



**НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР ПО ЗАРАЗНИ И ПАРАЗИТНИ
БОЛЕСТИ**

**МИКРОБИОЛОГИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ НА ТУБЕРКУЛОЗАТА С
ЕКСТЕНЗИВНА РЕЗИСТЕНТНОСТ В БЪЛГАРИЯ**

Станислава Пламенова Йорданова

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертационен труд за придобиване на образователната и научна
степен „Доктор“

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и
информатика

Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Научна специалност: Микробиология

Научни ръководители:

Проф. д-р Тодор Веселов Кантарджиев, дмн

Доц. д-р Елизабета Василева Бачийска, д.м.

София, 2017г.

Дисертацията е представена за обсъждане пред отдел „Микробиология“ към Национален център по заразни и паразитни болести, на 15.03.2017г.

Дисертацията съдържа 121 страници, 30 таблици и 24 фигури. Библиографската справка съдържа 88 заглавия.

Изследванията са извършени в отдел „Микробиология“, НЦЗПБ.

Защитата на дисертацията ще се състои на 2017г. от 13:00 ч. в аулата на Националния център по заразни и паразитни болести, бул. "Янко Сакъзов" 26, София, на открито заседание на научно жури в състав:

Председател: Доц. д-р Елизабета Бачийска, д.м.

Членове:

1. Проф. д-р Стефана Събчева, дмн - рецензия
2. Проф. д-р Ива Христова, дмн - рецензия
3. Проф. д-р Галина Железова, дмн
4. Доц. д-р Надя Маркова, д.б.
5. Доц. д-р Елизабета Бачийска, д.м.

Материалите по защитата са публикувани на www.ncipd.org и са на разположение в библиотеката на НЦЗПБ, София.

НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР ПО ЗАРАЗНИ И ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ

**МИКРОБИОЛОГИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ НА ТУБЕРКУЛОЗАТА С
ЕКСТЕНЗИВНА РЕЗИСТЕНТНОСТ В БЪЛГАРИЯ**

Станислава Пламенова Йорданова

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертационен труд за придобиване на образователната и научна
степен „Доктор“

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и
информатика

Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Научна специалност: Микробиология

Научни ръководители:

Проф. д-р Тодор Веселов Кантарджиев, дмн

Доц. д-р Елизабета Василева Бачийска, д.м.

София, 2017г.

СЪДЪРЖАНИЕ

Списък съкращения.....	5
Въведение.....	6
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	8
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	8
1. Дизайн на проучването.....	8
2. Материали.....	10
3. Методи.....	10
IV. РЕЗУЛТАТИ	13
1. Резултати от фенотипните тестове за лекарствена чувствителност ...	15
2. Резултати от молекулярно-генетичните тестове за откриване на мутации, свързани с резистентността	17
3. Резултати от молекулярно-епидемиологични методи за типизиране	21
4. Еволюция на резистентността на щамове <i>M. tuberculosis</i> до екстензивна	24
5. <i>M. tuberculosis</i> с първична екстензивна резистентност.....	26
V. ОБСЪЖДАНЕ	29
1. Резултати от фенотипните тестове за лекарствена чувствителност	29
2. Резултати от молекулярно-генетичните тестове за откриване на мутации, свързани с резистентността	30
3. Резултати от молекулярно-епидемиологични методи за типизиране .	32
4. Еволюция на резистентността на щамове <i>M. tuberculosis</i> до екстензивна	34
5. <i>M. tuberculosis</i> с първична екстензивна резистентност.....	35
VI. ИЗВОДИ	36
VIII. ПРИНОСИ	37
1. Приноси от научен характер	37
2. Приноси от научно-приложен характер.....	37
IX. ЛИТЕРАТУРА	38
X. ПРИЛОЖЕНИЕ	42
XI. SUMMARY	45

СПИСЪК СЪКРАЩЕНИЯ

МИК	Минимална инхибираща концентрация
НРЛ ТБ	Национална референтна лаборатория по туберкулоза
НЦЗПБ	Национален център по заразни и паразитни болести
ПЛС	Противотуберкулозни лекарствени средства
СЗО	Световна здравна организация
ТБ	Туберкулоза
ТЛЧ	Тест за лекарствена чувствителност
HIV	Human Immunodeficiency Virus
MDR-TB	Multidrug-resistant tuberculosis
MGIT	Mycobacteria Growth Indicator Tube
MIRU	Mycobacterial Interspersed Repetitive Units
VNTR	Variable Number Tandem Repeat
MTC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
PCR	Polymerase chain reaction
SIT	Spoligo-International Type
XDR-TB	Extensively drug-resistant tuberculosis

ВЪВЕДЕНИЕ

Екстензивнорезистентна туберкулоза (XDR-TB) се дефинира като туберкулоза, причинена от щам *Mycobacterium tuberculosis complex*, резистентен към рифампицин и изониазид (MDR), с допълнителна *in vitro* резистентност към който и да е представител от групата на флуорохинолоните и към един или повече от следните инжекционни лекарствени средства: канамицин, амикацин, капреомицин [19].

През 2006г. Центъра по контрол на заболяванията (CDC) и СЗО публикуват резултатите от глобално проучване на резистентността при *M.tuberculosis*, в което се установява, че 2% от MDR-TB, изолирани 2000-2004г., били с екстензивна резистентност. Същата година се оповестява и вътреболничният взрив в Тугела Фери, Южна Африка. Според данни на СЗО, в глобален мащаб XDR-TB за 2015г. представлява 9,5% от MDR-TB (95% CI: 7,0 –12,1%), а докладваният брой случаи, започнали лечение същата година е 7579 - двойно по-висок от предходната година [28,29]. В Европейският регион на СЗО делът на XDR-TB е двойно по-висок (18,3% за 2014г.) [11]. С увеличаване на резистентността при туберкулозният щам, успехът от лечение рязко спада. Докато успехът от лечение за туберкулозата в световен мащаб е бил 83% (за кохорта 2014г.), за MDR-TB спада почти на половина – 52% (кохорта 2013г.), а за туберкулозата с екстензивна резистентност успехът от лечение е още по-нисък – едва 28% [28]. Неефективното лечение на MDR-TB остава като една от основните предпоставки за развитието на придобита екстензивна резистентност. Причините са основно в множеството механизми на устойчивост и резистентност при *M.tuberculosis*, както и човешките фактори, свързани с пропуски в медицинските услуги и качеството на лекарствените средства, съдействието от страна на пациентите и др.

Рисковите фактори за развитие и разпространение на XDR-TB са в зависимост от местното население и неговите демографски особености (мигрантска общност, коинфекцията с HIV, население в места за лишаване от свобода). Предходната противотуберкуозна терапия е от съществен принос към развитието на екстензивна резистентност [13].

Първите случаи с XDR-TB в България са открити през 2010г. До настоящият момент липсва задълбочен анализ на фенотипните и генетични характеристики на разпространените в България туберкулозни щамове с екстензивна резистентност, както и не са разглеждани трансмисията и придобиването на XDR-TB.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се охарактеризират фенотипно и генетично разпространените в България туберкулозни щамове с екстензивна резистентност, за да се проследи чрез микробиологични методи трансмисията и придобиването на XDR-TB.

Задачите, поставени във връзка с поставената цел, бяха следните:

1. Да се определят клиничните изолати с MDR-TB и да се изработят тестове за лекарствена чувствителност с конвенционален метод към втори ред ПЛС
2. Да се определят мутациите в таргетните гени посредством молекулярно-генетични методи
3. Да се типизират установените XDR-TB клинични изолати и да се анализира разпространението им на територията на България
4. Да се проследи еволюцията на резистентността при случаите с придобита екстензивна резистентност на *M.tuberculosis*
5. Да се анализира разпространението на случаите с първична екстензивна резистентност

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

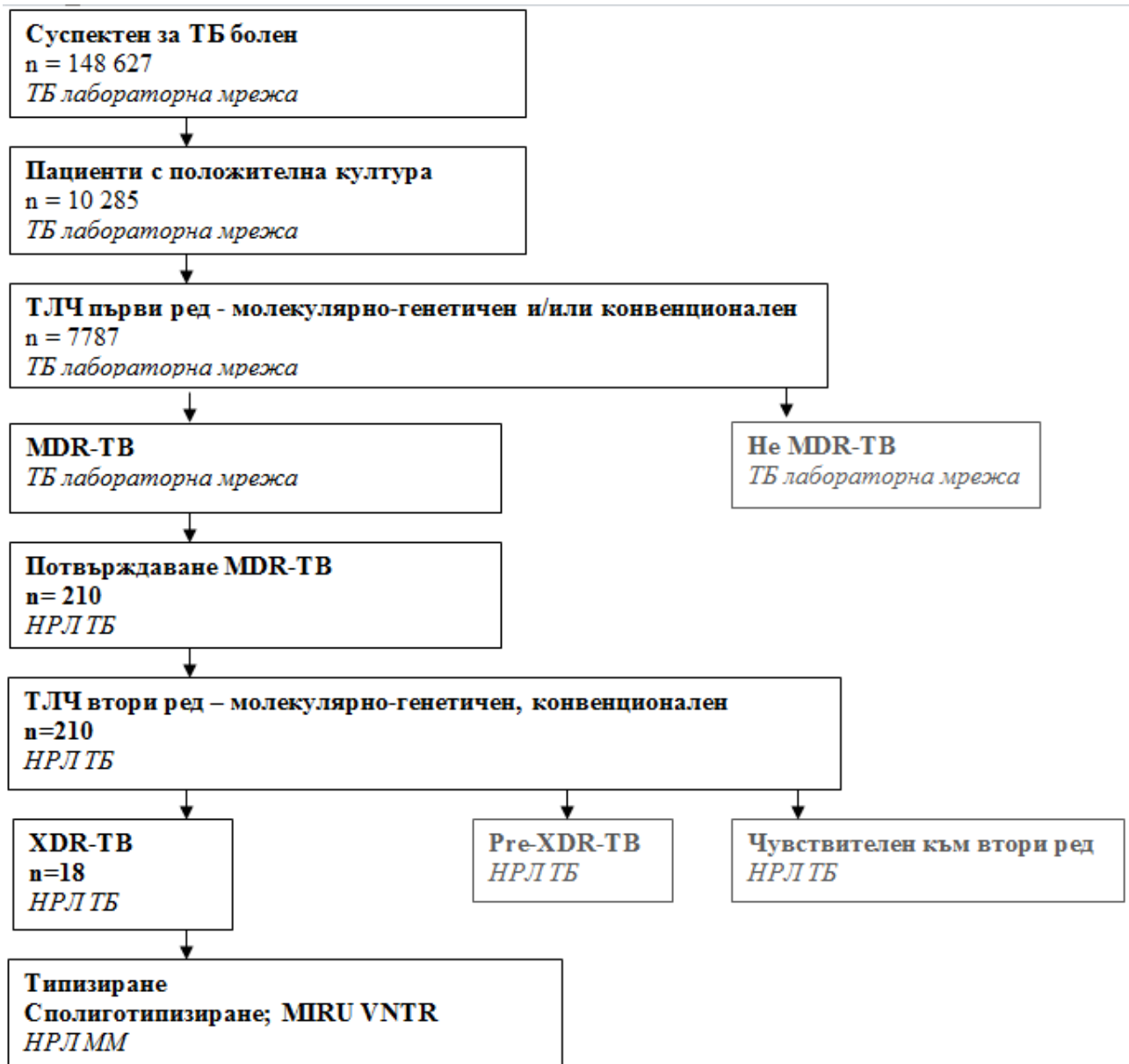
Настоящото проучване обхваща шестгодишен период (от 2011г. до 2016г. включително). За първи път в България през 2011г. НРЛ ТБ въведе и сертифицира метода за тестване на лекарствената чувствителност по пропорционалния метод в течни хранителни среди към втори ред ПЛС, а именно: офлоксацин, амикацин, канамицин, капреомицин.

