НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР ПО ЗАРАЗНИ И ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ

МИКРОБИОЛОГИЧЕН ОТДЕЛ

Д-р Елизабета Василева Бачийска

МИКРОБИОЛОГИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ ЕТИОЛОГИЯТА НА МУЛТИРЕЗИСТЕНТНАТА ТУБЕРКУЛОЗА В БЪЛГАРИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „Доктор”

Професионално направление: Медицина

Научна специалност: 01.06.12. Микробиология

Научен ръководител:

Проф. д-р Тодор Веселов Кантарджиев, дмн

Официални рецензенти:

Проф. д-р Ива Стефанова Христова, дмн

Доц. д-р Емма Едмонд Кьолеян, дм

София, 2013

Дисертационният труд е обсъден на разширен научен колегиум на отдел Микробиология, НЦЗПБ и е насочен за защита пред Научно жури.

Дисертационният труд съдържа 200 страници, 43 таблици и 36 фигури. В библиографията са включени 152 заглавия, от които 13 на кирилица и 139 на латиница.

Изследванията са извършени в НРЛ по туберкулоза и в НРЛ по молекулярна и радиационна микробиология, отдел Микробиология, НЦЗПБ и СРЛ по туберкулоза, HSR, Милано, Италия.

Материалите по защитата са публикувани в интернет страницата на НЦЗПБ и се намират на разположение в библиотеката на НЦЗПБ, гр. София.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 2013г., от ч., в аулата на НЦЗПБ, гр. София, бул. „Янко Сакъзов" № 26, на открито заседание на научното жури, назначено от директора на НЦЗПБ, съгласно ППЗРАСРБ на НЦЗПБ и ЗРАСРБ, в състав:

Председател:

Проф. д-р Тодор Веселов Кантарджиев, дмн – НЦЗПБ

Членове:

1. Проф. д-р Ива Стефанова Христова, дмн – НЦЗПБ – рецензия
2. Доц. д-р Емма Едмонд Кьолеян, дм – МИ на МВР, гр. София – рецензия
3. Проф. д-р Мариана Атанасова Мурджева, дмн – МУ, гр. Пловдив – становище
4. Проф. д-р Тодор Веселов Кантарджиев, дмн – НЦЗПБ – становище
5. Доц. д-р Стефана Донева Събчева, дм – „СБАЛО" ЕАД, гр. София – становище

НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР ПО ЗАРАЗНИ И ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ

МИКРОБИОЛОГИЧЕН ОТДЕЛ

Д-р Елизабета Василева Бачийска

МИКРОБИОЛОГИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ ЕТИОЛОГИЯТА НА МУЛТИРЕЗИСТЕНТНАТА ТУБЕРКУЛОЗА В БЪЛГАРИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „Доктор”

Професионално направление: Медицина

Научна специалност: 01.06.12. Микробиология

Научен ръководител:

Проф. д-р Тодор Веселов Кантарджиев, дмн

Официални рецензенти:

Проф. д-р Ива Стефанова Христова, дмн

Доц. д-р Емма Едмонд Кьолеян, дм

София, 2013

Основни означения и съкращения:

MDR-TB Туберкулоза с множествена лекарствена резистентност (Multidrug Resistant Tuberculosis), мултирезистентна туберкулоза

XDR-TB Туберкулоза с екстензивна лекарствена резистентност (Extensively Drug Resistant Tuberculosis)

NTM Non tuberculosis mycobacteriae, нетуберкулозни микобактерии, атипични микобактерии

MOTT Mycobacteria Other Then Tuberculosis – Микобактерии, различни от туберкулозните, атипични микобактерии

MTBC *Mycobacterium tuberculosis* complex

КУБ Киселинно устойчиви бактерии

H/INH Изониазид

R/RIF/RMP Рифампицин

E/EMB Етамбутол

KAN Канамицин

AMK Амикацин

CAP Капреомицин

S/SM Стрептомицин

OFX Офлоксацин

ECDC European Centre for Disease Prevention and Control

CDC Centers for Disease Control and Prevention

МЗ Министерство на здравеопазването

ТЛЧ Тест за лекарствена чувствителност, антибиограма

PCR Polymerase Chain Reaction, Полимеразна верижна реакция

LPA Line Probe Assay (Метод за линейна хибридизация)

MIRU/VNTR Mycobacterial Interspersed Repetitive Units/ Variable Number of Tandem Repeat или MIRU Типиране на вариабилни тандемни повтори

НЦЗПБ Национален център по заразни и паразитни болести

Въведение

Туберкулозата запазва своята значимост, и в наше време продължава да е сериозно предизвикателство, независимо от постигнатите големи успехи в областта на инфекциозната патология през изминалото столетие.

Към края на 20-ти век се появи един от най-сериозните проблеми в контрола на туберкулозата – резистентната туберкулоза, особено мултирезистентната й форма (MDR-TB), като в началото на 21-и век бяха регистрирани и първите случаи на екстензивнорезистентната туберкулоза (XDR-TB). В някои региони на света, като Африка, Азия и някои Източно Европейските страни, на фона на високата заболяемост от СПИН, тези две форми на резистентната туберкулоза рязко увеличиха смъртността в редица страни. Не случайно туберкулозата е сред приоритетите на СЗО, ECDC и CDC.

Мултирезистентната (екстензивнорезистентната) туберкулоза представлява световен проблем не само заради начина си на предаване, но и възможността за лесно придвижване на хората от едно място на друго в рамките на часове, както и недостатъчните мерки за инфекциозен контрол. Важни предпоставки за развитие на лекарствена резистентност е предшестващото, но неефективно лечение на туберкулозата, особено сред хората живеещи в риск, формиращите т. нар. рискови групи.

Независимо от предприетите усилия за превенция и контрол на тази изключително опасна форма на туберкулозата в световен мащаб, не е възможно да бъдат постигнати значими успехи, без да бъдат обединени усилията за предотвратяване на развитието и разпространението й на ниво отделни страни и региони.

Световната икономическа криза, на която сме свидетели днес, вероятно, допълнително ще доведе до усложнение на ситуацията. Много страни са в икономическа рецесия и чрез отделяне на по-малко средства за здравеопазване и социално благосъстояние от една страна; и спадане на доходите, респ. увеличаване

на бедността и стреса ще доведат до увеличаване на безработицата, криминализиране на определени групи, нарастване на бездомните, алкохолно и наркозависимите от друга; негативно ще повлияят на заболеваемостта от туберкулоза в това число и увеличение на резистентните форми.

За да бъде поставена диагнозата MDR/XDR-TB е необходимо лабораторното *in vitro* доказване на конкретния резистентен щам *M.tuberculosis,* изолиран от съответния туберкулозно болен т.е. потвърждението на етиологичния агент на резистентнтната туберкулоза е осъществимо изцяло и единствено благодарение на микробиологичните методи.

Бързата микробиологична диагностика на MDR/XDR-TB има ключово значение в хода на това заболяване. Лабораторната диагностика се нуждае от съвременни и надеждни методи, които да подобрят откриването на инфекциозните случаи, като бъде определена конкретната резистентност на изолирания туберкулозен щам. По този начин може да бъде включена адекватна терапия, отговаряща на съответния лечебен режим и съобразена с чувствителността на изолата, което да доведе до излекуване т.е. прекъсване на трансмисията и като крайна цел да намали разпространението, заболяемостта и смъртността от MDR/XDR-TB в регионален и глобален мащаб.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ:

ЦЕЛ на настоящия дисертационен труд е да се направи микробиологично проучване на етиологията на мултирезистентната туберкулоза в България за подобряване контрола на етиотропната терапия.

Във връзка с набелязаната цел бяха поставени следните задачи:

1. Да бъде направена фенотипна характеристика на щамовете *M. tuberculosis*, причинители на мултирезистентната туберкулоза в България.

2. Да бъдат открити мутациите, кодиращи резистентността към първи и втори ред противотуберкулозни лекарства в щамове *M. tuberculosis*, причинители на мултирезистентната туберкулоза в България.

3. Да бъде направена генотипна характеристика на щамовете *M. tuberculosis*, причинители на мултирезистентната туберкулоза в България.

4. Да се анализира разпространението на щамовете *M. tuberculosis*, причинители на мултирезистентната туберкулоза в България, на територията на страната и да се проследи еволюцията на проблема

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали

В проучването са включени 272 MDR-TB щама на 216 пациенти от цялата страна. Щамовете са изолирани в 28 лаборатории за микробиологична диагностика на туберкулозата към лечебните заведения, осъществяващи контрола на туберкулозата в България и в НРЛ по туберкулоза, НЦЗПБ, през периода 2007г. – 2011г. Щамовете бяха потвърдени като MDR/XDR-TB в НРЛ по туберкулоза – единствената микробиологична лаборатория в страната, сертифицирана от две международни организации за осъществяването на ТЛЧ към първи и втори ред противотуберкулозни лекарства: СЗО, Супранационална референтна лаборатория по туберкулоза, Италия и от INSTAND e.V., Дюселдорф, Германия.

MDR-TB щамовете бяха изолирани от следните клинични материали: храчка – 96,76% (n=209), стомашни промивни води – 1,39% (n=3), бронхо алвеоларен лаваж – 0,93% (n=2), плеврален пунктат – 0,46% (n=1) и секрет от белодробна фистула – 0,46% (n=1).

2. Методи

За осъществяване на целите на проучването бяха използвани две големи групи микробиологични методи: фенотипни и молекулярно-генетични методи.

2.1. Фенотипни методи

Използваните фенотипни методи в настоящия дисертационен труд са класически микробиологични методи (конвенционални методи) и включват: изолиране на щам *M. tuberculosis* от клинични материали, видова идентификация, тест за лекарствена чувствителност към първи и втори ред противотуберкулозни лекарства.

2.1.1 Изолиране на щамове *Mycobacterium tuberculosis* от клинични проби

Изследваните клинични материали бяха обработени чрез процес на хомогенизация и деконтаминация, съгласно стандартните оперативни процедури, визирани в Методичното указание за микробиологична диагностика и лечение на туберкулозата. Всяка проба беше инокулирана върху 2 броя епруветки с твърда хранителна среда на Льовенщайн-Йенсен (Löwenstein-Jensen) и една епруветка течна хранителна среда (MGIT).

Използвана беше фабрично готовата за употреба среда Льовенщайн-Йенсен, производител Becton Dikenson, USA. Култивирането се осъществяваше на 37˚C. Отчитането се извършваше по скала за полуколичествена оценка на растежа при култивиране, съгласно Методичното указание за микробиологична диагностика и лечение на туберкулозата, като от тях беше изготвян ТЛЧ.

Течната хранителна среда MGIT (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*) – комерсиална хранителна среда, 7 мл, в баркодирана епруветка, с вграден на дъното на епруветката флуоресцентен сензор, като култивирането и отчитането се осъществяваше автоматично в апарата BACTEC® MGIT 960 System, чрез специализиран софтуер, производител Becton Dikenson, USA. От идентифицираните като положителни епруветки бяха изготвяни: тест за видова идентификация и ТЛЧ.

2.1.2. Видова идентификация

Видовата идентификация на клиничните изолати до *Mycobacterium tuberculosis* complex беше осъществявана с помощта на два метода: чрез определяне на чувствителността на *M. tuberculosis* към пара-нитро-бензоена киселина (pNBA) и чрез комерсиален имунохроматографски тест: *BD MGIT TBc Identification Test.*

2.1.2.1. Видова идентификация чрез определяне на чувствителността на *M. tuberculosis* към пара-нитро-бензоена киселина (pNBA)

Тестът беше осъществен в 2 епруветки течна MGIT среда (работна и контролна епруветка). pNBA потиска растежа на *M. tuberculosis* complex, в резултат на което намалява кислородната продукция, а NTM (MOTT) са резистентни към pNBA и растат в нейно присъствие.

2.1.2.2. Видова идентификация чрез имунохроматографски тест: BD MGIT TBc Identification Test

Използван беше BD MGIT TBc Identification Test, BD, USA – имунохроматографски тест за качествено определяне на *M. tuberculosis* complex само от MGIT култури, положителни за КУБ. Тестът разпознава MPT64 – микобактериална протеинова фракция, която се отделя от микобактериалните клетки по време на култивирането. Анти-MPT64 конюгирани антитела на теста се свързват с MPT64 антигените от течната култура и реакцията се визуализира чрез тестовата ивица. Антиген-конюгативния комплекс се придвижва през тестовата лента към зоната на реакция, където се улавят от втори специфични MPT64 антитела, свързани с мембраната. Ако MPT64 антигена присъства в пробата се предизвиква цветна реакция от етикирани колоидни златни частици и се визуализира като розово - виолетова до червена линия в Т-зоната **(Фигура 1)**.

Фигура 1: Положителен имунохроматографски тест за *M. tuberculosis* complex

2.1.3. Тест за лекарствена чувствителност на *M. tuberculosis* complex към противотуберкулозни лекарства от първи и втори ред

Фенотипната чувствителност към противотуберкулозни лекарства от първи ред (Стрептомицин, Изониазид, Рифампицин и Етамбутол) и към противотуберкулозени лекарства от втори ред (Офлоксацин, Амикацин, Канамицин и Капреомицин) беше определена по пропорционалния метод, използвайки напълно автоматизирана система BACTEC® MGIT 960 System, следвайки инструкциите на производителя (Ръководство на потребителя на система BACTEC® MGIT 960, 2004).

Фигура 2: Фенотипно определяне на MDR-TB изолати чрез напълно автоматизирана система BACTEC® MGIT 960

За определяне на ТЛЧ към първи ред бяха изпитвани само щамовете, доказани като *M. tuberculosis* complex, а за втори ред само доказани като MDR-TB щамове.

Всички процедури по извършване на манипулациите с материали, съдържащи *M. tuberculosis*, свързани с образуването на инфекциозни аерозоли, опасни за оператора бяха осъществени в ламинарен бокс, клас 2, ползвайки регламентираните за целта лични предпазни средства.

За изготвянето на необходимата концентрация на противотуберкулозните лекарства от първи ред беше използван комерсиалния кит BD BACTEC® MGIT 960 SIRE Kit, съдържащ в лиофилизиран вид лекарствените субстанции:

Стрептомицин, Изониазид, Рифампицин и Етамбутол в концентрации, посочени в **Таблица 1.**

За изготвянето на необходимата концентрация на противотуберкулозните лекарства от втори ред бяха използвани чисти лекарствени субстанции: Офлоксацин, Амикацин, Канамицин и Капреомицин (Sigma-Aldrich, USA) **(Таблица 2)**.

Таблица 1: Лекарствени субстанции от първи ред в SIRE kit, с концентрации за флакон, след разтваряне и като крайна концентрация в MGIT епруветка

Противотуберкулозно лекарство от първи ред, SIRE kit	Концентрация на лиофилизираното лекарството за флакон	Концентрация на лекарството след разтваряне, за флакон	Крайна (критична) концентрация на лекарството MGIT епруветка
Streptomycin	332 µg	83 µg/ml	1,0 µg/ml
Isoniazid	33,2 µg	8,3 µg/ml	0,1 µg/ml
Rifampicin	332 µg	83 µg/ml	1,0 µg/ml
Ethambutol	660 µg	415 µg/ml	5,0 µg/ml

Таблица 2: Лекарствени субстанции от втори ред използвани в изготвяне на ТЛЧ

Наименование на чистата лекарствена субстанция	Концентрация на лиофилизат за флакон	Разтворител	Концентрация на крайното разреждане, µg/ml	Крайна концентрация в MGIT, µg/ml
Ofloxacin	99,1%	0,1N NaOH	168,0	2,0
Amikacin disulfate salt	740 µg/ml	Стерилна вода	84,0	1,0
Kanamycin sulfate	94,5%	Стерилна вода	420,0	5,0
Capreomycin sulfate	844 µg/ml	Стерилна вода	210,0	2,5

2.2. Молекулярно генетични методи:

За постигане на целите на настоящия дисертационен труд, бяха използвани две големи групи молекулярно генетични методи: методи за линейна хибридизация за определяне на резистентността към първи и втори ред противотуберкулозни лекарства (GenoType®MTBDR *plus* и GenoType®MTBDR *sl*) и методи за типизиране на MDR-TB щамове (сполиготипиране и MIRU/VNTR).

2.2.1. Молекулярено генетични методи за определяне на резистентността към първи и втори ред противотуберкулозни лекарства

Използвани бяха тестовете за линейна хибридизация: GenoType®MTBDR *plus* и GenoType®MTBDR *sl,* HAIN, Lifesciens. Тестовете са базирани на DNA-STRIP® технологията, като сме следвали инструкциите на производителя.

