group, Forschungszentrum Borstel, Nemačka, primenom tehnika spoligotipizacije i MIRU-VNTR.

3.4.1. Ekstrakcija DNK MDR sojeva MTK

Izolacija DNK za genotipizaciju MDR sojeva MTK izvedena je primenom kita QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Nemačka) u skladu sa preporukama proizvođača. Postupak je obuhvatio sledeće korake:

- 1) po jedna eza kolonija sa LJ podloge suspendovana je u 0,2 ml ATL (eng. tissue lysis buffer) pufera uz vorteksiranje;
- 2) suspenzija je centrifugirana na $5000 \times g$ tokom 10 min, nakon čega je odliven supernatant, a talog resuspendovan u 180 μ l rastvora enzima (20 mg/ml lizozima, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 2 mM EDTA i 1,2% Tritona) i inkubiran tokom 3 sata na 37°C;
- 3) u svaku tubicu je dodato po 20 μ l proteinaze K i 200 μ l AL (eng. lysis buffer) pufera uz vorteksiranje, a zatim su tubice inkubirane u termobloku na 56°C tokom 30 min i 95°C tokom 15 min;
- 4) u svaku tubicu dodato je po 200 μ l etanola uz vorteksiranje tokom 15 s;
- 5) sadržaj tubica je prebačen u spin kolonu prethodno postavljenu u tubicu od 2 ml, a zatim su kolone centrifugirane na $6000 \times g$ tokom 1 min;
- 6) nakon prebacivanja spin kolona u čistu tubice od 2 ml, u svaku spin kolonu dodato je po 500 μ l AW1 (eng. wash buffer 1) pufera i kolone su centrifugirane na $6000 \times g$ tokom 1 min;
- 7) nakon prebacivanja spin kolona u čistu tubice od 2 ml, u svaku spin kolonu dodato je po 500 μ l AW2 (eng. wash buffer 2) pufera i kolone su centrifugirane na $20.000 \times g$ 3 min;
- 8) spin kolone su prebačene u čiste tubice od po 1,5 ml i dodato je po 150 μ l AE (eng. elution buffer) pufera, a zatim su sledili koraci inkubiranja na sobnoj temperaturi tokom 1 min i centrifugiranja na $6000 \times g$ tokom 1 min;
- 9) nakon centrifugiranja, kolonice su odbačene, a uzorci DNK resuspendovani u AE puferu i čuvani na -20°C do izvođenja tehnika genotipizacije.

3.4.2. Spoligotipizacija MDR sojeva MTK

Spoligotipizacija je zasnovana na detekciji prisustva odnosno odsustva 43 različite spejser sekvence koje se nalaze u okviru DR lokusa u genomima članova MTK. Ova metoda izvedena je u skladu sa standardizovanim protokolom (Kremer i sar. 2002). Kao pozitivne kontrole korišćene su DNK sojeva *M. tuberculosis* H37Rv i *M. bovis* BCG, dok je voda bez nukleaze (eng. nuclease-free water, Qiagen) korišćena kao negativna kontrola.

3.4.2.1. PCR

Prvi korak u izvođenju spoligotipizacije je amplifikacija DR lokusa (Slika 11). Za svaki uzorak DNK pripremljen je PCR miks na sledeći način: 15 µl vode bez nukleaze, 2,5 µl *Tth* pufera (SphaeroQ, Lajden, Holandija), 0,5 µl nukleotida (dNTP), 2 µl DRa prajmera, 2 µl DRb prajmera, 0,75 µl MgCl₂, 0,125 µl *Tth* Taq polimeraze (SphaeroQ). Korišćene su sledeće sekvence prajmera:

DRa: 5' – GGT TTT GGG TCT GAC GAC – 3', obeležen biotinom na 5' kraju i

DRb: 5' – CCG AGA GGG GAC GGA AAC – 3'.

U prethodno pripremljene tubice dodato je po 23 µl PCR miksa i 2 µl DNK uz vorteksiranje i kratko centrifugiranje.

Parametri amplifikacije DNK bili su sledeći:

96°C	3 min		20 ciklusa
96°C	1 min		
55°C	1 min		
72°C	30 s		
72°C	5 min		
4 °C	∞		

U tubice sa PCR produktima dodato je po 190 µl 2×SSPE + 0,1% SDS uz vorteksiranje i zatim su tubice prebačene u PCR mašinu na 99°C tokom 15 min radi denaturacije. Nakon denaturacije, tubice sa PCR produktima stavljene su na led.

3.4.2.2. Hibridizacija

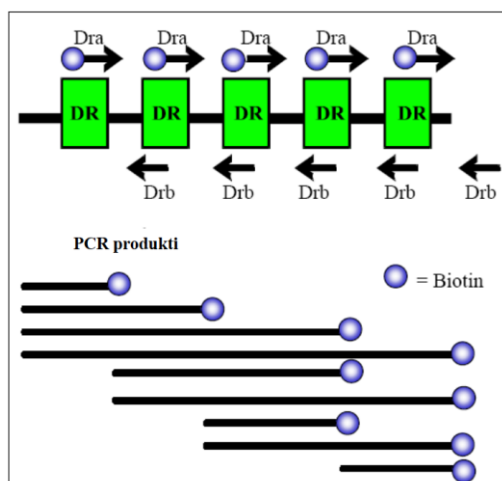
- 1) Spoligomembrane (Biodyne C membrane, Pall BioSupport, Njujork, SAD) prebačene su u plastičnu kadu i prelivene puferom 2×SSPE + 0,1% SDS,

inkubirane na 60°C tokom 10 min, a nakon toga postavljene u minibloter (MN45, Immunetics, Kembridž, SAD) (Slika 12).

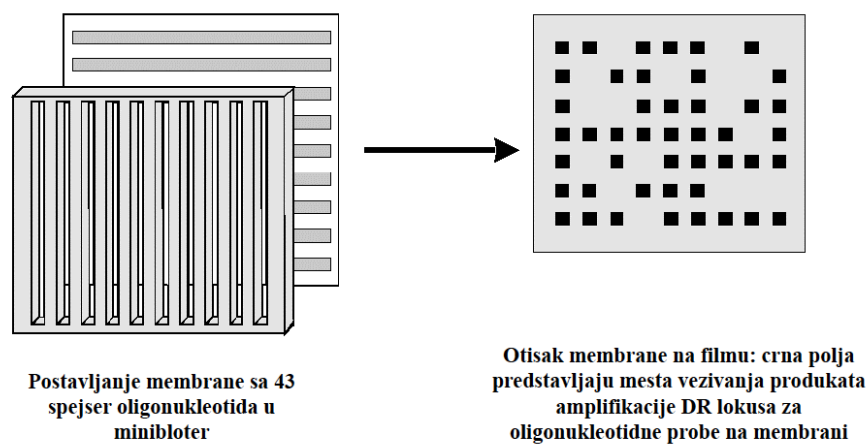
- 2) U prva tri i poslednja tri bunarčića miniblota dodato je po 160 µl 2×SSPE + 0,1% SDS, a u ostale bunarčiće po 160 µl PCR produkata.
- 3) Minibloter je postavljen u inkubator na 60°C tokom 1h.
- 4) Nakon uklanjanja viška PCR produkta i pufera, membrana je prebačena u plastičnu kadu i prelivena puferom 2×SSPE + 0,5% SDS, a zatim dva puta inkubirana na 60°C tokom 15 min.
- 5) Za vreme inkubiranja membrane, pripremljene su dve plastične epruvete sa po 50 ml 2×SSPE + 0,5% SDS i jedna sa 10 ml 2×SSPE + 0,5% SDS i 4 µl streptavidina (Boehringer, Mannheim, Nemačka).
- 6) Membrana je prebačena u staklenu menzuru, u koju je zatim sipan rastvor pufera i streptavidina i inkubirana na 42°C tokom 45 min.
- 7) Nakon inkubiranja, membrana je dva puta isprana sa 50 ml 2×SSPE + 0,5% SDS i inkubirana na 42°C tokom 10 min, postavljena u plastičnu kadu u koju je naliven pufer 2×SSPE, a zatim postavljena na šejker tokom 5 min (postupak je ponavljen dva puta).
- 8) Membrana je zatim prelivena prethodno pripremljenim rastvorom za detekciju produkata hibridizacije (2 ml reagensa za detekciju 1 + 2 ml reagensa za detekciju 2) (ECL detection liquid, Amersham International, Čalfont, Velika Britanija), pokrivena transparentnom folijom i postavljena u kasetu za film.
- 9) U komori za razvijanje filma, membrana u kaseti je pokrivena filmom (Hyperfilm ECL, Amersham International) tokom 8 min i film je razvijen na Kodak SRX-101A aparatu za razvijanje filmova.

Detekcija produkata hibridizacije postignuta je putem hemiluminescencije. Peroksidaza katalizuje hemijsku reakciju koja rezultira emisijom svetlosti, a svetlost se zatim detektuje autoradiografijom membrane (Slika 13).

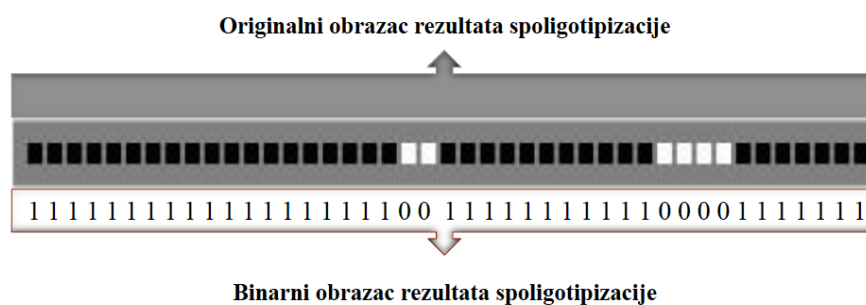
Rezultati spoligotipizacije na filmu predstavljeni su crnim poljima na mestima prisustva spejsera i bezbojnim poljima na mestima na kojima spejseri nisu prisutni. Originalni rezultati prevedeni su u binarne kodove, odnosno svakom crnom polju dodeljena je cifra 1, a belom polju cifra 0 (Slika 13). Genotipovi su zatim detektovani na osnovu broja i pozicije prisutnih i odsutnih spejsera iz seta od 43 spejsera.



Slika 11. Shematski prikaz amplifikacije DR lokusa uz primenu DRa i DRb prajmera.



Slika 12. Shematski prikaz postavljanja spoligomembrane u minibloter i detekcije produkata hibridizacije nakon autoradiografije membrane.



Slika 13. Prikaz originalnog i binarnog obrasca rezultata spoligotipizacije.

3.4.3. MIRU-VNTR genotipizacija MDR sojeva MTK

MIRU-VNTR genotipizacija sojeva MTK zasniva se na detekciji broja kopija uparenih ponovaka u okviru izabranih 15 odnosno 24 MIRU lokusa u genomu MTK. Za genotipizaciju studijske kolekcije MDR sojeva MTK urađena je MIRU-VNTR tipizacija za optimizovani set od 24 lokusa (Tabela 6). Lokusi su amplifikovani primenom šest kvadripleks PCR reakcija sa fluorescentnim prajmerima specifičnim za bočne regione target lokusa, uz upotrebu komercijalnog kita za MIRU-VNTR tipizaciju (GenoScreen, Lil, Francuska). Kao pozitivna kontrola korišćena je hromozomska DNK laboratorijskog referentnog soja *M. tuberculosis* H37Rv.

Tabela 6. Set 24 MIRU lokusa za MIRU-VNTR genotipizaciju MDR sojeva MTK.

PCR miks		MIRU lokusi		
1	580	2996	802	1955
2	960	2163b	3192	1644
3	424	577	2165	4052
4	154	2531	4348	2401
5	2059	2687	3007	4156
6	2347	2461	3171	3690

3.4.3.1. PCR

PCR miks pripremljen je u PCR pločama sa 96 bunarčića. Za svaku izolovanu DNK pripremljeno je po 5,5 µl svakog od šest kvadripleks PCR miksova i 2,5 µl vode bez nukleaze. U ukupnu zapreminu miksa od 8 µl dodato je po 2 µl izolovane bakterijske DNK. Ploča je pokrivena adhezivnim filmom, vorteksirana i centrifugirana na 300 rpm. Parametri amplifikacije DNK bili su sledeći:

95°C	15 min	}	40 ciklusa
94°C	1 min		
59°C	30 s		
72°C	1 min 30 s		
72°C	10 min		
4 °C	∞		

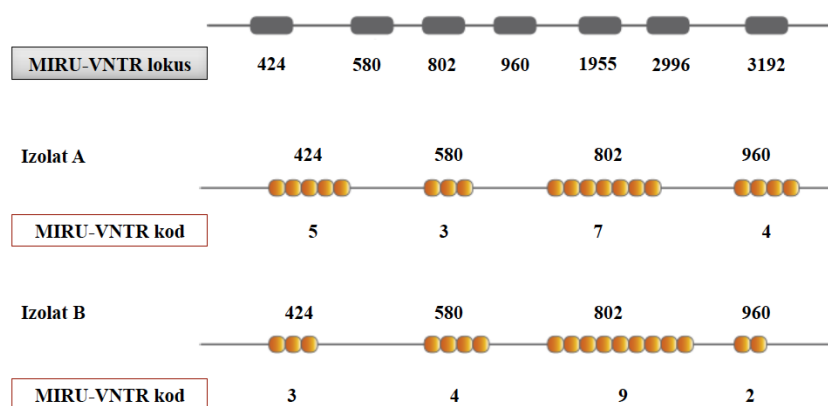
3.4.3.2. Priprema PCR produkata za kapilarnu elektroforezu

U svaki bunarčić ploče sa PCR produktima dodato je po 40 µl vode bez nukleaze. Za svaki PCR produkt pripremljen je rastvor od po 9,75 µl formamida i 0,25 µl Gene scan

size standarda (GeneScan 1200LIZ, Applied Biosystems, Forster City, CA, SAD). U bunarčiće ploče za sekvenciranje (Applied Biosystems) dodato je po 10 µl pripremljenog rastvora formamida i standarda, a zatim po 2 µl razblaženih PCR produkata. Ploča je pokrivena adhezivnim filmom, vorteksirana, kratko centrifugirana na 300 rpm i postavljena u PCR mašinu na 95°C tokom 5 min, radi denaturacije.

3.4.3.3. Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza izvedena je u sekvenatoru ABI 3500 XL Genetic Analyzer sa 24 kapilare (Applied Biosystems). Veličina PCR fragmenata i raspored VNTR alela određeni su uz pomoć ABI GeneMapper softvera (Applied Biosystems). S obzirom da je dužina ponavljanih segmenata poznata, vrednosti veličine fragmenata predstavljaju broj amplifikovanih MIRU kopija. Konačan rezultat predstavljen je numeričkim kodom, koji odgovara broju kopija svakog analiziranog lokusa (Slika 14).



Slika 14. Shematski primer rezultata MIRU-VNTR genotipizacije za četiri MIRU lokusa u genomu dva tipizirana soja MTK.

3.4.4. Analiza rezultata spoligotipizacije i MIRU-VNTR genotipizacije

3.4.4.1. Konstruisanje filogenetskog stabla na osnovu rezultata spoligotipizacije i MIRU-VNTR genotipizacije

Rezultati spoligotipizacije i MIRU-VNTR tipizacije analizirani su primenom Bionumerics softvera (Windows XP, verzija 7.5; Applied maths, Kortrijk, Belgija), po uputstvima proizvođača. Analiza i procena sličnosti spoligotipova i MIRU-VNTR genotipova ispitivanih MDR sojeva MTK izvršena je na osnovu kategorijskog

koeficijenta. Dendrogram je konstruisan primenom UPGMA metode (eng. unweighted pair group method with arithmetic averages). Identifikacija genotipova izvršena je uz upotrebu MIRU-VNTRplus baze podataka (www.miru-vntrplus.org) (Weniger i sar. 2012). Evolutivni odnosi između genotipova analizirani su na osnovu konstruisanja stabla minimalnog raspona (eng. minimum spanning tree), odnosno seta konekcija koje povezuju genome izolata putem najkraće moguće distance.

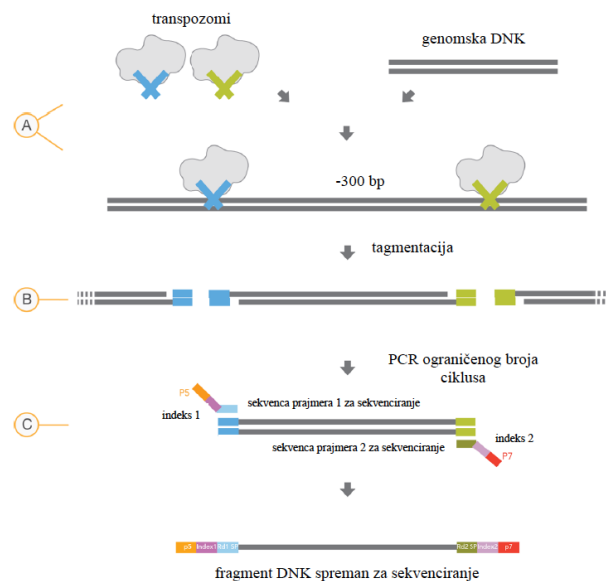
3.4.4.2. Definisanje klastera na osnovu rezultata spoligotipizacije i MIRU-VNR genotipizacije

Klasteri MDR sojeva MTK odnosno grupe sojeva sa identičnim genotipovima definisani su kao grupe od najmanje dva soja sa identičnim genotipovima, koji su izolovani iz uzoraka različitih pacijenata uključenih u studiju. Step en grupisanja MDR sojeva MTK u klastere definisan je kao $(n_c - c)/n$, pri čemu n_c predstavlja ukupan broj sojeva u klasterima, c broj klastera, a n ukupan broj ispitivanih sojeva (Roetzer i sar. 2011; Schürch i van Soolingen 2012).

3.5. Genotipizacija sekvenciranjem genoma MDR sojeva MTK

Pored genotipizacije MDR sojeva MTK primenom navedenih konvencionalnih tehnika, izvršeno je i sekvenciranje genoma ovih sojeva na Illumina MiSeq sekvenatoru (Illumina, San Diego, CA, SAD), odnosno tehnikom sekvenciranja putem sinteze i reverzibilnih terminatora. Sekvenciranje genoma MDR sojeva MTK urađeno je u laboratoriji Molecular Mycobacteriology Group, Forschungszentrum Borstel, Nemačka. Sekvenciranje je izvedeno u skladu sa Nextera XT vodičem za sekvenciranje na Illumina sekvenatorima (Nextera® XT DNA Sample Preparation Guide, Illumina). Koncentracije i prinos (A260/230 i A260/280) izolovanih DNK mereni su primenom QUBIT 1.0 (Invitrogen, Life Technologies, CA, SAD) i Implen P300 (Implen, GmbH, Minhen, Nemačka) spektrofotometara.

Postupak sekvenciranja obuhvatio je sledeće korake: tagmentacija izolovane DNK, PCR, prečišćavanje PCR produkata, normalizacija Nextera XT biblioteka i sekvenciranje na Illumina MiSeq sekvenatoru (Slike 6 i 15).



Slika 15. Shematski prikaz pripreme Nextera XT biblioteka za sekvenciranje: A) vezivanje Nextera XP transpozoma sa adapter sekvencama za DNK; B) tagmentacija DNK na manje fragmente i dodavanje adapter sekvenci; C) vezivanje prajmera i oligonukleotida u ograničenom broju PCR ciklusa (preuzeto iz «Nextera® XT DNA Sample Preparation Guide», Illumina).

3.5.1. Tagmentacija DNK

Tagmentacija DNK predstavlja tagovanje i fragmentaciju DNK primenom Nextera XT transpozoma, koji simultano seče DNK i dodaje adapter sekvence na krajeve DNK lanaca, omogućavajući na taj način amplifikaciju DNK (Slika 15).

Pre izvođenja postupka tagmentacije, sve DNK su razblažene u NE (eng. elution buffer) puferu do koncentracije 0,2 ng/μl. Za svaku biblioteku, u tubicama od 500 μl pripremljeno je po 10 μl TD pufera (eng. tagment DNA buffer), 5 μl DNK koncentracije 0,2 ng/μl i 5 μl ATM pufera (eng. amplicon tagment mix). Zatim su tubice postavljene u PCR mašinu na 55°C tokom 5 min, pa na 10°C, radi tagmentacije. Nakon toga, Nextera tagmenti su neutralisani dodavanjem po 5 μl NT pufera (eng. neutralize tagment buffer) i inkubirani na sobnoj temperaturi 5 min. Konačna zapremina DNK nakon tagmentacije bila je 25 μl.

3.5.2. PCR

PCR obuhvata ograničeni broj ciklusa vezivanja indeks 1 i indeks 2 sekvenci oligonukleotida, nakon čega sledi prečišćavanje biblioteka primenom AMPure XP perli, radi eliminacije kratkih fragmenata DNK (Slike 6 i 15).

Za svaku DNK odabrana je odgovarajuća kombinacija indeks sekvenci (Tabela 7).

Tabela 7. Sekvence oligonukleotida (indeksi 1 i 2) za amplifikaciju DNK (preuzeto iz „Nextera® XT DNA Sample Preparation Guide“, Illumina).

Index 1 (i7)	Sequence	Index 2 (i5)	Sequence
N701	TAAGGCGA	S501	TAGATCGC
N702	CGTACTAG	S502	CTCTCTAT
N703	AGGCAGAA	S503	TATCCTCT
N704	TCCTGAGC	S504	AGAGTAGA
N705	GGACTCCT	S505	GTAAGGAG
N706	TAGGCATG	S506	ACTGCATA
N707	CTCTCTAC	S507	AAGGAGTA
N708	CAGAGAGG	S508	CTAAGCCT
N709	GCTACGCT		
N710	CGAGGCTG		
N711	AAGAGGCA		
N712	GTAGAGGA		

Za svaku biblioteku pripremljeno je po 15 µl NPM (eng. Nextera PCR Master Mix), 5 µl indeks 2 prajmera (N5xx), 5 µl indeks 1 prajmera (N7xx) i tubice su postavljene u PCR mašinu. Parametri amplifikacije bili su sledeći:

72 °C	3 min	
95°C	30 s	} 12 ciklusa
95°C	10 s	
55°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	5 min	
10°C	∞	

PCR reakcija je završena sa ukupnim volumenom Nextera XT biblioteka od 50 µl.

3.5.3. Prečišćavanje PCR produkata

Iz svake PCR tubice prebačeno je po 50 µl Nextera XT biblioteka u PCR traku/ploču i dodato po 25 µl prethodno vorteksiranih AMPureXP perli (Beckman Coulter Inc, Brea, CA, SAD). PCR trake su zatim inkubirane na sobnoj temperaturi tokom 5 min i postavljene na magnetno postolje tokom 2 min. Supernatant je odstranjen, a talog dva

puta ispran sa 200 µl 80% etanola (bez resuspenzije perli) i inkubiran tokom 30 s. Nakon uklanjanja etanola, perle su sušene na sobnoj temperaturi tokom 15 min, PCR traka je sklonjena sa magnetnog postolja i dodato je po 52,5 µl pufera RSB (eng. resuspension buffer). Trake su inkubirane na sobnoj temperaturi 2 min, zatim na magnetnom postolju 2 min i nakon toga je po 50 µl supernatanta, odnosno prečišćenih Nextera XT biblioteka, prebačeno u sterilne tubice.

Kvantitet i kvalitet biblioteka određen je primenom 2100 Agilent bioanalizatora (Agilent Technologies, Santa Klara, CA, SAD), prema uputstvima proizvođača. U daljem radu korišćene su biblioteke veličine 50-7000 bp i koncentracije 5-500 pg/µl.

3.5.4. Normalizacija Nextera XT biblioteka

Proces normalizacije podrazumeva normalizaciju količine svake biblioteke, kako bi sve biblioteke bile sekvencirane u jednakoj količini.

Po 20 µl biblioteka prebačeno je u novu PCR ploču i u svaki bunarčić je dodato po 45 µl prethodno pripremljenog rastvora LNA1 (eng. library normalization additives 1) i LNB1 (eng. library normalization beads 1). Ploča je zatim centrifugirana na 1800 rpm tokom 30 min, postavljena na magnetno postolje tokom 2 min i nakon toga je odliveno po 80 µl supernatanta iz svakog bunarčića. Bunarčići su isprani dva puta sa po 45 µl LNW1 (eng. library normalization wash 1), ploča je centrifugirana na 1800 rpm tokom 5 min i postavljena na magnetno postolje 2 min. Nakon odlivanja supernatanta, dodato je po 30 µl NaOH 0.1 N, ploča je centrifugirana na 1800 rpm 5 min i postavljena na magnetno postolje 2 min. Nakon toga, u nove tubice je dodato po 30 µl LNS1 (eng. library normalization storage buffer 1), u koje je zatim prebačeno po 30 µl supernatanta, odnosno normalizovanih Nextera XT biblioteka. Finalna zapremina biblioteka nakon ovog koraka bila je 60 µl.

3.5.5. Postavljanje biblioteka u Illumina MiSeq sekvenator

Poslednji korak pripreme biblioteka obuhvata diluciju jednakih volumena biblioteka u puferu za hibridizaciju, denaturaciju biblioteka zagrevanjem i sekvenciranje na Illumina MiSeq sekvenatoru.

Pre sekvenciranja, sve biblioteke su razblažene 25 puta u puferu HT1 (eng. hybridization buffer), a zatim inkubirane na 96°C tokom 2 min radi denaturacije.

Biblioteke su zatim postavljene u ledeno kupatilo tokom 5 min, nakon čega je napunjen MiSeq kertridž i izvršeno sekvenciranje.

3.5.6. Analize rezultata sekvenciranja

3.5.6.1. Mapiranje sekvenci genoma MDR sojeva MTK

Detektovane sekvence genoma MDR sojeva MTK mapirane su na osnovu poređenja sa sekvencama genoma referentnog soja *M. tuberculosis* H37Rv (GenBank, identifikacioni broj NC_000962.3), uz upotrebu programa preciznog poravnanja (eng. exact alignment program) SARUMAN (Blom i sar. 2011). Kategorije gena definisane su u skladu sa studijom Comas i saradnika (2010). Geni su klasifikovani u četiri grupe: neesencijalni, esencijalni, epitopi i ponavljani geni (Comas i sar. 2010).

3.5.6.2. Pokrivenost genoma MDR sojeva MTK

Prosečna pokrivenost genoma definisana je kao prosečna dubina pročitanih sekvenci nakon poravnanja sa referentnom sekvencom, a izražava se na osnovu broja i dužine pročitanih sekvenci visokog kvaliteta nakon poravnanja sa referentnim sekvencama (Sims i sar. 2014). Prosečna pokrivenost sekvenciranih genoma MDR sojeva MTK iznosila je 50 (eng. 50-fold) (Roetzer i sar. 2013).

3.5.6.3. Identifikacija SNP

SNP su izdvojeni iz mapiranih sekvenci uz korišćenje in house Perl skripti na osnovu minimalne pokrivenosti od 10 pročitanih sekvenci i sa minimalnom frekvencijom alela od 75%, kao pragovima za detekciju (Roetzer i sar. 2013; Kohl i sar. 2014). Radi isključenja mogućnosti detekcije lažno pozitivnih SNP, pre konstruisanja evolutivnih stabala iz analize su isključene SNP varijante čiji su susedni SNP detektovani u opsegu od 12 baza, SNP koji su detektovani u genima povezanim sa rezistencijom na antibiotike i SNP lokalizovani u ponavljanim regionima genoma (Comas i sar. 2010; Kohl i sar. 2014).

3.5.6.4. Konstruisanje filogenetskih stabala na osnovu profila SNP

U cilju sagledavanja filogenetskih odnosa ispitivanih MDR sojeva MTK, konstruisana su stabla maksimalne parsimonije i minimalnog raspona.

Maksimalna parsimonija definiše se kao minimizacija ukupnog broja evolutivnih koraka u cilju konstruisanja filogenetskih odnosa. Stablo maksimalne parsimonije konstruisano je za ispitivane MDR sojeve MTK na osnovu najmanjeg broja različitih SNP profila primenom BioNumerics softvera.

Stablo minimalnog raspona predstavlja rekonstrukciju razlika i mikroevolucije u populaciji na osnovu određenih podataka, odnosno set konekcija koje povezuju genome izolata putem najkraće moguće distance. Stablo minimalnog raspona konstruisano je za MDR sojeve MTK na osnovu referentne kolekcije SNP laboratorije Molecular Mycobacteriology Group, Forschungszentrum Borstel, Nemačka, primenom BioNumerics i EvolView softvera (Homolka i sar. 2012; Roetzer i sar. 2013; Kohl i sar. 2014; Merker i sar. 2015). Bootstrap vrednost, odnosno verovatnoća tačnosti pozicije svake klade u stablu, izračunata je na osnovu 100 ponavljanja i izražena u procentima.

3.5.6.5. Definisanje klastera na osnovu rezultata NGS

Klasteri definisani na osnovu rezultata NGS obuhvatili su sve sojeve čiji su se genomi razlikovali u najviše 12 SNP, i.e. ≤ 12 SNP. Grupisanje sojeva u klastere izvršeno je u skladu sa predloženim maksimalnim nivoom varijacija genoma sojeva uključenih u lance nedavne transmisije (Walker i sar. 2013).

3.5.6.6. Procena evolutivne starosti NGS klastera

Procena evolutivne starosti definisanih NGS klastera izvršena je na osnovu Bayesian analize SNP profila MDR izolata MTK i vremena izolovanja MDR sojeva MTK iz respiratornih uzoraka pacijenata, primenom BEAST 1.7. softvera (Drummond i sar. 2012). Podaci su analizirani softverski dva puta sa različitim demografskim pretpostavkama i striktnim molekularnim satom (konstantna veličina populacije i Bayesian kriva). Srednja vrednost starosti zajedničkih ancestor klastera izračunata je na osnovu Bayesian faktora verovatnoće i procenjene stope mutacija.

3.6. Tumačenje rezultata genotipizacije u kontekstu transmisije MDR sojeva MTK

Svi MDR sojevi MTK za koje su genotipizacijom utvrđeni identični genotipovi, odnosno pacijenti od kojih su ti sojevi izolovani, svrstani su u klastere. Identični genotipovi sojeva odnosno pripadnost klasterima tumačeni su kao rezultat aktivne transmisije MDR TB. Radi tumačenja rezultata genotipizacije u kontekstu karakteristika transmisije lokalnih MDR sojeva MTK, analizirani su prikupljeni demografski, klinički, epidemiološki i laboratorijski podaci o pacijenatima navedeni u Tabeli 3. Identifikacija faktora rizika za transmisiju MDR TB izvedena je na osnovu poređenja karakteristika pacijenata svrstanih u klastere i pacijenata čiji MDR sojevi MTK imaju jedinstvene genotipove. Za detaljan uvid u transmisiju pojedinačnih sojeva organizovani su i razgovori sa nadležnim lekarima pacijenata.

3.7. Ispitivanje genetičke osnove rezistencije na antituberkulotike prve i druge linije kod MDR sojeva MTK

Poseban segment ovog istraživanja bio je utvrđivanje genetičke osnove rezistencije ispitivanih MDR sojeva MTK na ATL prve i druge linije odnosno detekcija mutacija koje dovode do rezistencije na ove lekove. Izvršena je analiza rezultata sekvenciranja gena koji se smatraju ključnim za rezistenciju na ATL prve i druge linije. Geni u kojima je ispitivano prisustvo mutacija udruženih sa rezistencijom na ove lekove navedeni su u Tabeli 8.

Tabela 8. Geni odgovorni za rezistenciju na ATL prve i druge linije.

Antituberkulotik	Pozicija gena	Gen(i)/promoter(i) udruženi sa rezistencijom	Značaj
Rifampicin	Rv0667	<i>rpoB</i>	visok
	Rv3457c	<i>rpoA</i>	moguć
	Rv0668	<i>rpoC</i>	moguć
Izoniazid	Rv1908c	<i>katG</i>	visok
	Rv1483	prom. <i>fabG1-inhA</i> = " <i>inhA</i> "	visok
	Rv1484	<i>inhA</i>	visok
	Rv1483	<i>fabG1</i>	moguć
	Rv2428	<i>aphC</i>	moguć
	Rv2245	<i>kasA</i>	moguć
	Rv1854c	<i>ndh</i>	moguć
	Rv2763c	<i>dfrA</i>	moguć
	Rv2427a	<i>oxyR</i>	moguć

Antituberkulotik	Pozicija gena	Gen(i)/promoter(i) udruženi sa rezistencijom	Značaj
Pirazinamid	Rv2043c	<i>pncA</i>	visok
	Rv2043c	prom. <i>pncA</i>	visok
	Rv1630	<i>rpsA</i>	nizak
	Rv2783c	<i>gpsI</i>	moguć
	Rv3169	Rv3169	moguć
	Rv2731	Rv2731	moguć
Etambutol	Rv3795	<i>embB</i>	visok
	Rv3794	<i>embA</i>	nizak
	Rv3794	prom. <i>embA</i>	nizak
	Rv3793	<i>embC</i>	nizak
Amikacin	MTB000019/Rvnr01	<i>rrs</i>	visok
	Rv2416c	prom. <i>eis</i>	nizak
	Rv3197A	(5' UTR) <i>whiB7</i>	nizak
Kanamycin	MTB000019/Rvnr01	<i>rrs</i>	visok
	Rv2416c	prom. <i>eis</i>	visok
	Rv3197A	(5' UTR) <i>whiB7</i>	visok
Kapreomicin	MTB000019/Rvnr01	<i>rrs</i>	visok
	Rv1694	<i>tlyA</i>	visok
	Rv2416c	prom. <i>eis</i>	moguć
	Rv3197A	(5' UTR) <i>whiB7</i>	moguć
Fluorohinoloni (moksifloksacin, ofloksacin, levofloksacin)	Rv0006	<i>gyrA</i>	visok
	Rv0005	<i>gyrB</i>	visok
Etionamid	Rv3854c	<i>ethA</i>	visok
	Rv3854c	prom. <i>ethA</i>	nizak
	Rv3855	prom. <i>ethR</i>	visok
	Rv3855	<i>ethR</i>	visok
	Rv1483	prom. <i>fabG1-inhA</i> = "inhA"	visok
	Rv1484	<i>inhA</i>	visok
	Rv1483	<i>fabG1</i>	moguć
	Rv0486	<i>mshA</i>	moguć
	Rv1854c	<i>ndh</i>	moguć
	Rv2763c	<i>dfrA</i>	moguć

Za sve SNP koji su otkriveni sekvenciranjem navedenih gena procenjivan je značaj kao markera rezistencije na osnovu dostupne baze polimorfizama povezanih sa rezistencijom (<https://tbdreamdb.ki.se/Info/>; Sandgren i sar. 2009).

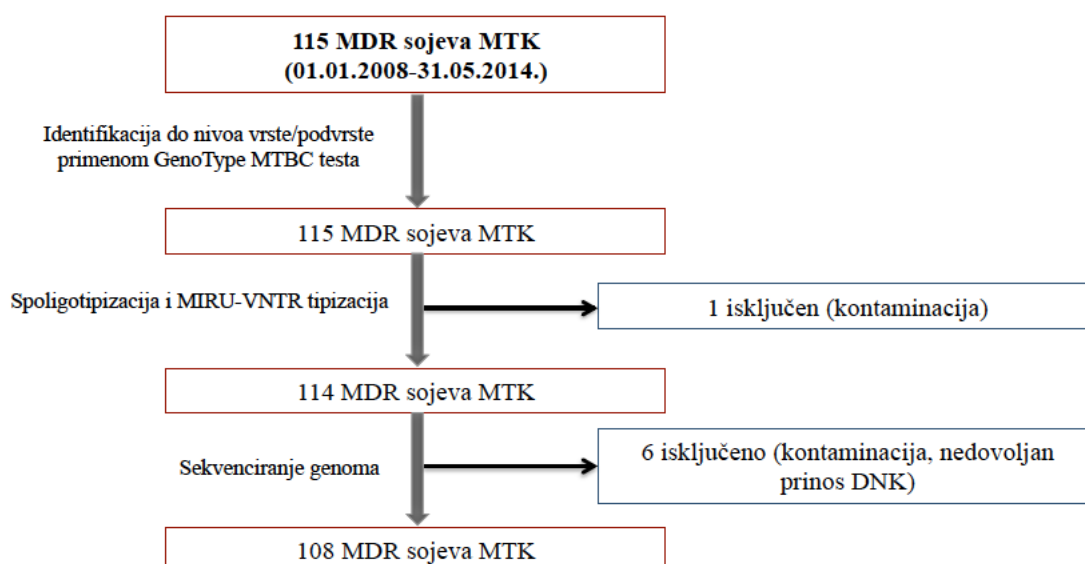
3.8. Statistička analiza podataka

U studiji su korišćene deskriptivne i analitičke statističke metode. Od deskriptivnih statističkih metoda korišćeni su apsolutni i relativni brojevi (n, %), mere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana) i mere disperzije (standardna devijacija, interval varijacije), a od analitičkih neparametarski testovi razlike. Kao neparametarski testovi razlike korišćeni su Hi kvadrat test, Hi kvadrat test za trend i Mann-Whithney U test. Zbog malog broja jedinica posmatranja u pojedinim analizama, korišćeni su egzaktni testovi i Monte Carlo simulacija. Rezultati su prikazani tabelarno. Signifikantnost testa manja od 0,05 ($p < 0,05$) uzeta je kao vrednost za odbacivanje nulte hipoteze. Statistička obrada podataka je izvršena primenom SPSS 20.0 softverskog paketa.

4. Rezultati

Istraživanjem je obuhvaćeno 115 MDR sojeva MTK izolovanih iz uzoraka 110 pacijenata kojima je dijagnostikovana MDR TB u Srbiji tokom perioda od 1. januara 2008. do 31. maja 2014. godine. Ukupno 12 MDR izolata iz kolekcije (10,3%), poreklom od 11 pacijenata, bilo je dodatno rezistentno na FLQ i bar jedan od injekcionih antituberkulotika druge linije, odnosno predstavljaju XDR sojeve MTK.

Identifikacija do nivoa vrste/podvrste primenom GenoType MTBC testa postignuta je za svih 115 MDR sojeva. Klasične tehnike genotipizacije, odnosno spoligotipizacija i MIRU-VNTR tipizacija, izvedene su za 114 MDR sojeva usled kontaminacije jedne subkulture. Sekvenciranje genoma primenom Illumina MiSeq platforme za sekvenciranje postignuto je za 108 MDR sojeva, jer su dva soja isključena zbog kontaminacije subkulture, a četiri usled nedovoljnog prinosa izolovane DNK (Slika 16).



Slika 16. Algoritam izvođenja GenoType MTBC testa, klasičnih tehnika genotipizacije i sekvenciranja genoma ispitivane kolekcije MDR sojeva *M. tuberculosis* kompleksa.

4.1. Identifikacija vrsta MTK izazivača MDR TB i TB u populaciji u Srbiji

Primenom GenoType MTBC testa svih 115 (100%) MDR sojeva MTK, koji su izolovani u Srbiji u periodu 01.01.2008.-31.05.2014. godina, identifikovani su kao vrsta *M. tuberculosis* (MTB) (Slika 17). U cilju poređenja profila vrsta odnosno podvrsta MTK uzročnika TB i MDR TB u Srbiji, izvršena je i identifikacija 971 soja MTK, odnosno svih sojeva MTK izolovanih od pacijenata obolelih od plućne TB u Srbiji

tokom perioda 1.12.2010.-30.11.2011. godina, jedan izolat po pacijentu, primenom GenoType MTBC testa. Svi sojevi ove kolekcije (971/971; 100%), takođe su identifikovani kao vrsta *M. tuberculosis*.



Slika 17. Reprezentativni prikaz rezultata GenoType MTBC testa za 11 izolata *M. tuberculosis* kompleksa. Raspored proba odgovara vrsti *M. tuberculosis*.

Ovakvi rezultati jasno pokazuju da je jedina vrsta MTK koja je značajna u Srbiji kao izazivač TB i MDR TB vrsta *M. tuberculosis*. Ustanovljeno je da ne postoji razlika u profilima vrsta/podvrsta MTK izazivača TB i vrsta/podvrsta MTK izazivača MDR TB u Srbiji.

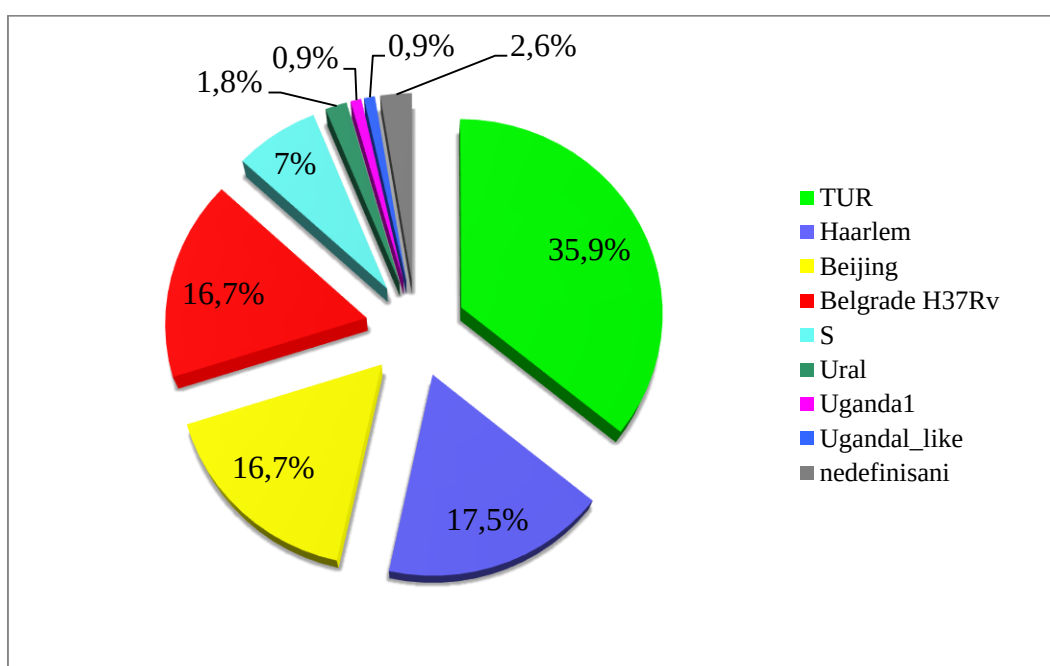
4.2. Filogenetska struktura MDR sojeva MTB

4.2.1. Filogenetska struktura MDR sojeva MTB na osnovu rezultata spoligotipizacije i MIRU-VNTR

Primenom spoligotipizacije i MIRU-VNTR izvršena je tipizacija 114 MDR sojeva MTB. Rezultati spoligotipizacije i MIRU-VNTR tipizacije analizirani su primenom BioNumerics softvera. Filogenetske linije MDR sojeva MTB identifikovane su nakon kombinovane analize rezultata spoligotipizacije i MIRU-VNTR tipizacije, uz korišćenje referentnog soja *M. tuberculosis* H37Rv i MIRU-VNTRplus baze genotipova (www.miru-vntrplus.org) (Weniger i sar. 2012).

Kombinovanom analizom rezultata klasičnih metoda genotipizacije, 114 MDR sojeva MTB klasifikovano je u ukupno osam genotipova. Identifikovani su TUR, Haarlem,

Beijing, S, Ural, Ugandal i Ugandal-like genotipovi, kao i novi genotip nazvan Belgrade H37Rv. Učestalost izolovanja navedenih genotipova u ispitivanom uzorku MDR sojeva MTB prikazana je u Grafikonu 2. Najveći broj izolata, 41 (35,9%), identifikovan je kao TUR genotip. Dvadeset sojeva (17,5%) identifikovano je kao Haarlem genotip, 19 (16,7%) kao Beijing, 19 (16,7%) kao Belgrade H37Rv, osam (7%) kao S, dva (1,8%) kao Ural, jedan (0,9%) kao Uganda1 i jedan izolat (0,9%) kao Ugandal-like genotip. Preostala tri (2,6%) izolata nisu mogla biti klasifikovana ni u jednu od prethodno opisanih filogenetskih linija na osnovu spoligo i MIRU-VNTR profila, zbog čega su označeni kao „nedefinisani“.



Grafikon 2. Učestalost izolovanja osam genotipova u kolekciji od 114 MDR sojeva *M. tuberculosis*.

Pored jasne predominacije TUR genotipa u ispitivanoj kolekciji MDR sojeva MTB, rezultat koji se izdvaja je i identifikacija genotipa koji je označen kao Belgrade H37Rv. U pitanju je genotip koji je po prvi put identifikovan u kolekciji MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji. Približno 17% ispitivanih MDR sojeva MTB identifikovano je kao ovaj genotip. Na osnovu analize spoligo i MIRU-VNTR profila novog identifikovanog genotipa, ustanovljeno je da je najbliži genotipu laboratorijskog soja *M. tuberculosis* H37Rv. Uporedni prikazi spoligoprofila i MIRU-VNTR profila laboratorijskog kontrolnog soja *M. tuberculosis* H37Rv i soja označenog kao Belgrade H37Rv dati su u

Tabelama 9 i 10. S obzirom na to da je ovaj profil po prvi put identifikovan u našoj kolekciji i to u izolatu pacijenta iz Beograda, nazvan je Belgrade H37Rv.

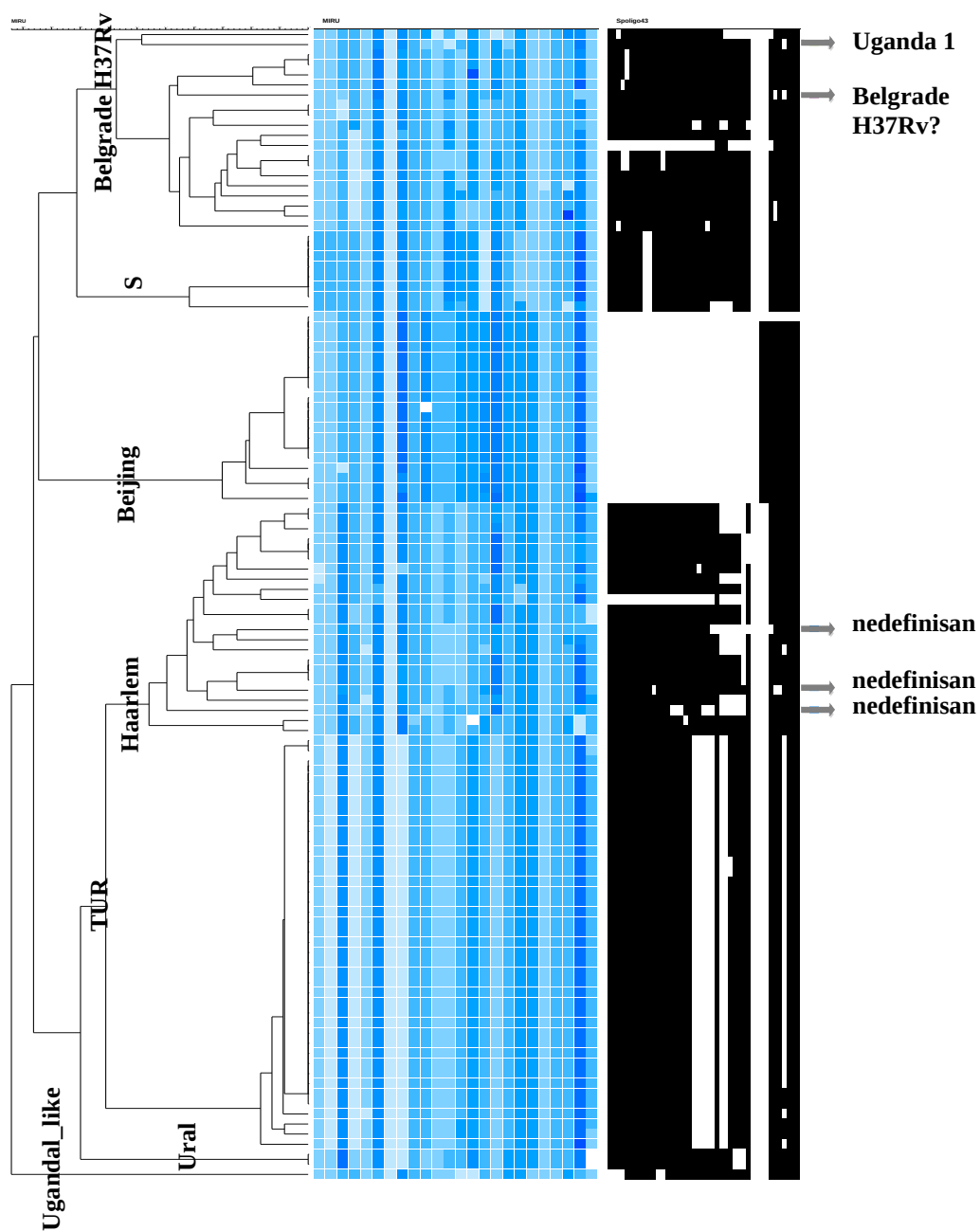
Tabela 9. Spoligoprofil kontrolnog soja *M. tuberculosis* H37Rv i soja Belgrade H37Rv.

DR lokus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
kontrolni soj H37Rv	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Belgrade H37Rv	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DR lokus	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
kontrolni soj H37Rv	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Belgrade H37Rv	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DR lokus	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43					
kontrolni soj H37Rv	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1					
Belgrade H37Rv	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1					

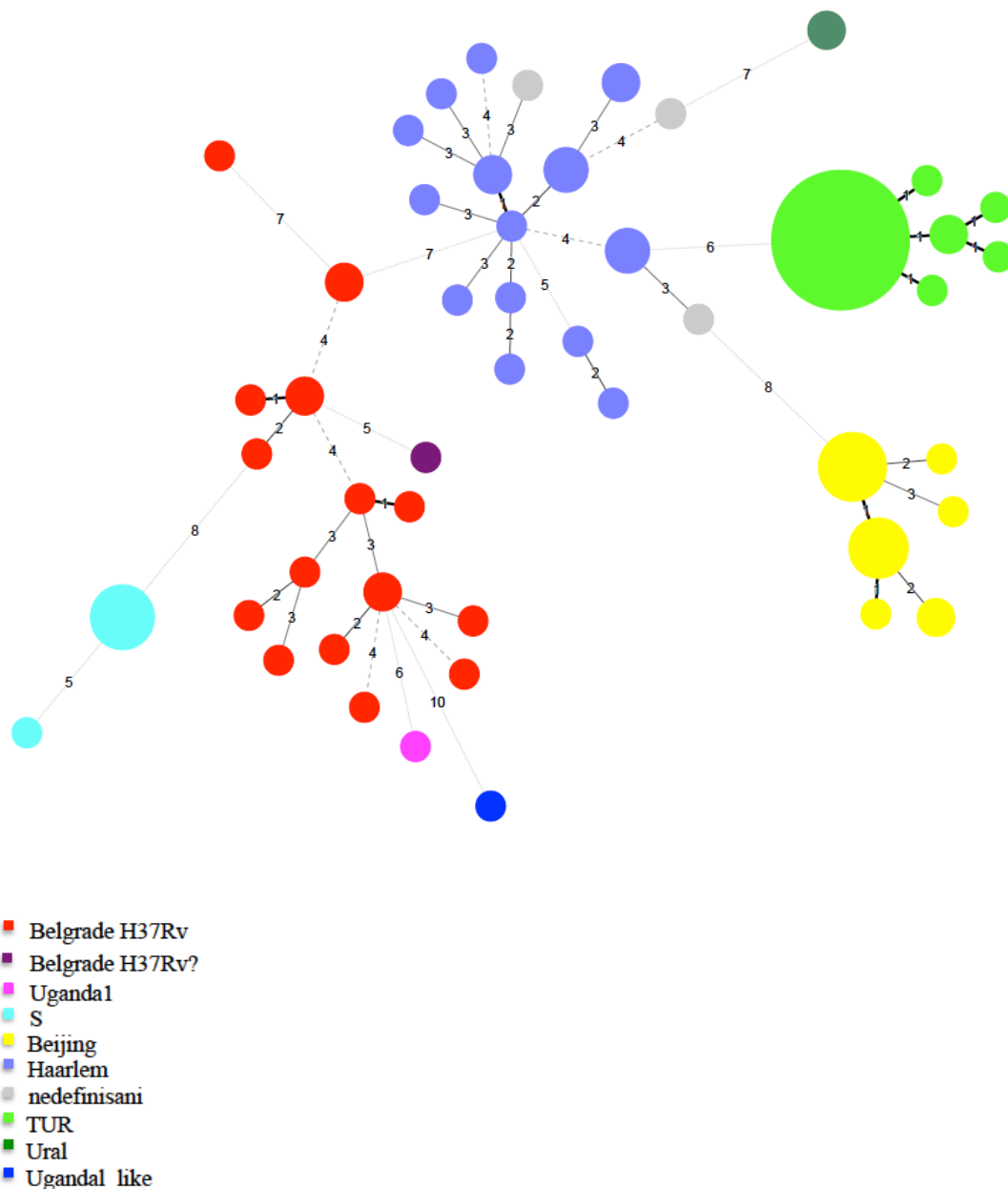
Tabela 10. MIRU-VNTR profili kontrolnog soja *M. tuberculosis* H37Rv i soja Belgrade H37Rv.

MIRU-VNTR lokus	580	2996	802	1955	960	2163b	3192	1644	424	577	2165	4052
kontrolni soj H37Rv	3s	3	1	2	3	5	3	2	2	4	3	5
Belgrade H37Rv	2	5	3	2	1	3	3	3	2	4	3	5
MIRU-VNTR lokus	154	2531	4348	2401	2059	2687	3007	4156	2347	2461	3171	3690
kontrolni soj H37Rv	2	6	2	2	2	1	3	2	4	3	3	5
Belgrade H37Rv	2	5	2	2	2	1	3	2	4	2	3	3

Sve filogenetske linije identifikovane primenom spoligotipizacije i MIRU-VNTR tipizacije u ispitivanoj kolekciji od 114 MDR sojeva prikazane su dendrogramom na Slici 18, a filogenetski odnosi između ustanovljenih genotipova predstavljeni su stablom minimalnog raspona na Slici 19. Uočava se da su tri MDR soja MTB koji su na osnovu rezultata spoligotipizacije i MIRU-VNTR tipizacije označeni kao „nedefinisani“, filogenetski najbliži Haarlem genotipu (Slike 18 i 19). Pored toga, filogenetska pozicija jednog izolata (na Slici 19 označen ljubičastom bojom) nije potpuno jasna, ali je u finalnoj analizi svrstan u profil Belgrade H37Rv.



Slika 18. Dendrogram za 114 MDR sojeva *M. tuberculosis* tipiziranih primenom klasičnih tehnika genotipizacije. Plava polja označavaju MIRU-VNTR lokuse; crno-bela polja označavaju spoligotipove.

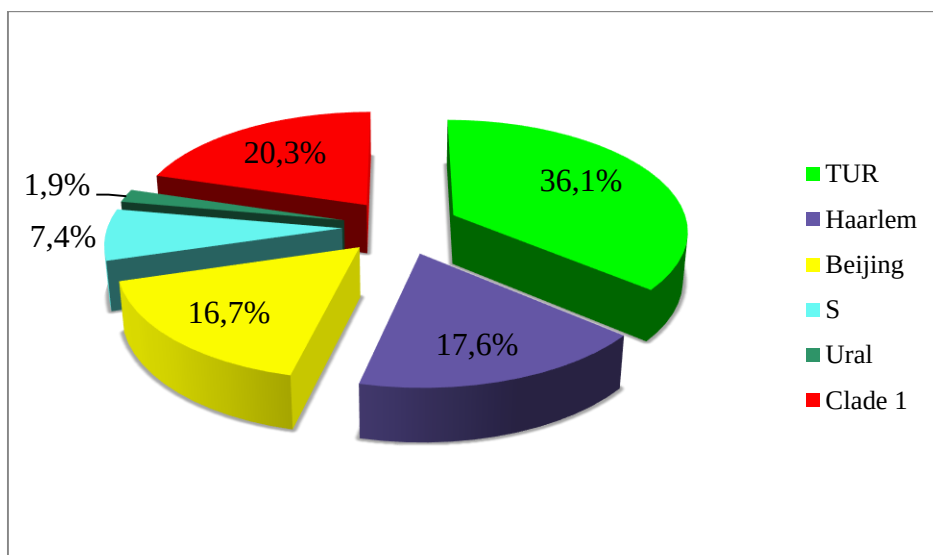


Slika 19. Stablo minimalnog raspona za 114 MDR sojeva *M. tuberculosis* tipiziranih primenom klasičnih tehnika genotipizacije. Brojevi predstavljaju brojeve kopija MIRU-VNTR lokusa u kojima se razlikuju genotipovi i sojevi koji pripadaju istim genotipovima.

4.2.2. Filogenetska struktura MDR sojeva MTB na osnovu rezultata NGS

U cilju precizne identifikacije filogenetskih linija i detekcije definitivnih puteva transmisije, izvršeno je sekvenciranje genoma ispitivanih MDR sojeva MTB primenom Illumina MiSeq platforme za sekvenciranje. Sekvenciranje je uspešno izvedeno za 108 MDR MTB sojeva.

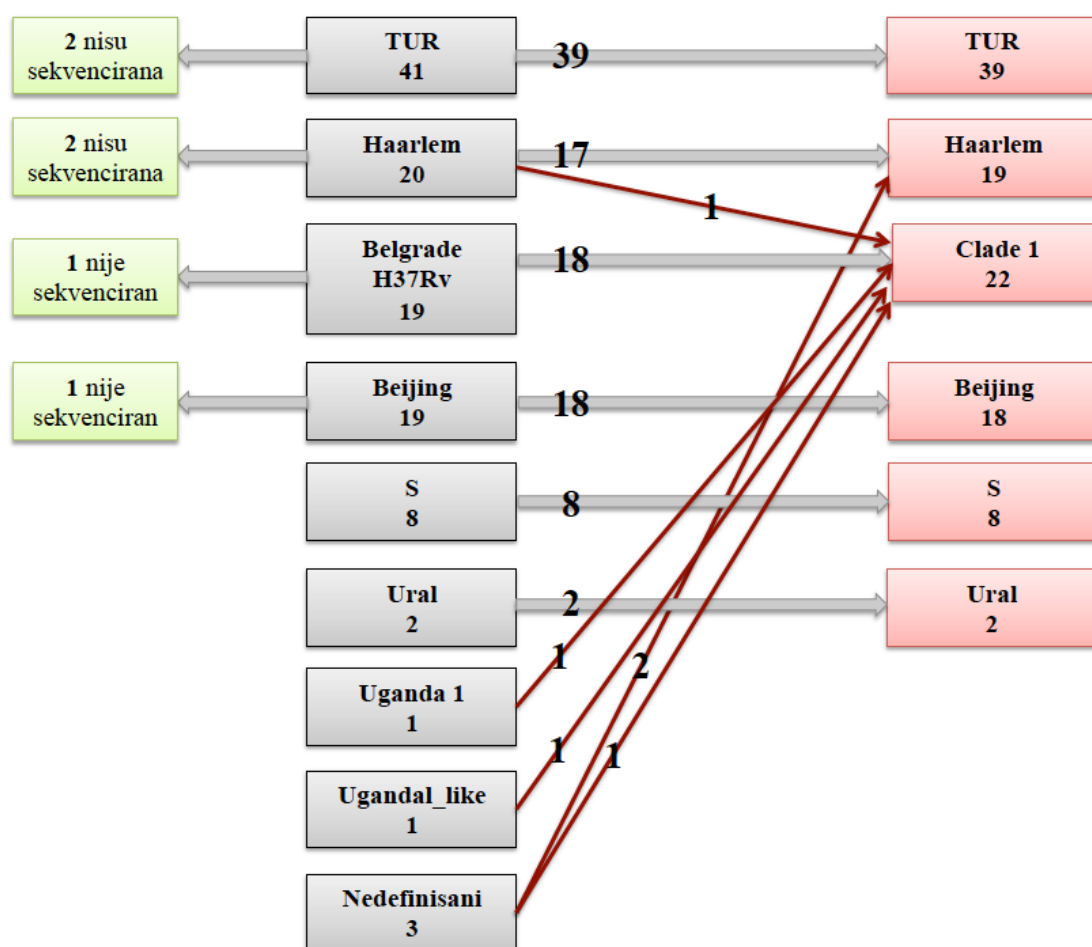
Na osnovu rezultata sekvenciranja genoma, odnosno SNP profila 108 MDR sojeva MTB, identifikovano je ukupno šest genotipova. U pitanju su genotipovi TUR, Clade 1 linija, Haarlem, Beijing, S i Ural. Prema rezultatima NGS, najveći broj izolata (39/108; 36,1%) pripada TUR liniji. Dvadeset dva (20,3%) izolata su klasifikovana kao Clade 1 linija, 19 (17,6%) kao Haarlem, 18 (16,7%) kao Beijing, 8 (7,4%) kao S, a 2 (1,9%) kao Ural linija (Grafikon 3).



Grafikon 3. Učestalost izolovanja šest filogenetskih linija 108 MDR sojeva *M. tuberculosis* na osnovu rezultata NGS.

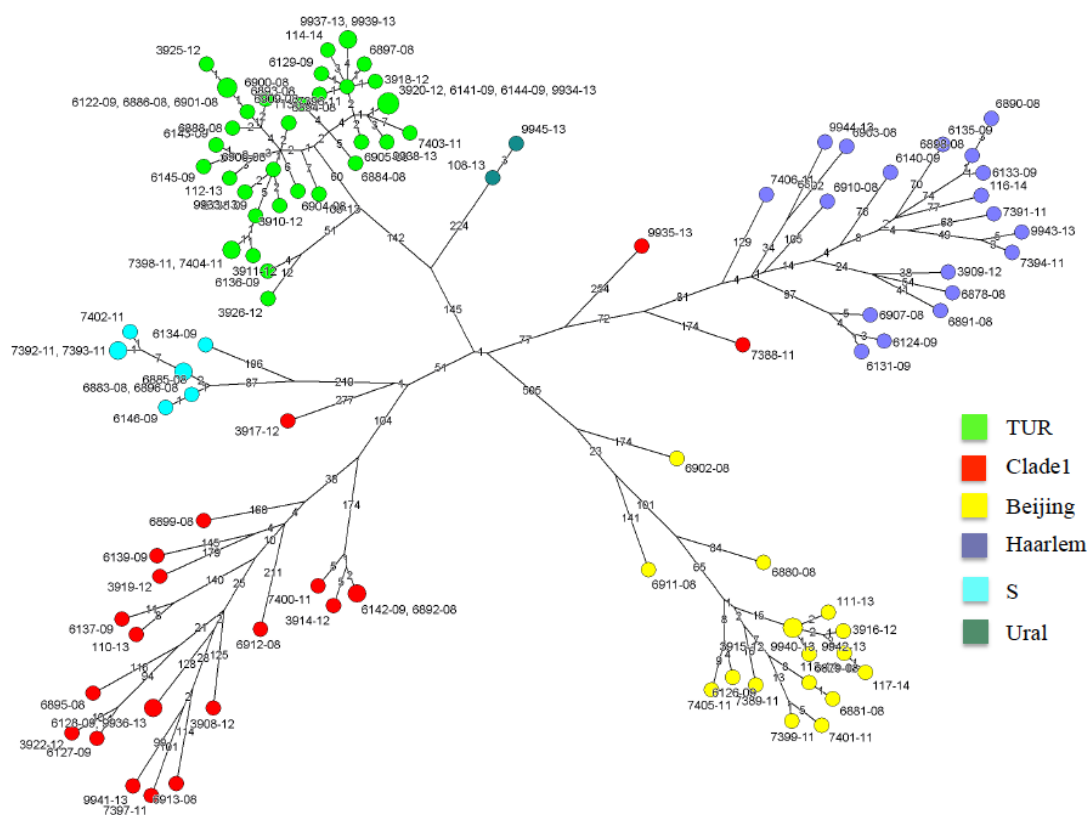
Uporedni prikaz rezultata klasičnih tehnika genotipizacije i NGS dat je na Slici 20. Od 41 izolata koji su primenom klasičnih tehnika definisani kao TUR genotip, dva nisu sekvencirana zbog nedovoljnog porasta subkultura na LJ podlozi, dok ostalih 39 na osnovu SNP analiza takođe pripada genotipu TUR. Prema tome, kada je u pitanju TUR filogenetska linija, ustanovljeno je potpuno poklapanje rezultata genotipizacije konvencionalnim tehnikama i sekvenciranjem genoma i potvrđena je predominacija ovog genotipa u ispitivanom uzorku sojeva. Prema rezultatima sekvenciranja genoma, sledeća filogenetska linija po učestalosti u našem uzorku MDR sojeva MTK je takozvana Clade 1 grupa. Ova filogenetska linija obuhvata evro-američku grupu klasičnih MTB sojeva (Homolka i sar. 2012). Ukupno 18 od 19 izolata koji su imali profil Belgrade H37Rv prema rezultatima klasičnih tehnika genotipizacije, na osnovu NGS analize reklasifikovano je u Clade 1 grupu, a preostali jedan soj nije sekvenciran zbog nedovoljnog prinosa DNK. Prema tome, jasno je da profil Belgrade H37Rv, koji je

po prvi put identifikovan u uzorku MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji, pripada ovoj filogenetskoj liniji. Liniji Clade 1 takođe pripada i jedan soj koji nije mogao biti klasifikovan ni u jednu filogenetsku liniju primenom klasičnih tehnika, jedan soj Uganda1, jedan Ugandal like soj i jedan soj definisan kao Haarlem na osnovu spoligo i MIRU-VNTR profila. Od 20 sojeva koji su na osnovu spoligo i MIRU-VNTR profila identifikovani kao Haarlem genotip, dva nisu sekvencirana usled nedovoljnog prinosa izolovane DNK, dok je pripadnost Haarlem liniji potvrđena za 17 sojeva. Dva soja koja su označena kao nedefinisani nakon klasične genotipizacije, na osnovu SNP analize identifikovani su kao Haarlem genotip. Jedan od 19 sojeva koji su prema klasičnim tehnikama identifikovani kao Beijing nije sekvenciran, dok je za preostalih 18 sojeva rezultatima NGS potvrđena pripadnost Beijing liniji. Takođe, ustanovljeno je i poklapanje rezultata konvencionalnih tehnika genotipizacije za S i Ural genotipove (Slika 20).



Slika 20. Uporedni prikaz rezultata klasičnih tehnika genotipizacije (siva polja) i NGS (crvena polja) kolekcije MDR sojeva *M. tuberculosis*.

