

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

Greta Musteikienė

**VEIKSNIŲ, SUSIJUSIŲ SU SKREPLIŲ
PASĖLIO KONVERSIJA, GYDANT
VAISTAMS JAUTRIĄ IR ATSPARIĄ
TUBERKULIOZĘ, TYRIMAS**

Daktaro disertacija
Medicinos ir sveikatos mokslai,
medicina (M 001)

Kaunas, 2022

Disertacija rengta 2015–2021 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Pulmonologijos klinikoje.

Mokslinis vadovas

prof. dr. Skaidrius Miliauskas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Konsultantė

prof. dr. Astra Vitkauskienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos medicinos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkė

prof. dr. Jūrate Macijauskienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Nariai:

prof. dr. Laura Malinauskienė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001);

prof. dr. Saulius Lukoševičius (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001);

prof. dr. Gediminas Jaruševičius (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001);

prof. dr. Mario C. Raviglione (Milano universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacija ginama viešajame Medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje 2022 m. birželio 10 d. 12 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės Kauno klinikų Didžiojoje auditorijoje.

Adresas: Eivenių g. 2, LT-50161 Kaunas, Lietuva.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES

Greta Musteikienė

**ANALYSIS OF FACTORS ASSOCIATED
WITH SPUTUM CULTURE CONVERSION
DURING TREATMENT OF
DRUG-SUSCEPTIBLE AND
DRUG-RESISTANT TUBERCULOSIS**

Doctoral Dissertation
Medical and Health Sciences,
Medicine (M 001)

Kaunas, 2022

The Dissertation has been prepared at the Department of Pulmonology of the Medical Academy of the Lithuanian University of Health Sciences during the period of 2015–2021.

Scientific Supervisor

Prof. Dr. Skaidrius Miliauskas (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

Consultant

Prof. Dr. Astra Vitkauskienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

The Dissertation is defended at the Medical Research Council of the Medical Academy of the Lithuanian University of Health Sciences:

Chairperson

Prof. Dr. Jūrate Macijauskienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

Members:

Prof. Dr. Laura Malinauskienė (Vilnius university, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001);

Prof. Dr. Saulius Lukoševičius (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001);

Prof. Dr. Gediminas Jaruševičius (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001);

Prof. Dr. Mario C. Raviglione (University of Milan, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

Dissertation will be defended at the open session of the Medical Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences on the 10th of June, 2022 at 12.00 PM in the Large Auditorium at the Hospital of Lithuanian University of Health Sciences Kauno klinikos.

Address: Eivenių 2, LT-50161 Kaunas, Lithuania.

TURINYS

SANTRUMPOS	7
ĮVADAS	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA	13
1.1. Tuberkuliozės epidemiologija	13
1.2. Tuberkuliozės diagnostika	14
1.3. Tuberkuliozės mikobakterijų jautrumo vaistams tyrimas	15
1.4. Tuberkuliozės mikobakterijų atsparumas naujiems vaistams nuo tuberkuliozės	16
1.5. Tuberkuliozės gydymas	18
1.6. Tuberkuliozės gydymo efektyvumo vertinimas	21
1.7. Biožymenys tuberkuliozės diagnostikoje ir tuberkuliozės gydymo efektyvumo vertinime	24
1.7.1. Tuberkuliozės mikobakterijos komponentai	24
1.7.2. Antikūnų atsakas į tuberkuliozės mikobakterijų antigenus	25
1.7.3. Ląstelinio imuniteto atsakas į tuberkuliozės mikobakterijos antigenus	26
1.7.4. Užkrėstojo biožymenys	30
1.7.4.1. Tirpus urokinazės tipo plazminogeno aktyvatoriaus receptorius	30
1.7.4.2. Tirpi tarpląstelinės adhezijos molekulė-1	31
1.7.4.3. C reaktyvusis baltymas	31
1.7.4.4. Kiti užkrėstojo biožymenys	32
1.7.5. Genomika, transkriptomika, proteomika, metabolomika	33
1.8. Tuberkuliozės gydymo išeitys ir jas įtakojantys veiksniai	33
2. METODAI	38
2.1. Tiriamųjų atrankos kriterijai	38
2.2. Tyrimo eiga	38
2.3. Tyrimų metodai	40
2.3.1. Gyvenimo kokybės vertinimas	40
2.3.2. Rūkyimo anamnezės įvertinimas	41
2.3.3. Krūtinės ląstos rentgenogramos vertinimas	41
2.3.4. Skreplių mikroskopija dėl rūgščiai atsparių bakterijų	41
2.3.5. Pasėlis dėl <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	42
2.3.6. Periferinio kraujo ištyrimas	43
2.4. Statistinė analizė	44
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	46
3.1. Tiriamųjų charakteristikos	46
3.2. Tuberkuliozės mikobakterijų atsparumas vaistams nuo tuberkuliozės ir atsparumo vaistams įtaka skreplių pasėlio konversijai	47
3.2.1. Rezultatų aptarimas	48
3.3. Skreplių pasėlio konversiją įtakojantys veiksniai	49
3.3.1. Skreplių pasėlio konversiją įtakojantys veiksniai gydant vaistams jautrią plaučių tuberkuliozę	49
3.3.2. Skreplių pasėlio konversiją įtakojantys veiksniai gydant daugeliui vaistų atsparią plaučių tuberkuliozę	54