С теста GenoType®MTBDR *plus* баха изследвани 126 щама *M. tuberculosis* complex (фенотипно доказани MDR-TB) за откриване на определени мутации в гени, асоциирани с тази резистентност, респ. за доказванене на MDR-TB. Резистентността към Рифампицин беше отчетена чрез мутации в гена *rpoB* (кодиране за β-субединица на РНК полимераза), а към Изониазид – в два гена: мутации в гена *katG* (кодиране за каталаза пероксидаза) за висока степен на резистентност и мутации в ген *inhA* (кодиране за NADH енол ACP редуктаза) за отчитане на ниска степен на резистентност към Изониазид.

С теста GenoType®MTBDR *sl* баха изследвани 86 фенотипно доказани MDR-TB щама за откриване на определени мутации в гени, асоциирани с резистентност към втори ред противотуберкулозни лекарства, респ. за доказванене на XDR-TB. Определянето на резистентността към флуорохинолони (Офлоксацин и Моксифлоксацин) беше регистрирана чрез отчитане на най-важните мутации в гена *gyrA* (кодиращ за ДНК-гираза), а определянето на резистентността към

аминогликозиди/циклични пептиди (антибиотици за инжекционно приложение: Капреомицин, Виомицин/Канамицин и Амикацин), чрез мутации в *rrs* гена.

2.2.2. Молекулярно генетични методи за типизиране на MDR-TB щамове

Използвани бяха два генотипни метода: сполиготипиране и типиране на вариабилни тандемни повтори (MIRU/VNTR), осъществени в Националната референтна лаборатория по молекулярна и радиационна микробиология, НЦЗПБ.

Сполиготипирането (Spacer olygonucleotide typing - spolygotyping) е генотипен метод, чрез който се идентифицира ДНК полиморфизми в участъка от прави повтори (DR – Direct Repeat) в генома на щамове от *M. tuberculosis* complex. Този специфичен участък от генома на *M. tuberculosis* включва прави повтори от 37 нуклеотидни бази, разделени от уникални спейсъри с дължина 35 – 41 нуклеотидни бази. Броят на прави повтори и съответно уникалните спейсъри между тях се различават при различните щамове. За да се визуализират полиморфизмите в целия участък от прави повтори, различните спейсъри се амплифицират с универсални праймери, хомоложни на краищата на два съседни повтора. Синтетични сонди на базата на нуклеотидната секвенция на спейсърните участъци ковалентно се имобилизират върху мембрана. Денатурираните PCR продукти се хибридизират с имобилизираните сонди от мембраната. Обемът от данни при сполиготипирането е стандартизиран и значително улеснен, защото може да се представи в цифров вид. Бинарния код може да бъде превърнат в октетен, кото по този начин се отпределят и съответните сполиготипове (ST или SIT), означавани с цифри. Сполиготиповете се групират в големи семейства и се сравняват с определена база данни, като по този начн могат да бъде определен преобладаващ сполиготип в дадена страна и какво е неговото разпространение в локален и в глобален мащаб. В настоящия дисертационен труд са сполиготипирани 188 MDR-TB, използвайки готовия за употреба комерсиален кит Isogen Bioscience BV, Maarssen, The Netherlands, следвайки инструкцията на производителя.

Другият метод за типиране, използван от нас беше метода на вариабилни тандемни повтори: VNTR – Variable Number of Tandem Repeat или MIRU – Mycobacterial Interspersed Repetitive Units. В дисертационния труд са изследвани 164 MDR-TB щама чрез метода VNTR. Използван беше готовия за употреба комерсиален кит Genoscreen, Lille, Franc, следвайки инструкциите на производителя.

Променливият брой от тандемни повтори се явяват ценни маркери за определяне на генотипа на *M. tuberculosis* complex. Методът позволява определянето на количеството копия на тандемните повтори в 24 независими полиморфни локуси в генома на *M. tuberculosis.* VNTR генотипизирането се базира на PCR амплификация, използвайки специфични праймери за съпътстващи региони на VNTR и определяне на размерите на ампликоните след електрофореза. Крайният резултат е цифров код, съответстващ на броя на повторите във всеки VNTR локус. Изследваните локуси съдържат VNTR на генетични елементи, наречени микобактериални примесени повтарящи единици (MIRUs), които се намират предимно във вътрегенни региони, разпръснати в целия геном на *M. tuberculosis*. Дължините на MIRU повторените единици са в диапазона от 50-100 bp, и затова принадлежат към категория „минисателитни” VNTR. MIRU/VNTR има предимството на по-бърз и подходящ за почти всички изолати *M. tuberculosis*, включително щамове, които имат няколко IS*6110* копия. Резултатите от полученият брой вариабилни фрагменти за отделните VNTR локуси се импортират в интернет on-line сайта www.miru-vntrplus.org, който е програма (софтуер) за обработка. Прилагат се инструкциите описващи софтуера за обработка на резултатите и изчертаване на дендрограма.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНИЯ

1. Фенотипна характеристика на разпространените в България MDR/XDR-TB щамове

За периода на дисертационния труд, 2007г. – 2011г., в НРЛ по туберкулоза, НЦЗПБ бяха доказани като MDR-TB щама 272 изолата *M. tuberculosis* complex, изолирани от 216 пациенти, болни от туберкулоза, от цялата страна.

От доказаните като MDR-TB 216 пациенти, на 175 пациента е изолиран по 1 MDR-TB щам, който е включен в дисертационния труд. На 41 пациента беше изолиран по повече от 1 MDR-TB щам, както следва: на 28 пациента по 2 щама; на 11 пациента по 3 щама; на 2 пациента по 4 щама.

От тези 41 пациента с повече от 1 MDR-TB щам, щамовете на 32 пациента не показаха динамика в резистентността в хода на проучването. Профилите на мутациите в таргетните гени също останаха непроменени, а сполиготипирането и VNTR профила потвърждиха идентичността на съответния щам през годините, така че в обработката на данните беше включен само по един щам на пациент, с цел да се избегне кумулиране на еднопосочни данни и изкривяване на резултатите.

Клиничните изолати на 9 MDR-TB пациента през периода на дисертационния труд показаха ескалиране на резистентността, като сполиготиповете и VNTR профилите, останаха непроменени т.е. потвърждиха идентичността на щамовете. При обработката на данните включихме само един – последния във времето изолиран за пациента щам, който е максимално охарактеризиран фенотипно и генетично. Еволюцията на резистентността (фенотипна и генетична) в тези 9 случая беше разгледана детайлно и проследена в динамика (виж точка 4).

MDR-TB щамовете са доказани, спазвайки стандартните оперативни процедури на деконтаминация на съответните материали – храчка, стомашни промивни води, бронхо-алвеоларен лаваж, плеврален пунктат, секрет от белодробна фистула с последваща видова идентификация до *M. tuberculosis*

complex. В проучването не са били провеждани тестове за лекарствена чувствителност към първи и втори ред на щам, който преди това да не е бил доказан като *M. tuberculosis* complex.

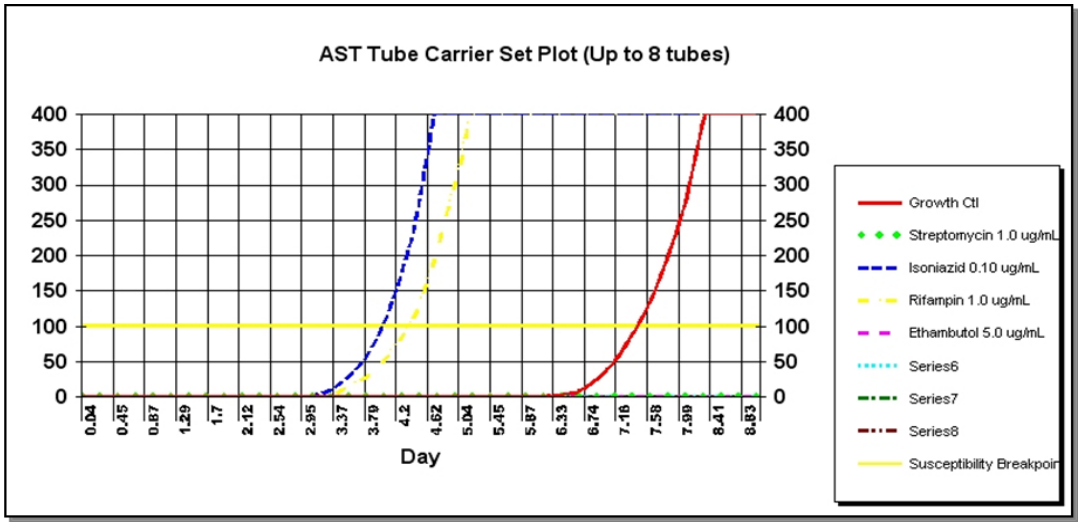
1.1. Фенотипната характеристика на MDR/XDR-TB – резистентност към първи ред противотуберкулозни лекарства

Фенотипната характеристика на всички MDR-TB щамовете, участващи в проучването, беше осъществена чрез определяне чувствителността на тези щамове към противотуберкулозни лекарства от първи ред (Стрептомицин, Изониазид, Рифампицин и Етамбутол) с автоматизираната система BACTEC® MGIT 960 System.

Съгласно определението на СЗО, посочено по-горе „MDR-TB се дефинира като туберкулоза, причинена от щам *M.tuberculosis* complex с доказана *in vitro* резистентност към: Изониазид и Рифампицин едновременно, с или без наличие на резистентност към други противотуберкулозни лекарства от първи ред.

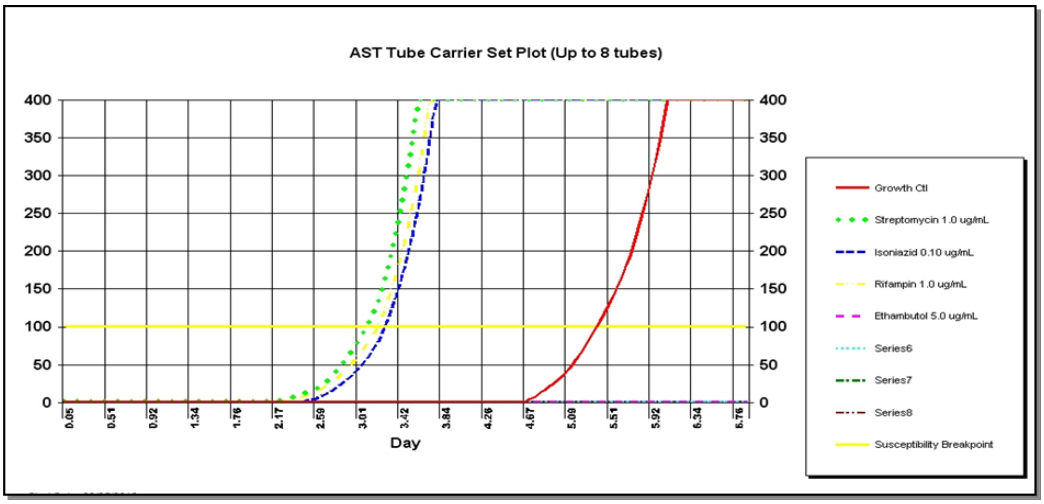
Получените от нас резултати показаха и четирите възможни варианта (комбинации) на резистентност на MDR-TB щамовете:

1. Едновременна резистентност само към Изониазид и Рифампицин (HR), представени графично на **Фигура 3**. Контролната крива (GC) е показана в червен цвят; растежната крива на Изониазид в синьо и на Рифампицин – в жълто.



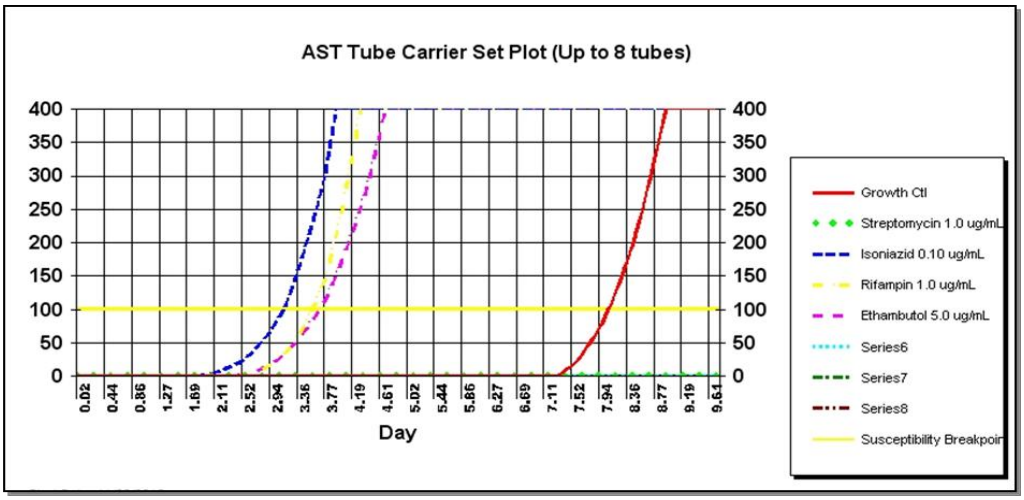
Фигура 3: Визуализиране на MDR-TB щам с HR тип резистентност, чрез растежни криви, съхранявани в Epi Center на автоматизирана система BACTEC® MGIT 960 System

2. Едновременна резистентност към Изониазид, Рифампицин и Стрептомицин (HRS), представена на **Фигура 4**. Контролната крива (GC) е показана в червен цвят; растежната крива на Изониазид в синьо; на Рифампицин в жълто и на Стрептомицин – в зелено.



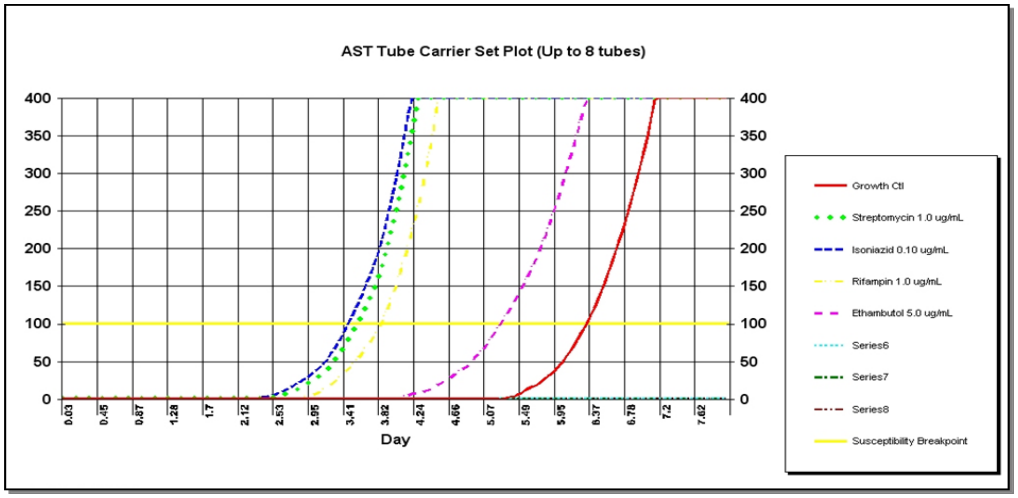
Фигура 4: Визуализиране на MDR-TB с HRS тип резистентност, чрез растежни криви, съхранявани в Epi Center на автоматизирана система BACTEC® MGIT 960 System

3. Едновременна резистентност към Изониазид, Рифампицин и Етамбутол (HRE), представена на **Фигура 5**. Контролната крива (GC) е показана в червен цвят; растежната крива на Изониазид в синьо; на Рифампицин в жълто и на Етамбутол – в лилаво.



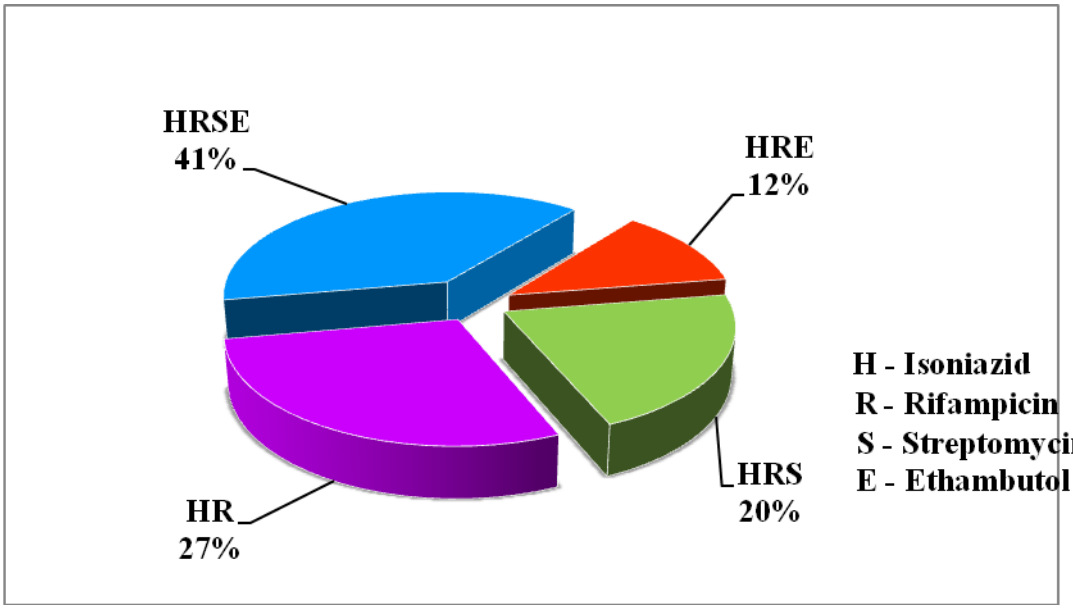
Фигура 5: Визуализиране на MDR-TB с HRE тип резистентност, чрез растежни криви, съхранявани в Epi Center на автоматизирана система BACTEC® MGIT 960 System

4. Едновременна резистентност и към четирите основни лекарства от първи ред: Изониазид, Рифампицин, Стрептомицин и Етамбутол (HRSE), представена графично на **Фигура 6**. Контролната крива (GC) е показана в червен цвят; растежната крива на Изониазид в синьо; на Рифампицин в жълто, на Стрептомицин в зелено и на Етамбутол – в лилаво.