Stablo maksimalne parsimonije za 108 MDR MTB sojeva konstruisano je na osnovu pozicija 6703 SNP i prikazano na Slici 21. Kao što je navedeno, na osnovu profila i pozicije SNP, 22 (20,3%) MDR izolata MTB svrstana su u liniju Clade 1. Većina tih izolata su na osnovu spoligotipizacije i MIRU-VNTR identifikovani kao nov Belgrade H37Rv profil. SNP profili ovih sojeva takođe pokazuju izvesnu specifičnost odnosno ne odgovaraju ni jednoj od do sada definisanih filogenetskih podlinija Clade 1 grupe (Homolka i sar. 2012). Stoga su njihovi genotipovi u ovom istraživanju označeni samo na nivou grupe, odnosno kao Clade 1.

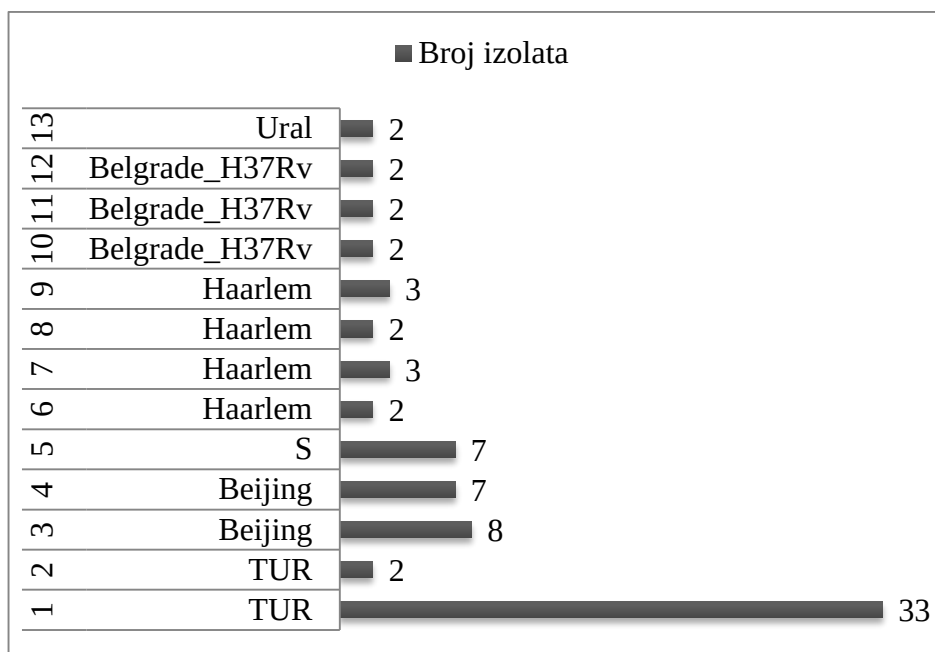


Slika 21. Stablo maksimalne parsimonije za 108 MDR sojeva *M. tuberculosis*. Brojevi predstavljaju brojeve različitih SNP među filogenetskim linijama, odnosno sojevima koji pripadaju istim filogenetskim linijama.

4.3. Tumačenje rezultata klasičnih tehnika genotipizacije i NGS u kontekstu karakteristika transmisije lokalnih MDR sojeva MTB

4.3.1. Grupisanje MDR sojeva MTB u klastere na osnovu rezultata spoligotipizacije i MIRU/VNTR genotipizacije

Na osnovu rezultata spoligotipizacije i MIRU-VNTR genotipizacije, ispitivani MDR sojevi MTB svrstani su u klastere, odnosno grupe od najmanje dva soja sa identičnim genotipovima, koji su izolovani iz uzoraka različitih pacijenata uključenih u studiju. Definisano je ukupno 13 klastera, koji su obuhvatili 75 (65,8%) MDR izolata MTB, poreklom iz uzoraka 73 pacijenta. Preostalih 39 (34,2%) izolata imali su jedinstvene genotipove. Step en grupisanja MDR sojeva u klastere, parametar koji ukazuje na obim aktivne transmisije MDR TB u ispitivanom uzorku, iznosi 54,4%. Najveći identifikovani klaster obuhvatio je 33 izolata, a preostalih 12 klastera bili su značajno manji i obuhvatali su od dva do osam MDR sojeva MTB (Grafikon 4). Kada su u pitanju filogenetske karakteristike sojeva u klasterima, među 75 sojeva identifikovano je šest genotipova: TUR, Haarlem, Beijing, S, Belgrade H37Rv i Ural. Najveći klaster, koji sa 33 izolata obuhvata 44% svih izolata u klasterima, pripada TUR liniji. Identifikovan je još jedan klaster od dva izolata TUR linije. Prema tome, od 41 izolata koji su identifikovani kao TUR genotip, čak 35 (85,4%) su u klasterima. Pored toga, od ukupno 12 XDR sojeva MTB, čak devet (75%) je svrstano u ovaj najveći TUR klaster od 33 izolata, dok su za tri (25%) XDR soja ustanovljeni jedinstveni TUR genotipovi. Među ostalih 12 klastera, četiri pripadaju Haarlem liniji, tri Belgrade H37Rv liniji, dva Beijing liniji, jedan TUR liniji, jedan S liniji i jedan Ural liniji (Grafikon 4). Dva klastera sojeva Beijing linije obuhvataju 15 izolata, što je 78,9% od ukupno identifikovanih 19 sojeva ove linije u ispitivanom uzorku. Samo jedan klaster čine sojevi filogenetske linije S, ali je u tom klasteru sedam (87,5%) od ukupno identifikovanih osam sojeva ove linije.



Grafikon 4. Veličina i filogenetske karakteristike MDR sojeva *M. tuberculosis* grupisanih u klastere definisane primenom klasičnih metoda genotipizacije.

Od pet pacijenata od kojih su po dva izolata bila uključena u istraživanje (Tabela 11), dva pacijenta su imala po dva S izolata sa identičnim spoligo i MIRU-VNTR profilima, dok su pacijenti označeni brojevima 8 i 56 imali po jedan TUR izolat u klasteru i jedan van klastera. Sojevi izolovani iz različitih uzoraka pacijenta označenog brojem 56 razlikuju se i po profilima osetljivosti. Soj 6145-09 je MDR i pripada najvećem identifikovanom klasteru TUR sojeva, a soj 3925-12 je XDR i ima jedinstven TUR genotip. Kod pacijenta označenog brojem 67 rezultati konvencionalne genotipizacije dva soja izolovana iz različitih uzoraka ukazuju na reinfekciju MDR sojem MTB. Soj 7397-11 je genotip Belgrade H37Rv, a soj izolovan dve godine kasnije 9942-13 pripada Beijing liniji (Tabela 11).

Tabela 11. Rezultati klasičnih metoda genotipizacije ponovljenih MDR izolata *M. tuberculosis* izolovanih od pet pacijenata.

Pacijent No	Izolati	Genotip	Spoligo/MIRU-VNTR klaster*
5	6883-08	S	4
	6896-08	S	4
7	6885-08	S	4
	6146-09	S	4
8	6886-08	TUR	ne

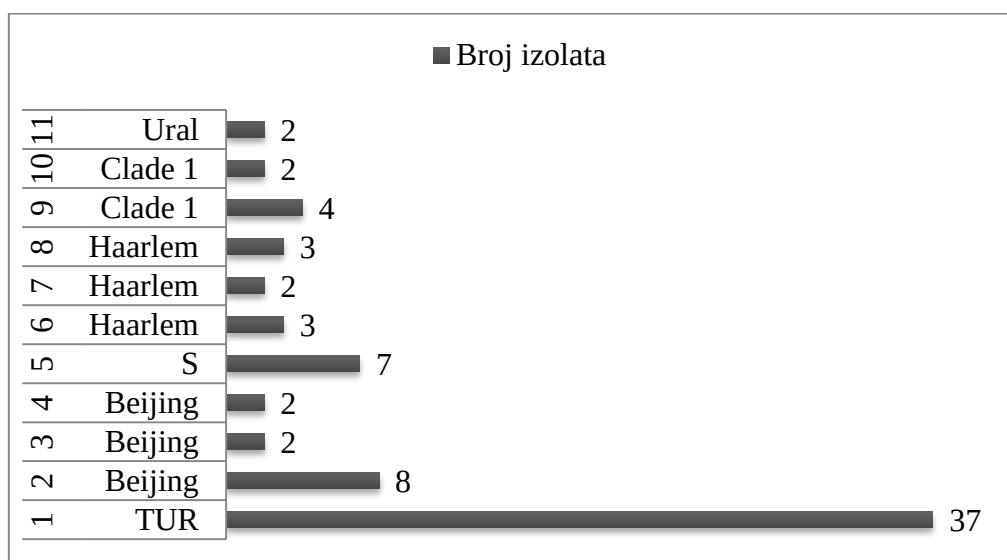
	6901-08	TUR	12
56	6145-09	TUR	12
	3925-12	TUR	ne
67	7397-11	Belgrade H37Rv	ne
	9942-13	Beijing	5

* Brojevi označavaju brojeve klastera prikazanih u Grafikonu 4.

4.3.2. Grupisanje MDR sojeva MTB u klastere na osnovu rezultata NGS

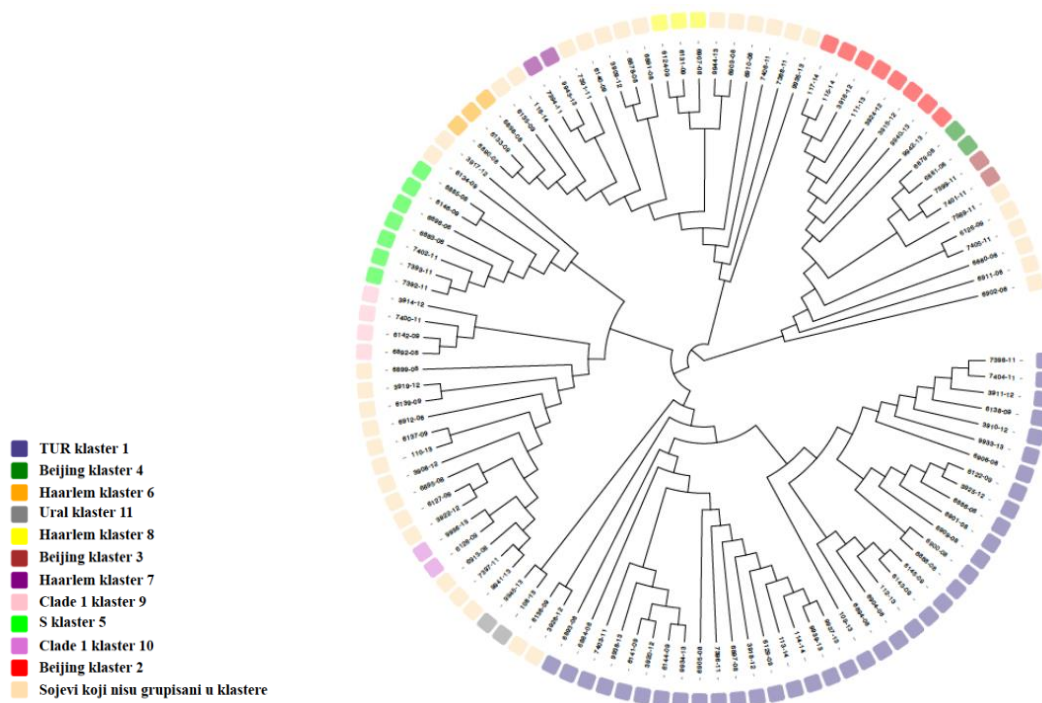
Na osnovu rezultata NGS, svi MDR sojevi MTB čiji su se genomi razlikovali u ≤ 12 SNP svrstani su u klastere, u skladu sa predloženim maksimalnim nivoom varijacija genoma sojeva uključenih u lance nedavne transmisije (Walker i sar. 2013). Step en grupisanja u klastere definisan je na isti način kao i step en grupisanja u klastere na osnovu rezultata spoligotipizacije i MIRU-VNTR genotipizacije.

U poređenju sa rezultatima klasičnih metoda genotipizacije, NGS analiza ispitivanih MDR sojeva MTB rezultirala je definisanjem manjeg broja klastera, ali višim stepenom grupisanja u klastere (56,5%) odnosno ukazuje na još viši obim aktivne transmisije MDR TB u ispitivanom uzorku. Od 108 sekvenciranih MDR sojeva MTB, 72 (66,7%) izolata poreklom od 68 pacijenata grupisani su u 11 klastera (Grafikon 5). Preostalih 36 izolata (33,3%) imali su jedinstvene SNP profile. Najveći identifikovani klaster obuhvatio je 37 izolata, dok je preostalih 10 klastera obuhvatalo od dva do osam MDR sojeva MTB.



Grafikon 5. Veličina i filogenetske karakteristike MDR sojeva *M. tuberculosis* grupisanih u klastere definisane na osnovu rezultata sekvenciranja genoma.

Rezultati grupisanja ispitivanih MDR MTB sojeva u klastere na osnovu analize NGS prikazani su i stablom maksimalne verovatnoće na Slici 22.



Slika 22. Stablo maksimalne verovatnoće za 108 MDR sojeva *M. tuberculosis* na osnovu pozicija 6703 SNP.

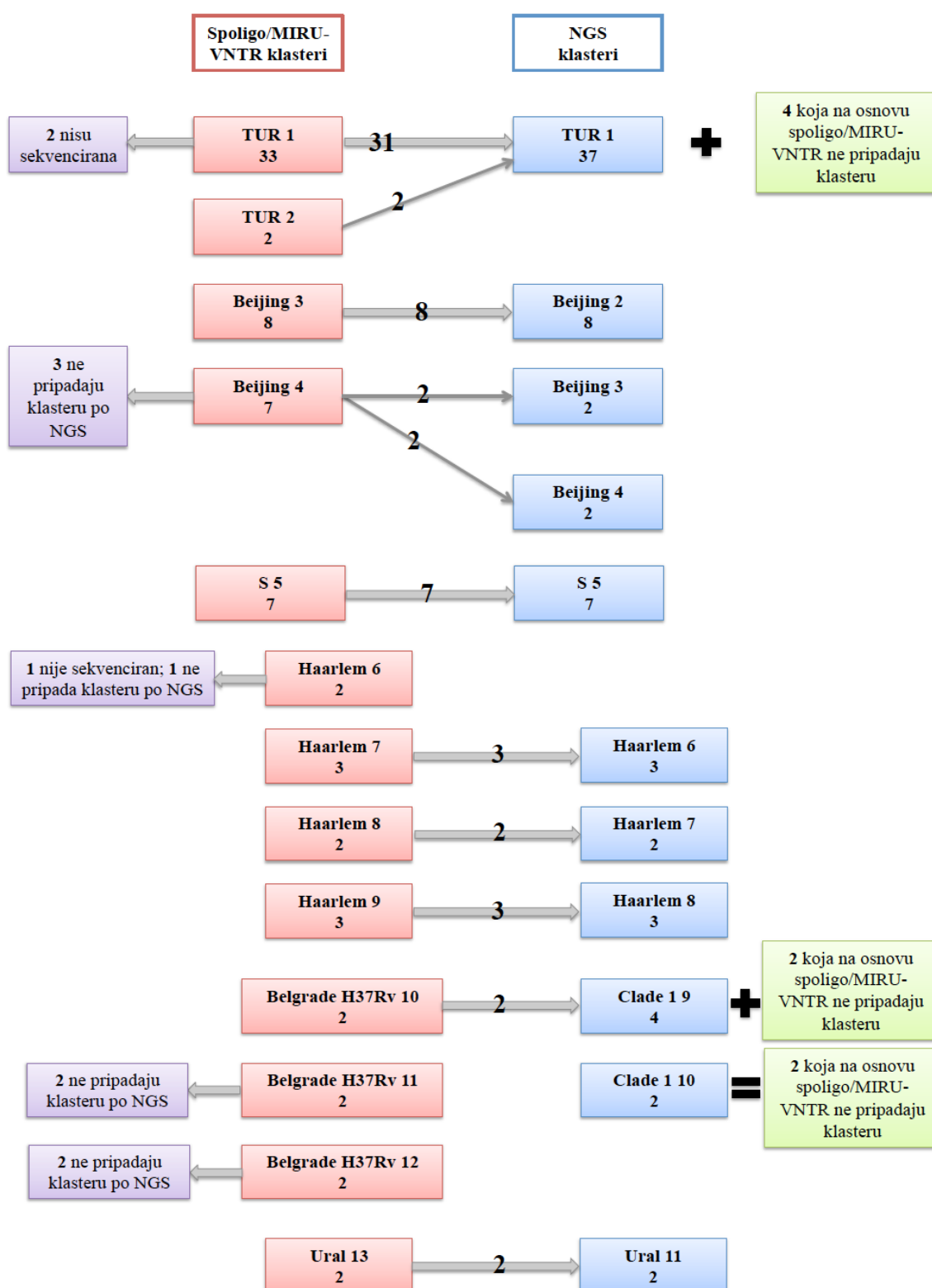
Identifikovani genotipovi 72 soja u klasterima bili su TUR, Beijing, Haarlem, Clade 1 i Ural. NGS rezultati potvrđuju pripadnost sojeva u najvećem identifikovanom klasteru TUR filogenetskoj liniji. U pitanju je klaster koji sa 37 izolata obuhvata 51,4% svih izolata u klasterima koji su prepoznati sekvenciranjem genoma. Od ukupno 39 izolata koji su primenom NGS identifikovani kao TUR genotip, čak 37 (94,9%) su u ovom klasteru. Ukupno 11 od 12 sekvenciranih XDR izolata (91,7%) takođe pripadaju ovom klasteru, a jedan (8,3%) XDR izolat ima jedinstven TUR SNP profil (Grafikon 5, Slika 22). Po tri klastera pripadaju linijama Beijing i Haarlem, dok dva klastera pripadaju Clade 1 liniji, a po jedan klaster Ural i S linijama. Slično rezultatima dobijenim primenom konvencionalnih tehnika genotipizacije, većina sojeva Beijing i S filogenetskih linija su u klasterima. Naime, od 18 sojeva koji su primenom NGS identifikovani kao Beijing, 12 (66,7%) je u klasterima, a od osam sojeva S linije čak sedam (87,5%). Ipak, statistička analiza primenom Pirsonovog Hi kvadrat testa

pokazala je da je samo TUR genotip MDR sojeva MTB značajno udružen sa pripadnošću klasteru, odnosno da se TUR sojevi značajno češće nalaze u klasteru u poređenju sa sojevima koji pripadaju drugim genotipovima (Tabela 12).

Tabela 12. Procena udruženosti genotipova MDR sojeva *M. tuberculosis* i pripadnosti klasteru.

Genotip	NGS klaster		p vrednost
	ne (n=36)	da (n=72)	
Beijing	6 (16,7%)	12 (16,7%)	
Clade 1	16 (44,4%)	6 (8,3%)	
Haarlem	11 (30,6%)	8 (11,1%)	
TUR	2 (5,6%)	37 (51,4%)	0,000
Ural	0 (0%)	2 (2,8%)	
S	1 (2,8%)	7 (9,7%)	

Uporedni prikaz klastera MDR sojeva MTB identifikovanih primenom klasičnih metoda genotipizacije i primenom NGS dat je na Slici 23. Ukupno šest od 13 klastera (46,2%) definisanih na osnovu rezultata klasičnih metoda genotipizacije bilo je potpuno potvrđeno analizama SNP (Beijing klaster 3, S klaster 5, Haarlem klasteri 7, 8 i 9, Ural klaster 13). TUR klaster definisan rezultatima NGS, obuhvatio je 31 izolat iz TUR klastera 1 po spoligotipizaciji i MIRU-VNTR (dva tipizirana izolata iz ovog klastera nisu sekvencirana zbog malog prinosa izolovane DNK), dva izolata iz TUR klastera 2 i dodatna četiri TUR izolata, koji na osnovu rezultata klasičnih tehnika genotipizacije nisu svrstani u klastere (Slika 23). Prema tome, NGS je takođe potvrdio klaster TUR MDR sojeva MTB kao daleko najveći u ispitivanom uzorku izolata. Od sedam izolata Beijing klastera 4 identifikovanog klasičnim tehnikama genotipizacije, tri izolata su na osnovu rezultata NGS imale jedinstvene SNP profile odnosno nisu pripadali nijednom klasteru. Preostala četiri izolata iz ovog klastera, prema rezultatima NGS grupisani su u dva različita klastera, Beijing klasteri 3 i 4 (Slika 23). Kada su u pitanju izolati Haarlem genotipa, rezultati klasičnih tehnika genotipizacije i sekvenciranja genoma se za tri klastera u potpunosti poklapaju (spoligo/MIRU-VNTR Haarlem klasteri 7, 8 i 9 odnosno NGS Haarlem klasteri 6, 7 i 8). Međutim, ustanovljene su razlike za Haarlem klaster 6 identifikovan klasičnim tehnikama genotipizacije (Slika 23). Za Belgrade H37Rv klastere 10, 11 i 12 koji su prepoznati primenom spoligotipizacije i MIRU-VNTR, NGS pokazuje značajno različite rezultate i identifikuje dva klastera od 2 i 4 izolata (Slika 23). Za sojeve Ural genotipa u klasterima, poklapanje rezultata konvencionalne genotipizacije i NGS bilo je potpuno.



Slika 23. Uporedni prikaz klastera MDR sojeva *M. tuberculosis* identifikovanih primenom tehnika klasične genotipizacije i NGS.

Sumirano, imajući u vidu jasne prednosti NGS u odnosu na konvencionalnu genotipizaciju, u ispitivanom uzorku MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji, definitivan broj klastera bio je 11, broj sojeva u klasterima 72, a broj sojeva koji nisu u klasterima 36. U Tabeli 13 dat je uporedni prikaz rezultata spoligotipizacije/MIRU-VNTR i NGS za 36 sojeva sa jedinstvenim SNP profilima, koji dodatno potvrđuje superiornu diskriminatornu moć NGS.

Tabela 13. Uporedni prikaz rezultata spoligotipizacije/MIRU-VNTR i NGS za 36 MDR sojeva *M. tuberculosis* koji su imali jedinstvene NGS profile.

ID izolata	Spoligo/MIRU -VNTR genotip	Spoligo/MIRU -VNTR klaster	NGS linija	NGS klaster	Poklapanje spoligo/MIRU -VNTR i NGS genotipova i klasteringa
6880-08	Beijing	ne	Beijing	ne	da/da
6902-08	Beijing	ne	Beijing	ne	da/da
6911-08	Beijing	ne	Beijing	ne	da/da
6126-09	Beijing	6	Beijing	ne	da/ne
7389-11	Beijing	6	Beijing	ne	da/ne
7405-11	Beijing	6	Beijing	ne	da/ne
6895-08	Belgrade H37Rv	ne	Clade1	ne	da/da
6899-08	Belgrade H37Rv	ne	Clade1	ne	da/da
6912-08	Belgrade H37Rv	ne	Clade1	ne	da/da
6913-08	Belgrade H37Rv	ne	Clade1	ne	da/da
6127-09	Belgrade H37Rv	3	Clade1	ne	da/ne
6137-09	Belgrade H37Rv	2	Clade1	ne	da/ne
7397-11	Belgrade H37Rv	ne	Clade1	ne	da/da
3908-12	Belgrade H37Rv	ne	Clade1	ne	da/da
3919-12	Belgrade H37Rv	ne	Clade1	ne	da/da
3922-12	Belgrade H37Rv	3	Clade1	ne	da/ne
9941-13	Belgrade H37Rv	ne	Clade1	ne	da/da
110-13	Belgrade H37Rv	2	Clade1	ne	da/ne
6878-08	Haarlem	ne	Haarlem	ne	da/da
6891-08	Haarlem	7	Haarlem	ne	da/ne
6903-08	Haarlem	ne	Haarlem	ne	da/da
6910-08	Haarlem	ne	Haarlem	ne	da/da
6140-09	Haarlem	ne	Haarlem	ne	da/da
7391-11	Haarlem	ne	Haarlem	ne	da/da
7406-11	Haarlem	ne	Haarlem	ne	da/da
9935-13	Haarlem	ne	Clade1	ne	da/da
9944-13	Haarlem	ne	Haarlem	ne	da/da
116-14	Haarlem	ne	Haarlem	ne	da/da
6135-09	nedefinisan	ne	Haarlem	ne	ne/da

7388-11	nedefinisan	ne	Clade1	ne	ne/da
3909-12	nedefinisan	ne	Haarlem	ne	ne/da
6134-09	S	ne	S	ne	da/da
6136-09	TUR	ne	TUR	ne	da/da
3926-12	TUR	ne	TUR	ne	da/da
6139-09	Uganda1	ne	Clade1	ne	dada
3917-12	Ugandal_like	ne	Clade1	ne	da/da

Rezultati sekvenciranja genoma MDR sojeva MTB pet pacijenata, za koje su po dva izolata uključena u studiju, prikazani su u Tabeli 14. Za pacijente označene brojevima 5 i 7 potvrđeni su rezultati dobijeni klasičnim tehnikama genotipizacije. Za oba pacijenta su ponovljeni izolati identifikovani kao S genotip i imali su iste SNP profile. Kada su u pitanju pacijenti označeni brojevima 8 i 56, klasična genotipizacija je pokazala po jedan TUR izolat u klasteru i jedan van klastera. Na osnovu rezultata NGS, ponovljeni izolati ovih pacijenata su identifikovani kao TUR genotip i imali su iste SNP profile. Kod ponovljenih izolata pacijenta označenog brojem 67, NGS je potvrdio rezultate klasične genotipizacije odnosno potvrdio reinfekciju drugim MDR sojem MTB. Pacijent je prvo bio inficiran sojem Clade 1 linije jedinstvenog SNP profila, a zatim ponovo inficiran sojem Beijing genotipa koji pripada NGS klasteru 2 (Tabela 14).

Tabela 14. Rezultati sekvenciranja genoma MDR sojeva *M. tuberculosis* poreklom od pacijenata sa po dva izolata uključena u studiju.

Pacijent	Izolat	Genotip	NGS klaster
5	6883-08	S	9
	6896-08	S	9
7	6885-08	S	9
	6146-09	S	9
8	6886-08	TUR	1
	6901-08	TUR	1
56	6145-09	TUR	1
	3925-12	TUR	1
67	7397-11	Clade 1	ne
	9942-13	Beijing	2

4.3.3. Karakteristike ispitivane populacije pacijenata

Za svih 110 pacijenata kojima je u periodu 01.01.2008.-31.05.2014. godina laboratorijski potvrđena MDR TB u Srbiji, prikupljeni su demografski, klinički, epidemiološki i laboratorijski podaci na osnovu uvida u Nacionalnu bazu podataka o obolima od MDR TB i pregleda medicinske i laboratorijske dokumentacije (Tabela

15). Najveći broj pacijenata uključenih u studiju bili su starosti od 55 do 64 godine (30/110; 27,3%), rođeni u Srbiji (107/110; 97,3%) i prethodno lečeni ATL (61/110; 55,5%). Ukupno 17,3% (19/110) pacijenata je uspešno završilo lečenje, dok je 27,3% umrlo. Od 55 pacijenata za koje je ustanovljeno prisustvo nekog komorbiditeta, kod čak 31 pacijenta je u pitanju bilo mentalno oboljenje. Zajednička karakteristika za čak 93 pacijenta studijske populacije bila je boravak u specijalnim bolnicama za plućne bolesti (Tabela 15). Za detaljan uvid u transmisiju pojedinačnih sojeva organizovani su razgovori sa nadležnim lekarima pacijenata čiji su izolati svrstani u klastere.

Tabela 15. Demografske, kliničke, epidemiološke i laboratorijske karakteristike pacijenata obolelih od MDR TB u Srbiji u periodu 01.01.2008.-31.05.2014. godina.

Karakteristike pacijenata	n (%)
Pol	
muški	87 (79,1)
ženski	23 (20,9)
Dobna grupa	
15-24	8 (7,3)
25-34	8 (7,3)
35-44	22 (20,0)
45-54	29 (26,3)
55-64	30 (27,3)
65-	13 (11,8)
Rođen u Srbiji	
da	107 (97,3)
ne	3 (2,7)
Istorija prethodnog lečenja	
da	61 (55,5)
ne	48 (43,6)
nepoznato	1 (0,9)
Ishod lečenja	
neuspešno lečenje	5 (4,5)
lečenje u toku	10 (9,1)
umro	30 (27,3)
završeno lečenje	31 (28,2)
uspešno lečenje	19 (17,3)
izgubljen iz praćenja	6 (5,4)
nepoznato	9 (8,2)
Laboratorijska dijagnoza TB	
Direktna mikroskopija	
• pozitivna	79 (71,8)
• negativna	30 (27,3)
• nepoznato	1 (0,9)
Komorbiditeti	
da	55 (50,0)
ne	46 (41,8)
nepoznato	9 (8,2)
HIV pozitivan	2
hronična opstruktivna bolest pluća	9
hronično oboljenje jetre	2

hepatitis B/C	2
kardiovaskularno oboljenje	6
diabetes mellitus	9
reumatoidni artritis	1
mentalno oboljenje	31
• shizofrenija	26
• depresivni poremećaj	2
• bipolarni poremećaj	1
• mentalna retardacija	2
Socijalni faktori rizika	
da	26 (23,6)
ne	75 (68,2)
nepoznato	9 (8,2)
alkoholizam	14
metadonska zavisnost	1
pušenje	9
socijalno ugrožen	16
boravak u zatvoru	2
sezonski rad u Rusiji	1
Dugotrajni boravak u specijalnim bolnicama za plućne bolesti*	
da	93 (84,5)
ne	17 (15,5)
Radiografija pluća (prisustvo kaverne)	
da	75 (68,2)
ne	26 (23,6)
nepoznato	9 (8,2)
Ukupno	110 (100)

*Specijalna bolnica za plućne bolesti „Ozren“; Specijalna bolnica za plućne bolesti „Budislav Babić“ Bela Crkva

4.3.4. Udruženost genotipova MDR sojeva MTB i karakteristika pacijenata

Ispitivana je moguća veza između genotipova MDR sojeva MTB identifikovanih primenom NGS i određenih karakteristika studijske populacije pacijenata. Karakteristike koje su uzete u obzir su: pol, starost, državljanstvo, izbeglički status, region boravišta, istorija prethodnog lečenja TB, alkoholizam, dijagnoza diabetes mellitus-a, shizofrenije, kardiovaskularnih bolesti i hronične opstruktivne bolesti pluća, prisustvo kaverni i hospitalizacija u specijalnim bolnicama za lečenje plućnih bolesti na Ozrenu i u Beloj Crkvi (Tabela 16).

Tabela 16. Udruženost šest genotipova MDR sojeva *M. tuberculosis* definisanih primenom NGS i demografskih, kliničkih i epidemioloških karakteristika pacijenata.

	Beijing	Clade 1	Haarlem	TUR	Ural	S	p vrednost
pol							
muški	13 (72,2%)	18 (81,8%)	15 (78,9%)	30 (81,1%)	2 (100%)	4 (66,7%)	0,909
ženski	5 (27,8%)	4 (18,2%)	4 (21,1%)	7 (18,9%)	0 (0%)	2 (33,3%)	
državljanstvo							
Srbija	17 (94,4%)	22 (100%)	19 (100%)	35 (94,6%)	2 (100%)	6 (100%)	0,572
BiH	1 (5,6%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (5,4%)	0 (0%)	0 (0%)	
izbeglički status							
ne	18 (100%)	22 (100%)	19 (100%)	33 (89,2%)	2 (100%)	6 (100%)	0,188
da	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (10,8%)	0 (0%)	0 (0%)	
dobna grupa							
15-24	2 (11,1%)	1 (4,5%)	2 (10,5%)	3 (8,1%)	1 (50%)	0 (0%)	0,881
25-34	0 (0%)	3 (13,6%)	1 (5,3%)	2 (5,4%)	0 (0%)	1 (16,7%)	
35-44	5 (27,8%)	7 (31,8%)	2 (10,5%)	7 (18,9%)	0 (0%)	1 (16,7%)	
45-54	5 (27,8%)	3 (13,6%)	7 (36,8%)	10 (27%)	0 (0%)	1 (16,7%)	
55-64	3 (16,7%)	5 (22,7%)	5 (26,3%)	12 (32,4%)	1 (50%)	1 (16,7%)	
65+	3 (16,7%)	3 (13,6%)	2 (10,5%)	3 (8,1%)	0 (0%)	2 (33,3%)	
region							
Beograd	9 (52,9%)	6 (27,3%)	2 (10,5%)	11 (31,4%)	1 (50%)	1 (16,7%)	0,310
Vojvodina	3 (17,6%)	4 (18,2%)	5 (26,3%)	6 (17,1%)	0 (0%)	0 (0%)	
centralna Srbija	5 (29,4%)	12 (54,5%)	12 (63,2%)	18 (51,4%)	1 (50%)	5 (83,3%)	
istorija prethodnog lečenja							
ne	12 (66,7%)	8 (36,3%)	8 (42,1%)	14 (37,8%)	2 (100%)	3 (50%)	0,189
da	6 (33,3%)	14 (63,6%)	11 (57,9%)	23 (62,2%)	0 (0%)	3 (50%)	
alkoholizam							
ne	17 (94,4%)	19 (86,4%)	14 (73,7%)	34 (91,9%)	1 (50%)	5 (83,3%)	0,210
da	1 (5,6%)	3 (13,6%)	5 (26,3%)	3 (8,1%)	1 (50%)	1 (16,7%)	
diabetes mellitus							
ne	17 (94,4%)	20 (90,9%)	17 (89,5%)	34 (91,9%)	2 (100%)	6 (100%)	1,000
da	1 (5,6%)	2 (9,1%)	2 (10,5%)	3 (8,1%)	0 (0%)	0 (0%)	
shizofrenija							
ne	18 (100%)	21 (95,5%)	18 (94,7%)	15 (40,5%)	2 (100%)	6 (100%)	0,000
da	0 (0%)	1 (4,5%)	1 (5,3%)	22 (59,5%)	0 (0%)	0 (0%)	
kardiovaskularno oboljenje							
ne	16 (88,9%)	22 (100%)	19 (100%)	34 (91,9%)	2 (100%)	6 (100%)	0,369
da	2 (11,1%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (8,1%)	0 (0%)	0 (0%)	
hronična opstruktivna bolest pluća							
ne	17 (94,4%)	21 (95,5%)	17 (89,5%)	31 (83,8%)	2 (100%)	6 (100%)	0,595
da	1 (5,6%)	1 (4,5%)	2 (10,5%)	6 (16,2%)	0 (0%)	0 (0%)	
prisustvo kaverne							
ne	5 (31,2%)	5 (23,8%)	3 (18,8%)	7 (18,9%)	1 (50%)	1 (33,3%)	0,870
da	11 (68,8%)	16 (76,2%)	13 (81,2%)	30 (81,1%)	1 (50%)	2 (66,7%)	

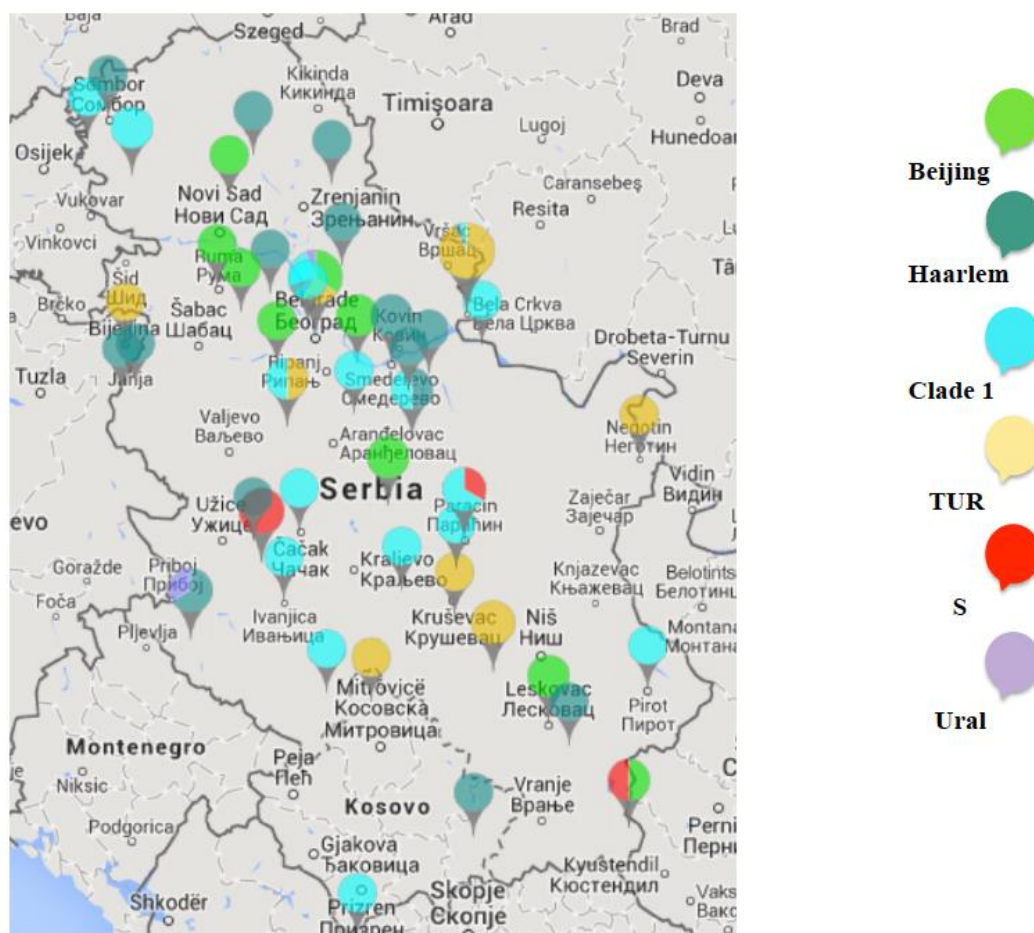
	Beijing	Clade 1	Haarlem	TUR	Ural	S	p vrednost
hospitalizacija							
BC*	0 (0%)	1 (4,8%)	1 (6,3%)	23 (65,7%)	0 (0%)	0 (0%)	
Ozren**	16 (100%)	20 (95,2%)	15 (93,7%)	10 (28,6%)	2 (100%)	3 (100%)	0,001
BC i Ozren	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (5,7%)	0 (0%)	0 (0%)	

*Specijalna bolnica za plućne bolesti „Budislav Babić“ Bela Crkva

** Specijalna bolnica za plućne bolesti „Ozren“

Na osnovu analize udruženosti navedenih karakteristika pacijenata i pojedinačnih genotipova kojima su pripadali MDR sojevi MTB izolovani iz uzoraka pacijenata, utvrđena je značajna povezanost samo za TUR genotip. Pokazano je da su MDR sojevi MTB izolovani iz uzoraka pacijenata obolelih od shizofrenije i uzoraka pacijenata koji su bili hospitalizovani u Specijalnoj bolnici za plućne bolesti „Budislav Babić“ Bela Crkva značajno udruženi sa TUR genotipom (Tabela 16).

Statistička analiza nije pokazala značajnu vezu između regiona boravišta pacijenata i određenih filogenetskih linija MDR sojeva MTB identifikovanih u okviru ovog istraživanja. Geografska distribucija identifikovanih genotipova MDR sojeva MTB, odnosno mesta prebivališta pacijenata od kojih su ti sojevi izolovani na području Srbije (Slika 24), je u skladu sa ovakvim rezultatom statističke analize. Ne uočava se predominacija određenih genotipova u određenim područjima. Nalaz koji se izdvaja jeste prisustvo čak pet genotipova MDR sojeva MTB na području Beograda. S obzirom na to da je u pitanju grad sa izrazito mobilnom i daleko najvećom populacijom u Srbiji, ovakav nalaz diverziteta genotipova MDR sojeva MTB je donekle i očekivan.



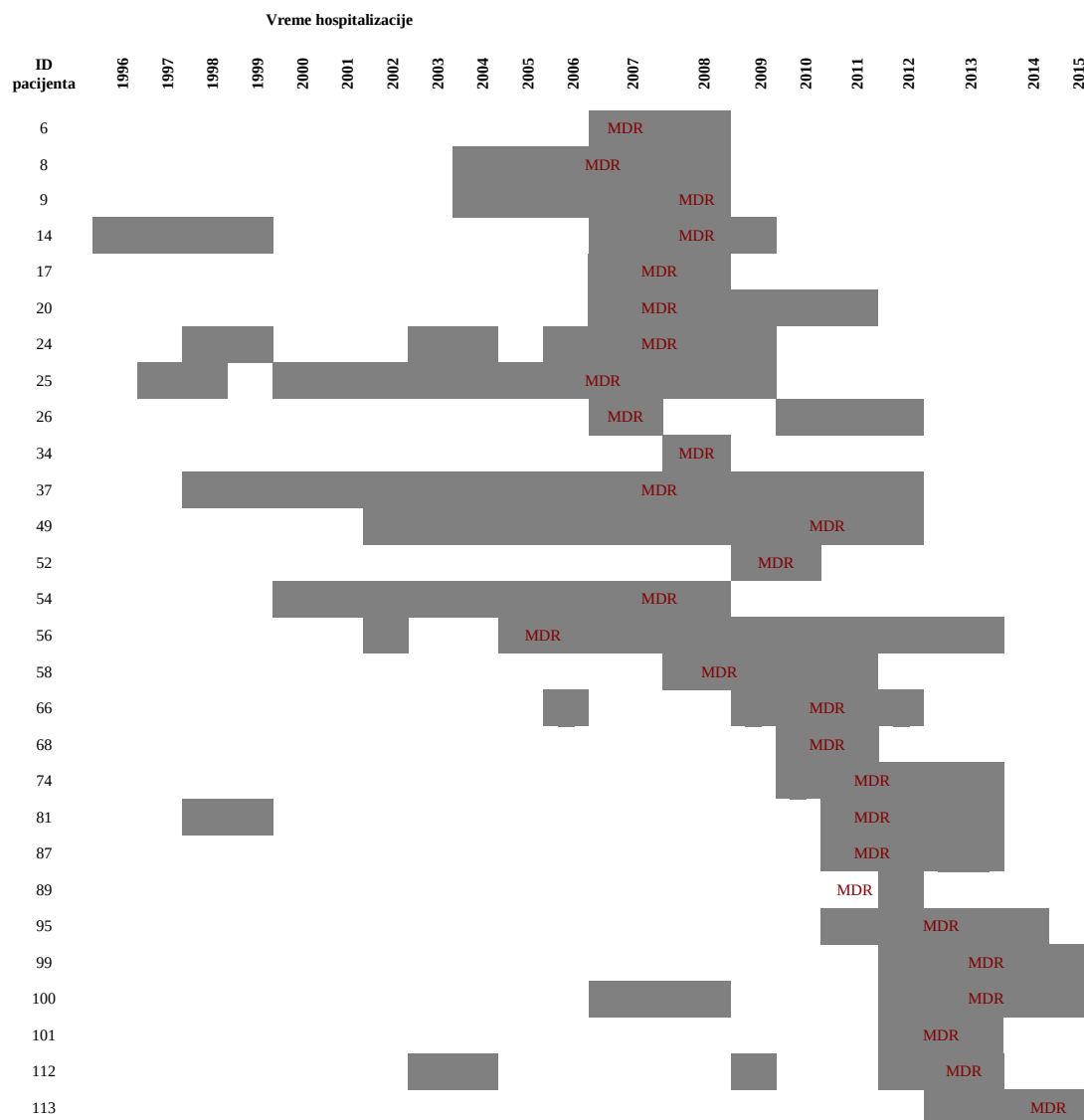
Slika 24. Geografska distribucija šest genotipova MDR sojeva *M. tuberculosis* definisanih primenom NGS na području Srbije.

4.3.5. Epidemiološke veze između pacijenata iz čijih uzoraka su izolovani MDR sojevi MTB grupisani u klasterima i oblici transmisije MDR TB u Srbiji

Od ukupno 13 klastera MDR sojeva MTB odnosno pacijenata iz čijih uzoraka su ti sojevi izolovani, koji su identifikovani primenom konvencionalnih tehnika genotipizacije, moguće epidemiološke veze između pacijenata dokazane su u devet (69,2%). Primenom sekvenciranja genoma identifikovano je ukupno 11 klastera MDR sojeva MTB odnosno pacijenata, a moguće epidemiološke veze dokazane su u osam (72,7%) klastera.

TUR klaster 1 definisan na osnovu rezultata NGS, obuhvata 37 MDR sojeva MTB koji su izolovani od 35 pacijenata. Od ovih 35 pacijenata čak 26 (74,3%) bilo je hospitalizovano na odeljenju za lečenje psihijatrijskih bolesnika obolelih od TB u Specijalnoj bolnici za plućne bolesti „Budislav Babić“ Bela Crkva. Na osnovu pregleda

medicinske dokumentacije, utvrđeno je da je većina pacijenata bila hospitalizovana u nekoliko navrata, a termini hospitalizacije su se u velikoj meri preklapali (Slika 25). Dodatna dva izolata pacijenata koji su takođe bili hospitalizovani u ovoj bolnici (pacijenti označeni brojevima 34 i 58 na Slici 25) i koji su tipizirani klasičnim tehnikama genotipizacije, nisu sekvencirana. Izolati ova dva pacijenta su prema rezultatima klasične genotipizacije takođe pripadali TUR klasteru. Ukupno 24 pacijenta bila su hospitalizovana zbog shizofrenije. Na osnovu podataka dobijenih od odgovornih lekara, do 2011. godine odnosno do početka rada odvojenog odeljenja za bolesnike sa MDR TB, mere prevencije i kontrole nozokomijalne transmisije TB bile su neodgovarajuće. U svakoj sobi je u veoma lošim uslovima bilo smešteno po više od dva pacijenta, koji su veliki deo vremena provodili zajedno u sobama i zajedničkim prostorijama bolnice. Prema tome, ovakvi rezultati genotipizacije MDR sojeva MTB u kontekstu epidemioloških podataka o pacijentima, jasno pokazuju da je najveći lanac transmisije MDR TB u Srbiji nozokomijalna transmisija, da nam je ključni fokus ove transmisije bolnica u Beloj Crkvi, a da je glavni „motor“ transmisije MDR TB u našoj zemlji TUR genotip.



Slika 25. Prikaz vremena i dužine hospitalizacije 28 pacijenata hospitalizovanih u Specijalnoj bolnici za plućne bolesti „Budislav Babić“ Bela Crkva iz čijih uzoraka su izolovani MDR *M. tuberculosis* sojevi TUR klastera 1. **MDR** = vreme postavljanja dijagnoze MDR TB.

Pored toga, dva pacijenta iz ovog TUR klastera su porodični kontakti pacijenata hospitalizovanih u bolnici u Beloj Crkvi. Interesantno je da su izolati dva pacijenta koja su bila hospitalizovana u ovoj bolnici na osnovu SNP analiza definisani kao Clade 1, odnosno Haarlem genotip. U pitanju su izolati označeni brojevima 6127-09 i 3909-12 (Tabela 13), koji su imali jedinstvene SNP profile. Ipak, ovakav nalaz svakako ne umanjuje značaj TUR genotipa kao apsolutno predominantnog u aktivnoj transmisiji MDR TB u bolnici u Beloj Crkvi.

Od osam pacijenata iz čijih uzoraka su izolovani sojevi grupisani u Beijing klasteru 2, porodične i socijalne prijateljske odnosno susedske veze su potvrđene za pet. Za dva pacijenta Beijing klastera 3 nisu dokazane nikakve epidemiološke veze. Za dva pacijenta iz čijih uzoraka su izolovani sojevi koji pripadaju Beijing klasteru 4 ustanovljeno je da imaju isto mesto boravišta, Kragujevac, ali ostali epidemiološki podaci nisu otkrili kontakt ili vezu između ovih pacijenata (Tabela 17). Za dva pacijenta od kojih su izolovani sojevi grupisani u S klasteru 5 situacija je slična kao kod pacijenata čiji sojevi pripadaju Beijing klasteru 4. U pitanju je isto mesto boravka, Arilje, ali nema dokaza o bilo kakvom kontaktu ili vezi između ovih pacijenata. Za ova dva pacijenta su inače u studiju bila uključena po dva izolata i imali su identične SNP profile. Nisu dokazane epidemiološke veze između preostala tri pacijenta iz čijih uzoraka su izolovani sojevi S klastera 5 (Tabela 17). Isto mesto boravka, ali bez dokazanih epidemioloških veza ustanovljeno je i za pacijente čiji sojevi pripadaju Haarlem klasterima 6 i 7. Mesto boravišta sva tri pacijenta Haarlem klastera 6 je Smederevo, a dva pacijenta Haarlem klastera 7 Loznica. Za sva tri pacijenta iz čijih uzoraka su izolovani sojevi grupisani u Haarlem klasteru 8 pokazane su jasne epidemiološke veze. U pitanju su tri prijatelja koji su puno vremena provodili zajedno. Klasičnim tehnikama genotipizacije prepoznat je još jedan klaster pacijenata iz čijih uzoraka su izolovani MDR sojevi Haarlem genotipa. U pitanju su dva brata i jasan slučaj porodične transmisije MDR TB. Međutim, za jedan od sojeva izolovanih od ovih pacijenata NGS nije urađen i stoga ovaj klaster nije detektovan primenom sekvenciranja genoma (Tabela 17). Za četiri pacijenta iz čijih uzoraka su izolovani sojevi koji na osnovu rezultata NGS pripadaju Clade 1 klasteru 9 nisu dokazane epidemiološke veze. Pri tome, izolati dva od ova četiri pacijenta su prepoznati kao klaster i primenom konvencionalnih tehnika genotipizacije. Primenom klasičnih tehnika detektovana su još dva klastera od po dva izolata Belgrade H37Rv genotipa odnosno dva klastera od po dva pacijenta iz čijih uzoraka su ovi sojevi izolovani. Dva pacijenta u jednom od ova dva klastera imaju isto mesto boravišta, selo Ratkovo, i dokazano je da su bili u kontaktu. Međutim, NGS za sva četiri izolata pokazuje četiri jedinstvena odnosno različita SNP profila tipična za Clade 1 liniju. Nasuprot ovoj situaciji, primenom sekvenciranja genoma identifikovan je još jedan klaster od dva soja odnosno pacijenta, Clade 1 klaster 10, koji nije detektovan primenom klasičnih tehnika genotipizacije. Za

dva pacijenta čiji sojevi pripadaju ovom klasteru nisu otkrivene epidemiološke veze (Tabela 17). Poslednji klaster MDR sojeva bacila TB odnosno pacijenata identifikovan primenom NGS je Ural klaster 11. Između dva pacijenta u ovom klasteru postoji rodbinska veza i klaster predstavlja dokaz porodične transmisije MDR TB (Tabela 17). Sumirano, pored nozokomijalne transmisije kao glavnog oblika transmisije MDR TB u Srbiji, primena tehnika genotipizacije pokazala je da se MDR TB u našoj zemlji javlja u većem broju mikroepidemija koje se najčešće zasnivaju na prijateljskim i/ili susedskim kontaktima, kao i porodičnoj transmisiji. Klasteri sojeva pacijenata koji žive u istom mestu, ali bez dokazanih epidemioloških veza ukazuju na ulogu kratkotrajnog, slučajnog kontakta u transmisiji MDR TB u Srbiji.

Tabela 17. Uporedni prikaz epidemioloških veza između pacijenata iz čijih uzoraka su izolovani MDR *M. tuberculosis* sojevi grupisani u klastere definisane klasičnim tehnikama genotipizacije i NGS.

ID pacijenta	Spoligo/MIRU-VNTR genotip	Klaster	NGS linija	Klaster	Epidemiološka veza
6	TUR	1	TUR	1	hospitalizacija u BC*
9	TUR	ne	TUR	1	hospitalizacija u BC
13	TUR	1	TUR	1	ne
14	TUR	1	TUR	1	hospitalizacija u BC
17	TUR	1	TUR	1	hospitalizacija u BC
20	TUR	1	TUR	1	hospitalizacija u BC
8	TUR	1	TUR	1	hospitalizacija u BC
24	TUR	1	TUR	1	hospitalizacija u BC
25	TUR	1	TUR	1	hospitalizacija u BC
26	TUR	1	TUR	1	hospitalizacija u BC
28	TUR	ne	TUR	1	ne
34	TUR	1	nije sekvenciran		hospitalizacija u BC
37	TUR	1	TUR	1	hospitalizacija u BC
42	TUR	1	TUR	1	ne
49	TUR	1	TUR	1	hospitalizacija u BC
52	TUR	1	TUR	1	hospitalizacija u BC snaha 55
54	TUR	1	TUR	1	hospitalizacija u BC
55	TUR	1	TUR	1	svekar 52
56	TUR	1	TUR	1	hospitalizacija u BC
58	TUR	1	nije sekvenciran		hospitalizacija u BC
66	TUR	1	TUR	1	hospitalizacija u BC
68	TUR	1	TUR	1	hospitalizacija u BC
73	TUR	1	TUR	1	ne
74	TUR	1	TUR	1	hospitalizacija u BC
80	TUR	1	TUR	1	ne
81	TUR	1	TUR	1	hospitalizacija u BC
87	TUR	1	TUR	1	hospitalizacija u BC
89	TUR	1	TUR	1	hospitalizacija u BC ćerka 96
95	TUR	1	TUR	1	hospitalizacija u BC
96	TUR	2	TUR	1	majka 89
99	TUR	2	TUR	1	hospitalizacija u BC

ID pacijenta	Spoligo/MIRU-VNTR genotip	Klaster	NGS linija	Klaster	Epidemiološka veza
100	TUR	1	TUR	1	hospitalizacija u BC
101	TUR	1	TUR	1	hospitalizacija u BC
109	TUR	1	TUR	1	ne
112	TUR	1	TUR	1	hospitalizacija u BC
113	TUR	1	TUR	1	hospitalizacija u BC
114	TUR	1	TUR	1	ne
67	Beijing	3	Beijing	2	prijatelj 102
84	Beijing	3	Beijing	2	majka 102; sused 85 i 92
85	Beijing	3	Beijing	2	sused 84, 92 i 102
92	Beijing	3	Beijing	2	sused 84, 85 i 102
102	Beijing	3	Beijing	2	sin 84; sused 85 i 92; prijatelj 67
111	Beijing	3	Beijing	2	ne
115	Beijing	3	Beijing	2	ne
117	Beijing	3	Beijing	2	ne
2	Beijing	4	Beijing	3	ne
4	Beijing	4	Beijing	3	ne
39	Beijing	4	Beijing	ne	ne
60	Beijing	4	Beijing	ne	ne
69	Beijing	4	Beijing	4	iz istog grada kao 71 (Kragujevac)
71	Beijing	4	Beijing	4	iz istog grada kao 69 (Kragujevac)
75	Beijing	4	Beijing	ne	ne
5 (dva soja)	S	5	S	5	iz istog grada kao 7 (Arlje)
7 (dva soja)	S	5	S	5	iz istog grada kao 5 (Arlje)
62	S	5	S	5	ne
63	S	5	S	5	ne
72	S	5	S	5	ne
11	Haarlem	6	Haarlem	ne	brat 35
35	Haarlem	6	nije sekvenciran		brat 11
10	Haarlem	7	Haarlem	6	iz istog grada kao 18 i 44 (Smederevo)
18	Haarlem	7	Haarlem	6	iz istog grada kao 10 i 44 (Smederevo)
44	Haarlem	7	Haarlem	6	iz istog grada kao 10 i 18 (Smederevo)
64	Haarlem	8	Haarlem	7	iz istog grada kao 105 (Loznica)
105	Haarlem	8	Haarlem	7	iz istog grada kao 64 (Loznica)
27	Haarlem	9	Haarlem	8	iz istog mesta kao 43 i 38 (Brodarevo)
43	Haarlem	9	Haarlem	8	iz istog mesta kao 27 i 38 (Brodarevo)
38	Haarlem	9	Haarlem	8	iz istog mesta kao 27 i 43 (Brodarevo)
12	Belgrade H37Rv	10	Clade1	9	ne
70	Belgrade H37Rv	10	Clade1	9	ne
53	Belgrade H37Rv	ne	Clade1	9	ne
83	Belgrade H37Rv	ne	Clade1	9	ne
48	Belgrade H37Rv	11	Clade1	ne	ne
110	Belgrade H37Rv	11	Clade1	ne	ne
40	Belgrade H37Rv	12	Clade1	ne	iz istog mesta kao 91 (Ratkovo)
91	Belgrade H37Rv	12	Clade1	ne	iz istog mesta kao 40 (Ratkovo)
41	Belgrade H37Rv	ne	Clade1	10	ne
98	Belgrade H37Rv	ne	Clade1	10	ne
107	URAL	13	Ural	11	unuk 108
108	URAL	13	Ural	11	deda 107

* Specijalna bolnica za plućne bolesti „Budislav Babić“ Bela Crkva

4.3.6. Faktori rizika za transmisiju MDR sojeva MTB u Srbiji

U cilju otkrivanja faktora udruženih sa transmisijom MDR sojeva MTB, ispitivane su razlike između demografskih, kliničkih, epidemioloških i laboratorijskih karakteristika pacijenata iz čijih uzoraka su izolovani MDR sojevi grupisani u 11 NGS klastera i pacijenata iz čijih uzoraka su izolovani MDR sojevi MTB koji su imali jedinstvene SNP profile. Kao i kod ispitivanja moguće udruženosti genotipova MDR sojeva MTB i karakteristika pacijenata, karakteristike koje su uzete u obzir su: pol, starost, državljanstvo, izbeglički status, region boravišta, istorija prethodnog lečenja TB, alkoholizam, dijagnoza diabetes mellitus-a, shizofrenije, kardiovaskularnih bolesti i hronične opstruktivne bolesti pluća, prisustvo kaverni i hospitalizacija u specijalnim bolnicama za lečenje plućnih bolesti na Ozrenu i u Beloj Crkvi (Tabele 18 i 19).

Tabela 18. Udruženost demografskih karakteristika pacijenata i pripadnosti klasteru.

		NGS klaster		p vrednost
		ne (n=36)	da (n=68)	
Pol				
	muški	26 (72,2%)	56 (82,4%)	0,229
	ženski	10 (27,8%)	12 (17,6%)	
Državljanstvo				
	Srbija	35 (97,2%)	66 (97,1%)	1,000
	BiH	1 (2,8%)	2 (2,9%)	
Izbeglički status				
	ne	36 (100%)	64 (94,1%)	0,296
	da	0 (0%)	4 (5,9%)	
Dobna grupa				
	15-24	1 (2,8%)	8 (11,8%)	0,471
	25-34	4 (11,1%)	3 (4,4%)	
	35-44	6 (16,7%)	16 (23,5%)	
	45-54	11 (30,6%)	15 (22,1%)	
	55-64	9 (25%)	18 (26,5%)	
	65+	5 (13,9%)	8 (11,8%)	
Region				
	Beograd	9 (25,7%)	21 (31,8%)	0,121
	Vojvodina	10 (28,6%)	8 (12,1%)	
	centralna Srbija	16 (45,7%)	37 (56,1%)	

Tabela 19. Udruženost kliničkih, epidemioloških i laboratorijskih karakteristika pacijenata i pripadnosti klasteru.

	NGS klaster		p vrednost
	ne (n=36)	da (n=68)	
Istorija prethodnog lečenja			
ne	13 (36,1%)	34 (50%)	0,176
da	23 (63,9%)	34 (50%)	
Alkoholizam			
ne	28 (77,8%)	62 (91,2%)	0,073
da	8 (22,2%)	6 (8,8%)	
Diabetes mellitus			
ne	33 (91,7%)	63 (92,6%)	1,000
da	3 (8,3%)	5 (7,4%)	
Shizofrenija			
ne	34 (94,4%)	46 (67,6%)	0,002
da	2 (5,6%)	22 (32,4%)	
Kardiovaskularno oboljenje			
ne	35 (97,2%)	64 (94,1%)	0,657
da	1 (2,8%)	4 (5,9%)	
Hronična opstruktivna bolest pluća			
ne	33 (91,7%)	61 (89,7%)	1,000
da	3 (8,3%)	7 (10,3%)	
Prisustvo kaverne			
ne	6 (17,6%)	16 (26,2%)	0,342
da	28 (82,4%)	45 (73,8%)	
Hospitalizacija			
Bela Crkva*	2 (5,9%)	23 (39%)	0,000
Ozren**	32 (94,1%)	34 (57,6%)	
Bela Crkva i Ozren	0 (0%)	2 (3,4%)	
Trajanje hospitalizacije (meseci) (n=99)	34 (8,5)	65 (11)	0,264
Mikroskopija (n=107)			
pozitivna	30 (83,3%)	50 (70,4%)	0,146
negativna	6 (16,7%)	21 (29,6%)	
Konverzija sputuma (meseci) (n=79)	3 (3-4,5)	3 (3-9)	0,097

*Specijalna bolnica za plućne bolesti „Budislav Babić“ Bela Crkva

**Specijalna bolnica za plućne bolesti „Ozren“

Pokazano je da su pacijenti oboleli od shizofrenije i pacijenti koji su bili hospitalizovani u Specijalnoj bolnici za plućne bolesti „Budislav Babić“ Bela Crkva značajno češće grupisani u klastere od pacijenata koji nisu imali shizofreniju kao komorbiditet i koji

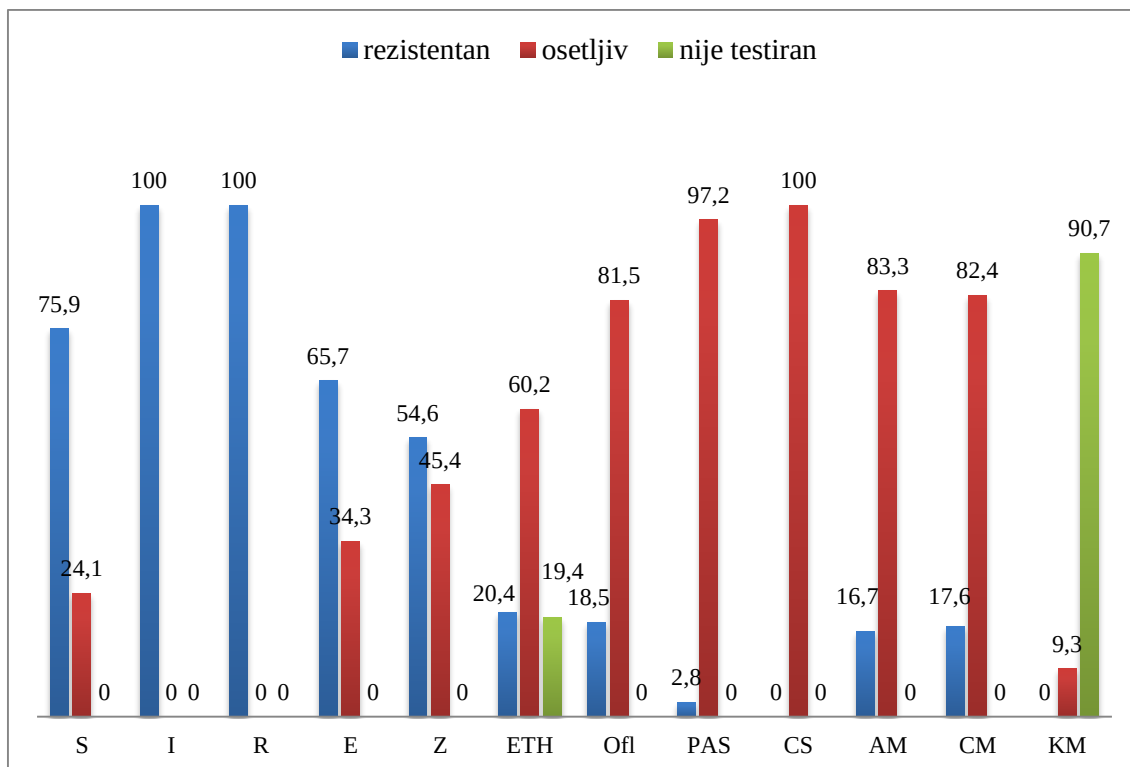
nisu bili hospitalizovani u ovoj bolnici. Prema tome, od svih ispitivanih karakteristika, prepoznati faktori rizika za skorašnju, aktivnu transmisiju MDR TB u Srbiji su shizofrenija kao komorbiditet i hospitalizacija u bolnici u Beloj Crkvi.

4.4. Genetička osnova rezistencije MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji na ATL prve i druge linije

Rezultati fenotipskog i genotipskog ispitivanja osetljivosti na ATL prve i druge linije biće prikazani za kolekciju od 108 MDR sojeva MTB, za koje je urađeno sekvenciranje genoma i omogućen sveobuhvatan uvid u genetičku osnovu njihove rezistencije.

4.4.1. Fenotipski profili osetljivosti MDR sojeva MTB u Srbiji

Rezultati fenotipskog testa za ispitivanje osetljivosti na ATL prve i druge linije 108 MDR sojeva MTB prikazani su Grafikonom 6. Ukupno 75,9% (82/108) sojeva bilo je rezistentno na S, 65,7% (71/108) na E, 54,6% (59/108) na Z, 20,4% (22/108) na ETH, 18,5% (20/108) na ofloksacin (OfI), 17,6% (19/108) na CM, 16,7% (18/108) na AM i 2,6% (3/108) na PAS (Grafikon 6). Nijedan soj nije bio rezistentan na CS, a test osetljivosti na KM urađen je za samo 10 sojeva i svi su bili osetljivi na ovaj antibiotik. Nijedan fenotipski profil rezistencije u ispitivanoj kolekciji MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji nije bio jasno predominantan, ali je najčešći bio S, I, R, E, Z (19/108; 17,6%). Najširi profil rezistencije koji je ustanovljen u ispitivanom uzorku sojeva i to samo kod jednog izolata, obuhvatio je rezistenciju na čak devet ATL (S, I, R, E, Z, ETH, OfI, AM, CM) (Tabela 20).



Grafikon 6. Učestalost fenotipske rezistencije na antituberkulotike prve i druge linije 108 MDR sojeva *M. tuberculosis*. S=streptomycin; I=izoniazid; R=rifampicin; E=etambutol; Z=pirazinamid; ETH=etionamid; OfI=ofloksacin; PAS=para-aminosalicilna kiselina; CS=cikloserin; AM=amikacin; CM=kapreomicin; KM=kanamicin.

Tabela 20. Fenotipski profili rezistencije na antituberkulotike (ATL) prve i druge linije 108 MDR sojeva *M. tuberculosis*.