3.3.3. Skreplių pasėlio konversiją įtakojantys veiksniai gydant plaučių tuberkuliozę	57
3.3.4. Rezultatų aptarimas	61
3.4. Uždegimo žymenų gydant jautrią ir atsparią vaistams tuberkuliozę sąsajos su skreplių pasėlio konversija	66
3.4.1. Rezultatų aptarimas	69
3.5. T limfocitų populiacijų sąsajos su tuberkuliozės gydymo išėjimais ir tuberkuliozės sukelta plaučių destrukcija	70
3.5.1. T limfocitų populiacijos ir tuberkuliozės gydymo išėjys	70
3.5.2. T limfocitų populiacijos ir skreplių pasėlio konversija	72
3.5.3. T limfocitų populiacijų ir tuberkuliozės sukeltos plaučių destrukcijos sąsajos	75
3.5.4. Rezultatų aptarimas	78
IŠVADOS	80
PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS	81
SUMMARY	82
LITERATŪRA	110
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	133
PUBLIKUOTI STRAIPSNIAI	134
PRIEDAI	161
CURRICULUM VITAE	169
PADĖKA	170

SANTRUMPOS

Ag 85	– antigeno 85 kompleksas
ATS	– (angl. <i>American Thoracic Society</i>) Amerikos krūtinės ląstos draugija
AUC	– (angl. <i>area under curve</i>) plotas po kreive
BCG vakcina	– <i>Bacillus Calmette–Guérin</i> vakcina
CD	– (angl. <i>cluster of differentiation</i>) diferenciacijos grupė
CFP-10	– (angl. <i>culture filtrate protein-10</i>) pasėlio filtrato baltymas
CRB	– C reaktyvusis baltymas
DNR	– deoksiribonukleorūgštis
DOTS	– (angl. <i>directly observed treatment strategy</i>) tiesiogiai stebimo gydymo strategija
DVA-TB	– daugeliui vaistų atspari tuberkuliozė (atspari mažiausiai dviem vaistams nuo tuberkuliozės – izoniazidui ir rifampicinui)
ECDC	– (angl. <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>) Europos ligų prevencijos ir kontrolės centras
ELISA	– (angl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>) imunofermentinė analizė
EMA	– (angl. <i>European Medicines Agency</i>) Europos vaistų agentūra
ERS	– (angl. <i>European Respiratory Society</i>) Europos respiratologų draugija
FDA	– (angl. <i>Food and drug administration</i>) Jungtinių Amerikos Valstijų Maisto ir vaistų administracija
ICAM-1	– (angl. <i>intercellular adhesion molecule-1</i>) tarpląstelinė adhezijos molekulė-1
IFN-γ	– interferonas gama
IQR	– (angl. <i>interquartile range</i>) interkvartilinis plotis
YVA-TB	– ypač vaistams atspari TB (atspari izoniazidui, rifampicinui, bent vienam fluorochinolonui ir bent vienam vaistui iš grupės A daugeliui vaistų atsparios tuberkuliozės gydymo schemeje)
JVT	– jautrumo vaistams tyrimai
KMI	– kūno masės indeksas
LAM	– lipoarabinomanas
LSMU	– Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
LSMUL KK	– Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninė Kauno klinikos
MSK	– (angl. <i>MIC – minimal inhibitory concentration</i>) minimali slopinamoji koncentracija