1. Дизайн на проучването

Дизайнът на проучването е представен на **фигура 11**. ТБ лабораторната мрежа в страната (34 лаборатории) се представляваше от областните лаборатории за микробиологична диагностика на

туберкулозата и НРЛ ТБ, където се извършваше първична микробиологична диагностика на суспектни за туберкулоза пациенти – микроскопско изследване, културелно изследване, а в някои от лабораториите се осъществяваше и ТЛЧ.

Всички потвърдени в НРЛ ТБ MDR-TB щамове бяха тествани за резистентност към втори ред ПЛС. Установихме екстензивна резистентност при 18 пациента. Данните са от лабораторните регистри на НРЛ ТБ. Термично инактивирани бактериални суспензии се предаваха на НРЛ ММ за молекулярно-епидемиологично типизиране.



Фигура 11. Дизайн на проучването, 2011-2016г. включително

2. Материали

В проучването са включени само пациентите с изолиран щам *M.tuberculosis* complex с доказана в НРЛ ТБ екстензивна резистентност в периода 2011-2016г. Като пациенти с XDR-ТВ бяха потвърдени шест жени и дванадесет мъже.

Транспортирането на клинични материали и/или клинични изолати (щамове) на пациенти, суспектни за М/XDR-ТВ, от областните лечебни заведения до НРЛ по туберкулоза, НЦЗПБ, се осъществяваше чрез куриер в тройнопагетираща система, съгласно изискванията за транспорт на биологичноопасни материали категория А – UN2814 (инфекциозен материал, представляващ опасност за хората) и категория В – UN3373 (диагностичен материал).

3. Методи

В повечето от областните микробиологични лаборатории, както и НРЛ ТБ, деконтаминацията на клиничните материали се извършваше чрез метода N-ацетил-L-цистеин-NaOH (NALC). В някои от областните лаборатории се използваше деконтаминация по метода на Петров с 4% NaOH.

Видовата идентификация и потвърждаване на клиничните изолати до *Mycobacterium tuberculosis* complex се извършваше по два начина: тестване чувствителността към p-нитробензоена киселина (pNBA) или чрез имунохроматографски тест: BD MGIT TBc Identification Test, приложим за култури на течната хранителна среда.

Фенотипният метод за тестване лекарствената чувствителност към първи ред ПЛС в НРЛ ТБ бе чрез т.нар. златен стандарт – пропорционален метод с критични концентрации в течни хранителни среди. Беше използван стандартизираният набор BACTEC MGIT 960 SIRE kit. Крайната (критична) концентрация на антибиотиците в епруветките бе:

стрептомицин – 1,0 µg/ml, изониазид – 0,1 µg/ml, рифампин – 1,0 µg/ml, етамбутол – 5,0 µg/ml.

Фенотипният метод за тестване лекарствената чувствителност към втори ред ПЛС беше чрез пропорционален метод с критични концентрации в течни хранителни среди MGIT 960. Изпитваха се щамове *M.tuberculosis* complex при установяване на мултилекарствена резистентност. Беше използван растежния суплемент от стандартизираният набор ВАСТЕС MGIT 960 SIRE kit и антибиотични субстанции, посочени в **таблица 10**.

Таблица 10. Използвани антибиотични субстанции за ТЛЧ втори ред в НРЛ ТБ, НЦЗПБ

Антибиотик	Съдържание	Производител
Капреомицин	Capreomycin sulfate, 844 µg/ml	USP Rockville, MD
Офлоксацин	Ofloxacin, 99,1%	Molecula
Амикацин	Amikacin disulfate salt, 740 µg/ml	Molecula
Канамицин	Kanamycin sulfate, 94.5%	Dr. Ehrenstorfer GmbH
Линезолид	Чиста субстанция, 100%	Sigma - Aldrich
Моксифлоксацин	Moxifloxacin hydrochloride, ca.100%	Fluka

Крайната критична концентрация на тестваните антибиотици, бе: капреомицин 2,5 µg/ml, офлоксацин 2,0 µg/ml, амикацин 1,0 µg/ml, канамицин 2,5 µg/ml и 5,0 µg/ml, линезолид 1,0 µg/ml, моксифлоксацин 0,25 и 0,5 µg/ml.

Отчитането на ТЛЧ първи и втори ред бе автоматично чрез системата ВАСТЕС MGIT 960 System, която регистрира промените в количеството кислород, консумирано от микобактериите.

Един от използваните молекулярни методи за определяне на мутации, свързани с резистентността, беше GenoType[®] MTBDR^{plus} v 1.0, v 2.0 – базира се на технологията DNA-STRIP[®] и позволява молекулярно-генетично откриване на *M. tuberculosis* complex и резистентността му към рифампицин или изониазид от култури или положителни клинични проби от дихателна система. Определянето на резистентността към рифампицин бе възможно с отчитане на най-важните мутации на *rpoB* гена (кодира β -субединицата на РНК полимеразата). За търсене на висока степен на резистентност към изониазид, се изследваше гена *katG* (кодиране за каталаза пероксидаза), а за отчитане на ниска степен на резистентност към изониазид, се изследваше промотора на региона на ген *inhA* (кодиране за NADH еноил АСР редуктаза) [14, 17].

Молекулярно-генетичното откриване на *M. tuberculosis* complex и резистентността му към флуорохинолони, аминогликозиди/циклични пептиди и етамбутол се извършваше с GenoType[®] MTBDR^{sl}. Определянето на резистентността към флуорохинолони бе възможно с отчитане на най-често срещаните мутации в гена *gyrA* гена (кодира ДНК-гираза); за отчитане на резистентността към аминогликозиди / циклични пептиди – *rrs* гена за 16S рРНК. Във втората версия на теста бе добавено тестване в *gyrB* и промотора на *eis* гена, кодиращ ацетилтрансфераза [15,16].

Разрежданията, стандартизирането на бактериалните суспензии *M.tuberculosis* complex и инокулирането, бе извършено в ламинарен бокс II клас, съгласно стандартно оперативната процедура и техниките за безопасност. Изпълнението на всички тествания бяха извършени съгласно инструкциите на производителите и Методичното указание за микробиологична диагностика на туберкулозата [4, 5, 14, 15,16,17].

Типизирането (сполиготипизиране и 24 локусен MIRU-VNTR) на клиничните изолати XDR-TB беше направено от Национална референтна лаборатория по молекулярна микробиология, НЦЗПБ.

Сполиготипизирането (спейсърно типизиране, Spacer Olygonucleotide Typing), е молекулярно генетичен метод, чрез който се идентифицират ДНК полиморфизми в участъка от прави повтори в генома на щамове от комплекса на *M. tuberculosis*. Типизиране на вариабилни тандемни повтори (MIRU-VNTR) позволява определянето на количеството копия на тандемните повтори в 24 независими полиморфни локуса в генома на *M. tuberculosis*. След получаване на данните, същите бяха анализирани с помощта на SITVIT WEB и www.MIRU-VNTRplus.org.

Поради обема на данните, използван в настоящата работа, широкото използване на статистически методи за обработка не беше приложимо. Въпреки това, използвахме t-критерий на Стюдънт с ϕ трансформация, за да направим сравнение честотата на разпределение на различните мутации при MDR-TB български изолати, с тези на разглежданите XDR-TB случаи. Използвани са още графичен анализ и таблични форми за представяне на резултатите, правени чрез Microsoft Excel 2010.

IV. РЕЗУЛТАТИ

През периода 2011-2016г. в НРЛ ТБ, НЦЗПБ, бяха потвърдени 210 случая на MDR-TB, от които с екстензивна резистентност бяха определени 18 от тях (8,57%). Шест от случаите бяха регистрирани при жени, дванадесет – при мъже, съотношение мъже:жени 2:1 [11].

Средната възраст на лицата към годината на тяхното потвърждаване като XDR-TB, бе 39,77. Възрастовата група с най-голяма честота, бе тази на 45-54г. (**фигура 13**). Не бяха установени случаи на деца с екстензивнорезистентна туберкулоза.



Фигура 13. Разпределение по възрастови групи на XDR-TB случаите в България

Разпределението на случаите по области беше на базата на адресната регистрация на пациентите по време на потвърждаването им като XDR-TB. С най-много случаи на XDR-TB за изследвания период, бе област Пловдив (n=7), следвана от област София – град (n=3) (**фигура 14**).