Broj ATL na koje je izolat rezistentan	Fenotipski profil osjetljivosti	Broj izolata	% izolata
2	I, R	13	12
3	S, I, R	4	3,7
	I, R, E	5	4,6
	I, R, Z	1	0,9
4	S, I, R, E	12	11,1
	S, I, R, Z	5	4,6
	I, R, E, Z	4	3,7
	S, I, R, ETH	1	0,9
5	S, I, R, E, Z	19	17,6
	S, I, R, Z, ETH	11	10,2
	S, I, R, E, OfI	4	3,7
	S, I, R, E, PAS	1	0,9
	S, I, R, E, ETH	1	0,9
	I, R, E, Z, ETH	1	0,9

Broj ATL na koje je izolat rezistentan	Fenotipski profil osetljivosti	Broj izolata	% izolata
	I, R, Z, AM, CM	1	0,9
	S, I, R, OfI, CM	1	0,9
6	S, I, R, E, Z, ETH	1	0,9
	S, I, R, E, AM, CM	2	1,9
	S, I, R, E, Z, OfI	2	1,9
	S, I, R, E, ETH, OfI	1	0,9
	S, I, R, E, Z, PAS	1	0,9
	I, R, E, OfI, AM, CM	1	0,9
	S, I, R, E, ETH, AM, CM	1	0,9
7	S, I, R, E, OfI, AM, CM	2	1,9
	S, I, R, E, Z, AM, CM	1	0,9
	S, I, R, E, Z, ETH, OfI	1	0,9
	S, I, R, E, Z, ETH, PAS	1	0,9
	S, I, R, E, Z, OfI, AM, CM	7	6,5
8	S, I, R, E, Z, ETH, AM, CM	2	1,9
9	S, I, R, E, Z, ETH, OfI, AM, CM	1	0,9

S=streptomycin; I=izoniazid; R=rifampicin; E=etambutol; Z=pirazinamid; ETH=etionamid; OfI=ofloksacin; PAS=para-amino salicilna kiselina; AM=amikacin; CM=kapreomicin.

Sledeći korak u našem istraživanju bio je ispitivanje moguće veze između filogenetskih linija MTB i profila rezistencije. Ispitivana je povezanost svih šest identifikovanih genotipova MDR sojeva MTB i rezistencije na pojedinačne ATL prve i druge linije (Tabela 21).

Tabela 21. Povezanost genotipova MDR sojeva *M. tuberculosis* sa fenotipskom rezistencijom na antituberkulotike (ATL) prve i druge linije.

ATL	Fenotipski profil osetljivosti	Beijing	Clade 1	Haarlem	TUR	Ural	S	P vrednost
S	osetljiv	0 (0%)	11 (50%)	8 (42,1%)	1 (2,6%)	0 (0%)	6 (75%)	0,000
	rezistentan	18 (100%)	11 (50%)	11 (57,9%)	38 (97,4%)	2 (100%)	2 (25%)	
E	osetljiv	11 (61,1%)	11 (50%)	11 (57,9%)	1 (2,6%)	2 (100%)	1 (12,5%)	0,000
	rezistentan	7 (38,9%)	11 (50%)	8 (42,1%)	38 (97,4%)	0 (0%)	7 (87,5%)	
Z	osetljiv	3 (16,7%)	13 (59,1%)	14 (73,7%)	14 (35,9%)	2 (100%)	3 (37,5%)	0,001
	rezistentan	15 (83,3%)	9 (40,9%)	5 (26,3%)	25 (64,1%)	0 (0%)	5 (62,5%)	
ETH	osetljiv	3 (17,6%)	13 (76,5%)	12 (85,7%)	29 (93,5%)	2 (100%)	6 (100%)	0,000
	rezistentan	14 (82,4%)	4 (23,5%)	2 (14,3%)	2 (6,5%)	0 (0%)	0 (0%)	
OfI	osetljiv	17 (94,4%)	20 (90,9%)	19 (100%)	22 (56,4%)	2 (100%)	8 (100%)	0,000
	rezistentan	1 (5,6%)	2 (9,1%)	0 (0%)	17 (43,6%)	0 (0%)	0 (0%)	
PAS	osetljiv	18 (100%)	20 (90,9%)	18 (94,7%)	39 (100%)	2 (100%)	8 (100%)	0,275

ATL	Fenotipski profil osetljivosti	Beijing	Clade 1	Haarlem	TUR	Ural	S	P vrednost
AM	rezistentan	0 (0%)	2 (9,1%)	1 (5,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0,073
	osetljiv	15 (83,3%)	21 (95,5%)	18 (94,7%)	27 (69,2%)	2 (100%)	7 (87,5%)	
CM	rezistentan	3 (17,6%)	1 (4,5%)	1 (5,3%)	12 (30,8%)	0 (0%)	1 (12,5%)	0,041
	osetljiv	15 (83,3%)	21 (95,5%)	18 (94,7%)	26 (66,7%)	2 (100%)	7 (87,5%)	
	rezistentan	3 (17,6%)	1 (4,5%)	1 (5,3%)	13 (33,3%)	0 (0%)	1 (12,5%)	

S=streptomycin; E=etambutol; Z=pirazinamid; ETH=etionamid; OfI=ofloksacin; PAS=para-aminosalicilna kiselina; AM=amikacin; CM=kapreomicin.

Pokazano je da su MDR sojevi MTB koji pripadaju Beijing i TUR genotipovima češće dodatno rezistentni na S od sojeva koji pripadaju nekom od preostala četiri genotipa. TUR sojevi su najčešće dodatno rezistentni na E i OfI, a Beijing sojevi na Z i ETH (Tabela 21). U Tabeli 22 prikazani su rezultati procene udruženosti identifikovanih genotipova sa rezistencijom na grupe od dva do pet i od šest do devet ATL. Nije dokazano da postoji značajna udruženost nijednog od šest identifikovanih genotipova sa rezistencijom na više od pet antibiotika.

Tabela 22. Udruženost genotipova MDR sojeva *M. tuberculosis* sa rezistencijom na 2-5 i 6-9 antituberkulotika (ATL).

Fenotipska rezistencija na	Beijing	Clade 1	Haarlem	TUR	Ural	S	P vrednost
2-5 ATL	14 (77,8%)	19 (86,4%)	18 (94,7%)	24 (61,5%)	2 (100%)	7 (87,5%)	0,050
6-9 ATL	4 (22,2%)	3 (13,6%)	1 (5,3%)	15 (38,5%)	0 (0%)	1 (12,5%)	

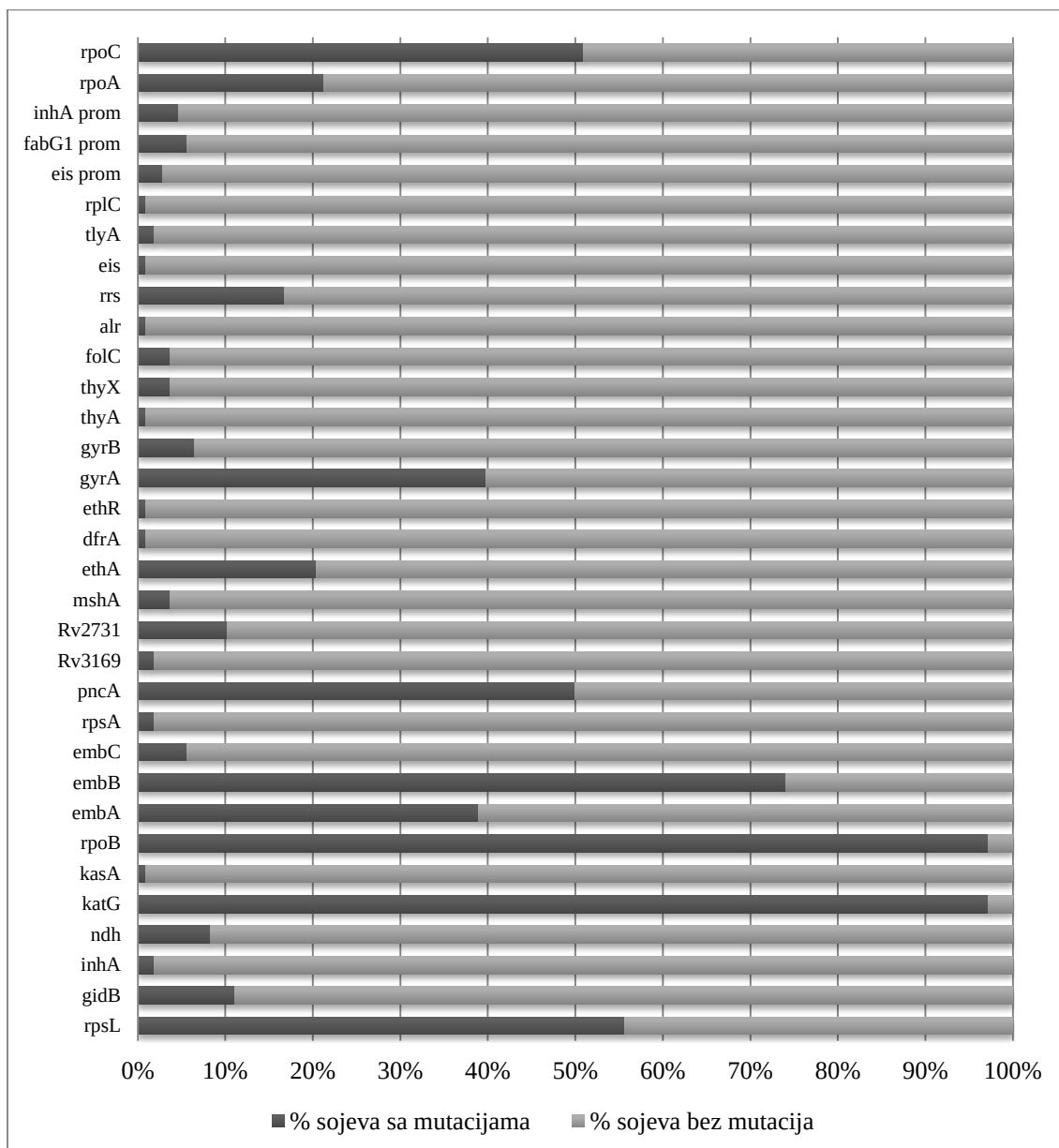
Međutim, rezultat koji se ipak izdvaja jeste 15 od 39 izolata (38,5%) TUR genotipa koji su bili rezistentni na šest do devet antibiotika. Odgovarajuća p vrednost je na granici statističke značajnosti (0,05), što ukazuje da bi u slučaju većeg ispitivanog uzorka sojeva možda bila pokazana značajna udruženost ovog genotipa sa rezistencijom na više od pet antibiotika (Tabela 22).

4.4.2. Mutacije u genomima MDR sojeva MTB povezane sa rezistencijom na ATL

Sekvenciranjem genoma 108 MDR sojeva MTB detektovano je ukupno 129 nesinonimnih i 24 sinonimna SNP u 31 genu povezanom sa rezistencijom na ATL, kao i 17 nesinonimnih SNP u *rpoA* i *rpoC* genima. Mutacije u genima povezanim sa

rezistencijom na ATL, koje su detektovane u genomima 108 MDR sojeva MTB prikazane su u Tabeli 23 (Prilog 1).

Pored očekivanih visokih učestalosti mutacija u *rpoB* i *katG* genima, koje su detektovane u genomima 97,2% (105/108) ispitivanih sojeva, ostale najčešće detektovane mutacije povezane sa rezistencijom u genomima MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji bile su: mutacije u *embB* (80/108; 74,1%), *rpsL* (60/108; 55,6%), *pncA* (54/108; 50%), *gyrA* (43/108; 39,8%) i *embA* (42/108; 38,9%) (Grafikon 7).



Grafikon 7. Učestalost mutacija u genima povezanim sa rezistencijom na antituberkulotike u genomima 108 MDR sojeva *M. tuberculosis*.

Rezultati analize korelacije genotipskih i fenotipskih profila rezistencije ispitivane kolekcije MDR sojeva MTB prikazani su u Tabeli 24 (Prilog 2). Statistička analiza nije urađena za mutacije *eis* gena i *eis* promotera, s obzirom na to da je fenotipski test osetljivosti na KM urađen za samo 10 izolata i da nijedan od fenotipski ispitivanih izolata nema mutacije ovih genskih lokusa. Takođe, nisu analizirane mutacije *rplC* gena, jer fenotipski test osetljivosti na linezolid nije urađen ni za jedan od 108 MDR sojeva MTB. Pokazano je da se molekularnim markerima rezistencije na ATL za MDR sojeve MTB izolovane u Srbiji mogu smatrati sledeći geni: *rpoB* za rezistenciju na R; *katG* za rezistenciju na I; *rpsL* za rezistenciju na S; *embB* za rezistenciju na E; *pncA* za rezistenciju na Z; i *rrs* gen za rezistenciju na AM i CM.

4.4.3. Korelacija ustanovljenih genotipova rezistencije i filogenetskih genotipova MDR sojeva MTB

Kao prvi korak u ispitivanju moguće povezanosti genotipova rezistencije i filogenetskih genotipova MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji, bilo je izvršeno poređenje genotipova rezistencije sojeva koji pripadaju glavnoj istočno-azijskoj liniji (Beijing genotip) i genotipova rezistencije sojeva koji pripadaju glavnoj evro-američkoj liniji (Clade 1, Haarlem, Ural, S i TUR genotipovi). Pokazano je da postoji visoko značajna razlika u udruženosti mutacija *rpsL* i *ethA* gena sa Beijing genotipom u odnosu na evro-američke genotipove ($p < 0,001$), dok su mutacije *embA*, *embB* i *gyrA* gena bile češće udružene sa evro-američkim genotipovima nego sa Beijing genotipom ($p < 0,05$) (Tabela 25). Nije bilo moguće izvršiti ovakvu analizu za mutacije u *kasA*, *ndh*, *ethR*, *dfrA*, *alr* i *rplC* genima, jer nijedan Beijing izolat nije imao mutacije u ovim genima.

Tabela 25. Povezanost genotipova rezistencije sa filogenetskim genotipovima istočno-azijske linije (Beijing) i evro-američke linije (Clade 1, Haarlem, Ural, S, TUR) MDR sojeva *M. tuberculosis*.

Genski lokus	Beijing linija (n=18)			Evro-američka linija (n=90)			p vrednost
	broj	proporcija	95% CI	broj	proporcija	95% CI	
<i>rpoB</i>	18	1	1,00-1,00	87	0,97	0,93-1,00	0,432
<i>katG</i>	18	1	1,00-1,00	87	0,97	0,93-1,00	0,432
<i>inhA</i>	1	0,06	0,05-0,16	1	0,01	0,01-0,03	0,201
<i>inhA</i> promotor	1	0,06	0,05-0,16	4	0,04	0,00-0,09	0,838
<i>rpsL</i>	17	0,94	0,83-1,05	43	0,48	0,38-0,58	0,000

Genski lokus	Beijing linija (n=18)			Evro-američka linija (n=90)			p vrednost
	broj	proporcija	95% CI	broj	proporcija	95% CI	
<i>gidB</i>	0	0	/	12	0,13	0,06-0,20	0,211
<i>embA</i>	1	0,06	0,05-0,17	41	0,46	0,36-0,56	0,001
<i>embB</i>	9	0,5	0,27-0,73	71	0,79	0,71-0,87	0,017
<i>embC</i>	0	0	/	6	0,07	0,02-0,12	0,587
<i>pncA</i>	12	0,67	0,45-0,89	42	0,47	0,37-0,57	0,121
<i>rpsA</i>	1	0,06	0,05-0,17	1	0,01	0,00-0,03	0,307
Rv3169	0	0	/	2	0,02	0,00-0,05	1,000
Rv2731	0	0	/	11	0,12	0,05-0,19	0,205
<i>gyrA</i>	1	0,06	0,05-0,17	42	0,47	0,37-0,57	0,001
<i>gyrB</i>	0	0	/	7	0,08	0,02-0,14	0,357
<i>ethA</i>	11	0,61	0,38-0,84	11	0,12	0,05-0,19	0,000
<i>fabG1</i> promoter	1	0,06	0,05-0,17	5	0,06	0,01-0,11	1,000
<i>mshA</i>	0	0	/	4	0,04	0,00-0,08	0,605
<i>thyA</i>	0	0	/	1	0,01	0,00-0,03	1,000
<i>thyX</i>	0	0	/	4	0,04	0,00-0,08	0,605
<i>folC</i>	0	0	/	4	0,04	0,00-0,08	0,605
<i>rrs</i>	3	0,17	0,00-0,34	15	0,17	0,09-0,25	1,000
<i>eis</i> promoter	0	0	/	3	0,03	0,00-0,07	1,000
<i>eis</i>	0	0	/	1	0,01	0,00-0,03	1,000
<i>thyA</i>	0	0	/	2	0,02	0,00-0,05	1,000

CI = interval poverenja.

Dalja analiza izvršena je u cilju utvrđivanja povezanosti mutacija u genima rezistencije sa pojedinačnim filogenetskim genotipovima MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji (Tabela 26, Prilog 3). Ustanovljeno je da se mutacije *rpsL* gena pojavljuju značajno češće kod sojeva Beijing i TUR genotipova. U poređenju sa ostalim genotipovima, Beijing je češće imao mutacije *pncA* i *ethA* gena, a TUR genotip mutacije *rpoA*, *embA*, *embB*, *gyrA* i *rrs* gena. Haarlem genotip je imao mutacije *rpoC* gena i Rv2731 češće od ostalih genotipova, dok su mutacije *ndh* gena bile češće kod sojeva S linije u poređenju sa ostalim linijama. Pokazano je da su Ural sojevi češće od ostalih filogenetskih genotipova imali mutacije *gidB* gena i Rv3169. Ipak, s obzirom da je ispitivana kolekcija MDR sojeva MTB uključivala samo dva Ural izolata, povezanost ovog genotipa sa mutacijama u *ndh* i Rv3169 genima ostaje diskutabilna.

4.4.4. Filogenetski informativni SNP detektovani u genima povezanim sa rezistencijom na ATL MDR sojeva MTB

U genomima 108 MDR sojeva MTB identifikovano je ukupno 20 filogenetski informativnih SNP u genima povezanim sa rezistencijom na ATL (Tabela 27).

Filogenetski markeri Beijing linije MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji su A1075A *rpoB*, R212R *rpsA*, R463L *katG*, C76C *embA* i E92D *gidB* gena, s obzirom da je svih 18 Beijing izolata imalo ove SNP. Filogenetski marker TUR MDR sojeva MTB u Srbiji je L244L *mshA* gena, jer je u genomima svih 39 TUR izolata detektovan upravo ovaj SNP. Filogenetski markeri Haarlem linije MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji su N111S *mshA*, D103D *rpoB*, V981L *embC* i G594E *rpoC* gena, s obzirom na to da je svih 19 Haarlem izolata u genomu imalo ove SNP.

Tabela 27. Filogenetski informativni SNP identifikovani u genima povezanim sa rezistencijom na antituberkulotike kod 108 MDR sojeva *M. tuberculosis*.

Gen	Rv broj	SNP	Kodon	Udruženost sa genotipom ^{a, b}	Beijing (n=18)	TUR (n=39)	Haarlem (n=19)	Clade1 (n=22)	S (n=8)	Ural (n=2)
<i>gyrA</i>	Rv0006	E21Q ^b	gag/Cag	H37Rv referentni soj	18	39	19		8	2
	Rv0006	S95T ^a	agc/aCc	H37Rv slični	18	39	19	3	8	2
	Rv0006	G668D ^b	ggc/gAc	H37Rv slični	18	39	19	3	8	2
<i>mshA</i>	Rv0486	L244L ^b	ctg/Ttg	TUR		39				
	Rv0486	A187V ^a	gca/gTa	moderni Beijing	16					
	Rv0486	N111S ^a	aac/aGc	Haarlem			19			
<i>rpoB</i>	Rv0667	A1075A ^b	gct/gcC	Beijing i Delhi/CAS	18					
	Rv0667	D103D ^b	gac/gaT	Haarlem			19	1		
<i>rpsA</i>	Rv1630	R212R ^a	cga/cgC	Beijing	18					
<i>tlyA</i>	Rv1694	L11L ^b	cta/ctG	H37Rv referentni soj	18	39	19	22	8	2
<i>katG</i>	Rv1908c	R463L ^b	cgg/cTg	ne evro-američki (Beijing, Delhi/CAS, EAI)	18					
<i>embC</i>	Rv3793	R927R ^b	cgc/cgT	H37Rv referentni soj	18	39	19	22	8	2
	Rv3793	V981L ^b	gtg/Ctg	Haarlem, Ghana, X			19	2		
<i>embA</i>	Rv3794	Q38Q ^a	caa/caG	Beijing (podgrana)	15					
	Rv3794	C76C ^a	tgc/tgT	Beijing (podgrana)	18					
<i>gidB</i>	Rv3919c	A205A ^a	gca/gcG	ne evro-američki (Delhi/CAS, EAI)	18					
	Rv3919c	E92D ^a	gaa/gaC	Beijing	18					
<i>ethA</i>	Rv3854c	S266R ^b	agc/agG	Beijing - Asia ancestralni 3	1					
<i>rpoC</i>	Rv0668	G594E ^b	ggg/gAg	Haarlem			19	2		
	Rv0668	E1092D ^b	gaa/gaC	Beijing	1					

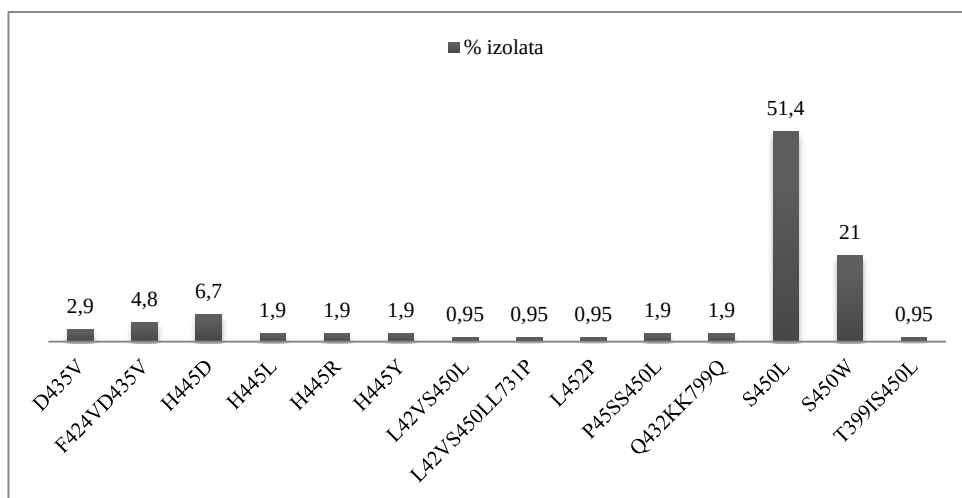
^a Feuerriegel i sar, 2014.

^b referentna kolekcija laboratorije Molecular Mycobacteriology Group, Forschungszentrum Borstel, Nemačka.

4.4.5. Mutacije gena povezanih sa rezistencijom na ATL prve linije kod MDR sojeva MTB

4.4.5.1. Mutacije gena povezanih sa rezistencijom na R

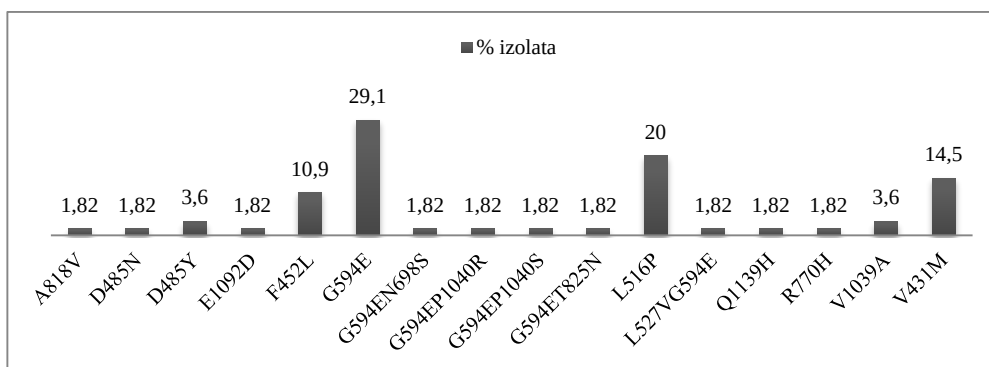
Mutacije *rpoB* gena detektovane su u genomima 105 od 108 (97,2%) MDR sojeva MTB. Identifikovano je ukupno 15 SNP, pri čemu je 56,2% izolata (59/105) imalo S450L mutaciju u okviru RRDR regiona. Ovakav rezultat je očekivan, jer su mutacije u kodonu 450 u okviru RRDR regiona najčešće detektovane mutacije *rpoB* gena kod sojeva MTB rezistentnih na R (Sandgren i sar. 2009; Da Silva i Palomino 2011). Ukupno 91,5% (54/59) sojeva imalo je samo S450L mutaciju, dok je pet sojeva (8,5%), pored ove, imalo najmanje još jednu mutaciju i to van RRDR regiona (L42V, P45S, T399I, L731P, K799Q). Mutacija S450W detektovana je u genomima 21% (22/105) izolata. U okviru 81-bp RRDR regiona detektovani su i SNP na pozicijama 424, 432, 435, 445 i 452, pri čemu je mutacija F424V bila isključivo u kombinaciji sa D435V (Grafikon 8).



Grafikon 8. Mutacije *rpoB* gena detektovane u genomima 105 MDR sojeva *M. tuberculosis*.

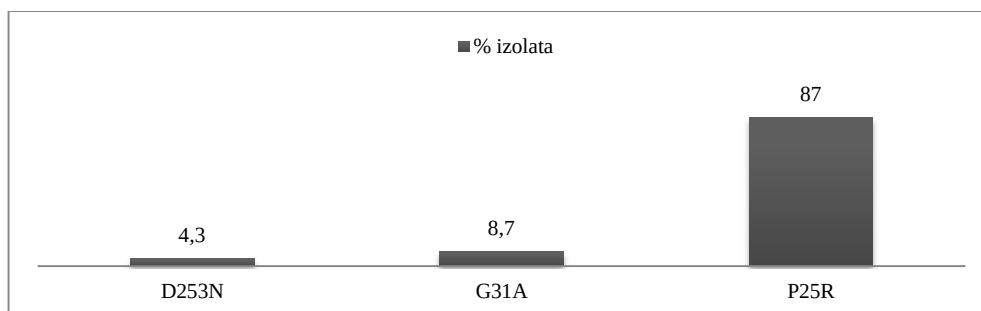
4.4.5.2. Kompenzatorne mutacije u okviru *rpoC* i *rpoA* gena

U okviru *rpoC* gena identifikovano je 17 SNP u genomima 55 MDR izolata MTB. Ukupno 38,2% (21/55) izolata imalo je G594E mutaciju *rpoC* gena, 20% izolata mutaciju L516P, 14% izolata mutaciju V431M, a 10,9% izolata mutaciju F452L (Grafikon 9).



Grafikon 9. Mutacije *rpoC* gena detektovane u genomima 55 MDR sojeva *M. tuberculosis*.

Mutacije *rpoA* gena identifikovane su u genomima 23 MDR izolata MTB. Od ukupno tri detektovana SNP u *rpoA* genu, mutacija P25R je identifikovana u 87% izolata (20/23) (Grafikon 10).



Grafikon 10. Mutacije *rpoA* gena detektovane u genomima 23 MDR izolata *M. tuberculosis*.

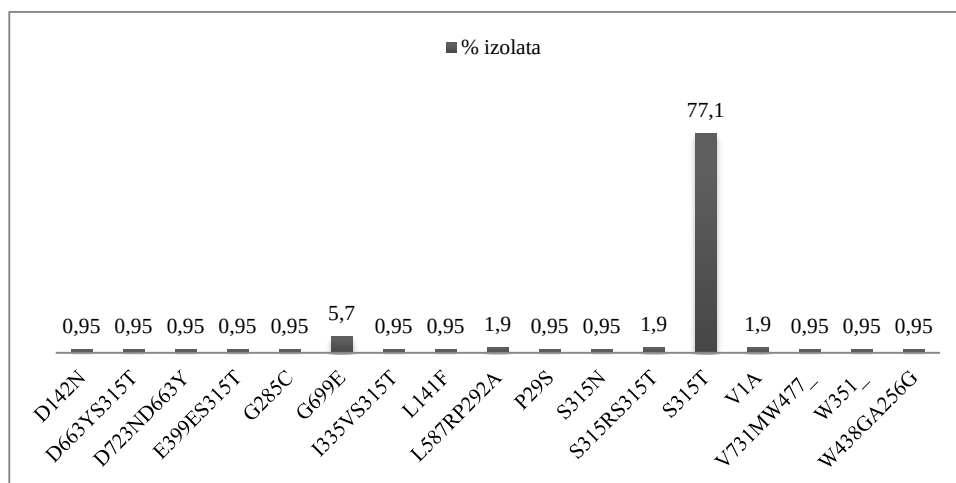
Ukupno 59/72 (81,9%) MDR MTB izolata svrstanih u klastere imalo je mutacije *rpoC* i/ili *rpoA* gena. Kada su u pitanju MDR sojevi MTB koji nisu bili grupisani u klastere, mutacije u ovim genima dokazane su kod 18/36 (50%) izolata. Visoko značajna razlika u učestalosti kompenzatornih mutacija MDR MTB sojeva u klasterima u poređenju sa učestalošću ovih mutacija u genomima sojeva koji su imali jedinstvene SNP profile ($p=0,001$) u našoj kolekciji, potvrđuje već dokazanu ulogu *rpoC* i *rpoA* mutacija u kompenzovanju negativnog uticaja pojedinih *rpoB* mutacija na sposobnost transmisije sojeva MTB rezistentnih na R (Comas i sar. 2012).

4.4.5.3. Mutacije gena povezanih sa rezistencijom na I

Fenotipska rezistencija na I potvrđena je detekcijom SNP u genomima 97,2% MDR izolata (105/108). Svih 105 izolata imalo je mutacije *katG* gena, a od ukupno 21 identifikovanog SNP u *katG* genu, najčešća je bila mutacija S315T (81,9%; 86/105).

Ova mutacija se i smatra najčešćom mutacijom *katG* gena koja dovodi do rezistencije na I (Zhang i Yew 2009; Seifert i sar. 2015). Od ukupno 86 izolata sa S315T mutacijom, čak 94,2% (81/86) imalo je samo S315T, dok je kod tri izolata (3,5%) pored ove mutacije, u *katG* genu detektovana po još jedna mutacija (D663Y, E399E, I335V). U genomima dva izolata (2,3 %) dokazane su mutacije S315R i S315T (Grafikon 11). Ukupno 15/105 (14,3%) izolata, pored *katG* mutacija, imalo je mutacije *inhA* gena, *inhA* promotera, *ndh* i/ili *kasA* gena. Mutacije *inhA* gena identifikovane su kod samo dva soja (I16V, I21V), pri čemu je izolat sa I21V imao mutaciju -15 c/t *inhA* promotera i G285C *katG* gena. Jedan izolat imao je mutacije -15c/t *inhA* promotera i S315T *katG*, a dva -8 t/g mutacije *inhA* promotera i S315T *katG*. Takođe, jedan izolat, uz -15 c/t *inhA* promotera, imao je V275G mutaciju *ndh* gena i P29S *katG* gena. Kod ukupno osam izolata dokazana je V18A mutacija *ndh* gena, od kojih je pet imalo i G699E *katG*, dva L598R i P292A *katG*, a jedan S315T mutaciju *katG* gena. U *kasA* genu detektovana je samo mutacija A208T, i to kod jednog soja, koji ima i mutaciju S315T *katG* gena. Mutacije *inhA* i *inhA* promotera dovode do niskog stepena rezistencije na I, dok su *ndh* i *kasA* mutacije identifikovane retko kod sojeva MTB rezistentnih na I (Da Silva i Palomino 2011; Seifert i sar. 2015). Doprinos mutacija ovih gena u nastanku rezistencije na I u našoj kolekciji MDR sojeva MTB bio je gotovo zanemarljiv, s obzirom na to da su svi sojevi koji su imali mutacije u nekom od ova četiri gena takođe imali i mutacije *katG* gena, koje se smatraju ključnim za visok stepen rezistencije na I (Seifert i sar. 2015).

Ukupno šest sojeva fenotipski rezistentnih na I imali su mutacije *fabG1* promotera. U genomima tri izolata detektovana je substitucija timina citozinom na poziciji -15 (-15 c/t), dok su dva izolata imala - 8 t/g, a jedan -58 t/c *fabG1* promotera. Mutacije *fabG1* promotera dovode se u vezu sa rezistencijom na I (Afanas'ev i sar. 2007). Međutim, svi sojevi MTB iz naše kolekcije, u čijim genomima su detektovane ove mutacije, takođe su imali i mutacije *katG* gena, tako da značaj *fabG1* mutacija u nastanku rezistencije na I kod lokalnih sojeva MTB ostaje nejasan.



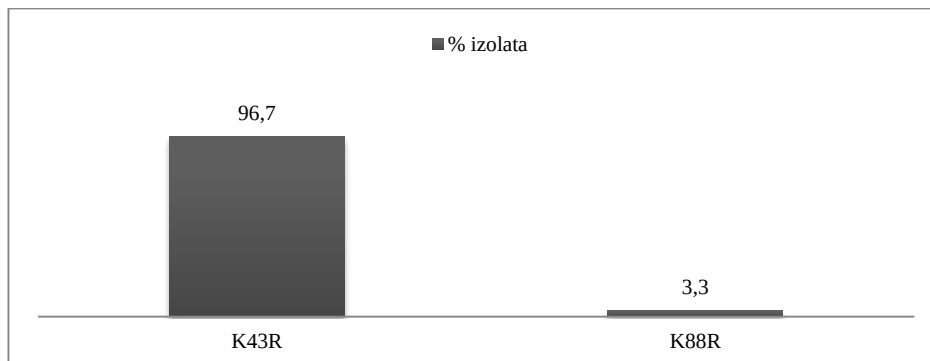
Grafikon 11. Mutacije *katG* gena detektovane u genomima 105 MDR izolata *M. tuberculosis*.

4.4.5.4. Mutacije gena povezanih sa rezistencijom na S

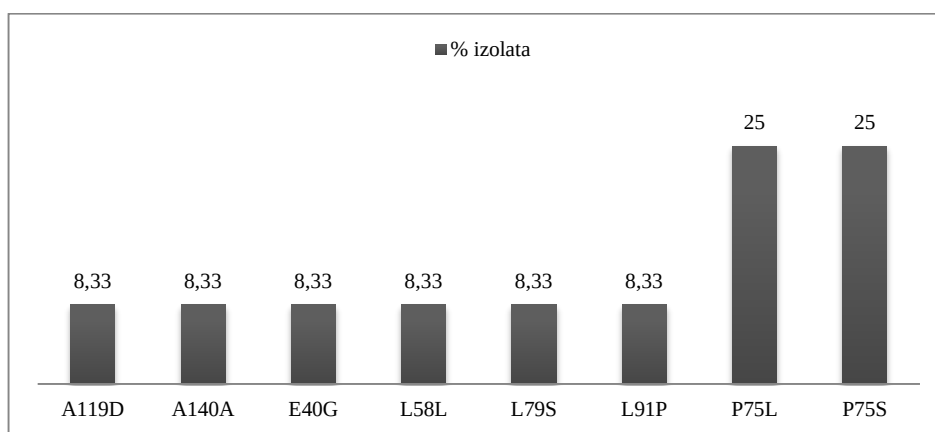
Mutacije *rpsL* i *gidB* gena identifikovane su u genomima 72/108 (66,7%) MDR izolata MTB. Najveći broj izolata imao je mutacije *rpsL* gena (60/72; 83,3%), pri čemu je kod 58 izolata (58/60; 96,7%) pokazan polimorfizam K43R, a kod dva izolata (3,3%) polimorfizam K88R (Grafikon 12), koji se smatraju visoko pouzdanim markerima rezistencije na S (Sandgren i sar. 2009). Ukupno 12 izolata (16,7%) MDR sojeva MTB iz naše kolekcije imali su mutacije *gidB* gena, od kojih su najučestalije bile P75L (3/12; 25%) i P75S (3/12; 25%) (Grafikon 13). Mutacije *gidB* gena su ređe uzrok rezistencije na S od *rpsL* mutacija i dovode do niskog odnosno srednjeg stepena rezistencije na S (Wong i sar. 2011; Perdigão i sar. 2013). Ipak, prisustvo ovih mutacija može se smatrati značajnim, jer je pokazano je da postoji velika verovatnoća da sojevi MTB sa *gidB* mutacijama steknu dodatne mutacije koje dovode do visokog stepena rezistencije na S (Okamoto i sar. 2007).

Fenotipska rezistencija potvrđena je genotipski kod 68/82 (82,9%) izolata rezistentnih na S. Međutim, četiri izolata koji su fenotipski bili osetljivi na ovaj antibiotik imaju SNP u okviru *rpsL* ili *gidB* gena (*gidB* L58L, P75S, A140A po jedan izolat; *rpsL* K43R jedan izolat), koji su jasno povezani sa rezistencijom na S. Ukupno 16 izolata fenotipski rezistentnih na S imali su *rrs* mutaciju A1401G, od čega je kod 15 detektovana i *rpsL* mutacija K43R. Kako se A1401G *rrs* i K43R *rpsL* smatraju jednako značajnim u nastanku rezistencije na S (Perdigão i sar. 2013), nijednu od ovih mutacija ne možemo izdvojiti kao dominantni uzrok rezistencije na S kod 15 lokalnih sojeva MTB. Iako se

ove mutacije povezuju sa visokim stepenom rezistencije na S, interesantno je da dva izolata iz naše kolekcije koji su fenotipski bili osetljivi na S, imaju A1401G mutaciju *rrs* gena, pri čemu je jedan izolat imao samo *rrs* A1401G, a drugi i *rpsL* K43R.



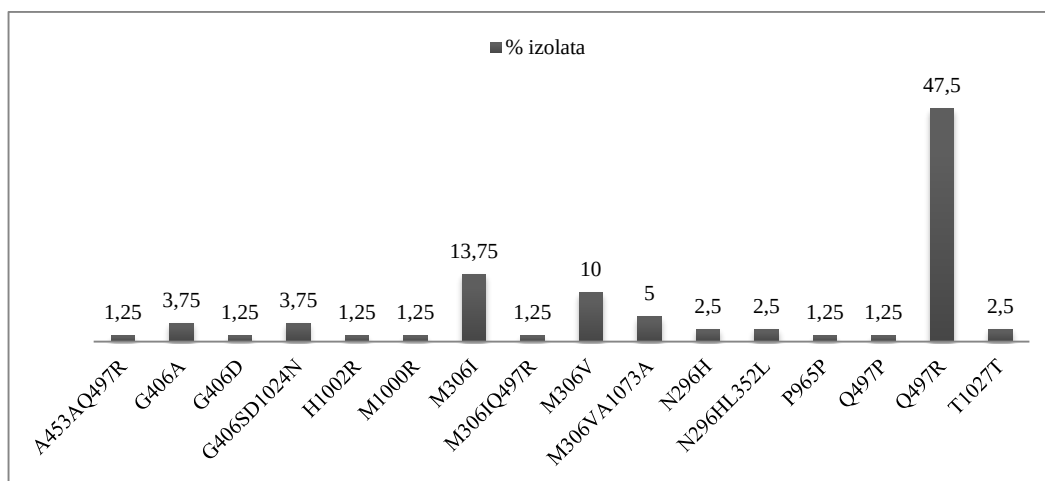
Grafikon 12. Mutacije *rpsL* gena detektovane u genomima 60 MDR izolata *M. tuberculosis*.



Grafikon 13. Mutacije *gidB* gena detektovane u genomima 12 MDR izolata *M. tuberculosis*.

4.4.5.5. Mutacije gena povezanih sa rezistencijom na E

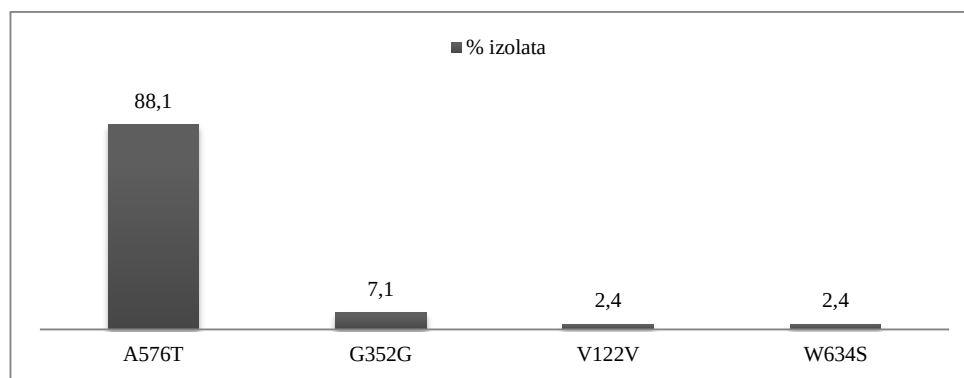
Mutacije *embB* gena detektovane su u genomima 80/108 (74,1%) MDR izolata MTB. Od ukupno 17 identifikovanih SNP, najčešća mutacija bila je Q497R (40/80; 50%), pri čemu je 38/40 (95%) izolata imalo samo ovu mutaciju *embB* gena, dok je kod dva izolata (5%) pored ove otkrivena i A453A, odnosno M306I. Ukupno 12/80 izolata (15%) imalo je mutaciju M306I, a 12 (15%) mutaciju M306V *embB* gena (Grafikon 14). Navedene mutacije Q497R, M306I i M306V *embB* spadaju u najčešće mutacije *embB* gena i smatraju se visoko pouzdanim markerima rezistencije na E (Sandgren i sar. 2009).



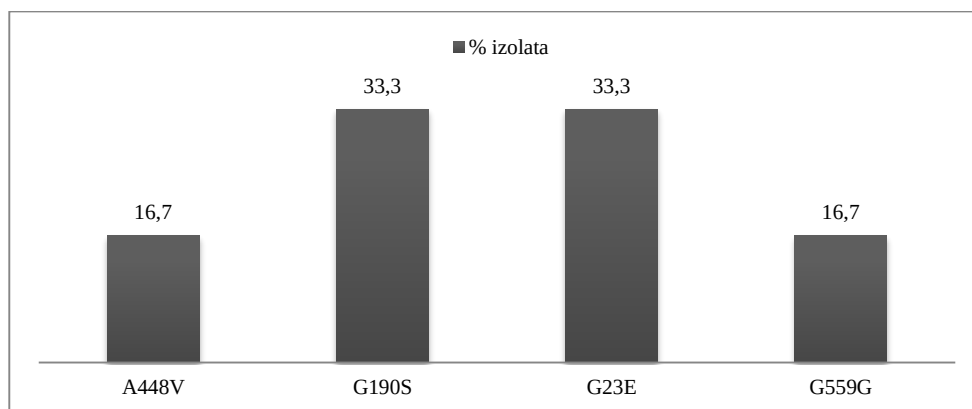
Grafikon 14. Mutacije *embB* gena detektovane u genomima 80 MDR izolata *M. tuberculosis*.

U okviru *embA* gena detektovana su četiri SNP u genomima 42/108 (38,9%) izolata. Najčešća mutacija, A576T, identifikovana je kod 37/42 izolata (88,1%) (Grafikon 15). Osim jednog izolata koji je imao *embA* W634S kao jedinu mutaciju *embBAC*, svi ostali sojevi sa *embA* mutacijama imali su i neku od *embB* mutacija. Mutacija V122V *embA* detektovana je u genomu jednog soja sa A453A i Q497R *embB* mutacijama; mutacije G352G *embA*, G406S i D1024N *embB* u genomima tri soja; A576T *embA* i M306I i Q497R *embB* kod jednog soja; a A576T *embA* i Q497R *embB* u genomima čak 36 sojeva. Imajući u vidu ovakve učestalosti kao i relativno mali značaj *embA* mutacija u nastanku rezistencije na E u poređenju sa *embB* mutacijama (Sandgren i sar. 2009), može se smatrati da *embA* mutacije ne doprinose značajno razvoju rezistencije na E u kolekciji lokalnih sojeva MTB. Mutacije *embC* gena identifikovane su u genomima 6/108 (5,6%) izolata, a od ukupno četiri identifikovana SNP, G190S i G23E bili su prisutni u po dva izolata (Grafikon 16). Za razliku od sojeva sa *embA* mutacijama, izolati sa *embC* mutacijama nisu imali nijednu mutaciju u *embA* i *embB* genima.

Fenotipska rezistencija na E genotipski je potvrđena za 69/71 izolata (97,1%). Međutim, u genomima čak 16 izolata koji su bili fenotipski osetljivi na E, dokazano je prisustvo SNP u nekom od navedenih gena: *embA* W634S; *embB* T1027T, M306I, M306V, M306I, G406A, N296H, H1002R, P965P; *embC* G190S, G559G, A448V.



Grafikon 15. Mutacije *embA* gena detektovane u genomima 42 MDR izolata *M. tuberculosis*.



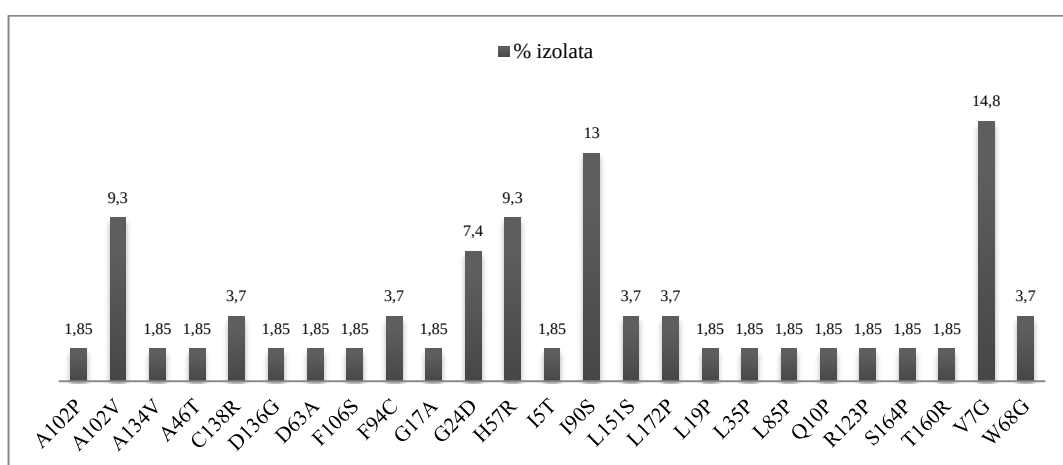
Grafikon 16. Mutacije *embC* gena detektovane u genomima 6 MDR izolata *M. tuberculosis*.

4.4.5.6. Mutacije gena povezanih sa rezistencijom na Z

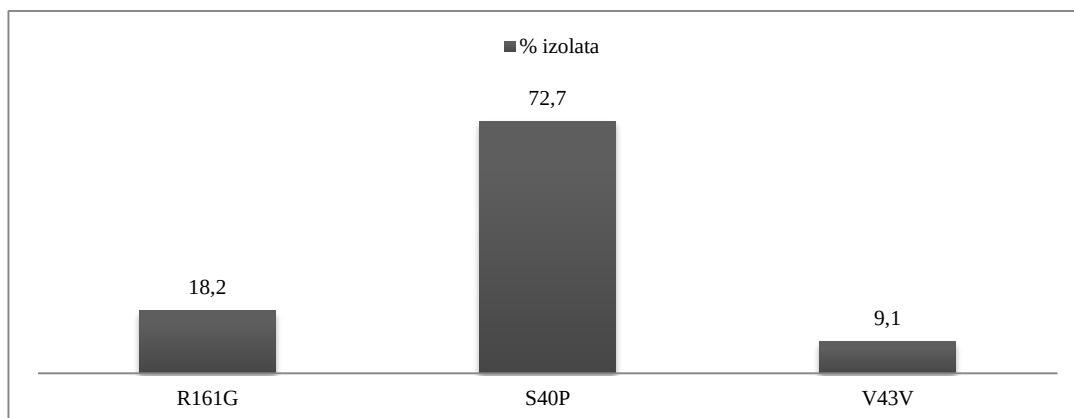
U okviru *pncA* gena identifikovano je 25 SNP kod 54/108 (50%) ispitivanih MDR izolata MTB (Grafikon 17). Osam od 54 izolata (14,8%) imali su V7G mutaciju, koja predstavlja visoko pouzdani marker rezistencije na Z (Sandgren i sar. 2009). Mutacije *pncA* gena su najčešći uzrok rezistencije MTB na Z na globalnom nivou. Prisustvo velikog broja različitih *pncA* mutacija u kolekciji lokalnih MDR izolata MTB potvrđuje rezultate dosadašnjih istraživanja na osnovu kojih se *pncA* gen smatra jednim od gena sa najvećim stepenom diverziteta u genomu MTB (Napiorkowska i sar. 2014). U Rv2731 regionu detektovana su tri SNP kod 11 izolata, od kojih je osam (72,7%) imalo mutaciju S40P (Grafikon 18). Jedan izolat je pored S40P, imao i mutaciju A134V *pncA*, a jedan F106S mutaciju *pncA* gena. Dva izolata imala su R161G u okviru Rv2731, ali i F94C mutaciju *pncA* gena, dok je izolat sa sinonimnim SNP V43V u Rv2731 imao i R123P mutaciju *pncA* gena. U okviru *rpsA* gena identifikovana su dva SNP (A412V, S449S) u genomima dva izolata, koji nisu imali mutacije u drugim genima povezanim sa rezistencijom na Z. Kod dva izolata detektovana je S174G mutacija u okviru Rv3169,

takođe bez drugih mutacija povezanih sa rezistencijom na Z. Kako značaj Rv2731, Rv3169 i *rpsA* mutacija u nastanku rezistencije na Z kliničkih izolata MTB još uvek nije u potpunosti ustanovljen (Shi i sar. 2011), uloga ovih mutacija u našoj kolekciji sojeva za sada nije potpuno jasna.

Fenotipska rezistencija na Z potvrđena je genotipski za 47/59 MDR sojeva (79,7%). Ukupno 17 izolata koji su bili fenotipski osetljivi na Z imali su neku od navedenih mutacija u genima povezanim sa rezistencijom na ovaj antibiotik: *pncA* I90S, L151S, I5T, G24D, A46T, A102V; *rpsA* S449S; Rv3169 S174G; i Rv2731 S40P kod čak pet izolata.



Grafikon 17. Mutacije *pncA* gena detektovane u genomima 54 MDR izolata *M. tuberculosis*.



Grafikon 18. Mutacije Rv2731 regiona detektovane kod 11 MDR izolata *M. tuberculosis*.

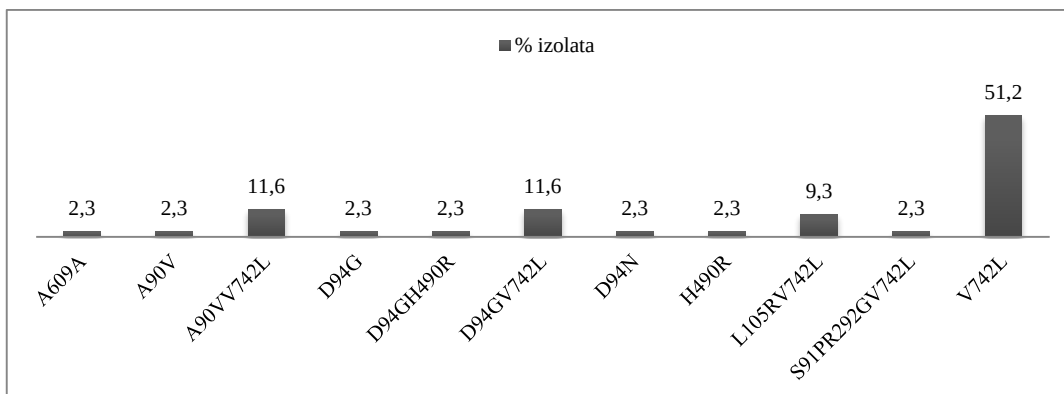
4.4.6. Mutacije gena povezanih sa rezistencijom na ATL druge linije

4.4.6.1. Mutacije gena povezanih sa rezistencijom na FLQ

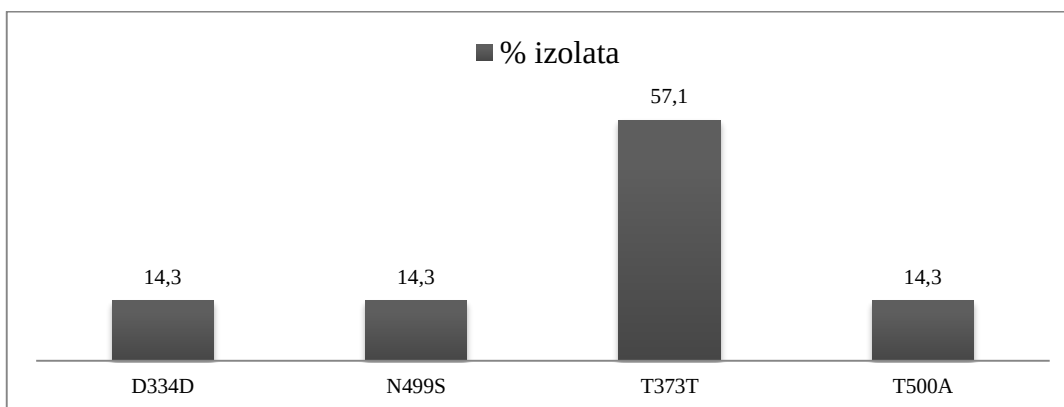
U okviru *gyrA* gena identifikovano je ukupno 11 SNP u genomima 43/108 (39,8%) MDR izolata MTB. Najčešće detektovana *gyrA* mutacija bila je V742L (37/43; 86%), pri čemu je 22/37 (59,5%) izolata imalo samo ovu mutaciju *gyrA* gena. Pet od 37 (13,5%) izolata imali su i A90V, 5/37 (13,5%) i D94G, 4/37 (10,8%) i L105R, a u genomu jednog izolata (2,7%) pokazane su i mutacije S91P i R292G *gyrA* gena. Mutacija D94G detektovana je kod ukupno sedam izolata, od kojih je jedan imao i mutaciju H490R, a jedan samo D94G. Mutacija A90V dokazana je kod ukupno šest izolata, pri čemu je jedan izolat imao samo ovu mutaciju (Grafikon 19). Prema rezultatima dosadašnjih istraživanja, visoko pouzdani markeri rezistencije na FLQ i najčešće mutacije *gyrA* gena su A90V, D94G, S91P (Sandgren i sar. 2009; Nosova i sar. 2013). Međutim, kod najvećeg broja MDR izolata MTB ispitivanih u okviru ovog istraživanja dokazana je V742L *gyrA* mutacija, koja do sada nije detektovana u genomima sojeva MTB rezistentnih na FLQ (Sandgren i sar. 2009).

U *gyrB* genu identifikovana su ukupno četiri SNP kod sedam (6,5%) MDR izolata MTB, od kojih su četiri imala sinonimni SNP T373T. Samo jedan izolat imao je istovremeno mutacije u *gyrA* i *gyrB* genima i to V742L i T500A (Grafikon 20). Mutacije *gyrB* gena se ređe detektuju od mutacija *gyrA*, a T500A se opisuje kao jedna od najčešćih *gyrB* mutacija koja dovodi do rezistencije na FLQ (Nosova i sar. 2013). S obzirom da su identifikovane sa značajno manjom učestalošću od *gyrA* mutacija i da su u pitanju uglavnom sinonimni SNP, može se smatrati da mutacije *gyrB* gena ne doprinose značajno rezistenciji MDR sojeva MTB na FLQ u Srbiji.

Svih 20 MDR izolata MTB sa fenotipskom rezistencijom na FLQ imali su neku od mutacija *gyrA* odnosno *gyrB* gena. Međutim, mutacije su detektovane i u genomima 29 MDR sojeva fenotipski osetljivih na FLQ, od kojih je čak 21 (72,4%) imao V742L mutaciju *gyrA* gena. Pored sinonimnih SNP A609A *gyrA*, T373T *gyrB* i D334D *gyrB*, u genomima MDR izolata osetljivih na FLQ identifikovane su i mutacije H490R *gyrA* i N499S *gyrB* gena.



Grafikon 19. Mutacije *gyrA* gena detektovane u genomima 43 MDR izolata *M. tuberculosis*.



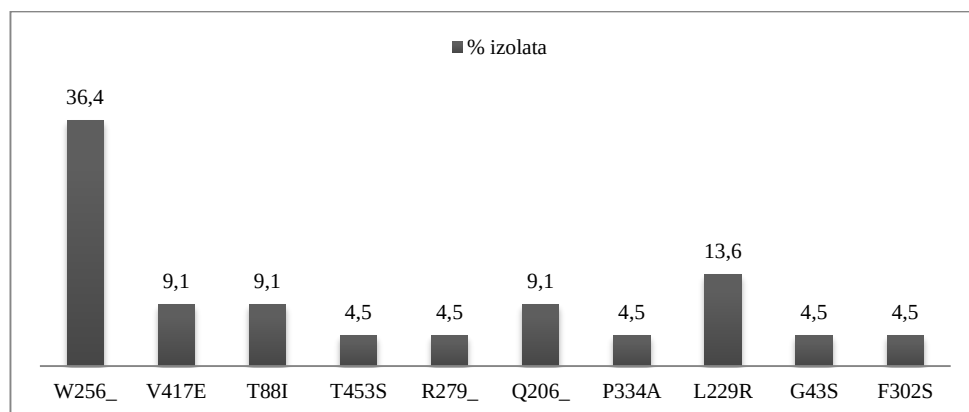
Grafikon 20. Mutacije *gyrB* gena detektovane u izolatima 7 MDR izolata *M. tuberculosis*.

4.4.6.2. Mutacije gena povezanih sa rezistencijom na ETH

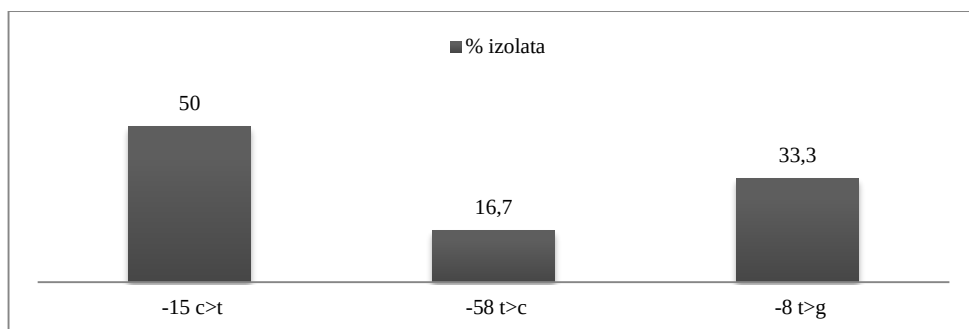
U okviru *ethA* gena identifikovano je ukupno 10 SNP u genomima 22/108 (20,4%) MDR izolata MTB. Mutacija sa najvišom učestalošću bila je W256_ (36,4%; 8/22) (Grafikon 21). Mutacije *ethA* gena smatraju se najčešćim uzrokom rezistencije na ETH (Sandgren i sar. 2009; Brossier i sar. 2011), što potvrđuju i rezultati našeg istraživanja. Ipak, osim G43S, sve ostale *ethA* mutacije identifikovane u genomima MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji do sada su retko detektovane ili uopšte nisu detektovane. Ovakav rezultat nije iznenađujući jer *ethA* gen karakteriše visok stepen diverziteta i do sada je opisan veliki broj različitih SNP u ovom genu (Brossier i sar. 2011).

Ukupno šest izolata imalo je mutacije *fabG1* promotera, od čega tri mutaciju -15 c>t (Grafikon 22). Mutacija -8 t>g *fabG1* promotera identifikovana je kod dva izolata, koji su imali i V417E *ethA*, dok je jedan izolat imao -58 t>c *fabG1* mutaciju promotera. Mutacije *mshA* gena identifikovane su kod samo četiri izolata (A362D, F117F, G67R, W430_), pri čemu je izolat sa sinonimnim SNP F117F imao i mutaciju T453S *ethA*

gena. Jedan izolat imao je *ethR* mutaciju F110L, a jedan G37G *dfrA* i G43S mutaciju *ethA* gena.



Grafikon 21. Mutacije *ethA* gena detektovane u genomima 22 MDR izolata *M. tuberculosis*.



Grafikon 22. Mutacije *fabG1* promotera detektovane u genomima 6 MDR izolata *M. tuberculosis*.

Fenotipska rezistencija na ETH potvrđena je genotipski za 17/22 (77,3%) izolata. Ipak, u genomima sedam izolata koji su fenotipski bili osetljivi na ETH detektovana je neka od mutacija *ethA*, *ethR* i/ili *mshA* gena (*ethA* Q206_, R279_, L229R, T453S; *ethR* F110L, *mshA* F117F). Od ukupno 21 izolata za koje nije urađen fenotipski test osetljivosti na ETH, kod šest je dokazana neka od mutacija u okviru *ethA* gena i/ili *fabG1* promotera (*ethA* T88I, V417E, L229R, F302S; *fabG1* promoter -8 t>g, -15 c>t, -58 t>c). Dva MDR soja MTB za koje je ustanovljena fenotipska rezistencija na ETH, imali su -15 c/t, a jedan -8 t/g mutaciju *inhA* promotera. U pitanju su mutacije koje dovode do ukrštene rezistencije na I i ETH.

Interesantno je da je kod jednog MDR soja MTB iz naše kolekcije, koji je bio osetljiv na ETH, otkrivena F110L mutacija *ethR* gena. To je prva opisana *ethR* mutacija povezana sa rezistencijom na ETH. Takođe, u našoj studiji identifikovane su i mutacije

inhA/fabG1 promotera, čija učestalost kod sojeva rezistentnih na ETH na globalnom nivou iznosi 25-100%, dok su mutacije *mshA* i *dfrA* gena koje se retko detektuju u genomima sojeva rezistentnih na ETH (Brossier i sar. 2011) bile retko prisutne i u genomima MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji.

4.4.6.3. Mutacije gena povezanih sa rezistencijom na PAS

U kolekciji lokalnih MDR izolata MTB samo tri su bila fenotipski rezistentna na PAS, a rezultati NGS pokazali su da ukupno devet (8,3%) izolata ima SNP u okviru nekog od tri gena koji se povezuju sa rezistencijom na ovaj ATL. Četiri izolata imala su mutacije *folC* gena, sinonimni SNP identifikovani su u okviru *thyX* gena kod četiri izolata, a kod jednog izolata detektovan je sinonimni SNP G136G *thyA* gena. Iako su molekularni mehanizmi rezistencije na PAS još uvek nedovoljno razjašnjeni, pokazano je da značajnu ulogu imaju mutacije *thyA* i *folC* gena (Fivian-Hughes i sar. 2012; Zheng i sar. 2013), dok se mutacije *thyX* gena, odnosno *thyX* promotera, smatraju kompenzacijom gubitka aktivnosti *thyA* i tako posredno dovode u vezu sa rezistencijom na ovaj ATL (Merker i sar. 2013). U našoj kolekciji sojeva u okviru *thyA* i *thyX* gena identifikovani su isključivo sinonimni SNP, pri čemu su svi izolati osim jednog sa T234T *thyX*, fenotipski bili osetljivi na PAS. Prema tome, može se smatrati da *thyA* i *thyX* mutacije nemaju značaja u nastanku rezistencije na PAS u kolekciji MDR izolata MTB izolovanih u Srbiji. Sa druge strane, mutacije *folC* gena (S150G *folC*), koje su detektovane u genomima dva izolata sa fenotipskom rezistencijom na PAS, predstavljaju dominantni mehanizam rezistencije na PAS u našoj kolekciji ispitivanih MDR sojeva.

4.4.6.4. Mutacije gena povezanih sa rezistencijom na AM, KM i CM

U okviru *rrs* gena identifikovana je mutacija A1401G u genomima 18 (16,7%) MDR izolata MTB. Mutaciju *eis* gena (R181_) imao je jedan izolat, dok su tri izolata imala mutaciju -14 g>a *eis* promotera. Jedan izolat sa -14 g>a imao je i mutaciju P179S *tlyA* gena, dok je jedan izolat imao samo sinonimni SNP F157F *tlyA* gena.

Od 108 sekvenciranih MDR izolata MTB, na CM je fenotipski bilo rezistentno 19, a na AM 18 izolata. Mutacija A1401G *rrs* gena identifikovana je kod 17 izolata korezistentnih na CM i AM, dok jedan izolat koji je bio rezistentan na oba leka i jedan

izolat rezistentan samo na CM nisu imali nijednu mutaciju. Tri izolata za koje nije urađen test osetljivosti na KM imali su mutaciju -14 g>a u *eis* promoteru, a jedan R181_ mutaciju *eis* gena. U genomima 10 MDR izolata osetljivih na KM nije detektovana nijedna mutacija u genima koji se dovode u vezu sa rezistencijom na ovaj antibiotik. Sumirano, ovakvi rezultati ukazuju da je dominantni uzrok rezistencije na AM i CM u kolekciji MDR izolata MTB izolovanih u Srbiji mutacija A1401G *rrs* gena, koja je i na globalnom nivou najčešća mutacija odgovorna za rezistenciju bacila TB na AM i CM (Johansen i sar. 2006; Georghiou i sar. 2012).

4.4.6.5. Mutacije gena povezanih sa rezistencijom na CS i linezolid

Svi ispitivani MDR sojevi MTB bili su fenotipski osetljivi na CS. Ovaj rezultat potvrđen je i genotipski, s obzirom na to da je u genomu samo jednog izolata identifikovan sinonimni SNP I386I *alrA* gena. Fenotipski test osetljivosti na linezolid za ispitivanu kolekciju MDR sojeva MTB nije urađen, ali je sekvenciranjem genoma ovih sojeva samo u genomu jednog izolata dokazano prisustvo sinonimnog SNP T27T *rplC* gena. Prema tome, rezultati sekvenciranja pokazali su da u ispitivanoj kolekciji MDR sojeva MTB u Srbiji nema sojeva rezistentnih na linezolid.