Фигура 6: Визуализиране на MDR-TB с HRSE тип резистентност, чрез растежни криви, съхранявани в Epi Center на автоматизирана система BACTEC® MGIT 960 System

Процентното съотношение и абсолютния брой на получените резултатите, показали различните фенотипни варианти на MDR-TB резистентността, са представени на **Фигура 7 и Таблица 3.**



Фигура 7: Фенотипна резистентност към първи ред противотуберкулозни лакарства

От доказаните с фенотипен ТЛЧ за първи ред 216 MDR-TB щама, най-голям е процентът на резистентните едновременно и към четирите лекарства от първи ред (HRSE) 41% (n=88); следван от тези само към Изониазид и Рифампицин (HR) – 27% (n=59), към Изониазид, Рифампицин и Стрептомицин (HRS) – 20% (n=43) и към Изониазид, Рифампицин и Етамбутол (HRE) – 12% (n=26).

Таблица 3: Фенотипна резистентност към първи ред противотуберкулозни лакарства: абсолютен брой и процентно съотношение

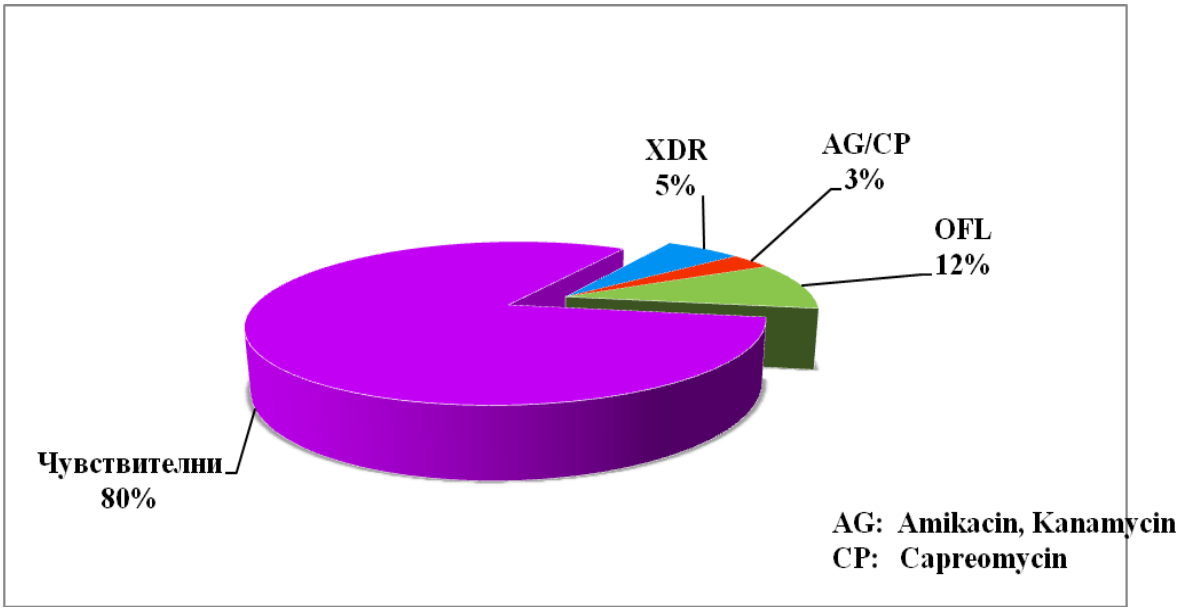
Резистентност	Брой	Процентно съотношение
HR	59	27 %
HRS	43	20 %
HRE	26	12 %
HRSE	88	41%
Брой и % MDR-TB щамове	216	100%

1.2. Фенотипната характеристика на MDR/XDR-TB щамове – резистентност към втори ред противотуберкулозни лекарства

От доказаните фенотипно щамове на 216 MDR-TB пациента, 174 т.е. 81% от тях бяха охарактеризирани фенотипно, чрез определяне чувствителността на тези щамове към противотуберкулозни лекарства от втори ред (Офлоксацин, Амикацин, Канамицин и Капреомицин) с автоматизираната система BACTEC® MGIT 960 System. На **Фигура 8** и **Таблица 4** са представени получените от нас резултати:

1. Най-голям е процентът на изцяло чуствителните към втори ред противотуберкулозни лекарства: Офлоксацин, Амикацин, Канамицин и Капреомицин – 80% (n=140)
2. Следвани от резистентност само към Офлоксацин – 12% (n=20)
3. С едновременна резистентност към Офлоксацин, Амикацин, Канамицин и Капреомицин – 5% (n=9)

4. С едновременна резистентност към Амикацин, Канамицин и Капреомицин – 3% (n=5).



Фигура 8: Фенотипна резистентност към втори ред противотуберкулозни лакарства

Осъществявайки фенотипната характеристика на MDR-TB щамовете към втори ред противотуберкулозни лекарства: Офлоксацин, Амикацин, Канамицин и Капреомицин, бяха доказани и първите XDR-TB щамове в България.

Съгласно определението на СЗО, посочено по-горе „XDR-TB се дефинира като туберкулоза, причинена от MDR-TB щам, с доказана *in vitro* резистентност към което и да е лекарство от групата на флуорохинолоните и към един или повече от следните инжекционни препарати: Канамицин, Амикацин, Капреомицин”

От фенотипно изследваните с втори ред лекарства 174 MDR-TB щама, 9 от тях (5%) се оказаха едновременно резистентни към Офлоксацин, Амикацин, Канамицин и Капреомицин т.е. съгласно дефиницията на СЗО те са XDR-TB.

През 2010г. с помощта на СРЛ, HSR, Милано, Италия бяха доказани първите 4 случая на XDR-TB. Те са случаи на MDR-TB, регистрирани през 2007г. и включени в т.нар. първа кохорта 2009/2011г. за лечение в СБАЛББ Габрово, с

втори ред противотуберкулозни лекарства. През следващата година в НРЛ по туберкулоза, НЦЗПБ бяха доказани още 5 случая на XDR-TB.

Таблица 4: Фенотипна резистентност към Офлоксацин, Амикацин, Канамицин и Капреомицин: абсолютен брой и процентно съотношение

OFX	**AMK**	**KAN**	**CAP**	**Брой**	**Процентно съотношение**
R	R	R	R	9	5%
S	R	R	R	5	3%
R	S	S	S	20	12%
S	S	S	S	140	80%
Брой/% MDR-TB щамове				**174**	**100%**

R – резистентен S – чувствителен

Изследвайки на практика всички туберкулозни щамове, изпратени в НРЛ по туберкулоза, НЦЗПБ от туберкулозната лабораторна мрежа на територията на цялата страната, от всички 28 области в България, като MDR-TB пациенти бяха доказани в 25 от тях. Нямаше установен MDR-TB щам на пациент с адресна регистрация в 3 области: Смолян, Кърджали и Ямбол.

Прави впечатление, че не винаги високата заболяемост от туберкулоза, регистрирана по области, съответства на броя на изолираните MDR/XDR-TB щамове на пациентите. В **Таблица 5** е представено сравнение между регистрираните заболявания от активна туберкулоза, на 100 000 население, по области и изолираните MDR-TB щамове на пациенти през периода 2007-2011г.

Таблица 5: Сравнение между регистрираните заболявания от активна туберкулоза, на 100 000 население, по области и изолираните MDR-TB щамове на пациенти през периода 2007-2011г.

№	Група	Област	2007	2008	2009	2010	2011	MDR-TB 2007-2011
		Заболяемост	**37,1**	**38**	**33,6**	**30,03**	**27,9**	**216**
1	1	София - град	37,4	32,0	31,9	33,6	30,5	38
2	1	Бургас	39,4	35,7	35,6	30,6	26,6	11
3	1	Стара Загора	35,3	30,2	32,9	20,7	18,6	7
4	2	Сливен	28,8	35,6	34,5	30,2	31,9	1
5	3	Монтана	43,0	42,3	43,3	40,5	44,5	24
6	3	Габрово	56,0	46,1	44,3	50,9	44,0	14
7	3	Видин	72,1	74,0	74,2	50,1	43,5	11
8	3	Враца	64,1	64,5	64,1	66,1	56,7	9
9	4	Ловеч	28,8	39,6	37,4	35,8	36,0	5
10	4	Силистра	43,2	39,1	38,9	27,0	27,6	4
11	4	Перник	58,9	40,3	40,2	50,5	38,1	4
12	4	Разград	43,8	36,9	43,4	36,9	29,5	2
13	4	Кюстендил	76,7	56,3	64,1	53,8	41,7	2
14	4	София - област	42,3	43,8	46,9	34,3	27,8	2
15	5	Пловдив	33,0	35,6	34,3	27,4	24,4	18
16	5	Варна	24,7	20,8	21,1	24,9	28,4	17
17	5	Добрич	29,4	28,0	27,9	22,3	22,6	14
18	5	Пазарджик	28,8	26,4	26,4	23,3	23,2	10
19	5	Шумен	26,4	17,5	18,0	28,1	23,2	6
20	6	Русе	36,2	28,8	27,2	27,6	21,6	5
21	6	Търговище	39,4	30,8	31,4	25,0	26,4	4
22	6	В. Търново	32,5	21,7	21,7	26,9	17,7	3
23	6	Хасково	38,0	26,9	26,8	20,5	18,2	2
24	6	Плевен	24,7	25,1	24,6	19,5	20,3	2
25	6	Благоевград	36,1	29,8	29,8	27,8	26,2	1
26	7	Ямбол	37,6	38,2	40,1	33,1	27,3	0
27	7	Кърджали	31,8	32,3	30,3	19,5	17,0	0
28	7	Смолян	17,1	20,8	20,7	19,6	21,3	0

Разглеждайки MDR-TB щамовете на пациенти, изолирани през периода 2007-2011г. и сравнявайки го със заболяемостта по области, установихме следните тенденции, представени от нас в 7 групи:

Група 1 – със заболяемост близка до средната за страната, но с високо ниво на потвърдени MDR-TB пациенти – София град (n=38), Бургас (n=11) и Ст. Загора (n=7).

Група 2 – със заболяемост близка до средната за страната, но с ниско ниво на потвърдени MDR-TB пациенти – Сливен (n=1).

Група 3 – със заболяемост по-висока от средната за страната и с високо ниво на потвърдени MDR-TB пациенти – Монтана (n=24), Габрово (n=14), Видин (n=11) и Враца (n=9).

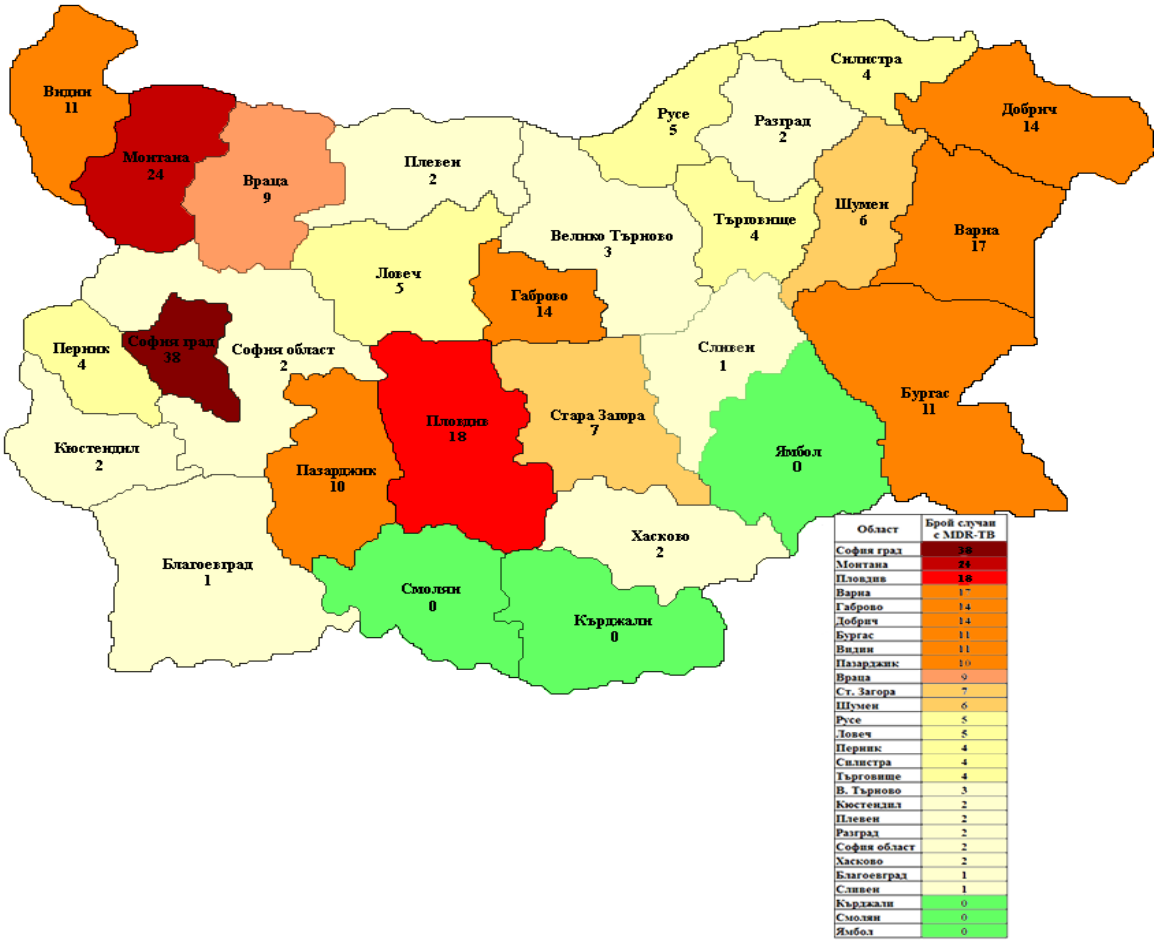
Група 4 – със заболяемост по-висока от средната за страната, но с ниско ниво на потвърдени MDR-TB пациенти – Кюстендил (n=2), Разград (n=2), София област (n=2), Перник (n=4), Силистра (n=4) и Ловеч (n=5).

Група 5 – със заболяемост по-ниска от средната за страната, но с високо ниво на потвърдени MDR-TB пациенти – Пловдив (n=18), Варна (n=17), Добрич (n=14) и Пазарджик (n=10) и Шумен (n=6).

Група 6 – със заболеваемост по-ниска от средната за страната и с ниско ниво на потвърдени MDR-TB пациенти – Русе (n=5), Търговище (n=4), В. Търново (n=3), Плевен (n=2), Хасково (n=2), Благоевград (n=1).

Група 7 – без MDR-TB, Кърджали и Смолян с по-ниска от средната за страната заболяемост и Ямбол със заболяемост, близка до средната за страната.

Като цяло, най-голямо е разпространението на MDR-TB щамовете на пациенти с адресна регистрация по области, които се явяват големи гравитационни центрове и са най-гъсто населените области в страната, като София град, Пловдив и Варна, както и в областите от Западна България, с традиционно висока заболяемост от активна туберкулоза над средната за страната през този 5 годишен период, като Монтана, Видин, Враца и Габрово (**Фигура 9**).