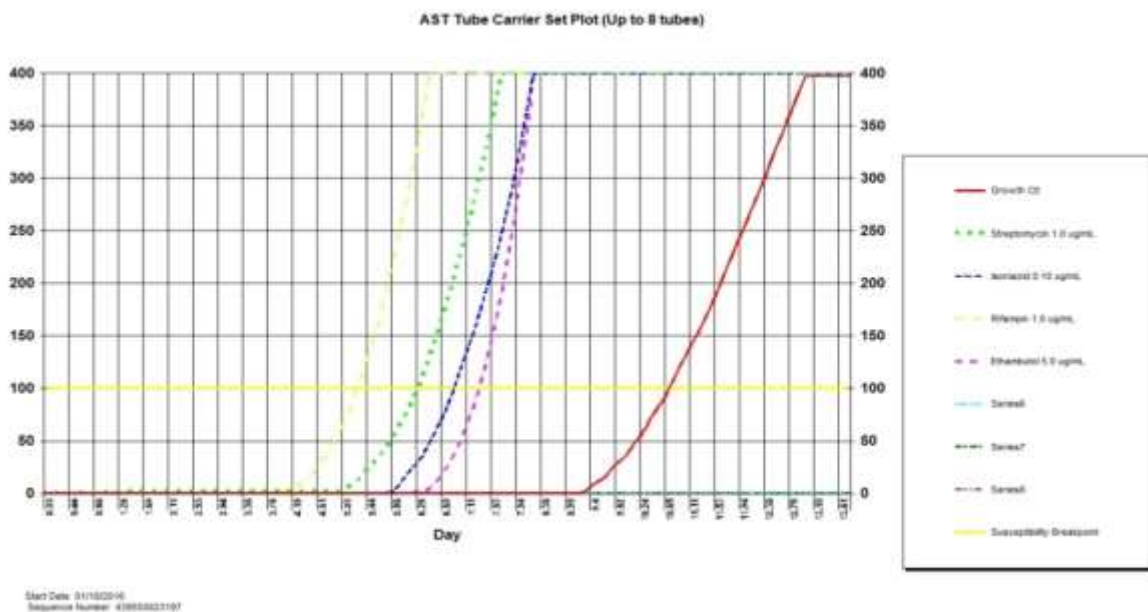


Фигура 14. Географско разпределение на XDR-TB случаите по области в България по адресна регистрация на пациентите

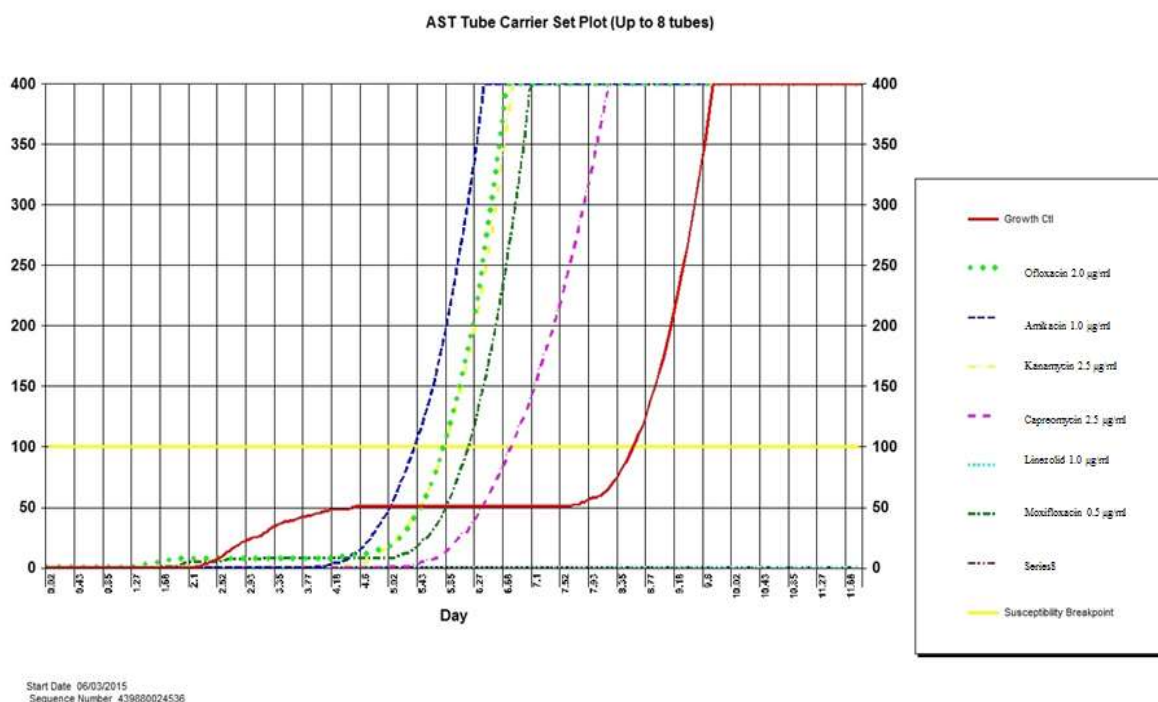
1. Резултати от фенотипни тестове за лекарствена чувствителност

Тестването на туберкулозните щамове за лекарствена резистентност беше двустъпален процес – при първият етап се търсеше резистентност към първи ред ПЛС, и само при установена резистентност към рифампицин и изониазид (MDR-TB) се провеждаше тестването с втори ред ПЛС.

На **фигура 15** и **фигура 16** са представени графични изображения на автоматично генерираните и отчетени от системата VACTEC 960 MGIT валидни резултати от ТЛЧ за първи и втори ред. С плътна червена линия се отчита растежната крива на щама в контролната епруветка, а растежните криви в епруветките с тестваните лекарствени средства се отчита като резистентност.



Фигура 15. Графично изображение на резултат фенотипен тест за лекарствена чувствителност на туберкулозен щам с мултилекарствена резистентност към първи ред ПЛС.



Фигура 16. Графично изображение на резултат фенотипен тест за лекарствена чувствителност на туберкулозен щам с екстензивна резистентност към втори ред ПЛС.

Резистентността към изониазид и рифампицин бе 100%, $n=18$, в съответствие с дефиницията за екстензивно резистентна туберкулоза.

Резистентни към стрептомицин бяха $n=16$, чувствителни $n=1$. При един случай резултатите за стрептомицин при тестване на различни изолати бяха различни (тестове на 3 изолата показаха чувствителност, а при други три – резистентност, без връзка с развитието на случая).

Резистентност към етамбутол показаха $n=15$, чувствителни $n=2$. При един от случаите резултатите за етамбутол при тестване на различни изолати бяха различни (отделните изолати на пациента показваха резистентност или чувствителност, без връзка с развитието на случая).

Резистентност към офлоксацин показаха $n=16$ от случаите, чувствителност – $n=2$. Други два бяха чувствителни на моксифлоксацин, а

от тестваните 13 случая n=11 показаха резистентност. За тринадесетте случая с налични резултати както за офлоксацин, така и за моксифлоксацин, установихме, че за четири от тях (30,76%) не се наблюдава пълна кръстосана резистентност между офлоксацин и моксифлоксацин.

Резистентността към инжекционните лекарствени средства от втори ред бяха както следва: амикацин n=18 (100%), канамицин n=18 (100%). Резистентност към капреомицин n=17 (94,44%), чувствителност показва един случай.

Резистентност към линезолид не се установи при тестваните (n=0), т.е. всички изпитвани изолати показаха чувствителност *in vitro*.

2. Резултати от молекулярно - генетични тестове за откриване на мутации, свързани с резистентността

Успоредно с фенотипните тествания за лекарствена резистентност бяха проведени и изпитвания за търсене на най-честите мутации, свързани с резистентността.

На **фигура 17** е представен един от протоколите, част от резултатите на които бяха използвани в настоящата работа. Като MDR-TB бяха определени изолатите с номера 534, 538, 551 и 557 (липса на хибридизация на див тип 8, и наличие на хибридизация при MUT3 – характерна комбинация за най-често срещаната мутация в *proB* гена, свързана с рифампициновата резистентност - S531L). В *katG* S315T1 мутацията се идентифицира при проба 534, а C15T в *inhA* при пробите номер 538, 551, 557. Като монорифампицин резистентен беше определен номер 535 (с липса на хибридизация на див тип 7).

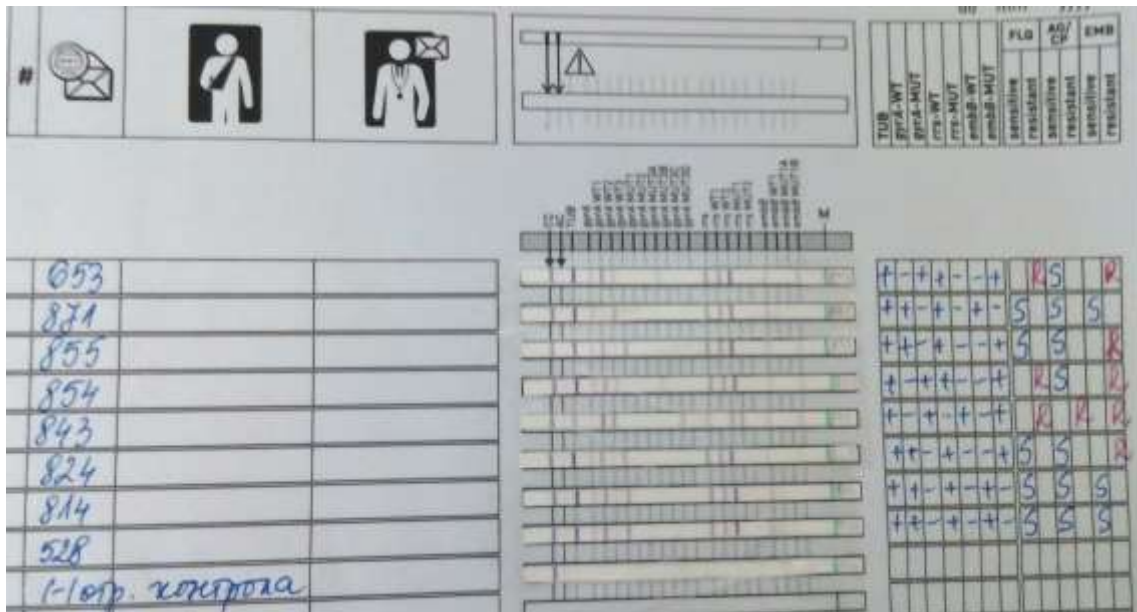


Фигура 17. Протокол с резултати от GenoType[®] MTBDRplus.