4.4.7. Udruženost filogenetskih genotipova sa pojedinačnim mutacijama u genima rezistencije MDR sojeva MTB

Rezultati analize povezanosti identifikovanih filogenetskih genotipova MDR sojeva MTB sa pojedinačnim mutacijama u genima rezistencije prikazani su u Tabeli 28 (Prilog 4). Visoko značajna povezanost utvrđena je između filogenetskih genotipova Beijing i TUR i K43R mutacije *rpsL* gena. Takođe, TUR genotip je češće od svih ostalih genotipova imao mutacije S315T *katG*, S450W *rpoB*, F452L i V431M *rpoC*, P25R *rpoA*, A576T *embA*, Q497R *embB* i V742L *gyrA* gena. Mutacije S450L *rpoB*, L516P *rpoC*, V7G *pncA* i W256_ *ethA* gena bile su dominantno prisutne u genomima Beijing sojeva, dok je Haarlem genotip udružen sa mutacijama G594E *rpoC* i S40P Rv2731 gena.

4.4.8. Genotipski i fenotipski profili rezistencije na ATL MDR sojeva MTB svrstanih u klastere

Izvršena je statistička analiza moguće korelacije fenotipske rezistencije na ATL i pripadnosti MDR sojeva klasteru. Pokazano je da su MDR sojevi MTB grupisani u klasterima značajno češće rezistentni na S i E u poređenju sa MDR sojevima van klastera (Tabela 29).

Tabela 29. Korelacija fenotipske rezistencije na antituberkulotike (ATL) MDR sojeva *M. tuberculosis* i pripadnosti klasteru.

ATL	Fenotipski profil osetljivosti	NGS klaster		p vrednost
		ne (n=36)	da (n=72)	
S	osetljiv	13 (36,1%)	13 (18,1%)	0,039
	rezistentan	23 (63,9%)	59 (81,9%)	
E	osetljiv	18 (50%)	19 (26,4%)	0,015
	rezistentan	18 (50%)	53 (73,6%)	
Z	osetljiv	21 (58,3%)	28 (38,9%)	0,056
	rezistentan	15 (41,7%)	44 (61,1%)	
ETH *	osetljiv	21 (75%)	44 (74,6%)	0,966
	rezistentan	7 (25%)	15 (25,4%)	
OFL	osetljiv	33 (91,7%)	55 (76,4%)	0,054
	rezistentan	3 (8,3%)	17 (23,6%)	
PAS	osetljiv	34 (94,4%)	71 (98,6%)	0,214
	rezistentan	2 (5,6%)	1 (1,4%)	
AM	osetljiv	31 (86,1%)	59 (81,9%)	0,584
	rezistentan	5 (13,9%)	13 (18,1%)	
CM	osetljiv	30 (83,3%)	59 (81,9%)	0,858
	rezistentan	6 (16,7%)	13 (18,1%)	

* ne (n=28), da (n=59)

S=streptomycin; E=etambutol; Z=pirazinamid; ETH=etionamid; OfI=ofloksacin; PAS=para-aminosalicilna kiselina; AM=amikacin; CM=kapreomicin.

Ustanovljene p vrednosti za udruženost rezistencije na Z (p=0,056) i OFL (p=0,054) sa pripadnošću sojeva klasterima su bliske granici statističke značajnosti. Ovakve vrednosti ukazuju na to da bi, pod uslovom da je analiziran veći uzorak sojeva, moguće i rezistencija na ova dva ATL bila češća kod MDR sojeva u klasterima u poređenju sa sojevima van klastera. Ispitivana je i moguća udruženost fenotipske rezistencije MDR sojeva MTB na dva do pet i šest do devet ATL i pripadnosti klasteru, ali takva korelacija nije dokazana (p=0,623). Pored toga, izvršeno je i ispitivanje moguće

korelacije između pojedinačnih mutacija u genima rezistencije MDR sojeva MTB i pripadnosti sojeva klasterima (Tabela 30, Prilog 5). Utvrđeno je da su MDR sojevi MTB koji imaju mutacije u genima *rpsL*, *katG*, *rpoB*, *embA*, *embB* i *gyrA* značajno češće u klasterima od sojeva koji nemaju mutacije u ovim genima.

4.4.8.1. Genotipski profili rezistencije MDR sojeva MTB grupisanih u Beijing klasterima

Genotipski profili rezistencije MDR sojeva MTB koji pripadaju Beijing klasterima prikazani su u Tabeli 31. Osam izolata Beijing klastera 2 imali su identične SNP u okviru *rpoB*, *rpsL*, *katG*, *pncA*, *ethA* i *rpoC* gena. Takođe, svi izolati su bili fenotipski rezistentni na R, S, I, Z i ETH. Dva izolata svrstana u Beijing klaster 3, na osnovu analiza SNP imali su identične mutacije u okviru *rpoB*, *rpsL*, *katG*, *pncA*, *embB* i *rpoA* gena i bili su fenotipski rezistentni na R, S i I. Izolat 6881-08 bio je fenotipski osetljiv na E, iako je detektovana mutacija N296H u *embB* genu. Izolat 6879-08 bio je fenotipski osetljiv na Z, iako je u *pncA* genu dokazana mutacija C138R. Ista mutacija otkrivena je u genomu soja 6881-08, koji je fenotipski bio rezistentan na Z.

Dva izolata iz Beijing klastera 4 imali su identične SNP u okviru *rpoB*, *rpsL*, *katG*, *embB* i *rpoC* gena. Takođe, oba izolata bila su fenotipski rezistentna na R, S, I i E. Međutim, izolat 7401-11 je imao mutaciju D94G *gyrA* gena i bio je fenotipski rezistentan na FLQ, kao i mutaciju L35P *pncA* gena i fenotipsku rezistenciju na Z. Interesantno je da su oba izolata iz Beijing klastera 4 bila fenotipski rezistentna na ETH, pri čemu nijedan nije imao mutacije u genima povezanim sa rezistencijom na ovaj antibiotik.

Tabela 31. Genotipski profili rezistencije MDR sojeva *M. tuberculosis* koji pripadaju Beijing klasterima 2, 3 i 4.

Beijing	ID izolata	<i>gyrA</i>	<i>rpoB</i>	<i>rpsL</i>	<i>katG</i>	<i>pncA</i>	<i>embB</i>	<i>ethA</i>	<i>rpoC</i>	<i>rpoA</i>
Klaster 2	3915-12		S450L	K43R	S315T	V7G		W256_	L516P	
	3916-12		S450L	K43R	S315T	V7G		W256_	L516P	
	3924-12		S450L	K43R	S315T	V7G		W256_	L516P	
	9940-13		S450L	K43R	S315T	V7G		W256_	L516P	
	9942-13		S450L	K43R	S315T	V7G		W256_	L516P	
	111-13		S450L	K43R	S315T	V7G		W256_	L516P	
	115-14		S450L	K43R	S315T	V7G		W256_	L516P	

	117-14	S450L	K43R	S315T	V7G	W256_	L516P
Klaster 3	6879-08	S450L	K43R	S315T	C138R	N296H	G31A
	6881-08	S450L	K43R	S315T	C138R	N296H	G31A
Klaster 4	7399-11	S450L	K43R	S315T		N296HL352L	D485Y
	7401-11	D94G	S450L	K43R	S315T	L35P	N296HL352L

4.4.8.2. Genotipski profili rezistencije MDR sojeva MTB grupisanih u S klaster

Genotipski profili rezistencije MDR sojeva MTB koji pripadaju S klasteru 5 prikazani su u Tabeli 32. Sedam izolata svrstanih u S klaster 5 su po dva ponovljena izolata od dva pacijenta i tri izolata od tri različita pacijenta. Svih sedam sojeva imali su identičan SNP samo u okviru *ndh* gena. Dva soja, 6883-08 i 6896-08, izolovana iz uzorka istog pacijenta imali su F424V i D435V mutacije *rpoB* gena i G699E *katG* gena, a razlikuju se u mutacijama u *embB* genu. Izolat 6883-08 nije imao mutacije *embB* gena i fenotipski je bio osjetljiv na E, a 6896-08 je imao mutaciju Q497P *embB* gena i fenotipski je bio rezistentan na ovaj antibiotik. U pitanju su dva soja izolovana tokom iste godine, ali je soj bez mutacije *embB* gena izolovan ranije. Promene u SNP profilima MDR sojeva MTB tokom vremena su još očiglednije kod sojeva 6885-08 i 6146-09. U pitanju su dva soja izolovana iz uzoraka istog pacijenta tokom perioda od približno dve godine. Kada se uporede mutacije povezane sa rezistencijom u genomima ova dva soja (Tabela 32), uočava se da je kasnije izolovan soj imao dve dodatne mutacije, G17A *pncA* gena i A1401G mutaciju *rrs* gena. Kasnije izolovan soj u poređenju sa sojem 6885-08 je, prema tome, pokazao dodatnu fenotipsku rezistenciju na Z, AM i CM.

Preostala tri izolata S klastera 5 (7392-11, 7393-11 i 7402-11) imali su identične SNP u *rpoB*, *ndh*, *katG* i *embB* genima i svi su bili fenotipski rezistentni na R, I i E. Sva tri izolata bila su rezistentna i na Z, ali je ustanovljena razlika u mutacijama. Izolat 7402-11 ima mutaciju D63A u *pncA* genu, dok su ostala dva izolata u tom genu imala mutaciju W68G.

Tabela 32. Genotipski profili rezistencije MDR sojeva *M. tuberculosis* koji pripadaju S klasteru 5.

S	ID izolata	<i>rpoB</i>	<i>ndh</i>	<i>katG</i>	<i>pncA</i>	<i>embB</i>	<i>rrs</i>
Klaster 5	6883-08	F424VD435V	V18A	G699E			
	6896-08	F424VD435V	V18A	G699E		Q497P	
	6885-08	S450L	V18A	L587RP292A		M306I	
	6146-09	S450L	V18A	L587RP292A	G17A	M306I	A1401G

7392-11	F424VD435V	V18A	G699E	W68G	M306V
7393-11	F424VD435V	V18A	G699E	W68G	M306V
7402-11	F424VD435V	V18A	G699E	D63A	M306V

4.4.8.3. Genotipski profili rezistencije MDR sojeva MTB grupisanih u Haarlem klasterima

Genotipski profili rezistencije MDR sojeva MTB koji pripadaju Haarlem klasterima prikazani su u Tabeli 33. Tri izolata Haarlem klastera 6 imali su identične SNP u okviru *rpoB*, *katG*, *embA*, *embB*, *ethA*, *gidB*, Rv2731 i *thyX* gena. Takođe, sva tri izolata su bili fenotipski rezistentna na R, I, E i S. Izolati 6890-08 i 6898-08, za koje je ustanovljena fenotipska osetljivost na ETH, su imali mutaciju L229R *ethA* gena. Ovu mutaciju imao je i izolat 6133-09, za koji nije rađen fenotipski test osetljivosti na ETH. Izolati 6890-08 i 6898-08 su takođe bili osetljivi na PAS, iako je u njihovim genomima dokazana mutacija T234T *thyX* gena. Ista mutacija prisutna je i u genomu soja 6133-09, koji je fenotipski bio rezistentan na ovaj antibiotik.

Dva izolata Haarlem klastera 7 imali su identične SNP u okviru *rpoB* i *katG* gena i bili su fenotipski rezistentni na R i I. Međutim, oba izolata bila su fenotipski rezistentna i na S, iako nisu dokazane mutacije u genima povezanim sa rezistencijom na ovaj antibiotik. Oba izolata bila su osetljiva na Z, iako je detektovana mutacija S40P Rv2731 regiona. Samo jedan izolat, 9943-13, bio je fenotipski rezistentan na E, što se može objasniti prisustvom M306V mutacije *embB* gena.

Od tri izolata Haarlem klastera 8, sojevi 6124-09 i 6131-09 imaju identične SNP u okviru *rpoB* i *katG* gena. Sva tri izolata bila su fenotipski rezistentni na R i I, dok je 6907-08 bio rezistentan i na S, Z i ETH. U genomu ovog izolata nisu dokazane mutacije kojima bi se mogla objasniti fenotipska rezistencija na S i ETH, ali je ustanovljena mutacija *pncA* gena T160R koja se dovodi u vezu sa rezistencijom na Z.

Tabela 33. Genotipski profili rezistencije MDR sojeva *M. tuberculosis* koji pripadaju Haarlem klasterima 6, 7 i 8.

Haarlem	ID izolata	<i>gyrB</i>	<i>mshA</i>	<i>fabG1</i>	<i>rpoB</i>	<i>rpsL</i>	<i>katG</i>	<i>pncA</i>	<i>embA</i>	<i>embB</i>	<i>ethA</i>	<i>gidB</i>	Rv2731	<i>thyX</i>	<i>rpoC</i>
Klaster 6	6890-08				H445D		S315T	A134V	G352G	G406S D1024N	L229R	P75L	S40P	T234T	G594E *
	6898-08	N499S			H445D		S315T		G352G	G406S D1024N	L229R	P75L	S40P	T234T	G594E
	6133-09				H445D		S315T		G352G	G406S D1024N	L229R	P75L	S40P	T234T	G594E
Klaster 7	7394-11				S450L		S315T						S40P		G594E
	9943-13				S450L		S315T			M306V			S40P		G594E
Klaster 8	6907-08		W430_		S450L	K88R	V1A	T160R		M306I					G594E
	6124-09				D435V		S315R S315T								G594E
	6131-09			-58 c/T	D435V		S315R S315T								G594E

* filogenetski informativni SNP

4.4.8.4. Genotipski profili rezistencije MDR sojeva MTB grupisanih u Clade 1 klasterima

Četiri izolata Clade 1 klastera 9 (Tabela 34) imali su identične SNP u okviru *gyrB*, *katG* i *embB* gena. Kod tri izolata ustanovljen je identičan SNP *rpoB* gena (S450L), dok je izolat 7400-11 pored ove mutacije imao i mutaciju T399I *rpoB* gena. Interesantno je da samo kod izolata 7400-11 iz ovog klastera nije dokazana kompenzatorna mutacija L516P *rpoC* gena, što se može objasniti potencijalnim kompenzatornim uticajem T399I mutacije *rpoB* gena. Sva četiri izolata bila su fenotipski rezistentna na R, I i E. Sojevi 6892-08 i 6142-09 bili su rezistentni i na S, iako nije dokazano prisustvo mutacija u genima povezanim sa rezistencijom na ovaj antibiotik. Nasuprot tome, u genomu soja 3914-12 dokazana je mutacija P75S *gidB*, ali je izolat bio fenotipski osetljiv na S. Izolati 7400-11 i 3914-12 bili su fenotipski rezistentni na Z, ali nisu dokazane mutacije u genima povezanim sa rezistencijom na ovaj antibiotik. Izolat 3914-12 je bio fenotipski rezistentan i na ETH, takođe bez mutacija u genima koji su povezani sa nastankom rezistencije na ovaj lek. Dva izolata Clade 1 klastera 10 imali su identične SNP u okviru *rpoB*, *katG* i *embC* gena, a fenotipski su bili rezistentni samo na R i I.

Tabela 34. Genotipski profili rezistencije MDR sojeva *M. tuberculosis* koji pripadaju Clade 1 klasterima 8 i 9.

Clade 1	ID izolata	<i>gyrB</i>	<i>rpoB</i>	<i>katG</i>	<i>embC</i>	<i>embB</i>	<i>gidB</i>	<i>rpoC</i>
Klaster 8	6892-08	T373T	S450L	S315T		M306VA1073A		L516P
	7400-11	T373T	T399IS450L	S315T		M306VA1073A		/
	6142-09	T373T	S450L	S315T		M306VA1073A		L516P
	3914-12	T373T	S450L	S315T		M306VA1073A	P75S	L516P
Klaster 9	6128-09		P45SS450L	S315T	G190S			/
	9936-13		P45SS450L	S315T	G190S			/

4.4.8.5. Genotipski profili rezistencije MDR sojeva MTB grupisanih u Ural klaster

Genotipski profili rezistencije MDR sojeva MTB koji pripadaju Ural klasteru 10 prikazani su u Tabeli 35. Dva izolata ovog klastera imala su identične SNP u okviru *rpoB*, *katG*, *embB*, *ethA*, *gidB*, *rpoC* gena i Rv3169 regiona, a fenotipski su bili osetljivi na R, I i S. Oba izolata bila su fenotipski osetljiva na E, Z i ETH, uprkos prisustvu mutacija T1027T *embB*, S174G Rv3169 regiona i Q206_ *ethA* gena.

Tabela 35. Genotipski profili rezistencije MDR sojeva *M. tuberculosis* koji pripadaju Ural klasteru 10.

Ural	ID izolata	<i>rpoB</i>	<i>katG</i>	<i>embB</i>	<i>ethA</i>	<i>gidB</i>	Rv3169	<i>rpoC</i>
Klaster 10	9945-13	S450L	S315T	T1027T	Q206_	P75S	S174G	V1039A
	108-13	S450L	S315T	T1027T	Q206_	P75S	S174G	V1039A

4.4.8.6. Genotipski profili rezistencije MDR sojeva MTB grupisanih u TUR klaster

Genotipski profili rezistencije MDR sojeva MTB koji pripadaju najvećem identifikovanom klasteru u okviru ovog istraživanja, TUR klasteru 1, prikazani su u Tabeli 36. Svi izolati svrstani u TUR klaster bili su fenotipski rezistentni na R, I i E. Izolat 6901-08 je fenotipski bio osjetljiv na S, iako je imao mutaciju K43R *rpsL* gena. Slično tome, izolati 6909-08 i 6122-09 bili su fenotipski osjetljivi na Z, iako je dokazana I90S mutacija *pncA* gena. Fenotipska rezistencija na Z ustanovljena je i kod sojeva 6138-09 (sa mutacijom G24D *pncA*), 9937-13 i 9939-13 (sa mutacijom A102V *pncA* gena). Nasuprot tome, ukupno sedam izolata bez dokazanog prisustva mutacija u genima povezanim sa rezistencijom na Z bilo je fenotipski rezistentno na ovaj antibiotik (6894-08, 6904-08, 6905-08, 6906-08, 3910-12, 9933-13, 114-14). Čak 21 izolat sa V742L mutacijom *gyrA* gena bio je fenotipski osjetljiv na FLQ. Jedan izolat (6905-08) sa ovom mutacijom bio je fenotipski rezistentan na FLQ, ali je u genomu ovog izolata dokazana i mutacija T500A *gyrB* gena.

TUR klasteru 11 pripadaju četiri soja koja su izolovana iz ponovljenih uzoraka dva pacijenta. Sojevi 6886-08 i 6901-08 izolovani su iz uzoraka istog pacijenta tokom iste godine. Profili SNP u genima rezistencije ova dva soja su identični, odnosno imaju iste SNP u *gyrA*, *rpoB*, *rpsL*, *katG*, *pncA*, *embA*, *embB*, *rrs* i *rpoA* genima (Tabela 36). Međutim, postoji razlika u njihovoj fenotipskoj osjetljivosti na ATL. Soj 6886-08, koji je vremenski ranije izolovan od 6901-08, je fenotipski rezistentan na S, I, R, E, Z, OfI, AM i CM, dok je izolat 6901-08 fenotipski rezistentan na I, R, E, OfI, AM i CM, a osjetljiv na S i Z.

Kada je reč o sojevima 6145-09 i 3925-12, koji su takođe izolovani iz uzoraka istog pacijenta, ali u razmaku od tri godine, identični SNP identifikovani su u genima *rpoB*, *rpsL*, *katG*, *embA* i *rpoA*. Međutim, ova dva soja su u *gyrA* genu imali po jednu identičnu (V742L) i jednu različitu mutaciju (A90V i D94G). Takođe, soj 3925-12 imao

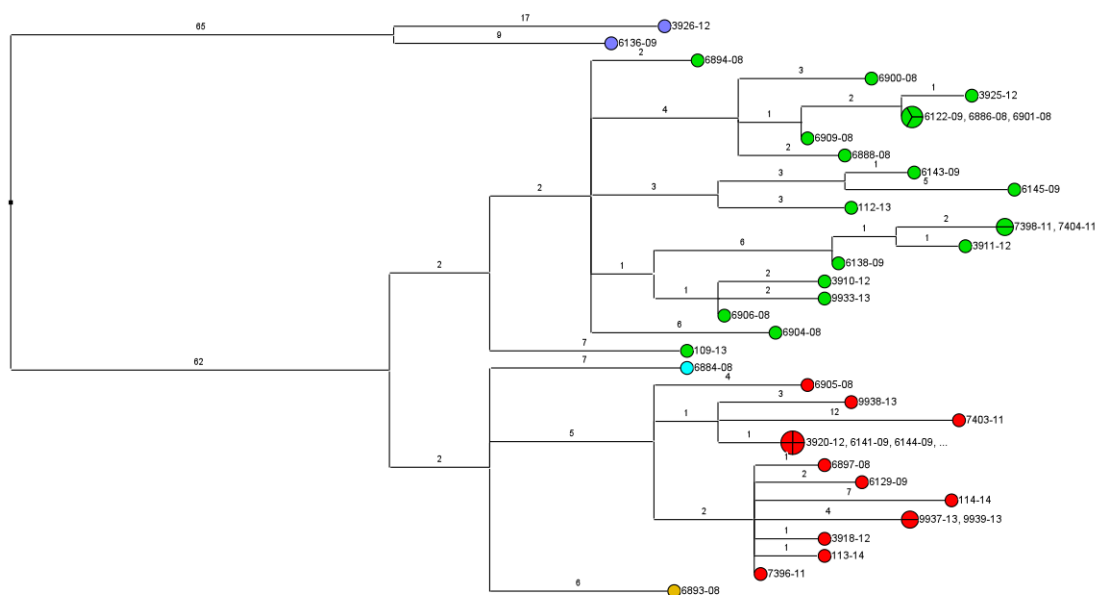
je SNP I90S *pncA* i A1401G *rrs* gena, koje nisu detektovane u genomu soja 6145-09. Osim toga, oba soja su u *embB* genu imala i mutaciju Q497R, s tim što je kod 6145-09 pored ove dokazana i M306I *embB* mutacija (Tabela 36). Kada su u pitanju fenotipski profili osetljivosti ova dva izolata, 6145-09 bio je rezistentan na S, I, R, E i OfI, dok je 3925-12 bio rezistentan na S, I, R, E, Z, OfI, AM i CM. Sumirano, TUR soj izolovan od istog pacijenta je tokom tri godine u *gyrA* genu izgubio D94G ali dobio A90V mutaciju, čime je održana njegova rezistencija na OfI; stekao I90S mutaciju *pncA* gena i rezistenciju na Z; izgubio M306I *embB* gena, ali zadržao Q497R *embB* i rezistenciju na E; izgubio -14g/A *eis* promotera i dobio A1401G *rrs* gena, zahvaljujući čemu je stekao rezistenciju na AM i CM, odnosno postao XDR soj.

Tabela 36. Genotipski profili rezistencije MDR sojeva *M. tuberculosis* koji pripadaju TUR klasteru 1.

TUR	ID izolata	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>mshA</i>	<i>rpoB</i>	<i>rpsL</i>	<i>inhA</i>	<i>katG</i>	<i>pncA</i>	<i>thyA</i>	<i>embA</i>	<i>embB</i>	<i>folC</i>	<i>rrs</i>	<i>eis prom</i>	<i>rpoC</i>	<i>rpoA</i>
Klaster 1	6886-08	D94GV742L			S450W	K43R		S315T	I90S		A576T	Q497R		A1401G			P25R
	6901-08	D94GV742L			S450W	K43R		S315T	I90S		A576T	Q497R		A1401G			P25R
	6145-09	A90VV742L			S450W	K43R		S315T			A576T	M306IQ497R			-14 g/A		P25R
	3925-12	D94GV742L			S450W	K43R		S315T	I90S		A576T	Q497R		A1401G			P25R
	6884-08	V742L			H445Y	K43R		S315T	S164P		A576T	Q497R					
	6888-08	V742L			S450W	K43R		S315T	I90S		A576T	Q497R					P25R
	6893-08	V742L			H445L	K43R		S315T			A576T	Q497R					
	6894-08	V742L			S450W	K43R		S315T			A576T	Q497R					P25R
	6897-08	V742L			S450L	K43R		S315T			A576T	Q497R				V431M	
	6900-08	V742L			S450W	K43R		S315T	I90S	G136G	A576T	Q497R					P25R
	6904-08	V742L			S450W	K43R		S315T			A576T	Q497R					P25R
	6905-08	V742L	T500A		S450L	K43R		S315T			A576T	Q497R					
	6906-08	A90VV742L			S450W	K43R		S315T			A576T	Q497R					P25R
	6909-08	V742L			S450W	K43R		S315T	I90S		A576T	Q497R		A1401G			P25R
	6122-09	D94GV742L			S450W	K43R		S315T	I90S		A576T	Q497R		A1401G			P25R
	6129-09	D94HV742L			S450L	K43R		S315T			A576T	Q497R				V431M	
	6138-09	L105RV742L			S450W	K43R		S315T	G24D		A576T	Q497R		A1401G			P25R
	6141-09	V742L			S450L	K43R		S315T	H57R		A576T	Q497R				F452L	
	6143-09	A90VV742L			S450W	K43R		S315T			A576T	Q497R			-14 g/A		P25R
	6144-09	V742L			S450L	K43R		S315T	H57R		A576T	Q497R				F452L	
	7396-11	V742L			S450L	K43R		S315T	A102V		A576T	Q497R				V431M	
	7398-11	L105RV742L			S450W	K43R		S315T	G24D		A576T	Q497R		A1401G			P25R
	7403-11	S91PR292GV742L		A362D	S450L	K43R	I16V	S315T	L172P		A576T	Q497R	R42P	A1401G		F452L	
	7404-11	L105RV742L			S450W	K43R		S315T	G24D		A576T	Q497R		A1401G			P25R
	3910-12	A90VV742L			S450W	K43R		S315T			A576T	Q497R		A1401G			P25R
	3911-12	L105RV742L			S450W	K43R		S315T	G24D		A576T	Q497R		A1401G			P25R
	3918-12	V742L			S450L	K43R		S315T	A102V		A576T	Q497R				V431M	
	3920-12	V742L			S450L	K43R		S315T	H57R		A576T	Q497R				F452L	
	9933-13	A90VV742L			S450W	K43R		S315T			A576T	Q497R		A1401G			P25R
	9934-13	V742L			S450L	K43R		S315T	H57R		A576T	Q497R				F452L	
	9937-13	V742L			S450L	K43R		S315T	A102V		A576T	Q497R				V431M	
	9938-13	V742L			S450L	K43R		S315T	H57R		A576T	Q497R				F452L	
	9939-13	V742L			S450L	K43R		S315T	A102V		A576T	Q497R				V431M	
	109-13	V742L			S450W	K43R		S315T			A576T	Q497R					P25R
	112-13	V742L			S450W	K43R		S315T			A576T	Q497R					P25R
	113-14	V742L			S450L	K43R		S315T	A102V		A576T	Q497R				V431M	
	114-14	V742L		G67R	S450L	K43R		S315T			A576T	Q497R				V431M	

4.4.8.6.1. Evolucija TUR klastera MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji

S obzirom da je za najveći broj MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji tokom poslednjih šest godina ustanovljeno da pripadaju TUR liniji (39/108; 36,1%), pri čemu je čak 94,9% (37/39) TUR izolata bilo grupisano u isti klaster, poseban segment ovog istraživanja posvećen je analizi evolucije TUR klastera, odnosno lokalnih TUR izolata. Na osnovu analize SNP profila ispitivanih MDR sojeva TUR linije, konstruisano je stablo minimalnog raspona prikazano na Slici 26. Jasno se uočava da je TUR klaster podeljen u dve podgrupe, koje su radi jednostavnijeg tumačenja označene kao zelena i crvena grana (Slika 26).



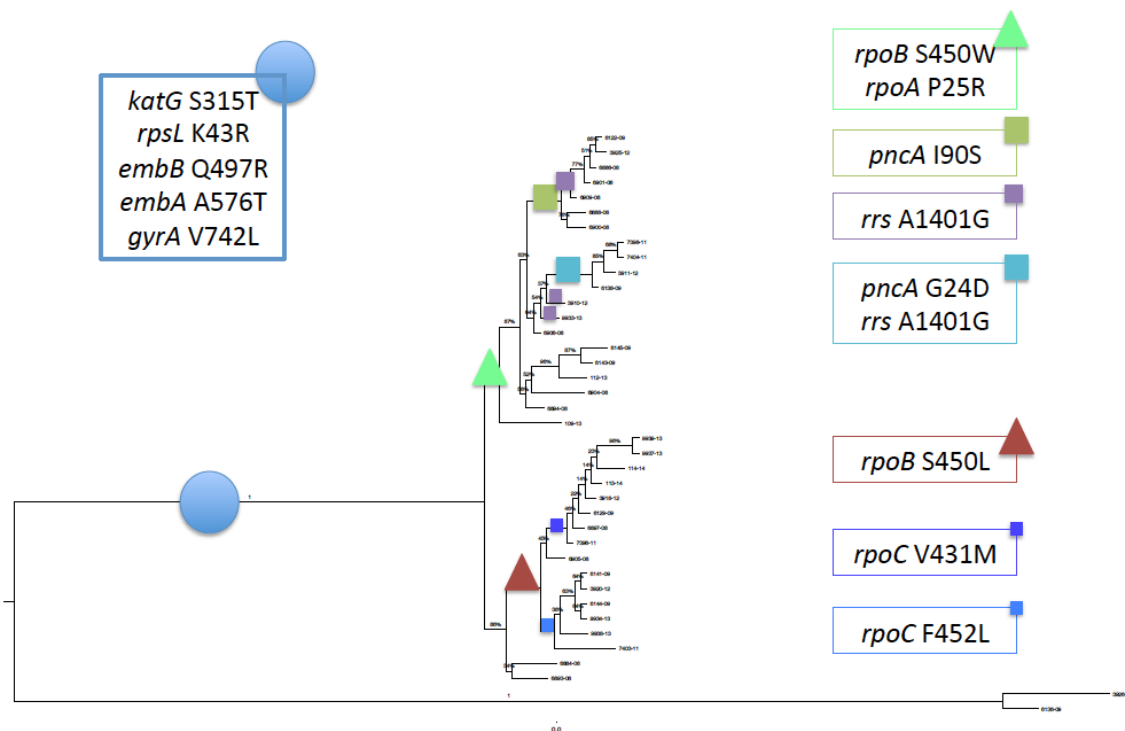
Slika 26. Stablo minimalnog raspona TUR klastera MDR sojeva *M. tuberculosis*. Brojevi iznad grana označavaju broj različitih SNP. Izolati 6893-08 (označen žutom bojom) i 6884-08 (označen plavom bojom) imaju mutacije H445L i H445Y *rpoB* gena; izolati 3926-12 i 6136-09 (označeni ljubičastom bojom) pripadaju TUR liniji, ali nisu grupisani u TUR klaster (spoljna grupa).

Radi preciznijeg uvida u evoluciju TUR filogenetske linije MDR sojeva u Srbiji, konstruisano je stablo maksimalne parsimonije u kom su obeleženi SNP identifikovani u genima povezanim sa rezistencijom na ATL (Slika 27). Iz stabla maksimalne parsimonije jasno se vidi da je ancestralni TUR soj imao sledeći SNP profil: *katG* S315T, *rpsL* K43R, *embB* Q497R, *embA* A576T i *gyrA* V742L. Prema tome, ovaj ancestralni TUR soj bio je rezistentan na I, S, E i FLQ, zbog čega je označen kao pre-

MDR soj. Rezultati našeg istraživanja pokazuju da je pre-MDR ancestor evoluirao u dve grane, uzastopnim sticanjem multiplih SNP u genima rezistencije i kompenzatornih SNP u *rpoA* odnosno *rpoC* genima.

Zelena grana TUR klastera najpre je istovremeno stekla S450W *rpoB* i P25R mutaciju *rpoA* gena i od ove grane je nastalo ukupno 20 MDR izolata MTB. Od zelene podgrane sa I90S *pncA* mutacijom nastalo je pet izolata sa dodatnom A1401G *rrs* mutacijom. Jedna zelena podgrana simultano je stekla G24D *pncA* i A1401G mutaciju *rrs* gena dajući četiri izolata, dok su dva izolata nezavisno dobila mutaciju A1401G *rrs* gena. Na ovaj način, zelena grana rezultirala je pojavom 11 XDR izolata MTB. Dva izolata sa S450W *rpoB*, P25R *rpoA* i I90S *pncA* i sedam izolata sa S450W *rpoB* i P25R mutacijom *rpoA* gena nisu dobili nijednu dodatnu mutaciju, odnosno zadržali su MDR profil.

Od crvene grane, koja je inicijalno stekla mutaciju S450L *rpoB* gena, odvojile su se dve podgrane od kojih je svaka nezavisno dobila po jednu *rpoC* mutaciju (F452L, odnosno V431M). Od podgrane sa V431M *rpoC* nastalo je osam ne-XDR sojeva MTB, dok je od podgrane sa F452L *rpoC* nastalo šest ne-XDR sojeva MTB. Jedan soj crvene grane sa S450L mutacijom *rpoB* gena nije stekao nijednu kompenzatornu mutaciju niti mutacije u drugim genima povezanim sa rezistencijom na ATL.

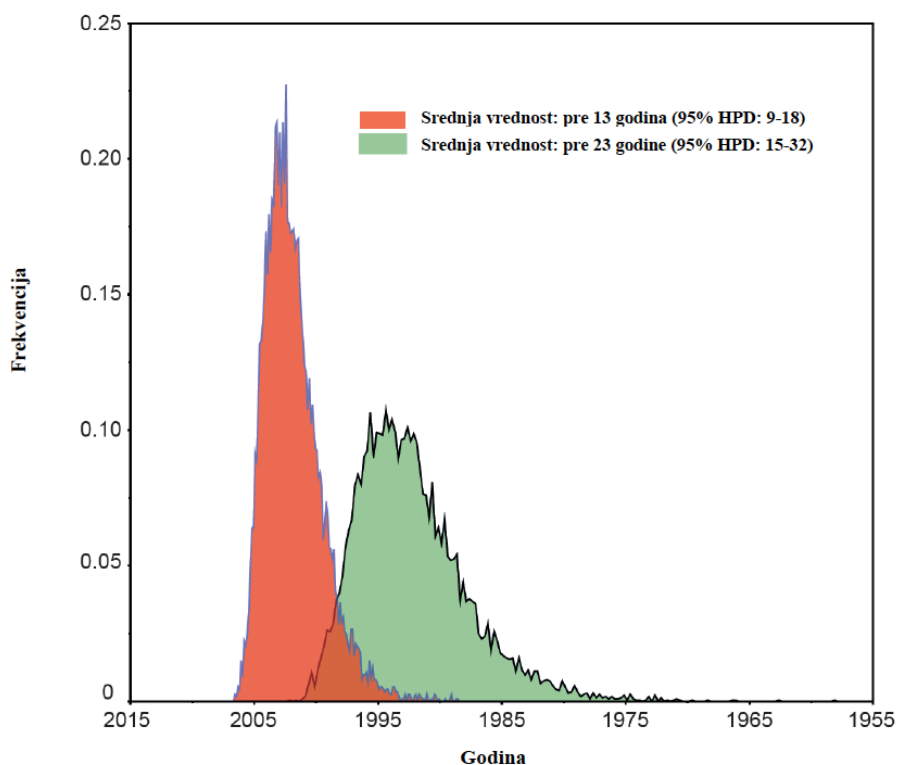


Slika 27. Stablo maksimalne parsimonije TUR klastera MDR i XDR sojeva *M. tuberculosis* izolovanih u Srbiji. Procenti označavaju bootstrap vrednosti, odnosno verovatnoću pozicije svake grane u stablu.

4.4.8.6.2. Procena evolutivne starosti TUR klastera MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji

Na osnovu pozicije zelene i crvene grane u stablu minimalnog raspona TUR klastera 1, pretpostavili smo da je zelena grana evolutivno starija, odnosno da se vremenski ranije izdvojila od crvene grane. U cilju precizne procene starosti anastora zelene i crvene grane TUR klastera, izvršena je Bayesian analiza na osnovu SNP profila svih 108 MDR izolata i vremena izolovanja MDR sojeva MTB iz respiratornih uzoraka pacijenata, primenom BEAST softvera (Drummond i sar. 2012). Podaci su analizirani softverski dva puta sa različitim demografskim pretpostavkama i striktnim molekularnim satom (konstantna veličina populacije i Bayesian kriva). Oba modela imala su gotovo isti Bayesian faktor verovatnoće (-10.499.755 i -10.499.668), zbog čega je za dalja tumačenja izabran jednostavniji model. Procenjena stopa mutacija iznosila je $1,08 \times 10^{-7}$. Prema rezultatima Bayesian analize, procenjeno je da zajednički anastor sojeva zelene grane TUR klastera 1 datira iz 1992. godine, odnosno između 1983. i 2000. godine. Za

zajednički ancestor MDR izolata crvene grane procenjeno je da je nastao 2002. godine, odnosno između 1997. i 2006. godine (Grafikon 23).



Grafikon 23. Rezultati Bayesian analize za procenu starosti zajedničkih ancestor MDR sojeva *M. tuberculosis* koji pripadaju zelenoj i crvenoj grani TUR klastera 1. HPD = interval gustine najviše verovatnoće (eng. highest probability density interval).

Korelacija između dužine TUR grana u evolutivnom stablu odnosno procenjene evolutivne starosti MDR sojeva MTB TUR genotipa i vremena izolovanja ovih sojeva bila je slabo pozitivna ($r=0,22$). Jedno od mogućih objašnjenja ovakvog nalaza je nedovoljna pouzdanost podataka o vremenu izolovanja sojeva iz uzoraka pacijenata. Međutim, nepoklapanje vremena izolovanja TUR sojeva i njihove evolutivne starosti može se objasniti i različitom selekcijom sojeva u organizmu domaćina, odnosno varijacijama genoma bacila u organizmu pacijenata. Drugim rečima, pacijent sa populacijom bacila TB koju čine sojevi različitih SNP profila, može inficirati jednu osobu sojem koji ima, na primer, 5 SNP varijanti, a drugu osobu sojem koji ima, na primer, jedan potpuno drugačiji SNP. S obzirom na to da patogeneza TB u značajnoj meri zavisi i od imunskog statusa organizma domaćina, jasno je da će od trenutka inficiranja ove dve osobe sojevima sa potpuno različitim SNP profilima do trenutka

razvoja aktivne TB proći različito dugi vremenski periodi. U skladu sa tim, može se očekivati da će se vremena izolovanja sojeva iz uzoraka pacijenata razlikovati, iako su sojevi koji su kod oba pacijenta dovela do nastanka aktivne TB zapravo nastali u isto vreme.

4.4.8.6.3. Mogući uzroci klonske ekspanzije MDR sojeva MTB TUR genotipa u Srbiji

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je aktivna transmisija MDR TB u Srbiji pre svega povezana sa MDR sojevima TUR filogenetske linije. U cilju detekcije gena čiji produkti bi mogli biti odgovorni za ovakvu klonsku ekspanziju TUR izolata svrstanih u klaster, izdvojene su sve „hitchhiking“ mutacije SNP detektovanih u genima rezistencije na ATL (Tabela 37, Prilog 6). „Hitchhiking“ mutacije definisane su kao neutralne mutacije koje, zbog bliske prostorne povezanosti sa mutacijama koje su pod pozitivnom selekcijom, i same podležu pozitivnoj selekciji. Usled toga ove mutacije javljaju se sa visokom učestalošću ili čak dolazi do njihove fiksacije u populaciji.

Detaljnim pregledom identifikovanih „hitchhiking“ mutacija i njihovih produkata, uočeno je prisustvo tri produkta koji bi mogli imati ulogu u ekspanziji TUR klastera odnosno koji bi mogli doprineti povećanju virulencije MDR sojeva ovog klastera. Naime, za sve MDR sojeve MTB koji pripadaju TUR klasteru pokazano je da imaju toksine VapC24 i VapC25. U pitanju su produkti koji predstavljaju članove najveće familije toksin-antitoksin sistema *M. tuberculosis*, VapBC, za koji se smatra da ima veliki značaj u uspostavljanju latentne TB (Ramage i sar. 2009; Sala i sar. 2014). Takođe, svi MDR sojevi koji pripadaju crvenoj grani TUR klastera imaju takozvanu verovatnu katjon-transporter ATP-azu I (eng. probable cation-transporter ATP-ase I), koja se inače smatra ključnom za opstanak mikobakterija u prisustvu toksičnih supstanci unutar fagozoma tokom aktivne i latentne faze TB (Padilla-Benavides i sar. 2013; Novoa-Aponte i sar. 2014). Postoji mogućnost da je fiksacija VapC24 i VapC25 kod ancestoru TUR klastera povećala njegovu virulenciju i omogućila preživljavanje, odnosno dovela do uspostavljanja latentne TB i stabilizacije populacije TUR sojeva u nepovoljnim uslovima u organizmu domaćina. Rezultati našeg istraživanja ukazuju da je nešto kasnije, u subpopulaciji koja će formirati crvenu granu TUR klastera, došlo do fiksacije „hitchhiking“ mutacije odgovorne za verovatnu katjon-transporter ATP-azu I. Time je, moguće, dodatno povećana virulencija i sposobnost transmisije ovih sojeva.

Međutim, među MDR sojevima MTB zelene grane TUR klastera nije prepoznat nijedan faktor koji bi mogao objasniti „agresivnost“ ovih sojeva, posebno sojeva sa XDR profilom rezistencije. Osim toga, imajući u vidu da realan značaj verovatne katjon-transporter ATP-aze, VapC24 i VapC25 toksina kao faktora virulencije sojeva MTB još uvek nije u potpunosti poznat, njihova povezanost sa ekspanzijom TUR klastera u Srbiji za sada je samo hipotetička i nijedan od navedenih faktora ne možemo sa sigurnošću smatrati odgovornim za ekstremnu virulenciju lokalnih MDR sojeva koji pripadaju TUR klasteru.

4.4.9. Procena sposobnosti transmisije MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji

U cilju procene sposobnosti transmisije MDR sojeva MTB, izvršena je statistička analiza udruženosti pojedinačnih mutacija u genima rezistencije i pripadnosti klasteru (Tabela 38, Prilog 7). Na osnovu rezultata analize, utvrđena je značajna povezanost mutacija P75L i P75S *gidB*, S315T *katG*, S450W *rpoB*, L516P i V431M *rpoC*, P25R *rpoA*, A576T *embA*, Q497R *embB*, V7G *pncA*, V742L *gyrA* i W256_ *ethA* gena i pripadnosti klasteru. Na osnovu rezultata zaključujemo da MDR sojevi MTB sa navedenim mutacijama imaju značajno veću sposobnost transmisije u poređenju sa MDR sojevima u čijim genomima ove mutacije nisu detektovane.

Na osnovu rezultata analize udruženosti prisustva mutacija u genima rezistencije sa pozitivnim odnosno negativnim ishodima lečenja, pokazano je da su mutacije *gyrA* gena udružene sa negativnim, odnosno neuspešnim i/ili smrtnim ishodom lečenja (Tabela 39). Međutim, analiza povezanosti pojedinačnih mutacija sa ishodima lečenja pokazala je da ne postoji značajna udruženost nijedne pojedinačne mutacije, kako u *gyrA* tako ni u ostalim genima, sa negativnim ishodima lečenja (Tabela 40, Prilog 8).

Tabela 39. Analiza udruženosti prisustva mutacija u genima rezistencije MDR sojeva *M. tuberculosis* sa ishodima lečenja.

	Ishod lečenja		p vrednost
	Neuspešno/umro	Završeno/uspešno	
<i>rpsL</i>			
ne	15 (40,5%)	22 (59,5%)	0,578
da	21 (46,7%)	24 (53,3%)	
<i>gidB</i>			
ne	32 (43,8%)	41 (56,2%)	0,972
da	4 (44,4%)	5 (55,6%)	

	Ishod lečenja		p vrednost
	Neuspešno/umro	Završeno/uspešno	
<i>inhA</i>			
ne	35 (43,2%)	46 (56,8%)	0,255
da	1 (100%)	0 (0%)	
<i>ndh</i>			
ne	32 (42,1%)	44 (57,9%)	0,243
da	4 (66,7%)	2 (33,3%)	
<i>katG</i>			
ne	2 (100%)	0 (0%)	0,106
da	34 (42,5%)	46 (57,5%)	
<i>kasA</i>			
ne	35 (43,2%)	46 (56,8%)	0,255
da	1 (100%)	0 (0%)	
<i>inhA</i> prom			
ne	35 (44,3%)	44 (55,7%)	0,707
da	1 (33,3%)	2 (66,7%)	
<i>rpoB</i>			
ne	3 (100%)	0 (0%)	0,046
da	33 (41,8%)	46 (58,2%)	
<i>rpoC</i>			
ne	22 (48,9%)	23 (51,1%)	0,316
da	14 (37,8%)	23 (62,2%)	
<i>rpoA</i>			
ne	25 (40,3%)	37 (59,7%)	0,250
da	11 (55%)	9 (45%)	
<i>embA</i>			
ne	19 (40,4%)	28 (59,6%)	0,462
da	17 (48,6%)	18 (51,4%)	
<i>embB</i>			
ne	7 (31,8%)	15 (68,2%)	0,182
da	29 (48,3%)	31 (51,7%)	
<i>embC</i>			
ne	36 (47,4%)	40 (52,6%)	0,024
da	0 (0%)	6 (100%)	
<i>pncA</i>			
ne	15 (36,6%)	26 (63,4%)	0,182
da	21 (51,2%)	20 (48,8%)	
<i>rpsA</i>			
ne	36 (44,4%)	45 (55,6%)	0,373
da	0 (0%)	1 (100%)	
Rv3169			
ne	35 (43,2%)	46 (56,8%)	0,255
da	1 (100%)	0 (0%)	

	Ishod lečenja		p vrednost
	Neuspešno/umro	Završeno/uspešno	
Rv2731			
ne	35 (46,7%)	40 (53,3%)	0,099
da	1 (14,3%)	6 (85,7%)	
<i>gyrA</i>			
ne	14 (31,8%)	30 (68,2%)	0,018
da	22 (57,9%)	16 (42,1%)	
<i>gyrB</i>			
ne	34 (44,7%)	42 (55,3%)	0,588
da	2 (33,3%)	4 (66,7%)	
<i>ethA</i>			
ne	31 (45,6%)	37 (54,4%)	0,498
da	5 (35,7%)	9 (64,3%)	
<i>ethR</i>			
ne	36 (44,4%)	45 (55,6%)	0,373
da	0 (0%)	1 (100%)	
<i>dfrA</i>			
ne	35 (43,2%)	46 (56,8%)	0,255
da	1 (100%)	0 (0%)	
<i>fabG1</i> prom			
ne	35 (44,9%)	43 (55,1%)	0,435
da	1 (25%)	3 (75%)	
<i>mshA</i>			
ne	35 (44,3%)	44 (55,7%)	0,707
da	1 (33,3%)	2 (66,7%)	
<i>thyA</i>			
ne	36 (44,4%)	45 (55,6%)	0,373
da	0 (0%)	1 (100%)	
<i>thyX</i>			
ne	36 (45,6%)	43 (54,4%)	0,119
da	0 (0%)	3 (100%)	
<i>folC</i>			
ne	35 (44,9%)	43 (55,1%)	0,435
da	1 (25%)	3 (75%)	
<i>rrs</i>			
ne	27 (40,3%)	40 (59,7%)	0,165
da	9 (60%)	6 (40%)	
<i>eis</i> prom			
ne	35 (43,8%)	45 (56,2%)	0,860
da	1 (50%)	1 (50%)	
<i>eis</i>			
ne	35 (43,2%)	46 (56,8%)	0,255
da	1 (100%)	0 (0%)	

	Ishod lečenja		p vrednost
	Neuspešno/umro	Završeno/uspešno	
<i>tlyA</i>			
ne	35 (43,2%)	46 (56,8%)	0,255
da	1 (100%)	0 (0%)	
<i>alr</i>			
ne	36 (44,4%)	45 (55,6%)	0,373
da	0 (0%)	1 (100%)	
<i>rplC</i>			
ne	36 (44,4%)	45 (55,6%)	0,373
da	0 (0%)	1 (100%)	

5. Diskusija

Patogeneza TB predstavlja rezultat kompleksne interakcije između patogena, domaćina i okruženja. Smatra se da su u složenom procesu koegzistencije bacila TB i domaćina ključni faktori koji utiču na razvoj bolesti promene na nivou genoma bacila TB, koje nastaju kao odgovor na susret sa imunskim sistemom organizma domaćina (Comas i Gagneux 2009). Tokom poslednjih nekoliko decenija postignut je veliki napredak u razumevanju molekularne biologije članova MTK i njihove interakcije sa organizmom čoveka. Ipak, kliničke i epidemiološke posledice infekcije sojevima MTK i dalje su u velikoj meri nepoznanica, jer se klinički izolati bacila TB međusobno značajno razlikuju po svojoj virulenciji i imunogenosti. Posledice visoke varijabilnosti genoma pojedinačnih sojeva neke bakterije najjednostavnije je sagledati kroz vrednosti morbiditeta i mortaliteta oboljenja koje ona izaziva, a MTK u tom smislu predstavlja jedan od vodećih infektivnih agenasa na globalnom nivou. Osim toga, veliki diverzitet bacila TB presudno utiče na efikasnost kontrolnih mera na nivou svake pojedinačne populacije. Iz tog razloga, primena dijagnostičkih testova, lekova i vakcina u određenoj populaciji trebalo bi da bude usklađena sa karakteristikama bacila TB koji su u njoj dominantno prisutni, a uvođenje novih kontrolnih mera trebalo bi da bude zasnovano na rezultatima opsežnih studija samih uzročnika i njihovih interakcija sa domaćinima. U tom smislu, precizna identifikacija do nivoa vrste, genotipizacija i detekcija mutacija u okviru gena povezanih sa rezistencijom na ATL MDR izolata MTK prisutnih u datoj populaciji predstavljaju veoma važan korak u uspostavljanju adekvatnih mera kontrole MDR TB najpre na lokalnom, a posledično i na globalnom nivou.

Jedino molekularno epidemiološko istraživanje TB u Srbiji sprovedeno je pre 14 godina. Rezultati RFLP IS6110 genotipizacije kolekcije MTB sojeva izolovanih u Beogradu tokom 1998. i 1999. godine pokazali su da je skoro 70% MDR izolata MTB bilo grupisano u klastere (Vukovic i sar. 2003). U istoj studiji pokazano je da rezistencija i multipla rezistencija sojeva MTB predstavljaju jedine faktore rizika za pripadanje MTB sojeva, odnosno pacijenata od kojih su ti sojevi izolovani, klasterima i da na području Beograda postoji skorašnja, aktivna transmisija MDR TB. Pokazano je takođe da većina ustanovljenih oblika transmisije TB nije bila otkrivena konvencionalnim epidemiološkim ispitivanjem i da je za pouzdano praćenje transmisije MDR TB u našoj sredini, pored konvencionalnih, neophodna primena i molekularnih epidemioloških tehnika (Vukovic i sar. 2003). Međutim, pristup praćenju transmisije

MDR TB u Srbiji od tada nije značajno promenjen i još uvek se bazira isključivo na konvencionalnom konceptu pretrage za kontaktima obolelih od MDR TB. U pogledu laboratorijske dijagnostike MDR TB u Srbiji, značajan pomak napravljen je 2008. godine, kada su u NRL za TB uvedeni molekularni testovi proizvođača HAIN Lifescience, za identifikaciju MTK do nivoa vrste i detekciju mutacija koje najčešće dovode do pojave rezistencije na glavne ATL prve linije, I i R. Ipak, uprkos preporukama, u algoritam laboratorijske dijagnostike do sada nije uveden ni jedan metod genotipizacije sojeva MTK, a praćenje transmisije MDR TB ostalo je na suboptimalnom nivou. Prema tome, filogenetska struktura, modeli, putevi i faktori rizika za transmisiju MDR TB, kao i genetička osnova rezistencije na ATL prve i druge linije MDR sojeva MTK prisutnih u našoj populaciji još uvek nisu poznati i to je bio osnovni razlog za sprovođenje ovog istraživanja. Našim istraživanjem obuhvaćeni su svi MDR sojevi MTK izolovani iz uzoraka pacijenata kojima je dijagnostikovana MDR TB u periodu 01.01.2008-31.05.2014. godina u Srbiji, odnosno svi MDR sojevi MTK izolovani u Srbiji tokom poslednjih šest godina.

5.1. Vrste/podvrste MTK kao uzročnici MDR TB u populaciji u Srbiji

Za specijaciju MDR sojeva MTK obuhvaćenih ovim istraživanjem korišćen je GenoType MTBC test. U poređenju sa drugim komercijalno dostupnim molekularnim testovima, GenoType MTBC može identifikovati najveći broj vrsta/podvrsta MTK (*M. tuberculosis*/*M. canettii*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG i *M. caprae*), uz visoku osetljivost i specifičnost (Padilla i sar. 2004; Richter i sar. 2004; Kurtoglu i sar. 2014). Opređenje za ovaj test proisteklo je iz činjenice da se njegovom primenom mogu identifikovati vrste MTK koje je opravdano očekivati u populaciji u Srbiji. Pre svega, ovaj test identifikuje *M. tuberculosis* sensu stricto kao geografski najrasprostranjeniju vrstu MTK i ujedno najčešćeg uzročnika TB; *M. bovis*, vrstu koja je najznačajniji uzročnik TB kao zoonoze (Müller i sar. 2013 b); i vrstu *M. caprae*, za koju je pokazano da je kao izazivač TB prisutna u ruralnim sredinama u više evropskih država (Prodinger i sar. 2002; Prodinger i sar. 2014). Nedostaci GenoType MTBC testa su nemogućnost identifikacije vrsta *M. pinnipedii*, *M. orygis*, *M. suricattae*, *M. mungi* i bacila šimpanzi, ali s obzirom na njihovu geografsku distribuciju i ulogu u nastanku

humane TB, prisustvo ovih članova MTK kao uzročnika MDR TB u Srbiji nije bilo očekivano.

Primenom GenoType MTBC testa, svih 115 (100%) MDR sojeva MTK, koji su izolovani u Srbiji tokom proteklih šest godina, identifikovano je kao vrsta *M. tuberculosis*. Kako bismo uporedili profile vrsta odnosno podvrsta MTK uzročnika TB i MDR TB u Srbiji, primenom GenoType MTBC testa izvršili smo identifikaciju i svih sojeva MTK izolovanih od pacijenata obolelih od plućne TB u Srbiji tokom perioda 01.12.2010.-30.11.2011. godina, jedan izolat po pacijentu. Svi sojevi ove kolekcije (971/971; 100%) takođe su identifikovani kao vrsta *M. tuberculosis* (Živanović i sar. 2014), čime je pokazano da ne postoji razlika u profilima vrsta izazivača TB i vrsta uzročnika MDR TB u Srbiji.

Detekcija vrste *M. tuberculosis* kao apsolutno dominantnog izazivača TB u populaciji u Srbiji je očekivan rezultat, s obzirom da je ova vrsta na globalnom nivou najčešće identifikovana vrsta MTK u uzorcima obolelih od TB (WHO 2014). Ako uporedimo rezultate naše sa rezultatima drugih evropskih studija, koje su se bavile specijacijom MTK primenom GenoType MTBC testa, sličan rezultat imaju, na primer, studije iz Poljske (Safianowska i sar. 2009) i Turske (Kurtoglu i sar. 2014). Kada su u pitanju MDR sojevi MTK, naši rezultati su u skladu sa apsolutnom predominacijom ove vrste kao izazivača MDR TB u svetu (WHO 2014) i posebno na području Evrope (Günther i sar. 2015).

M. africanum je izazivač oko 40% slučajeva humane TB na području zapadne Afrike. Ova vrsta obuhvata dve filogenetske linije. MAF1 linija je dominantna na istoku zapadne Afrike i centralnoafričkim državama, dok je MAF2 prevalentna u zapadnom delu zapadne Afrike, a obe linije su prisutne u Sijeri Leone, Obali Slonovače, Gani i Beninu (de Jong i sar. 2010). Prema rezultatima poslednjih studija, pokazano je da je prevalencija TB izazvane MAF1 linijom najviša u Beninu, koji se trenutno smatra epicentrom ove linije (Gehre i sar. 2013). Iako je identifikovana kao izazivač sporadičnih slučajeva TB u Nemačkoj, Engleskoj, Francuskoj i Španiji, *M. africanum* se retko detektuje van područja zapadne Afrike i to uglavnom kod imigranata iz ovog geografskog područja (de Jong i sar. 2010). Srbija tokom nekoliko poslednjih godina predstavlja tranzitnu zemlju u lancu interkontinentalnih migracija iz Afrike i Azije u Evropu. Prema podacima Centra za zaštitu i pomoć tražiocima azila u Srbiji, do kraja

2014. godine kroz Srbiju je prošlo 16.490 migranata. Najveći broj dolazi iz Sirije, Somalije, Avganistana, Eritreje, Pakistana, Alžira i Malija (APCCZA 2013). Iako su u pitanju države sa visokim stopama prevalencije i incidencije MDR TB (WHO 2014), migranti u Srbiji borave kratak vremenski period, a samo njih 10 je za proteklih pet godina dobilo izbeglički status. Ne može se isključiti mogućnost prisustva migranata sa TB i MDR TB u Srbiji, jer se ne sprovodi sistemska kontrola usmerena na otkrivanje TB u ovoj populaciji. Međutim, naši rezultati odnosno odsustvo vrste *M. africanum* u obe kolekcije ispitivanih izolata MTK pokazuju da migranti, za sada, nemaju značaja u transmisiji TB i MDR TB u Srbiji. Slična je situacija i sa prisustvom vrste *M. canettii*. U kolekcijama sojeva MTK ispitivanim u okviru ovog istraživanja nijedan izolat nije identifikovan kao *M. canettii*, što je i bilo očekivano. Naime, slučajevi humane TB izazvane ovom vrstom MTK su retki i do sada su opisani samo kod stanovnika Afrike ili osoba koje su neko vreme boravile u Africi (van Soolingen i sar. 1997; Somoskovi i sar. 2009).

Kada je u pitanju vrsta *M. bovis*, prema podacima Referentne laboratorije EU za bovinu TB, u državama EU u 2012. godini potvrđeno je samo 125 slučajeva humane TB izazvane ovom vrstom. Vrednosti prevalencije bovine TB u EU značajno su smanjene pre svega zahvaljujući programu provere prisustva *M. bovis* u uzorcima domaćih životinja pre klanja (eng. „test and slaughter“) (Reviriego Gordejo i sar. 2006; Perez-Lago i sar. 2014). U Srbiji je 50-ih godina 20. veka uveden Nacionalni program kontrole i eradikacije bovine TB, koji se zasnivao na godišnjem tuberkulinskom testiranju stoke i izdvajanju i klanju inficiranih životinja. Tokom 2005. godine ustanovljen je nov program eradikacije bovine TB u skladu sa preporukama EU, ali se slučajevi bovine TB stoke još uvek sporadično javljaju (Krnjajić i sar. 2014). Do transmisije *M. bovis* na čoveka najčešće dolazi usled direktnog kontakta sa inficiranim domaćim životinjama ili konzumiranjem životinjskih produkata, a interhumana transmisija je retka i uglavnom se događa među imunokompromitovanim osobama. Iako se stoka smatra glavnim rezervoarom, rezervoari *M. bovis* su i razne divlje životinje, poput jazavaca (Velika Britanija i Irska), belorepih jelena (Mičigen, SAD), oposuma (Novi Zeland), bivola, antilopa (Afrika) i divljih svinja (Pirinejsko poluostrvo). Ovom vrstom MTK takođe mogu biti inficirani psi i mačke, usled konzumiranja mesa inficiranih životinja. Zbog raznovrsnosti životinjskih vrsta koje su

moćni rezervoari *M. bovis*, primena uobičajenih mera prevencije, kao što su pasteurizacija mleka i mlečnih proizvoda, primena tuberkulinskog testa za kontrolu domaćih životinja, pregled životinjskih produkata i BCG vakcinacija, često nije dovoljna (Perez-Lago i sar. 2014). Najbolji primer za to je Francuska, u kojoj je 2006. godine izvršena totalna depopulacija crvenih jelena kao glavnih rezervoara *M. bovis*. Godinu dana nakon toga, *M. bovis* je identifikovan kod divljih svinja, a 2009. godine i kod jazavaca, zbog čega je izvršena redukcija broja životinja ovih vrsta. Međutim, *M. bovis* se i dalje sporadično detektuje u uzorcima divljih svinja, a populacija *M. bovis* na taj način i dalje održava među domaćim životinjama odnosno u okruženju u Francuskoj (EFSA 2012).

Posebno značajan nalaz je da su detektovani *M. bovis* sojevi kao izazivači humane MDR i XDR TB. Jedan od primera predstavlja nozokomijalna epidemija XDR TB, koja je nastala usled nekontrolisane transmisije aerosolom vrste *M. bovis* i trajala cele četiri godine. Epidemijom su bile zahvaćene 22 bolnice iz šest regija u Španiji, obolela je najmanje 141 osoba, a svi pacijenti iz dve bolnice umrli su u roku od oko 40 dana od trenutka postavljanja dijagnoze. Većina inficiranih bili su HIV pozitivni, ali među obolelima je bilo i pet imunokompetentnih osoba, čime je osporeno prvobitno mišljenje da je imunosupresija ključni preduslov za interhumanu transmisiju *M. bovis*. Uprkos uvođenju drastičnih mera kontrole transmisije u bolnicama zahvaćenim epidemijom i postavljanja nadzora mreže bolnica za zbrinjavanje obolelih od MDR i XDR TB 1998. godine, od 1998. do 2003. godine u Španiji su identifikovana još 22 nova slučaja XDR TB izazvana istim sojem *M. bovis*, koji je bio uzročnik nozokomijalne epidemije (Samper i Martin 2007; Perez-Lago i sar. 2014). Imajući u vidu sve navedeno, jasno je da je moguće očekivati prisustvo *M. bovis* u Srbiji, kako u populaciji domaćih i divljih životinja, tako i u humanoj populaciji, posebno u ruralnim sredinama u kojima su ljudi izloženi bliskom kontaktu sa životinjama. Pored toga, jedan od osnovnih razloga izvođenja molekularne specijacije lokalne populacije MDR sojeva MTK bio je i dokazan značaj vrste *M. bovis* kao izazivača MDR i XDR TB. Međutim, u ispitivanim studijskim kolekcijama sojeva MTK izolovanih u našoj zemlji nijedan soj nije identifikovan kao *M. bovis*, kako među sojevima osetljivim na ATL, tako i među MDR sojevima.

Pored *M. bovis*, kao zoonoza se mogu preneti i vrste *M. caprae*, *M. microti* i *M.*

pinnipedii. *M. caprae* spada u široko rasprostranjene vrste MTK u Evropi i odgovoran je za 13-31% slučajeva humane TB, koja se na čoveka prenosi usled direktnog kontakta sa inficiranim životinjama, najčešće kozama i govedima (Perez-Lago i sar. 2014). Rezervoar *M. caprae* mogu biti i divlje životinje, pa je tako zabeležen prvi slučaj infekcije kamile u zoološkom vrtu u Sloveniji pre nekoliko godina (Pate i sar. 2006). *M. caprae* tipično je prisutan u ruralnim sredinama (Prodinger i sar. 2005). Imajući u vidu da je Srbija većim delom upravo ruralna zemlja, prisustvo ove vrste u populaciji naše zemlje bi moglo biti očekivano. Ipak, nijedan izolat iz analizirane MDR kolekcije, kao ni iz kolekcije sojeva MTK osetljivih na ATL, nije identifikovan kao *M. caprae*. *M. microti* spada u retko izolovane vrste MTK iz kliničkih uzoraka i najčešće dovodi do nastanka TB kod imunokompromitovanih osoba (Xavier i sar. 2007). Infekcije *M. microti* u Evropi do sada su zabeležene samo kod životinja. U Švajcarskoj je ova vrsta MTK detektovana u uzorcima dve divlje svinje (Schöning i sar. 2013), dok je u centralnoj Francuskoj zabeležen jedan slučaj kožne mikobakterioze mačke izazvane *M. microti* (Laprie i sar. 2013). Glavni rezervoar *M. microti* su poljski miševi i opšte prihvaćen stav je da do transmisije ove vrste na čoveka dolazi najčešće usled kontakta sa poljskim miševima i mačkama (van Soolingen i sar. 1998; Kipar i sar. 2014), što je posebno značajno s obzirom na kosmopolitsku distribuciju ovih životinjskih vrsta. Vrsta *M. pinnipedii* takođe se može preneti kao zoonoza. Međutim, slučajevi humane TB izazvane ovom vrstom MTK do sada su dokazani samo kod radnika zooloških vrtova koji su bili u bliskom kontaktu sa inficiranim fokama i morskim lavovima (Kiers i sar. 2008). Prema tome, odsustvo vrsta *M. microti* i *M. pinnipedii* u kolekcijama sojeva MTK obuhvaćenih ovim istraživanjem je bio očekivan rezultat. Transmisija četiri poslednje identifikovane vrste MTK, *M. orygis*, *M. suricattae*, *M. mungi* i bacila šimpanzi, sa životinja na ljude još uvek nije pouzdano dokazana.

Sumirano, rezultati ovog istraživanja pokazuju da je jedina značajna vrsta MTK koja izaziva TB i MDR TB u Srbiji vrsta *M. tuberculosis*. Bez obzira na reprezentativne kolekcije ispitivanih sojeva MTK, jasno je da ovakav rezultat ne isključuje mogućnost sporadičnog pojavljivanja vrsta MTK koje su primarno patogeni životinja kao izazivača TB u našoj zemlji. Ipak, sveukupni rezultati ovog istraživanja pokazali su da TB kao zoonoza u Srbiji nema značaja.