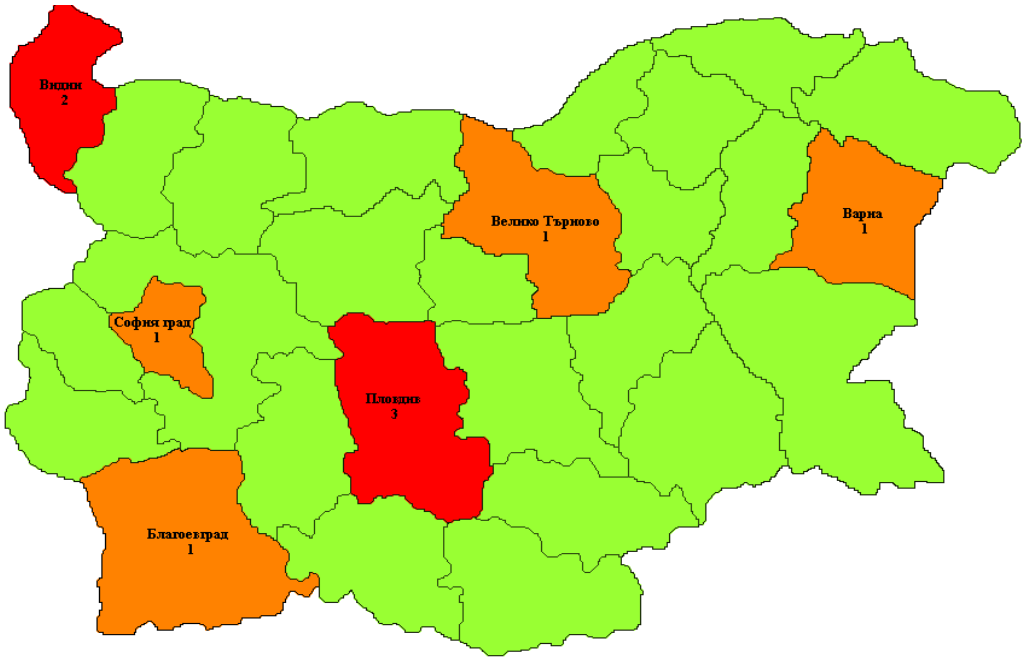


Област	Брой случаи с MDR-TB
София град	38
Монтана	24
Пловдив	18
Варна	17
Габрово	14
Добрич	14
Бургас	11
Видин	11
Пазарджик	10
Враца	9
Ст. Загора	7
Шумен	6
Русе	5
Ловеч	5
Перник	4
Силистра	4
Търговище	4
В. Търново	3
Кюстендил	2
Плевен	2
Разград	2
София област	2
Хасково	2
Благоевград	1
Сливен	1
Кърджали	0
Смолян	0
Ямбол	0

Фигура 9: Брой MDR-TB щамове и географското им разпределението по области на територията на България, според адресната регистрация на пациентите, от които са изолирани

В области, с традиционно ниска заболяемост от туберкулоза в България, по-ниска от средната за страната за периода 2007-2011г., като Смолян и Кърджали – не са били изолирани MDR-TB щамове. Това може да се дължи на причини от различно естество, като ниска гъстота на населението, респ. отдалеченост на квартали и жилища във високо планински местности, ограничаващо трансмисията; наличие на чист въздух и естествена храна; преминаване през чести профилактични прегледи в големите предприятия и др.

Наличие на XDR-TB щамове през този петгодишен период беше установено в 6 области: Пловдив, Видин, София град, Варна, Велико Търново и Благоевград (**Фигура 10**).



Фигура 10: Брой XDR-TB щамове и географското им разпределението по области на територията на България, според адресната регистрация на пациентите, от които са изолирани

Отново представени са най-гъсто населените области, като София град, Пловдив и Варна, както и тези с висока заболяемост, като Видин, но и от две области със заболяемост по-ниска от средната за страната: Благоевград и Велико Търново.

Разпределението на тези 9 XDR-TB в страната е представено на **Таблица 6,** като съпоставяне на изолирания абсолютен брой MDR-TB и този XDR-TB. Само един от тези 9 пациента с XDR-TB щамове е бил с доказана първична резистентност т.е. пациентът се е заразил с XDR-TB, докато при другите 8 случая е наблюдавана еволюция от MDR-TB до XDR-TB.

Таблица 6: Съотношение на MDR-TB и XDR-TB по области на територията на България, според адресната регистрация на пациентите, от които са изолирани

Разпределение на XDR-TB по		Брой MDR-TB
Области	**Брой**	
Пловдив	3	18
Видин	2	11
Варна	1	17
София-град	1	38
В. Търново	1	3
Благоевград	1	1

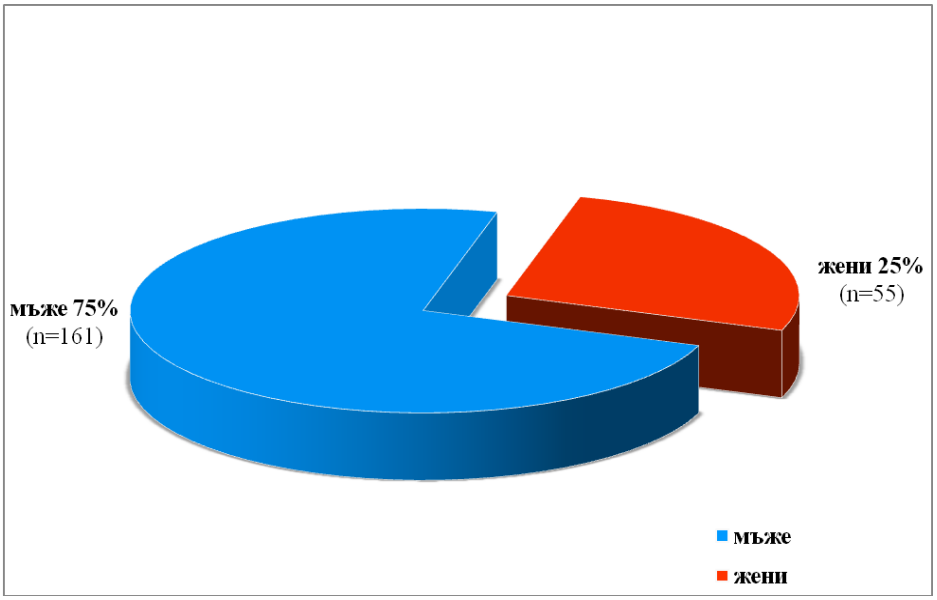
Разпределени по населени места на адресната регистрация на пациентите от които са изолирани, MDR-TB щамовете определено преобладават сред градското население – 74% (n=159), като селското население е 24% (n=52) т.е. съотношението градско/селско население е приблизително 3:1. Случаите на MDR-TB в институции е 2% (n=5). От тях 3 щама MDR-TB са били изолирани от затворници – по един от затворите в София, Бургас и Ловеч и 2 щама на психично болни от Държавната психиатрична болница в с. Карвуна (**Таблица 7**).

Таблица 7: Разпределени MDR-TB щамовете по населени места на адресната регистрация на пациентите от които са изолирани, 2007-2011г.

Населено място	Брой случаи MDR-TB	Процент
Градове	159	74%
Села	52	24%
Институции	5	2%
Общо	216	100%

Доказаните MDR-TB щамове, изолирани от мъже са 75% (n=161) от всички MDR-TB пациенти за периода 2007 – 2011г., а тези от жени 25% (n=55), като по този начин се запазва съотношението мъже/жени 3:1, характерно за туберкулозното заболяване въобще, не само за MDR-TB.

На **Фигура 11** е представено разпределението по пол на пациентите, от които са били изолирани MDR-TB щамовете за периода 2007-2011г.



Фигура 11: Разпределение по пол на пациентите, от които са изолирани MDR-TB щамовете, за периода 2007-2011г.

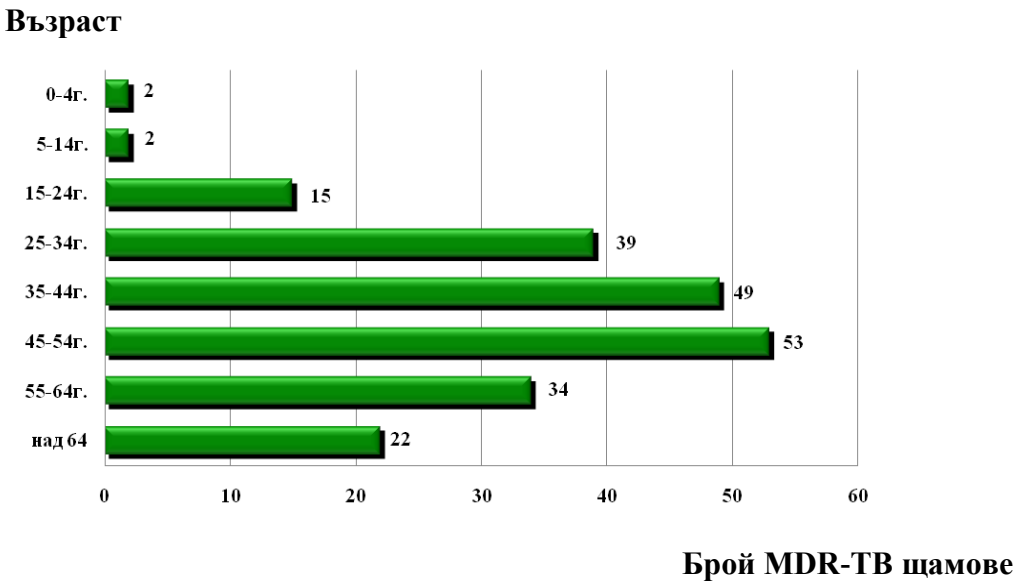
MDR-TB щамовете са изолирани предимно от пациенти в активна трудоспособна възраст **(Таблица 8)**.

На първо място е възрастовата група от 45 до 54г. – 24,54% (n=53); на второ място е възрастовата група от 35 до 44г. – 22,69% (n=49); на трето място е възрастовата група от 25 до 34г. – 18,6% (n=39); на четвърто място е възрастовата група от 55 до 64г. – 15,74% (n=34 случая).

Таблица 8: Разпределение по възрастови групи на пациентите, с изолирани MDR-TB щамове, 2007-2011г.

Възрастова група (години)	Брой MDR-TB щамове	Процент
над 64	22	10,18
от 55 до 64	34	15,74
от 45 до 54	53	24,54
от 35 до 44	49	22,69
от 25 до 34	39	18,06
от 15 до 24	15	6,94
от 5 до 14	2	0,925
от 0 до 4	2	0,925
Общо	**216**	**100**

Най-малко са MDR-TB щамовете, изолирани от пациенти в детска възраст, във възрастовите групи от 0 до 4 – 0,925% (n=2); от 5 до 14г – 0,925% (n=2), следвани от възрастовата група от 15 до 24г. – 6,94% (n=15) и групата над 64г. – 10,18% (n=22) (**Фигура 12**).



Фигура 12: Възрастова структура на пациентите, с изолирани MDR-TB щамове, 2007-2011г.

2. Молекулярно генетична характеристика на разпространените в България MDR/XDR-TB щамове

Използваните молекулярно генетични тестове MTBDR*plus* и MTBDR*sl*, ни дадоха възможност да открием и охарактеризираме най-честите мутации в Български MDR/XDR-TB щамове, асоциирани с резистентността към противотуберкулозните лекарства от първи ред: Изониазид и Рифампицин (MTBDR*plus*) и към тези от втори ред: флуорохинолони, аминоглицозиди/циклични пептиди (MTBDR*sl*).

2.1. Молекулярно генетичната характеристика на MDR/XDR-TB – резистентност към първи ред противотуберкулозни лекарства

На 58,33% (n=126) от всички участващи в проучването щамове на 216 MDR-TB пациента беше направен генетичния тест MTBDR*plus*. Тъй като обикновено мутациите, обуславящи Рифампициновата резистентност са в т. нар. гореща точка, обхващаща кодони от 507 до 533 в активен участък, обозначаван като RRDR – *„Rifampicine Resistance Determining Region”* (регион определящ Рифампицинова резистентност) от 81 bp на *rpoB* гена, то използвания от нас тест за генетична характеристика на MDR-TB щамовете отговаря на поставената задача **(Таблица 9)**.

Таблица 9: Корелация на резултати за RMP резистентност от генетичен тест MTBDR*plus* с тези от фенотипния тест BACTEC MGIT

Мутации в *rpo*B таргетен ген, асоциран с RMP резистентност						
Резултат от MTBDR*plus*	**Анализиран кодон**	**Мутация**	**Брой**	**%**	**Интерпретация MTBDR*plus***	**Интерпретация BACTEC**
ΔWT 8, MUT 3	530-533	S531L	102	80,95	R	R
ΔWT 7, MUT 2B	526-529	H526D	5	3,97	R	R
ΔWT 8	530-533	*S531P, S531Q, S531W, L533P	4	3,17	R	R
ΔWT 7	526-529	*H526R, H526P	3	2,4	R	R

		H526Q, H526N H526L, H526S H526C				
ΔWT 7, MUT 2A	526-529	H526Y	2	1,59	R	R
ΔWT3,4,MUT 1	513-519	D516V	2	1,59	R	R
WT	505-533	-	2	1,59	S	R
ΔWT 2,3	510-517	*Q513L, Q513P del514-516	1	0,79	R	R
ΔWT 2,3,4	510-519	*D516Y, del515	1	0,79	R	R
ΔWT 3	513-519	*Q513L, Q513P del514-516	1	0,79	R	R
ΔWT 3,4	513-519	*D516Y, del515	1	0,79	R	R
ΔWT2	510-513	*L511P	1	0,79	R	R
ΔWT 4,5	516-522	*del518, N518I	1	0,79	R	R
Общо	505-533		126	100	2 S (124 R)	126 R

Δ делеция; WT див тип; MUT мутация; RMP Рифампицин; R резистентен; S чувствителен
*Възможни мутации, точно разграничими чрез секвениране

В направеното от нас проучване на 126 MDR-TB щама с генетичния тест MTBDR*plus*, установихме, че в 98,41% има пълна корелация между фенотипната резистентност на дадения изолат към Рифампицин (конвенционален BACTEC метод, обозначаван като „златен стандарт”) и тази от молекулярно генетичния тест.

При отчитане на Рифампициновата резистентност на стрипа на Hain MTBDR*plus* се интерпретират 8 сонди (WT1 до WT8), разпознаващи дивите мутации и 4 сонди (*rpoB* MUT S531L, *rpoB* MUT H526Y, *rpoB* MUT H526D и *rpoB* MUT D516V), кореспондиращи с най-честите мутации: S531L, H526Y, H526D и D516V на *rpoB.*

Според проучванията на Hillemann et al. през 2007 е открита асоциация с *rpoB* мутации при 96,8 до 98,7% of RIF резистентни щамове. Тестът е бърз, лесен и приложим както на култури, така и на микроскопски позитивни материали.

В нашето проучване само в 2 щама (1,58%) не се откриха мутации в RRDR региона на *rpo*B гена (**Таблица 9**). По литературни данни, по-малко от 5% от фенотипно резистентните щамове не показват мутация на *rpo*B региона (Mani C., et al., 200; Riska P. F., et al. 2000; Hillemann et al., 2007). Рядко локуси, които се намират извън региона на горещата точка на *rpo*B, са свързани с резистентност без да имат връзка с мутациите, познати като причиняващи резистентност.

Мутациите, детерминиращи Рифампициновата резистентност в настоящия дисертационен труд, са с най-висока честота в кодон 531 и кодон 526 на *rpo*B гена, съответно 84,13% (n=106), като замяната S531L е установена в 80,95% (n=102) от MDR изолатите; и 7,93% (n=10), като замяна H526D е установена в 5 щама, H526Y в 2 щама, а в 3 щама – някои от посочените в **Таблица 9** мутации: H526R, H526P, H526Q, H526N, H526L, H526S, H526C. Останалите 8 Рифампицин резистентни щама са с ниска честота – по 0,79% до 1,59%.

Други наши проучвания, публикувани през 2008г., 2012г. и 2013г, макар и изследващи по-малък брой MDR-TB щамове от България, подкрепят получените резултати от изследваните 126 MDR-TB щама в настоящия дисертационен труд (Miotto P., et al., 2008; Бачийска Е., и сътр., 2012г; Бачийска Е., и сътр., 2013). Преобладаващата мутация, обуславяща Рифампициновата резистентност е S531L – кодон 531, следвана от мутации в кодон 526 и 516.

По литературни данни, повече от 95% от RIF-резистентните *M. tuberculosis* имат мутация в специфичната зона RRDR (Zhang Y., et al., 2005; Telenti A., et al., 1993(1); Telenti A., et al.,1993 (2). Като най-често срещани се цитират мутации, засягащи кодони 531 и 526 (в 81% от случаите). Те обикновено водят до високо ниво на фенотипна резистентност, както и кръстосана резистентност с други рифамицини (Riska P. F., et al., 2000). Мутациите 511, 516, 518 и 522 причиняват ниски нива на резистентност към Рифампицин, както и известна чувствителност към рифабутин според Zhang Y, et al., 2005.