Само при установяване на рифампицинова резистентност или MDR-TB, беше провеждан молекулярно-генетичен тест за търсене на най-честите мутации, определящи резистентност към втори ред ПЛС.

На **фигура 18** е представен протокол с резултатите от изпитване на вече установени и потвърдени клинични изолати с рифампицинова резистентност или MDR-TB.

Като флуорохинолон резистентни бяха определени изолатите с номера 653 и 854 (липса на див тип 3, наличие на хибридизация в MUT3A), с определена мутация D94A. Като щам с екстензивна резистентност беше определен номер 843: с мутация D94G (липса на див тип 3, наличие на хибридизация в MUT3C) и наличие на мутация в *rrs* гена.



Фигура 18. Протокол с резултати от GenoType® MTBDRsl

В **таблица 24** са обобщени получените резултати от молекулярно генетичните тестове GenoType® MTBDRplus/sl, v1.0, v2.0, предназначени за бърза детекция на най-често срещаните мутации в гени, свързани с резистентността за всеки пациент поотделно.

Най-често срещаната мутация в *rpoB* гена, свързана с резистентността към рифампицин бе S531L (Ser→Leu) (n=16, 88,88%). В два от случаите тестът откри изменения в изследваните кодони (510-519).

При разглежданите случаи на екстензивна резистентност се установи по-често мутацията C15T (Cys →Thr) в промотора на *inhA* гена (n=10; 55,56%), отколкото S315T1 (Ser →Thr) в *katG* гена (n=9, 50%), като при три от случаите двете мутации се откриха едновременно в изследваните щамове. В един случай имаше изменение в изследвания участък на *katG*, като с използваният тест не може да се определи каква точно бе замената.

Най-честата мутация в *gyrA*, свързана с резистентност към флуорохинолони, бе D94G (n=8; 44,44%), следвана от A90V (n=4; 22,22%), D94A (n=2; 11,11%), S91P (n=1; 5,56%). Тестът не откри мутация в *gyrA*

гена в три от случаите (n=3; 16,66%). При никой от пациентите не се установиха мутациите N538D и E540V в *gyrB* гена.

При всички случаи мутацията A1401G в *rrs* гена определяше резистентността към инжекционните лекарствени средства от втори ред – аминогликозиди и циклични пептиди. При никой от пациентите не се установиха мутации в *eis* гена, характерни с определянето на нискостепенна резистентност към канамицин.

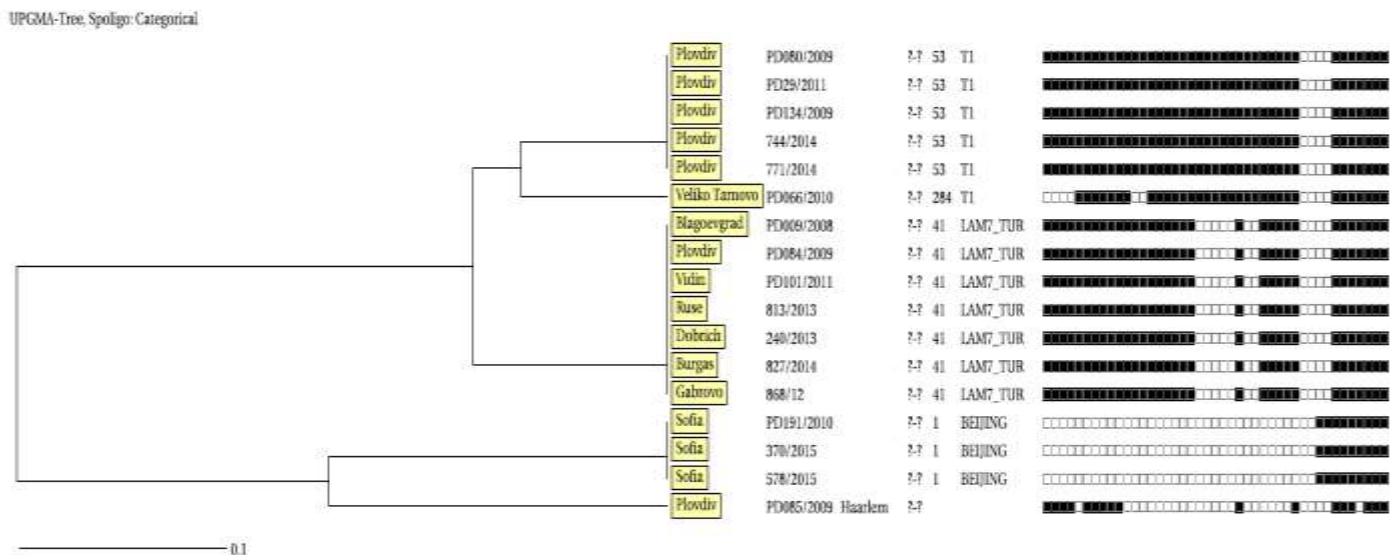
Таблица 24. Резултати от GenoType® MTBDR_{plus/sl}, v1.0, v2.0 на XDR-TB изолатите

Пациент	Мутации, свързани с резистентността, в:						
	<i>rpoB</i>	<i>katG</i>	<i>inhA</i>	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>rrs</i>	<i>eis</i>
Ж01	S531L	-	C15T	D94G	-	A1401G	-
Ж02	S531L	-	C15T	A90V	-	A1401G	-
Ж03	S531L	S315T1	C15T	D94G	-	A1401G	-
Ж04	S531L	-	C15T	S91P	-	A1401G	-
Ж05	ΔWT2,3	-	-	D94G	-	A1401G	-
Ж06	S531L	S315T1	C15T	D94G	-	A1401G	-
М01	S531L	S315T1	-	D94A	-	A1401G	-
М02	ΔWT2,3,4	ΔWT	-	D94G	-	A1401G	-
М03	S531L	S315T1	-	D94G	-	A1401G	-
М04	S531L	S315T1	-	-	-	A1401G	-
М05	S531L	S315T1	-	D94A	-	A1401G	-
М06	S531L	-	C15T	A90V	-	A1401G	-
М07	S531L	-	C15T	A90V	-	A1401G	-
М08	S531L	S315T1	-	-	-	A1401G	-
М09	S531L	S315T1	-	-	-	A1401G	-
М10	S531L	-	C15T	D94G	-	A1401G	-
М11	S531L	-	C15T	A90V	-	A1401G	-
М12	S531L	S315T1	C15T	D94G	-	A1401G	-

3. Резултати от молекулярно – епидемичното типизиране на щамовете XDR-TB

Резултати от сполиготипизиране. На изолатите от 17 пациента беше направено сполиготипизиране. Групирането по клъстери беше 70%. Формираха се три клъстера, а два случая останаха самостоятелни (**фигура 19**).

Към група T1 (Ghana), ST53, принадлежаха щамовете на пет пациента (n=5; 29,41%). Един случай бе определен като Haarlem, без SIT. Един щам бе определен към група T1, SIT284. Към група TUR, SIT41, принадлежаха щамовете на седем пациента (n=7; 41,17%). Към група Пекин, ST1, принадлежаха изолатите на трима XDR-TB (n=3; 17,64%).



Фигура 19. Резултати от сполиготипизиране на XDR-TB щамове, групирани по клъстери

Разпределението на получените резултати, съгласно съвременните класификации на щамовете от МТС комплекса, е направено на **таблица 26**.

Таблица 26. Разпределение на установените за България сполиготипове XDR-TB според класификацията на *M.tuberculosis* complex

Lineage	Група (sublineage)	SIT	XDR-TB (%)	n
Lineage 1 (Индо-Океански)	–	–	–	
Lineage 2 (Източно Азиатски)	Пекин	1	3 (17,64%)	
Lineage 3 (Източна Африка, Централна и Южна Азия)	–	–	–	
Lineage 4 (Евро-Американски)	T1 TUR	53 284 No SIT 41	5 (29,41%) 1 (5,89%) 1 (5,89%) 7 (41,17%)	
Lineage 5 (<i>M.africanum</i> West African 1)	–	–	–	
Lineage 6 (<i>M.africanum</i> West African 1)	–	–	–	
Lineage 7 (Етиопски)	–	–	–	
Животински представители на МТС	–	–	–	

Географското разпределение на различните сполиготипове, установени при XDR-TB, на територията на страната, показва определени особености (**фигура 20**).

Сполиготип 41 бе с равномерно разпределение на територията на България, представен от единични случаи в отделни области.

Разпределението на група T1 (Ghana), към който се числят SIT 53 и SIT 284 беше следното: пет случая SIT 53 в Пловдивска област и единичен случай с SIT 284 област Велико Търново.