MMP-8	– matrikso metaloproteinazė-8
N	– tiriamųjų skaičius
NK	– natūralieji kileriai
p	– patikimumo lygmuo
PI	– pasikliautinasis intervalas
PPD	– (angl. <i>purified protein derivative</i>) išgrynintas tuberkulino baltymo derivatas
Pre-YVA-TB	– tuberkuliozė, sukelta <i>Mycobacterium tuberculosis</i> štamo, kuris yra atsparus rifampicinui, izoniazidui ir bet kuriam fluorochinolonui.
PSO	– Pasaulio sveikatos organizacija
RAB	– rūgščiai atsparios bakterijos
RA-TB	– rifampicinui atspari tuberkuliozė
RNR	– ribonukleino rūgštis
ROC	– (angl. <i>receiver operating characteristic</i>) sprendimus priimančiojo ypatybių kreivė
RR	– reliatyvi rizika
SGRQ	– (angl. <i>St. George Respiratory Questionnaire</i>) Šv. Jurgio ligoninės kvėpavimo klausimynas
sICAM-1	– (angl. <i>soluble intercellular adhesion molecule-1</i>) tirpi tarpląstelinė adhezijos molekulė-1
SN	– standartinis nuokrypis
suPAR	– (angl. <i>soluble urokinase-type plasminogen activator receptor</i>) tirpaus urokinazės tipo plazminogeno aktyvatoriaus receptorius
TB	– tuberkuliozė
TCM	– centriniai atminties T limfocitai
TEM	– efektoriniai atminties T limfocitai
TEMRA	– galutinai diferencijuoti T limfocitai
TM	– tuberkuliozės mikobakterija
TNF	– (angl. <i>tumor necrosis factor</i>) tumoro nekrozės faktorius
uPAR	– (angl. <i>urokinase-type plasminogen activator receptor</i>) urokinazės tipo plazminogeno aktyvatoriaus receptorius.
VCAM-1	– (angl. <i>vascular cell adhesion molecule-1</i>) kraujagyslinė adhezijos molekulė-1
VEGF	– (angl. <i>vascular endothelial growth factor</i>) kraujagyslių endotelio augimo veiksnys
ŽIV	– žmogaus imunodeficito virusas

ĮVADAS

Tuberkuliozė (TB) – infekcinė, uždegiminė liga, sukeliama mikobakterijų, priklausančių *Mycobacterium tuberculosis* kompleksui. TB įprastai yra lėtinė liga ir dažniausiai pažeidžia plaučius.

Remiantis Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) rekomendacijomis, siekiant pakankamos TB kontrolės, svarbu išgydyti bent 85 proc. naujų bakteriologiškai patvirtintų plaučių TB atvejų [1]. Įprastai vaistams jautri TB sėkmingai išgydoma per šešis mėnesius, tačiau nustačius atsparumą rifampicinui, vienam iš pačių efektyviausių vaistų nuo TB, gydymo trukmė ženkliai ilgėja, o pasveikimo tikimybė mažėja [2].

Daugeliui vaistų atspari TB (DVA-TB) – atspari mažiausiai dviem vaistams nuo tuberkuliozės – izoniazidui ir rifampicinui. Sergant DVA-TB, dėl efektyvių vaistų skirtų DVA-TB gydyti trūkumo pasveikimo tikimybė mažėja [3]. Taip pat išskiriama ypač vaistams atspari TB (YVA-TB). YVA-TB nustatoma tada, kai tuberkuliozės mikobakterijos (TM) atsparios izoniazidui, rifampicinui, bent vienam fluorochinolonui ir bent vienam kitam vaistui iš grupės A DVA-TB gydymo schemeje (bedakvilinui ar linezolidui). Lietuvoje bendra išgydytų DVA/YVA-TB atvejų dalis 2018–2020 metais tesiekė 43,1 proc. [4]. Taigi, atsparumas vaistams sąlygoja dažnesnes gydymo nesėkmes.