Определяне резистентността към Изониазид, чрез генетичния тест MTBDR*plus* е по-сложна от тази към Рифампицин, тъй като мутациите, обуславящи резистентност към Изониазид, са локализирани в няколко гена и региона. Чрез генетичния тест MTBDR*plus* се визуализират най-значимите и често срещани мутации, обуславящи резистентността към Изониазид, съответно в гените *kat*G и *inh*A.

Резултатите от проучването на 126 доказани фенотипно MDR-TB изолата са представени на **Таблица 10**.

Таблица 10: Корелация на резултати за INH резистентност от генетичен тест MTBDR*plus* с тези от фенотипния тест BACTEC MGIT

Мутации в *kat*G и *inh*A гени, асоциирани с INH резистентност						
Резултат от MTBDR*plus* за *katG*	**Резултат от MTBDR*plus* за *inhA***	**Мутация**	**Брой**	**%**	**Интерпретация MTBDR*plus***	**Интерпретация BACTEC**
WT	ΔWT1, MUT1	C15T/-15	56	44,44	INH - R	INH - R
ΔWT1, MUT1	WT	S315T1	32	25,4	INH - R	INH - R
ΔWT	WT	Само в *katG*	8	6,34	INH - R	INH - R
ΔWT1, MUT1	ΔWT1, MUT1	S315T1, C15T/-15	3	2,4	INH - R	INH - R
ΔWT	ΔWT1, MUT1	315*katG*, C15T/-15	1	0,79	INH - R	INH - R
WT	WT	Няма мутации	26	20,63	INH - S	INH - R
Общо			126	100	100 INH – R (79,37%)	126 INH - R

Δ делеция; WT див тип; MUT мутация; INH Изониазид; R резистентен; S чувствителен

Най-често наблюдаваната мутация в проучените от нас щамове, асоциирана с резистентност към Изониазид е тази в *inh*A гена – 44,44%, следвана от мутация в *kat*G гена – 31,74% и четири щама с мутации и в двата гена едновременно – 3,19%.

Направено е сравнение между фенотипния и генетичния метод, използвани в проучването. Докато корелацията е почти пълна (98,41%, n=124 RMP - R) между фенотипната резистентност на дадения изолат към Рифампицин (конвенционален BACTEC метод, обозначаван като „златен стандарт”) и тази от молекулярно генетичния тест, представени в **Таблица 9,** то при Изониазид тя е 79,37% (n=100 INH - R), в **Таблица 10**. В 20,63% от проучените 126 MDR-TB щама не бяха установени мутации в двата гена, най-често асоциирани с резистентност към Изониазид. Вероятно се касае за мутации в гени, извън използваните в теста.

Предходни наши публикации през 2008г., 2012г. и 2013г, макар и изследващи по-малък брой MDR-TB щамове от България, подкрепят получените резултати от изследваните 126 MDR-TB щама в настоящия дисертационен труд (Miotto P., et al., 2008; Бачийска Е., и сътр., 2012г; Бачийска Е., и сътр., 2013).

По данни на различни автори: от 50% до 95% от Изониазид резистентните щамове имат мутация в кодон 315 на *kat*G гена; от 20 до 35% - в регулаторния регион на *inh*A гена и от 10 до 15% в *ahpC-oxyR* междугенен регион, често във връзка с мутация в *kat*G гена, извън кодон 315 (Hillemann et al., 2007, Mokrousov I., et al., 2002; Piatek A. Et al., 2000).

Ограниченията на използвания комерсиален молекулярен тест MTBDR*plus* произтичат от невъзможността да се обхванат всички възможни мутации, свързани с Изониазидовата резистентност, като са визирани най-честите мутации в *kat*G гена и регулаторния регион на *inh*A гена.

На **Таблица 11** са представени подробните обобщените резултати за резистентността към Изониазид и Рифампицин едновременно на детайлно проучванените 126 фенотипно определени като MDR-TB изолата с представени всички установени от нас мутации или липсата им.

Таблица 11: Резултати за резистентността към Рифампицин и Изониазид едновременно и сравнения между генетичен тест MTBDR*plus* и фенотипния тест BACTEC MGIT

Резултати за RMP и INH резистентност чрез 2 метода: MTBDR*plus* и BACTEC						
RMP	**INH**					
***rpo*B**	***kat*G**	***inh*A**	**Брой**	**%**	**MTBDR*plus***	**BACTEC**
ΔWT 8, MUT 3	WT	ΔWT1, MUT1	54	42,9	MDR	MDR
ΔWT 8, MUT 3	ΔWT, MUT1	WT	28	22,22	MDR	MDR
ΔWT 8, MUT 3	WT	WT	15	11,9	RMP^r	MDR
ΔWT 8, MUT 3	ΔWT	WT	2	1,59	MDR	MDR
ΔWT 8	ΔWT, MUT1	WT	2	1,59	MDR	MDR
ΔWT 7, MUT 2B	ΔWT, MUT1	WT	2	1,59	MDR	MDR
ΔWT 7	WT	WT	2	1,59	RMP^r	MDR
WT	WT	WT	2	1,59	S	MDR
ΔWT 7, MUT 2B	ΔWT	WT	1	0,79	MDR	MDR
ΔWT 7, MUT 2B	WT	ΔWT1, MUT1	1	0,79	MDR	MDR
ΔWT 8, MUT 3	ΔWT1, MUT1	ΔWT1, MUT1	3	2,38	MDR	MDR
ΔWT 3,4, MUT 1	WT	WT	1	0,79	RMP^r	MDR
ΔWT 3,4, MUT 1	ΔWT	WT	1	0,79	MDR	MDR
ΔWT 2,3	WT	WT	1	0,79	RMP^r	MDR
ΔWT 3	WT	WT	1	0,79	RMP^r	MDR
ΔWT 3,4	WT	WT	1	0,79	RMP^r	MDR
ΔWT 4,5	WT	WT	1	0,79	RMP^r	MDR
ΔWT 8	WT	WT	1	0,79	RMP^r	MDR
ΔWT 7	ΔWT	WT	1	0,79	MDR	MDR
ΔWT 2,3,4	ΔWT	WT	1	0,79	MDR	MDR
ΔWT 7, MUT 2A	WT	ΔWT1, MUT1	1	0,79	MDR	MDR
ΔWT 7, MUT 2A	ΔWT	ΔWT1, MUT1	1	0,79	MDR	MDR
ΔWT 7, MUT 2B	WT	WT	1	0,79	RMP^r	MDR
ΔWT 2	ΔWT	WT	1	0,79	MDR	MDR
ΔWT 8	ΔWT	WT	1	0,79	MDR	MDR
Общ брой проучени с фенотипен и генетичен тест MDR-TB щамове. Резултати			126	100	100 MDR	126 MDR

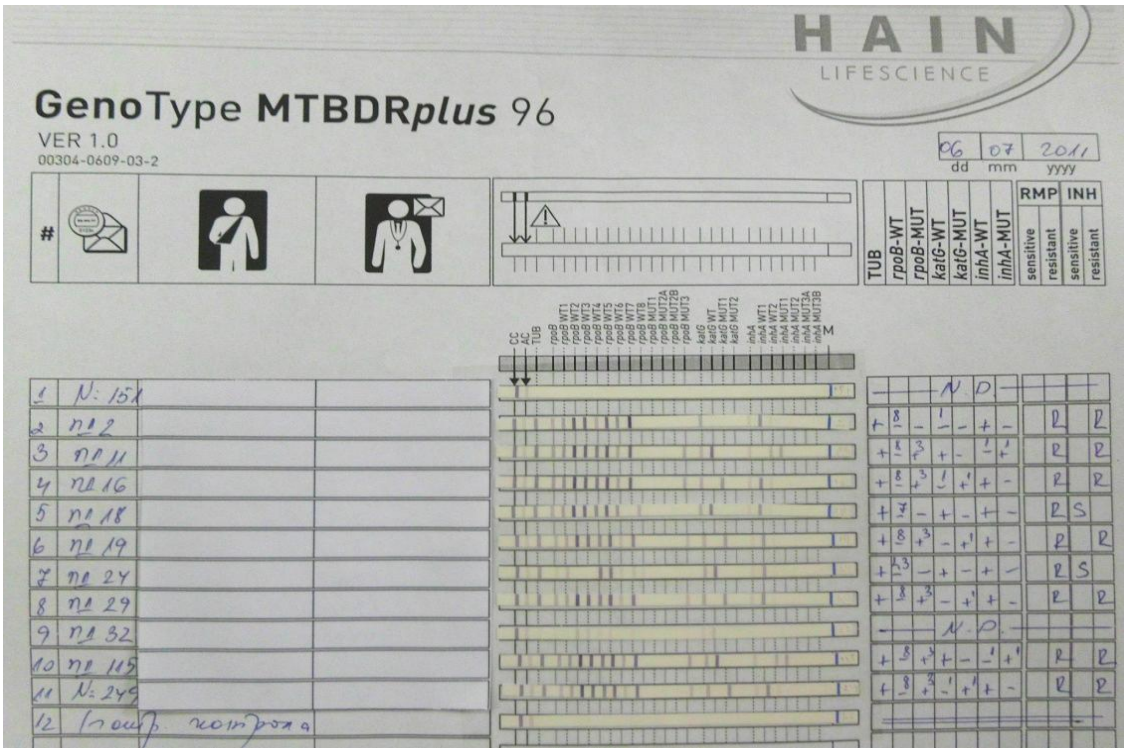
Δ делеция; WT див тип; MUT мутация; INH Изониазид; RMP^r RMP резистентен; S чувствителен

При иследването на 126 фенотипно определени като MDR-TB щама, прави впечатление, че 26 от тях, съгласно генетичния тест са INH чувствителни – 20,63% т.е. са без мутации в *kat*G и/или *inh*A едновременно или по отделно. В 79,37% наблюдавахме различни типове мутации поне в един от тези два гена (*kat*G и *inh*A), асоциирани с Изониазидовата резистентност. От тези 26 Изониазид чувствителни, но фенотипно определении като MDR-TB щама, 2 освен чувствителни към INH са чувствителни и към RMP (1,58%) т.е. са без наличие на мутации в *rpo*B и *kat*G и *inh*A едновременно. Те могат да бъдат предмет на по-нататъшни проучвания, чрез секвениране на генома им, с цел точното локализиране на мутациите, асоциирани с MDR-TB.

На **Фигура 13** е представена снимка, илюстрираща начина на визуализиране на изработените с генетичния тест GenoType®MTBDR*plus* в НРЛ по туберкулоза, НЦЗПБ 126 MDR-TB щама, потвърдени фенотипно като такива. В случая, на снимката се виждат резултатите от генетичното тестване на единадесет ДНК, изолирани от щамове.

- Две проби са били отрицателни за *Mycobacterium tuberculosis* complex (позиция № 1 и позиции № 9) – липсва контролният банд за *Mycobacterium tuberculosis* complex. По този начин тестът дава възможност за потвърждаване или отхвърляне на етиологичната диагноза, директно от даден изолат или проба в рамките на 48часа.
- Седем от щамовете са определени като MDR-TB. Два от щамовете се определят от теста като резистентни само към Рифампицин (позиции № 5 и позиции №7). Тези два случая бяха потвърдени като MDR-TB чрез конвенционалния фенотипен тест за лекарствена чувствителност (BACTEC® MGIT 960 System).
- На позиция № 3 и 10 се вижда най-често срещания вариант на мутации в *rpo*B и *inh*A гените (42,9%), определящи MDR-TB в България (виж **Таблица 11)**. Това е комбинацията: ΔWT 8, MUT 3 в *rpo*B гена с ΔWT1, MUT1 в *inh*A гена т.е. наличие на мутаците S531L в *rpo*B гена и C15T в *inh*A гена.

- На позиции № 4, 6, 8 и 11, се виждат ясно бандовете за ΔWT8, MUT3, в *rpo*B гена в комбинация с бандовете за ΔWT, MUT1 в *kat*G гена т.е. наличие на мутация в *rpo*B гена - S531L, комбинирана с мутацията S315T1 в *kat*G гена (втория по честота вариант на мутации, определящи MDR-TB в България – 22,22% (виж **Таблица 11)**.
- Друг вариант на комбинация от мутации, асоциирани с MDR-TB е визуализирана на позиция № 2. Тук отсъствието на един див тип – ΔWT8, макар и без наличие на банд MUT в *rpo*B гена; в комбинация с липса на див тип – ΔWT, макар и без наличие на банд MUT в *kat*G гена, определят MDR-TB – 0,79% (виж **Таблица 11)**.



Фигура 13: Снимка, илюстрираща визуализирацията на MDR-TB щамове с генетичния тест MTBDR*plus* (снимката е направена в НРЛ по туберкулоза, НЦЗПБ, като имената на пациентите са закрити).

Получените от нас резултати за корелацията между генетични и фенотипни методи, представени по-горе: за Рифампицин 98,41% съвпадение и за Изониазид 79,37%, са напълно съпоставими с публикуваните мета-анализи за Geno Type MTBDR*plus* и BACTEC MGIT на MDR-TB, представени обобщено на **Таблица 12** (по Ling D.I., et al. 2008).

Таблица 12: Чувствителност и специфичност на метода Geno Type MTBDR*plus* за Рифампицин и Изониазид по Ling D.I., et al. 2008.

Лекарство	**Чувствителност**		**Специфичност**	
	%	Доверителен интервал (CI)	%	Доверителен интервал (CI)
Рифампицин	98,1%	95% CI (95,9- 99,1)	98,7%	95% CI (97,3-99,4)
Изониазид	84,3%	95% CI (76,6-89,8)	99,5%	95% CI (97,5-99,9)

2.2. Молекулярно генетичната характеристика на MDR/XDR-TB – резистентност към втори ред противотуберкулозни лекарства

На 68,25% (n=86) от тестваните с MTBDR*plus* беше направен генетичния тест MTBDR*sl,* определящ асоциацията на резистентността към втори ред противотоберкулозни лекарства със съответни генни мутации, което представлява 39,81% от всички участващи в проучването щамове на 216 MDR-TB пациента.

Чрез теста беше определена чувствителността на 86 фенотипно доказани щамове на MDR-TB пациенти към 2 големи групи противотуберкулозни лекарства от втори ред. Тези лекарства са с решаващо значение при определяне на конкретните терапевтични курсове на MDR-TB пациентите, а именно: за перорално приложение – групата на флуорохинолоните (Офлоксацин и Моксифлоксацин) и за парентерално приложение – групата на цикличните пептиди (Капреомицин, Виомицин) и/или аминогликозидите (Канамицин и Амикацин).

Таблица 13: Резултати за резистентността към флуорохинолони и аминогликозиди/циклични пептиди чрез генетичен тест MTBDR*sl* и фенотипен тест BACTEC MGIT

gyr A		***rrs***				**MTBDR*sl***		**Bactec MGIT**			
WT	**Мутация**	**WT**	**Мутация**	**Брой**	**%**	**FQ**	**AG/CP**	**OFX**	**AMK**	**KAN**	**CAP**
WT	няма	WT	няма	64	74,4	S	S	S	S	S	S
WT	няма	ΔWT 1, MUT1	A1401G	4	4,6	S	R	S	R	R	R
ΔWT 2, MUT1	A90V	WT	няма	7	8,1	R	S	R	S	S	S
ΔWT 3, MUT3A	D94A	WT	няма	2	2,3	R	S	R	S	S	S
ΔWT1	C88S /A88T	WT	няма	1	1,2	R	S	R	S	S	S
ΔWT 2, MUT1	A90V	WT	A1401G	1	1,2	R	R	R	R	R	R
ΔWT 3, MUT3A	D94A	ΔWT 1, MUT1	A1401G	1	1,2	R	R	R	R	R	R
ΔWT 3, MUT3C	D94G	ΔWT 1, MUT1	A1401G	5	5,8	R	R	R	R	R	R
ΔWT 2, MUT2	S91P	ΔWT 1, MUT1	A1401G	1	1,2	R	R	R	R	R	R

Δ делеция; WT див тип; MUT мутация; FQ Флурохинолони; AG/CP Аминоглокозиди/ циклични пептиди; AMK Амикацин; KAN Канамицин; CAP Капреомицин; R резистентен; S чувствителен

В 74,4% (n = 64) не бяха открити мутации в *gyr A* и *rrs* т.е. MDR-TB щамовете са чувствителни към флуорохинолони и аминогликозиди/циклични пептиди, което в 100% съвпада с фенотипната характеристика на тези щамове (**Таблица 13**).