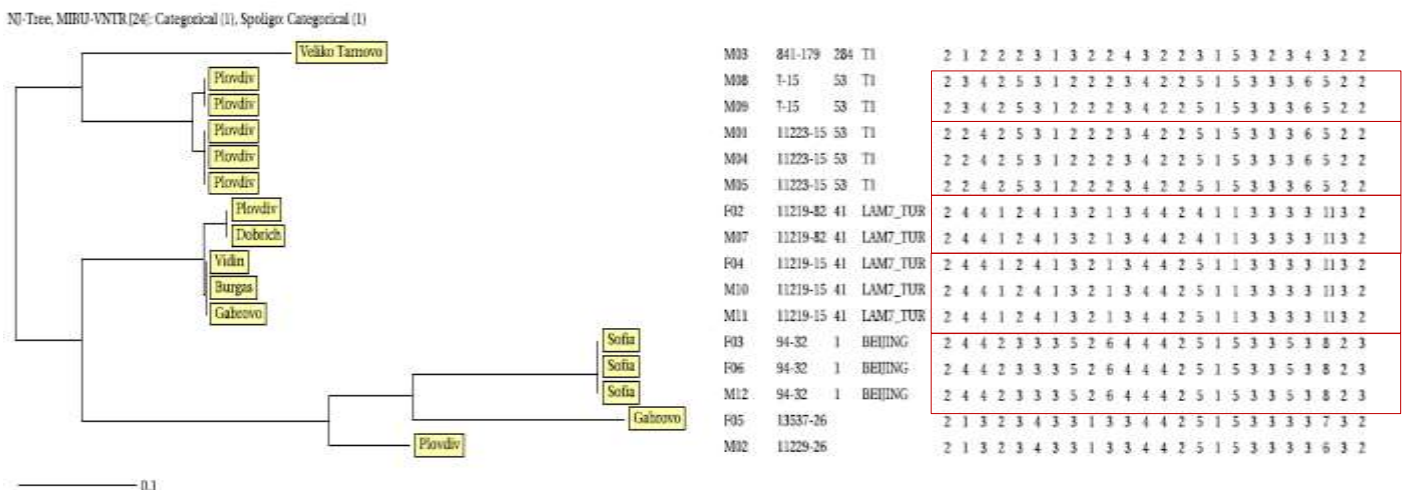
Група Пекин, представен с SIT1 в настоящата работа, бе представен от три случая, единствено в София - град.

Единичен случай на сполиготип без SIT номер, група Haarlem (T1), бе в Пловдивска област.



Фигура 20. Географско разпределение на сполитогиповете XDR-TB на територията на България

Резултати от MIRU-VNTR. С резултати от 24 локусен MIRU-VNTR бяха 16 от разглежданите случаи, **фигура 21.**



Фигура 21. Резултати от 24 локусен MIRU-VNTR на потвърдени XDR-TB, изолирани в България 2011-2016г. Локусите са подредени по възходящ ред.

Благодарение на по-голямата дискриминативна способност на MIRU-VNTR, се формираха 5 по-малки клъстера, а 3 от типизираните случая не се групираха. При обработката на резултатите използвахме алгоритъма за търсене по подобие на MIRU-VNTR базата данни (www.miru-vntrplus.org), като се генерираха автоматично MtbC15-9 типовете. Този код бе определен от комбинацията на 15 локуса (MtbC15) на дискриминативното подмножество, и тип, основан на 9 спомагателни локуса (MtbC9). Типът MtbC15-9 се изписва като комбинация, напр. 841-179.

В SIT53 клъстера (Пловдив) чрез MIRU-VNTR се обособиха на два по-малки - с тип MtbC15-9 11223-15, и един с неопределен MtbC15 тип. Двата клъстера се различават само по един локус – 424 (Mtub04) – при единият повторите са 2, а при по-новите случаи – 3.

Клъстерът на SIT41 също беше разделен на две. Единият тип MtbC15-9 бе 11219-82, а другият – 11219-15. Различията между двата бе отново само в едно копие в един локус – 2531 (MIRU23).

Петият формиран клъстер, бе Пекинският клъстер на SIT1 (София град). Типът MtbC15-9 бе 94-32.

4. Еволюция на резистентността на щамове *M.tuberculosis* до екстензивна

Причисляването на случаите към придобитата екстензивна резистентност на *M.tuberculosis* или към първична такава, бе въз основа на лабораторните регистри и данни от лечебните заведения. За начален фенотип на щама сме приели резултата от първият ТЛЧ на пациента, осъществен в НРЛ ТБ. При осем от пациентите доказахме придобиване на екстензивна резистентност на щама във времето; при шест се отнасяше за трансмисия на щам XDR-TB; а при четирима първичният фенотип не е известен, и развитието на екстензивна резистентност бе определена като „вероятна“ (**таблица 28**).

Таблица 28. Еволюция на резистентността до екстензивна

Брой случаи	Първи ТЛЧ	Преходен фенотип	Краен фенотип	Еволюция на резистентността до XDR-TB
1	Чувствителен	MDR-TB	XDR-TB	да
5	MDR-TB	–	XDR-TB	4 – да; 1 – вероятно да
1	MDR-TB	Pre XDR-TB (FQ-R)	XDR-TB	да
2	Pre XDR-TB (FQ-R)	–	XDR-TB	да
4	Pre XDR-TB (AG/CP-R)	–	XDR-TB	2 – не; 2 – вероятно не
5	XDR-TB	–	XDR-TB	4 – не; 1 – вероятно да

AG – аминокликозиди; CP – циклични пептиди; FQ – флуорохинолини;
R – резистентен

Отделните туберкулозни щамове с придобита екстензивна резистентност в България са описани подробно в **таблица 29**. Всички случаи от разглежданите XDR-TB щамове със SIT41, бяха случаи на придобита екстензивна резистентност, и всички са с характерната мутация C15T, определяща чувствителност към по-високи дози изониазид. Профилът на мутациите, определящи резистентност към първи ред ПЛС, бяха еднакви при всички, докато мутациите в *guyA* бяха разнообразни и говори за тяхното допълнително придобиване. Случаите не бяха свързани помежду си и териториално – те са единични в различни области, което потвърждава тезата, че не се касаеше за трансмисия на щам XDR-TB с тези характеристики (**фигура 20**).

Таблица 29. Микробиологична характеристика на туберкулозните щамове с придобита с времето екстензивна резистентност

SIT (група)	Случаи	Област	Мутации				
			<i>rpoB</i>	<i>katG</i>	<i>inhA</i>	<i>gyrA</i>	<i>rrs</i>
SIT 41(TUR)	7	Благоевград Пловдив Видин Русе Добрич Бургас Габрово	S531L	-	C15T	A90V (n=4) D94G (n=2) S91P (n=1)	A1401 G
SIT 284 (T1)	1	Велико Търново	S531L	S315T 1	-	D94G	A1401 G
No SIT (T1)	1	Пловдив	ΔWT2,3, 4	ΔWT	-	D94G	A1401 G
- *	1	Габрово	ΔWT2,3	-	-	D94G	A1401 G

* Един от случаите няма резултат от сполиготипиране

5. *M.tuberculosis* с първична екстензивна резистентност

За случаи с *M.tuberculosis* с първична екстензивна резистентност сме приели тези, при които преди стартиране на лечение с втори ред в СБАЛББ Габрово има установена туберкулоза с екстензивна резистентност. В тази група сме включили и тези, които поради по-късното въвеждане тестването към моксифлоксацин, първоначално бяха определени като preXDR-TB, но след установяване тяхната резистентност към моксифлоксацин, бяха отнесени към XDR-TB. В потвърждение на тезата, че първичният фенотип на щама е бил с екстензивна резистентност, е

фактът, че този фенотип на щама е потвърден при нелекувани с втори ред ПЛС пациенти (резистентност към моксифлоксацин и инжекционните лекарствени средства, но чувствителност към офлоксацин) както и епидемичната връзка между случаите.

При случаите с първична XDR-TB се оформиха два ясно различими локуса, както в териториално, така и в микробиологично отношение – в област София-град (3 случая) и в Пловдивска област (5 случая).

В София - град първият потвърден случай бе през 2010г., а другите два – през 2015г. Случаите от 2015г. имаха връзка помежду си, но връзка с първият случай не е известна. И трите случая са причинени от SIT1, група Пекин, MtbC15-9 94-32, който е един от най-разпространените щамове сред мултирезистентната туберкулоза в Европа [12].

В Пловдивска област определихме 5 случая като причинени от щамове *M.tuberculosis* с първична екстензивна резистентност. Първият пациент е заболял от туберкулоза 2004г. и първичният фенотип на щама не е известен, определен до ргеXDR-TB преди стартиране на лечението му с втори ред ПЛС, поради по-късното въвеждане на тестването с моксифлоксацин. Последният заболял случай бе регистриран през 2014г. Съществува териториална и епидемична връзка между заболелите. Средната продължителност на трансмисията на конкретният щам към края на 2016г., бе 12 години.

Микробиологичните характеристики на установените щамове *M.tuberculosis* с първична екстензивна резистентност са представени на **таблица 30**. Характерна особеност на XDR-TB щамове от SIT1, която установихме, беше едновременната детекция на мутациите, свързани с изониазидовата резистентност – S315T1 в *katG*, както и C15T в промотора на *inhA* гена. Липсата на разнообразие и в мутациите, свързани с резистентността и към втори ред ПЛС също допринася за тезата, че става въпрос за трансмисия на този XDR-TB щам.

При изолираните в Пловдив щамове SIT 53 (T1), профилът включваше следните характеристики: S531L в *rpoB* гена, S315T1 в *katG* гена, липса на мутация в промотора на *inhA* гена, липса на установена с използвания тест мутация в *gyrA* гена. По време на лечение с втори ред двама от пациентите добиха допълнително мутация D94A в *gyrA* гена.

Таблица 30. Микробиологична характеристика на щамовете с първична екстензивна резистентност в България

Локализация на случаите	SIT(група)	Брой случаи	Мутации				
			<i>rpoB</i>	<i>katG</i>	<i>inhA</i>	<i>gyrA</i>	<i>rrs</i>
София	SIT 1 (Пекин)	3	S531L	S315T1	C15T	D94 G	A1401 G
Пловдив	SIT 53 (T1)	5	S531L	S315T1	-	- *	A1401 G

* По време на лечение с втори ред двама от пациентите добиха мутация D94A в *gyrA* гена.

V. ОБСЪЖДАНЕ

1. Резултати от фенотипните тестове за лекарствена чувствителност.

Тестването за резистентност е първата алгоритмична стъпка за диагностицирането на екстензивно резистентната туберкулоза. Резултатите от тестванията към стрептомицин и етамбутол не показаха категоричност в два случая (при един - със стрептомицин, при един - с етамбутол), което може да се обясни с недотам добрата чувствителност и специфичност на метода за тези лекарствени средства [20, 23, 26, 31].