Remiantis ekspertų rekomendacijomis [5, 6], siekiant mažinti sergamumą TB, rekomenduojama: nustatyti socialinius ir ekonominius veiksnius, įtakančius TB plitimą; rinkti duomenis apie TB molekulinę epidemiologiją ir vykdyti atsparumo vaistams prevenciją; kuo anksčiau nustatyti TB diagnozę; skirti adekvatų gydymą; ieškoti naujų diagnostikos metodų ir naujų saugesnių, efektyvesnių ir trumpesnių gydymo režimų. Siekiant užkirsti kelią TB plitimui populiacijoje, svarbiausia nustatyti sergančiuosius TB, kurių skrepliuose randama TM. Šie žmonės yra epidemiologiškai pavojingi aplinkiniams, nes platina TM ir visame pasaulyje yra siekiama juos izoliuoti kol šis pavojus išlieka. Priklausomai nuo atskirų valstybių įstatymų ir gydymo rekomendacijų, pacientai, kurių skrepliuose randama TM, gali būti izoliuojami ligoninėje tol, kol išskiria į aplinką TM. Lietuvoje įprastai šie pacientai dažniausiai stacionarizuojami ir gydomi ligoninėje.

Remiantis Lietuvos pulmonologų ir alergologų, bei Lietuvos pulmonologų draugijų rekomendacijomis [7] rekomenduojama skreplių pasėlius dėl TM kartoti po dviejų gydymo mėnesių, vertinant skreplių pasėlio konversiją. Nors laikoma, kad skreplių pasėlio konversija po dviejų mėnesių gerai prognozuoja gydymo sėkmę [8, 9], 2 mėnesiai, kuriuos pacientas praleidžia izoliuotas ligoninėje, gali turėti ženklios įtakos paciento asmeniniam ir profesiniam gyvenimui. Gerai žinoma, kad TB yra ir socialinė problema, ne tik

dėl ilgo izoliacijos laiko, bet ir dėl socialinės stigmos [10], kurią jaučia TB sergantys pacientai ir jų šeimos nariai.

Vertinant TB gydymo efektyvumą iki šiol remiamasi klasikiniiais kriterijais – TM neradimu skrepliuose pabaigus gydymo kursą ir atkryčio nebuvimu per dvejus metus po gydymo užbaigimo [11]. Nors šie kriterijai buvo sėkmingai naudojami praeityje, būtų naudinga rasti labiau specifiskus biožymenis ligos prognozei, aktyvumui ir išplitimui, atsakui į skiriamą gydymą, atkryčio tikimybei bei gydymo pabaigai numatyti [8]. TB gydymas trunka ne mažiau kaip 6 mėnesius, tačiau jau yra duomenų, kad kai kuriems pacientams gali užtekti 2-3 mėnesių gydymo [6, 12]. TB gydymo trukmės sumažinimas – vienas didžiausių vykstančių tyrimų tikslas [13], todėl svarbu nustatyti biožymenis, kurie galėtų anksti prognozuoti TB gydymo sėkmę [12,14,15].

Darbo tikslas:

Įvertinti socialinių, laboratorinių ir kitų veiksnių galimą įtaką skreplių pasėlio konversijai gydant vaistams jautrią ir atsparią tuberkuliozę.

Darbo uždaviniai:

1. Įvertinti sąsajas tarp socialinių veiksnių, rūkymo, kūno masės indekso (KMI), gyvenimo kokybės ir skreplių pasėlio konversijos sergant vaistams jautria ir atsparia tuberkulioze.
2. Nustatyti tuberkuliozės mikobakterijų, pasižyminčių atsparumu vaistams nuo tuberkuliozės dažnį tarp tirtų pacientų, ir įvertinti atsparumo vaistams įtaką skreplių pasėlio konversijai.
3. Nustatyti ir įvertinti skreplių pasėlio konversijos sąsajas su tuberkuliozės išplitimu plaučiuose, rūgščiai atsparių bakterijų (RAB) kiekiu skrepliuose.
4. Nustatyti sergančiųjų tuberkulioze biocheminių ir imuninių žymenų (albumino, vitamino D, C reaktyviojo baltymo (CRB), tirpios tarpląstelinės adhezijos molekulės-1 (sICAM-1), tirpaus urokinazės tipo plazminogeno aktyvatoriaus receptoriaus (suPAR)) pokyčius ir įvertinti jų ryšį su skreplių pasėlio konversijos ypatumais taikant vaistams jautrios ir atsparios tuberkuliozės gydymą.
5. Nustatyti ir įvertinti T limfocitų populiacijų kraujyje ryšį su skreplių pasėlio konversija, tuberkuliozės sukkelto plaučių pažeidimo išplitimu ir tuberkuliozės gydymo išeitimis.