В останалите 25,6% (n=22) от изследваните MDR-TB щамове са отчетени следните 3 комбинации от мутации в двата гена едновременно или по отделно, асоциирани със съответната резистентност:

1. FQ-R и AG/CP-S: резистентността е асоциирана с наличие на мутации само в *gyr A* гена, без мутации в *rrs* т.е. в 11,62% (n=10) от всички изследвани MDR-TB щамове (n=86), респективно 45,45% (n=10) от всички показали резистентност MDR-TB щамове (n=22) с теста MTBDR*sl*. В тази група най-често срещаната мутация е A90V– 31,81% (n =7); следвана от D94A – 9,1% (n=2); и C88S /A88T – 4,54% (n=1).
2. FQ-S и AG/CP- R: резистентността е асоциирана с наличие на мутации само в *rrs* гена, без мутации в *gyr A* гена т.е. в 4,65% (n=4) от всички изследвани MDR-TB щамове (n=86), респективно в 18,18% (n=4) от всички показали резистентност MDR-TB щамове (n=22) с теста MTBDR*sl*. В тази група единствената мутация е A1401G.
3. FQ-R и AG/CP- R: резистентността е асоциирана с наличие на мутации едновременно в двата гена *gyr A* и *rrs* гена т.е. в 9,30% (n=8) от всички изследвани MDR-TB щамове (n=86), респективно в 36,36% (n=8) от всички показали резистентност MDR-TB щамове (n=22) с теста MTBDR*sl*. В тази група най-често срещаната комбинация от мутации е D94G и A1401G – 22,72% (n=5), и по 1 случай от комбинациите: A90V и A1401G; D94A и A1401G; S91P и A1401G. Посочената комбинация всъщност визира 8 от 9-те случая на XDR-TB, доказани в НРЛ ТБ за периода на проучването. Един XDR-TB пациент е бил охарактеризиран само фенотипно.

Представената генетична характеристика на резистентните MDR-TB щамове към флуорохинолони и аминогликозиди/циклични пептиди чрез теста MTBDR*sl*, съвпада напълно с направената фенотипната характеристика на тези щамове с тест BACTEC MGIT, респективно това се отнася и за XDR-TB (**Таблица 13**).

На **Фигура 14** е представена снимка, илюстрираща визуализирацията на MDR-TB щамове с генетичния тест MTBDR*sl*, осъществени НРЛ по туберкулоза, НЦЗПБ).

Фигура 14: Снимка, илюстрираща визуализирацията на MDR-TB щамове с генетичния тест MTBDR*sl* (снимката е направена в НРЛ по туберкулоза, НЦЗПБ).

Ясно се разграничават 3 ситуации:

1. Наличие на изцяло чувствителен към втори ред MDR-TB щам – позиция № 1, 2 и 4 т.е. отсъствие на мутации и в двата гена: *gyr A* и *rrs.*
2. Резистентност към AG/CP с мутация A1401G в *rrs* гена (ΔWT 1, MUT1) – позиция 3, свързвана с високо ниво на резистентност на *M. tuberculosis* към Амикацин и Канамицин.
3. Един случай на XDR-TB, на позиция 5. Показаната комбинация от мутации е ΔWT 2, MUT2 в *gyr A* (S91P) *и* ΔWT 1, MUT1 в *rrs* гена (A1401G).

По литературни данни мутациите в кодон 90 (GCG → GTG), 91 и 94 (94Asp→Gly, Ala, Tyr, and Asn) са най-честите мутации, свързани с флуорохинолоновата резистентност на *M. tuberculosis* complex (Shi R., et al. 2006). Друга често срещана мутация е S95T (95 Ser → Thr), преобладаваща при проучени Офлоксацин резистентни щамове от Индия, следвана отново по честота от мутации в кодоните 90 и 94 на *gyr* A (Siddiqi N., et al., 2002). Получените резултати от Българските MDR-TB щамове потвърждават световната тенденция за водещата роля на *gyr A* мутациите в определянето на резистентността към флуорохинолони.

Чувствителността на GenoType® MTBDR*sl* за детекция на флуорохинолоновата резистентност, е оценена от Hillemann D., et al., на 90,2%, специфичност – 100% (Hillemann D. et al., 2009), докато при тестваните за периода Български изолати, не бяха установени фалшиво положителни или фалшиво отрицателни резултати, дадени от този молекулярен тест, вероятно предвид не дотам големия брой изследвани MDR-TB щамове с такава резистентност (n=22).

Мутацията A1401G в *rrs* гена, определящи високостепенна резистентност към Амикацин и Канамицин е съобщавана като най-често срещана (Alangaden, G. J., et al.,1998). В настоящото проучване A1401G се откри в 100% от случаите на фенотипна резитентност към инжекционните препарати от втори ред. Не бяха открити мутациите C1402T и G1484T.

Чувствителността на MTBDR*sl* е оценена от Hillemann et al. на 83,3% за Амикацина, и на 86,8% за Капреомицина; специфичност – 100% за Амикацина и 99,1% за Капреомицина, докато в Българската извадка фалшиво положителни или фалшиво отрицателни резултати за чувствителността към инжекционните препарати от втори ред, не беше установена, вероятно предвид не дотам големия брой изследвани MDR-TB щамове с такава резистентност (n=22).

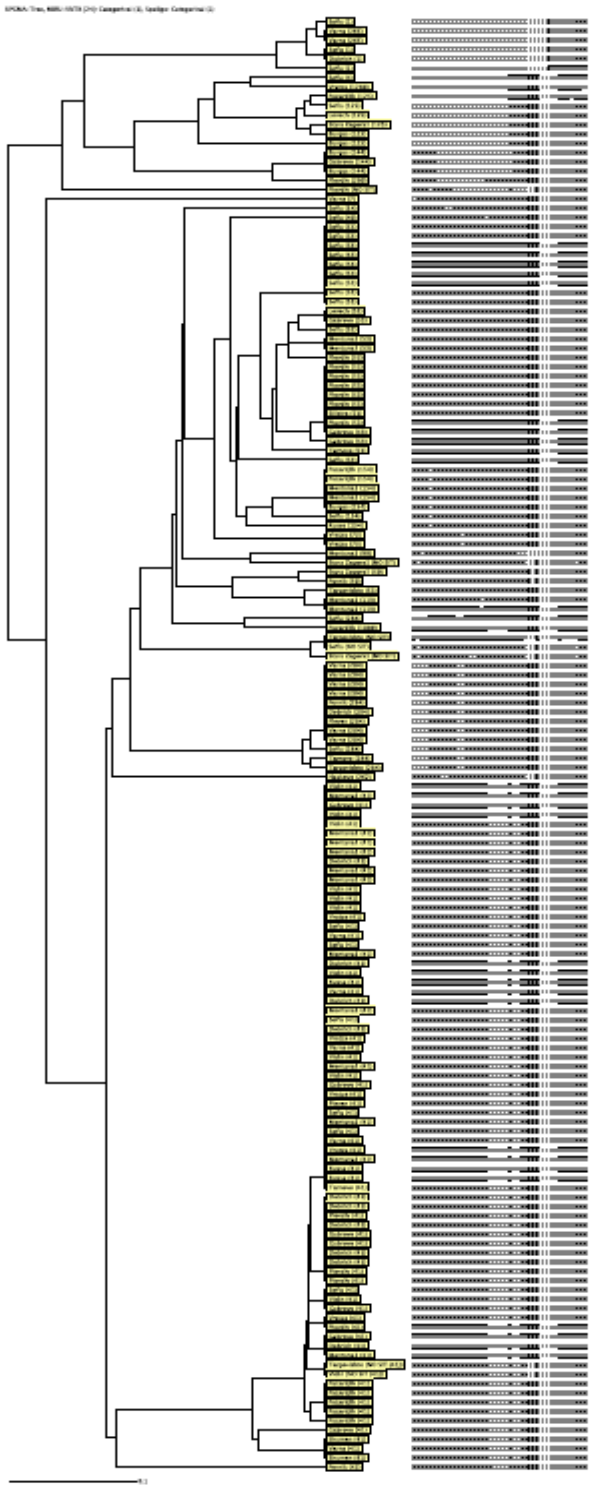
3. Генотипна характеристика на разпространените в България MDR/XDR-TB щамове

От проучените MDR-TB щамове на 216 пациенти, типизирани чрез сполиготипиране бяха 87,03% (n=188) и чрез VNTR – 75,92% (n=164).

От сполиготипираните 188 MDR-TB щама, най-застъпено беше суперсемейството (superlineage) Euro American – 181 щама; следвано от CAS (Central Asian) – 6 щама Beijing и East Asia – 1 щам.

Разгледани детайлно по семейства (lineage), субсемейства (clade) и сполиготипове, за периода 2007 – 2011г., можем да направим следната характеристика на разпространените генотипове MDR-TB щамове в България, както е представено на дендрограмата (**Фигура 15)**:

1. Най-разпространеното семейство у нас е TUR – 45,74% (n=86), със субсемейство (clade) LAM7_TUR – 45,74% (n=86), към което принадлежи и най-разпространения сполиготип сред MDR-TB щамовете в България – SIT41 – 96,51% (n=83) от сполиготиповете в това семейство.
2. Следващото по разпространение е семейство Ghana – 30,85% (n=58), с преобладаващо субсемейство T1 – 96,55% (n=56), и най-често срещащи се сполиготипове SIT53 и SIT284, съответно 53,44% (n=31) и 29,31% (n=17).
3. MDR-TB щамовете, принадлежащи към семейство Haarlem са 6,38% (n=12), като 41,66% (n=5) са от субсемейство T1, с най-застъпен SIT14 – 41,66% (n=5).
4. Следващото по разпространение е семейство UgandaI – 5,31% (n=10), 80% от които са SIT125 (n=8).
5. Генотипът Beijing е представен от 6 щама – 3,19% от всички типизирани щамове. От тях четири щама са със SIT1 и два със SIT265. Тъй като за първи път в България бяха доказани MDR-TB щамове от генотип Beijing в хода на това проучване, сме разгледали детайлно случаите, като сме проследили историята на заболяването на тези MDR-TB пациенти.



Фигура 15: Дендрограма с групиране на MDR-TB изолатите според сполиго профилите им

Генотипът Beijing е широко разпространен по целия свят. Изолиран от щамове от Китай, Монголия, Тайланд и Южна Корея, той е описан за първи път през 1995г. от Dick van Soolingen като превалиращ генотип в Югоизточна Азия (van Soolingen D, et al.,1995).

Други проучвания доказват, че този генотип е свързан с трансмисията на MDR-TB в Германия, Куба, Естония и Русия (Niemann S. et al., 1997; Diaz R., et al., 1998; Kruuner A., et al., 2001; Mokrousov I. et al., 2003). В САЩ беше описан W-щам, сред MDR-TB и чувствителни щамове, също принадлежащ към фамилията на Beijing (Agerton T. B., et al., 1999). Днес този генотип е широко разпространен по света (Bifani J. P., et al., 2002; Devaux I., et al., 2009; Schurch A.C, et al.2011). На Балканския полуостров вече няколко страни докладваха за случаи на Beijing генотипа, главно като внесен (импортен) щам (Tafaj S, et al., 2009; Panaiotov S., 2010, 2; Zozio T., et al., 2005). До 2009г. в България в редица проучвания на MDR-TB и чувствителни щамове не беше открит този генотип (Panaiotov S., et al. 2005, 1; Valcheva V., et al., 2008;). У нас за първи път бяха докладвани няколко случая на Beijing от колектив от НЦЗПБ през 2010г. (Panaiotov S., et al., 2010, 3; Panaiotov S., et al., 2012, 4).

В настоящото проучване доказаните 6 MDR-TB Beijing щама са изолирани от пациенти, с адресна регистрация в София град – 3 щама, област Добрич – 1 щам и във Варна – 2 щама, като тези от София и Добрич са със SIT 1, а от Варна със SIT 265.

Щамовете, изолирани в пациентите в София нямат епидемична връзка помежду си. Двама от тях са български граждани, но от арменски и молдовски произход. И двете страни са от групата на 18-те страни с висок приоритет на MDR-TB в Европейския регион на СЗО. По данни на ECDC от 2013г в Армения заболяемостта е 51 на 100 000 население, с 14,9% MDR-TB през 2011г., а в Молдова заболяемостта е 150,7 на 100 000 население, с 42,0% MDR-TB през 2011г (Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe, 2013).

Пациентът от арменски произход е починал и не е съобщил за контакти извън страната.

Особен интерес представлява втория Beijing щам, изолиран от млада жена, регистрирана като нов болен през 2010г. Пациентката съобщава за контакт в Молдова с Украинска гражданка, болна от туберкулоза (която към онзи момент не е знаела за заболяването си) и вероятно се е заразила от нея с XDR-TB Beijing щам т.е. с първична XDR-TB. Това е единствения случай на такъв щам, регистриран в България. След включване в кохорта през 2010г. за лечение с втори ред противотуберкулозни лекарства и направена операция, болната се е повлиява добре и попада в категорията „излекувана".

Третият Beijing MDR-TB е на мъж, асоциален, с алкохолна зависимост, с който се общува трудно и не е съобщил за контакти извън страната.

Интерес представляват и MDR-TB Beijing щамовете, SIT265 на двама мъже от Варна, които са изолирани през 2010г. Тези щамове са абсолютно идентични, с еднаква фенотипна и генетична характеристика (с идентични мутации) и с идентичен генотипен профил, който не открихме в други щамове, не само от гр. Варна, но и от цялата страна. По-възрастният мъж, моряк с дългогодишен стаж, с алкохолна зависимост, вероятно е внесъл този Beijing MDR-TB щам в България. Бидейки съседи с по-младия мъж, който се оказа диабетик, трансмисията е била лесно осъществима.

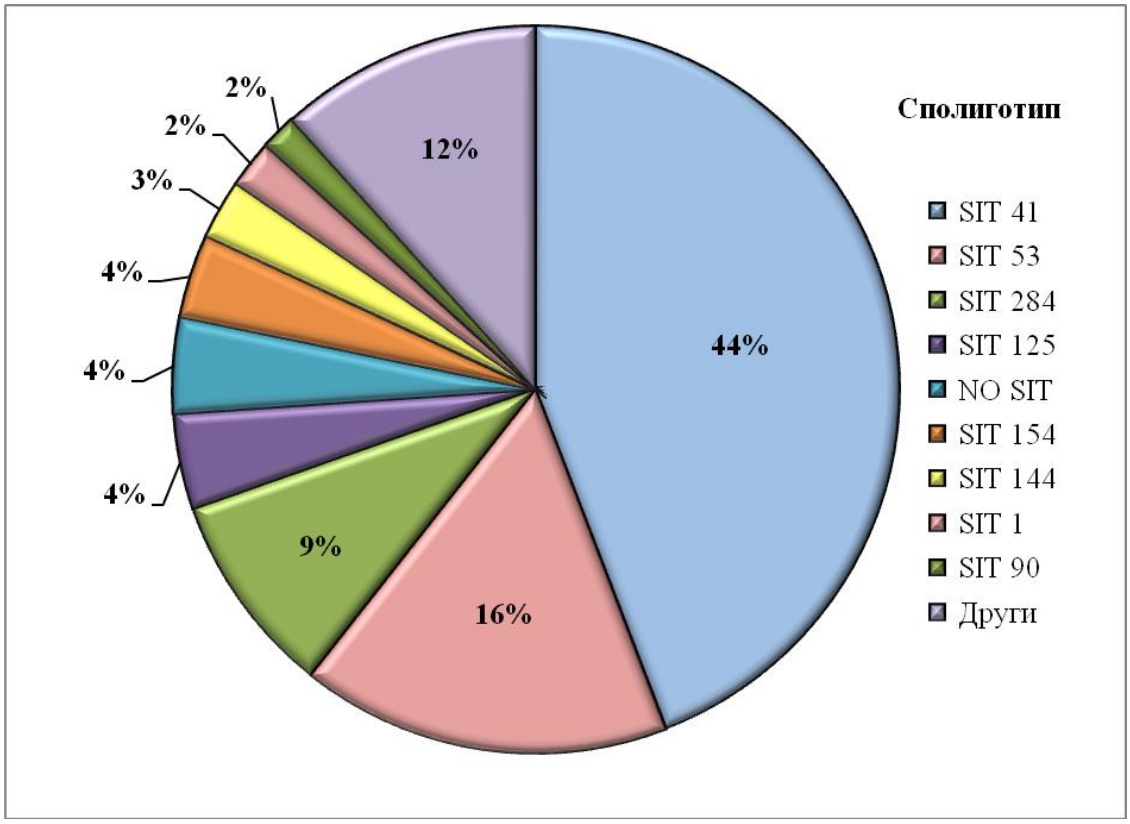
Шестият Beijing MDR-TB щам е изолиран от млад мъж от област Добрич, който е починал скоро след това и нямаме сведения за контакти, осъществени извън страната.

Останалите семейства, съдържат по-малък брой щамове, неформиращи клъстери, с единични заболели или с по два или три щама.

Разгледани детайлно по сполиготипове, прави впечатление, че водещо място сред всички сполиготипирани 188 MDR-TB щама, най-разпространени бяха SIT41– 44,15% (n=83), следван SIT53 – 16,49% (n=31). Заедно, те формират дял от 60,64% сред MDR-TB случаите за периода 2007-2011г (**Фигура 16**).