5.2. Filogenetska struktura MDR sojeva MTB u Srbiji

Sledeći segment našeg istraživanja obuhvatio je ispitivanje filogenetske strukture MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji. Jedna od prvih evolutivnih rekonstrukcija populacione strukture MTK bila je zasnovana na podeli ovog kompleksa u modernu i ancestralnu grupu, na osnovu prisustva delecije TbD1 (Brosch i sar. 2002). Sojevi MTK sa TbD1 delecijom definisani su kao moderni sojevi, dok su sojevi bez ove delecije grupisani u ancestralnu, odnosno grupu koja se izdvojila pre moderne grupe. Zahvaljujući primeni NGS, danas znamo da MTK obuhvata sedam filogenetskih linija koje su adaptirane na život u čoveku, pri čemu linije 2, 3 i 4 (sa TbD1 delecijom) predstavljaju moderne linije. Rezultatima brojnih studija pokazano je da linije MTK adaptirane na čoveka imaju filogeografsku populacionu strukturu, odnosno da su različite linije udružene sa različitim geografskim područjima (Hirsh i sar. 2004; Gagneux i sar. 2006 b; Filliol i sar. 2006; Hershberg i sar. 2008; Wirth i sar. 2008), pri čemu su linije 2 (istočno-azijska) i 4 (evro-američka) geografski najrasprostranjenije. Linija 2 je dominantno prisutna u istočnoj Aziji, ali takođe i u centralnoj Aziji, Rusiji i južnoj Africi, dok se linija 4 detektuje u Aziji, Evropi, Africi i Americi. Evro-američka linija je evolutivno najmlađa i ujedno najheterogenija moderna linija MTB, s obzirom da obuhvata 11 različitih podlinija, od kojih je svaka definisana određenom delecijom velikih sekvenci (Gagneux i sar. 2006 b). Spoligoprofil evro-američke linije karakteriše odsustvo spejsera 33-36 u DR lokusu, a na osnovu specifičnih spoligoprofila ova linija podeljena je na T, Haarlem, LAM, S, X, i Ural linije, koje se dalje dele u 36 podlinija (Rindi i sar. 2012). Linije 1 (indo-okeanska) i 3 (istočno-afričko-indijska) su prostorno ograničene na istočnu Afriku, centralnu, južnu i jugoistočnu Aziju. Linije 5 i 6 su poznate i kao *M. africanum* zapadnoafrička linija 1 i 2 i prisutne su skoro isključivo u zapadnoj Africi i kod imigranata iz ovog područja (de Jong i sar. 2010), dok je linija 7 dokazana samo u Etiopiji i imigranata iz ovog područja (Firdessa i sar. 2013).

Iako je MTK dugo smatran visokoklonalnim kompleksom, koji karakteriše nizak stepen genskog diverziteta, ovaj stav je u značajnoj meri promenjen tokom poslednjih nekoliko godina. Zahvaljujući rezultatima brojnih eksperimentalnih i epidemioloških studija, danas znamo da su sojevi MTK u velikoj meri fenotipski različiti, odnosno da se glavne filogenetske linije i njihove podlinije u velikoj meri razlikuju na fenotipskom nivou (Coscolla i Gagneux, 2014). Iako su rezultati studija koje su se bavile povezanošću

filogenetskih linija sa kliničkim oblicima TB donekle nekonzistentni, rezultati studija koje su se bavile drugim aspektima virulencije nedvosmisleno ukazuju da su moderne linije MTK generalno virulentnije od ancestralnih i takođe uspešnije na globalnom nivou kao izazivači TB, odnosno MDR TB. Tako su, na primer, linije 2 i 4 virulentnije od linija 1 i 6 u pogledu imunogenosti i sposobnosti transmisije, dok linije 5 i 7 imaju najmanju virulenciju. Takođe, mnogi autori prepoznali su Beijing genotip linije 2 kao vodeći preteći genotip MTK današnjice, posebno kada je u pitanju MDR TB (Parwati i sar. 2010; Hanekom i sar. 2011). Dve ključne karakteristike Beijing genotipa, koje se dovode u vezu sa njegovom gotovo eksplozivnom ekspanzijom, su smanjena efikasnost BCG vakcine u odnosu na ove sojeve i povećana učestalost rezistencije na ATL odnosno multirezistencije. Smatra se da je Beijing genotip, barem u izvesnoj meri, evolutivni odgovor MTK na terapiju ATL (Borrell i Gagneux 2009) i primenu BCG vakcine (Abebe i Bjune 2006). Predominacija određenih linija MTK i porast njihove virulencije, međutim, dovodi se u vezu i sa promenama u humanoј demografiji, odnosno dramatičnim porastom veličine ljudske populacije kroz istoriju, od Neolitskog perioda preko Industrijske revolucije do danas (Comas i Gagneux 2011; Comas i sar. 2013; Bos i sar. 2014).

Rezultatima naše studije pokazano je da MDR sojevi MTB izolovani u Srbiji tokom proteklih šest godina pripadaju filogenetskim linijama TUR, Clade 1, Haarlem, Beijing, S i Ural. Više od jedne trećine svih MDR sojeva iz naše kolekcije pripadaju genotipu TUR, dok se učestalost ostalih genotipova nalazi u opsegu od 20,3% (Clade 1) do 1,9% (Ural). Zastupljenost Beijing i Haarlem genotipova, koji se zajedno sa LAM linijom smatraju ključnim među MDR sojevima MTB, u kolekciji MDR sojeva izolovanih u Srbiji iznosi 16,7%, odnosno 17,6%, dok nijedan izolat iz naše studijske populacije sojeva ne pripada LAM genotipu.

5.2.1. TUR genotip MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji

Na osnovu rezultata sekvenciranja genoma, čak 36,1% analiziranih MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji tokom proteklih šest godina svrstano je u TUR liniju. Ovako visoka učestalost TUR linije nije zabeležena ni u jednoj studiji do sada, pa čak ni u studijama iz Turske, iako je TUR filogeografski specifičan upravo za ovu državu i u njoj ima najvišu prevalenciju u populaciji sojeva MTB (Kisa i sar. 2012).

TUR genotip prvi put je opisan u studiji Zozio i saradnika (2005) u kojoj je, primenom spoligotipizacije, 21% sojeva MTK izolovanih na području Turske imalo odsustvo spejsera na pozicijama 21-24, 26-27 i 33-36. Zbog sličnosti sa LAM linijom i činjenice da je prvi put detektovan u Turskoj, ovaj genotip nazvan je LAM7-TUR i smatran je podlinijom linije LAM (Zozio i sar. 2005). Retrospektivnom analizom studija objavljenih u 2005. godini, a koje su zajedno obuhvatile 374 izolata MTK iz Turske, utvrđeno je da je godinu dana pre zvaničnog definisanja LAM7-TUR, 14,4% izolata MTB iz ove države imalo spoligoprofil koji odgovara ovom genotipu, odnosno da je LAM7-TUR predstavljao drugi genotip po učestalosti u Turskoj (Gencer i sar. 2005). Dve godine kasnije, objavljena je još jedna studija iz Turske, u kojoj je LAM7-TUR identifikovan kao najučestaliji genotip MTB u ovoj državi sa 22,5% (Durmaz i sar. 2007). U ispitivanoj populaciji MTB izolata iz Ankare LAM7-TUR profil ustanovljen je kod 7,9% od ispitivanih 114 izolata (Kisa i sar. 2007), a u kolekciji MTB sojeva iz istočne Turske kod 8,6% izolata (Otlu i sar. 2009). Tek 2010. godine LAM7-TUR je na osnovu SNP profila izdvojen iz LAM linije sensu stricto kao posebna linija, filogenetski specifična za Tursku, a koja deli SNP ligC (809 tgg (trp)/ttg (leu)) sa T3-Osaka linijom (Abadia i sar. 2010). Konačno, 2012. godine Kisa i saradnici u svojoj studiji, u kojoj je 20% izolata MTB iz Turske identifikovano kao LAM7-TUR, dodeljuju ovom genotipu naziv TUR, odnosno „Turska“ linija.

Između 2005. i 2010. godine, LAM7-TUR se, osim u studijama iz Turske, pominje i u studiji iz Bugarske, u kojoj je 5,4% izolata MTB iz ove države pripadalo LAM7-TUR liniji (Valcheva i sar. 2008). Autori ove studije navode da LAM7-TUR genotipa ima takođe u Grčkoj i Rumuniji, ali bez objavljivanja izvora podataka (Valcheva i sar. 2008). TUR linija se pominje i u studijama iz Finske (tri izolata MTB osetljiva na ATL) (Smit i sar. 2013), severozapadne Etiopije (2% izolata MTB, od čega dva rezistentna na I, a jedan na S) (Tessema i sar. 2013), Saudijske Arabije (1,8% izolata MTB osetljivih na ATL) (Al-Hajoj i sar. 2014), Bagdada (0,7% izolata MTB osetljivih na ATL) (Ali i sar. 2014), Italije (0,1% sojeva MTB osetljivih na ATL, izolovani kod tri strana državljanina) (Fallico i sar. 2014), Sicilije (2,8% osetljivih sojeva MTB, samo dva izolata rezistentna na I) (Bonura i sar. 2014) i Iraka (4,2% MDR sojeva MTB) (Ahmed i sar. 2014). Prema podacima SITVIT baze spoligotipova, zastupljenost TUR linije u Severnoj Americi, južnoj Africi, Australiji i Aziji iznosi samo 0,53%. Međutim,

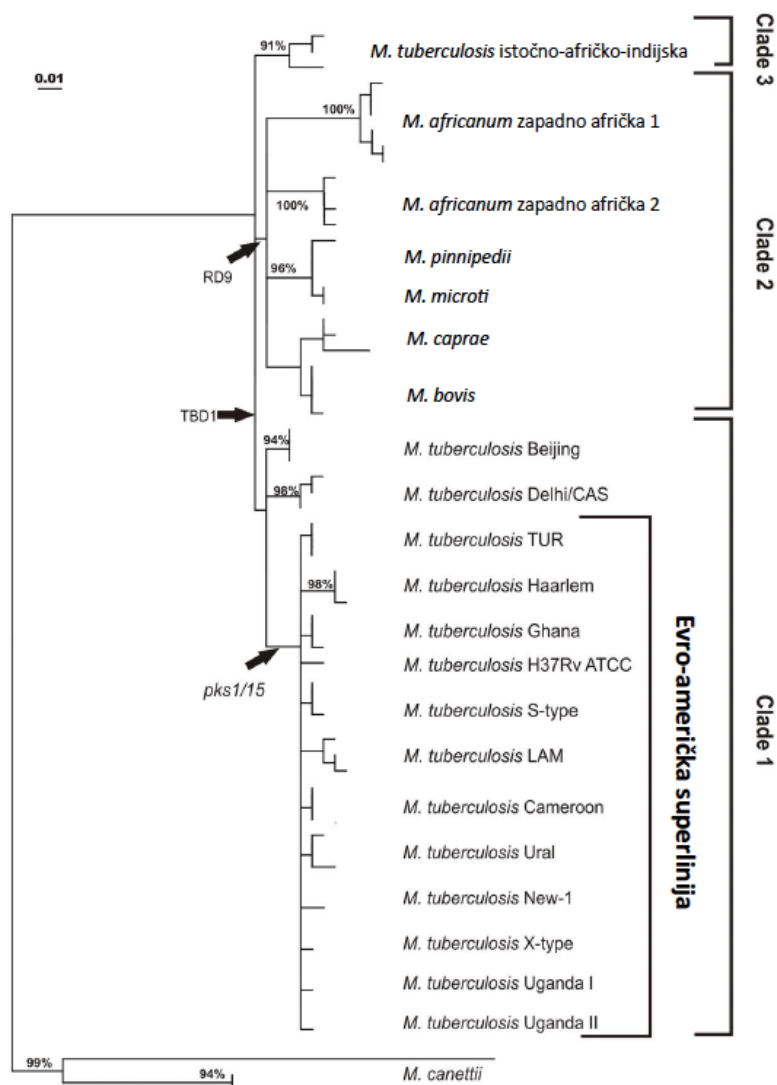
učestalost u istočnoj Evropi porasla je od 2006. do 2014. godine sa 2% na 6%. Iako do sada nije utvrđena posebna povezanost između multiple rezistencije i ovog genotipa, prema poslednjem izveštaju autora SITVIT, u toku je ekspanzija TUR linije iz Turske u ostale države istočne Evrope (Couvin i Rastogi 2014).

Prema poslednjim podacima, među MDR sojevima izolovanim u Turskoj, TUR linija se sa 12,5%, nalazi na trećem mestu po učestalosti, posle T (30%) i Haarlem (20%), ali pre Beijing (10%) i LAM (7,5%) linija (Kisa i sar. 2012). Učestalost izolovanja MDR sojeva MTB sa TUR profilom u Srbiji je čak tri puta veća nego u Turskoj i svi lokalni XDR sojevi pripadaju TUR liniji, na osnovu čega bi se moglo postaviti pitanje o trenutno važećoj geografskoj specifičnosti ove linije za Tursku. Ipak, u ispitivanoj kolekciji MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji tokom proteklih šest godina nije dokazana statistički značajna povezanost između TUR genotipa i pola, državljanstva, izbegličkog statusa, dobne grupe, regiona, istorije prethodnog lečenja, alkoholizma, dijabetesa, kardiovaskularnih oboljenja, hronične opstruktivne bolesti pluća i prisustva kaverne u plućima obolelih od MDR TB. Međutim, utvrđena je visoko značajna udruženost TUR genotipa i shizofrenije ($p=0,000$), kao i TUR genotipa i hospitalizacije u Specijalnoj bolnici za plućne bolesti „Budislav Babić“ Bela Crkva ($p=0,001$). Analizom sociodemografskih karakteristika pacijenata koji su bili inficirani TUR sojevima MTB, utvrđeno je da su dva pacijenta državljani Republike Srpske, odnosno da su u Srbiju došli sa teritorije Bosne i Hercegovine (BiH). Jedan od ova dva pacijenta lečen je tokom 2007. godine od MDR TB u Specijalnoj bolnici za plućne bolesti „Budislav Babić“ Bela Crkva u Srbiji. Imajući u vidu trenutno važeću klasifikaciju prema kojoj je TUR linija autohtona turska linija MTB, o poreklu TUR genotipa u Srbiji moglo bi se spekulisati na sledeći način. S obzirom da su Turska i BiH kulturološki i migraciono snažno povezane, postoji mogućnost da je do unosa TUR soja u Srbiju iz Turske došlo preko BiH. Ova pretpostavka za sada ostaje isključivo na nivou spekulacije, s obzirom da našim istraživanjem nisu bili obuhvaćeni MDR sojevi MTK izolovani u Srbiji pre 2008. godine, kao i da nije poznata filogeografska populaciona struktura MTK sojeva izolovanih u BiH.

5.2.2. Clade 1 grupa genotipova MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji

Ukupno 20,3% MDR sojeva MTB u našoj studiji klasifikovano je na osnovu NGS

rezultata u takozvanu Clade 1 grupu velike evro-američke linije MTB. Clade 1 grupu definisali su Homolka i saradnici (2012), na osnovu rezultata *de novo* sekvenciranja 26 gena u genomima 68 kliničkih izolata MTB, koji su izabrani kao predstavnici šest glavnih linija MTK iz MIRU-VNTR*plus* baze genotipova, i evaluacije najvarijabilnijih 11 gena u populaciji sojeva izolovanih tokom jedne godine u Hamburgu, Nemačka. Na osnovu rezultata ove studije uspostavljen je dijagnostički algoritam koji obuhvata analizu sekvenci samo pet gena i omogućava klasifikaciju kliničkih izolata MTK u 17 filogenetskih linija na jednostavan, jeftin i visoko specifičan način. Od ukupno 161 identifikovanog SNP, autori opisuju 59 kao specifične za pojedine genotipove, a 12 kao specifične za veće grupe, kao što je na primer evro-američka. Na osnovu detektovanih polimorfizama konstruisano je stablo maksimalne verovatnoće, na kome su jasno diferencirane tri grupe MTK sojeva: Clade 1, koja obuhvata klasične sojeve MTB, Clade 2, koja obuhvata *M. africanum* i životinjske izolate i Clade 3, koja obuhvata istočno-afričko-indijske sojeve MTB (Slika 28). Nakon analize 11 najvarijabilnijih gena u kolekciji MTK sojeva izolovanih iz uzoraka pacijenata iz Hamburga, utvrđena je još heterogenija populacija bacila, s tim što pojedini sojevi nisu mogli biti klasifikovani ni u jednu liniju, zbog čega je njihova pripadnost evro-američkoj liniji potvrđena samo prisustvom delecije pks1/15.



Slika 28. Stablo maksimalne verovatnoće konstruisano na osnovu rezultata sekvenciranja 26 gena u genomima referentne kolekcije sojeva *M. tuberculosis* kompleksa. Preuzeto iz Homolka i sar. 2012.

De novo sekvenciranjem 11 gena u kolekciji sojeva iz Hamburga, Homolka i saradnici (2012) jasno ukazuju na nedostatke prethodnih studija koje su se bavile SNP analizama populacije MTK, a u kojima su analizirani samo poznati genotipovi referentnih kolekcija sojeva MTK. Činjenica da su autori ove studije tek nakon SNP analiza kliničkih izolata identifikovali novi genotip, označen kao Hamburg, govori u prilog visokom diverzitetu i složenoj populacionoj strukturi evro-američke linije. Potreba za analizom većeg broja kliničkih sojeva u cilju precizne diferencijacije genotipova dokazana je i rezultatima naše studije. Približno petina ispitivanih MDR sojeva MTB nije mogla biti definisana do nivoa podlinije, odnosno pojedinačnih genotipova Clade 1

grupe. U analizi SNP lokalne kolekcije MDR sojeva MTB korišćena je referentna kolekcija sojeva MTK laboratorije Molecular Mycobacteriology Group, Forschungszentrum Borstel, koja obuhvata i kliničke izolate. Na osnovu poređenja sa ovom kolekcijom, četiri MDR soja koji su primenom klasičnih tehnika genotipizacije identifikovani kao Haarlem, Uganda1, Ugandal like i nedefinisan genotip, svrstani su u Clade 1 grupu. Takođe, svi MDR MTB sojevi, koji su na osnovu spoligo i MIRU-VNTR profila okarakterisani kao Belgrade H37Rv, na osnovu NGS analiza svrstani su u Clade 1 grupu (Slika 20). Imajući u vidu rezultate studije Homolka i saradnika (2012) kao i rezultate našeg istraživanja, jasno je da dalja identifikacija ovih izolata do nivoa pojedinačnih genotipova zahteva dalja ispitivanja u okviru veće i heterogenije grupe kliničkih izolata MTK.

5.2.3. Haarlem genotip MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji

Učestalost sojeva Haarlem linije koja je ustanovljena u ispitivanom uzorku MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji iznosi 17,6%. Haarlem genotip prvi put je identifikovan u Holandiji (Kremer i sar. 1999), a trenutno predstavlja jedan od najheterogenijih i najrasprostranjenijih genotipova evro-američke linije MTK. Haarlem linija smatra se prototipom evro-američke linije, obuhvata približno 25% kompletne populacije MTB u Evropi, a zajedno sa LAM i T linijama predstavlja dominantnu liniju MTB u evropskim zemljama (Couvin i Rastogi 2014). Iako potiče sa severa Evrope, sojevi MTB Haarlem genotipa su se u velikoj meri proširili i na ostale delove sveta, pa tako njihova učestalost u, na primer, Južnoj Americi iznosi 28,9% (Ritacco i sar. 2012). Prema rezultatima poslednje objavljene meta-analize o prevalenciji Haarlem linije na globalnom nivou, najmanja prevalencija ovog genotipa iznosila je 6,42% u 2010. godini, a najviša 20,6% u 2012. godini (Ramazanzadeh i sar. 2015).

Značaj Haarlem genotipa u velikoj meri proizilazi iz dokazane udruženosti ovog genotipa sa rezistencijom i multiplom rezistencijom na ATL. Ubedljivo najvišu učestalost rezistentnih MTB sojeva Haarlem linije ima Mađarska, gde čak 66,2% sojeva MTB rezistentnih na najmanje jedan ATL pripada upravo ovom genotipu (Ködmön i sar. 2006). U severozapadnoj Rusiji rezistentni sojevi MTB Haarlem genotipa čine 14,3% ispitivane populacije sojeva, što je neuobičajen nalaz jer u svim drugim delovima Rusije postoji jasna predominacija Beijing genotipa među rezistentnim sojevima MTB (Mokrousov i sar. 2012). Udruženost Haarlem genotipa sa MDR profilom dokazana je,

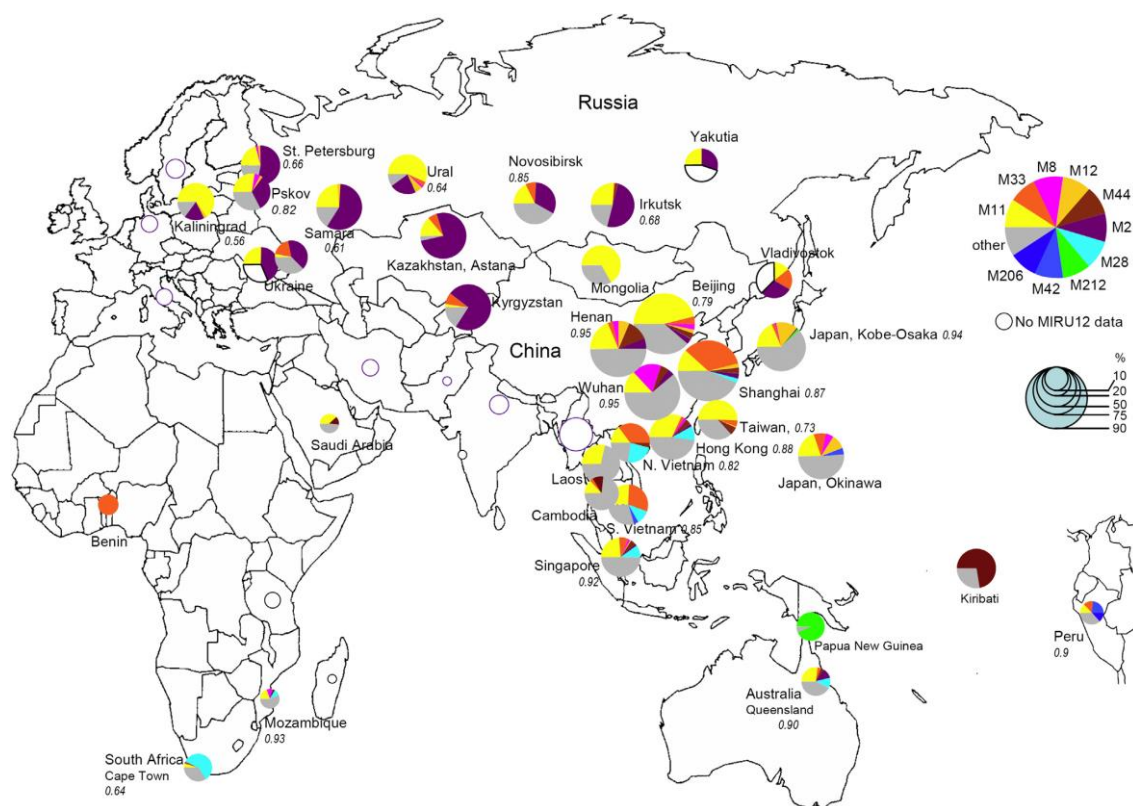
na primer, u Turskoj (24,2% rezistentnih oblika TB i 20% MDR-TB) (Kisa i sar. 2012), Grčkoj (24,5% MDR TB) (Rovina i sar. 2011), Italiji (28,6% MDR TB) (Garzelli i sar. 2010), Iraku (20% MDR TB) (Merza i sar. 2011) i Tajvanu (21% MDR TB) (Hsu i sar. 2010). Pokazana je i veza Haarlem genotipa sa XDR profilom rezistencije. Tako su, na primer, XDR sojevi MTB Haarlem linije veoma značajni izazivači XDR TB u Peru (Caceres i sar. 2014). Nasuprot ovakvim rezultatima, ispitivanjem filogenetske strukture MTB sojeva u nekim zemljama nije dokazana povezanost Haarlem genotipa i rezistencije na ATL. Tako je, na primer, učestalost izolovanja MTB sojeva Haarlem linije na Siciliji porasla sa 16,3% od perioda 1994-2000. godina na 26,5%, koliko je iznosila u periodu 2004-2012. godina, ali nijedan MDR soj MTB na ovom području nije identifikovan kao Haarlem (Bonura i sar. 2014). Slična situacija je i u Finskoj, u kojoj 22,6% sojeva MTB osetljivih na ATL pripada Haarlem liniji, ali nijedan MDR soj nije identifikovan kao ovaj genotip (Smit i sar. 2013). Učestalost MDR sojeva Haarlem linije takođe je izrazito niska i u Kini i iznosi samo 0,8% (Ramazanzadeh i sar. 2015). Imajući u vidu ustanovljenu učestalost MDR sojeva MTB Haarlem linije od 17,6% u Srbiji, jasno je da su rezultati našeg istraživanja u skladu sa rezultatima studija u kojima je pokazana veza između Haarlem genotipa i MDR profila rezistencije. Učestalost MDR sojeva MTB Haarlem genotipa u našoj zemlji odgovara prosečnoj učestalosti ovog genotipa među MDR sojevima MTB u Evropi, čija procenjena vrednost iznosi 17,4% (Jagielski i sar. 2010). Haarlem genotip se među MDR izolatima u Srbiji nalazi na trećem mestu po učestalosti i značajno je ređi od predominantne TUR linije. Međutim, imajući u vidu dokazanu povezanost Haarlem genotipa sa MDR profilom, samo prisustvo MTB sojeva Haarlem genotipa u našoj populaciji predstavlja ozbiljnu pretnju za održavanje niskih stopa pokazatelja oboljevanja od MDR TB u Srbiji.

5.2.4. Beijing genotip MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji

Na osnovu rezultata NGS, od 108 analiziranih MDR sojeva MTB iz naše kolekcije, 16,7% klasifikovano je kao Beijing genotip. Od ukupno šest filogenetskih linija koje su identifikovane u Srbiji, Beijing se po učestalosti nalazi na četvrtom mestu. Beijing genotip prvi put je opisan 1995. godine na osnovu rezultata spoligotipizacije i RFLP IS6110 genotipizacije sojeva MTK izolovanih u periodu 1992-1994. godina u Kini i Mongoliji (van Soolingen i sar. 1995). Naziv Beijing ovaj genotip je dobio po Peking,

odnosno na osnovu pretpostavke da potiče iz ovog grada i da se odatle proširio na ostale delove sveta. Danas se Beijing smatra najuspešnijim genotipom istočno-azijske linije, ali i najuspešnijim klonom MTK uopšte, s obzirom da je odgovoran za najveći broj epidemija TB na globalnom nivou. Značaju Beijing genotipa dodatno doprinosi činjenica da je, u poređenju sa ostalim linijama MTK, značajno češće udružen sa multiplom rezistencijom na ATL (Parwati i sar. 2010; Hanekom i sar. 2011).

Spoligoprofil Beijing linije karakteriše prisustvo prva 34 i odsustvo poslednjih devet od ukupno 43 spejsera. Na osnovu MIRU-VNTR profila, Beijing linija obuhvata čak 50 različitih MIRU-VNTR tipova, a najvišu prevalenciju (do 90%) i diverzitet (0,80-0,95) ima u severnoj Kini (Slika 29), zbog čega je ova regija dugo smatrana mestom porekla Beijing linije (Mokrousov 2015). U poređenju sa ostalim filogenetskim linijama MTK za koje je ustanovljen određeni stepen genetičke heterogenosti u zavisnosti od geografskog porekla, Beijing sojevi iz različitih geografskih područja su visoko konzervirani (Mokrousov 2015).



Slika 29. Globalna distribucija 10 glavnih MIRU tipova Beijing linije. Prazni krugovi

predstavljaju procenat Beijing genotipa u područjima za koje nema podataka o MIRU-VNTR genotipizaciji. Veličina krugova je proporcionalna procentu Beijing sojeva u lokalnim populacijama *M. tuberculosis*. Brojevi u krugovima predstavljaju Hunter Gaston (HGI) vrednosti diverziteta lokalnih populacija Beijing genotipa na osnovu rezultata MIRU-VNTR genotipizacije za 12 lokusa. Preuzeto iz Mokrousov 2015.

Postoji čitav niz argumenata i objašnjenja za opšte prihvaćen stav da je Beijing najznačajniji preteći genotip MTK na globalnom nivou. Jedno od objašnjenja proisteklo je iz rezultata analize prisustva Beijing genotipa u uzorcima autohtonog stanovništva obolelog od TB u razvijenim zapadnoevropskim zemljama. Pokazan je porast učestalosti izolovanja MTB sojeva Beijing linije u ovim subpopulacijama, što je dokaz agresivnosti i velike transmisibilnosti Beijing MTB sojeva. Pored toga, ustanovljeno je i da je mlađa životna dob faktor rizika za aktivnu transmisiju Beijing linije (Parwati i sar. 2010). Drugi zanimljiv argument proizilazi iz rezultata analize genotipizacije sojeva MTB u uzorcima obolelih od TB u Republici Južnoj Africi, koji su decenijama čuvani u parafinu. Pokazano je da su MTB sojevi Beijing genotipa bili veoma retki na ovom području u periodu 1930-1965. godina, ali da je u periodu 1995-2005. godina došlo do značajnog i brzog porasta njihove učestalosti. Tako je, na primer, učestalost kod dece porasla sa 13% u 2000. na 33% u 2003. godini (Cowley i sar. 2008). Dobar argument su i rezultati do sada najopsežnijeg ispitivanja evolucije i globalne ekspanzije Beijing linije, koji su objavljeni ove godine (Merker i sar. 2015). Istraživanjem je obuhvaćeno 4.987 MTB sojeva Beijing genotipa iz 99 država, od kojih je 110 sekvencirano primenom NGS. Na osnovu rezultata ove studije, zaključeno je da se Beijing linija pojavila u regiji koja je obuhvatala istočnu Kinu, Koreju i Japan pre približno 6.600 godina, odakle se širila na ostatak sveta u nekoliko talasa. Proširenje veličine populacije Beijing bacila TB bilo je najveće na početku 19. veka, odnosno u periodu industrijalizacije i urbanizacije, dok poslednji talas širenja predstavlja epidemijska ekspanzija dva MDR klona Beijing linije u centralnoj Aziji i Rusiji. Od ova dva Beijing klona koja su se pojavila tokom ranog Srednjeg veka, nastale su evro-ruska (CC2) i pacifička (CC5) podlinija, čija ekspanzija je počela zajedno sa centralno-azijskom (CC1) podlinijom pre oko 200 godina, odnosno u vreme prvog talasa migracija kineskog stanovništva u ostale delove sveta. Drugi porast populacije Beijing bacila desio se tokom Prvog svetskog rata kada je zabeležena najviša stopa mortaliteta od TB

na globalnom nivou ikada. Nakon uvođenja antibiotika u terapiju TB, dolazi do privremenog smanjenja veličine Beijing populacije MTB sojeva, koje zatim prekida pojava HIV epidemije i multiple rezistencije na ATL. Ekspanzija dve Beijing podlinije koje su najčešće udružene sa MDR genotipom (centralno-azijska i evro-ruska) dešava se pre početka ere antibiotika, što ukazuje da visoka prevalencija rezistencije na ATL u ovim podlinijama nije primarni uzrok njihove ekspanzije, već posledica primene neodgovarajućih terapijskih režima u lečenju TB izazvane Beijing sojevima. Ove dve MDR podgrane počele su da se šire epidemijski pre samo 20-30 godina preko Evroazije, što se poklapa sa urušavanjem javno zdravstvenog sistema u nekadašnjem Sovjetskom Savezu (Merker i sar. 2015).

Učestalost MDR sojeva MTB koji pripadaju Beijing liniji u Srbiji znatno je ispod učestalosti u azijskim zemljama, kao što su Kina, Južna Koreja, Hong Kong i Tajland (50%) (Glynn i sar. 2002), Japan (62%) (Murase i sar. 2010), Tajvan (50%) (Chang i sar. 2011) i Indija (41%) (Chatterjee i sar. 2010). U evroazijskim zemljama bivšeg Sovjetskog Saveza postoji potpuna predominacija Beijing genotipa među rezistentnim i MDR sojevima MTB, tako da je učestalost ovih sojeva daleko iznad vrednosti koju smo mi ustanovili za MDR sojeve izolovane u Srbiji. Tako je, na primer, učestalost MDR sojeva MTB Beijing genotipa u Gruziji 78% (Niemann i sar. 2010), a u Rusiji 67% (Drobniewski i sar. 2005; Casali i sar. 2014). U poređenju sa evropskim zemljama, učestalosti Beijing genotipa u našoj državi niža je od učestalosti u Grčkoj (34%) (Rovina i sar. 2011). Ipak, u poređenju sa velikim brojem evropskih zemalja, znatno je viša. Tako je, na primer, učestalost ovih sojeva u Švedskoj 13% (Ghebremichael i sar. 2010), Poljskoj 9% (Jagielski i sar. 2010), Španiji 7,7% (Gavin i sar. 2012), Bugarskoj 3,2% (Panaiotov i sar. 2013), a u Finskoj i Danskoj 1% (Ghebremichael i sar. 2010).

Imajući u vidu globalni značaj Beijing linije, veliku sposobnost transmisije u poređenju sa drugim genotipovima, kao i dokumentovano paralelno prisustvo Beijing linije u populacijama imigranata iz Azije i istočne Evrope i u autohtonim populacijama evropskih država, samo prisustvo MDR sojeva MTB Beijing genotipa u populaciji u Srbiji ima veliki značaj. Iako ukupan broj sojeva obuhvaćen našim istraživanjem nije veliki, ispitivan uzorak sojeva je potpuno reprezentativan i obuhvata sve MDR sojeve MTB izolovane tokom perioda od šest godina. U tom smislu, ustanovljena učestalost MDR sojeva MTB Beijing genotipa od 16,7% može se smatrati visokom i ovaj genotip

je jasno preteći genotip MDR sojeva MTB u Srbiji.

5.2.5. S genotip MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji

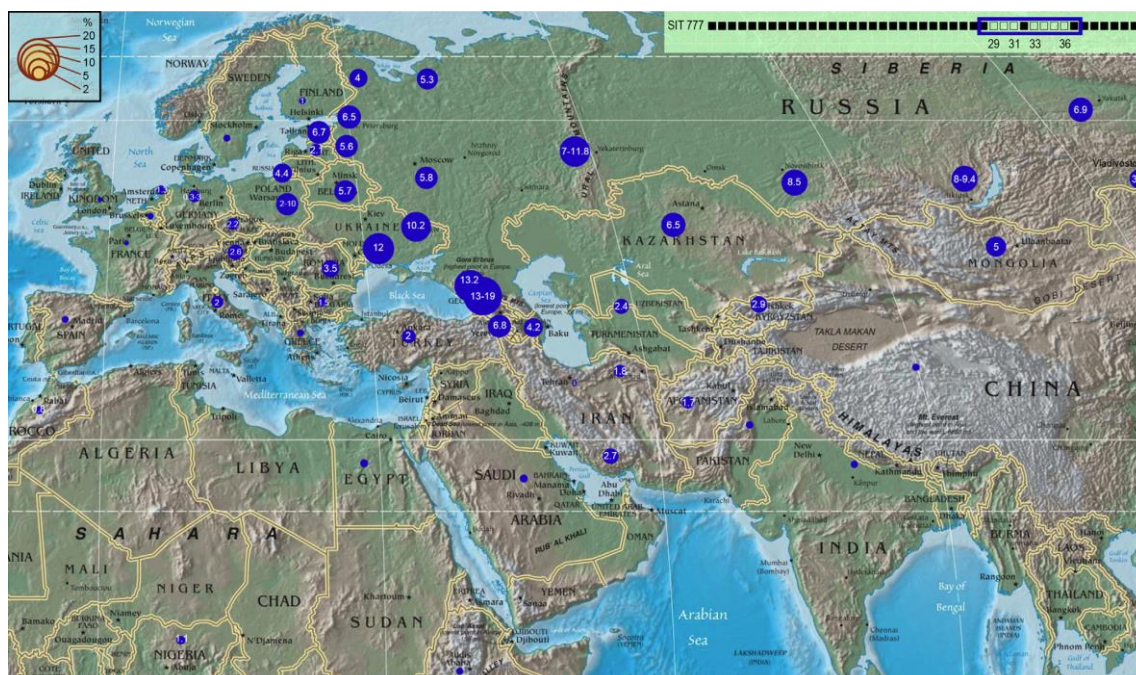
Od ukupno 108 lokalnih MDR izolata MTB, S liniji pripada osam odnosno 7,4% sojeva, pri čemu su četiri soja ponovljeni izolati iz uzoraka dva pacijenta. U poređenju sa brojem izolata koji pripadaju ostalim identifikovanim filogenetskim linijama MDR sojeva MTB u Srbiji, S linija se nalazi na petom, odnosno pretposlednjem mestu. Prema podacima SITVIT baze genotipova, MTB sojevi S genotipa su u niskom procentu zastupljeni u južnom delu Evrope, južnoj i severnoj Africi (Couvin i Rastogi 2014). Za razliku od LAM i T podlinija evro-američke linije MTB, između S genotipa i multiple rezistencije na ATL nije dokazana značajna povezanost. Tako prosečna učestalost ove linije kada su u pitanju evropski MDR sojevi iznosi samo 4,35% (Jagielski i sar. 2010), dok u južnoj Africi 9,8% svih MDR sojeva pripada S liniji (Said i sar. 2012). Da S linija nije povezana sa multiplom rezistencijom na ATL potvrđuje studija iz Bugarske, u kojoj 7/133 (5,3%) svih izolata MTB pripada S liniji, od čega je samo jedan rezistentan na R (Valcheva i sar. 2008). Takođe, na Siciliji 8,5% izolata MTB pripada S genotipu, od čega nijedan nije MDR (Bonura i sar. 2014). U studiji Sougakoff-a (2011), koja se bavi globalnom ekspanzijom MDR i XDR sojeva MTB, autor navodi da je S linija u Francuskoj na poslednjem mestu po učestalosti među MDR sojevima, posle Beijing, Ghana, T i LAM linija. MDR sojevi MTB S genotipa takođe su veoma retki i u Argentini i Španiji, gde je ustanovljena njihova učestalost od svega 0,7% odnosno 0,5% (Ritacco i sar. 2012). U Finskoj je učestalost MDR sojeva koji pripadaju S genotipu nešto viša, ali ipak niža od učestalosti u Srbiji, i iznosi 5,9% (Smith i sar. 2013).

Sumirano, u studijskoj kolekciji MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji S genotip nije zastupljen sa visokom učestalošću, ali je ipak u pitanju vrednost koja je iznad prosečne učestalosti izolovanja ovakvih sojeva u Evropi. Pored toga, treba imati u vidu da su MDR izolati MTB S genotipa pet pacijenata grupisani u jedan klaster (S klaster 5), što je jasan dokaz da ovaj genotip ipak ima uticaj na aktivnu transmisiju MDR TB u Srbiji.

5.2.6. Ural genotip MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji

Filogenetska linija Ural dobila je naziv po planinskom vencu Ural, regiji u kojoj je prvi put opisana u studiji Kovalev i saradnika 2005. godine. Ural genotip definisan je na

osnovu rezultata 12 MIRU-VNTR genotipizacije, a jedna kopija VNTR lokusa 26 smatra se specifičnim markerom ovog genotipa (Kovalev i sar. 2005). Na osnovu spoligoprofila, Ural genotip je u SITVIT bazi spoligotipova najpre klasifikovan kao podlinija Haarlem linije. S obzirom na to da nema Haarlem specifičan SNP, reklasifikovan je u posebnu familiju, koja pripada velikoj evro-američkoj liniji MTB (Abadia i sar. 2010). Iako su MTB sojevi Ural linije prvi put identifikovani u kliničkim uzorcima iz uralske regije, rezultati kasnijih studija pokazali su da je prevalencija sojeva ove linije najviša u južnoj Ukrajini i Gruziji, gde iznosi i do 19% (Niemann i sar 2010; Mokrousov 2012). U severnoj i severoistočnoj regiji Crnog mora zabeležen je porast učestalosti izolovanja MTB sojeva Ural linije i danas se smatra da ove oblasti najverovatnije predstavljaju mesto porekla Ural genotipa (Mokrousov 2015). Prema dosadašnjim podacima, Ural genotip za sada se detektuje uglavnom u predelima centralne Evroazije, dok se u ostalim oblastima Ural sojevi detektuju vrlo retko i gotovo uvek kao pojedinačni, sporadični slučajevi (Slika 30) (Mokrousov 2015).



Slika 30. Geografska distribucija Ural linije u Evroaziji i susednim regijama. Brojevi u krugovima predstavljaju procenat *M. tuberculosis* sojeva koji pripadaju Ural genotipu od ukupnog broja sojeva *M. tuberculosis* u određenoj regiji. U gornjem desnom uglu nalazi se spoligoprofil Ural genotipa. Preuzeto iz Mokrousov 2015.

Interesantno je da se, prema mišljenju nekih autora, Ural linija dovodi u vezu sa TUR

linijom. Pokazano je da, uprkos različitim spoligoprofilima, u dendrogramima koji su konstruisani na osnovu rezultata 24 MIRU-VNTR genotipizacije u studijama iz Rusije i Kazahstana, Ural izolati formiraju odvojene grupe koje obuhvataju po jedan TUR izolat. Iako je za ova dva genotipa zajedničko jedino odsustvo spejsera na pozicijama 33-36 DR lokusa, što je generalno karakteristika svih evro-američkih linija MTK, nije isključena mogućnost da ova dva genotipa zapravo imaju zajedničkog pretka. Prema ovoj pretpostavci, od severne subpopulacije Ural/TUR ancestor, koji potiče iz okoline Crnog mora, nastao je Ural genotip, dok je od južne subpopulacije nastala takozvana proto-Ural/TUR familija, od koje se zatim odvojio TUR genotip (Mokrousov 2015).

Značajna udruženost Ural linije MTB sojeva sa rezistencijom na ATL nije dokazana ni u prvoj studiji u kojoj je ovaj genotip opisan (Kovalov i sar. 2005), kao ni u kasnijim studijama (Niemann i sar. 2010). Stoga ovaj genotip nije smatran pretećim u smislu rezistencije i sposobnosti transmisije, već nisko kontagioznim genotipom MTB. Ovakav stav u velikoj meri potvrđuje i geografska distribucija sojeva Ural genotipa, koja je uglavnom ograničena na mesto porekla, odnosno centralnu Evroaziju (Mokrousov 2015). Međutim, MDR Ural sojevi detektovani su u pojedinim delovima istočne Evrope, odnosno Moldaviji i zapadnoj Rusiji (Mokrousov 2015), ali takođe i na Siciliji (Bonura i sar. 2014). Iz tog razloga, prema nekim autorima, može se očekivati ekspanzija MDR Ural sojeva MTB i na ostale delove Evrope (Mokrousov 2015), što je na izvestan način pokazalo i naše istraživanje. Ural genotip se po učestalosti kao izazivač MDR TB u Srbiji nalazi na poslednjem mestu, sa samo dva izolata odnosno 1,9%. Oba izolata nalaze se u istom klasteru, a potiču od pacijenata koji su u porodičnom kontaktu. Pacijent koji je prvi bio inficiran Ural sojem bio je na privremenom radu u Rusiji. Iako nije bilo moguće utvrditi u kojoj oblasti Rusije je boravio, pretpostavljamo da je inficiran u Rusiji odnosno da je reč o importovanom Ural MDR soju MTB.

5.3. Karakteristike transmisije MDR sojeva MTB u Srbiji

Genotipizacija MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji omogućila je prvo detaljno sagledavanje transmisije MDR TB u našoj populaciji. Na osnovu rezultata klasičnih tehnika genotipizacije u kolekciji MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji definisano je ukupno 13 klastera u kojima je grupisano 75 (65,8%) MDR sojeva MTB, dok je stepen

grupisanja u klastere iznosio 54,4%. Primenom NGS analize ustanovljeno je grupisanje 72 (66,7%) MDR soja MTB u 11 klastera sa stepenom grupisanja u klastere od 56,5%. Iako cilj naše studije nije bila evaluacija primenljivosti klasičnih metoda genotipizacije i NGS u detekciji puteva transmisije MDR TB, deskriptivnim poređenjem dobijenih rezultata klasičnih tehnika genotipizacije i NGS (Tabela 17) možemo zaključiti da su slični. Ipak, imajući u vidu jasno dokazane prednosti genotipizacije zasnovane na analizi SNP (Roetzer i sar. 2013; Schürch i van Soolingen 2012; Drobniewski i sar. 2013), u ovom odeljku će karakteristike transmisije MDR TB biti tumačene primarno u kontekstu rezultata NGS.

Rezultati analize SNP, bez uzimanja u obzir epidemioloških veza, pokazali su da su dve trećine slučajeva MDR TB i čak 92,3% XDR slučajeva u Srbiji posledica skorašnje transmisije. Epidemiološke veze dokazane su u ukupno osam klastera, odnosno kod 52 od 68 (76,5%) pacijenata, čiji izolati su grupisani u klastere na osnovu NGS. Prema rezultatima sumirane analize molekularnih i epidemioloških podataka, odnosno formule za izračunavanje stepena grupisanja u klastere modifikovane za epidemiološke veze (Anderson i sar. 2014), dobijena proporcija slučajeva MDR TB koji su direktna posledica aktivne, skorašnje transmisije u Srbiji iznosi 40,7%. U pitanju je iznenađujuće visoka vrednost, s obzirom na to da su vrednosti incidencije i prevalencije MDR TB u Srbiji realno veoma niske. Poređenja radi, u Velikoj Britaniji u kojoj takođe postoji nisko opterećenje MDR TB, na ovaj način utvrđena proporcija slučajeva MDR TB koji su direktna posledica aktivne transmisije iznosi svega 8,5% (Anderson i sar. 2014).

Drugi veoma specifičan nalaz u našem istraživanju jeste potpuno dominantna uloga MDR sojeva MTB TUR genotipa u aktivnoj transmisiji MDR i XDR TB. Više od jedne polovine svih MDR sojeva svrstanih u klastere u našoj zemlji pripada TUR klasteru (37/72; 51,4%), u koji je takođe svrstano 10 od ukupno 11 XDR sojeva. Preostalih 10 klastera, od kojih po tri pripadaju Beijing i Haarlem linijama, dva grupi genotipova Clade 1, a po jedan genotipovima S i Ural, obuhvataju znatno manji broj MDR sojeva, od dva do osam. Čak 74,3% pacijenata čiji izolati su grupisani u TUR klaster bili su pacijenti Specijalne bolnice za plućne bolesti „Budislav Babić“ Bela Crkva. Prema tome, visoko značajna povezanost hospitalizacije u ovoj bolnici i pripadnosti sojeva odnosno pacijenata klasteru dokazuju da je ključni model transmisije MDR TB u Srbiji nozokomijalna transmisija.

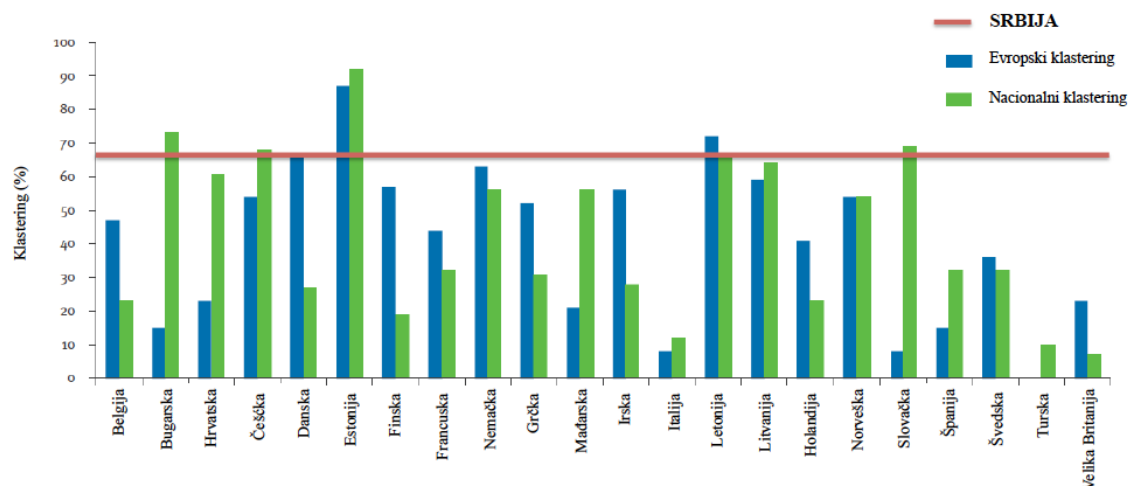
Ostali prepoznati oblici aktivne transmisije MDR TB u našoj zemlji su male socijalne i porodične epidemije, izazvane različitim genotipovima MDR sojeva MTB, pre svega Beijing i Haarlem. Posebno treba istaći prijateljske i susedske veze, za koje je u našem istraživanju ustanovljeno da imaju i veći značaj u transmisiji MDR TB od porodičnih kontakata. Ovo je svakako nalaz koji bi trebalo imati u vidu prilikom pretrage kontakata osobe obolele od MDR TB. Za čak devet pacijenata iz čijih uzoraka su izolovani MDR sojevi MTB grupisani u manjim klasterima ustanovljeno je da žive u istom mestu, ali nisu dokazane jasne veze i kontakti među njima. Isto mesto boravka, naročito što su u pitanju relativno mala mesta, ukazuje na epidemiološku vezu. Uobičajeno objašnjenje za ovakvu situaciju u molekularnim epidemiološkim studijama TB jeste transmisija slučajnim, kratkotrajnim kontaktom. U prilog ovom objašnjenju ide i činjenica da su kod dva pacijenta u pitanju izolati Beijing genotipa, a kod pet pacijenata izolati Haarlem genotipa. Oba genotipa se prema svojoj agresivnosti i sposobnosti transmisije izdvajaju od ostalih genotipova MTB i danas imaju ključnu ulogu u transmisiji MDR TB na globalnom nivou. Ovakav rezultat odnosno verovatna transmisija MDR sojeva Beijing i Haarlem genotipova u Srbiji kratkotrajnim kontaktom dodatno naglašava njihovu ulogu kao pretećih genotipova MDR sojeva MTB u našoj zemlji. Prema rezultatima našeg istraživanja, tokom poslednjih šest godina u Srbiji se desio samo jedan slučaj reinfekcije MDR sojem MTB. Naime, jedan pacijent je 2011. godine bio inficiran sojem jedinstvenog SNP profila, koji odgovara grupi genotipova Clade 1, da bi 2013. godine bio inficiran novim, Beijing sojem koji pripada klasteru 2. Ovakav nalaz sekvenciranja genoma sojeva izolovanih iz uzoraka ovog pacijenta potvrđuje rezultat epidemiološke analize, kojom je ustanovljeno da je pacijent tokom 2012. i 2013. godine intenzivno bio u kontaktu sa jednom od osoba čiji izolati su grupisani u Beijing klaster 2.

Ako uporedimo rezultate našeg istraživanja sa rezultatima drugih molekularno epidemioloških studija MDR TB, jasno je da je Srbija u grupi država sa visokim stepenom grupisanja MDR sojeva u klastere (Tabela 41), posebno kada imamo u vidu niske vrednosti incidencije MDR TB u našoj zemlji. U poređenju sa ostalim evropskim državama, procenat MDR sojeva grupisanih u klastere u Srbiji najbliži je vrednostima u Bugarskoj, Češkoj, Letoniji, Litvaniji i Slovačkoj ($\approx 70\%$), a značajno viša vrednost ustanovljena je samo u Estoniji (Grafikon 24) (De Beer i sar. 2014). Za razliku od Bugarske, Letonije, Litvanije i Estonije koje su na globalnom nivou među zemljama sa

najvišim opterećenjem MDR TB (WHO 2014), situacija u Srbiji uporediva je sa Češkom i Slovačkom u kojima su vrednosti incidencije MDR TB veoma niske.

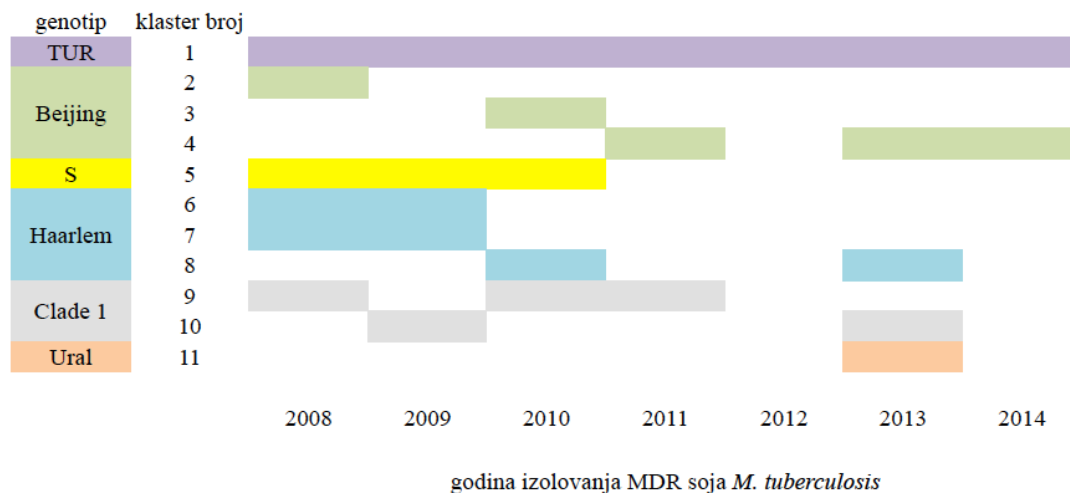
Tabela 41. Procenat MDR sojeva *M. tuberculosis* grupisanih u klastere u različitim geografskim regijama u svetu.

Geografsko područje	Vremenski period	Broj analiziranih MDR sojeva MTB	% MDR sojeva u klasterima	Izvorna referenca
Danska	1992 - 2007	29	17%	Bang i sar. 2010
Kalifornija, SAD	2004 - 2007	123	20%	Metcalfe i sar. 2010
Švajcarska	2006 - 2012	49	25%	Somoskovi i sar. 2014
Španija	1998 - 2008	480	32,7%	Gavin i sar. 2012
Viktorija, Australija	2002 - 2010	40	33%	Denholm i sar. 2012
Finska	2008 - 2011	17	35,3%	Smit i sar. 2013
Japan	2002 (6 meseci)	55	38%	Murase i sar. 2010
Kampala, Uganda	2003 - 2007	41	41,5%	Clark i sar. 2013
Gruzija	2006 (3 meseca)	183	47%	Niemann i sar. 2010
Nemačka	1995 - 2001	433	49%	Kubica i sar. 2004
Galicija, Španija	1998 - 2004	57	53%	
Latinska Amerika i Španija	2004 - 2008	1.078	53,3%	Ritacco i sar. 2012
Ankara, Turska	2004 - 2006	40	55%	Kisa i sar. 2012
Poljska	2004	46	56,5%	Jagielski i sar. 2010
Mađarska	2003 - 2004	28	56,8%	Kodmon i sar. 2006
Srbija	2008 - 2014	108	66,7%	/
Republika Južna Afrika	2004 - 2007	434	66,8%	Marais i sar. 2013
Letonija	1999 - 2001	73	74%	Nodieva i sar. 2010
Argentina	2003 - 2009	787	74,8%	Ritacco i sar. 2012
Panama	2002 - 2004	37	83%	Rosas i sar. 2013
Etiopija	2009 - 2012	183	86%	Diriba i sar. 2013



Grafikon 24. Procenat MDR i XDR sojeva grupisanih u evropske (n=941) i nacionalne (n=1.086) klastere u Evropi u periodu 2003-2011. godina. Modifikacija grafikona iz studije De Beer i sar. 2014.

Visok procenat MDR sojeva u klasterima načelno se objašnjava održavanjem visokog stepena aktivne transmisije MDR TB tokom dužeg vremenskog perioda u određenoj populaciji (De Beer i sar. 2014). Na Slici 31 shematski je prikazano vreme održavanja klastera MDR sojeva MTB u populaciji u Srbiji. Uočava se da su se, sa izuzetkom Ural klastera koji je detektovan samo u 2013. godini, svi ostali klasteri održali u populaciji u Srbiji najmanje po tri godine. Najveći TUR klaster, koji je odgovoran za više od polovine slučajeva aktivne transmisije MDR TB u našoj zemlji, kontinuirano je prisutan u populaciji od 2008. do 2014. godine.



Slika 31. Održavanje klastera MDR sojeva *M. tuberculosis* u populaciji u Srbiji po godinama.

Vrednost grupisanja MDR sojeva u klastere, koja je 1997-1998. godine iznosila 70% (Vukovic i sar. 2003), samo je neznatno niža u ovom trenutku u Srbiji. To zapravo znači da za poslednjih 17 godina nisu postignuti značajniji pomaci u poboljšanju kontrole aktivne transmisije MDR TB u našoj zemlji, posebno kada je reč o vulnerabilnim populacionim grupama. U studiji Vuković i saradnika (2003), pacijenti sa MDR TB činili su 5% ukupne studijske populacije, a aktivna transmisija MDR TB dokazana je samo na području Beograda. Našom studijom obuhvaćeni su svi pacijenti oboleli od MDR TB u Srbiji od 2008. do 2014. godine, pri čemu je od ukupnog broja pacijenata u klasterima 56,1% iz centralne Srbije, 31,8% sa teritorije Beograda i 12,1% iz Vojvodine. Na osnovu rezultata statističkih analiza, nijedna od ovih regija ne predstavlja predisponirajući faktor za pripadnost klasteru, što znači da je aktivna transmisija MDR TB jednako zastupljena na celom području Srbije.

U populaciji pacijenata čiji izolati pripadaju klasterima, samo 5,9% (4/68) nisu državljani Srbije i dolaze iz Hrvatske, koja spada u države sa niskim opterećenjem MDR TB (WHO 2014). U tom smislu se uticaj migracija na aktivnu transmisiju MDR TB u našoj zemlji, bar za sada, isključuje. Ipak, imajući u vidu novi veliki talas migracija sa Bliskog Istoka, koji je Srbiju zahvatio posebno početkom 2015. godine, moguće je očekivati njihov uticaj, kako na vrednosti incidencije i prevalencije MDR TB u Srbiji, tako i na aktivnu transmisiju MDR TB. Prema podacima Centra za zaštitu i pomoć tražiocima azila u Srbiji, od početka 2015. godine azil u Srbiji zatražilo je preko

9.000 ljudi, a očekuje se da će do kraja ove godine taj broj iznositi preko 30.000. Kao što je navedeno, najveći broj migranata dolazi iz Sirije i Avganistana, koje su prema podacima SZO države sa visokim opterećenjem MDR TB. U 2013. godini u Siriji je 6,2% novoobolelih i 31% prethodno lečenih od TB imalo MDR TB, dok je u Avganistanu 3,7% novoobolelih i 20% prethodno lečenih razvilo MDR TB (WHO 2014). Jedan od ilustrativnih primera uticaja imigracija iz država sa visokim stopama MDR TB na status MDR TB u državama sa niskim opterećenjem, predstavlja Španija. Od ukupnog broja obolelih od MDR TB, migranti iz južne i centralne Amerike i istočne Evrope su 2000. godine činili 17%, a 2008. godine čak 65%. Takođe, sedam od ukupno devet klastera detektovanih u Španiji od 1998. do 2008. godine obuhvatilo je MDR sojeve MTB stranih državljana, čiji genotipovi su bili karakteristični za geografsko područje iz kog su oboleli imigranti došli. Pokazano je da je tokom perioda 2004.-2008. godina čak 37% autohtonih stanovnika Španije, čiji su MDR sojevi MTB bili u klasterima, inficirano novim genotipovima MDR sojeva, kojih do tada nije bilo na području ove zemlje (Gavin i sar. 2012). Prema tome, jasno je da je moguć uticaj imigracije na status MDR TB u Srbiji i neophodnost primene adekvatnih kontrolnih mera, kao i bliske saradnje država u cilju efikasne prevencije širenja MDR TB, što je najbolje ilustrovano rezultatima nadzora MDR TB u Evropi koji sprovodi ECDC (De Beer i sar. 2014).

Neuobičajeno visok procenat XDR sojeva u klasterima ustanovljen u našoj studiji uporediv je sa rezultatima studije Murase i saradnika (2010). Autori su analizirali dinamiku transmisije MDR i XDR sojeva u Japanu tokom 2002. godine, a rezultati studije pokazali su da je 71% (12/17) XDR sojeva bilo grupisano u klastere. Time je dokazano da je klonska ekspanzija XDR sojeva moguća i u zemljama sa srednjom odnosno niskom incidencijom MDR TB i niskom incidencijom HIV infekcije. U istoj studiji utvrđeno je da XDR TB češće nastaje kod pacijenata u klasterima, nego kod onih koji su inficirani jedinstvenim genotipovima MTB (Murase i sar. 2010), što potvrđuju i naši rezultati.

Visoko značajna povezanost TUR genotipa i pripadnosti klasteru pokazana u našoj studiji znatno odstupa od rezultata nadzora transmisije MDR i XDR TB u Evropi od 2003. do 2011. godine, prema kojima najveći evropski klaster, koji obuhvata 60% MDR sojeva iz 17 od 24 evropske države, pripada Beijing genotipu (De Beer i sar. 2014). Za

razliku od Beijing linije, čije su značajno veća sposobnost transmisije, povezanost sa aktivnom transmisijom TB i multiplom rezistencijom na ATL jasno dokazani (Niemann i sar. 2010), TUR genotip se, bar do sada, nije dovodio u vezu ni sa MDR profilom rezistencije ni sa aktivnom transmisijom MDR TB. Takođe, nije dokazano da TUR sojevi imaju veću sposobnost transmisije u poređenju sa ostalim linijama MTK, posebno ne u poređenju sa Beijing, LAM i Haarlem linijama kao ključnim za aktivnu transmisiju MDR TB na globalnom nivou (Kodmon i sar. 2006; Niemann i sar. 2010; Marais i sar. 2013; Rosas i sar. 2013). Podatak da je TUR genotip tek treći po učestalosti kao izazivač MDR TB u Turskoj (Kisa i sar. 2012), području u kom se nalazi gotovo kompletna globalna populacija TUR bacila, kao i veoma retko, sporadično prisustvo ovog genotipa u pojedinim evropskim državama, govori u prilog tome da TUR nema značaja u transmisiji MDR TB ni u Evropi ni na globalnom nivou. Međutim, apsolutna predominacija TUR sojeva u lokalnim klasterima MDR sojeva MTB, čini ovaj genotip ključnim za aktivnu transmisiju MDR TB u Srbiji. Osim toga, pored klastera Beijing i Haarlem genotipova, za koje je s obzirom na njihovu sposobnost transmisije i bilo očekivano održavanje u populaciji tokom dužeg vremenskog perioda (Brudey i sar. 2006; Niemann i sar. 2010; Gavin i sar. 2012), lanac transmisije TUR genotipa se u Srbiji bez prekida održava od 2008. godine (Slika 31).

Prosečna starost pacijenata sa MDR TB svrstanih u klastere u Srbiji je 48 godina, što je nešto više od proseka u Evropi, koji iznosi 40 godina (De Beer i sar. 2014). Većinu pacijenata u klasterima čine osobe muškog pola (82,4%), domaći državljani (97,1%) sa negativnim izbegličkim statusom (94,1%) i stanovnici centralne Srbije (56,1%). Međutim, kao što je navedeno, od svih ispitivanih demografskih, epidemioloških, kliničkih i laboratorijskih karakteristika pacijenata, dokazano je da su jedini faktori rizika za aktivnu transmisiju MDR TB u Srbiji oboljevanje od shizofrenije i hospitalizacija u Specijalnoj bolnici za plućne bolesti „Budislav Babić“ Bela Crkva. Pre 1990. godine, nozokomijalne epidemije MDR TB bile su veoma retke, ali se od prve opisane epidemije 1991. godine u tri bolnice na Floridi i u Njujorku, SAD (CDC 1992), broj registrovanih epidemija značajno povećava. Iako su se početkom devedesetih godina prošlog veka intrahospitalne epidemije MDR TB najčešće dešavale na području SAD, Moro i saradnici 1998. godine opisuju najveću nozokomijalnu epidemiju MDR TB u Evropi u to vreme. U pitanju je epidemija koja je zahvatila odeljenja dve bolnice

(A i B) u Milanu u kojima su lečeni HIV pozitivni pacijenti. Čak 89% (82/92) pacijenata koji su oboleli od MDR TB u periodu 1991-1995. godina u ove dve bolnice, bilo je inficirano MDR sojevima sa identičnim RFLP profilom. Izvor epidemije bio je samo jedan pacijent koji je iz bolnice A prebačen u bolnicu B i čija MDR TB nije na vreme prepoznata. Epidemije u Španiji (Rullan i sar. 1996), Sankt Peterburgu u Rusiji (Narvskaya i sar. 2002) i Letoniji (Nodieva i sar. 2010) samo su neki od brojnih primera nozokomijalnih epidemija MDR TB, koje su se desile tokom proteklih 20 godina. Ipak, adekvatna primena mera prevencije nozokomijalne transmisije MDR TB (Lange i sar. 2014), pre svega individualna izolacija svih direktno mikroskopski pozitivnih pacijenata sa dijagnozom MDR TB, u mnogim državama je znatno smanjila stepen nozokomijalne transmisije i broj bolničkih epidemija MDR TB. Problem nozokomijalnih epidemija MDR TB, međutim, i dalje postoji u oblastima sa visokim vrednostima incidencije i prevalencije HIV infekcije, ali i kao posledica nedostataka nacionalnih programa kontrole MDR i XDR TB. Tako je u mestu Tugela Ferry u provinciji KwaZulu-Natal u južnoj Africi od 2005. do 2009. godine registrovano 516 slučajeva XDR TB, pri čemu je većina pacijenata bila HIV pozitivna. Usled sličnosti ove sa epidemijama MDR TB iz 1990-ih godina, sprovedena je retrospektivna opservaciona studija u koju je uključeno 148 pacijenata obolelih od XDR TB u Tugela Ferry tokom perioda 2005-2006. godina, od kojih je 98% bilo HIV pozitivno. Studijom je obuhvaćen detaljan pregled medicinske dokumentacije, epidemiološka pretraga kontakata obolelih, genotipizacija sojeva MTB i detekcija lanaca transmisije. Skoro svi pacijenti (93%) bili su hospitalizovani u istoj bolnici u vreme infektivnosti, a pre postavljanja dijagnoze XDR TB, 113 pacijenata je bilo hospitalizovano najmanje jednom, od kojih je njih 80 bilo izloženo najmanje jednom infektivnom pacijentu sa XDR TB. Rezultatima spoligotipizacije pokazano je da se u jednom klasteru genotipova (ST60) nalazilo 92% izolata, a primenom RFLP IS6110 genotipizacije detektovan je takozvani KZN genotip, kome je pripadalo 96% sojeva iz ST60 klastera. Autori ove studije opisali su mrežu transmisije u kojoj je učestvovao čak 51 pacijent iz čijih uzoraka su izolovani XDR sojevi MTB iz klastera ST60/KZN, a epidemiološka veza utvrđena je kod 82% pripadnika klastera. Rezultati sekvenciranja 10 glavnih genskih determinanti rezistencije na ATL potvrdili su visoko klonalnu prirodu nozokomijalne epidemije XDR TB (Gandhi i sar. 2013). Autori ove studije ističu nekoliko ključnih faktora za nastanak

epidemije: dugo vreme hospitalizacije, lošu prostornu organizaciju odeljenja sa 30-40 kreveta koji su međusobno udaljeni manje od 1 m, kasno postavljanje dijagnoze XDR TB i visoku prevalenciju HIV infekcije. Svi ovi faktori doveli su do uspostavljanja transmisivne mreže XDR TB, u kojoj izvor infekcije nije bio jedan pacijent, što je tipično za epidemije, nego veći broj pacijenata i multipli lanci transmisije. Kako je genotip sojeva iz KZN klastera bio identičan sojevima u prethodno opisanim klasterima XDR sojeva MTB u KwaZulu-Natal regiji (Ioerger i sar. 2009), autori smatraju da su XDR slučajevi analizirani u ovoj studiji deo multiinstitucionalne epidemije XDR TB, slično epidemiji W-Beijing soja (McElroy i sar. 2002), i da je epidemija počela godinama pre nego što je detektovana u mestu Tugela Ferry (Gandhi i sar. 2013).