Доскоро се смяташе, че кръстосаната резистентност при флуорохинолоните е пълна и тестването само с офлоксацин е достатъчно [9,10,21]. При навлизането на по-нови представители на флуорохинолоните (моксифлоксацин, гатифлоксацин) в лечението на резистентните форми на туберкулозата, се въведе и тестване за резистентност към тях. В литературата са описани случаи, при които кръстосаната резистентност не е пълна – напр. резистентни на гатифлоксацин и моксифлоксацин, но чувствителни към офлоксацин, както и резистентни на офлоксацин, но чувствителни на моксифлоксацин [9,27]. От направените фенотипни тестове за лекарствена чувствителност установихме, че флуорохинолоновата кръстосана резистентност не беше пълна и че класическият формат на тестване фенотипна резистентност към втори ред ПЛС (с офлоксацин, амикацин, канамицин, капреомицин) бе недостатъчен за откриване някои от случаите на екстензивна резистентност. Без въвеждането на тестване за резистентност към по-нови представители на флуорохинолоните, вероятността за недиагностициране на случаи с екстензивна резистентност е реална.

Не установихме нито един случай, в който резистентността към инжекционните ПЛС да се ограничи само до един от тестваните

представители (амикацин, канамицин, капреомицин), което води до допълнителни затруднения в изготвянето на терапевтичните режими поради липса на избор на ефективно лекарство от група В.

В нашето проучване резистентност към линезолид не беше установена. Макар вече да има литературни данни за наличие на резистентност към линезолид в клинични изолати МТС, все още е рядко явление, поради скорошното навлизане в терапевтичните режими на MDR-TB [22].

2. Резултати от молекулярно - генетични тестове за откриване на мутации, свързани с резистентността

Мутацията S531L (Ser→Leu в позиция 531) в *rpoB* е една от мутациите, която най-често определя рифампицинова резистентност и очаквано беше установена в болшинството от случаите (в 88,88%). Тя обуславя високи МИК както за рифампицин, така и за рифабутин. Макар че кръстосаната резистентност при рифамицините е обичайно явление, има литературни данни за рифампицин резистентни, рифабутин чувствителни клинични изолати – фенотип, определен от конкретни мутации, което дава една много добра възможност за лечение на M/XDR-TB при такива случаи [18]. Обичайно определени мутации в 531 и 526 кодон в *rpoB* гена се свързват с високи МИК за рифампицин и рифабутин, докато мутациите в други позиции показват умерени или ниски МИК за рифампицин и/или рифабутин [18].

Молекулярно-генетичните тествания могат да ни послужат в подбор на тези изолати, които биха могли да покажат чувствителност към представител на рифамицините, а именно: тези изолати *M.tuberculosis*, които са показали резистентност към рифампицин (монорезистентност, мултилекарствена резистентност или екстензивна резистентност) със стандартната тестова концентрация от 1,0 µg/ml, но без мутация в тестваният регион на *rpoB*, или с наличие на мутация, но различна от S531L или H526D. Ако приложим този принцип на оценка резултатите от

генетичните тестове в настоящата работа, в поне два от разглежданите XDR-TB случая е бил приложен тест за определяне на МИК на рифампицин и рифабутин.

Мутацията S315T1 в *katG* гена се свързва с високи МИК за изониазид ($\geq 1 \mu\text{g/ml}$), докато мутацията C15T в промотора на *inhA* гена – с ниска степен на резистентност (резистентни при $0,1 \mu\text{g/ml}$, но чувствителни при по-високи концентрации) [24]. Мутацията C15T е характерна за резистентната туберкулоза в България [2,30]. Тъй като изониазидовата резистентност е многофакторно явление, самостоятелното определяне на водещата мутация, свързана с изониазидовата резистентност, е недостатъчна за определяне на чувствителността към високите дози изониазид – средство при лечение на резистентните форми. Молекулярно-генетичното изследване може да послужи за изключване на възможността високите терапевтични дози изониазид, да се окажат ефективни (при наличие на S315T1 в *katG*). Във всички останали случаи е оправдано изследването на МИК за изониазид при резистентните клинични изолати на *M.tuberculosis*, което може да насочи вниманието на клиницистите в употребата на изониазид в повишени дози (16 – 20 mg/kg телесно тегло на ден) [3].

Резултатите за мутации в *gyrA* гена бяха разнообразни. D94G (в нашето проучване: n=8; 44,44%) е често срещана и се свързва с високи стойности на МИК, както за офлоксацина, така и за моксифлоксацина [21]. A90V (в нашето проучване: n=4; 22,22%) определя ниски МИК за флуорохинолоните [21]. При ограниченията в избора на ефективните лекарствени средства при XDR-TB, определянето на нивата на резистентност при различни флуорохинолони е съществено, за да може да се приложат по-високи дози при случаите с нискостепенна резистентност. Едва при 4-11% от офлоксацин резистентните случаи са с установени за моксифлоксацина МИК $\geq 4 \text{ mg/l}$, свързвани с неуспех от лечението [21].

В нашето проучване на XDR-ТВ не открихме с използвания тест мутация в изследвания участък на *gyrA* гена в три от случаите (n=3; 16,66%). Изолатите и на трите случая без установена мутация в изследвания участък на *gyrA* гена принадлежаха към щамът SIT53, разпространен в Пловдивска област. По литературни данни при 15-18% от флуорохинолон резистентните щамове МТС не се открива мутация в региона, определящ флуорохинолонова резистентност в *gyrA* (кодони 88-94). Като причина могат да се посочат мутации извън този регион в същия ген, независима мутация в *gyrB*, както и/или друг механизъм на резистентност, напр. понижена пропускливост на клетъчната стена, ефлуксна помпа, инактивиране на антибиотика [7].

Определихме чрез молекулярно-генетичното тестване XDR-ТВ в 14 от 18 случая, в останалите четири случая тестването се оказва недостатъчно за определяне на екстензивната резистентност на *M.tuberculosis* – веднъж поради ограничение на теста в определяне резистентността към изониазид, и в три случая – поради ограниченията на теста в определяне резистентността към флуорохинолони. Тези резултати потвърждават нуждата от успоредното използване на бързите методи за диагностика с конвенционалните тестове за лекарствена чувствителност.

3. Резултати от молекулярно-епидемичното типизиране на щамове XDR-ТВ

Водещият сполиготип беше SIT41, TUR (n=7), характерен причинител на резистентната туберкулоза в България [1, 6, 30]. SIT41 не се среща често сред чувствителните щамове *M.tuberculosis*, разпространени на територията на страната (2,7%) [6]. При сравняване честотата на разпространението на SIT41, TUR сред клинични изолати с различна чувствителност към лекарствени средства, потвърдихме тезата, че той е характерен за резистентната туберкулоза в България, като честотата при XDR-ТВ е близка до тази при MDR-ТВ (41,17% спрямо 49,4%).

В резултат на MIRU-VNTR типизирането, се установи, че клъстерът се разделя на два по-малки, с MtbC15-9 тип 11219-82 и 11219-15. Същите са били разглеждани като клон „Изток“ и клон „Север“ при български щамове MDR-TB и не са посочени да образуват трансгранични клъстери сред мултирезистентните щамове, изолирани и типирани в Европа за периода 2011-2014г.[6,12].

Следващият по големина клъстер бе този на сполиготип SIT 53 (T1) (n=5). Сред чувствителните щамове *M.tuberculosis*, разпространени на територията на страната, този сполиготип е широко застъпен [6]. От получените резултати в настоящата работа, установихме, че при XDR-TB относителният дял е двойно по-висок (29, 41%) от този при чувствителни и MDR-TB щамове [6]. SIT 53 с екстензивна резистентност беше разпространен само в Пловдивска област. Установихме типът MtbC15-9: 11223-15, който за периода 2011-2014г. не е посочен да сформира трансграничен клъстер в Европа сред типизираните случаи на мултирезистентна туберкулоза [12].

Три от разглежданите XDR-TB случаи принадлежаха към SIT1, Пекин, установен само в София - град. При сравнение честотата на групата Пекин при български чувствителни щамове *M.tuberculosis* (0,4%) и MDR-TB (3,1%), установихме, че с увеличаване на резистентността, се увеличава и относителния дял, като за XDR-TB нараства многократно (17,64%) [6]. Пекин е една от най-адаптивните и бързоразпространяващи се групи *M.tuberculosis* в световен мащаб, независимо от отнасянето на щамата към противотуберкулозни лекарствени средства [8]. В Европа група Пекин е силно застъпена сред MDR-TB щамове – 62,6% от типизираните в Европа мултирезистентни изолати за 2014г. [12]. Чрез MIRU-VNTR типизирането определихме типът MtbC15-9: 94-32, който е един от най-застъпените сред типизираните в Европа MDR-TB за 2014г. Като тип 94-32

за периода 2014г. в Европа са били определени 73 щамове (от които 12 били XDR-TB), в 14 различни страни [12].

4. Еволюция на резистентността на щамове *M.tuberculosis* до екстензивна

Придобиването на екстензивна резистентност в хода на заболяването чрез акумулиране на мутации, е индикатор за човешкият фактор и пропуски в контрола на туберкулозата, водещи до неуспех от лечението [3].

При осем пациента установихме и проследихме чрез микробиологични методи придобиване на екстензивна резистентност, а при двама пациенти предполагахме такава.

В седем от тези десет случая на придобита с времето екстензивна резистентност на *M.tuberculosis*, щамът принадлежеше към SIT 41, TUR. Териториално бяха равномерно разпределени на територията на страната, представени от единични случаи, което е още един аргумент в твърдението за придобита XDR-TB, а не за трансмисията ѝ. Мутациите при SIT 41, TUR, определящи резистентността към рифампицин и изониазид бяха характерни –S531L в *rpoB*, липса на мутация в *katG*, наличие на C15T в промотора на *inhA*. Същите резултати за SIT 41, TUR получихме при разглеждането на preXDR-TB в друго наше проучване [30]. Мутациите в *gyrA* бяха разнообразни, което е в полза на твърдението, че мутациите, определящи флуорохинолонова резистентност са били придобити допълнително и самостоятелно.