В категорията NO SIT са включени щамове, чийто профил не съответства на досега класифицирани в базата данни на SpolDB4 ST, формиращи два различни клъстера и още два единични случая.

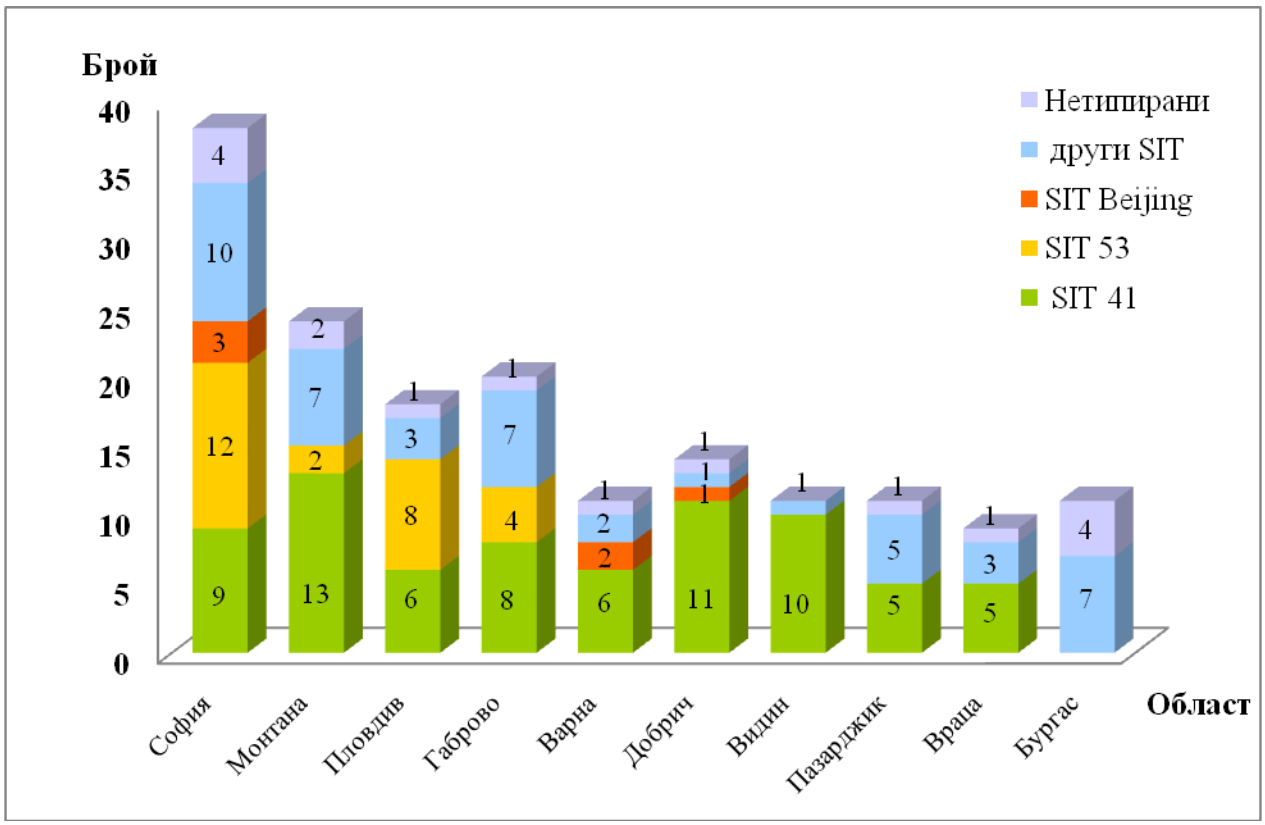
В категорията „Други“ са включени всички сполиготипове със спорадични случаи, най-често единични: SIT 4; 7; 34; 37; 40; 42; 47; 50; 73; 119; 262; 265; 280; 1261; 1280; 1410; 1800.



Фигура 16: Разпределение на MDR-TB щамовете, според принадлежността към определен сполиготип, 2007-2011г.

Въз основа на получените резултати, определено можем да твърдим, че SIT41 и SIT53 са асоциирани с мултилекарствената резистентност на туберкулозата в България и се свързват с конкретната трансмисия на тези щамове сред населението в страната.

Ако анализираме областите с най-голям брой доказани MDR-TB случи в България – София, Монтана, Пловдив, Габрово, Варна, Добрич, Видин, Пазарджик, Враца и Бургас, представени на **Фигура 9,** и ги свържем с разпространените сполиготипове по региони, представени на **Фигура 17,** прави впечатление превалиращия дял на сполиготип SIT41 в някои области, като Видин и Добрич.



Фигура 17: Разпростанение на най-значимите сполиготипове в областите в България с най- висок приоритет на MDR-TB случаи в периода 2007-2011г.

В област Видин SIT41 съставлява 90,9% (n=10) от 11 MDR-TB случая (всички изолирани MDR-TB щамове бяха типизирани), което определено се свързва с MDR-TB трансмисивността. От тези 10 MDR-TB щама 9 са с еднакъв VNTR профил: 244124132134425113333113 2 и с еднаква мутация в *rpoB* гена (S531L) т.е. образуват клъстер, а 1 MDR-TB щам е с различен VNTR профил, но

той е и с различна мутация в *rpoB* гена (H526D). От 9-те щама за 3 от тях има данни за огнищност – отнася се за семейство от двама съпрузи и дъщеря.

В област Добрич SIT41 съставлява 84,6% (n=11) от 13 типизирани MDR-TB щама от общо 14 доказани случаите за периода. За 5 от случаите със SIT41, с еднакъв VNTR профил и идентични мутации в *rpoB* гена (S531L) *inhA* гена (C15T) има данни за огнищност: отнася се за съседи, живеещи на една и съща улица, а двама от тях са били баща и син.

В област Монтана броят на MDR-TB щамовете с този сполиготип също е преобладаващ – 60% (n=13) от типизирани 22 щама (общо изолирани са били 24 MDR-TB щама), като половината от тях са от MDR-TB щамове на пациенти с адресна регистрация в гр. Лом, останалите – от 4 села в областта. И тук беше открит еднакъв VNTR профил и идентични мутации в *rpoB* гена (S531L) *inhA* гена (C15T), като също има данни за огнищност.

В област Пловдив прави впечатление, че от 6 MDR-TB щама със SIT41 и с еднакъв VNTR профил (35,3% от типизираните 17 щама), има данни за огнищност, тъй като 4 от тях бяха изолирани от пациенти от малцинствена група в Асеновградско село – съседи. Резистентността при един от тези MDR-TB пациенти, регистриран със туберкулоза през 2003г. е еволюирала до XDR-TB, доказана като такава през 2010г. и представена по-обстойно в точка 4. В област Пловдив регистрирахме превес на сполиготип SIT53 над SIT41сред MDR-TB щамовете, което беше наблюдавано и в София-град, като делът му е съответно 47,05% (n=8) и 35,3% (n=12). В Пловдив има данни, че три от щамовете са били изолирани от пациенти, които са били съседи (двама от които братя), в квартал с преобладаващо малцинствено население.

Голямо различие в профила на сполиготиповете при MDR-TB изолатите се наблюдава в област Бургас, където най-често срещани са SIT144; SIT125 и SIT154., като там не бяха установени SIT41 и SIT53. Вероятно в случая се касае за трансмисия на MDR-TB щамове, които са били импортирани в страната **(Фигура 17)**.

4. Анализ на еволюцията на резистентността, проследена при пациенти, с повече от един изолиран MDR/XDR-TB щам

Както беше отбелязано в глава Материали и методи, през 5 годишния период на проучването, на 41 пациента беше изолиран по повече от 1 MDR-TB щам, както следва: на 28 пациента по 2 щама; на 11 пациента по 3 щама; на 2 пациента по 4 щама.

От тези 41 пациента с повече от 1 MDR-TB щам, щамовете на 32 пациента не показаха динамика в резистентността в хода на проучването. Профилът на мутациите в таргетните гени също остана непроменен, а сполиготипирането и VNTR профила потвърдиха идентичността на съответния щам през годините за всеки пациент, така че в обработката на данните е включен само по един щам на пациент, с цел да се избегне кумулиране на еднопосочни данни и изкривяване на резултатите.

При 9 MDR-TB пациента клиничните изолати през годините показаха ескалиране на резистентността (7 от тях еволюираха до XDR-TB), като сполиготиповете и VNTR профилите им потвърждават идентичността на щама. При обработката на данните за 216 пациента, беше включен само един – последния във времето изолиран от пациента щам, който е максимално охарактеризиран фенотипно и генетично, а деветте случая представяме подробно по-долу.

Проследявайки детайлно в динамика, еволюцията на резистентността в тези 9 MDR-TB случая бяха набелязани следните основни тенденции:

- Разпределени по пол на пациентите, от които са изолирани, бяха 4-ма мъже и 5 жени.
- Седем от тези 9 щама на MDR-TB пациенти еволюираха до XDR-TB.
- Само 2-ма от MDR-TB пациентите са били нови случаи, когато са доказани като MDR-TB, а останалите 7 са били с предходно лечение (в различни терапевтични категории).

- Всичките 9 MDR-TB пациенти са били включени в 1-ва или 2-ра кохорта за лечение с втори ред противотуберкулозни лекарства в СБАЛББ Габрово, но въпреки това 5 пациента са починали необезбацилени.
- Засегната е била младата работоспособна възраст, като средната възраст към датата на доказването на MDR-TB е била 35,22г.

Регистираните промени във фенотипната и генетична характеристика на щамовете на тези MDR-TB пациенти представяме, проследени в динамика за всеки един от тях, както следва:

1. Мъж; 44г.; регистриран с туберкулоза през 2004г., а през 2009г. с доказана MDR-TB; с предходно протовотуберкулозно лечение, с терапевтична категория – рецидив; с адресна регистрация в област Пловдив. В хода на проучването от пациента бяха изолирани 3 MDR-TB щама, съответно през 2009, 2010 и 2011г. Трите щама са типизирани и са показали идентична характеристика, а именно: SIT280, T1-RUS2 и VNTR профил 232443122334225163333522 т.е. нямаме съмнение, че те принадлежат на един и същ пациент. Тъй като това е единствения изолиран в България MDR-TB щам с този генотипен профил, предполагаме, че е внесен у нас от чужбина. Фенотипно и генетично, резистентността през тези 3 години е преминала през: HR (мутация S531L в *rpoB* гена и мутация S315T1 в *katG* гена) плюс чувствителност към OFX, AMK, KAN и CAP (без мутации в *gyr A* гена и *rrs* гена) през 2009 и 2010г. През 2011г. изолираният MDR-TB щам е вече резистентен към EMB т.е. HRE (мутация S531L в *rpoB* гена; мутация S315T1в *katG* гена; мутация M306I в *embB* гена), като се прибавя и придобита резистентност към OFX (мутация A90V в *gyr A* гена).

2. Жена; 37г.; регистрирана с туберкулоза през 2007г.; с 4 изолирани MDR-TB щама. Доказана е през 2009 като MDR-TB, с предходно

протовотуберкулозно лечение, с адресна регистрация в област Видин. Други два щама са изолирани от пациентката през 2010г и още един през 2011г. И четирите й щама са типизирани и са показали една и съща генотипна характеристика: SIT41, LAM7_TUR и VNTR профил: 244124132134425113333113 2. Фенотипно и генетично, резистентността е еволюирала по следния начин: през 2009г. – HRE (мутация S531L в *rpoB* гена и мутация C15T в *inhA* гена) и чувствителност към OFX, AMK, KAN и CAP. През 2011г. пациентката е доказана като XDR-TB – HRSE (мутация S531L в *rpoB* гена; мутация C15T в *inhA* гена; мутация M306I в *embB* гена) плюс резистентност към OFX, AMK, KAN и CAP (мутация S91P в *gyr A* гена плюс мутация A1401G в *rrs* гена).

3. Мъж; 30г.; регистриран с туберкулоза през 2007г., а през 2008г. с доказана MDR-TB; с предходно протовотуберкулозно лечение, с терапевтична категория – повторно лечение след неуспех; с адресна регистрация в област Пловдив; с 4 изолирани MDR-TB щама, съответно през 2008, 2009, 2010 и 2011г. Щамовете са типизирани и са показали една и съща характеристика: Haarlem, NO SIT и VNTR профил: 21323433133442515333363 2. През 2008 и 2009г. щамовете са били с фенотипна характеристика HRS (ΔWT2,3,4 в *rpoB* гена и ΔWT в *katG* гена) плюс чувствителност към OFX, AMK, KAN и CAP. През 2010г. е доказан като XDR-TB. Следващия щам, изолиран през 2011г. е бил със същата характеристика, както този през 2010г, а именно: HRS (ΔWT2,3,4 в *rpoB* гена; ΔWT в *katG* гена и M306I в в *embB* гена) плюс резистентност към OFX, AMK, KAN и CAP (мутация D94G в *gyr A* гена и мутация A1401G в *rrs* гена). Пациентът е завършил летално през 2011г.

4. Жена; 53г.; регистрирана с туберкулоза през 2008г. През 2008г. е доказана MDR-TB; с терапевтична категория – нов (нелекуван) случай т.е. вероятно се е заразила с MDR-TB щам; с адресна регистрация в област Варна; с 3 изолирани MDR-TB щама, съответно през 2008, 2009 и 2010г. Щамовете са

типизирани и са показали една и съща характеристика: SIT41, LAM7_TUR и VNTR профил: 244124132134425113333113 2. Фенотипно и генетично, резистентността е еволюирала по следния начин: през 2008 и 2009г. щамовете са резистентни към HRSE (мутация S531L в *rpoB* гена и мутация C15T в *inhA* гена) и чувствителност към OFX, AMK, KAN и CAP. През 2010г. пациентката е доказана като XDR-TB – HRSE (мутация S531L в *rpoB* гена; мутация C15T в *inhA* гена; мутация M306I в *embB* гена) плюс резистентност към OFX, AMK, KAN и CAP (мутация D94G в *gyr A* гена плюс мутация A1401G в *rrs* гена). Пациентката е завършила летално през 2011г.

5. Жена; 17г.; регистриран с туберкулоза през 2006г. През 2008г. е доказана MDR-TB; с предходно протовотуберкулозно лечение, с терапевтична категория – повторно лечение след неуспех; с адресна регистрация в област Благоевград; с 3 изолирани MDR-TB щама, съответно през 2008, 2010 и 2011г. Щамовете са типизирани и са показали една и съща характеристика: SIT41, LAM7_TUR. Фенотипно и генетично, резистентността е еволюирала по следния начин: през 2008 щамът е бил резистентен само към първи ред т.е. HRSE (мутация S531L в *rpoB* гена и мутация C15T в *inhA* гена) и чувствителност към OFX, AMK, KAN и CAP. През 2010г. пациентката е доказана като XDR-TB – HRSE (мутация S531L в *rpoB* гена; мутация C15T в *inhA* гена; мутация M306I в *embB* гена) плюс резистентност към OFX, AMK, KAN и CAP (мутация D94G в *gyr A* гена плюс мутация A1401G в *rrs* гена). Със същата характеристика е бил и щамът, изолиран през 2011г., когато пациентката завършва летално.

6. Мъж; 21г.; през 2008г. е доказана MDR-TB; с терапевтична категория – нов (нелекуван) случай т.е. вероятно се е заразил с MDR-TB щам; с адресна регистрация в област Велико Търново; с 3 изолирани MDR-TB щама, съответно през 2008, 2010 и 2011г. Щамовете са типизирани и са показали

една и съща характеристика: SIT284, Ghana и VNTR профил: 212223132243223153234322. Фенотипно и генетично, резистентността е еволюирала по следния начин: през 2008 резистентността е само към първи ред: HRSE (мутация S531L в *rpoB* гена и мутация мутация S315T1в *katG* гена) и чувствителност към OFX, AMK, KAN и CAP. През 2010г. пациентът е доказан като XDR-TB – HRSE (мутация S531L в *rpoB* гена; мутация мутация S315T1в *katG* гена; мутация M306I в *embB* гена) плюс резистентност към OFX, AMK, KAN и CAP (мутация D94G в *gyr A* гена плюс мутация A1401G в *rrs* гена). Пациентът е завършил летално през 2011г., необезбацилен.