Intrahospitalna transmisija MDR TB koja je rezultatima naše studije dokazana u Specijalnoj bolnici za plućne bolesti „Budislav Babić“ Bela Crkva, prepoznata je od strane psihijatar i pneumoftiziologa pre više od deset godina. Međutim, od 1968. godine, kada počinje hospitalizacija obolelih od TB u ovoj bolnici, pa sve do 2011. godine, oboleli od MDR TB nisu bili potpuno izolovani od ostalih pacijenata. Uslovi u ovoj bolnici bili su izuzetno loši, pre svega u smislu neadekvatnih higijenskih uslova u sobama i zajedničkim prostorijama kao i velikog broja bolesničkih postelja po sobi, čime nije ispoštovan osnovni postulat kontrole transmisije MDR TB u bolničkim uslovima (Lange i sar. 2014). Činjenica da je najveći broj hospitalizovanih sa dijagnozom MDR TB imao shizofreniju kao komorbiditet i da je lečenje MDR TB u Srbiji sve do 2008. godine bilo isključivo empirijsko, značajno je doprinela izuzetno lošoj kontroli nozokomijalne transmisije MDR i XDR TB u bolnici u Beloj Crkvi. Imajući u vidu da veliki broj psihijatrijskih bolesnika hospitalizovanih u bolnici u Beloj Crkvi zbog respiratornih oboljenja dolaze iz drugih psihijatrijskih ustanova u koje se vraćaju nakon završetka terapije, otvara se pitanje transmisije MDR TB i u matičnim psihijatrijskim ustanovama pacijenata. Iako među pacijentima hospitalizovanim u Beloj Crkvi nijedan nije bio HIV pozitivan, po svim ostalim karakteristikama ova nozokomijalna epidemija u velikoj meri odgovara nekontrolisanom širenju MDR i XDR TB u KwaZulu-Natal provinciji u Republici Južnoj Africi, ali predstavlja jedinstven slučaj u svetu kada su u pitanju države sa niskim opterećenjem TB i MDR TB, kakva je Srbija.

Istovremeno postojanje psihijatrijskog i somatskog oboljenja nije retkost, posebno kada

su u pitanju hronične somatske bolesti, kakva je i TB (Pachi i sar. 2013). Psihijatrijski poremećaji značajno komplikuju postavljanje dijagnoze i sprovođenje terapije somatskih oboljenja, menjajući tako njihov tok i ishod. TB je tipičan primer bolesti koju karakterišu kako medicinske, tako i socijalne dimenzije, a jedna od njenih osnovnih karakteristika je bliska povezanost sa životom u lošim socioekonomskim uslovima, koji takođe predisponiraju i nastanak brojnih psihijatrijskih oboljenja. Povišen rizik od razvoja aktivne TB koincidira sa alkoholizmom, intravenskim korišćenjem droga, HIV infekcijom, dijabetesom i mnogim drugim faktorima. Svi navedeni faktori rizika su ujedno prevalentni i u populaciji psihijatrijskih bolesnika, u kojoj sledstveno povećavaju rizik od razvoja aktivne TB. Negativan uticaj psihopatoloških stanja na tok i ishod somatskih oboljenja pre svega se ogleda u slaboj komplijansi pacijenata u terapiji somatskih bolesti (Pachi i sar. 2013). Kako je upravo neadekvatno sprovođenje lečenja TB glavna pretnja efikasnoj kontroli MDR TB, jasno je da prisustvo hroničnih psihijatrijskih bolesti, poput shizofrenije, doprinosi širenju MDR TB u populaciji. Iako analiza uzročno posledične povezanosti shizofrenije i MDR TB prevazilazi okvire ovog istraživanja, iz svega navedenog jasno proizilazi zaključak da shizofrenija može predstavljati faktor rizika za MDR TB, što je nalaz naše studije. U prilog tome dodatno govori i činjenica da su svi pacijenti hospitalizovani u bolnici u Beloj Crkvi zbog shizofrenije i respiratornih oboljenja, pre postavljanja dijagnoze MDR TB već imali dijagnozu shizofrenije. Sa druge strane, povezanost shizofrenije, sojeva MTB TUR genotipa i uslova hospitalizacije u Beloj Crkvi koji favorizuju transmisiju upravo TUR MDR sojeva MTB, što je dokazano rezultatima naše studije, otvara niz novih pitanja. Ispitivanje povezanosti navedene tri ključne determinante aktivne transmisije MDR TB u Srbiji prevazilazi okvire ove doktorske disertacije, ali svakako predstavlja povod i osnov za dalja istraživanja.

5.4. Genetička osnova rezistencije MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji

5.4.1. Fenotipski profili rezistencije MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji

U lokalnoj kolekciji MDR sojeva MTB, najveći broj izolata ima fenotipsku rezistenciju na S (75,9%), E (65,7%) i Z (54,6%), tako da je najčešći fenotipski profil rezistencije u Srbiji tokom proteklih šest godina bila istovremena rezistencija na sve ATL prve linije.

U našoj studiji nije utvrđena značajna udruženost rezistencije MDR sojeva MTB na više od pet antibiotika ni sa jednim genotipom, kao ni sa pripadnošću klasteru. Ovakav rezultat znači da postoji jednaka verovatnoća za sve lokalne MDR genotipove da budu fenotipski rezistentni na više od pet ATL, kao i da fenotipska rezistencija sojeva na više od pet ATL ne povećava verovatnoću njihove aktivne transmisije.

U Tabeli 42 dat je uporedni prikaz učestalosti rezistencije MDR sojeva MTB na ATL prve i druge linije u evropskim državama sa niskim opterećenjem MDR TB (Günther i sar. 2015) i Srbiji. Kada je reč o rezistenciji na ATL prve linije, jasno se može videti da je učestalost fenotipske rezistencije na S u Srbiji nešto niža od evropskog proseka, učestalost rezistencije na E nešto viša, dok je učestalost rezistencije na Z gotovo jednaka evropskom proseku. Učestalost fenotipske rezistencije na jedan i više od jednog ATL druge linije u Srbiji je niža od vrednosti u evropskim državama sa niskim stopama MDR TB, kao i učestalost rezistencije na jedan i više od jednog injekcionog ATL druge linije. Procenat MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji u proteklih šest godina i u evropskim državama sa niskim opterećenjem MDR TB koji su rezistentni na AM i CM je jednak. U Srbiji za sada nema MDR sojeva dodatno rezistentnih na KM, s tim što treba naglasiti da je test ispitivanja osetljivosti na KM urađen za samo 9,3% sojeva iz ispitivane MDR kolekcije. Učestalosti rezistencije lokalih MDR izolata na Ofi i ETH su niže od evropskog proseka, dok je učestalost rezistencije na PAS u Srbiji izuzetno niska. Nijedan lokalni MDR soj nije bio fenotipski rezistentan na CS. Sumirano, u poređenju sa evropskim državama sa niskim opterećenjem MDR TB, učestalost rezistencije lokalnih MDR sojeva MTB na ATL druge linije je nešto niža. Međutim, autori poslednje objavljene multicentrične studije o statusu MDR TB u Evropi, sa čijim rezultatima smo poredili rezultate naše studije, i nisku učestalost rezistencije MDR sojeva na ATL druge linije u državama sa niskim opterećenjem MDR TB ipak karakterišu kao visoku (Günther i sar. 2015). Na osnovu ovakvog stava i značajnog poklapanja rezultata naše studije sa rezultatima studije Günther i saradnika (2015), zaključujemo da je učestalost rezistencije MDR sojeva izolovanih u Srbiji tokom proteklih šest godina na ATL druge linije takođe visoka.

Tabela 42. Učestalost rezistencije MDR sojeva *M. tuberculosis* na antituberkulotike (ATL) prve i druge linije u evropskim državama sa niskim opterećenjem MDR TB u periodu 2010-2011. godina (Günther i sar. 2015) i Srbiji u periodu 2008-2014. godina.

	Evropa države sa niskim opterećenjem MDR TB	Srbija
ATL prve linije		
<i>grupa 1</i>		
Streptomycin	83,9 %	75,9 %
Etambutol	50,5 %	65,7 %
Pirazinamid	53,6 %	54,6 %
≥1 ATL ne-prve linije	65,4 %	41,7 %
ATL druge linije		
<i>grupa 2</i>		
Amikacin	17,9 %	16,7 %
Kanamycin	20,5 %	0%*
Kapreomicin	17,0 %	17,6 %
≥1 injekcionih	24,0 %	17,6 %
<i>grupa 3</i>		
Ofloksacin	23,2 %	18,5 %
<i>grupa 4</i>		
Para-aminosalicilna	18,5 %	2,6 %
Etionamid	48 %	20,3 %**
Cikloserin	11,3 %	0%

*Test osetljivosti na kanamicin urađen je za 9,2% lokalnih MDR sojeva *M. tuberculosis*.

**Test osetljivosti na etionamid urađen je za 80,6% lokalnih MDR sojeva *M. tuberculosis*.

Visoka učestalost rezistencije MDR sojeva na ATL druge linije objašnjava se neracionalnom upotrebom ovih lekova u lečenju MDR TB i odsustvom primene individualnih terapijskih režima (Günther i sar. 2015). Uvidom u medicinsku dokumentaciju studijske populacije pacijenata obolelih od MDR TB u Srbiji, ustanovljeno je da nisu primenjivani individualni terapijski režimi i da je većina pacijenata lečena kombinacijom E, Z, CM, levofloksacina, ETH i CS. Takođe, kod značajnog broja pacijenata je terapija određenim ATL prekinuta usled pojave neželjenih efekata leka. Osim toga, test ispitivanja osetljivosti za drugu liniju ATL ne izvodi se u Srbiji, već u SRL u Borstelu, Nemačka. Samim tim, rezultati testa osetljivosti na ATL druge linije dostupni su lekarima kliničarima tek nakon više meseci od postavljanja dijagnoze MDR TB, što dodatno komplikuje primenu individualnih terapijskih režima.

Još jedan otežavajući faktor je svakako i veliki broj pacijenata obolelih od MDR TB sa psihijatrijskim bolestima kao komorbiditetom, što u značajnoj meri ometa adekvatno sprovođenje lečenja i svakako doprinosi razvoju XDR TB. U lokalnoj populaciji pacijenata sa XDR TB, svi osim jednog (10/11) imaju psihijatrijsko oboljenje, što potvrđuje prethodnu opservaciju. Iz svega navedenog proizilazi zaključak da su osnovni razlozi visoke učestalosti rezistencije na ATL druge linije u Srbiji upravo oni koji su dominantni i na globalnom nivou, uz dodatnu specifičnost uticaja psihijatrijskih oboljenja kao komorbiditeta na vrednosti učestalosti rezistencije na ATL u lokalnoj populaciji.

U lokalnoj kolekciji MDR sojeva ustanovljena je visoko značajna udruženost Beijing i TUR genotipova sa fenotipskom rezistencijom na S. Udruženost Beijing genotipa sa rezistencijom na S opisana je i u ranijim studijama (Bifani i sar. 1996; Githui i sar. 2004; Sun i sar. 2010; Buu i sar. 2012). Pored toga, Buu i saradnici (2012) pokazali su da je udruženost Beijing genotipa sa MDR profilom čak zavisna od rezistencije na S, odnosno da rezistencija na S predstavlja preduslov da Beijing soj postane MDR soj. Autori ove studije smatraju da je asocijacija Beijing genotipa sa MDR TB na neki način posledica selekcije Beijing sojeva rezistentnih na S, čija reproduktivna sposobnost nije smanjena u populacijama sa jakim selektivnim pritiskom za S odnosno u populacijama u kojima se S primenjuje u okviru standardnih terapijskih režima za TB (Buu i sar. 2012). Tipičan primer takvih država su pojedine države bivšeg Sovjetskog Saveza, u kojima je S deo standardnog terapijskog protokola kako za novoobolele, tako i za prethodno lečene od TB, a jedan od pokazatelja navedene hipoteze o uticaju selektivnog pritiska za S jeste prevalencija prethodno lečenih u odnosu na novoobolele među MDR pacijentima (WHO 2014). U našoj studijskoj populaciji, 55,5% pacijenata sa MDR TB čine pacijenti koji su prethodno lečeni od TB, a S je bio deo standardnog terapijskog protokola u Srbiji. Uzimajući u obzir sve navedeno, moglo bi se pretpostaviti da je rezistencija na S moguće uticala i na razvoj MDR profila kod lokalnih Beijing sojeva. Takođe, imajući u vidu da su u populaciji MDR sojeva u Srbiji predominantni sojevi TUR genotipa, kao i da smo ustanovili značajnu povezanost TUR genotipa sa rezistencijom na S, moglo bi se spekulirati o tome da rezistencija na S ima sličan uticaj na povezanost lokalnih TUR sojeva sa MDR profilom. S obzirom da ni u jednoj drugoj studiji do sada nije opisana povezanost TUR genotipa sa rezistencijom na S, kao ni

uticaj ove rezistencije na povezanost TUR genotipa sa MDR profilom, mogući uticaj rezistencije na S na MDR TUR sojeve u Srbiji ostaje samo na nivou hipoteze.

Na osnovu analize korelacije fenotipske rezistencije na ATL i pripadnosti lokalnih MDR sojeva klasterima, utvrđeno je da se MDR sojevi rezistentni na S i E češće nalaze u klasterima od sojeva rezistentnih na druge ATL. To praktično znači da rezistencija na S i E značajno utiče na aktivnu transmisiju MDR TB u Srbiji. Buu i saradnici (2012) su u svojoj studiji dokazali da rezistencija na S, I i E kod Beijing sojeva skoro tri puta povećava verovatnoću pripadnosti klasteru, dok kod evro-američkih sojeva rezistencija na navedene ATL smanjuje verovatnoću pripadnosti klasteru. Drugim rečima, pacijenti sa Beijing sojevima koji su rezistentni na S su češće u klasterima od pacijenata sa Beijing sojevima osetljivim na S (Buu i sar. 2012). U našoj kolekciji MDR sojeva, međutim, svi Beijing sojevi bili su rezistentni na S, tako da ne možemo tvrditi da rezistencija na S među lokalnim Beijing sojevima povećava mogućnost njihove aktivne transmisije. Za razliku od studije Buu i saradnika (2012), čiji rezultati su u velikoj meri slični rezultatima našeg istraživanja, u studiji Verdugo i saradnika (2015) koji su analizirali sojeve MTB izolovane u Njujorku, SAD, sa pripadnošću klasteru, odnosno aktivnom transmisijom MDR TB udružena je isključivo rezistencija na Z (Verdugo i sar. 2015).

MDR Beijing sojevi izolovani u Srbiji su češće od sojeva koji pripadaju ostalim genotipovima dodatno rezistentni na Z i ETH, dok su TUR sojevi u našoj ispitivanoj kolekciji češće od svih ostalih dodatno rezistentni na E i OfI. Rezultati studije Xia i saradnika (2015), koji su ispitivali nivo rezistencije MDR sojeva iz provincije Zheijang u Kini na Z, takođe pokazuju udruženost Beijing linije za rezistencijom na Z. Baranov i saradnici (2009) pokazali su da su Beijing izolati iz severozapadne oblasti Rusije udruženi sa rezistencijom na sve ATL prve linije i ETH. Sa druge strane, u studiji iz Lisabona, sa rezistencijom na ETH udružena je LAM linija (Machado i sar. 2015), dok studija iz okruga Kolumbija, pokazuje da je na tom području sa rezistencijom na FLQ udružena istočno azijska filogenetska linija MTK (Yuen i sar. 2013). Ovakvi rezultati ukazuju na to da je, sa izuzetkom Beijing linije čiju povezanost sa rezistencijom na ATL određuje više faktora, najčešće genotip koji je dominantan u određenoj regiji značajno udružen sa rezistencijom na neki od ATL. Prema našem saznanju, u drugim studijama do sada nisu objavljeni podaci o povezanosti TUR linije sa rezistencijom na E i FLQ,

ali, na osnovu prethodno navedenog, možemo pretpostaviti da sama predominacija TUR genotipa u Srbiji značajno utiče na povezanost lokalnih TUR sojeva sa rezistencijom na određene ATL.

5.4.2. Genotipski profili rezistencije MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji

U kolekciji MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji tokom proteklih šest godina, najvišu učestalost imaju mutacije *rpoB* i *katG* gena, koje su detektovane u genomima 97,2% analiziranih sojeva. Visoka učestalost mutacija detektovana je takođe u genima *embB*, *rpsL*, *pncA*, *gyrA* i *embA*. Na osnovu rezultata analize korelacije genotipskih i fenotipskih profila rezistencije lokalne MDR kolekcije, molekularnim markerima rezistencije na ATL MDR sojeva MTB u Srbiji mogu se smatrati sledeći geni: R – *rpoB*, I – *katG*, S – *rpsL*, E – *embB*, Z – *pncA*, AM i CM – *rrs*. Ovim je pokazano da su lokalni molekularni markeri rezistencije upravo oni geni u kojima se najčešće dešavaju mutacije koje dovode do rezistencije na R, I, S, E, Z, AM i CM na globalnom nivou (Da Silva i Palomino 2011; Prozorov i sar. 2012; Santos 2012; Koch i sar. 2014).

Mutacije *rpsL* gena u našoj studijskoj populaciji MDR sojeva MTB imali su predominantno genotipovi Beijing i TUR. U poređenju sa ostalim genotipovima, Beijing češće ima mutacije *pncA* i *ethA* gena, TUR genotip mutacije *rpoA*, *embA*, *embB*, *gyrA* i *rrs* gena, Haarlem genotip mutacije *rpoC* i Rv2731 gena, a S genotip mutacije *ndh* gena. U pogledu povezanosti genotipova sa pojedinačnim SNP, visoko značajna povezanost utvrđena je između Beijing i TUR genotipova i K43R mutacije *rpsL* gena. Udruženost Beijing linije sa K43R *rpsL* mutacijom u našoj studiji je potvrda ranije dokazane povezanosti Beijing sojeva sa ovim SNP *rpsL* gena (Sun i sar. 2010). Povezanost TUR genotipa sa K43R *rpsL*, međutim, nije dokazana u prethodnim studijama, kao ni asocijacija TUR sojeva sa mutacijama S315T *katG*, S450W *rpoB*, F452L i V431M *rpoC*, P25R *rpoA*, A576T *embA*, Q497R *embB* i V742L *gyrA* gena, na koju ukazuju rezultati naše studije. Mutacije S450L *rpoB*, L516P *rpoC*, V7G *pncA* i W256_ *ethA* gena dominantno su prisutne u genomima lokalnih Beijing sojeva, dok je Haarlem genotip udružen sa mutacijama G594E *rpoC* i S40P Rv2731 gena. Udruženost Beijing genotipa sa S450L mutacijom *rpoB* gena dokazana je i u ranijim studijama (Zhang i sar. 2015), dok povezanost sa kompenzatornom mutacijom L516P *rpoC* gena može biti potvrda ranije opisane veće sposobnosti transmisije Beijing sojeva u

poređenju sa ostalim linijama MTB. Takođe, povezanost Haarlem sojeva sa G594E *rpoC* mutacijom govori u prilog veće sposobnosti transmisije Haarlem linije, što je u skladu sa već opisanom udruženošću Haarlem sojeva sa MDR profilom.

5.4.2.1. Genetička osnova rezistencije na R kod MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji

Mutacije *rpoB* gena detektovane su u genomima 97,2% MDR sojeva MTB, pri čemu je preko 70% izolata imalo mutacije u okviru RRDR regiona. RRDR region je odgovoran za nastanak rezistencije na R kod 96% sojeva MTB fenotipski rezistentnih na ovaj ATL na globalnom nivou, a mutacije u kodonu 450 su najčešći uzrok rezistencije na R, što potvrđuju i rezultati naše studije (Da Silva i Palomino 2011). Od svih *rpoB* mutacija, S450L najmanje negativno utiče na sposobnost transmisije sojeva MTB (Gagneux 2009; Borrell i sar. 2013). U našem istraživanju je ustanovljeno da su mutacije S450W i S450L *rpoB* gena značajno udružene sa pripadnošću klasteru, odnosno skorašnjom transmisijom MDR TB u Srbiji. Na osnovu ovih rezultata, možemo zaključiti da S450L i S450W ne podležu negativnom selektivnom pritisku, odnosno da ne utiču negativno na sposobnost transmisije MDR sojeva MTB u populaciji u Srbiji. Tome u prilog govori i rezultat da je S450W mutacija značajno povezana sa TUR genotipom, koji je dominantan među lokalnim MDR sojevima MTB i ujedno najodgovorniji za visok stepen aktivne transmisije MDR TB u Srbiji.

U kolekciji MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji, u okviru RRDR regiona identifikovane su i mutacije na pozicijama 424, 432, 435, 445 i 452 (0,95-6,7%), koje se takođe smatraju visoko pouzdanim molekularnim markerima rezistencije na R (Sandgren i sar. 2009). Mutacije *rpoB* gena van RRDR regiona detektovane su u genomima 8,6% izolata koji imaju S450L mutaciju. Uloga ovih mutacija u nastanku rezistencije na R ostaje nejasna, s obzirom da su u našoj kolekciji identifikovane isključivo u kombinaciji sa S450L. Međutim, u studiji u kojoj je analizirana genetička osnova rezistencije uzročnika epidemije MDR TB na Tajlandu, svi analizirani sojevi imali su, pored S450L mutacije i mutaciju L731P u *rpoB* genu (Regmi i sar. 2015). L731P je pre ove studije jedino detektovana u studiji Ioerger i saradnika (2010), takođe u kolekciji uzročnika epidemije MDR TB u Republici Južnoj Africi. Uloga V731P, međutim, i dalje je kontroverzna i još uvek nije poznato da li ova mutacija omogućava soju koji je nosi da toleriše slabiju sposobnost transmisije koja nastaje kao posledica

prisustva određenih mutacija povezanih sa rezistencijom ili direktno doprinosi rezistenciji na R. Sudeći po njenom prisustvu u genomima sojeva izazivača epidemija MDR TB, verovatnije je da L731P predstavlja kompenzatornu mutaciju koja doprinosi sposobnosti transmisije sojeva MTB. U našoj studiji, samo jedan izolat imao je ovaj SNP u *rpoB* genu, zajedno sa S450L, tako da ne možemo zaključiti kakva je uloga L731P mutacije u genomima lokalnih MDR sojeva MTB. Ipak, na osnovu povezanosti mutacije L731P sa epidemijama MDR TB, može se smatrati da prisustvo ovog SNP predstavlja na izvestan način pretnju daljoj kontroli transmisije MDR TB u našoj populaciji.

U *rpoB* genima ispitivane kolekcije MDR sojeva detektovana su i dva filogenetski informativna SNP. Naime, svi Beijing sojevi imali su A1075A mutaciju, koja je i ranije opisana kao filogenetski informativni SNP Beijing linije (Feuerriegel i sar. 2014). Takođe, svi lokalni Haarlem izolati imali su sinonimni SNP D103D, koji je prema podacima Molecular Mycobacteriology Group, Forschungszentrum Borstel, filogenetski informativan za ovu liniju.

5.4.2.2. Genetička osnova rezistencije na I kod MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji

Fenotipska rezistencija na I potvrđena je detekcijom SNP u genomima 97,2% MDR izolata MTB. Svi izolati rezistentni na I u čijim genomima su detektovane mutacije, imali su mutacije *katG* gena koje dovode do visokog nivoa rezistencije na I. Ovaj rezultat jasno pokazuje da su *katG* mutacije ključne za nastanak rezistencije na I u našoj zemlji. Iako učestalost *katG* mutacija varira u zavisnosti od geografskog područja i iznosi od 55,5% u zapadnom Pacifiku, preko 69,4% u Evropi, do 78,4% u jugoistočnoj Aziji, smatra se da su upravo ove mutacije najčešći uzrok rezistencije na I i na globalnom nivou (Seifert i sar. 2015).

Čak 81,9% MDR sojeva MTB iz naše kolekcije sa *katG* mutacijama, imalo je S315T, koja je i najčešće identifikovana *katG* mutacija na globalnom nivou sa učestalošću od 64,2% (Seifert i sar. 2015). MDR sojevi MTB u našoj kolekciji na poziciji 315 *katG* gena imaju substituciju serina treoninom (agc/acC), koja se i smatra najčešćim SNP u kodonu 315 *katG* gena sa učestalošću od 93,4% (Seifert i sar. 2015). Rezultati naše studije pokazuju da postoji visoko značajna udruženost S315T sa pripadnošću klasterima uopšte, a posebno sa TUR klasterom. Ovaj rezultat, kao i činjenica da je

TUR klaster MDR sojeva MTB najzaslužniji za visok stepen aktivne transmisije MDR TB u Srbiji, potvrđuje rezultate dosadašnjih studija, prema kojima S315T ne utiče negativno na sposobnost transmisije sojeva MTB (Gagneux 2009). Interesantno je da je, prema rezultatima ranijih studija, Beijing genotip češće udružen sa ne-S315T, odnosno „skupim“ mutacijama *katG* gena, što takođe potvrđuje i naša studija. Neki autori smatraju da su Beijing sojevi MTB, upravo zahvaljujući ovoj činjenici, odnosno gubitku aktivnosti KatG, manje osetljivi na oksidativni stres u organizmu domaćina ili da imaju druge mehanizme koji kompenzuju gubitak KatG aktivnosti (Gagneux 2009).

Ukupno 14,3% lokalnih izolata, pored *katG* mutacija, ima mutacije *inhA* gena, *inhA* promotera, *ndh* i/ili *kasA* gena. Mutacije *ndh* i *kasA* gena do sada su detektovane samo sporadično kod sojeva rezistentnih na I, dok se mutacije *inhA* gena i *inhA* promotera smatraju odgovornim za nizak nivo rezistencije na I (Zhang i Yew 2009; Da Silva i Palomino 2011). Iz naše kolekcije MDR sojeva MTB po 1,9% izolata ima mutacije *inhA* gena (I16V, I21V), odnosno -8 t/g *inhA* promotera, što odgovara učestalosti ovih mutacija u drugim studijama (Seifert i sar. 2015). Međutim, samo 2,9% izolata ima mutaciju -15c/t *inhA* promotera, što je daleko ispod 19,2%, koliko iznosi učestalost ove mutacije na globalnom nivou (Seifert i sar. 2015). Na osnovu svega navedenog, možemo zaključiti da mutacije *inhA* gena, *inhA* promotera, *ndh* i *kasA* gena, u poređenju sa *katG* mutacijama, nemaju značajnu ulogu u nastanku rezistencije na I kod MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji.

U okviru *katG* gena svih Beijing sojeva iz naše kolekcije kao filogenetski informativan marker identifikovan je SNP R463L. Ovaj rezultat je u skladu sa rezultatima dosadašnjih istraživanja Molecular Mycobacteriology Group, Forschungszentrum Borstel, koja ovaj SNP svrstavaju u filogenetski informativne za ne-evro-američke genotipove MTK, kao što je Beijing genotip.

5.4.2.3. Genetička osnova rezistencije na S kod MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji

Do nastanka rezistencije na S u lokalnoj MDR kolekciji primarno dovode mutacije *rpsL* gena, koje su detektovane u genomima 83,3% izolata koji imaju bar jednu mutaciju povezanu sa rezistencijom na S. Ključna mutacija *rpsL* gena kod lokalnih MDR sojeva bila je K43R. U pitanju je dominantna mutacija *rpsL* gena među MDR sojevima na globalnom nivou, a njena učestalost značajno varira u populaciji MDR sojeva MTB

među različitim geografskim regijama, od 24 do 64,1%. Visoka prevalencija K43R u genomima sojeva rezistentnih na S objašnjava se slabim uticajem ove mutacije na sposobnost transmisije sojeva (Jagielski i sar. 2015b). Rezultati naše studije idu u prilog ovom objašnjenju, jer je dokazana visoko značajna povezanost lokalnih TUR i Beijing sojeva, kao ključnih za aktivnu transmisiju MDR TB u Srbiji, sa K43R. Mutacija K88R *rpsL* gena identifikovana je kod samo dva lokalna MDR izolata, što je takođe u skladu sa do sada opisanim malim značajem K88R u nastanku rezistencije na S i daleko nižim vrednostima učestalosti u poređenju sa K43R (Jagielski i sar. 2015). Pojava K-R mutacija *rpsL* gena u sojevima osetljivim na S je izuzetno retka (Jagielski i sar. 2014), što potvrđuju i naši rezultati. Naime, mutacija K43R detektovana je u genomu samo jednog lokalnog izolata fenotipski osetljivog na S.

Za razliku od *rpsL* gena, u kom su do sada opisana samo dva SNP povezana sa rezistencijom, *gidB* gen je izrazito polimorfan. Ovo potvrđuju i naši rezultati odnosno osam detektovanih *gidB* SNP u lokalnoj MDR kolekciji. U dosadašnjim studijama pokazano je i da se *gidB* mutacije često javljaju u genomima sojeva osetljivih na S (Jagielski i sar. 2015). U lokalnoj MDR kolekciji, ukupno 12 (16,7%) izolata ima *gidB* mutacije, pri čemu su tri izolata sa ovim mutacijama osetljiva na S. Najučestalije *gidB* mutacije u genomima lokalnih MDR sojeva MTB su P75L i P75S (po 25%), koje su i u drugim studijama opisane kao značajne za nastanak rezistencije na S (Sandgren i sar. 2009). Takođe, naši rezultati ukazuju na visoko značajnu udruženost P75L i P75S i pripadnosti klasteru, odnosno ukazuju na značajnu ulogu ove dve *gidB* mutacije u aktivnoj transmisiji MDR TB u Srbiji.

Mutacije *rrs* gena detektovane su kod 16/72 (22,2%) izolata rezistentnih na S, što se uklapa u globalni prosek odnosno učestalosti ovih mutacija od 0 do 28% među sojevima MTB rezistentnim na S (Jagielski i sar. 2015). Ukupno 17% lokalnih sojeva rezistentnih na S nema nijednu mutaciju u genima za koje je do sada dokazana povezanost sa rezistencijom na S, što je nešto više od vrednosti u studiji iz Poljske (12,5%), a značajno manje od vrednosti u Španiji (62,3%) i Portugaliji (33,3%) (Jagielski i sar. 2015). Odsustvo mutacija u genomu sojeva sa fenotipskom rezistencijom na S u studijskoj populaciji MDR sojeva MTB ukazuje na moguću ulogu nekih drugih mehanizama rezistencije na ovaj ATL u populaciji u Srbiji.

U lokalnoj populaciji MDR sojeva detektovana su i dva filogenetska markera u okviru

gidB gena. Naime, svi lokalni Beijing izolati imaju SNP A205A i E92D, za koje je već dokazano da su filogenetski informativni za Beijing genotip (Feuerriegel i sar. 2014).

5.4.2.4. Genetička osnova rezistencije na E kod MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji

Od ukupno 17 identifikovanih SNP *embB* gena, koji su detektovani kod 74,1% lokalnih MDR sojeva, najčešća je mutacija Q497R. Polovina svih sojeva sa *embB* mutacijama ima upravo ovaj polimorfizam, a zatim slede M306I i M306V sa učestalošću od po 15%. Time je pokazano da genetičku osnovu rezistencije na E kod MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji primarno čine Q497R, M306I i M306V, odnosno tri mutacije *embB* gena koje se inače smatraju visoko pouzdanim markerima rezistencije na ovaj ATL (Sandgren i sar. 2009). Takođe, učestalost *embB* mutacija, koja među lokalnim sojevima fenotipski rezistentnim na E iznosi 100%, odgovara vrednostima ustanovljenim u ranijim studijama (Zhang i sar. 2014b). Postoji razlika u učestalosti pojedinačnih mutacija. Naime, učestalost *embB* mutacija na poziciji 306 kod lokalnih MDR izolata niža je od učestalosti u genomima izolata iz Koreje, Kine, Kube, Dominikanske Republike, Poljske, Rusije i Nemačke, kod kojih su upravo ove mutacije predominantni uzrok rezistencije na E (Bakula i sar. 2013). Pored toga, najučestalija *embB* mutacija u našoj kolekciji MDR sojeva, Q497R, visoko je značajno povezana sa TUR genotipom i pripadnošću klasteru, čime se ova mutacija ističe kao jedna od najznačajnijih mutacija za aktivnu transmisiju MDR TB u našoj zemlji.

U okviru *embA* gena detektovana su četiri SNP u genomima 38,9% izolata, dok su mutacije *embC* gena identifikovane samo kod 5,6% lokalnih MDR sojeva. Najčešća *embA* mutacija, A576T, identifikovana je kod 88,1% izolata koji imaju najmanje jednu *embA* mutaciju. Svi osim jednog lokalnog izolata koji imaju *embA* mutacije imaju i neku od *embB* mutacija. Na osnovu navedenih rezultata i prethodno dokazanog malog značaja *embA* i *embC* mutacija u nastanku rezistencije na E u poređenju sa *embB* mutacijama (Sandgren i sar. 2009), možemo zaključiti da *embA* i *embC* mutacije ne doprinose značajno razvoju rezistencije na E u kolekciji lokalnih MDR sojeva MTB. Međutim, A576T *embA* gena je sa visokom značajnošću udružena sa lokalnim TUR sojevima i pripadnošću klasteru, što znači da ova mutacija spada u važne determinante aktivne transmisije MDR TB u Srbiji.

U analiziranoj kolekciji MDR sojeva, fenotipska rezistencija na E je potvrđena genotipski za 97% izolata. Međutim, čak 22,5% izolata fenotipski osetljivih na E ima bar jedan SNP u *embA*, *embB* i/ili *embC* genima. Prisustvo *embB* mutacija u sojevima koji su fenotipski osetljivi na E može se objasniti na nekoliko načina. Naime, rezultati pojedinih studija pokazali su da postoji snažna povezanost između *embB* 306 mutacija i MDR fenotipa, odnosno da *embB* 306 mutacije inhibiraju sinergistički efekat ATL koji se koriste u kombinaciji u terapiji MDR TB. Molekularni mehanizmi koji stoje iza ovog fenomena još uvek nisu poznati, ali je jedna od pretpostavki izmena permeabilnosti ćelijskog zida usled *embB* 306 mutacija (Bakula i sar. 2013). Drugo objašnjenje odsustva korelacije između mutacija *embB* gena i fenotipske osetljivosti sojeva MTB na E odnosi se na kumulativni efekat multiplih mutacija na razvoj rezistencije na E. Drugim rečima, moguće je da su sojevi koji nose samo *embB* mutacije osetljivi na E jer ove mutacije nisu dovoljne za nastanak rezistencije, već je neophodno da pored njih postoje izmene i u nekim drugim genskim lokusima. Konačno, jasno je pokazano da fenotipski testovi za ispitivanje osetljivosti na E nisu dovoljno precizni. Najčešće je u pitanju pogrešna detekcija fenotipske osetljivosti na E upravo kod onih izolata koji imaju *embB* mutacije. Zbog ovog problema, Zhang i saradnici (2014b) predložili su da test izbora za ispitivanje osetljivosti na E, umesto metoda proporcije na LJ podlozi koji prema preporukama SZO trenutno predstavlja zlatni standard, bude bujon dilucionni test. Pokazano je da bujon dilucionni metod ima bolju korelaciju sa rezultatima detekcije *embB* mutacija kod MDR sojeva MTB (Zhang i sar. 2014b).

U okviru *embA* gena lokalnih Beijing izolata detektovana su dva filogenetski informativna SNP, koji su već ranije opisani za Beijing liniju, Q38Q i C76C (Feuerriegel i sar. 2014). Takođe, u okviru *embC* gena identifikovan je SNP R927R koji, prema podacima Molecular Mycobacteriology Group, Forschungszentrum Borstel, predstavlja SNP filogenetski informativan za referentni soj *M. tuberculosis* H37Rv. Ovaj podatak potvrđen je detekcijom R927R u genomima svih analiziranih 108 MDR sojeva iz naše kolekcije. U genomima svih 19 lokalnih MDR sojeva koji su klasifikovani kao Haarlem genotip, detektovana je mutacija V981L *embC* gena, koja je, na osnovu analiza referentne kolekcije sojeva Molecular Mycobacteriology Group, Forschungszentrum Borstel, prepoznata kao filogenetski marker za Haarlem, Ghana i X linije MTB.

5.4.2.5. Genetička osnova rezistencije na Z kod MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji

Ključni uzrok rezistencije lokalnih MDR sojeva na Z predstavljaju mutacije *pncA* gena, koje su i najčešći uzrok rezistencije MTB na Z na globalnom nivou (Napiorkowska i sar. 2014). Ove mutacije identifikovane su u genomima 50% ispitivanih MDR sojeva MTB. Najčešće mutacije u okviru *pncA* gena dešavaju se na kodonima 6-15, 50-70, 90-100, 130-145 i 170-175 (Miotto i sar. 2014), što je potvrđeno i u našem istraživanju. U ispitivanoj kolekciji MDR sojeva identifikovana je najmanje jedna mutacija u svakom od ovih regiona. Pored toga, detekcija čak 25 SNP u lokalnoj kolekciji MDR izolata predstavlja potvrdu već dokazanog velikog diverziteta *pncA* gena (Napiorkowska i sar. 2014). Na osnovu velikog diverziteta i izražene nasumične lokalizacije mutacija u okviru *pncA* gena, moglo bi se očekivati da samo epidemiološki povezani sojevi imaju iste mutacije, što je u našoj kolekciji dokazano na primeru dva od tri Beijing klastera (Tabela 31). Međutim, opisani su i klasteri MTB sa različitim *pncA* mutacijama, što je takođe pokazano u našoj studiji na primerima S (Tabela 32) i TUR klastera (Tabela 36). Smatra se da je pojava različitih *pncA* mutacija u genomima sojeva iz istih lanaca transmisije najverovatnije posledica negativnog uticaja *pncA* mutacija na sposobnost transmisije MTB (den Hertog i sar. 2015). Ipak, mi smo za najčešću mutaciju *pncA* gena koja je dokazana u našem istraživanju, V7G, ustanovili pozitivnu korelaciju sa sposobnošću transmisije ispitivanih MDR sojeva MTB. U pitanju je mutacija za koju je i ranijim istraživanjima pokazano da je visoko pouzdani marker rezistencije na Z (Sandgren i sar. 2009). Mutacija V7G *pncA* gena je u našoj studiji bila značajno udružena sa Beijing genotipom, što je u skladu sa rezultatima ranijih studija odnosno već uočene povezanosti Beijing genotipa sa *pncA* mutacijama (Xia i sar. 2015). Osim toga, V7G *pncA* je u našoj studijskoj kolekciji MDR sojeva značajno udružena sa pripadnošću klasteru, odnosno predstavlja jednu od važnih determinanti aktivne transmisije MDR TB u našoj zemlji. Mutacije *rpsA* gena, Rv2731 i Rv3169 regiona pominju se u ranijim studijama kao mogući uzroci rezistencije na Z (Shi i sar. 2011; Bhujji i sar. 2013). Međutim, u lokalnoj populaciji MDR sojeva ove mutacije prisutne su veoma retko. Pored toga, ustanovljene su i kod sojeva osetljivih na Z, tako da njihova uloga u nastanku rezistencije na Z u našoj kolekciji sojeva za sada ostaje nejasna. Korelacija rezultata fenotipskog i genotipskog ispitivanja rezistencije na Z u našoj studiji iznosi 80%, što se može smatrati visokom vrednošću jer su ranija istraživanja

ustanovila korelaciju u opsegu od 41% do 80% (Bhuju i sar. 2013). Ipak, kod preko 20% sojeva rezistentnih na Z u našoj kolekciji nisu detektovane mutacije. Mogući uzrok ovakvog rezultata su lažno pozitivni rezultati fenotipskog testa osetljivosti odnosno detekcija lažne fenotipske rezistencije na Z, koja inače predstavlja čestu grešku. Smatra se da je najvažniji faktor koji dovodi do lažno pozitivne fenotipske rezistencije na Z veličina bakterijskog inokuluma. Naime, amonijak koji nastaje kao produkt bakterijskog metabolizma povećava pH vrednost hranljive podloge na kojoj se izvodi test osetljivosti i tako dovodi do inaktivacije Z, odnosno lažne slike rasta sojeva MTB u prisustvu ovog ATL (Bhuju i sar. 2013)

U genomima svih lokalnih Beijing sojeva identifikovan je SNP R212R *rpsA* gena, za koji je i ranije utvrđeno da predstavlja filogenetski informativan SNP za ovaj genotip MTB (Feuerriegel i sar. 2014).

5.4.2.6. Genetička osnova rezistencije na FLQ kod MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji

Rezistencija MDR sojeva MTB na FLQ u Srbiji primarno je uzrokovana mutacijama u okviru *gyrA* gena, koje su identifikovane u genomima 40% svih MDR izolata i svih izolata rezistentnih na FLQ, što je u skladu sa rezultatima prethodnih studija (Zhang i sar. 2013). Međutim, neočekivan rezultat je da čak 86% lokalnih MDR sojeva sa *gyrA* mutacijama ima mutaciju SNP V742L. U pitanju je mutacija, koja prema našim saznanjima, do sada nije detektovana u genomima sojeva MTB rezistentnih na FLQ (Sandgren i sar. 2009). Mutacije *gyrA* na pozicijama 90, 91 i 94, koje se smatraju visoko pouzdanim markerima rezistencije na FLQ i čija učestalost na globalnom nivou iznosi 50-83% (Sandgren i sar. 2009; Zhang i sar. 2013), detektovane su kod 35% lokalnih izolata sa *gyrA* mutacijama, što je značajno manje od proporcije izolata sa V742L mutacijom. Ovakav rezultat dovodi u pitanje ranije dokazanu opravdanost primene komercijalnih molekularnih testova za brzo otkrivanje XDR sojeva MTB u Srbiji (Živanović i sar. 2012). Ovi testovi detektuju rezistenciju na FLQ na osnovu ispitivanja prisustva mutacija *gyrA* na pozicijama 90, 91 i 94. Predominacija mutacije V742L u *gyrA* genu, koja je ustanovljena u našem istraživanju, praktično znači da bi osetljivost ovih testova za detekciju rezistencije na FLQ u populaciji MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji bila niska. Pored toga, od 43 izolata sa *gyrA* mutacijama, čak 53,3% sojeva bilo

je fenotipski osetljivo na FLQ. Sumirano, rezultati našeg istraživanja pokazuju da se *gyrA* mutacije ne mogu smatrati dovoljno pouzdanim molekularnim markerima za rezistenciju na FLQ kod MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji. Ustanovljena predominacija V742L mutacije u *gyrA* genima lokalnih MDR sojeva potpuno je različita od rezultata dosadašnjih studija o nedvosmisleno dominantnom značaju *gyrA* i mutacija na pozicijama 90, 91 i 94 *gyrA* gena za nastanak rezistencije na FLQ na globalnom nivou. Ipak, naš rezultat ne osporava značaj mutacija na pozicijama 90, 91 i 94 *gyrA* gena za nastanak rezistencije na FLQ. Naime, iako je mutacija V742L najčešća u ispitivanoj kolekciji izolata, ovu mutaciju *gyrA* gena ima 72,4% lokalnih MDR sojeva koji su fenotipski osetljivi na FLQ, a čak 75% sojeva sa V742L mutacijom i fenotipskom rezistencijom na FLQ pored ove ima i neku od mutacija na pozicijama 90, 91, 94 i 105. Samo kod jednog izolata rezistentnog na FLQ detektovano je prisustvo samo mutacije V742L.

Sa druge strane, rezultati naše studije pokazali su da postoji visoko značajna udruženost V742L sa TUR genotipom i pripadnošću klasteru, što znači da V742L ipak ima značaja u aktivnoj transmisiji MDR TB u Srbiji. U tom smislu, moglo bi se pretpostaviti da je neočekivano visoka učestalost mutacije V742L u genomima lokalnih MDR sojeva na izvestan način povezana sa njihovom sposobnošću transmisije. U prilog ovoj pretpostavci idu rezultati ranijih studija koje su pokazale epistazu između mutacija koje dovode do rezistencije na ATL, posebno mutacija *gyrA* i *rpoB* gena. Tako je, na primer, pokazano da nepatogeni sojevi *M. smegmatis* koji istovremeno nose određene *gyrA* i *rpoB* mutacije imaju bolji „fitnes“ tokom kompetitivnog rasta pod standardnim *in vitro* uslovima od sojeva koji nose mutacije u samo jednom od ova dva gena. Još značajniji nalaz je da su identične *gyrA/rpoB* SNP kombinacije identifikovane u panelu kliničkih XDR izolata MTB (Koch i sar. 2014). Ovakvi rezultati jasno ukazuju na to da epistaza između mutacija koje dovode do rezistencije na ATL može imati ključni uticaj na „fitnes“ sojeva MTB rezistentnih na ATL i čak determinisati put sticanja multiplih mutacija (Koch i sar. 2014). U ovom kontekstu bi se moglo pretpostaviti i postojanje pozitivne epistaze između mutacije V742L *gyrA* gena i *rpoB* alela u ispitivanoj kolekciji MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji. Naime, svi MDR sojevi grupisani u TUR klasteru imaju V742L mutaciju *gyrA* gena, dok u *rpoB* genu 20 sojeva ima S450L, 15 sojeva ima S450W, a po jedan soj H445Y i H445L mutacije. Stoga je naša pretpostavka

da je mutacija V742L *gyrA* gena verovatno u pozitivnom epistatskom odnosu sa mutacijama S450L i S450W *rpoB* gena. Takođe, rezultati statističke analize pokazali su da je sa negativnim ishodima MDR TB u Srbiji značajno udruženo jedino prisustvo *gyrA* mutacija u genomima MDR sojeva. Iako ni za jednu pojedinačnu mutaciju *gyrA* gena, pa ni za V742L, nije dokazana značajna udruženost sa negativnim ishodima MDR TB, jasno je da ova mutacija zbog ustanovljene asocijacije sa aktivnom transmisijom ima nedvosmislen uticaj na status MDR TB u Srbiji. Hipoteza o postojanju pozitivne epistaze između V742L *gyrA* mutacije i S450 i S450W *rpoB* mutacija u ispitivanoj populaciji lokalnih MDR sojeva je jedno moguće objašnjenje, ali je jasno da su neophodna detaljnija istraživanja u cilju definitivnog otkrivanja značaja neuobičajene V742L mutacije za rezistenciju na FLQ i „fitnes“ MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji.

U kolekciji MDR sojeva MTB identifikovan je ranije opisan SNP S95T *gyrA* gena, koji je filogenetski informativan za H37Rv slične sojeve (Feuerrriegel i sar. 2014). Ovu mutaciju u našoj kolekciji imaju svi izolati koji pripadaju linijama Beijing, TUR, Haarlem, S i Ural i tri od 22 izolata iz grupe genotipova Clade 1. Takođe, u okviru *gyrA* gena svih lokalnih izolata, osim onih koji pripadaju grupi Clade 1, detektovan je i SNP E21Q, koji je prema analizama referentne kolekcije Molecular Mycobacteriology Group, Forschungszentrum Borstel, filogenetski marker referentnog soja *M. tuberculosis* H37Rv. Za ovakav nalaz odnosno odsustvo E21Q u genomima izolata koji pripadaju genotipu Clade 1 ne postoji očigledno objašnjenje. Može se samo pretpostaviti jedinstvena genetička specifičnost lokalnih MDR izolata MTB, koji do sada nisu bili uključeni u navedenu referentnu kolekciju.

5.4.2.7. Genetička osnova rezistencije na ETH kod MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji

Mutacije *ethA* gena identifikovane su kod 20,4% MDR izolata MTB iz naše kolekcije. Izmene *ethA* gena predstavljaju najčešći uzrok rezistencije lokalnih MDR sojeva na ETH, s obzirom da 70,6% (12/17) izolata koji su fenotipski rezistentni na ETH ima *ethA* mutacije. Ovakav rezultat poklapa se sa rezultatima drugih studija, odnosno opsegom učestalosti *ethA* mutacija kod sojeva rezistentnih na ETH koji iznosi od 37 do 100% (Sandgren i sar. 2009; Brossier i sar. 2011). Od ukupno 10 identifikovanih *ethA* SNP,

najzastupljeniji je W256_. Naši rezultati ukazuju i na značajnu udruženost W256_ mutacije sa Beijing sojevima i pripadnošću klasteru, što potvrđuje opisanu udruženost Beijing linije sa rezistencijom na ETH (Baranov i sar. 2009), ali takođe ukazuje i na veliki značaj mutacije W256_ za aktivnu transmisiju MDR TB u Srbiji. Osim G43S, sve ostale *ethA* mutacije identifikovane u genomima lokalnih sojeva MTB do sada su detektovane retko ili uopšte nisu detektovane. Ipak, ovakav rezultat je u skladu sa rezultatima ranijih istraživanja (Brossier i sar. 2011). Naime, u *ethA* genu do sada je detektovano na stotine različitih SNP i nijedna mutacija ovog gena do sada nije izdvojena kao najčešći uzrok rezistencije na ETH, što ukazuje na postojanje dodatnih mehanizama rezistencije na ovaj ATL (Brossier i sar. 2011). U našoj kolekciji MDR sojeva identifikovana je i F110L mutacija *ethR* gena, koja je prva opisana *ethR* mutacija povezana sa rezistencijom na ETH (Brossier i sar. 2011). Ipak, ova mutacija je u lokalnoj kolekciji MDR sojeva detektovana u genomu samo jednog soja koji je bio fenotipski osetljiv na ETH, što znači da ova mutacija zapravo nema značaja u nastanku rezistencije na ETH u Srbiji. Neku od mutacija *fabG1* i *inhA* promotera, kao i *mshA* i *ethR* gena ima svega 29,4% (5/17) lokalnih MDR izolata fenotipski rezistentnih na ETH, što pokazuje da izmene ovih gena odnosno regiona ne utiču značajno na rezistenciju na ETH u našoj populaciji.

U okviru *mshA* gena 16 lokalnih Beijing sojeva MTB detektovan je SNP A187V, koji je već opisan kao filogenetski marker modernih Beijing sojeva (Feuerriegel i sar. 2014). Takođe, u genomima svih Haarlem izolata identifikovan je N111S, za koji je i ranije dokazano da je filogenetski marker ove linije (Feuerriegel i sar. 2014). Kod svih lokalnih TUR sojeva detektovan je SNP L244L, koji se prema podacima Molecular Mycobacteriology Group, Forschungszentrum Borstel i smatra markerom TUR linije.

5.4.2.8. Genetička osnova rezistencije na AM i CM kod MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji

Fenotipska korezistencija na AM i CM potvrđena je detekcijom A1401G mutacije *rrs* gena kod 17 izolata, dok jedan izolat koji je bio rezistentan na oba ATL i jedan rezistentan samo na CM nisu imali nijednu mutaciju. Na osnovu ovih rezultata jasno je da dominantni uzrok rezistencije na AM i CM u kolekciji lokalnih MDR izolata MTB predstavlja mutacija A1401G *rrs* gena. Ova mutacija je i ranije dokazana kao

predominantni uzrok rezistencije bacila TB na AM i CM u Srbiji (Živanović i sar. 2012), a ujedno predstavlja i najčešću mutaciju odgovornu za rezistenciju na ove lekove u svetu (Johansen i sar. 2006; Georghiou i sar. 2012).

U okviru *tlyA* gena, koji se dovodi u vezu sa rezistencijom na CM, kod svih analiziranih MDR sojeva iz naše kolekcije identifikovan je SNP L11L. Prema podacima Molecular Mycobacteriology Group, Forschungszentrum Borstel, u pitanju je filogenetski marker referentnog soja *M. tuberculosis* H37Rv.

5.4.3. Kompenzatorne mutacije u genomima MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji

Pojedine mutacije koje umanjuju negativne efekte mutacija odgovornih za rezistenciju na „fitnes“ sojeva MTB već su navedene u prethodnom delu diskusije, tako da će u ovom odeljku biti navedeni i tumačeni samo najvažniji nalazi ovog istraživanja u vezi sa kompenzatornim mutacijama. Mutacije *rpoC* gena identifikovane su u genomima 52,4%, a mutacije *rpoA* gena u genomima 22% MDR sojeva MTB iz naše kolekcije. Ovako visoke učestalosti *rpoC* i *rpoA* mutacija daleko prevazilaze vrednost od 19,2%, koliko iznosi učestalost ovih mutacija u genomima MDR sojeva MTB na globalnom nivou, ali i 31,3% koliko iznosi u Gruziji, Uzbekistanu i Kazahstanu, vodećim područjima po vrednostima prevalencije MDR TB (Comas i sar. 2012). Od ukupnog broja sojeva sa *rpoC* mutacijama, 38,2% ima G594E mutaciju, dok 20% ima L516P, 14% V431M, a 10,9% mutaciju F452L. Od tri detektovana SNP u *rpoA* genu, najvišu učestalost od čak 87%, ima mutacija P25R. Sumirano, ukupno 81,9% izolata svrstanih u klastere u našoj kolekciji ima mutacije *rpoC* i/ili *rpoA* gena, što potvrđuje rezultate prethodnih studija, odnosno ulogu *rpoA* i *rpoC* mutacija u kompenzaciji negativnog uticaja pojedinih *rpoB* mutacija na sposobnost transmisije MDR sojeva MTB (Comas i sar. 2012; De Vos i sar. 2013). Rezultati naše studije ukazuju na udruženost Beijing genotipa sa L516P mutacijom *rpoC*, kao i Haarlem sojeva sa G594E *rpoC*, što je takođe potvrda rezultata ranijih studija koje govore o faktorima koji doprinose uspehu ove dve linije kada je u pitanju transmisija MDR TB (Comas i sar. 2012). Osim toga, rezultati naše studije ukazuju i na značajnu udruženost F452L i V431M *rpoC*, kao i P25R *rpoA* mutacija sa TUR genotipom, čime je definitivno dokazana predominantna uloga TUR sojeva u aktivnoj transmisiji MDR TB u Srbiji. Ustanovljena povezanost najučestalijih kompenzatornih mutacija sa dva genotipa za koje je već dokazano da imaju ogroman

uticaj na globalnu transmisiju MDR TB, kao i sa TUR linijom koja je ključna za aktivnu transmisiju MDR TB u lokalnoj populaciji, je verovatno najbolji pokazatelj velike sposobnosti transmisije MDR sojeva MTB prisutnih u našoj zemlji. Statističkim analizama pokazano je da su sa pripadnošću klasteru u ispitivanoj kolekciji MDR sojeva povezane L516P i V431M *rpoC* i P25R *rpoA* mutacije, odnosno da upravo ove mutacije ključno doprinose povećanju transmisibilnosti lokalnih MDR sojeva i da su od presudne važnosti za aktivnu transmisiju MDR TB u našoj zemlji.

5.5. Evolucija TUR klastera MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji

Zahvaljujući uspešnom sekvenciranju genoma ispitivane kolekcije MDR sojeva MTB odnosno detekciji SNP kao nedvosmisleno najpouzdanijih molekularnih markera promenljivosti genoma MTK i najboljih prediktora fenotipskih posledica genskih promena, otkriveni su ključni pokazatelji statusa MDR TB u Srbiji. Iz velikog broja prethodno navedenih i diskutovanih rezultata, ipak se izdvaja potpuno predominantna uloga MDR sojeva MTB TUR genotipa u transmisiji MDR TB u Srbiji. U skladu sa tim, poseban akcenat ove studije stavljen je na istraživanje evolucije lokalnih MDR sojeva MTB koji pripadaju genotipu TUR. Naime, više od jedne trećine MDR sojeva i svi XDR sojevi koji su izolovani u Srbiji tokom proteklih šest godina pripadaju TUR genotipu. Kao što je navedeno, to znači da je učestalost TUR genotipa kao uzročnika MDR TB u našoj zemlji značajno viša od učestalosti u Turskoj, za koju se TUR smatra autohtonom filogenetskom linijom (Kisa i sar. 2012). Čak 95% svih lokalnih TUR izolata nalazi se u TUR 1 klasteru odnosno u jednom lancu aktivne transmisije, što je jedinstven slučaj do sada u svetu kada je reč o TUR genotipu. Kada uzmemo u obzir kompletnu lokalnu kolekciju MDR sojeva MTB, preko polovine svih slučajeva MDR TB i 90% slučajeva XDR TB koji su posledica aktivne transmisije u Srbiji grupisano je u TUR 1 klasteru. Lokalni TUR sojevi su visoko značajno udruženi sa shizofrenijom kao komorbiditetom i hospitalizacijom u Specijalnoj bolnici za plućne bolesti „Budislav Babić“ Bela Crkva, a shizofrenija i hospitalizacija u navedenoj bolnici predstavljaju jedine faktore rizika za aktivnu transmisiju MDR TB u Srbiji. Takođe, TUR genotip u našoj zemlji je visoko značajno udružen sa rezistencijom na S i E, a fenotipska rezistencija na ova dva antibiotika je značajno udružena sa pripadnošću klasteru u lokalnoj populaciji. Konačno, dokazana je značajna udruženost lokalnih TUR sojeva sa

mutacijama K43R *rpsL*, S315T *katG*, S450W *rpoB*, F452L i V431M *rpoC*, P25R *rpoA*, A576T *embA*, Q497R *embB* i V742L *gyrA* gena. Sve navedene mutacije, osim K43R *rpsL* i F452L *rpoC* gena, su prema rezultatima naše studije značajno udružene sa pripadnošću MDR sojeva koji ih poseduju klasterima, odnosno ključne su za aktivnu transmisiju MDR TB sojeva u Srbiji.

Na osnovu izračunate stope mutacija od $1,08 \times 10^{-7}$, procenjeno je da poslednji zajednički ancestor današnjih TUR sojeva datira od pre 1992. godine (1983-2000.), odnosno da je u našoj populaciji postojao čak 16 godina pre izolovanja prvog MDR soja koji je uključen u ovu studiju. Po svom genotipskom profilu rezistencije, zajednički ancestor lokalnih TUR sojeva imao je pre-MDR profil i evoluirao je u dve grane. Verovatnoća da su TUR izolati obuhvaćeni ovim istraživanjem nastali kao posledica prisustva super transmitora u populaciji u Srbiji nije isključena, ali je po genotipskim profilima rezistencije dve grane koje su nastale od TUR ancestoru verovatnije da je reč o nastanku dva potpuno nezavisna lanca transmisije. Drugim rečima, naša hipoteza zasniva se na tome da je veliki broj TUR izolata u lokalnoj populaciji nastao od ancestoru usled pojave SNP koji su akumulirani pre inicijalne transmisije i poboljšali „fitnes“ svake od dve grane odnosno klona. Pre-MDR TUR ancestor nije bio rezistentan na R i imao je mutacije *katG* S315T, *rpsL* K43R, *embB* Q497R, *embA* A576T i *gyrA* V742L. SNP koji je, prema dosadašnjim saznanjima, mogao održati sposobnost transmisije ancestoru je S315T *katG* i, moguće, V742L *gyrA*. Prema rezultatima našeg istraživanja, dolazi do istovremene fiksacije mutacija S450W *rpoB* i P25R *rpoA* gena odnosno pojave rezistencije na R i 1992. godine se od TUR ancestoru odvaja prva grana koja rezultira nastankom 20 MDR sojeva MTB, od kojih 11 razvija XDR profil. Fiksacija navedenih mutacija *rpoB* i *rpoA* gena je najverovatnije bila posledica selektivnog pritiska ATL usled njihove neracionalne upotrebe. Deset godina kasnije, 2002. godine (1997-2006.), od ancestoru se odvija novija grana koja stiče S450L *rpoB* mutaciju i rezultira nastankom 15 MDR sojeva. U nekom trenutku posle 2002. godine, od TUR ancestoru nezavisno su nastale i dve podgrane sa H445Y odnosno H445L *rpoB* mutacijama, koje daju svega dva MDR soja. Na taj način formiran je najveći klaster MDR sojeva MTB u Srbiji, koji se prema našem saznanju u populaciji održava najmanje 23 godine. Očigledno nepoklapanje vremena izolovanja TUR sojeva iz naše kolekcije (2008-2014. godina) i njihove evolutivne starosti najverovatnije je posledica

različite selekcije MDR sojeva MTB u organizmu domaćina, odnosno koevolucije domaćina i patogena.

Uloga faktora virulencije, odnosno funkcionalnih produkata SNP koji su tokom evolucije TUR klastera zbog blizine sa mutacijama u genima rezistencije bili zajedno sa njima fiksirani u populaciji bacila, a koja bi mogla objasniti klonsku ekspanziju TUR izolata u našoj studiji, nije dokazana. Iako je dokazano prisustvo pojedinih faktora koji se smatraju ključnim za opstanak mikobakterija unutar fagozoma tokom latentne i aktivne faze TB (Padilla-Benavides i sar. 2013; Novoa-Aponte i sar. 2014) i članova najveće familije toksin-antitoksin sistema MTB značajnih u uspostavljanju latentne TB (Ramage i sar. 2009; Sala i sar. 2014), s obzirom na njihovu još uvek nedovoljno razjašnjenu ulogu, ovi faktori se za sada isključuju kao odgovorni za klonsku ekspanziju TUR sojeva u Srbiji. Smatramo da je TUR klaster najverovatnije posledica pozitivne selekcije određenih mutacija u genima rezistencije, do koje je najverovatnije došlo usled neracionalne primene ATL u Srbiji pre oko 20 godina, kao i kompenzatornih mutacija čija uloga je bila da umanje negativan uticaj mutacija rezistencije na sposobnost transmisije sojeva. Istorijski kontekst odnosno situacija u Srbiji i regionu pre 20 godina ide u prilog ovakvoj pretpostavci. U vreme ratova i opšte oskudice sasvim sigurno nisu postojali uslovi za dosledno i ispravno sprovođenje kompleksnih režima za lečenje TB. U pitanju je tipičan primer uloge ljudskog faktora, u ovom slučaju neodgovarajućeg lečenja TB, u evoluciji. Okidač generisanja visoko transmisibilnih potomaka TUR anastora bila je shizofrenija, kao dokazani faktor rizika za TB, ali i jedan od ključnih uzroka neuspešnog sprovođenja terapije TB i sledstvene dodatne pozitivne selekcije mutacija u genima rezistencije. Dugotrajna i ponavljana hospitalizacija obolelih od shizofrenije u neadekvatnim uslovima u Specijalnoj bolnici za plućne bolesti „Budislav Babić“ Bela Crkva favorizovala je aktivnu transmisiju MDR mutanata.

Rezultati ovog istraživanja, pre svega izuzetno visok stepen aktivne transmisije MDR sojeva MTB i predominacija intrahospitalne transmisije kao najvažniji ustanovljeni pokazatelji statusa MDR TB u Srbiji, jasno ukazuju na dugogodišnju suboptimalnu kontrolu transmisije MDR TB u našoj zemlji, posebno u vulnerabilnim kategorijama populacije, i potrebu za neodložnim uvođenjem mera za adekvatnu kontrolu transmisije jedne od najozbiljnijih pretećih infektivnih bolesti današnjice.

6. Zaključci

Na osnovu rezultata istraživanja izvedeni su sledeći zaključci:

1. Jedina vrsta MTK koja je dokazana kao izazivač TB i MDR TB u Srbiji je vrsta *M. tuberculosis*, najčešći izazivač TB i MDR TB i na globalnom nivou. Nije isključena mogućnost sporadičnog pojavljivanja ostalih vrsta MTK kao izazivača TB i MDR TB, ali je jasno pokazano da TB kao zoonoza nema značaja u Srbiji.
2. MDR sojevi MTB izolovani u Srbiji pripadaju filogenetskim linijama TUR, Clade 1, Haarlem, Beijing, S i Ural.
3. Ključna filogenetska linija MTB za širenje MDR TB u Srbiji je TUR linija, što je jedinstven nalaz za sojeve ovog genotipa na globalnom nivou. Dokazano prisustvo agresivnih Beijing i Haarlem genotipova predstavlja pretnju za dalju kontrolu MDR TB u Srbiji.
4. Približno dve trećine slučajeva MDR TB u Srbiji rezultat je skorašnje transmisije. Ovako visok nivo skorašnje transmisije jasno ukazuje na suboptimalnu kontrolu širenja MDR TB u našoj zemlji.
5. Jedini identifikovani faktori rizika za skorašnju transmisiju MDR TB u Srbiji su shizofrenija kao komorbiditet i hospitalizacija psihijatrijskih bolesnika u Specijalnoj bolnici za plućne bolesti „Budislav Babić“ Bela Crkva.
6. Najvažniji oblik transmisije MDR TB u Srbiji je intrahospitalna transmisija među psihijatrijskim pacijentima. Ostali prepoznati oblici aktivne transmisije su male socijalne i porodične epidemije, izazvane različitim genotipovima MDR sojeva MTB, kao i verovatna transmisija MDR sojeva Beijing i Haarlem linija kratkotrajnim kontaktom.
7. U genomima MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji detektovano je ukupno 170 mutacija u 33 gena povezana sa rezistencijom na ATL prve i druge linije, a ustanovljene mutacije najviših učestalosti (S450L *rpoB*, S315T *katG*, Q497R *embB*, K43R *rpsL*, V7G *pncA*, A576T *embA*) tipične su za evropske MDR sojeve MTB.
8. Ustanovljeni molekularni markeri rezistencije na ATL prve i druge linije kod MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji odgovaraju tipičnim markerima rezistencije prepoznatim na globalnom nivou. Važan izuzetak su mutacije *gyrA* gena, za koje je pokazano da se ne mogu smatrati pouzdanim markerima rezistencije na FLQ kod

MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji, što ograničava primenljivost komercijalno dostupnih molekularnih eseja za brzo otkrivanje XDR sojeva MTB u našoj zemlji.