Mokslinis tyrimo naujumas

Skreplių pasėlio konversija klinikiniuose tyrimuose dažnai naudojama kaip mikrobiologinis rodiklis, turintis predikcinę vertę, siekiant anksti įvertinti TB gydymo rezultatus, monitoruoti gydymą [16]. Iki šiol nėra visiškai

aišku, nuo kokių veiksnių gali priklausyti skreplių pasėlio konversija, gydant TB. Remiantis pastaruoju metu atliktais tyrimais, skreplių pasėlio konversiją gali įtakoti rūkymo stažas [17], kavitacijos buvimas plaučiuose [18], KMI [19], prieš gydymą skreplių mikroskopijoje rastas RAB kiekis [20], vitamino D koncentracija [21], albumino koncentracija kraujyje [22], įvairūs socialiniai veiksniai [23]. Lietuvoje tyrimų šia tema iki šiol nepavyko rasti. Taip pat radome tik keletą pasaulyje publikuotų tyrimų vertinančių skreplių pasėlio konversiją įtakojančius veiksnius DVA-TB atveju. Pavieniai tyrimai tarp DVA-TB pacientų rodo, kad DVA-TB atveju, skreplių pasėlio konversiją gali įtakoti kiti veiksniai nei jautrios vaistams TB atveju: skystis pleuros ertmėje [24], prieštuberkuliozinių medikamentų kiekis naudojamas DVA-TB gydyti [25, 26], kartu esant cukriniam diabetui – glikemijos kontrolės lygis [27].

Kaip galimus skreplių pasėlio konversiją įtakojančius veiksnius tyrėme ir kai kuriuos galimus biožymenis. Iki šiol nėra visuotinai priimto vieno biožymens, kuris leistų anksti numatyti TB gydymo išeitį. Toks biožymuo būtų didelis pasiekimas vykdant efektyvią TB kontrolę, klinikinius naujų prieštuberkuliozinių vaistų tyrimus, o atskiro paciento atveju tai leistų spręsti ar galima sutrumpinti gydymo laiką, lengviau monitoruoti gydymą ir anksti įtarti gydymo nesėkmę. Tinkamas TB biožymuo turėtų būti įvertinamas diagnozavus ligą ir leistų koreguoti gydymą bei prognozuoti gydymo išeitį.

Dalis galimų TB biožymenų, atspindinčių ligos sunkumą, tirti tik pacientams sergantiems vaistams jautria TB ir gauti rezultatai nebūtinai tiktų DVA-TB atveju [28]. Pavyzdžiui, nustatyta, kad DVA-TB metu, lyginant su vaistams jautria TB, yra mažesnis kai kurių limfocitų populiacijų kiekis [29], skirtingas Th1 citokininų kiekis [30]. Dėl šios priežasties svarbu vertinti tuos pačius biožymenis jautrios vaistams TB ir DVA-TB atveju [28].

Be įprastai klinikinėje praktikoje naudojamo CRB, tyrinėjami ir įvairūs imuniniai žymenys. Daugelis jų nėra specifiški TB ir jų praktinė nauda nėra pakankamai aiški. Siekiant panaudoti šiuos žymenis klinikinėje praktikoje, reikalingi tolimesni tyrimai, kurie apibrėžtų jų galimybes ir trūkumus. Atlikta nemažai tyrimų su ląstelių adhezijos molekulėmis, ypač tarpląstelinės adhezijos molekulėmis-1 (ICAM-1, *angl. intercellular adhesion molecule-1*). ICAM-1 daugiausiai ekspresuojamos endotelio ląstelėse. Tai leukocitų integrinų ligandai, dalyvaujantys ląstelių adhezijoje ir leukocitų riedėjime. Tirpi šios molekulės forma (*angl. soluble ICAM-1 – sICAM-1*) patenka į kraujotaką. Nustatyta, kad sergantiems plaučių TB, būtent sICAM-1 yra jautriausia iš ląstelių adhezijos molekulių, vertinant TB išplitimą: rastos sąsajos tarp jos koncentracijų kraujyje ir TB išplitimo [31, 32], radiologinių pokyčių, CRB koncentracijos kraujyje [31]. Taip pat yra duomenų, kad sICAM-1 gali būti naudojama siekiant diferencijuoti TB nuo kitų plaučių ligų [33]. Duomenų,