Изолатите МТС на останалите трима пациенти с прогресираща резистентност не бяха причислени към клъстер, т.е. потвърждение за наличие на еволюция в резистентността до екстензивна, а не трансмисия на екстензивно резистентен щам *M.tuberculosis*.

5. *M.tuberculosis* с първична екстензивна резистентност

Както териториално, така и микробиологично се оформиха две области в България, с трансмисия на *M.tuberculosis* с екстензивна резистентност.

В София град се установиха три случая на XDR-TB, причинена от SIT1, група Пекин, MtbC15-9 тип 94-32. Случаите от 2015г. имаха връзка помежду си, но връзката им с първият случай не е известна, т.е. възможна е както трансмисия на територията на столицата, така и добиването на инфекцията извън нашите граници поради широкото разпространение на този щам в Европа. При определяне на мутациите, свързани с резистентността, също установихме еднотипност: S531L в *rpoB*, едновременното наличие както на S315T1 в *katG*, така и на C15T в промотора на *inhA* гена, D94G в *gyrA*, A1401G в *rrs*. Едновременното наличие на мутация както в *katG*, така и в промотора на *inhA* гена е рядко явление сред изолатите с мултилекарствена резистентност в България – 1,8% за периода 2007-2014г. (n=4 от 222 случая) [2].

Пет случая на XDR-TB в Пловдивска област бяха причинени от SIT 53, с начален тип MtbC15-9 11223-15. С времето установихме изменения в броя копия на локус 424 (Mtub04) – от 2 на 3 при един пациент, и наличие на същият щам в последният регистриран случай. В MIRU-VNTR профила могат да настъпят изменения с течение на времето, най-често загуба или добавяне на един повтор [6, 25]. Установихме отлики в профила и на този щам: S531L в *rpoB*, S315T1 в *katG*, липса на мутация в промотора на *inhA* гена, липса на мутация в изследваният регион на *gyrA*, A1401G в *rrs*. Във фенотипно отношение щамове на четири от пациентите бяха чувствителни на офлоксацин, като в следствие се установи резистентността им към моксифлоксацин, а щамове на двама от лекуваните пациенти придобиха с времето и резистентност към офлоксацин.

VI. ИЗВОДИ

В настоящия дисертационен труд са представени и анализирани резултатите от микробиологичните тествания на клиничните изолати XDR-TB, изолирани на територията на България в периода 2011-2016г. Въз основа на получените резултати направихме следните изводи:

1. Установихме, че флуорохинолоновата кръстосана резистентност не беше пълна и че разширяване класическият формат на ТЛЧ към втори ред ПЛС с нови представители на групата на флуорохинолоните допринася за идентифицирането на случаите с XDR-TB.
2. Не открихме *in vitro* резистентност към линезолид, което потвърждава значението му при лечението на резистентните форми на туберкулозата.
3. Чрез молекулярно-генетичните тествания на XDR-TB изолати в България, открихме мутациите в таргетните гени, свързани с висока степен на резистентност към основните противотуберкулозни лекарствени средства.
4. При направения анализ на разпространението на XDR-TB на територията на страната, не открихме териториална връзка при случаите SIT41, TUR (тип MtbC15-9 11219-82 и 11219-15). Случаите със SIT1, Пекин (MtbC15-9 94-32) бяха открити само в София-град, а със SIT53, T1 – единствено в Пловдивска област.
5. Доказахме, че най-срещаният сполиготип сред случаите с придобитата екстензивна резистентност при *M.tuberculosis*, бе SIT41, TUR.
6. Отличихме два щама *M.tuberculosis* с първична екстензивна резистентност в България: SIT53, T1, разпространен само в България, и SIT1, Пекин (MtbC15-9 94-32), широко разпространен в Европа.

VIII. ПРИНОСИ

1. Приноси с научен характер

- 1.1 Направихме характеристика на фенотипната резистентност и на мутациите, свързани с нея на туберкулозните щамове с екстензивна резистентност в България.
- 1.2 Анализирахме разпространението на XDR-TB на територията на страната.
- 1.3 Проследихме еволюцията на резистентността на *M.tuberculosis* при случаите на придобита екстензивна резистентност чрез микробиологични методи.
- 1.4 Установихме, че сполиготип 41, група TUR е водещ при туберкулозата с екстензивна резистентност в България.

2. Приноси с научно-приложен характер

- 2.1 Чрез въведеният ТЛЧ към втори ред ПЛС определихме случаите на XDR-TB в България.
- 2.2 Установихме случаите, които могат да бъдат тествани за определяне минимални инхибиращи концентрации на изониазид, рифамицини и флуорохинолони.
- 2.3 Сформирахме колекция от българските XDR-TB щамове, които могат да бъдат използвани при бъдещи научни проучвания.

IX. ЛИТЕРАТУРА

1. Бачийска, Е. Микробиологични проучвания върху етиологията на мултирезистентната туберкулоза в България. Дисертация за присъждане на научната степен „Доктор“. София, 2013.
2. Бачийска, Е., Йорданова, С., Атанасова, Ю., и др. Мултирезистентната туберкулоза в България – генни мутации, асоциирани с нея. // *In Spiro*, 2016, 4 (37), с. 36-40.
3. Министерство на здравеопазването. Методическо указание за терапевтично поведение при резистентната туберкулоза. София, 2016. с. 6-32.
4. Министерство на здравеопазването. Методично указание за микробиологична диагностика и лечение на туберкулозата. София, 2009, с. 3-132.
5. Министерство на здравеопазването. Методично указание за микробиологична диагностика на туберкулозата, София, 2016.
6. Панайотов, С. Молекулярно-генетично проучване върху етиологията на туберкулозата в България. Дисертация за присъждане на степен „Доктор на науките“. София, 2016.
7. Avalos, E., Catanzaro, D., Catanzaro, A., et al. Frequency and Geographic Distribution of *gyrA* and *gyrB* Mutations Associated with Fluoroquinolone Resistance in Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates: A Systematic Review. // *PLoS ONE*, 2015, 10(3), e0120470. doi: 10.1371/journal.pone.0120470
8. Brites, D., Gagneux, S. Co-evolution of *Mycobacterium tuberculosis* and *Homo sapiens*. // *Immunological Reviews*, 2015, 264(1), p.6 doi:10.1111/imr.12264.
9. Devasia, RA., Blackman, A., May, C., et al. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: an assessment of MGIT 960, MODS and nitrate reductase assay and fluoroquinolone cross-resistance. // *Journal of*

- Antimicrobial Chemotherapy*, 2009, 63(6), p.1173-1178.
doi:10.1093/jac/dkp096.
10. El Sahly, HM, Teeter, LD, Jost KC, et.al. Incidence of Moxifloxacin Resistance in Clinical Mycobacterium tuberculosis Isolates in Houston, Texas. // *J. Clin. Microbiol*, 2011, 49(8), p. 2942-2945. doi:10.1128/JCM.00231-11.
 11. European Centre for Disease Prevention and Control, WHO Regional Office for Europe. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe. European Centre for Disease Prevention and Control, 2016.
 12. European Centre for Disease Prevention and Control. Molecular typing for surveillance of multidrug-resistant tuberculosis in the EU/EEA – January 2016. Stockholm: ECDC, 2016.
 13. Flor de Lima B., Tavares M. Risk factors for extensively drug-resistant tuberculosis: a review.// *The Clinical Respiratory Journal*, 2014, ISSN 1752-6981.
 14. HAIN Lifescience. GenoType MTBDR*plus* VER 2.0 - Your Test System for a Fast and Reliable Way to detect MDR-TB. <<http://www.hain-lifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/tuberculosis/genotype-mtbdplus.html>> 20.01.2017.
 15. HAIN Lifescience. GenoType MTBDR*sl* VER 1.0 and VER 2.0 - Your Important Assistance for Detetion of XDR-TB. <<http://www.hain-lifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/tuberculosis/genotype-mtbdsl.html>> 20.01.2017.
 16. HAINLifescience. GenoType[®]MTBDR*sl*, Molecular Genetic Assay for Identification of Resistance to Fluoroquinolones, Aminoglycosides/Cyclic Peptides, and Ethambutol of *Mycobacterium tuberculosis* complex, 2010, p.23-42

17. HAIN, Lifescience. GenoType[®]MTBDR_{plus}, Molecular Genetic Assay for Identification of Resistance to Rifampicin and/or Isoniazid of *Mycobacterium tuberculosis* complex. 2009, p. 23-42.
18. Jamieson, F.B., Guthrie, J.L., Neemuchwala, A., et.al. Profiling of *rpoB* Mutations and MICs for Rifampin and Rifabutin in *Mycobacterium tuberculosis*. // *Journal of Clinical Microbiology*, 2014, 52(6), p. 2157-2162. doi:10.1128/JCM.00691-14.
19. Jassal, M., Bishai, W.R. Extensively drug-resistant tuberculosis. // *Lancet Infect Dis*, 2009, 9, p. 19–30.
20. Krüüner, A., Yates, M.D., Drobniewski, F. A. Evaluation of MGIT 960-Based Antimicrobial Testing and Determination of Critical Concentrations of First- and Second-Line Antimicrobial Drugs with Drug-Resistant Clinical Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. // *J. Clin. Microbiol*, 2006, **44**, N 3, p. 811-818. doi: 10.1128/JCM.44.3.811-818.2006.
21. Li, J., Gao, X., Luo, T.; et.al. Association of *gyrA/B* mutations and resistance levels to fluoroquinolones in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. // *Emerging Microbes & Infections*, 2014, 3, e19. doi:10.1038/emi.2014.21.
22. Palomino, J.C., Martin, A. Drug Resistance Mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. // *Antibiotics*, 2014, 3(3), p. 317-340. doi:10.3390/antibiotics3030317
23. Said, H.M, Kock, M. M, Ismail N. A, et. al. Comparison between the BACTEC MGIT 960 system and the agar proportion method for susceptibility testing of multidrug resistant tuberculosis strains in a high burden setting of South Africa. // *BMC Infectious Diseases*, 2012, 12, p. 369. doi: 10.1186/1471-2334-12-369.
24. Springer, B., Lucke, K., Calligaris-Maibach, R., et al. Quantitative Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* by Use of MGIT 960