7. Мъж; 57г.; регистриран с туберкулоза през 2007г., през 2009г. е доказана MDR-TB; с предходно противотуберкулозно лечение, с терапевтична категория – повторно лечение след неуспех; с адресна регистрация в област Пловдив; с 2 изолирани MDR-TB щама, съответно през 2009 и 2011г. Щамовете са типизирани и са показали една и съща характеристика: SIT 53, Ghana и VNTR профил: 224253122342225153336522. Фенотипно и генетично, резистентността е еволюирала по следния начин: през 2009г. щамът е бил резистентен освен към първи ред т.е. HRSE (мутация S531L в *rpoB* гена и мутация C15T в *inhA* гена) и към OFX от втори ред, но с чувствителност към AMK, KAN и CAP. През 2011г. пациентът е доказан като XDR-TB – HRSE (мутация S531L в *rpoB* гена; мутация S315T1в *katG* гена; мутация M306I в *embB* гена) плюс резистентност към OFX, AMK, KAN и CAP (мутация D94G в *gyr A* гена и мутация A1401G в *rrs* гена). Пациентът е завършил летално през 2011г., необезбацилен.

8. Жена; 26г.; регистрирана с туберкулоза през 2010г., през 2011г. е доказана като MDR-TB; с предходно протовотуберкулозно лечение, с терапевтична категория – повторно лечение след прекъсване; с адресна регистрация в София област; с 2 изолирани MDR-TB щама, съответно през 2010 и 2011г.

Щамовете са типизирани и са показали една и съща характеристика: SIT 125, UgandaI и VNTR профил: 234335331144422515333922. Фенотипно и генетично, резистентността е еволюирала по следния начин: през 2010 щамът е бил резистентен само към първи ред т.е. HRE (мутация S531L в *rpoB* гена; ΔWT в *katG* гена и мутация M306I в *embB* гена) и чувствителен към OFX, AMK, KAN и CAP. През 2011г. пациентката развива допълнително резистентност към OFX, но остава чувствителна към AMK, KAN и CAP до 2011г., когато завършва летално.

9. Жена; 32г.; регистрирана с туберкулоза през 2003г., през 2006г. е доказана като MDR-TB; с предходно протовотуберкулозно лечение, с терапевтична категория – повторно лечение след прекъсване; с адресна регистрация в област Пловдив; с 3 изолирани MDR-TB щама, съответно през 2009, 2010 и 2011г. Щамовете са типизирани и са показали една и съща характеристика: SIT41, LAM7_TUR и VNTR профил: 244124132134424113333113 2. Фенотипно и генетично, резистентността е еволюирала по следния начин: през 2009 щамът е бил резистентен освен към първи ред т.е. HRSE (мутация S531L в *rpoB* гена; и мутация C15T в *inhA* гена и M306I в *embB* гена) и към OFX (мутация A90V в *gyr A*). През 2010г. пациентката допълнително развива резистентност към AMK, KAN и CAP т.е. тя е доказана като XDR-TB. Изолираният през следващата година щам не се различава от този през 2010г.

Разглеждайки в динамика фенотипните и генетични промени в щамовете на тези девет MDR-TB пациенти, представихме детайлно характеристиката на еволюцията на резистентността, като в някои от случаите с развитие до XDR-TB.

По данни на Националната програма за превенция и контрол на туберкулозата в България, въз основа на индивидуални данни от регистрираните случаи с MDR-TB и получените резултати от НРЛ по туберкулоза, представени в

настоящия дисертационен труд, беше отбелязана тенденцията за покачване броя на случаите на MDR/XDR-TB на фона на бавното снижаване на общата заболяемост от туберкулоза. Това беше обяснено, както с подобряване микробиологичната диагностика, така и с пропуски в лечението в продължителната фаза. Тези пропуски са били резултат от не дотам стриктното директно наблюдавано лечение на приема на лекарствата, поради което е било допуснато прекъсване на лечението или неуспех от лечението. Отказът на някои болни да бъдат отделени от семействата им за продължително лечение на MDR/XDR-TB, също е представлявало допълнителна опасност от разпространение на инфекцията.

На практика, осъществените от нас фенотипни и молекулярно генетични методи допринесоха за бързото откриване и точното охарактеризиране на MDR/XDR-TB щамовете, главен бенифициент на което бяха самите пациенти.

V. РЕЗЮМЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ. ИЗВОДИ.

Разработената дисертация има изследователска и методична насоченост. Изпитахме и въведохме няколко метода, които да бъдат включени в рутинната практика за доказване на MDR/XDR-TB.

Въз основа на проведените от нас изследвания и получените резултати могат да се направят следните изводи:

1. Фенотипните методи остават златен стандарт в диагностиката на MDR/XDR-TB.
2. Изпитаните молекулярно генетични методи (LPA) за откриване на хромозомни мутации, асоциирани с MDR/XDR-TB са с много висока чуствителност и специфичност и са напълно сравними с фенотипните методи.
3. Прилагането на молекулярно генетични методи (LPA), предвид бързината и надежността на теста са изключително подходящи за търсене на MDR/XDR-TB сред рисковите групи.
4. Генотипното маркиране на MDR/XDR-TB може да даде яснота за трансмисията и да помогне в откриване на епидемична връзка между отделните случаи.
5. Поради факта, че MDR/XDR-TB са асоциирани с продължителна, скъпа и с много странични ефекти терапия, тяхното откриване и потвърждаване изисква тестове и методи, гарантиращи надежност и точност на изследванията.
6. Съчетаването на класически фенотипни с новите бързи молекулярно генетични методи и едно модерно генотипно маркиране максимално допринасят за цялостната характеристика на MDR/XDR-TB щамовете, главен бенифициент на което е туберкулозно болният.

VI. ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ, ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Научно-теоретични приноси:

1.1. За първи път бе определена фенотипната характеристика и географското разпространение на MDR-TB щамовете в страната за периода 2007-2011г., като резултатите ежегодно са докладвани в Националната програма за туберкулоза, респ. ECDC и СЗО.

1.2. За първи път Български MDR-TB щамове бяха изследвани чрез въведения от нас метод за определяне на лекарственна чувствителност към втори ред противотуберкулозни лекарства, като по този начин бяха диагностицирани и първите случаи на XDR-TB в страната.

1.3. Апробирахме новите за страната модерни молекулярни методи за линейна хибридизация, откриващи мутации в таргетни гени, асоциирани с резистентността на *M. tuberculosis* към първи и втори ред противотуберкулозни лекарства.

1.4. Направена беше цялостна генотипна характеристика на разпространените в България MDR-TB щамове, за периода 2007-2011г., свързвайки определен сполиготип с развитие на MDR-TB.

1.5. Получените от нас резултати са основа за формиране на базата данни за проследяване еволюцията на щамовете за в бъдеще, охарактеризирайки етиологичения агент на тези тежки форми на туберкулозата.

2. Научно-приложни приноси:

2.1. Въведохме алгоритъм при определяне на лекарствена чувствителност към първи и втори ред противотуберкулозни лекарства.

2.2. Чрез прилагането на модерна автоматизирана апаратура за нерадиометрично отчитане, въведохме този тип фенотипна методика,

сертифицирана от СЗО супранационална лаборатория, за първи и втори ред.

2.3. Създадена бе първата репрезентативна за страната банка от над 300 клинични туберкулозни изолата, съхранявани при необходимите условия, с оглед бъдещи проучвания.

2.4. Организирана беше действаща мрежа от микробиологични лаборатории за диагностика на туберкулозата в страната.

2.5. За първи път в страната беше въведена външна оценка на качеството на културелното изследване за туберкулоза и на теста за лекарсвена чувствителност към първи ред противотуберкулозни лекарства.

VII. ПРИЛОЖЕНИЯ:

Списък на научните публикации и участията в Български и международни научни форуми във връзка с дисертационния труд

1. А.Торосян, А. Панайотова, А. Гърова, **Е. Бачийска** и др., Директно обзервирана терапия – кратък курс/DOTS/ и лекарственна резистентност на туберкулозните микобактерии – едногодишен опит в Пловдивска област, 9-та Национална Конференция по белодробни Болести-декември, 1999, София.

2. Torossian, A. Panaiotova, **E. Bachiyska**. Study of drug-resistant tuberculosis in Plovdiv Region-Bulgaria-9-ERS Annual Congress- Madrid, Spain- oct, 1999, ERJ,14 1999, suppl 30, 402 s, P2665- A.

3. A.Torossian, A. Panaiotova, **E. Bachiyska**. Drug resistance and directly observed therapy short course (DOTS) in Plovdiv-region, Bulgaria-15 months experience-World Congress on Lung Health 10 ERS Annual Congress, Florence, Itally, Aug 30-Sep3, 2000, ERJ, 16, supll 31, 2000,12(263).

4. S. Panaiotov, **E. Bachiyska**, T.Kantardjiev. Species identification of mycobacteria by PCR-RFLP of the *rpoB* Gene. -Thessaloniki, Greece, Nov 22-24, 2001.

5. Ст. Панайотов, Т. Кантарджиев, **Е. Бачийска**. Методи за молекулярна идентификация и епидемиологично типизиране на микобактерийни щамове – 9 Конгрес на Българските микробиолози, 2002, Пловдив.

6. Ст. Панайотов, Т. Кантарджиев, **Е. Бачийска**, Молекулярна идентификация на атипични щамове от София, Пловдив, Пазарджик, 9 конгрес на Българските микробиолози, 2002, Пловдив.

7. **E. Bachiyska**, Current epidemiological situation and the organization of laboratory Services in Bulgaria, 3 European Workshop for Laboratory Managers, Warsaw, Poland, 2003.

8. **Е. Бачийска**, Наръчник за микробиологична диагностика на туберкулозата, 2005, ISBN 954- 321-183-3, 1-95.

9. **Е. Бачийска**, Ю. Атанасова, К. Иванова, МОТТ – ново предизвикателство пред микробиологичната диагностикана микобактериозите в страната, Инфектология, Supplement, том XLIV, 2007, 58-61.

10. **Е. Бачийска**, Кр. Бозов, Е. Бозова, Ю. Атанасова, А. Иванова, Д. Мерджанов, Oto Rhino Laringology, ISSN 1312-6997, година V, брой 3/ 2009, „Етиологично доказан случай на туберкулозен отит", 33-36.

11. E. Keuleyan, D. Popov, **E. Bachiyska**, T. Anakieva, Sh. Tete: Problems of Infectious and parasitic diseases, ISSN 0204-9155, volume 37, number 1/2009, Sofia – "Containment of tuberculosis in prisons – a key point of the global policy", 29-31.

12. С. Панайотов, Г. Иванова, **Е. Бачийска** 2009. Молекулярни методи за генотипиране на *Mycobacterium tuberculosis.* Съвременна медицина. 60, 5-6:140-147.

13. V. Valcheva, I. Mokrousov, S. Panaiotov, **E. Bachiyska**, T. Zozio, C. Sola, N. Markova, N. Rastogi. 2009. Controversial Dissemination Pattern of the Bulgaria-Specific M. tuberculosis Spoligotype ST125_BGR. 30th annual congress ESM, 5-8 July 2009, Porto, Portugal, p.80 PP-7.

14. S. Panaiotov, **E. Bachiyska**, N. Brankova, V. Levterova. 2009. Mycobacterium tuberculosis Beijing Genotype and Origins of the Bulgarians. 30th annual congress ESM, 5-8 July 2009, Porto, Portugal, p.81 PP-8.

15. С. Панайотов, **Е. Бачийска**, А. Кърчева, Н. Бранкова, В. Левтерова. Разпространени генотипове на *M. tuberculosis* в България, 7 Национален конгрес по клинична микробиология и инфектология на БАМ, 8-10 май 2009, В.Търново.

16. **Е. Бачийска**, Характеристика на туберкулозните щамове с множествена резистентност, разпространени в България, 7 Национален конгрес по клинична микробиология и инфектология на БАМ, 8-10 май 2009, В.Търново.

17. S. Panaiotov, **E. Bachiyska**, A. Ivanova, Y. Atanasova, N. Brankova, V. LevterovA. Molecular biodiversity of MDR-TB genotypes in Bulgaria. A three-year survey. 2010. 31st ESM congress, 4-7 July 2010, Bled Slovenia, PP-111, p.203.

18. S. Panaiotov, **E. Batchiiska**, V. Levterova, N. Brankova, S. Tafaj, V. Katalinic-Jankovic, M. Zolnir-Dovc, R. Durmaz, T. Kantardjiev. Evidences for scanty spread of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype in the Balkan Peninsula. ECCMID, 10-13 April 2010, Vienna, Austria, P2056, Clin. Microbiol. Infect. 16, Suppl. 2.

19. Stefan Panaiotov, Massimo Amicosante, Marc Govaerts, Patrick Butaye, **Elizabeta Bachiyska**, Nadia Brankova, Victoria Levterova, BSL3 and BSL 4 Agents, Epidemiolody, Microbiology, and Practical Guidelines, ISBN 978-3-527-31715-8, 2012,Germany, Wiley-Blackwell, Edited by Mandy Elschner, Sally Cutler, Manfred Weidmann and Patrick Butaye, Mycobacterium tuberculosis: Tuberculosis, 149-171.

20. Valcheva, Violeta; Mokrousov, Igor; Panaiotov, Stefan; **Bachiiska, Elizabeta**; Zozio, Thierry; Sola, Christophe; Markova, Nadya; Rastogi, Nalin. 2010. Bulgarian specificity and controversial phylogeography of Mycobacterium tuberculosis spoligotype ST125_BGR. FEMS Immunology & Medical Microbiology. 2010; 59, (1): 90–99, IF: 2.441.

21. Gomgnimbou MK, Abadia E, Zhang J, Refrégier G, Panaiotov S, **Bachiyska E**, Sola C, “Spoligoriftyping” a DPO-based direct-hybridization assay for TB control on a multianalyte microbead-based hybridization system, J Clin Microbiol, 2012 Jul 18, IF: 4.153 (2012).

22. Indra Bergval, Sarah Sengstake, Nadia Brankova, Viktoria Levterova, Edgar Abadía, Nino Tadumaze, Nino Bablishvili, Maka Akhalaia, Kiki Tuin, Anja

Schuitema, Stefan Panaiotov, **Elizabeta Bachiyska**, Todor Kantardjiev, Rina de Zwaan, Anita Schürch, Dick van Soolingen, Anja van‘t Hoog, Frank Cobelens, Rusudan Aspindzelashvili, Christophe Sola, Paul Klatser, Richard Anthony, Combined Species Identification, Genotyping, and Drug Resistance Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Cultures by MLPA on a Bead-Based Array, PLoS ONE 7(8): e43240. doi:10.1371/ PlosOne, IF: 4.092 (2011).

23. S. Panaiotov, **E. Bachiyska**, V. Levterova, N. Brankova, A. Ivanova, D. Merdjanov, Y. Atanasova, T. Kantardjiev. 2010. Limited evidences for spread of Mycobacterium tuberculosis ‘Beijing’ genotype in Bulgaria. Problems Infect. Parasit. Dis. 38:1:7-9.

24. **E. Bachiyska**, T. Kantardjiev, A. Ivanova, Y. Atanasova, D. Merdzhanov. 2010. Diagnosis of tuberculosis – 5 years experience after the establishment of the TB National Reference laboratory, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Problems Infect. Parasit. Dis. 38:1:4-6.

25. I. Bergval, S. Sengstake, **E. Bachiyska**, N. Brankova, K. Tankova, V. Levterova, A. Ivanova, Y. Atanasova, S. Yordanova, E. Abadía, C.Sola, M. Akhalaia, R. Aspindzelashvili, D. van Soolingen, R. M. Anthony, T. Kantardjiev, S.Panaiotov, Evaluation of a new molecular test for the identification of drug resistance in mycobacterium tuberculosis clinical isolates, Probl. Inf. Parasit. Dis., vol.38, 2010, 2.

26. В. Миланов, М. Замфирова, Т. Върлева, **Е. Бачийска**, А. Колева, А. Янева, Епидемиолоична и микробиологична характеристика на случаите с мултирезистентна туберкулоза в република България, регистрирани и съобщени за периода 2007 – 2009г., Торакална медицина, Том III 2011, брой 4, ISSN1313-9827,16-22

27. Кантарджиев Т., Ст. Панайотов, **Ел. Бачийска**, Съвременна диагностика на туберкулозата и методи на епидемиологично маркиране, Превантивна медицина, ISSN:1314-5681, бр.1/2012, 56-58.

28. **Бачийска Е**., С. Манев, Ю. Атанасова, С. Йорданова, Т. Кантарджиев, Етиологично доказан случай на генитална туберкулоза, Акушерство и гинекология, ISSN 0324-0959, Брой 5, 2012, Volume 51, 54 -57.

29. **Елизабета Бачийска**, Юлияна Атанасова, Станислава Йорданова, Ана Байкова, Тодор Кантарджиев, Микробиологична диагностика на респираторните микобактериози в България, *In Spiro*, бр. 4, декември 2012, ISSN 1313-4329, стр.6.

30. **Е. Бачийска**, С. Йорданова, Ю. Атанасова, А. Байкова, Т. Кантарджиев, Фенотипна и генетична характеристика на туберкулозните щамове, причинители на мултирезистентната туберкулоза в България през 2011г., *In Spiro*, бр. 1, март 2013, ISSN 1313-4329, 38-41.

Общ IF 10,686