apibūdinčių šių molekulių sąsają su klinikiniais ar kitais gydymo efektyvumo kriterijais, kol kas nepakanka. Urokinazės tipo plazminogeno aktyvatoriaus receptoriaus (uPAR) daugiausiai ekspresuojamas makrofagų ir monocitų. UPAR yra susijęs su ląstelių adhezija ir judėjimu. Tirpios šio receptoriaus formos – suPAR (angl. *soluble urokinase-type plasminogen activator receptor*) koncentracija serume padidėja pacientams, kuriems nustatyta aktyvi TB, randamos sąsajos su mikobakterijų kiekiu skrepliuose [34]. SuPAR koncentracija mažėja skiriant prieštuberkuliozinį gydymą, nustatytos sąsajos su TB sukeltu plaučių pažeidimu [35]. Aukštesnės suPAR žymens koncentracijos susietos su didesniu mirtingumu, esant TB [34]. Esant žmogaus imunodeficitinio viruso (ŽIV) ir TB koinfekcijai, vertinant letalios išėties tikimybę, suPAR koncentracija, kaip ir CD4 limfocitų kiekis, buvo susijusi su letalia išėjimu [36]. Kai kurių autorių duomenimis, didesnė suPAR koncentracija, didina riziką, kad bus nustatyta DVA-TB (siūlyta būtinai atlikti jautrumo vaistams tyrimus (JVT) kai suPAR >5 ng/ml [36]). Šio žymens naudai klinikinėje praktikoje patvirtinti reikalingi tolimesni, geriausia prospektyviniai, tyrimai [35].

Vieno biožymens naudojimas kol kas nepasiteisino, nes daugeliu atveju tiriamas žymuo nėra nei pakankamai jautrus, nei specifiškas diagnozuojant TB ir/ar vertinant gydymo efektyvumą. Ekspertai rekomenduoja naudoti ne vieną žymenį, o jų rinkinius, tačiau ir šios krypties tyrimų dar trūksta [8, 37].

Rentgeninis krūtinės ląstos tyrimas yra vienas iš kertinių diagnozuojant TB ir vertinant ligos sunkumą, tačiau nėra atlikta tyrimų, kurie vertintų radiologinio TB išplitimo sąsają su tirtais biožymenimis, T limfocitų populiacijomis.

Savo tyrime taip pat vertinome atsparumo vaistams nuo TB dažnį tarp tirtų pacientų. Tarp tirtų vaistų buvo ir naujai į TB gydymo rekomendacijas įtraukti medikamentai: bedakvilinas, klofaziminas, linezolidas. Tyrimų apie atsparumą šiems vaistams ir šio atsparumo įtaką skreplių konversijai, mūsų žiniomis, Lietuvoje neatlikta.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Tuberkuliozės epidemiologija

Manoma, kad per paskutinius 100 metų TB sąlygojo daugiau kaip 100 milijonų žmonių mirtį [38]. Pasaulyje TB yra viena iš dešimties dažniausių mirties priežasčių, sukeliama vieno infekcijos sukėlėjo [39]. Vien 2019 metais TB užsikrėtė apie 10 milijonų žmonių, nuo šios ligos mirė 1,4 milijono [39]. Remiantis PSO duomenimis, maždaug ketvirtadalis pasaulio žmonių yra infekuoti TB [40] ir jie sudaro natūralų šio patogeno rezervuarą [41].

Naujų TB atvejų skaičius pasaulyje mažėja maždaug 2 proc. per metus [39], kas nėra pakankama siekiant užsibrėžtų pasaulinės TB strategijos tikslų: nuo 2015 iki 2035 metų sumažinti mirties nuo TB atvejų skaičių 95 procentais ir sumažinti naujų TB atvejų skaičių 90 procentų [42].