9. Udruženost pojedinačnih mutacija rezistencije sa određenim genotipovima ustanovljena kod MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji slična je kao kod ostalih evropskih MDR sojeva MTB.
10. U genomima MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji identifikovano je čak 12 mutacija rezistencije koje ne utiču na sposobnost transmisije ovih sojeva, jer su značajno udružene sa pripadnošću sojeva klasterima. Nije dokazano prisustvo mutacija rezistencije koje umanjuju sposobnost transmisije lokalnih MDR sojeva MTB.
11. U genomima većine (82%) MDR sojeva MTB svrstanih u klastere dokazano je prisustvo važnih kompenzatornih mutacija *rpoA* i *rpoC* gena, a ustanovljena je i značajna udruženost ovih mutacija sa TUR, Beijing i Haarlem filogenetskim linijama, što je jasna potvrda velike sposobnosti transmisije MDR sojeva MTB prisutnih u našoj zemlji.
12. Čak 95% svih lokalnih TUR izolata pripada TUR klasteru 1 odnosno jednom lancu aktivne transmisije. Ovo je do sada najveći opisan klaster MDR sojeva MTB TUR genotipa i rezultati našeg istraživanja pokazuju da je nastao pozitivnom selekcijom mutacija rezistencije, do koje je najverovatnije došlo usled neracionalne primene ATL u Srbiji pre oko 20 godina, kao i selekcijom kompenzatornih mutacija. Kod pacijenata sa shizofrenijom kao komorbiditetom, u genomima sojeva MTB došlo je do dodatne pozitivne selekcije mutacija rezistencije usled neuspešnog sprovođenja terapije TB, a hospitalizacija u neadekvatnim uslovima doprinela je širenju MDR MTB mutanata.

7. Literatura

1. Abadia E, Zhang J, dos Vultos T. i sar. Resolving lineage assignation on Mycobacterium tuberculosis clinical isolates classified by spoligotyping with a new high-throughput 3R SNPs based method. *Infect Genet Evol* 2010;10:1066-74.
2. Abebe F, Bjune G. The emergence of Beijing family genotypes of Mycobacterium tuberculosis and low-level protection by bacille Calmette-Guérin (BCG) vaccines: is there a link? *Clin Exp Immunol* 2006;145:389-97.
3. Achtman M. Insights from genomic comparisons of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2012;367:860-7.
4. Afanas'ev MV, Ikryannikova LN, Il'ina EN. i sar. Molecular characteristics of rifampicin- and isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from the Russian Federation. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:1057-64.
5. Ahmad S, Mokaddas E. Current status and future trends in the diagnosis and treatment of drug-susceptible and multidrug-resistant tuberculosis. *J Infect Public Health* 2014;7:75-91.
6. Ahmad S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection. *Clin Dev Immunol* 2011;814943.
7. Ahmed MM, Mohammed SH, Abood Nasurallah H. i sar. Snapshot of the genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis isolates in Iraq. *Int Jour Mycob* 2014;3:184-96.
8. Al-Hajoj S, Akkerman O, Parwati I. i sar. Microevolution of Mycobacterium tuberculosis in a tuberculosis patient. *J Clin Microbiol* 2010;48:3813-6.
9. Al-Hajoj S, Varghese B, Al-Habobe F. i sar. Current trends of Mycobacterium tuberculosis molecular epidemiology in Saudi Arabia and associated demographical factors. *Infect Genet Evol* 2013;16:362-8.
10. Alexander K, Laver P, Michel A. i sar. Novel Mycobacterium tuberculosis complex pathogen, M. mungi. *Emerg Infect Dis* 2010;16:1296-9.
11. Ali RM, Trovato A, Couvin D. i sar. Molecular epidemiology and genotyping of Mycobacterium tuberculosis isolated in Baghdad. *Biomed Res Int* 2014;580981.
12. Alland D, Lacher D, Hazbón M. i sar. Role of large sequence polymorphisms (LSPs) in generating genomic diversity among clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis and the utility of LSPs in phylogenetic analysis. *J Clin Microbiol* 2007;45:39-46.
13. Alonso H, Samper S, Martín C. i sar. Mapping IS6110 in high-copy number Mycobacterium tuberculosis strains shows specific insertion points in the Beijing genotype. *BMC Genomics* 2013;14:422.

14. Anderson LF, Tamne S, Brown T. i sar. Transmission of multidrug-resistant tuberculosis in the UK: a cross-sectional molecular and epidemiological study of clustering and contact tracing. *Lancet Infect Dis* 2014;14:406-15.
15. Ando H, Kitao T, Miyoshi-Akiyama T. i sar. Downregulation of *katG* expression is associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 2011;79:1615-28.
16. APCCZA. Analiza – tražioni azila u Srbiji i srpski azilanti u Evropi, 2013.
17. Aranaz A, Cousins D, Mateos A. i sar. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1785-9.
18. Aranaz A, Liébana E, Gómez-Mampaso E. i sar. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:1263-73.
19. Bakula Z, Napiórkowska A, Bielecki J. i sar. Mutations in the *embB* gene and their association with ethambutol resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Poland. *Biomed Res Int* 2013;2013:167954.
20. Bang D, Lillebaek T, Thomsen VØ, Andersen AB. Multidrug resistant tuberculosis: treatment outcome in Denmark, 1992-2007. *Scand J Infect Dis* 2010;42:288-93.
21. Bansal-Mutalik R i Nikaido H. *Mycobacterial* outer membrane is a lipid bilayer and the inner membrane is unusually rich in diacyl phosphatidylinositol dimannosides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:4958-63.
22. Baranov AA, Mariandyshev AO, Mannsåker T. i sar. Molecular epidemiology and drug resistance of widespread genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* in northwestern Russia. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13:1288-93.
23. Barnes P, Cave. Molecular epidemiology of tuberculosis. *N Engl J Med* 2003;349:1149-56.
24. Barot K, Nikolova S, Ivanov I. i sar. Antitubercular drug development: current status and research strategies. *Mini Rev Med Chem* 2013;13:1664-84.
25. Beckert P, Hillemann D, Kohl T. i sar. RplC T460C identified as a dominant mutation in linezolid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:2743-5.
26. Bentley D, Balasubramanian S, Swerdlow H. i sar. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 2008;456:53-9.

27. Bentley S, Comas I, Bryant J. i sar. The genome of *Mycobacterium africanum* West African 2 reveals a lineage-specific locus and genome erosion common to the *M. tuberculosis* complex. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6:e1552.
28. Bergval I, Kwok B, Schuitema A. i sar. Pre-existing isoniazid resistance, but not the genotype of *Mycobacterium tuberculosis* drives rifampicin resistance codon preference in vitro. *PLoS One* 2012;7:e29108.
29. Bhuj S, Fonseca Lde S, Marsico AG. I sar. *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Rio de Janeiro reveal unusually low correlation between pyrazinamide resistance and mutations in the *pncA* gene. *Infect Genet Evol* 2013;19:1-6.
30. Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE. i sar. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol* 2002;10:45-52.
31. Bifani PJ, Plikaytis BB, Kapur V. i sar. Origin and interstate spread of a New York City multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clone family. *JAMA* 1996;275:452-7.
32. Blom J, Jakobi T, Doppmeier D. i sar. Exact and complete short-read alignment to microbial genomes using Graphics Processing Unit programming. *Bioinformatics* 2011;27:1351-8.
33. Blouin Y, Cazajous G, Dehan C. i sar. Progenitor “*Mycobacterium canettii*” clone responsible for lymph node tuberculosis epidemic, Djibouti. *Emerg Infect Dis* 2014;20:21-8.
34. Blower S, Chou T. Modeling the emergence of the 'hot zones': tuberculosis and the amplification dynamics of drug resistance. *Nat Med* 2004;10:1111-6.
35. Bonura C, Gomgnimbou MK, Refrégier G. i sar. Molecular epidemiology of tuberculosis in Sicily, Italy: what has changed after a decade? *BMC Infect Dis* 2014;14:602.
36. Boritsch E, Supply P, Honoré N. i sar. A glimpse into the past and predictions for the future: the molecular evolution of the tuberculosis agent. *Mol Microbiol* 2014;93:835-52.
37. Borrell S, Gagneux S. Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13:1456-66.
38. Borrell S, Gagneux S. Strain diversity, epistasis and the evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:815-20.
39. Borrell S, Teo Y, Giardina F. i sar. Epistasis between antibiotic resistance mutations drives the evolution of extensively drug-resistant tuberculosis. *Evol Med Public Health* 2013;2013:65-74.

40. Bos K, Harkins K, Herbig A. i sar. Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. *Nature* 2014;514:494-7.
41. Bottai D, Stinear TP, Supply P. i sar. Mycobacterial pathogenomics and evolution. *Microbiol Spectr* 2014;2.
42. Bozdogan B, Appelbaum P. Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2004;23:113-9.
43. Brennan P. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 2003;83:91-7.
44. Brosch R, Gordon S, Marmiesse M. i sar. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:3684-9.
45. Brosch R, Gordon SV, Pym A. i sar. Comparative genomics of the mycobacteria. *Int J Med Microbiol* 2000;290:143-52.
46. Brossier F, Veziris N, Truffot-Pernot C. i sar. Molecular investigation of resistance to the antituberculous drug ethionamide in multidrug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:355-60.
47. Brudey K, Driscoll J, Rigouts L. i sar. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol* 2006;6:23.
48. Buu TN, van Soolingen D, Huyen MN. i sar. Increased transmission of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains associated with resistance to streptomycin: a population-based study. *PLoS One* 2012;7:e42323.
49. Cáceres O, Rastogi N, Bartra C. i sar. Characterization of the genetic diversity of extensively-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from pulmonary tuberculosis patients in Peru. *PLoS One* 2014;9:e112789.
50. Caminero J, Sotgiu G, Zumla A. i sar. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2010;10:621-9.
51. Campbell E, Korzhova N, Mustaev A. i sar. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell* 2001;104:901-12.
52. Campbell P, Morlock G, Sikes D. i sar. Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:2032-41.
53. Cardoso R, Cardoso M, Leite C. i sar. Characterization of *ndh* gene of isoniazid resistant and susceptible *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007;102:59-61.

54. Casali N, Nikolayevskyy V, Balabanova Y. i sar. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population. *Nat Genet* 2014;46:279-86.
55. Casali N, Nikolayevskyy V, Balabanova Y. i sar. Microevolution of extensively drug-resistant tuberculosis in Russia. *Genome Res* 2012;22:735-45.
56. Castets M, Boisvert H, Grumbach F. i sar. Tuberculosis bacilli of the African type: preliminary note. *Rev Tuberc Pneumol* 1968;32:179-84.
57. Cave M, Yang Z, Stefanova R. i sar. Epidemiologic import of tuberculosis cases whose isolates have similar but not identical IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns. *J Clin Microbiol* 2005;43:1228-33.
58. Centers for Disease Control (CDC). Transmission of multidrug-resistant tuberculosis among immunocompromised persons in a correctional system--New York, 1991. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1992;41:507-9.
59. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009;58:7-10.
60. Chakraborty S, Gruber T, Barry III C. i sar. Para-aminosalicylic acid acts as an alternative substrate of folate metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 2013;339:88-91.
61. Chang CW, Wu MH, Chuang PC. i sar. Characteristics of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan: a population-based study. *Infect Genet Evol* 2011;11:633-9.
62. Chatterjee A, D'Souza D, Vira T. i sar. Strains of *Mycobacterium tuberculosis* from western Maharashtra, India, exhibit a high degree of diversity and strain-specific associations with drug resistance, cavitary disease, and treatment failure. *J Clin Microbiol* 2010;48:3593-9.
63. Cheng A, Yew W, Chan E. i sar. Multiplex PCR amplicon conformation analysis for rapid detection of *gyrA* mutations in fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:596-601.
64. Clark TG, Mallard K, Coll F. i sar. Elucidating emergence and transmission of multidrug-resistant tuberculosis in treatment experienced patients by whole genome sequencing. *PLoS One* 2013;8:e83012.
65. Co D, Hogan L, Kim S. i sar. Mycobacterial granulomas: keys to a long-lasting host-pathogen relationship. *Clin Immunol* 2004;113:130-6.
66. Cohen T, Murray M. Modeling epidemics of multidrug-resistant *M. tuberculosis* of heterogeneous fitness. *Nat Med* 2004;10:1117-21.

67. Cole ST, Brosch R, Parkhill J. i sar. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998;393:537-44.
68. Cole ST. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology* 2002;148:2919-28.
69. Comas I, Borrell S, Roetzer A. i sar. Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase genes. *Nat Genet* 2012;44:106-10.
70. Comas I, Chakravarti J, Small P. i sar. Human T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* are evolutionarily hyperconserved. *Nat Genet* 2010;42:498-503.
71. Comas I, Coscolla M, Luo T. i sar. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nat Genet* 2013;45:1176-82.
72. Comas I, Gagneux S. A role for systems epidemiology in tuberculosis research. *Trends Microbiol* 2011;19:492-500.
73. Comas I, Gagneux S. The past and future of tuberculosis research. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000600.
74. Comas I, Homolka S, Niemann S. i sar. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. *PLoS One* 2009;4:e7815.
75. Coscolla M, Barry PM, Oeltmann JE. i sar. Genomic epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* during transcontinental spread. *J Infect Dis* 2015;212:302-10.
76. Coscolla M, Gagneux S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Semin Immunol* 2014;26:431-44.
77. Coscolla M, Gagneux S. Does *M. tuberculosis* genomic diversity explain disease diversity? *Drug Discov Today Dis Mech* 2010;7:e43-e59.
78. Coscolla M, Lewin A, Metzger S i sar. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex isolate from a wild chimpanzee. *Emerg Infect Dis* 2013;19:969-76.
79. Cousins D, Bastida R, Cataldi A. i sar. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:1305-14.
80. Couvin D, Rastogi N. The establishment of databases on circulating genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* complex and web tools for an effective response to better monitor, understand and control the tuberculosis epidemic worldwide. *Euro reference* 2014;12:36-48.

81. Cowan L, Diem L, Brake M. i sar. Transfer of a Mycobacterium tuberculosis genotyping method, Spoligotyping, from a reverse line-blot hybridization, membrane-based assay to the Luminex multianalyte profiling system. *J Clin Microbiol* 2004;42:474-7.
82. Cowan L, Diem L, Monson T. i sar. Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of Mycobacterium tuberculosis isolates in the United States. *J Clin Microbiol* 2005;43:688-95.
83. Cowley D, Govender D, February B. i sar. Recent and rapid emergence of W-Beijing strains of Mycobacterium tuberculosis in Cape Town, South Africa. *Clin Infect Dis* 2008;47:1252-9.
84. Cubillos-Ruiz A, Morales J, Zambrano M. Analysis of the genetic variation in Mycobacterium tuberculosis strains by multiple genome alignments. *BMC Res Notes* 2008;1:110.
85. Cubillos-Ruiz A, Sandoval A, Ritacco V. i sar. Genomic signatures of the haarlem lineage of Mycobacterium tuberculosis: implications of strain genetic variation in drug and vaccine development. *J Clin Microbiol* 2010;48:3614-23.
86. Da Silva A, Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: classical and new drugs. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:1417-30.
87. Dale J, Brittain D, Cataldi A. i sar. Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the Mycobacterium tuberculosis complex: recommendations for standardised nomenclature. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001;5:216-9.
88. Dale J. Mobile genetic elements in mycobacteria. *Eur Respir J Suppl* 1995;20:633s-648s.
89. Daley C, Small P, Schecter G. i sar. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. An analysis using restriction-fragment-length polymorphisms. *N Engl J Med* 1992;326:231-5.
90. Dalla Costa E, Ribeiro M, Silva M. i sar. Correlations of mutations in katG, oxyR-ahpC and inhA genes and in vitro susceptibility in Mycobacterium tuberculosis clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America. *BMC Microbiol* 2009;9:39.
91. Dark M. Whole-genome sequencing in bacteriology: state of the art. *Infect Drug Resist* 2013;6:115-23.

92. Dawson K, Bell A, Kawakami P. i sar. Transmission of *Mycobacterium orygis* (M. tuberculosis complex species) from a tuberculosis patient to a dairy cow in New Zealand. *J Clin Microbiol* 2012;50:3136-8.
93. De Beer JL, Kodmon C, van der Werf MJ. i sar. Molecular surveillance of multi- and extensively drug-resistant tuberculosis transmission in the European Union from 2003 to 2011. *Euro Surveill* 2014;19.
94. De Jong B, Antonio M, Gagneux S. *Mycobacterium africanum* - review of an important cause of human tuberculosis in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4:e744.
95. De Jong B, Hill P, Aiken A. i sar. Progression to active tuberculosis, but not transmission, varies by *Mycobacterium tuberculosis* lineage in The Gambia. *J Infect Dis* 2008;198:1037-43.
96. De Vos M, Müller B, Borrell S. i sar. Putative compensatory mutations in the *rpoC* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* are associated with ongoing transmission. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:827-32.
97. Demay C, Liens B, Burguière T. i sar. SITVITWEB--a publicly available international multimer database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infect Genet Evol* 2012;12:755-66.
98. Denholm JT, Leslie DE, Jenkin GA. i sar. Long-term follow-up of contacts exposed to multidrug-resistant tuberculosis in Victoria, Australia, 1995- 2010. *Int J Tuberc Lung Dis* 2012;16:1320-5.
99. Di Pietrantonio T, Correa J, Orlova M. i sar. Joint effects of host genetic background and mycobacterial pathogen on susceptibility to infection. *Infect Immun* 2011;79:2372-8.
100. Didelot X, Bowden R, Wilson DJ. i sar. Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. *Nat Rev Genet* 2012;13:601-12.
101. Dietze R, Hadad D, McGee B. i sar. Early and extended early bactericidal activity of linezolid in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:1180-5.
102. Diriba B, Berkessa T, Mamo G. i sar. Spoligotyping of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Ethiopia. *Int J Tuberc Lung Dis* 2013;17:246-50.
103. Drobniewski F, Balabanova Y, Nikolayevsky V. i sar. Drug-resistant tuberculosis, clinical virulence, and the dominance of the Beijing strain family in Russia. *JAMA* 2005;293:2726-2731.

104. Drobniewski F, Nikolayevskyy V, Maxeiner H. i sar. Rapid diagnostics of tuberculosis and drug resistance in the industrialized world: clinical and public health benefits and barriers to implementation. *BMC Med* 2013;11:190.
105. Drummond A, Suchard M, Xie D. i sar. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol* 2012;29:1969-73.
106. Durmaz R, Zozio T, Gunal S. i sar. Genetic diversity and major spoligotype families of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from different regions of Turkey. *Infect Genet Evol* 2007;7:513-9.
107. EFSA, ECDC. Scientific report of EFSA and ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. 2012.
108. Engström A, Perskvist N, Werngren J. i sar. Comparison of clinical isolates and in vitro selected mutants reveals that *tlyA* is not a sensitive genetic marker for capreomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:1247-54.
109. European Centre for Disease Prevention and Control (2015). Surveillance report. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe. European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, Sweden.
110. Evans J, Smith E, Banerjee A. i sar. Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence for person-to-person transmission in the UK. *Lancet* 2007;369:1270-6.
111. Fabre M, Hauck Y, Soler C. i sar. Molecular characteristics of "*Mycobacterium canettii*" the smooth *Mycobacterium tuberculosis* bacilli. *Infect Genet Evol* 2010;10:1165-73.
112. Fallico L, Couvin D, Peracchi M. i sar. Four year longitudinal study of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in a region of North-Eastern Italy. *Infect Genet Evol* 2014;26:58-64.
113. Fang Z, Doig C, Morrison N. i sar. Characterization of IS1547, a new member of the IS900 family in the *Mycobacterium tuberculosis* complex, and its association with IS6110. *J Bacteriol* 1999;181:1021-4.
114. Farhat M, Shapiro J, Kieser K. i sar. Genomic analysis identifies targets of convergent positive selection in drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Genet* 2013;45:1183-9.

115. Feuerriegel S, Köser C, Niemann S. Phylogenetic polymorphisms in antibiotic resistance genes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:1205-10.
116. Feuerriegel S, Köser C, Trübe L. i sar. Thr202Ala in *thyA* is a marker for the Latin American Mediterranean lineage of the *Mycobacterium tuberculosis* complex rather than para-aminosalicylic acid resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:4794-8.
117. Filliol I, Motiwala A, Cavatore M. i sar. Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. *J Bacteriol* 2006;188:759-72.
118. Firdessa R, Berg S, Hailu E. I sar. Mycobacterial lineages causing pulmonary and extrapulmonary tuberculosis, Ethiopia. *Emerg Infect Dis* 2013;19:460-3.
119. Fivian-Hughes A, Houghton J, Davis E. *Mycobacterium tuberculosis* thymidylate synthase gene *thyX* is essential and potentially bifunctional, while *thyA* deletion confers resistance to p-aminosalicylic acid. *Microbiology* 2012;158:308-18.
120. Fleischmann R, Alland D, Eisen J. i sar. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol* 2002;184:5479-90.
121. Ford C, Lin P, Chase M. i sar. Use of whole genome sequencing to estimate the mutation rate of *Mycobacterium tuberculosis* during latent infection. *Nat Genet* 2011;43:482-6.
122. Ford C, Shah R, Maeda M. i sar. *Mycobacterium tuberculosis* mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis. *Nat Genet* 2013;45:784-90.
123. Foudraine N, van Soolingen D, Noordhoek G. i sar. Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium microti* in a human immunodeficiency virus-infected patient. *Clin Infect Dis* 1998;27:1543-4.
124. Frothingham R, Hills H, Wilson K. Extensive DNA sequence conservation throughout the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1994;32:1639-43.
125. Gagneux S, Burgos MV, De Riemer K. i sar (a). Impact of bacterial genetics on the transmission of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 2006;2:e61.
126. Gagneux S, De Riemer K, Van T. i sar (b). Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:2869-73.

127. Gagneux S, Small P. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis* 2007;7:328-37.
128. Gagneux S. Fitness cost of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect* 2009;15 Suppl 1:66-8.
129. Gandhi N, Moll A, Sturm A. i sar. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet* 2006;368:1575-80.
130. Gandhi NR, Weissman D, Moodley P. i sar. Nosocomial transmission of extensively drug-resistant tuberculosis in a rural hospital in South Africa. *J Infect Dis* 2013;207:9-17.
131. Garcia-Betancur J, Menendez C, Del Portillo P. i sar. Alignment of multiple complete genomes suggests that gene rearrangements may contribute towards the speciation of *Mycobacteria*. *Infect Genet Evol* 2012;12:819-26.
132. Garzelli C, Lari N, Cuccu B. i sar. Impact of immigration on tuberculosis in a low-incidence area of Italy: a molecular epidemiological approach. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:1691-7.
133. Gavín P, Iglesias M, Jiménez M. i sar. Long-term molecular surveillance of multidrug-resistant tuberculosis in Spain. *Infect Genet Evol* 2012;12:701-10.
134. Gehre F, Antonio M, Faïhun F. i sar. The first phylogeographic population structure and analysis of transmission dynamics of *M. africanum* West African 1--combining molecular data from Benin, Nigeria and Sierra Leone. *PLoS One* 2013;8:e77000.
135. Gencer B, Shinnick T. Molecular Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Turkey. *American Journal of Infectious Diseases* 2005;1:5-11.
136. Georghiou S, Magana M, Garfein R. i sar. Evaluation of genetic mutations associated with *Mycobacterium tuberculosis* resistance to amikacin, kanamycin and capreomycin: a systematic review. *PLoS One* 2012;7:e33275.
137. Ghebremichael S, Groenheit R, Pennhag A. i sar. Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* of the Beijing Genotype Does Not Spread in Sweden. *PLoS One* 2010;5:e10893.
138. Gibson A, Hewinson G, Goodchild T. i sar. Molecular epidemiology of disease due to *Mycobacterium bovis* in humans in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 2004;42:431-4.
139. Gideon H, Flynn J. Latent tuberculosis: what the host "sees"? *Immunol Res* 2011;50:202-12.

140. Gillespie S. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:267-74.
141. Githui WA, Jordaan AM, Juma ES. i sar. Identification of MDR-TB Beijing/W and other *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in Nairobi, Kenya. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004;8:352-60.
142. Gledovic Z, Jovanovic M, Pekmezovic T. Tuberculosis trends in Central Serbia in the period 1956-1996. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4:32-5.
143. Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ. i sar. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg Infect Dis* 2002;8:843-9.
144. Groenen P, Bunschoten A, van Soolingen D. i sar. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol Microbiol* 1993;10:1057-65.
145. Günther G, van Leth F, Alexandru S. i sar. Multidrug-resistant tuberculosis in Europe, 2010-2011. *Emerg Infect Dis* 2015;21:409-16.
146. Gutacker M, Mathema B, Soini H. i sar. Single-nucleotide polymorphism-based population genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from 4 geographic sites. *J Infect Dis* 2006;193:121-8.
147. Gutacker M, Smoot J, Migliaccio C. i sar. Genome-wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. *Genetics* 2002;162:1533-43.
148. Gutierrez C, Brisse S, Brosch R. i sar. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 2005;1:e5.
149. Halouska S, Fenton R, Zinniel D. i sar. Metabolomics analysis identifies d-Alanine-d-Alanine ligase as the primary lethal target of d-Cycloserine in mycobacteria. *J Proteome Res* 2014;13:1065-76.
150. Hanekom M, Gey van Pittius N, McEvoy C. i sar. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: a template for success. *Tuberculosis (Edinb)* 2011;91:510-23.
151. Harding J, Schreiber H, Sandor M. Granuloma transplantation: an approach to study mycobacterium-host interactions. *Front Microbiol* 2011;2:245.
152. Hazbón M, del Valle M, Guerrero M. i sar. Role of embB codon 306 mutations in *Mycobacterium tuberculosis* revisited: a novel association with broad drug resistance and IS6110 clustering rather than ethambutol resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:3794-802.

153. Hegde SS, Vetting MW, Roderick SL. i sar. A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. *Science* 2005;308:1480-3.
154. Hermans P, van Soolingen D, Bik E. i sar. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect Immun* 1991;59:2695-705.
155. Hermans P, van Soolingen D, van Embden J. Characterization of a major polymorphic tandem repeat in *Mycobacterium tuberculosis* and its potential use in the epidemiology of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium goodii*. *J Bacteriol* 1992;174:4157-65.
156. Herrera L, Jiménez S, Valverde A. i sar. Molecular analysis of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Spain (1996-2001). Description of new mutations in the *rpoB* gene and review of the literature. *Int J Antimicrob Agents* 2003;21:403-8.
157. Hershberg R, Lipatov M, Small P. i sar. High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography. *PLoS Biol* 2008;6:e311.
158. Hillemann D, Rüscher-Gerdes S, Richter E. In vitro-selected linezolid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* mutants. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:800-1.
159. Hirsh A, Tsolaki A, DeRiemer K. i sar. Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:4871-6.
160. Hlavsa M, Moonan P, Cowan L. i sar. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the United States, 1995-2005. *Clin Infect Dis* 2008;47:168-75.
161. Homolka S, Projahn M, Feuerriegel S. i sar. High resolution discrimination of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex strains based on single nucleotide polymorphisms. *PLoS One* 2012;7:e39855.
162. Honisch C, Mosko M, Arnold C. i sar. Replacing reverse line blot hybridization spoligotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 2010;48:1520-6.
163. Hsu AH, Lin CB, Lee YS. I sar. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Eastern Taiwan. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010;14:924-6.
164. Illumina sequencing technology. Illumina, San Diego, CA, USA. 2010.
165. Ioerger T, Feng Y, Chen X. i sar. The non-clonality of drug resistance in Beijing-genotype isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from the Western Cape of South Africa. *BMC Genomics* 2010;11:670.

166. Ioerger TR, Koo S, No EG. i sar. Genome analysis of multi- and extensively-drug-resistant tuberculosis from KwaZulu-Natal, South Africa. *PLoS One* 2009;4:e7778.
167. Isea-Peña M, Brezmes-Valdivieso M, Gonzáles-Velasco M. i sar. *Mycobacterium africanum*, an emerging disease in high-income countries? *Int J Tuberc Lung Dis* 2012;16:1400-4.
168. Izveštaj o tuberkulozi u Srbiji za 2009. godinu (2010). Ministarstvo zdravlja Republike Srbije.
169. Izveštaj o tuberkulozi u Srbiji za 2013. godinu (2014). Ministarstvo zdravlja Republike Srbije.
170. Jagielski T, Augustynowicz-Kopeć E, Zozio T. i sar. Spoligotype-based comparative population structure analysis of multidrug-resistant and isoniazid-monoresistant *Mycobacterium tuberculosis* complex clinical isolates in Poland. *J Clin Microbiol* 2010;48:3899-909.
171. Jagielski T, Brzostek A, van Belkum A. i sar. A close-up on the epidemiology and transmission of multidrug-resistant tuberculosis in Poland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015;34:41-53.
172. Jagielski T, Ignatowska H, Bakula Z. i sar (a). Screening for streptomycin resistance-conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Poland. *PLoS One* 2014;9:e100078.
173. Jagielski T, van Ingen J, Rastogi N. i sar (b). Current methods in the molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. *Biomed Res Int* 2014;2014:645802.
174. Jin D, Gross C. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli* *rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *J Mol Biol* 1988;202:45-58.
175. Johansen S, Maus C, Plikaytis B. i sar. Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using *tlyA*-encoded 2'-O-methylations in 16S and 23S rRNAs. *Mol Cell* 2006;23:173-82.
176. Johnson R, Streicher E, Louw G. i sar. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Issues Mol Biol* 2006;8:97-111.
177. Johnson R, Warren R, Strauss OJ. i sar. An outbreak of drug-resistant tuberculosis caused by a Beijing strain in the western Cape, South Africa. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006;10:1412-4.
178. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A. i sar. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997;35:907-14.

179. Karginov F, Hannon G. The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. *Mol Cell* 2010;37:7-19.
180. Karlson A, Lessel E. *Mycobacterium bovis* nom. nov. *Int J Syst Bact* 1970;20:273-82.
181. Kato-Maeda M, Bifani P, Kreiswirth B. i sar. The nature and consequence of genetic variability within *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest* 2001;107:533-7.
182. Kaufmann S. Fact and fiction in tuberculosis vaccine research: 10 years later. *Lancet Infect Dis* 2011;11:633-40.
183. Kiers A, Klarenbeek A, Mendelts B. i sar. Transmission of *Mycobacterium pinnipedii* to humans in a zoo with marine mammals. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008;12:1469-73.
184. Kipar A, Burthe J, Hetzel U. i sar. *Mycobacterium microti* tuberculosis in its maintenance host, the field vole (*Microtus agrestis*): characterization of the disease and possible routes of transmission. *Vet Pathol* 2014;51:903-14.
185. Kisa O, Albay A, Baylan O. i sar. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates at the Military Medical Academy in Ankara, Turkey. *Res Microbiol* 2007;158:318-23.
186. Kisa O, Tarhan G, Gunal S. i sar. Distribution of spoligotyping defined genotypic lineages among drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex clinical isolates in Ankara, Turkey. *PLoS One* 2012;7:e30331.
187. Kjeldsen M, Bek D, Rasmussen E. i sar. Line probe assay for differentiation within *Mycobacterium tuberculosis* complex. Evaluation on clinical specimens and isolates including *Mycobacterium pinnipedii*. *Scand J Infect Dis* 2009;41:635-41.
188. Koch A, Mizrahi V, Warner D. The impact of drug resistance on *Mycobacterium tuberculosis* physiology: what can we learn from rifampicin? *Emerging Microbes and Infections* 2014;3:e17.
189. Koch R. Die Aetiologie der Tuberkulose. *Berliner klinische Wochenschrift* 1882;19:221-230.
190. Kodaman N, Sobota R, Mera R. i sar. Disrupted human-pathogen co-evolution: a model for disease. *Front Genet* 2014;5:290.
191. Ködmön C, Niemann S, Lukács J. i sar. Molecular epidemiology of drug-resistant tuberculosis in Hungary. *J Clin Microbiol* 2006;44:4258-61.
192. Kohl T, Diel R, Harmsen D. i sar. Whole-genome-based *Mycobacterium tuberculosis* surveillance: a standardized, portable, and expandable approach. *J Clin Microbiol* 2014;52:2479-86.
193. Kong Y, Cave M, Yang D. i sar. Distribution of insertion- and deletion-associated genetic polymorphisms among four *Mycobacterium tuberculosis* phospholipase C genes

- and associations with extrathoracic tuberculosis: a population-based study. *J Clin Microbiol* 2005;43:6048-53.
194. Koul A, Arnoult E, Lounis N. i sar. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature* 2011;469:483-90.
 195. Kovalev SY, Kamaev EY, Kravchenko MA. i sar. Genetic analysis of mycobacterium tuberculosis strains isolated in Ural region, Russian Federation, by MIRU-VNTR genotyping. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005;9:746-52.
 196. Kremer K, Bunschoten A, Schouls L. i sar. “Spoligotyping” a PCR-based method to simultaneously detect and type Mycobacterium tuberculosis complex bacteria. National Institute of Public Health and the Environment Bilthoven, the Netherland 2002; version 4.
 197. Kremer K, Van Soolingen D, Frothingham R. i sar. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of Mycobacterium tuberculosis complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 1999;37:2607-18.
 198. Kremer K, van Soolingen D, van Embden J. i sar. Mycobacterium microti: more widespread than previously thought. *J Clin Microbiol* 1998;36:2793-4.
 199. Krnjaic D, Plavsic B, Stanojevic S. Epidemiology of bovine tuberculosis in the Republic of Serbia with a brief overview of the current epidemiological situation in the region. *Zoonotic tuberculosis: Mycobacterium bovis and other pathogenic mycobacteria* 2014;309-322.
 200. Kubica T, Rüsç-Gerdes S, Niemann S. The Beijing genotype is emerging among multidrug resistant Mycobacterium tuberculosis strains from Germany. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004;8:1107-13.
 201. Kurtoglu M, Ozdemir M, Kesli R. i sar. Comparison of the GenoType(®) MTBC Molecular Genetic Assay with culture methods in the diagnosis of tuberculosis. *Arch Med Sci* 2014;10:315-8.
 202. Lange C, Abubakar I, Alffenaar JW. i sar. Management of patients with multidrug resistant/extensively drug-resistant tuberculosis in Europe: a TBNET consensus statement. *Eur Respir J* 2014;44:23-63.
 203. Laprie C, Duboy J, Malik R. i sar. Feline cutaneous mycobacteriosis: a review of clinical, pathological and molecular characterization of one case of Mycobacterium microti skin infection and nine cases of feline leprosy syndrome from France and New Caledonia. *Vet Dermatol* 2013;24:561-9.

204. Lee A, Othman S, Ho Y. i sar. Novel mutations within the embB gene in ethambutol-susceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4447-9.
205. Lee A, Teo A, Wong S. Novel mutations in ndh in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2157-9.
206. Lee M, Lee J, Carroll M. i sar. Linezolid for treatment of chronic extensively drug-resistant tuberculosis. *N Engl J Med* 2012;367:1508-18.
207. Leung E, Ho P, Yuen K. i sar. Molecular characterization of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: identification of a novel mutation in inhA. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1075-8.
208. Leung K, Yip C, Yeung Y. i sar. Usefulness of resistant gene markers for predicting treatment outcome on second-line anti-tuberculosis drugs. *J Appl Microbiol* 2010;109:2087-94.
209. Lin P, Flynn J. Understanding latent tuberculosis: a moving target. *J Immunol* 2010;185:15-22.
210. Liu J, Tran V, Leung A. i sar. BCG vaccines: their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. *Hum Vaccin* 2009;5:70-8.
211. Loeffler S, de Lisle G, Neill M. i sar. The seal tuberculosis agent, *Mycobacterium pinnipedii*, infects domestic cattle in New Zealand: epidemiologic factors and DNA strain typing. *J Wildl Dis* 2014;50:180-7.
212. Louw G, Warren R, Gey van Pittius N. i sar. Rifampicin reduces susceptibility to ofloxacin in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* through efflux. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184:269-76.
213. Machado D, Perdigão J, Ramos J. i sar. High-level resistance to isoniazid and ethionamide in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* of the Lisboa family is associated with inhA double mutations. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:1728-32.
214. Malik A, Godfrey-Faussett P. Effects of genetic variability of *Mycobacterium tuberculosis* strains on the presentation of disease. *Lancet Infect Dis* 2005;5:174-83.
215. Marais BJ, Mlambo CK, Rastogi N. i sar. Epidemic spread of multidrug-resistant tuberculosis in Johannesburg, South Africa. *J Clin Microbiol* 2013;51:1818-25.
216. Maruri F, Sterling T, Kaiga A. i sar. A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrase numbering system. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:819-31.

217. Matsiota-Bernard P, Vrioni G, Marinis E. Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Greece. *J Clin Microbiol* 1998;36:20-3.
218. Maus C, Plikaytis B, Shinnick T. Molecular analysis of cross-resistance to capreomycin, kanamycin, amikacin, and viomycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:3192-7.
219. Mazars E, Lesjean S, Banuls A. i sar. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:1901-6.
220. McElroy PD, Sterling TR, Driver CR. i sar. Use of DNA fingerprinting to investigate a multiyear, multistate tuberculosis outbreak. *Emerg Infect Dis* 2002;8:1252-6.
221. McEvoy C, Falmer A, van Pittius N. i sar. The role of IS6110 in the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 2007;87:393-404.
222. McEvoy C, van Helden P, Warren R. i sar. Evidence for a rapid rate of molecular evolution at the hypervariable and immunogenic *Mycobacterium tuberculosis* PPE38 gene region. *BMC Evol Biol* 2009;9:237.
223. Merker M, Blin C, Mona S. i sar. Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage. *Nat Genet* 2015;47:242-9.
224. Merza MA, Farniaa P, Salih AM. i sar. First insight into the drug resistance pattern of *Mycobacterium tuberculosis* in Dohuk, Iraq: using spoligotyping and MIRU-VNTR to characterize multidrug resistant strains. *J Infect Public Health* 2011;4:41-7.
225. Metcalfe JZ, Kim EY, Lin SY. i sar. Determinants of multidrug-resistant tuberculosis clusters, California, USA, 2004-2007. *Emerg Infect Dis* 2010;16:1403-9.
226. Mikusšová K, Slayden R, Besra G. i sar. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:2484-9.
227. Millard J, Ugarte-Gil C, Moore DA. Multidrug resistant tuberculosis. *BMJ* 2015;350:h882.
228. Miotto P, Cabibbe AM, Feuerriegel S. i sar. *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamide resistance determinants: a multicenter study. *MBio* 2014;5:e01819-14.
229. Mishra A, Driessen N, Appelmelk B. i sar. Lipoarabinomannan and related glycoconjugates: structure, biogenesis and role in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and host-pathogen interaction. *FEMS Microbiol Rev* 2011;35:1126-57.
230. Mokrousov I, Otten T, Zozio T. i sar. At Baltic crossroads: a molecular snapshot of *Mycobacterium tuberculosis* population diversity in Kaliningrad, Russia. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009;55:13-22.

231. Mokrousov I, Vyazovaya A, Otten T. i sar. *Mycobacterium tuberculosis* population in northwestern Russia: an update from Russian-EU/Latvian border region. *PLoS One* 2012;7:e41318.
232. Mokrousov I. Multiple *rpoB* mutants of *Mycobacterium tuberculosis* and second-order selection. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1337-8.
233. Mokrousov I. *Mycobacterium tuberculosis* phylogeography in the context of human migration and pathogen's pathobiology: Insights from Beijing and Ural families. *Tuberculosis (Edinb)* 2015. pii: S1472-9792(15)00032-3.
234. Mokrousov I. The quiet and controversial: Ural family of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Genet Evol* 2012;12:619-29.
235. Montagnani C, Chiappini E, Galli L. i sar. Vaccine against tuberculosis: what's new? *BMC Infect Dis* 2014;14 Suppl 1:S2.
236. Morlock G, Metchock B, Sikes D. i sar. *EthA*, *inhA*, and *katG* loci of ethionamide-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3799-805.
237. Moro ML, Gori A, Errante I. i sar. An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis involving HIV-infected patients of two hospitals in Milan, Italy. Italian Multidrug-Resistant Tuberculosis Outbreak Study Group. *AIDS* 1998;12:1095-102.
238. Mostowy S, Inwald J, Gordon S. i sar. Revisiting the evolution of *Mycobacterium bovis*. *J Bacteriol* 2005;187:6386-95.
239. Mostowy S, Onipede A, Gagneux S. i sar. Genomic analysis distinguishes *Mycobacterium africanum*. *J Clin Microbiol* 2004;42:3594-9.
240. Mukadi Y, Perriens J, St Louis M. i sar. Spectrum of immunodeficiency in HIV-1-infected patients with pulmonary tuberculosis in Zaire. *Lancet* 1993;342:143-6.
241. Müller B, Borrell S, Rose G. i sar (a). The heterogeneous evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Genet* 2013;29:160-9.
242. Müller B, Dürr S, Alonso S. i sar (b). Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerg Infect Dis* 2013;19:899-908.
243. Müller B, Streicher E, Hoek K. i sar. *InhA* promoter mutations: a gateway to extensively drug-resistant tuberculosis in South Africa? *Int J Tuberc Lung Dis* 2011;15:344-51.
244. Murase Y, Maeda S, Yamada H. i sar. Clonal expansion of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis, Japan. *Emerg Infect Dis* 2010;16:948-54.
245. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. *Medical microbiology*. 7th edition, 2013.

246. Namouchi A, Didelot X, Schöck U. i sar. After the bottleneck: Genome-wide diversification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by mutation, recombination, and natural selection. *Genome Res* 2012;22:721-34.
247. Napiórkowska A, Rüsch-Gerdes S, Hillemann D. i sar. Characterisation of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Poland and Germany. *Int J Tuberc Lung Dis* 2014;18:454-60.
248. Narvskaya O, Otten T, Limeschenko E. i sar. Nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by a strain of *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family in St. Petersburg, Russia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:596-602.
249. Newton-Foot M, Gey van Pittius NC. The complex architecture of mycobacterial promoters. *Tuberculosis (Edinb)* 2013;93:60-74.
250. Nextera® XT DNA Sample Preparation Guide. Illumina, San Diego, CA, USA. 2012.
251. Niemann S, Diel R, Khechinashvili G. i sar. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage favors the spread of multidrug-resistant tuberculosis in the Republic of Georgia. *J Clin Microbiol* 2010;48:3544-50.
252. Niemann S, Köser C, Gagneux S. i sar. Genomic diversity among drug sensitive and multidrug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* with identical DNA fingerprints. *PLoS One* 2009;4:e7407.
253. Niemann S, Kubica T, Bange F. i sar. The species *Mycobacterium africanum* in the light of new molecular markers. *J Clin Microbiol* 2004;42:3958-62.
254. Niemann S, Richter E, Dalügge-Tamm H. i sar. Two cases of *Mycobacterium microti* derived tuberculosis in HIV-negative immunocompetent patients. *Emerg Infect Dis* 2000;6:539-42.
255. Niemann S, Richter E, Ruesch-Gerdes S. Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (approved lists 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:433-6.
256. Niemann S, Richter E, Rüsch-Gerdes S. Stability of *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns and spoligotypes determined by analyzing serial isolates from patients with drug-resistant tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1999;37:409-12.
257. Nodieva A, Jansone I, Broka L. i sar. Recent nosocomial transmission and genotypes of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010;14:427-33.

258. Novoa-Aponte L, Ospina C. Mycobacterium tuberculosis P-Type ATPases: Possible Targets for Drug or Vaccine Development. *BioMed Research International* 2014;296986.
259. Oelemann M, Diel R, Vatin V. i sar. Assessment of an optimized mycobacterial interspersed repetitive- unit-variable-number tandem-repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2007;45:691-7.
260. Okamoto S, Tamaru A, Nakajima C. i sar. Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria. *Mol Microbiol* 2007;63:1096-106.
261. Otal I, Gomez A, Kremer K. i sar. Mapping of IS6110 insertion sites in Mycobacterium bovis isolates in relation to adaptation from the animal to human host. *Vet Microbiol* 2008;129:333-41.
262. Otlu B, Durmaz R, Gunal S. i sar. Beijing/W and major spoligotype families of Mycobacterium tuberculosis strains isolated from tuberculosis patients in Eastern Turkey. *New Microbiol* 2009;32:255-63.
263. Pachi A, Bratis D, Moussas G. i sar. Psychiatric morbidity and other factors affecting treatment adherence in pulmonary tuberculosis patients. *Tuberc Res Treat* 2013;2013:489865.
264. Padilla E, González V, Manterola J. i sar. Comparative evaluation of the new version of the INNO-LiPA Mycobacteria and Genotype Mycobacterium assays for identification of Mycobacterium species from MB/BacT liquid cultures artificially inoculated with Mycobacterial strains. *J Clin Microbiol* 2004;42:3083-8.
265. Padilla-Benavides T, Long J, Raimunda D. i sar. A novel P(1B)-type Mn²⁺ transporting ATPase is required for secreted protein metallation in mycobacteria. *J Biol Chem* 2013;288:11334-47.
266. Panaiotov S, Bachiyska E, Yordanova S. i sar. Beijing lineage of MDR Mycobacterium tuberculosis in Bulgaria, 2007-2011. *Emerg Infect Dis* 2014;20:1899-901.
267. Panteix G, Gutierrez M, Boschioli M. i sar. Pulmonary tuberculosis due to Mycobacterium microti: a study of six recent cases in France. *J Med Microbiol* 2010;59:984-9.
268. Parsons L, Somoskövi A, Gutierrez C. i sar. Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource-poor countries: challenges and opportunities. *Clin Microbiol Rev* 2011;24:314-50.

269. Parsons SD, Drewe JA, Gey van Pittius NC. i sar. Novel cause of tuberculosis in meerkats, South Africa. *Emerg Infect Dis* 2013;19:2004-7.
270. Parwati I, van Crevel R, van Soolingen D. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains. *Lancet Infect Dis* 2010;10:103-11.
271. Pasipanodya J, Gumbo T. A new evolutionary and pharmacokinetic-pharmacodynamic scenario for rapid emergence of resistance to single and multiple anti-tuberculosis drugs. *Curr Opin Pharmacol* 2011;11:457-63.
272. Pate M, Svara T, Gombac i sar. Outbreak of tuberculosis caused by *Mycobacterium caprae* in a zoological garden. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2006;53:387-92.
273. Pawlowski A, Jansson M, Sköld M. i sar. Tuberculosis and HIV co-infection. *PLoS Pathog* 2012;8:e1002464.
274. Perez-Lago L, Navarro Y, Garcia de Viedma D. Current knowledge and pending challenges in zoonosis caused by *Mycobacterium bovis*: a review. *Res Vet Sci* 2014;97 Suppl:S94-S100.
275. Perlman D, Segal Y, Rosenkranz S. i sar. The clinical pharmacokinetics of rifampin and ethambutol in HIV-infected persons with tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2005;41:1638-47.
276. Piccaro G, Giannoni F, Filippini P. i sar. Activities of drug combinations against *Mycobacterium tuberculosis* grown in aerobic and hypoxic acidic conditions. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:1428-33.
277. Plinke C, Cox H, Kalon S. i sar. Tuberculosis ethambutol resistance: concordance between phenotypic and genotypic test results. *Tuberculosis (Edinb)* 2009;89:448-52.
278. Pozzi G, Meloni M, Iona E. i sar. RpoB mutations in multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Italy. *J Clin Microbiol* 1999;37:1197-9.
279. Prodinger W, Brandstätter A, Naumann L. i sar. Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *J Clin Microbiol* 2005;43:4984-92.
280. Prodinger W, Eigentler A, Allerberger F. i sar. Infection of red deer, cattle, and humans with *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in western Austria. *J Clin Microbiol* 2002;40:2270-2.
281. Prodinger W, Indra A, Koksalan O. i sar. *Mycobacterium caprae* infection in humans. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2014;12:1501-13.

282. Prozorov A, Zaichikova M, Danilenko V. Mycobacterium tuberculosis Mutants with Multidrug Resistance: History of Origin, Genetic and Molecular Mechanisms of Resistance, and Emerging Challenges. *Russian Journal of Genetics* 2012;48:1–14.
283. Pym A, Saint-Joanis B, Cole S. Effect of katG mutations on the virulence of Mycobacterium tuberculosis and the implication for transmission in humans. *Infect Immun* 2002;70:4955-60.
284. Ramage H, Connolly L, Cox J. Comprehensive functional analysis of Mycobacterium tuberculosis toxin-antitoxin systems: implications for pathogenesis, stress responses, and evolution. *PLoS Genet* 2009;5:e1000767.
285. Ramazanzadeh R, Roshani D, Shakib P. i sar. Prevalence and occurrence rate of Mycobacterium tuberculosis Haarlem family multi-drug resistant in the worldwide population: A systematic review and meta-analysis. *J Res Med Sci* 2015;20:78-88.
286. Regmi SM, Chaiprasert A, Kulawonganunchai S. i sar. Whole genome sequence analysis of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis Beijing isolates from an outbreak in Thailand. *Mol Genet Genomics* 2015. [Epub ahead of print]
287. Reviriego Gordejo F, Vermeersch J. Towards eradication of bovine tuberculosis in the European Union. *Vet Microbiol* 2006;112:101-9.
288. Richter E, Rüscher-Gerdes S, Hillemann D. First linezolid-resistant clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1534-6.
289. Richter E, Weizenegger M, Fahr A. i sar. Usefulness of the GenoType MTBC assay for differentiating species of the Mycobacterium tuberculosis complex in cultures obtained from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2004;42:4303-6.
290. Rindi L, Lari N, Garzelli C. Large Sequence Polymorphisms of the Euro-American lineage of Mycobacterium tuberculosis: a phylogenetic reconstruction and evidence for convergent evolution in the DR locus. *Infect Genet Evol* 2012;12:1551-7.
291. Ritacco V, Iglesias M, Ferrazoli L. i sar (a). Conspicuous multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis cluster strains do not trespass country borders in Latin America and Spain. *Infect Genet Evol* 2012;12:711-7.
292. Ritacco V, López B, Ambroggi M. i sar (b). HIV infection and geographically bound transmission of drug-resistant tuberculosis, Argentina. *Emerg Infect Dis* 2012;18:1802-10.
293. Rodrigo T, Caylà J, de Olalla G. i sar. Characteristics of tuberculosis patients who generate secondary cases. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997;1:352-7.

294. Rodrigues L, Machado D, Couto I. i sar. Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infect Genet Evol* 2012;12:695-700.
295. Roetzer A, Diel R, Kohl T. i sar. Whole genome sequencing versus traditional genotyping for investigation of a *Mycobacterium tuberculosis* outbreak: a longitudinal molecular epidemiological study. *PLoS Med* 2013;10:e1001387.
296. Roetzer A, Schuback S, Diel R. i sar. Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* typing methods in a 4-year study in Schleswig-Holstein, Northern Germany. *J Clin Microbiol* 2011;49:4173-8.
297. Rosas S, Bravo J, Gonzales F. i sar. High clustering rates of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in Panama. *BMC Infect Dis* 2013;13:442.
298. Rovina N, Karabela S, Constantoulakis P. i sar. MIRU-VNTR typing of drug-resistant tuberculosis isolates in Greece. *Ther Adv Respir Dis* 2011;5:229-36.
299. Rullán JV, Herrera D, Cano R. i sar. Nosocomial transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Spain. *Emerg Infect Dis* 1996;2:125-9.
300. Safi H, Sayers B, Hazbón M. i sar. Transfer of embB codon 306 mutations into clinical *Mycobacterium tuberculosis* strains alters susceptibility to ethambutol, isoniazid, and rifampin. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2027-34.
301. Safianowska A, Walkiewicz R, Nejman-Gryz P. i sar. Diagnostic utility of the molecular assay GenoType MTBC (HAIN Lifesciences, Germany) for identification of tuberculous mycobacteria. *Pneumonol Alergol Pol* 2009;77:517-20.
302. Said HM, Kock MM, Ismail NA. i sar. Molecular characterization and second-line antituberculosis drug resistance patterns of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the northern region of South Africa. *J Clin Microbiol* 2012;50:2857-62.
303. Sala A, Bordes P, Genevaux P. Multiple toxin-antitoxin systems in *Mycobacterium tuberculosis*. *Toxins (Basel)* 2014;6:1002-20.
304. Sala C, Dhar N, Hartkoorn R. i sar. Simple model for testing drugs against nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:4150-8.
305. Samper S, Martín C. Spread of extensively drug-resistant tuberculosis. *Emerg Infect Dis* 2007;13:647-8.
306. Sander P, Springer B, Prammananan T. i sar. Fitness cost of chromosomal drug resistance-conferring mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1204-11.

307. Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P. i sar. Tuberculosis drug resistance mutation database. *PLoS Med* 2009;6:e2.
308. Santos L. Review: The Molecular Basis of Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Open Journal of Medical Microbiology* 2012;2:24-36.
309. Savine E, Warren R, van der Spuy G. i sar. Stability of variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2002;40:4561-6.
310. Schöning J, Cerny N, Prohaska S. i sar. Surveillance of bovine tuberculosis and risk estimation of a future reservoir formation in wildlife in Switzerland and Liechtenstein. *PLoS One* 2013;8:e54253.
311. Schürch A, van Soolingen D. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*: from phage typing to whole-genome sequencing. *Infect Genet Evol* 2012;12:602-9.
312. Scorpio A, Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med* 1996;2:662-7.
313. Seidler A, Nienhaus A, Diel R. The transmission of tuberculosis in the light of new molecular biological approaches. *Occup Environ Med* 2004;61:96-102.
314. Seifert M, Catanzaro D, Catanzaro A i sar. Genetic mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *PLoS One* 2015;10:e0119628.
315. Shariat N, Dudley E. CRISPRs: molecular signatures used for pathogen subtyping. *Appl Environ Microbiol* 2014;80:430-9.
316. Sherman D, Mdluli K, Hickey M. i sar. Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1996;272:1641-3.
317. Shi W, Zhang X, Jiang X. i sar. Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 2011;333:1630-2.
318. Sims D, Sudbery I, Ilott N. i sar. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nat Rev Genet* 2014;15:121-32.
319. Siu GK, Zhang Y, Lau TC. i sar. Mutations outside the rifampicin resistance-determining region associated with rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:730-3.
320. Slayden R, Barry C 3rd. The role of KasA and KasB in the biosynthesis of meromycolic acids and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 2002;82:149-60.

321. Smit P, Haanperä M, Rantala P. i sar. Molecular epidemiology of tuberculosis in Finland, 2008-2011. PLoS One 2013;8:e85027.
322. Smith N. The global distribution and phylogeography of *Mycobacterium bovis* clonal complexes. Infect Genet Evol 2012;12:857-65.
323. Smith T, Wolff K, Nguyen L. Molecular biology of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Curr Top Microbiol Immunol 2013;374:53-80.
324. Somoskovi A, Dormandy J, Mayrer A. i sar. "*Mycobacterium canettii*" isolated from a human immunodeficiency virus-positive patient: first case recognized in the United States. J Clin Microbiol 2009;47:255-7.
325. Somoskovi A, Helbling P, Deggim V. i sar. Transmission of multidrug-resistant tuberculosis in a low-incidence setting, Switzerland, 2006 to 2012. Euro Surveill 2014;19.
326. Soto C, Menéndez M, Pérez E. i sar. IS6110 mediates increased transcription of the *phoP* virulence gene in a multidrug-resistant clinical isolate responsible for tuberculosis outbreaks. J Clin Microbiol 2004;42:212-9.
327. Sougakoff W. Molecular epidemiology of multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol Infect 2011;17:800-5.
328. Spies F, da Silva P, Ribeiro M. i sar. Identification of mutations related to streptomycin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and possible involvement of efflux mechanism. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:2947-9.
329. Spies F, Ribeiro A, Ramos D. i sar. Streptomycin resistance and lineage-specific polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* *gidB* gene. J Clin Microbiol 2011;49:2625-30.
330. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer K. i sar. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94:9869-74.
331. Stead WW, Eisenach KD, Cave MD. i sar. When did *Mycobacterium tuberculosis* infection first occur in the New World? An important question with public health implications. Am J Respir Crit Care Med 1995;151:1267-8.
332. Stinear TP, Seemann T, Harrison PF. i sar. Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. Genome Res 2008;18:729-41.
333. Stucki D, Gagneux S. Single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* and the need for a curated database. Tuberculosis (Edinb) 2013;93:30-9.

334. Sun YJ, Luo JT, Wong SY. i sar. Analysis of rpsL and rrs mutations in Beijing and non-Beijing streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Singapore. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:287-9.
335. Supply P, Allix C, Lesjean S. i sar. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2006;44:4498-510.
336. Supply P, Magdalena J, Himpens S. i sar. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Mol Microbiol* 1997;26:991-1003.
337. Supply P, Marceau M, Mangenot S. i sar. Genomic analysis of smooth tubercle bacilli provides insights into ancestry and pathoadaptation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Genet* 2013;45:172-9.
338. Supply P, Mazars E, Lesjean S. i sar. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* 2000;36:762-71.
339. Telenti A, Imboden P, Marchesi F. i sar. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993;341:647-50.
340. Tessema B, Beer J, Merker M. i sar. Molecular epidemiology and transmission dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in Northwest Ethiopia: new phylogenetic lineages found in Northwest Ethiopia. *BMC Infect Dis* 2013;13:131.
341. Thierry D, Cave M, Eisenach K. i sar. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Res* 1990;18:188.
342. Thorne N, Borrell S, Evans J. i sar. IS6110-based global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Genet Evol* 2011;11:132-8.
343. Turcatti G, Romieu A, Fedurco M. i sar. A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. *Nucleic Acids Res* 2008;36:e25.
344. Turcios L, Casart Y, Florez I. i sar. Characterization of IS6110 insertions in the dnaA-dnaN intergenic region of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:200-3.
345. Valcheva V, Mokrousov I, Rastogi N. i sar. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from different regions of Bulgaria. *J Clin Microbiol* 2008;46:1014-8.
346. Valway S, Sanchez M, Shinnick T. i sar. An outbreak involving extensive transmission of a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *N Engl J Med* 1998;338:633-9.

347. Van der Spuy G, Warren R, Richardson M. i sar. Use of genetic distance as a measure of ongoing transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2003;41:5640-4.
348. Van Embden J, Cave M, Crawford J. i sar. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993;31:406-9.
349. Van Ingen J, Rahim Z, Mulder A. i sar. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerg Infect Dis* 2012;18:653-5.
350. Van Soolingen D, De Haas P, Haagsma J. i sar. Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1994;32:2425-33.
351. Van Soolingen D, Hermans P, De Haas P. i sar. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1991;29:2578-86.
352. Van Soolingen D, Hoogenboezem T, De Haas P. i sar. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Canetti*: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:1236-45.
353. Van Soolingen D, Qian L, De Haas P. i sar. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol* 1995;33:3234-8.
354. Van Soolingen D, Van Der Zanden A, De Haas P. i sar. Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers. *J Clin Microbiol* 1998;36:1840-5.
355. Van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Intern Med* 2001;249:1-26.
356. Vázquez-Gallardo R, Aníbarro L, Fernández-Villar A. i sar. Multidrug-resistant tuberculosis in a low-incidence region shows a high rate of transmission. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007;11:429-35.
357. Vera-Cabrera L, Hernández-Vera M, Welsh O. i sar. Phospholipase region of *Mycobacterium tuberculosis* is a preferential locus for IS6110 transposition. *J Clin Microbiol* 2001;39:3499-504.
358. Verdugo D, Fallows D, Ahuja S. i sar. Epidemiologic correlates of pyrazinamide resistant *Mycobacterium tuberculosis* in New York City. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;pii: AAC.00764-15.

359. Veyrier F, Dufort A, Behr M. The rise and fall of the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Trends Microbiol* 2011;19:156-61.
360. Veyrier F, Pletzer D, Turenne C. i sar. Phylogenetic detection of horizontal gene transfer during the step-wise genesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Evol Biol* 2009;9:196.
361. Vilchèze C, Av-Gay Y, Attarian R. i sar. Mycothiol biosynthesis is essential for ethionamide susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 2008;69:1316-29.
362. Vilchèze C, Av-Gay Y, Barnes S i sar. Coresistance to isoniazid and ethionamide maps to mycothiol biosynthetic genes in *Mycobacterium bovis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:4422-3.
363. Vilchèze C, Weisbrod T, Chen B. i sar. Altered NADH/NAD⁺ ratio mediates coresistance to isoniazid and ethionamide in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:708-20.
364. Vukovic D, Rüsç-Gerdes S, Savic B. i sar. Molecular epidemiology of pulmonary tuberculosis in belgrade, central serbia. *J Clin Microbiol* 2003;41:4372-7.
365. Walker T, Harrell R, Evans J. i sar. Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. *Lancet Infect Dis* 2013;13:137-46.
366. Wang F, Langley R, Gulten G. i sar. Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy. *J Exp Med* 2007;204:73-8.
367. Warren R, Streicher E, Sampson S. i sar. Microevolution of the direct repeat region of *Mycobacterium tuberculosis*: implications for interpretation of spoligotyping data. *J Clin Microbiol* 2002;40:4457-65.
368. Weniger T, Krawczyk J, Supply P. i sar. Online tools for polyphasic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* complex genotyping data: now and next. *Infect Genet Evol* 2012;12:748-54.
369. Williams D, Spring L, Collins L. i sar. Contribution of *rpoB* mutations to development of rifamycin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1853-7.
370. Wirth T, Hildebrand F, Allix-Béguec C. i sar. Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PLoS Pathog* 2008;4:e1000160.
371. World Health Organization (2010). Treatment of tuberculosis guidelines. Fourth edition. WHO/HTM/TB/2009.420. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

372. World Health Organization (2014). Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. WHO/HTM/TB/2014.11. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
373. World Health Organization (2014). Global tuberculosis report 2014. WHO/HTM/TB/2014.8. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
374. Xavier EF, Seagar AL, Doig C. i sar. Human and animal infections with *Mycobacterium microti*, Scotland. *Emerg Infect Dis* 2007;13:1924-27.
375. Xia Q, Zhao LL, Li F. i sar. Phenotypic and genotypic characterization of pyrazinamide resistance among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Zhejiang, China. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:1690-5.
376. Xuan J, Yu Y, Qing T. i sar. Next-generation sequencing in the clinic: promises and challenges. *Cancer Lett* 2013;340:284-95.
377. Yeboah-Manu D, Asante-Poku A, Bodmer T. i sar. Genotypic diversity and drug susceptibility patterns among *M. tuberculosis* complex isolates from South-Western Ghana. *PLoS One* 2011;6:e21906.
378. Youmans G, Raleigh G, Youmans A. The Tuberculostatic Action of para-Aminosalicylic Acid. *J Bacteriol* 1947;54:409-16.
379. Yuen CM, Kurbatova EV, Click ES. i sar. Association between *Mycobacterium tuberculosis* complex phylogenetic lineage and acquired drug resistance. *PLoS One* 2013;8:e83006.
380. Zaunbrechera A, Sikes D, Metchock B. i sar. Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase *eis* confers kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:20004-9.
381. Zhang H, Li D, Zhao L. i sar. Genome sequencing of 161 *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China identifies genes and intergenic regions associated with drug resistance. *Nat Genet* 2013;45:1255-60.
382. Zhang J, Abadia E, Refregier G. i sar. *Mycobacterium tuberculosis* complex CRISPR genotyping: improving efficiency, throughput and discriminative power of 'spoligotyping' with new spacers and a microbead-based hybridization assay. *J Med Microbiol* 2010;59:285-94.
383. Zhang Z, Lu J, Liu M. i sar. Genotyping and molecular characteristics of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *J Infect* 2015;70:335-45.
384. Zhang Z, Panga Y, Wang Y. i sar (a). Beijing genotype of *Mycobacterium tuberculosis* is significantly associated with linezolid resistance in multidrug-resistant and

- extensively drug-resistant tuberculosis in China. *Int J Antimicrob Agents* 2014;43:231-5.
385. Zhang Z, Wang Y, Pang Y. i sar (b). Ethambutol resistance as determined by broth dilution method correlates better than sequencing results with *embB* mutations in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* 2014;52:638-41.
 386. Zhang Z, Yew W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13:1320-30.
 387. Zhao F, Wang X, Erber L. i sar. Binding pocket alterations in dihydrofolate synthase confer resistance to para-aminosalicylic acid in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:1479-87.
 388. Zheng j, Rubin E, Bifani P. i sar. Para-aminosalicylic acid is a prodrug targeting dihydrofolate reductase in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 2013;288:23447-56.
 389. Živanović I, Vuković D, Dakić I. i sar. Detection of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by the GenoType MTBDRsl assay in Serbia. *Arch Biol Sci* 2012;64:1311-18.
 390. Živanović I, Vuković D, Dakić I. i sar. Species of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria identified in respiratory specimens from Serbia. *Arch Biol Sci* 2014;66:553-61.
 391. Zozio T, Allix C, Gunal S. i sar. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in two cities of Turkey: description of a new family of genotypes that is phylogeographically specific for Asia Minor. *BMC Microbiol* 2005;5:44.
 392. Zumla A, Nahid P, Cole S. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12:388-404.

8. *Prilozi*

Prilog 1.

Tabela 23. Mutacije u genima povezanim sa rezistencijom na antituberkulotike koje su detektovane u genomima 108 MDR sojeva *M. tuberculosis*.