- and EpiCenter Instrumentation. // *J. Clin. Microbiol*, 2009, **47**, N 6, p. 1773-1780. doi: 10.1128/JCM.02501-08
25. Supply, P., Mazars, E., Lesjean, S., et.al. Variable human minisatelite-like regions in the *M. tuberculosis* genome.// *Mol. Microbiol*, 2000, 36, p. 762-771.
 26. Tortoli, E., Benedetti, M., Fontanelli, A., et al. Evaluation of Automated BACTEC MGIT 960 System for Testing Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Four Major Antituberculous Drugs: Comparison with the Radiometric BACTEC 460TB Method and the Agar Plate Method of Proportion.// *J. Clin. Microbiol*, 2002, 40(2), p. 607-610. doi:10.1128/JCM.40.2.607-610.2002.
 27. Von Groll, A., Martin, A., Jureen, P., et.al. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and mutation in *gyr A* and *gyrB*. // *Antimicrob.Agents Chemother*, 2009, 53, p. 4498-4500. doi: 10.1128/AAC.00287-09.
 28. World Health Organization. Global Tuberculosis report 2016.//WHO, 2016, p. 4-79 <http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/> 24.01.2017г.
 29. World Health Organization. Global Tuberculosis report, 20th edition.//WHO, 2015,p.54-68 <http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/> 03.10.2016г.
 30. Yordanova, S., Bachiyska, E., Atanasova, Y., et. al. MDR-TB with additional fluoroquinolone resistance in Bulgaria.//*Probl. Inf. Paras. Dis.*, 2015, **43**, 2, p.8-11.
 31. Zhao, P., Fang, F., Yu, Q., et al. Evaluation of BACTEC MGIT 960 System for Testing Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to First-Line Drugs in China.//*PLoS ONE*, 2014, 9(9), e99659. doi:10.1371/journal.pone.0099659.

Х. ПРИЛОЖЕНИЕ

Списък публикации, свързани с дисертацията

1. **Yordanova, S.**, Bachiyska, E., Atanasova, Y., et. al. Multidrug resistant tuberculosis in Bulgaria-microbiological aspects. // *Probl. Inf. Parasit. Dis.*, 2013, **41**, N1, p. 5-8.
2. Panaiotov, S., Bachiyska, E., **Yordanova, S.**, et. al. Beijing Lineage of MDR *Mycobacterium tuberculosis* in Bulgaria, 2007–2011// *Emerging Infectious Diseases*, **20**, 2014, N11, p. 1899-1901.
3. **Yordanova, S.**, Bachiyska, E., Atanasova, Y., et. al. MDR-TB with additional fluoroquinolone resistance in Bulgaria.// *Probl. Inf. Parasit. Dis.*, 2015, **43**, N 2, p.8-11.
4. Бачийска, Е., **Йорданова, С.**, Атанасова, Ю. и др. Мултирезистентната туберкулоза в България – генни мутации, асоциирани с нея. // *InSpiro*, 2016, 4 [37], с. 36-40.
5. Панайотов, С., Бачийска, Е., **Йорданова, С.** и др. Генетично биоразнообразие на чувствителни и мултирезистентни щамове *M.tuberculosis* в България.// *Медицински преглед*, 2016, **52**, N 3, с.47-53

Участия в конгреси и научни форуми

- **Yordanova, S.**, Bachiyska, E., Atanasova, Y., et. al. Resistance of Bulgarian MDR-TB strains to second line drugs.// *35th congress ESM, Vienna, 2014*, P23, p.72.
- Todorova, Y., Bachiyska, E., Atanasova, Y., **Yordanova, S.** et. al. Evaluation of MDR-TB among inmates in Sofia prison, Bulgaria, 2010 – 2013. // *35th congress ESM, Vienna, 2014*, P134, p.76.
- Panaiotov, S., Bachiyska, E., Brankova, N., Levterova, V., Ivanova, A., Atanasova, Y., **Yordanova, S.**, Kantardjiev, T. SIT41 (LAM-TUR) genotype is associated with MDR tuberculosis in Bulgaria.// *35th congress ESM, Vienna, 2014*, P253, p.80.

- **Йорданова, С.**, Бачийска, Е., Атанасова, Ю., и др. Флуорохинолонова резистентност на MDR-TB щамове, изолирани в България, 2011-2012. // *11^{та} конгрес БАМ, София*, 2013, с. 26.
- Панайотов, С., Дурмаз, Р., Бачийска, Е., Карагъоз, А., **Йорданова, С.** и др. Общи генотипове на *Mycobacterium tuberculosis* при мултирезистентни щамове от България и Турция. // *12^{та} конгрес БАМ, София*, 2014, ОП, с. 44.
- **Йорданова, С.**, Бачийска, Е. Атанасова, и др. Екстензивнорезистентна туберкулоза в България – микробиологични аспекти. // *12^{та} конгрес БАМ, София*, 2014, ПС, с. 56.
- **Йорданова, С.**, Бачийска, Е. Атанасова, и др. Микробиологична диагностика на резистентната туберкулоза в България. // *5^{та} конгрес на БДББ, София*, 2014, ПСЗ, с. 72.
- Панайотов, С., Бачийска, Е., Левтерова, В., Бранкова, Н., Симеоновски, И., Танкова, К., **Йорданова, С.** и др. Връзка между генотип на *M. tuberculosis* и мултирезистентна туберкулоза. // *13^{та} конгрес БАМ, София*, 2015, ОП, с. 42.
- **Йорданова, С.**, Бачийска, Е., Атанасова, Ю. и др. Микробиологична характеристика на мулти - и екстензивнорезистентната туберкулоза в Пловдивска област. // *13^{та} конгрес БАМ, София*, 2015, ПС, с. 72.
- **Йорданова, С.**, Панайотов, С., Бачийска, Е. и др. Разнообразие на екстензивнорезистентната туберкулоза в България. // *14^{та} конгрес БАМ, София*, 2016, П 29, с. 62.

Благодарности

Изказвам благодарност на научните ми ръководители: проф. д-р Тодор Кантарджиев и доц. д-р Елизабета Бачийска, които ме подкрепиха и ми предоставиха свободата за изява.

Зад всеки един разглеждан случай стои трудът и усилията на много специалисти, работещи по контрола на туберкулозата – лекари, медицински сестри, лаборанти и технически персонал от ЛЗ за контрол на туберкулозата от цялата страна и от Националната програма по туберкулоза.

Благодаря на колегите си от НРЛ по туберкулоза, НЦЗПБ: гл. асистент Яна Тодорова, Юлияна Атанасова и Ана Байкова.

Благодаря на д-р Тонка Върлева, директор на програми, финансирани от Глобалният фонд за борба със СПИН, туберкулоза и малария, за предоставените ни необходимите консумативи и реактиви по програми BUL-607-G02-T, BUL-809-G03-T. Методите, използвани за установяване на резистентност към втори ред ПЛС, бяха въведени в НРЛ ТБ, НЦЗПБ също с помощта на тези програми.

Благодаря на екипа на д-р Даниела Чирило, Институт Сан Рафаеле, Милано, Италия за оказаната ни методична помощ при въвеждането на методите за ТЛЧ втори ред.

Благодаря на колегите от НРЛ молекулярна микробиология, НЦЗПБ за типизирането на щамовете МТС.

Благодаря и на ръководството на СБАЛББ Габрово и колегите от УМБАЛ Пловдив за съдействието с предоставяна информация и справки.

От сърце благодаря на тези, които ме ценят независимо от моята работа.

XI. SUMMARY

Extensively drug-resistant tuberculosis is caused by strain *M.tuberculosis* resistant to rifampicin, isoniazid, at least one of the fluoroquinolones and at least one of three injectable second-line drugs (amikacin, capreomycin or kanamycin).

The purpose of this work was to describe the circulating extensively drug resistant *M.tuberculosis* strains in Bulgaria in order to assess and analyze the acquisition and transmission of XDR-TB in the country. This study covered the six-year period from 2011 to 2016. Every clinical isolate suspected or defined to be MDR-TB, was confirmed at NRL TB, NCIPD and was further tested for resistance to second line drugs by the automated system BACTEC[®] MGIT 960. The mutations in the corresponding genes were detected by line probe assays GenoType[®]MTBDR*plus* and GenoType[®]MTBDR*sl*. Spoligotyping and MIRU-VNTR were also performed for the purposes of the cluster analysis.

For the period of the study in NRL TB as MDR-TB were confirmed 210 cases, and 8,57% of them were with extensive resistance (n=18).

We found out that the cross resistance between the fluoroquinolones was not full and adding newer representatives increased the detection of XDR-TB. In our study we did not find *in vitro* resistance to linezolid in confirmation for its importance in the treatment of the resistant tuberculosis.

By the molecular testing we detected the most common mutations related to the high level of resistance to the main antituberculosis drugs (S531L in the *rpoB* gene, S315T1 in the *katG*, D94G in the *gyrA*, A1401G in the *rrs* gene). We also found strains with mutations associated with low level resistance in *M.tuberculosis* (C15T in the promotor of *inhA* gene, A90V in *gyrA* gene) and changes in the codons 510-519. The low level resistance indicated the opportunity to perform minimal inhibitory concentrations testing and including in the treatment regimen higher dose of the corresponding drug.

The most common spoligotype of *M.tuberculosis* in the cases with acquired extensive resistance was SIT41 with MtbC15-9 type 11219-82 and 11219-15. The cases were evenly distributed in the country without a linkage between the patients. Three new XDR-TB cases of SIT1, Beijing (MtbC15-9 94-32) were found only in Sofia-city. The strain forms a big cross-border cluster in Europe among the multi-drug resistant TB. Another XDR-TB strain, detected in the new cases, was one with SIT53, T1 (MtbC15-9 11223-15) distributed only in district of Plovdiv.

In conclusion, the accurate microbiological diagnosis of XDR-TB could help in defining the treatment regimen and prevent the spreading of the disease in the community.