Gen	Rv broj	Mutacija/ izmena aminokiseline	SNP/ izmena u kodonu	Rezistencija na
<i>rpsL</i>	Rv0682	K43R	aag/aGg	S
	Rv0682	K88R	aag/aGg	S
<i>gidB</i>	Rv3919c	E40G	gaa/gGa	S
	Rv3919c	L58L	ctc/ctG	S
	Rv3919c	P75L	ccg/cTg	S
	Rv3919c	P75S	ccg/Tcg	S
	Rv3919c	L79S	ttg/tCg	S
	Rv3919c	L91P	cta/cCa	S
	Rv3919c	A119D	gcc/gAc	S
	Rv3919c	A140A	gcc/gcG	S
	Rv3919c	A140A	gcc/gcG	S
<i>katG</i>	Rv1908c	V1A	gtg/gCg	I
	Rv1908c	P29S	ccc/Tcc	I
	Rv1908c	L141F	ttg/ttC	I
	Rv1908c	D142N	gac/Aac	I
	Rv1908c	A256G	gcc/gGc	I
	Rv1908c	G285C	ggc/Tgc	I
	Rv1908c	P292A	ccg/Gcg	I
	Rv1908c	S315T	agc/aCc	I
	Rv1908c	S315R	agc/agG	I
	Rv1908c	S315N	agc/aAc	I
	Rv1908c	I335V	atc/Gtc	I
	Rv1908c	W351_	tgg/tgA	I
	Rv1908c	E399E	gaa/gaG	I
	Rv1908c	W438G	tgg/Ggg	I
	Rv1908c	W477_	tgg/tAg	I
	Rv1908c	L587R	ctg/cGg	I
	Rv1908c	D663Y	gac/Tac	I
	Rv1908c	G699E	ggg/gAg	I
	Rv1908c	D723N	gac/Aac	I
	Rv1908c	V731M	gtg/Atg	I
	Rv1484		- 15 c/T	I, ETH
	Rv1484		- 8 t/G	I, ETH
<i>inhA</i>	Rv1484	I16V	atc/Gtc	I, ETH
	Rv1484	I21V	atc/Gtc	I, ETH
<i>ndh</i>	Rv1854c	V18A	gtg/gCg	I, ETH
	Rv1854c	V275G	gtc/gGc	I, ETH
<i>kasA</i>	Rv2245	A208T	gcg/Acg	I
<i>rpoB</i>	Rv0667	L42V	ctt/Gtt	R
	Rv0667	P45S	ccg/Tcg	R
	Rv0667	T399I	acc/aTc	R

Gen	Rv broj	Mutacija/ izmena aminokiseline	SNP/ izmena u kodonu	Rezistencija na
	Rv0667	F424V	ttc/Gtc	R
	Rv0667	Q432K	caa/Aaa	R
	Rv0667	D435V	gac/gTc	R
	Rv0667	H445D	cac/Gac	R
	Rv0667	H445R	cac/cGc	R
	Rv0667	H445Y	cac/Tac	R
	Rv0667	H445L	cac/cTc	R
	Rv0667	S450L	tcg/tTg	R
	Rv0667	S450W	tcg/tGg	R
	Rv0667	L452P	ctg/cCg	R
	Rv0667	L731P	ctg/cCg	R
	Rv0667	K799Q	aag/Cag	R
embC	Rv3793	G23E	gga/gAa	E
	Rv3793	G190S	ggc/Agc	E
	Rv3793	A448V	gcg/gTg	E
	Rv3793	G559G	ggg/ggC	E
embA	Rv3794	V122V	gtg/gtA	E
	Rv3794	G352G	ggc/ggT	E
	Rv3794	A576T	gca/Aca	E
	Rv3794	W634S	tgg/tCg	E
embB	Rv3795	N296H	aat/Cat	E
	Rv3795	M306I	atg/atA, atg/atC, atg/atT	E
	Rv3795	M306V	atg/Gtg	E
	Rv3795	L352L	ctg/ctA	E
	Rv3795	G406A	ggc/gCc	E
	Rv3795	G406D	ggc/gAc	E
	Rv3795	G406S	ggc/Agc	E
	Rv3795	A453A	gcc/gcT	E
	Rv3795	Q497P	cag/cCg	E
	Rv3795	Q497R	cag/cGg	E
	Rv3795	P965P	ccg/ccA	E
	Rv3795	M1000R	atg/aGg	E
	Rv3795	H1002R	cac/cGc	E
	Rv3795	D1024N	gac/Aac	E
	Rv3795	T1027T	acg/acA	E
	Rv3795	A1073A	gcc/gcG	E
pncA	Rv2043c	I5T	atc/aCc	Z
	Rv2043c	V7G	gtc/gGc	Z
	Rv2043c	Q10P	cag/cCg	Z
	Rv2043c	G17A	ggc/gCc	Z
	Rv2043c	L19P	ctg/cCg	Z
	Rv2043c	G24D	ggc/gAc	Z
	Rv2043c	L35P	ctg/cCg	Z
	Rv2043c	A46T	gca/Aca	Z
	Rv2043c	H57R	cac/cGc	Z

Gen	Rv broj	Mutacija/ izmena aminokiseline	SNP/ izmena u kodonu	Rezistencija na
	Rv2043c	D63A	gac/gCc	Z
	Rv2043c	W68G	tgg/Ggg	Z
	Rv2043c	L85P	ctg/cCg	Z
	Rv2043c	I90S	atc/aGc	Z
	Rv2043c	F94C	ttc/tGc	Z
	Rv2043c	A102V	gcg/gTg	Z
	Rv2043c	A102P	gcg/Ccg	Z
	Rv2043c	F106S	ttc/tCc	Z
	Rv2043c	R123P	cgc/cCc	Z
	Rv2043c	A134V	gcc/gTc	Z
	Rv2043c	D136G	gat/gGt	Z
	Rv2043c	C138R	tgt/Cgt	Z
	Rv2043c	L151S	ttg/tCg	Z
	Rv2043c	T160R	aca/aGa	Z
	Rv2043c	S164P	tcg/Ccg	Z
	Rv2043c	L172P	ctg/cCg	Z
Rv2731	Rv2731	S40P	tcc/Ccc	Z
	Rv2731	V43V	gtg/gtC	Z
	Rv2731	R161G	aga/Gga	Z
Rv3169	Rv3169	S174G	agc/Ggc	Z
rpsA	Rv1630	A412V	gcc/gTc	Z
	Rv1630	S449S	tcg/tcT	Z
gyrA	Rv0006	A90V	gcg/gTg	FLQ
	Rv0006	S91P	tcg/Ccg	FLQ
	Rv0006	D94G	gac/gGc	FLQ
	Rv0006	D94H	gac/Cac	FLQ
	Rv0006	D94N	gac/Aac	FLQ
	Rv0006	L105R	ctg/cGg	FLQ
	Rv0006	R292G	cga/Gga	FLQ
	Rv0006	H490R	cac/cGc	FLQ
	Rv0006	A609A	gcc/gcT	FLQ
	Rv0006	V742L	gta/Cta	FLQ
gyrB	Rv0005	D334D	gac/gaT	FLQ
	Rv0005	T373T	acc/acT	FLQ
	Rv0005	N499S	aac/aGc	FLQ
	Rv0005	T500A	acc/Gcc	FLQ
ethA	Rv3854c	G43S	ggc/Agc	ETH
	Rv3854c	T88I	acc/aTc	ETH
	Rv3854c	Q206_	cag/Tag	ETH
	Rv3854c	L229R	ctg/cGg	ETH
	Rv3854c	W256_	tgg/tAg	ETH
	Rv3854c	R279_	cga/Tga	ETH
	Rv3854c	F302S	ttc/tCc	ETH
	Rv3854c	P334A	ccg/Gcg	ETH
	Rv3854c	V417E	gtg/gAg	ETH
	Rv3854c	T453S	aca/Tca	ETH

Gen	Rv broj	Mutacija/ izmena aminokiseline	SNP/ izmena u kodonu	Rezistencija na
<i>fabG1 prom</i>	Rv1483		-8 t/G	ETH, I
	Rv1483		-58 t/C	ETH, I
	Rv1483		-15 c/T	ETH, I
<i>ethR</i>	Rv3855	F110L	ttc/Ctc	ETH
<i>mshA</i>	Rv0486	G67R	ggc/Cgc	ETH
	Rv0486	F117F	ttc/ttT	ETH
	Rv0486	A362D	gcc/gAc	ETH
	Rv0486	W430_	tgg/tAg	ETH
<i>dfrA</i>	Rv2763c	G37G	ggg/ggA	ETH
<i>thyA</i>	Rv2764c	G136G	ggc/ggT	PAS
<i>thyX</i>	Rv2754c	R168R	cgc/cgT	PAS
	Rv2754c	T234T	acc/acG	PAS
<i>folC</i>	Rv2447c	E40D	gag/gaT	PAS
	Rv2447c	R42P	cgc/cCc	PAS
	Rv2447c	S150G	agc/Ggc	PAS
<i>rrs</i>	MTB000019	A1401G	a/G	AM, CM, KM, S
<i>eis prom</i>	Rv2416c		-14 g/A	KM
<i>eis</i>	Rv2416c	R181_	cga/Tga	KM
<i>tlyA</i>	Rv1694	F157F	ttc/ttT	CM
	Rv1694	P179S	cca/Tca	CM
<i>alr</i>	Rv3423c	I386I	atc/atT	CS
<i>rplC</i>	Rv0701	T27T	acc/acA	Linezolid
<i>rpoC</i>	Rv0668	V431M	gtg/Atg	kompensatorna
	Rv0668	F452L	ttc/Ctc	kompensatorna
	Rv0668	D485N	gat/Aat	kompensatorna
	Rv0668	D485Y	gat/Tat	kompensatorna
	Rv0668	L516P	ctg/cCg	kompensatorna
	Rv0668	L527V	ttg/Gtg	kompensatorna
	Rv0668	N698S	aac/aGc	kompensatorna
	Rv0668	R770H	cgc/cAc	kompensatorna
	Rv0668	A818V	gcc/gTc	kompensatorna
	Rv0668	T825N	acc/aAc	kompensatorna
	Rv0668	V1039A	gta/gCa	kompensatorna
	Rv0668	P1040R	ccg/cGg	kompensatorna
	Rv0668	P1040S	ccg/Tcg	kompensatorna
	Rv0668	Q1139H	cag/caC	kompensatorna
<i>rpoA</i>	Rv3457c	P25R	ccg/cGg	kompensatorna
	Rv3457c	G31A	ggc/gCc	kompensatorna
	Rv3457c	D253N	gac/Aac	kompensatorna

S=streptomycin; I=izoniazid; R=rifampicin; E=etambutol; Z=pirazinamid; ETH=etionamid; FLQ=fluorohinoloni; PAS=para-amino salicilna kiselina; AM=amikacin; CM=kapreomicin; KM=kanamicin; CS=cikloserin.

Prilog 2.

Tabela 24. Korelacija genotipskih i fenotipskih profila rezistencije 108 MDR sojeva *M. tuberculosis*.

Antibiotik	Genski lokus	Ima mutaciju		Nema mutaciju		Senzitivnost	Specifičnost	PPV	NPV
		osetljiv	rezistentan	osetljiv	rezistentan				
R	<i>rpoB</i>	0	105	0	3	100%	0	97,2%	NaN
I	<i>katG</i>	0	105	0	3	100%	0	97,2%	NaN
	<i>inhA</i>	0	2	0	106	100%	0	1,9%	NaN
	<i>inhA</i> prom	0	5	0	103	100%	0	4,6%	NaN
	<i>ndh</i>	0	9	0	99	100%	0	8,3%	NaN
	<i>kasA</i>	0	1	0	107	100%	0	0,9%	NaN
S	<i>rpsL</i>	1	59	25	23	98,3%	52,1%	72%	96,2%
	<i>gidB</i>	3	9	23	73	75%	24%	11%	88,5%
	<i>rrs</i>	2	16	24	66	88,9%	26,7%	19,5%	92,3%
E	<i>embA</i>	1	41	36	30	97,6%	54,5%	57,7%	97,3%
	<i>embB</i>	11	69	26	2	86,3%	92,9%	97,2%	70,3%
	<i>embC</i>	4	2	33	69	33,3%	32,4%	2,8%	89,2%
Z	<i>pncA</i>	9	45	40	14	83,3%	74,1%	76,3%	81,6%
	Rv2731	5	6	44	53	54,5%	45,3%	10,2%	89,8%
	Rv3169	2	0	47	59	0	44,3%	0	95,9%
	<i>rpsA</i>	1	1	48	58	50%	45,3%	1,7%	98%
FLQ	<i>gyrA</i>	23	20	65	0	46,5%	100%	100%	73,9%
	<i>gyrB</i>	6	1	82	19	14,3%	81,2%	5%	93,2%
ETH *	<i>ethA</i>	6	12	59	10	66,7%	85,5%	54,5%	90,8%
	<i>ethR</i>	1	0	64	22	0	74,4%	0	98,5%
	<i>fabG1</i> prom	0	3	65	19	100%	77,4%	13,6%	100%
	<i>mshA</i>	1	3	64	19	75%	77,1%	13,6%	98,5%
	<i>dfrA</i>	0	1	65	21	100%	75,6%	4,5%	100%
PAS	<i>thyA</i>	1	0	104	3	0	97,2%	0	99%
	<i>thyX</i>	3	1	102	2	25%	98,1%	33,3%	97,1%
	<i>folC</i>	2	2	103	1	50%	99%	66,7%	98,1%
AM	<i>rrs</i>	1	17	89	1	94,4%	98,9%	94,4%	98,9%
CM	<i>rrs</i>	1	17	88	2	94,4%	97,8%	89,5%	98,9%
	<i>tlyA</i>	2	0	87	19	0	82,1%	0	97,8%

CS	alr	1	0	107	0	0	100%	NaN	99,1%
----	-----	---	---	-----	---	---	------	-----	-------

* Fenotipski test osetljivosti na etionamid urađen je za 87 MDR sojeva *M. tuberculosis*. PPV = pozitivna prediktivna vrednost; NPV = negativna prediktivna vrednost; NaN = kalkulacija nije moguća, jer je najmanje jedna vrednost 0.

R=rifampicin; I=izoniazid; S=streptomycin; E=etambutol; Z=pirazinamid; FLQ=fluorohinoloni; ETH=etionamid; PAS=para-amino salicilna kiselina; AM=amikacin; CM=kapreomicin; CS=cikloserin.

Prilog 3.

Tabela 26. Udruženost mutacija u genima rezistencije sa pojedinačnim genotipovima MDR sojeva *M. tuberculosis*.

Gen	Beijing		Clade 1		Haarlem		TUR		Ural		S		p vrednost
	ne*	da**	ne	da	ne	da	ne	da	ne	da	ne	da	
<i>rpsL</i>	1 (5,6%)	17 (94,4%)	20 (90,9%)	2 (9,1%)	15 (78,9%)	4 (21,1%)	2 (5,1%)	37 (94,9%)	2 (100%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	0,000
<i>gidB</i>	18 (100%)	0 (0%)	19 (86,4%)	3 (13,6%)	13 (68,4%)	6 (31,6%)	38 (97,4%)	1 (2,6%)	0 (0%)	2 (100%)	8 (100%)	0 (0%)	0,000
<i>inhA</i>	17 (94,4%)	1 (5,6%)	22 (100%)	0 (0%)	19 (100%)	0 (0%)	38 (97,4%)	1 (2,6%)	2 (100%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	0,787
<i>ndh</i>	18 (100%)	0 (0%)	22 (100%)	0 (0%)	18 (94,7%)	1 (5,3%)	39 (100%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	8 (100%)	0,000
<i>katG</i>	0 (0%)	18 (100%)	1 (4,5%)	21 (95,5%)	2 (10,5%)	17 (89,5%)	0 (0%)	39 (100%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	8 (100%)	0,270
<i>kasA</i>	18 (100%)	0 (0%)	22 (100%)	0 (0%)	19 (100%)	0 (0%)	38 (97,4%)	1 (2,6%)	2 (100%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	0,878
<i>inhA</i> prom	17 (94,4%)	1 (5,6%)	20 (90,9%)	2 (9,1%)	17 (89,5%)	2 (10,5%)	39 (100%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	0,428
<i>rpoB</i>	0 (0%)	18 (100%)	2 (9,1%)	20 (90,9%)	1 (5,3%)	18 (94,7%)	0 (0%)	39 (100%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	8 (100%)	0,348
<i>rpoC</i>	6 (33,3%)	12 (66,7%)	14 (63,6%)	8 (36,4%)	0 (0%)	19 (100%)	25 (64,1%)	14 (35,9%)	0 (0%)	2 (100%)	8 (100%)	0 (0%)	0,000
<i>rpoA</i>	16 (88,9%)	2 (11,1%)	21 (95,5%)	1 (4,5%)	19 (100%)	0 (0%)	19 (48,7%)	20 (51,3%)	2 (100%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	0,000
<i>embA</i>	17 (94,4%)	1 (5,6%)	22 (100%)	0 (0%)	16 (84,2%)	3 (15,8%)	1 (2,6%)	38 (97,4%)	2 (100%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	0,000
<i>embB</i>	9 (50%)	9 (50%)	8 (36,4%)	14 (63,6%)	9 (47,4%)	10 (52,6%)	1 (2,6%)	38 (97,4%)	0 (0%)	2 (100%)	1 (12,5%)	7 (87,5%)	0,000
<i>embC</i>	18 (100%)	0 (0%)	18 (81,8%)	4 (18,2%)	17 (89,5%)	2 (10,5%)	39 (100%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	0,042
<i>pncA</i>	6 (33,3%)	12 (66,7%)	15 (68,2%)	7 (31,8%)	14 (73,7%)	5 (26,3%)	14 (35,9%)	25 (64,1%)	2 (100%)	0 (0%)	3 (37,5%)	5 (62,5%)	0,011
<i>rpsA</i>	17 (94,4%)	1 (5,6%)	21 (95,5%)	1 (4,5%)	19 (100%)	0 (0%)	39 (100%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	0,620
Rv3169	18 (100%)	0 (0%)	22 (100%)	0 (0%)	19 (100%)	0 (0%)	39 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	8 (100%)	0 (0%)	0,000
Rv2731	18 (100%)	0 (0%)	19 (86,4%)	3 (13,6%)	11 (57,9%)	8 (42,1%)	39 (100%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	0,000
<i>gyrA</i>	17 (94,4%)	1 (5,6%)	18 (81,8%)	4 (18,2%)	19 (100%)	0 (0%)	1 (2,6%)	38 (97,4%)	2 (100%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	0,000
<i>gyrB</i>	18 (100%)	0 (0%)	17 (77,3%)	5 (22,7%)	18 (94,7%)	1 (5,3%)	38 (97,4%)	1 (2,6%)	2 (100%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	0,028
<i>ethA</i>	7 (38,9%)	11 (61,1%)	18 (81,8%)	4 (18,2%)	16 (84,2%)	3 (15,8%)	37 (94,9%)	2 (5,1%)	0 (0%)	2 (100%)	8 (100%)	0 (0%)	0,000
<i>ethR</i>	18 (100%)	0 (0%)	21 (95,5%)	1 (4,5%)	19 (100%)	0 (0%)	39 (100%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	0,557
<i>dfrA</i>	18 (100%)	0 (0%)	21 (95,5%)	1 (4,5%)	19 (100%)	0 (0%)	39 (100%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	0,557

Gen	Beijing		Clade 1		Haarlem		TUR		Ural		S		p vrednost
	ne*	da**	ne	da	ne	da	ne	da	ne	da	ne	da	
<i>fabG1</i> prom	17 (94,4%)	1 (5,6%)	20 (90,9%)	2 (9,1%)	16 (84,2%)	3 (15,8%)	39 (100%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	0,206
<i>mshA</i>	18 (100%)	0 (0%)	21 (95,5%)	1 (4,5%)	18 (94,7%)	1 (5,3%)	37 (94,9%)	2 (5,1%)	2 (100%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	0,916
<i>thyA</i>	18 (100%)	0 (0%)	22 (100%)	0 (0%)	19 (100%)	0 (0%)	38 (97,4%)	1 (2,6%)	2 (100%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	0,878
<i>thyX</i>	18 (100%)	0 (0%)	22 (100%)	0 (0%)	15 (78,9%)	4 (21,1%)	39 (100%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	0,002
<i>folC</i>	18 (100%)	0 (0%)	20 (90,9%)	2 (9,1%)	18 (94,7%)	1 (5,3%)	38 (97,4%)	1 (2,6%)	2 (100%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	0,679
<i>rrs</i>	15 (83,3%)	3 (16,7%)	21 (95,5%)	1 (4,5%)	19 (100%)	0 (0%)	26 (66,7%)	13 (33,3%)	2 (100%)	0 (0%)	7 (87,5%)	1 (12,5%)	0,013
<i>eis</i> prom	18 (100%)	0 (0%)	22 (100%)	0 (0%)	18 (94,7%)	1 (5,3%)	37 (94,9%)	2 (5,1%)	2 (100%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	0,752
<i>eis</i>	18 (100%)	0 (0%)	22 (100%)	0 (0%)	18 (94,7%)	1 (5,3%)	39 (100%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	0,450
<i>tlyA</i>	18 (100%)	0 (0%)	21 (95,5%)	1 (4,5%)	18 (94,7%)	1 (5,3%)	39 (100%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	0,645
<i>alr</i>	18 (100%)	0 (0%)	21 (95,5%)	1 (4,5%)	19 (100%)	0 (0%)	39 (100%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	0,557
<i>rplC</i>	18 (100%)	0 (0%)	21 (95,5%)	1 (4,5%)	19 (100%)	0 (0%)	39 (100%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	0,557

* ne pripada genotipu

** pripada genotipu

Prilog 4.

Tabela 28. Korelacija genotipova MDR sojeva *M. tuberculosis* i pojedinačnih mutacija u genima rezistencije.

Gen	Mutacija	Beijing	Clade 1	Haarlem	TUR	Ural	S	p vrednost
<i>rpsL</i>	K43R	17 (100%)	1 (50%)	3 (75%)	37 (100%)			0,009
	K88R	0 (0%)	1 (50%)	1 (25%)	0 (0%)			
<i>gidB</i>	A119D		0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)		0,089
	A140A		0 (0%)	1 (16,7%)	0 (0%)	0 (0%)		
	E40G		1 (33,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
	L58L		0 (0%)	1 (16,7%)	0 (0%)	0 (0%)		
	L79S		1 (33,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
	L91P		0 (0%)	1 (16,7%)	0 (0%)	0 (0%)		
	P75L		0 (0%)	3 (50%)	0 (0%)	0 (0%)		
	P75S		1 (33,3%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)		
<i>inhA</i>	I16V	0 (0%)			1 (100%)			1,000
	I21V	1 (100%)			0 (0%)			
<i>ndh</i>	V18A			0 (0%)			8 (100%)	0,111
	V275G			1 (100%)			0 (0%)	
<i>katG</i>	D142N	0 (0%)	0 (0%)	1 (5,9%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0,012
	D663YS315T	0 (0%)	1 (4,8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	D723ND663Y	0 (0%)	1 (4,8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	E399ES315T	0 (0%)	1 (4,8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	G285C	1 (5,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	G699E	0 (0%)	1 (4,8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (62,5%)	
	I335VS315T	1 (5,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	L141F	0 (0%)	1 (4,8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	L587RP292A	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (25%)	
	P29S	0 (0%)	0 (0%)	1 (5,9%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	S315N	0 (0%)	1 (4,8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	S315RS315T	0 (0%)	0 (0%)	2 (11,8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	S315T	16 (88,9%)	12 (57,1%)	11 (64,7%)	39 (100%)	2 (100%)	1 (12,5%)	
	V1A	0 (0%)	1 (4,8%)	1 (5,9%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	V731MW477_	0 (0%)	1 (4,8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	W351_	0 (0%)	1 (4,8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	W438GA256G	0 (0%)	0 (0%)	1 (5,9%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
<i>inhA</i> prom	15 c/t	1 (100%)	0 (0%)	2 (100%)				0,197

Gen	Mutacija	Beijing	Clade 1	Haarlem	TUR	Ural	S	p vrednost
	8 t/g	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)				
<i>rpoB</i>	D435V	1 (5,6%)	0 (0%)	2 (11,1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0,000
	F424VD435V	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (62,5%)	
	H445D	0 (0%)	0 (0%)	5 (27,8%)	2 (5,1%)	0 (0%)	0 (0%)	
	H445L	0 (0%)	1 (5%)	0 (0%)	1 (2,6%)	0 (0%)	0 (0%)	
	H445R	0 (0%)	0 (0%)	1 (5,6%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (12,5%)	
	H445Y	0 (0%)	1 (5%)	0 (0%)	1 (2,6%)	0 (0%)	0 (0%)	
	L42VS450L	1 (5,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	L42VS450LL731P	1 (5,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	L452P	0 (0%)	0 (0%)	1 (5,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	P45SS450L	0 (0%)	2 (10%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	Q432KK799Q	0 (0%)	2 (10%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	S450L	15 (83,3%)	12 (60%)	8 (44,4%)	15 (38,5%)	2 (100%)	2 (25%)	
	S450W	0 (0%)	1 (5%)	1 (5,6%)	20 (51,3%)	0 (0%)	0 (0%)	
	T399IS450L	0 (0%)	1 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
<i>rpoC</i>	A818V	0 (0%)	1 (12,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		0,000
	D485N	1 (8,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
	D485Y	2 (16,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
	E1092D	1 (8,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
	F452L	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (42,9%)	0 (0%)		
	G594E	0 (0%)	0 (0%)	16 (84,2%)	0 (0%)	0 (0%)		
	G594EN698S	0 (0%)	0 (0%)	1 (5,3%)	0 (0%)	0 (0%)		
	G594EP1040R	0 (0%)	1 (12,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
	G594EP1040S	0 (0%)	0 (0%)	1 (5,3%)	0 (0%)	0 (0%)		
	G594ET825N	0 (0%)	0 (0%)	1 (5,3%)	0 (0%)	0 (0%)		
	L516P	8 (66,7%)	3 (37,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
	L527VG594E	0 (0%)	1 (12,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
	Q1139H	0 (0%)	1 (12,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
	R770H	0 (0%)	1 (12,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
	V1039A	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)		
	V431M	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	8 (57,1%)	0 (0%)		
<i>rpoA</i>	D253N	0 (0%)	1 (100%)		0 (0%)			0,000
	G31A	2 (100%)	0 (0%)		0 (0%)			
	P25R	0 (0%)	0 (0%)		20 (100%)			
<i>embA</i>	A576T	0 (0%)		0 (0%)	37 (97,4%)			0,000
	G352G	0 (0%)		3 (100%)	0 (0%)			
	V122V	1 (100%)		0 (0%)	0 (0%)			
	W634S	0 (0%)		0 (0%)	1 (2,6%)			

Gen	Mutacija	Beijing	Clade 1	Haarlem	TUR	Ural	S	p vrednost
<i>embB</i>	A453AQ497R	1 (11,1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0,000
	G406A	1 (11,1%)	0 (0%)	2 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	G406D	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (2,6%)	0 (0%)	0 (0%)	
	G406SD1024N	0 (0%)	0 (0%)	3 (30%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	H1002R	0 (0%)	1 (7,1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	M1000R	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (14,3%)	
	M306I	0 (0%)	7 (50%)	2 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (28,6%)	
	M306IQ497R	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (2,6%)	0 (0%)	0 (0%)	
	M306V	3 (33,3%)	0 (0%)	2 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (42,9%)	
	M306VA1073A	0 (0%)	4 (28,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	N296H	2 (22,2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	N296HL352L	2 (22,2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	P965P	0 (0%)	1 (7,1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	Q497P	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (14,3%)	
	Q497R	0 (0%)	1 (7,1%)	1 (10%)	36 (94,7%)	0 (0%)	0 (0%)	
	T1027T	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	
<i>embC</i>	A448V		0 (0%)	1 (50%)				0,195
	G190S		2 (50%)	0 (0%)				
	G23E		2 (50%)	0 (0%)				
	G559G		0 (0%)	1 (50%)				
<i>pncA</i>	A102P	0 (0%)	1 (14,3%)	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)	0,000
	A102V	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (20%)		0 (0%)	
	A134V	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)	0 (0%)		0 (0%)	
	A46T	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)	0 (0%)		0 (0%)	
	C138R	2 (16,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)	
	D136G	1 (8,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)	
	D63A	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		1 (20%)	
	F106S	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)	0 (0%)		0 (0%)	
	F94C	0 (0%)	2 (28,6%)	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)	
	G17A	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		1 (20%)	
	G24D	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (16%)		0 (0%)	
	H57R	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (20%)		0 (0%)	
	I5T	0 (0%)	1 (14,3%)	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)	
	I90S	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (28%)		0 (0%)	
	L151S	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (8%)		0 (0%)	
	L172P	0 (0%)	1 (14,3%)	0 (0%)	1 (4%)		0 (0%)	
	L19P	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		1 (20%)	
	L35P	1 (8,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)	
	L85P	0 (0%)	1 (14,3%)	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)	
	Q10P	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)	0 (0%)		0 (0%)	
	R123P	0 (0%)	1 (14,3%)	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)	

Gen	Mutacija	Beijing	Clade 1	Haarlem	TUR	Ural	S	p vrednost
	S164P	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (4%)		0 (0%)	
	T160R	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)	0 (0%)		0 (0%)	
	V7G	8 (66,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)	
	W68G	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		2 (40%)	
<i>rpsA</i>	A412V	1 (100%)	0 (0%)					1,000
	S449S	0 (0%)	1 (100%)					
<i>Rv2731</i>	R161G		2 (66,7%)	0 (0%)				0,006
	S40P		0 (0%)	8 (100%)				
	V43V		1 (33,3%)	0 (0%)				
<i>gyrA</i>	A609A	0 (0%)	1 (25%)		0 (0%)			0,000
	A90V	0 (0%)	1 (25%)		0 (0%)			
	A90VV742L	0 (0%)	0 (0%)		5 (13,2%)			
	D94G	1 (100%)	0 (0%)		0 (0%)			
	D94GH490R	0 (0%)	1 (25%)		0 (0%)			
	D94GV742L	0 (0%)	0 (0%)		5 (13,2%)			
	D94N	0 (0%)	0 (0%)		1 (2,6%)			
	H490R	0 (0%)	1 (25%)		0 (0%)			
	L105RV742L	0 (0%)	0 (0%)		4 (10,5%)			
	S91PR292GV742L	0 (0%)	0 (0%)		1 (2,6%)			
	V742L	0 (0%)	0 (0%)		22 (57,9%)			
<i>gyrB</i>	D334D		1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)			0,141
	N499S		0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)			
	T373T		4 (80%)	0 (0%)	0 (0%)			
	T500A		0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)			
<i>ethA</i>	F302S	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (50%)	0 (0%)		0,000
	G43S	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
	L229R	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)		
	P334A	1 (9,1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
	Q206_	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)		
	R279_	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (50%)	0 (0%)		
	T453S	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
	T88I	2 (18,2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
	V417E	0 (0%)	2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
	W256_	8 (72,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
<i>fabG1</i> prom	15c/t	1 (33,3%)	0 (0%)	2 (66,7%)				0,143
	58t/c	0 (0%)	0 (0%)	1 (33,3%)				
	8t/g	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)				

Gen	Mutacija	Beijing	Clade 1	Haarlem	TUR	Ural	S	p vrednost
<i>mshA</i>	A362D		0 (0%)	0 (0%)	1 (50%)			1,000
	F117F		1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)			
	G67R		0 (0%)	0 (0%)	1 (50%)			
	W430_		0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)			
<i>folC</i>	E40D		0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)			0,161
	R42P		0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)			
	S150G		2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)			
<i>tlyA</i>	F157F		1 (100%)	0 (0%)				1,000
	P179S		0 (0%)	1 (100%)				

Prilog 5.

Tabela 30. Korelacija mutacija u genima rezistencije MDR sojeva *M. tuberculosis* i pripadnosti klasteru.

Gen	NGS klaster		p vrednost
	ne (n=36)	da (n=72)	
<i>rpsL</i>			
ne	26 (72,2%)	22 (30,6%)	0,000
da	10 (27,8%)	50 (69,4%)	
<i>gidB</i>			
ne	30 (83,3%)	66 (91,7%)	0,194
da	6 (16,7%)	6 (8,3%)	
<i>inhA</i>			
ne	35 (97,2%)	71 (98,6%)	0,614
da	1 (2,8%)	1 (1,4%)	
<i>ndh</i>			
ne	34 (94,4%)	65 (90,3%)	0,460
da	2 (5,6%)	7 (9,7%)	
<i>katG</i>			
ne	3 (8,3%)	0 (0%)	0,013
da	33 (91,7%)	72 (100%)	
<i>kasA</i>			
ne	35 (97,2%)	72 (100%)	0,155
da	1 (2,8%)	0 (0%)	
<i>inhA</i> prom			
ne	31 (86,1%)	72 (100%)	0,001
da	5 (13,9%)	0 (0%)	
<i>rpoB</i>			
ne	3 (8,3)	0 (0%)	0,013
da	33 (91,7%)	72 (100%)	
<i>rpoC</i>			
ne	18 (50%)	35 (48,6%)	0,892
da	18 (50%)	37 (51,4%)	
<i>rpoA</i>			
ne	35 (97,2%)	50 (69,4%)	0,001
da	1 (2,8%)	22 (30,6%)	
<i>embA</i>			
ne	34 (94,4%)	32 (44,4%)	0,000
da	2 (5,6%)	40 (55,6%)	
<i>embB</i>			

Gen	NGS klaster		p vrednost
	ne (n=36)	da (n=72)	
ne	14 (38,9%)	14 (19,4%)	0,030
da	22 (61,1%)	58 (80,6%)	
<i>embC</i>			
ne	32 (88,9%)	70 (97,2%)	0,075
da	4 (11,1%)	2 (2,8%)	
<i>pncA</i>			
ne	22 (61,1%)	32 (44,4%)	0,102
da	14 (38,9%)	40 (55,6%)	
<i>rpsA</i>			
ne	34 (94,4%)	72 (100%)	0,044
da	2 (5,6%)	0 (0%)	
Rv3169			
ne	36 (100%)	70 (97,2%)	0,313
da	0 (0%)	2 (2,8%)	
Rv2731			
ne	30 (83,3%)	67 (93,1%)	0,115
da	6 (16,7%)	5 (6,9%)	
<i>gyrA</i>			
ne	31 (86,1%)	34 (47,2%)	0,000
da	5 (13,9%)	38 (57,8%)	
<i>gyrB</i>			
ne	35 (97,2%)	66 (91,7%)	0,269
da	1 (2,8%)	6 (8,3%)	
<i>ethA</i>			
ne	27 (75%)	59 (81,9%)	0,398
da	9 (25%)	13 (18,1%)	
<i>ethR</i>			
ne	35 (97,2%)	72 (100%)	0,155
da	1 (2,8%)	0 (0%)	
<i>dfrA</i>			
ne	35 (97,2%)	72 (100%)	0,155
da	1 (2,8%)	0 (0%)	
<i>fabG1</i> prom			
ne	31 (86,1%)	71 (98,6%)	0,008
da	5 (13,9%)	1 (1,4%)	
<i>mshA</i>			
ne	35 (97,2%)	69 (95,8%)	0,719
da	1 (2,8%)	3 (4,2%)	
<i>thyA</i>			

Gen	NGS klaster		p vrednost
	ne (n=36)	da (n=72)	
ne	36 (100%)	71 (98,6%)	0,477
da	0 (0%)	1 (1,4%)	
<i>thyX</i>			
ne	35 (97,2%)	69 (95,8%)	0,719
da	1 (2,8%)	3 (4,2%)	
<i>folC</i>			
ne	33 (91,7%)	71 (98,6%)	0,072
da	3 (8,3%)	1 (1,4%)	
<i>rrs</i>			
ne	32 (88,9%)	58 (80,6%)	0,273
da	4 (11,1%)	14 (19,4%)	
<i>eis</i> prom			
ne	35 (97,2%)	70 (97,2%)	1,000
da	1 (2,8%)	2 (2,8%)	
<i>eis</i>			
ne	35 (97,2%)	72 (100%)	0,155
da	1 (2,8%)	0 (0%)	
<i>tlyA</i>			
ne	34 (94,4%)	72 (100%)	0,044
da	2 (5,6%)	0 (0%)	
<i>alr</i>			
ne	35 (97,2%)	72 (100%)	0,155
da	1 (2,8%)	0 (0%)	
<i>rplC</i>			
ne	35 (97,2%)	72 (100%)	0,155
da	1 (2,8%)	0 (0%)	

Prilog 6.

Tabela 37. „Hitchhiking“ mutacije detektovane u genomima MDR sojeva *M. tuberculosis* koji pripadaju TUR klasteru.

Pozicija	Mutacija		Napomena
<i>rpoB</i> S450W	A		
5815	Rv3457c	P25R (ccg/cGg)	verovatna DNK-usmerena RNK polimeraza (alfa lanac) RpoA (alfa lanac transkriptaze) (alfa subjedinica RNK polimeraze) (DNK-usmerena RNK nukleotidtransferaza)
<i>pncA</i> I90S	B		
1977	Rv1122	Y238Y (tac/taT)	verovatna 6-fosfoglukonat dehidrogenaza, dekarboksilirajuća Gnd2
2295	Rvnr01	-	rRNK
4480	Rv2597	P202S (ccc/Tcc)	verovatni membranski protein
6343	-	-	-
6701	Rv3921c	V17V (gtg/gtT)	verovatni konzervirani transmembranski protein
<i>rpoC</i> V341M	C		
1304	Rv0668	V431M (gtg/Atg)	DNK-usmerena RNK polimeraza (beta' lanac) RpoC (beta' lanac transkriptaze) (beta' subjedinica RNK polimeraze)
1464	Rv0782	A301A (gca/gcG)	verovatna proteaza II PtrBb (drugi deo) (oligopeptidaza B)
<i>rpoC</i> F452L	D		
1305	Rv0668	F452L (ttc/Ctc)	DNA-usmerena RNK polimeraza (beta' lanac) RpoC (beta' lanac transkriptaze) (beta' subjedinica RNK polimeraze)
<i>rrs</i> 1401 a>g	E		
		nema drugih identifikovanih SNP varijanti	
<i>pncA</i> G24D <i>rrs</i> 1401 a>g	F		
224	Rv0077c	T3T (acg/acA)	verovatna oksidoreduktaza
496	Rv0198c	R628R (cgg/cgA)	verovatna cink metaloproteaza Zmp1
1565	Rv0848	E334D (gaa/gaC)	moгуća cistein sintaza CysK2 (O-acetilserin sulfhidrilaza) (O-acetilserin (tiol)-liaza) (CSASE)
4923	Rv2918c	Q211_ (cag/Tag)	verovatna [protein-PII] uridililtransferaza GlnD (PII uridilil-transferaza) (uridilil uklanjajući enzim) (UTASE)
6280	Rv3762c	H283H (cat/caC)	moгуća hidrolaza
	G	nije proveren	nije identifikovan nijedan zajednički SNP povezan sa rezistencijom
<i>rpoB</i> S450L	H		
1430	Rv0765c	A24T (gcg/Acg)	verovatna oksidoreduktaza
2767	Rv1594	E13K (gaa/Aaa)	verovatna hinolinat sintetaza NadA
3659	Rv2095c	Y157C (tac/tGc)	proteazom pomoćni faktor C, PafC
4038	Rv2344c	L240M (ctg/Atg)	verovatna deoksiguanozin trifosfat trifosfohidrolaza Dgt (dGTPaza) (dGTP trifosfohidrolaza)

Pozicija	Mutacija		Napomena
	I		
298	Rv0107c	A806S (gcg/Tcg)	verovatni katjon-transporter ATPaza I CtpI
6345	-	-	-
	J		
katG S315T rpsL K43R embB Q497R embA A576T gyrA V742L			
325	Rv0114	C98R (tgc/Cgc)	moguća D-alfa,beta-D-heptoza-1,7-bifosfat fosfataza GmhB (D-glicero-D-mano-heptoza 7-fosfat kinaza)
385	Rv0144	A44A (gcc/gcT)	verovatni transkripcioni regulatorni protein moguće TetR-familija)
446	Rv0180c	A187T (gcc/Acc)	verovatni konzervirani transmembranski protein
491	Rv0197	L114I (ctc/Atc)	moguća oksidoreduktaza
578	Rv0240	I8I (atc/atT)	mogući toksin VapC24 koji sadrži PIN domen
581	Rv0242c	F392L (ttc/Ctc)	verovatna 3-oksoacil-acil-protein nosač] reduktaza FabG4 (3-ketoacil-acil protein nosač reduktaza)
587	-	-	-
649	Rv0275c	R20C (cgc/Tgc)	mogući transkripcioni regulatorni protein (moguće TetR-familija)
653	Rv0277c	N74T (aac/aCc)	moguće toksin-VapC25 koji sadrži PIN domen
654	Rv0277c	P62P (cca/ccG)	moguće toksin-VapC25 koji sadrži PIN domen
725	Rv0318c	G178G (gga/ggG)	verovatni konzervirani integralni membranski protein
786	-	-	-
811	Rv0372c	A212A (gcc/gcT)	hipotetički protein
908	Rv0414c	A153A (gcg/gcA)	Tiamin-fosfat pirofosforilaza ThiE (TMP pirofosforilaza) (TMP-PPASE) tiamin-fosfat sintaza)
1101	Rv0536	A74A (gcc/gcG)	verovatna UDP-glukoza 4-epimeraza Gale3 galaktovaldenaza) (UDP-galaktoza 4-epimeraza) (uridin difosfo-galaktoza 4-epimeraza)
1134	Rv0557	P70L (cca/cTa)	manoziltransferaza MgtA
1627	Rv0888	V16I (gtc/Atc)	verovatni izvozni protein
1779	Rv0981	V197V (gtc/gtT)	mikobakterijski perzistentni regulator MRPA (dvokomponentni transkripcioni regulatorni protein)
2034	Rv1159	S382S (agc/agT)	manoziltransferaza PimE
2184	Rv1240	E38K (gag/Aag)	verovatna malat dehidrogenaza Mdh
2255	Rv1290A	A65A (gcc/gcT)	hipotetički protein
2299	Rvnr02	-	rRNK
2332	Rv1330c	A210V (gcg/gTg)	nikotinska kiselina fosforiboziltransferaza PncB1
2432	Rv1395	D301E (gac/gaA)	transkripcioni regulatorni protein
2560	Rv1479	G167G (ggt/ggC)	verovatni transkripcioni regulatorni protein MoxR1
2561	Rv1479	A356G (gcc/gGc)	verovatni transkripcioni regulatorni protein MoxR1
2567	Rv1482c	A27T (gcg/Acg)	hipotetički protein
2798	Rv1616	A13A (gcc/gcG)	hipotetički protein
2813	Rv1625c	V1V (gtg/gtA)	membranska adenilil ciklaza Cya (ATP pirofosfat-liaza) (adenilat ciklaza)
3080	Rv1780	P62P (ccc/ccG)	hipotetički protein
3348	Rv1941	V83M (gtg/Atg)	verovato dehidrogenaza/reduktaza kratkolančanog tipa
3480	Rv2011c	T105T (acc/acT)	konzervirani hipotetički protein, verovatno represor transkripcije

Pozicija		Mutacija	Napomena
3629	Rv2079	P210P (ccg/ccA)	hipotetički protein
3685	Rv2113	R35R (cgg/Agg)	verovatni integralni membranski protein
3731	Rv2149c	V99L (gtg/Ctg)	konzervirani protein YfiH
3773	Rv2174	A451A (gca/gcG)	alfa(1->6)manoziltransferaza, moguće konzervirani integralni membranski protein
4227	Rv2468c	A140A (gct/gcA)	hipotetički protein
4364	Rv2537c	E32D (gag/gaT)	3-dehidrokinat dehidrataza AroD (AROQ) (3-dehidrokinaza) (tip II dhkaza)
4395	Rv2561	A85S (gcg/Tcg)	hipotetički protein
4475	Rv2593c	T169T (acc/acA)	verovatna "holliday" DNK helikaza RuvA
4540	Rv2660c	V26V (gtc/gtT)	hipotetički protein
4793	Rv2839c	E727K (gag/Aag)	verovatni faktor inicijacije translacije if-2 InfB
4842	Rv2867c	A268A (gcc/gcT)	GCN5-vezana N-acetiltransferaza
4877	Rv2888c	G433G (ggc/ggT)	verovatna amidaza AmiC (aminohidrolaza)
5204	Rv3063	Q472L (cag/cTg)	verovatno protein za nedostatak ugljenika, protein A homolog CstA
5256	-	-	-
5276	Rv3098c	V91V (gtt/gtC)	hipotetički protein
5306	Rv3121	Y341Y (tat/taC)	verovatno citohrom P450 141 Cyp141
5338	Rv3147	P192R (ccg/cGg)	verovatna NADH dehidrogenaza I (lanac C) NuoC (NADH-ubikvinon oksidoreduktaza lanac C)
5498	-	-	-
5611	Rv3329	P73L (ccg/cTg)	verovatna aminotransferaza
5750	Rv3432c	W261C (tgg/tgT)	verovatna glutamat dekarboksilaza GadB
5829	Rv3479	S201P (tcc/Ccc)	mogući transmembranski protein
5854	Rv3494c	P484P (cca/ccC)	Mce-familija proteina Mce4F
5980	Rv3573c	A266T (gcc/Acc)	verovatna acil-CoA dehidrogenaza FadE34
6277	Rv3761c	V334I (gtt/Att)	moguća acil-CoA dehidrogenaza FadE36
6365	Rv3803c	Q286H (cag/caT)	sekretujući MPT51/MPB51 antigen protein FbpD (MPT51/MPB51 antigen 85 kompleks C) (AG58C) (mikolil transferaza 85C) (fibronektin-vezujući protein C) (85C)
6533	Rv3864	I386V (atc/Gtc)	ESX-1 sekretujući protein EspE
6603	Rv3887c	M128I (atg/atA)	ESX konzervirana komponenta EccD2 ESX-2 tip VII sekrecioni sistem protein, verovatno transmembranski protein
6650	Rv3900c	Q32Q (caa/caG)	konzervirani hipotetički protein bogat alaninom

Prilog 7.

Tabela 38. Udruženost pojedinačnih mutacija u genima rezistencije MDR sojeva *M. tuberculosis* i pripadnosti klasteru.

Gen	Mutacija	NGS klaster		p vrednost
		ne (n=10)	da (n=50)	
<i>rpsL</i>	K43R	9 (90%)	49 (98%)	0,308
	K88R	1 (10%)	1 (2%)	
<i>gidB</i>		ne (n=6)	da(n=6)	0,047
	A119D	1 (16,7%)	0 (0%)	
	A140A	1 (16,7%)	0 (0%)	
	E40G	1 (16,7%)	0 (0%)	
	L58L	1 (16,7%)	0 (0%)	
	L79S	1 (16,7%)	0 (0%)	
	L91P	1 (16,7%)	0 (0%)	
	P75L	0 (0%)	3 (50%)	
	P75S	0 (0%)	3 (50%)	
<i>inhA</i>		ne (n=1)	da (n=1)	1,000
	I16V	0 (0%)	1 (100%)	
	I21V	1 (100%)	0 (0%)	
<i>ndh</i>		ne (n=2)	da (n=7)	0,222
	V18A	1 (50%)	7 (100%)	
	V275G	1 (50%)	0 (0%)	
<i>katG</i>		ne (n=33)	da (n=72)	0,000
	D142N	1 (3%)	0 (0%)	
	D663YS315T	1 (3%)	0 (0%)	
	D723ND663Y	1 (3%)	0 (0%)	
	E399ES315T	1 (3%)	0 (0%)	
	G285C	1 (3%)	0 (0%)	
	G699E	1 (3%)	5 (6,9%)	
	I335VS315T	1 (3%)	0 (0%)	
	L141F	1 (3%)	0 (0%)	
	L587RP292A	0 (0%)	2 (2,8%)	
	P29S	1 (3%)	0 (0%)	
	S315N	1 (3%)	0 (0%)	

Gen	Mutacija	NGS klaster		p vrednost
		ne (n=10)	da (n=50)	
	S315RS315T	0 (0%)	2 (2,8%)	
	S315T	19 (57,6%)	62 (86,1%)	
	V1A	1 (3%)	1 (1,4%)	
	V731MW477_	1 (3%)	0 (0%)	
	W351_	1 (3%)	0 (0%)	
	W438GA256G	1 (3%)	0 (0%)	
<i>rpoB</i>		ne (n=31)	da (n=74)	0,002
	D435V	1 (3,2%)	2 (2,7%)	
	F424VD435V	0 (0%)	5 (6,8%)	
	H445D	4 (12,9%)	3 (4,1%)	
	H445L	1 (3,2%)	1 (1,4%)	
	H445R	2 (6,5%)	0 (0%)	
	H445Y	1 (3,2%)	1 (1,4%)	
	L42VS450L	1 (3,2%)	0 (0%)	
	L42VS450LL731P	1 (3,2%)	0 (0%)	
	L452P	1 (3,2%)	0 (0%)	
	P45SS450L	0 (0%)	2 (2,7%)	
	Q432KK799Q	0 (0%)	2 (2,7%)	
	S450L	17 (54,8%)	37 (50%)	
	S450W	2 (6,5%)	20 (27%)	
	T399IS450L	0 (0%)	1 (1,4%)	
<i>rpoC</i>		ne (n=18)	da (n=37)	0,000
	A818V	1 (5,6%)	0 (0%)	
	D485N	1 (5,6%)	0 (0%)	
	D485Y	0 (0%)	2 (5,4%)	
	E1092D	1 (5,6%)	0 (0%)	
	F452L	0 (0%)	6 (16,2%)	
	G594E	8 (44,4%)	8 (21,6%)	
	G594EN698S	1 (5,6%)	0 (0%)	
	G594EP1040R	1 (5,6%)	0 (0%)	
	G594EP1040S	1 (5,6%)	0 (0%)	
	G594ET825N	1 (5,6%)	0 (0%)	
	L516P	0 (0%)	11 (29,7%)	
	L527VG594E	1 (5,6%)	0 (0%)	
	Q1139H	1 (5,6%)	0 (0%)	
	R770H	1 (5,6%)	0 (0%)	
	V1039A	0 (0%)	2 (5,4%)	

Gen	Mutacija	NGS klaster		p vrednost
		ne (n=10)	da (n=50)	
	V431M	0 (0%)	8 (21,6%)	
<i>rpoA</i>		ne (n=1)	da (n=22)	
	D253N	1 (100%)	0 (0%)	
	G31A	0 (0%)	2 (9,1%)	0,042
	P25R	0 (0%)	20 (90,9%)	
<i>embA</i>		ne (n=2)	da (n=40)	
	A576T	0 (0%)	37 (92,5%)	
	G352G	0 (0%)	3 (7,5%)	
	V122V	1 (50%)	0 (0%)	0,001
	W634S	1 (50%)	0 (0%)	
<i>embB</i>		ne (n=22)	da (n=58)	
	A453AQ497R	1 (4,5%)	0 (0%)	
	G406A	3 (13,6%)	0 (0%)	
	G406D	1 (4,5%)	0 (0%)	
	G406SD1024N	0 (0%)	3 (5,2%)	
	H1002R	1 (4,5%)	0 (0%)	
	M1000R	1 (4,5%)	0 (0%)	
	M306I	8 (36,4%)	3 (5,2%)	
	M306IQ497R	0 (0%)	1 (1,7%)	
	M306V	4 (18,2%)	4 (6,9%)	0,000
	M306VA1073A	0 (0%)	4 (6,9%)	
	N296H	0 (0%)	2 (3,4%)	
	N296HL352L	0 (0%)	2 (3,4%)	
	P965P	1 (4,5%)	0 (0%)	
	Q497P	0 (0%)	1 (1,7%)	
	Q497R	2 (9,1%)	36 (62%)	
	T1027T	0 (0%)	2 (3,4%)	
<i>embC</i>		ne (n=4)	da (n=2)	
	A448V	1 (25%)	0 (0%)	
	G190S	0 (0%)	2 (100%)	
	G23E	2 (50%)	0 (0%)	0,210
	G559G	1 (25%)	0 (0%)	
<i>pncA</i>	A102P	ne (n=14)	da (n=40)	
		1 (7,1%)	0 (0%)	0,000

Gen	Mutacija	NGS klaster		p vrednost
		ne (n=10)	da (n=50)	
	A102V	0 (0%)	5 (12,5%)	
	A134V	0 (0%)	1 (2,5%)	
	A46T	1 (7,1%)	0 (0%)	
	C138R	0 (0%)	2 (5%)	
	D136G	1 (7,1%)	0 (0%)	
	D63A	0 (0%)	1 (2,5%)	
	F106S	1 (7,1%)	0 (0%)	
	F94C	2 (14,3%)	0 (0%)	
	G17A	0 (0%)	1 (2,5%)	
	G24D	0 (0%)	4 (10%)	
	H57R	0 (0%)	5 (12,5%)	
	I5T	1 (7,1%)	0 (0%)	
	I90S	0 (0%)	7 (17,5%)	
	L151S	2 (14,3%)	0 (0%)	
	L172P	1 (7,1%)	1 (2,5%)	
	L19P	1 (7,1%)	0 (0%)	
	L35P	0 (0%)	1 (2,5%)	
	L85P	1 (7,1%)	0 (0%)	
	Q10P	1 (7,1%)	0 (0%)	
	R123P	1 (7,1%)	0 (0%)	
	S164P	0 (0%)	1 (2,5%)	
	T160R	0 (0%)	1 (2,5%)	
	V7G	0 (0%)	8 (20%)	
	W68G	0 (0%)	2 (5%)	
		ne (n=6)	da (n=5)	
<i>Rv2731</i>	R161G	2 (33,3%)	0 (0%)	
	S40P	3 (50%)	5 (100%)	0,302
	V43V	1 (16,7%)	0 (0%)	
		ne (n=5)	da (n=38)	
<i>gyrA</i>	A609A	1 (20%)	0 (0%)	
	A90V	1 (20%)	0 (0%)	
	A90VV742L	0 (0%)	5 (13,2%)	
	D94G	0 (0%)	1 (2,6%)	
	D94GH490R	1 (20%)	0 (0%)	0,000
	D94GV742L	0 (0%)	5 (13,2%)	
	D94N	1 (20%)	0 (0%)	
	H490R	1 (20%)	0 (0%)	

Gen	Mutacija	NGS klaster		p vrednost
		ne (n=10)	da (n=50)	
	L105RV742L	0 (0%)	4 (10,5%)	
	S91PR292GV742L	0 (0%)	1 (2,6%)	
	V742L	0 (0%)	22 (57,9%)	
<i>gyrB</i>		ne (n=1)	da (n=6)	
	D334D	1 (100%)	0 (0%)	
	N499S	0 (0%)	1 (16,7%)	
	T373T	0 (0%)	4 (66,7%)	0,434
	T500A	0 (0%)	1 (16,7%)	
<i>ethA</i>		ne (n=9)	da (n=13)	
	F302S	1 (11,1%)	0 (0%)	
	G43S	1 (11,1%)	0 (0%)	
	L229R	0 (0%)	3 (23,1%)	
	P334A	1 (11,1%)	0 (0%)	
	Q206_	0 (0%)	2 (15,4%)	0,000
	R279_	1 (11,1%)	0 (0%)	
	T453S	1 (11,1%)	0 (0%)	
	T88I	2 (22,2%)	0 (0%)	
	V417E	2 (22,2%)	0 (0%)	
	W256_	0 (0%)	8 (61,5%)	
<i>fabG1</i> prom		ne (n=5)	da (n=1)	
	15c/t	3 (60%)	0 (0%)	
	58t/c	0 (0%)	1 (100%)	0,166
	8t/g	2 (40%)	0 (0%)	
<i>mshA</i>		ne (n=1)	da (n=3)	
	A362D	0 (0%)	1 (33,3%)	
	F117F	1 (100%)	0 (0%)	
	G67R	0 (0%)	1 (33,3%)	1,000
	W430_	0 (0%)	1 (33,3%)	
<i>thyX</i>		ne (n=1)	da (n=3)	
	R168R	1 (100%)	0 (0%)	
	T234T	0 (0%)	3 (100%)	0,250
<i>folC</i>		ne (n=3)	da (n=1)	
	E40D	1 (33,3%)	0 (0%)	0,502

Gen	Mutacija	NGS klaster		p vrednost
		ne (n=10)	da (n=50)	
	R42P	0 (0%)	1 (100%)	
	S150G	2 (66,7%)	0 (0%)	

Prilog 8.

Tabela 40. Udruženost pojedinačnih mutacija u genima rezistencije MDR sojeva *M. tuberculosis* sa ishodima lečenja.

Gen	Mutacija	Ishod lečenja		p vrednost
		neuspešno/umro	završeno/uspešno	
<i>rpsL</i>	K43R	21 (47,7%)	23 (52,3%)	0,344
	K88R	0 (0%)	1 (100%)	
<i>gidB</i>	A119D	1 (100%)	0 (0%)	0,323
	A140A	0 (0%)	1 (100%)	
	E40G	1 (100%)	0 (0%)	
	L79S	0 (0%)	1 (100%)	
	L91P	1 (100%)	0 (0%)	
	P75L	0 (0%)	2 (100%)	
	P75S	1 (100%)	0 (0%)	
<i>ndh</i>	V18A	3 (60%)	2 (40%)	0,439
	V275G	1 (100%)	0 (0%)	
<i>katG</i>	D142N	0 (0%)	1 (100%)	0,262
	D663YS315T	1 (100%)	0 (0%)	
	D723ND663Y	1 (100%)	0 (0%)	
	E399ES315T	1 (100%)	0 (0%)	
	G699E	1 (33,3%)	2 (66,7%)	
	L141F	1 (100%)	0 (0%)	
	L587RP292A	2 (100%)	0 (0%)	
	P29S	1 (100%)	0 (0%)	
	S315N	0 (0%)	1 (100%)	
	S315RS315T	0 (0%)	2 (100%)	
	S315T	25 (41%)	36 (59%)	
	V1A	0 (0%)	2 (100%)	
	V731MW477_	0 (0%)	1 (100%)	
	W351_	1 (100%)	0 (0%)	
	W438GA256G	0 (0%)	1 (100%)	
<i>inhA</i> prom	15 c/t	1 (100%)	0 (0%)	0,083
	8 t/g	0 (0%)	2 (100%)	

Gen	Mutacija	Ishod lečenja		p vrednost
		neuspešno/umro	završeno/uspešno	
<i>rpoB</i>	D435V	0 (0%)	2 (100%)	0,214
	F424VD435V	0 (0%)	2 (100%)	
	H445D	1 (20%)	4 (80%)	
	H445L	1 (50%)	1 (50%)	
	H445R	2 (100%)	0 (0%)	
	H445Y	2 (100%)	0 (0%)	
	L42VS450LL731P	0 (0%)	1 (100%)	
	P45SS450L	0 (0%)	2 (100%)	
	Q432KK799Q	0 (0%)	2 (100%)	
	S450L	18 (47,4%)	20 (52,6%)	
	S450W	9 (45%)	11 (55%)	
	T399IS450L	0 (0%)	1 (100%)	
<i>rpoC</i>	A818V	1 (100%)	0 (0%)	0,535
	D485Y	1 (50%)	1 (50%)	
	E1092D	0 (0%)	1 (100%)	
	F452L	2 (40%)	3 (60%)	
	G594E	2 (20%)	8 (80%)	
	G594EN698S	0 (0%)	1 (100%)	
	G594EP1040R	0 (0%)	1 (100%)	
	G594ET825N	1 (100%)	0 (0%)	
	L516P	2 (33,3%)	4 (66,7%)	
	L527VG594E	0 (0%)	1 (100%)	
	Q1139H	1 (100%)	0 (0%)	
	V1039A	1 (100%)	0 (0%)	
	V431M	3 (50%)	3 (50%)	
<i>rpoA</i>	D253N	1 (100%)	0 (0%)	0,403
	G31A	1 (100%)	0 (0%)	
	P25R	9 (50%)	9 (50%)	
<i>embA</i>	A576T	16 (50%)	16 (50%)	0,226
	G352G	0 (0%)	2 (100%)	
	W634S	1 (100%)	0 (0%)	
<i>embB</i>	A453AQ497R			0,285
	G406A	1 (100%)	0 (0%)	
	G406D	0 (0%)	1 (100%)	
	G406SD1024N	0 (0%)	2 (100%)	

Gen	Mutacija	Ishod lečenja		p vrednost
		neuspešno/umro	završeno/uspešno	
	H1002R	1 (100%)	0 (0%)	0,620
	M1000R	1 (100%)	0 (0%)	
	M306I	6 (60%)	4 (40%)	
	M306IQ497R	0 (0%)	1 (100%)	
	M306V	0 (0%)	2 (100%)	
	M306VA1073A	0 (0%)	3 8100%	
	N296H	1 (100%)	0 (0%)	
	N296HL352L	1 (50%)	1 (50%)	
	P965P	0 (0%)	1 (100%)	
	Q497P	0 (0%)	1 (100%)	
	Q497R	17 (53,1%)	15 (46,9%)	
	T1027T	1 (100%)	0 (0%)	
<i>pncA</i>	A102P	1 (100%)	0 (0%)	
	A102V	2 (50%)	2 (50%)	
	A134V	0 (0%)	1 (100%)	
	A46T	1 (100%)	0 (0%)	
	C138R	1 (100%)	0 (0%)	
	D136G	0 (0%)	1 (100%)	
	F94C	0 (0%)	2 (100%)	
	G17A	1 (100%)	0 (0%)	
	G24D	2 (66,7%)	1 (33,3%)	
	H57R	1 (25%)	3 (75%)	
	I5T	1 (100%)	0 (0%)	
	I90S	3 (42,9%)	4 (57,1%)	
	L151S	1 (50%)	1 (50%)	
	L172P	1 (100%)	0 (0%)	
	L19P	1 (100%)	0 (0%)	
	L35P	1 (100%)	0 (0%)	
	L85P	0 (0%)	1 (100%)	
	Q10P	0 (0%)	1 (100%)	
	R123P	1 (100%)	0 (0%)	
	S164P	1 (100%)	0 (0%)	
	T160R	0 (0%)	1 (100%)	
	V7G	2 (50%)	2 (50%)	
Rv2731	R161G	0 (0%)	2 (100%)	0,030
	S40P	0 (0%)	2 (100%)	
	V43V	1 (100%)	0 (0%)	

Gen	Mutacija	Ishod lečenja		p vrednost
		neuspešno/umro	završeno/uspešno	
<i>gyrA</i>	A609A	1 (100%)	0 (0%)	0,733
	A90V	1 (100%)	0 (0%)	
	A90VV742L	2 (40%)	3 (60%)	
	D94G	1 (100%)	0 (0%)	
	D94GH490R	1 (100%)	0 (0%)	
	D94GV742L	2 (50%)	2 (50%)	
	D94N	1 (100%)	0 (0%)	
	H490R	1 (100%)	0 (0%)	
	L105RV742L	2 (66,7%)	1 (33,3%)	
	S91PR292GV742L	1 (100%)	0 (0%)	
	V742L	9 (50%)	9 (50%)	
<i>gyrB</i>	D334D	1 (100%)	0 (0%)	0,112
	N499S	0 (0%)	1 (100%)	
	T373T	0 (0%)	3 (100%)	
	T500A	1 (100%)	0 (0%)	
<i>ethA</i>	F302S	1 (100%)	0 (0%)	0,291
	G43S	1 (100%)	0 (0%)	
	L229R	0 (0%)	2 (100%)	
	P334A			
	Q206_	1 (100%)	0 (0%)	
	R279_	0 (0%)	1 (100%)	
	T453S	0 (0%)	1 (100%)	
	T88I	0 (0%)	1 (100%)	
	V417E	0 (0%)	2 (100%)	
<i>fabG1</i> prom	W256_	2 (50%)	2 (50%)	0,135
	15c/t	1 (100%)	0 (0%)	
	58t/c	0 (0%)	1 (100%)	
<i>mshA</i>	8t/g	0 (0%)	2 (100%)	0,223
	A362D	1 (100%)	0 (0%)	
	F117F	0 (0%)	1 (100%)	
<i>folC</i>	W430_	0 (0%)	1 (100%)	0,135
	E40D	0 (0%)	1 (100%)	

Gen	Mutacija	Ishod lečenja		p vrednost
		neuspešno/umro	završeno/uspešno	
	R42P	1 (100%)	0 (0%)	
	S150G	0 (0%)	2 (100%)	

BIOGRAFIJA

Irena Arandelović rođena je 10.01.1982. godine u Valjevu. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Valjevu sa odličnim uspehom. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2008. godine sa prosečnom ocenom 9,29. Obavezni staž je obavila na Medicinskom fakultetu u Beogradu i položila stručni ispit za doktora medicine 2009. godine. U aprilu 2011. godine upisala je specijalizaciju iz Medicinske mikrobiologije na Medicinskom fakultetu u Beogradu.

Dr Irena Arandelović je 21. oktobra 2010. godine zaposlena kao saradnik u nastavi za užu naučnu oblast Mikrobiologija na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, a 24. januara 2013. godine izabrana je u zvanje asistenta. Kao saradnik je bila angažovana na projektima Ministarstva zdravlja Republike Srbije podržanim od strane Globalnog Fonda za borbu protiv AIDS, tuberkuloze i malarije: podprojekat „Nadzor rezistencije bacila tuberkuloze na antituberkulotike u Srbiji“ u okviru projekta „Kontrola tuberkuloze u Srbiji“ tokom 2010-2011. godine i projekat „Jačanje i povećanje dostupnosti dijagnostike i lečenja tuberkuloze i multirezistentne tuberkuloze sa naglaskom na najosetljivije populacije“ tokom 2010-2015. godine. Od 2011. godine uključena je u rad na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije „Bakterije rezistentne na antibiotike u Srbiji: fenotipska i genotipska karakterizacija“. Dobitnik je stipendije Federacije evropskih mikrobioloških društava FEMS Research Fellowship za 2013. godinu, za studijski boravak u laboratoriji Molecular Mycobacteriology Group, Forschungszentrum Borstel, Nemačka u trajanju od tri meseca.

Do sada je objavila tri rada štampana *in extenso* u časopisima indeksiranim u JCR listi, 11 radova štampanih u izvodima međunarodnih skupova i dva rada štampana u izvodima nacionalnih skupova.

U Beogradu,

05.09.2015. godine

dr Irena Arandelović

Izjava o autorstvu

Potpisana **Irena Arandžević**

broj upisa: MM-08/09

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom „**Vrste, filogenetske karakteristike i genetička osnova rezistencije multirezistentnih sojeva *Mycobacterium tuberculosis* kompleksa izolovanih u Srbiji**“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranta



U Beogradu, 05.09.2015. godine

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: **Irena Arandelović**

Broj upisa: MM-08/09

Studijski program: Molekularna medicina

Naslov rada: „Vrste, filogenetske karakteristike i genetička osnova rezistencije multirezistentnih sojeva *Mycobacterium tuberculosis* kompleksa izolovanih u Srbiji“

Mentor: prof. dr Dragana Vuković

Potpisani: Irena Arandelović

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranta



U Beogradu, 05.09.2015. godine

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom «Vrste, filogenetske karakteristike i genetička osnova rezistencije multirezistentnih sojeva *Mycobacterium tuberculosis* kompleksa izolovanih u Srbiji», koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

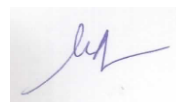
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranta



U Beogradu, 05.09.2015. godine

1. **Autorstvo** - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. **Autorstvo – nekomercijalno**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. **Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. **Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. **Autorstvo – bez prerade**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. **Autorstvo - deliti pod istim uslovima**. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.