Nepaisant taikomų infekcijos kontrolės priemonių, nacionalinių TB programų, tiesiogiai stebimo gydymo strategijos (DOTS, angl. *directly observed treatment strategy*), TB problema pasaulyje išlieka aktuali [6, 39], ypač dėl TB mikobakterijų, pasižyminčių atsparumu vaistams, atsiradimo bei TB plitimo ŽIV infekuotųjų tarpe [8]. DVA-TB PSO paskelbta visuomenės sveikatos krize [39]. Jau 1946–1947 metais, po streptomicino įvedimo TB gydymui, pastebėtas TM atsparumo vaistams vystymasis [43]. Įgytas TM atsparumas vaistams dažniausiai yra jatrogeninė komplikacija [44, 45] kuri sukelia dirbtinės atsparumą sąlygojančių mutacijų selekcijos *M. tuberculosis* genome skiriant netinkamą gydymą arba per anksti jį nutraukus [44, 46]. 2018 metais PSO Europos regione tiriant TM atsparumą vaistams, DVA-TB nustatyta 3,7 proc. tarp visų TB atvejų [4].

Lietuva priklauso 18 didelio prioriteto šalių PSO Europos regione [47] ir minima tarp šalių šiame regione nustatančių didžiausią DVA-TB dalį tarp visų šalies viduje nustatomų TB atvejų [48]. Tarp naujų TB atvejų Lietuvoje DVA-TB 2020 metais sudarė 12 proc. [49]. Nors nuo 2016 iki 2020 m. DVA-TB naujų atvejų sumažėjo beveik per pusę (nuo 115 iki 60 atvejų), DVA-TB dalis tarp visų naujų atvejų išlieka panaši (13 proc. – 2016 metais, 12 proc. – 2020 metais) [49]. Daugiau nei 55 proc. plaučių YVA-TB kasmet nuo 2014 iki 2017 buvo nustatoma dviejose PSO Europos regiono šalyse: Lietuvoje ir Rumunijoje [4]. 2019 metais šiose dviejose šalyse nustatyta 75 proc. iš visų regiono YVA-TB atvejų [50]. Paskutiniais duomenimis, Lietuvoje tarp visų DVA-TB atvejų, 36,3 proc. sudaro YVA-TB [51].

Kita problema, su kuria susiduria Lietuva, yra didelis pakartotinių TB atvejų skaičius. Pavyzdžiui, 2019 metais 17,3 proc. iš visų registruotų TB atvejų nustatyti jau anksčiau TB sirgusiems pacientams [52]. Didelė pakartotinių

atvejų dalis, PSO duomenimis, gali būti nulemta buvusios klinikinės gydymo nesėkmės, blogo gydymo režimo laikymosi ar galimos reinfekcijos [4].

1.2. Tuberkuliozės diagnostika

Aktyvios TB nustatymas remiasi klinikinių simptomų ir anamnezės įvertinimu, kartu su radiologiniais požymiais ir mikrobiologine diagnostika [53].

TB būdingi simptomai yra ilgiau kaip 2–3 savaites trunkantis kosulys su ar be skrepliavimo, neaiškios kilmės karščiavimas, prakaitavimas, svorio kritimas [54]. Kraujo atkosėjimas pasitaiko rečiau. Visgi vien dėl to, kad pacientas nejaučia simptomų aktyvios TB atmeti negalima, ypač tais atvejais kai TB serga imuniteto sutrikimų turintys asmenys [55].

Plaučių TB būdingi radiologiniai pokyčiai yra plaučių infiltracija viršutinėse skiltyse, ypač su irimo požymiais, greta esančiais židiniai; dauginiai įvairaus dydžio, vietomis susiliejęs židiniai; smulkių židinių sanaupa vienoje skiltyje; ertminiai, ypač storasieniai, dariniai. Tačiau krūtinės ląstos rentgenogramoje nerandant pokyčių, būdingų TB, tai plaučių TB taip pat nepaneigia [53].

Visi asmenys turintys TB būdingų simptomų, anamnezę ir rizikos veiksnių, turėtų būti tiriami dėl plaučių ir/ar ekstrapulmoninės TB [56]. Auksinis aktyvios TB diagnostikos standartas – TM išauginimas pasėlyje. Kai yra būdingų klinikinių ir radiologinių požymių, TB gali būti diagnozuota remiantis ir kitais metodais: ėminiuose genotipiniais (molekuliniiais) diagnostikos metodais patvirtinus TM arba esant būdingiems pokyčiams plaučių, pleuros, limfmazgio ar kito organo biopsinėje medžiagoje. Remiantis Europos Respiratologų draugijos (angl. *European Respiratory Society*, (ERS)) rekomendacijomis [56], visiems pacientams, kuriems įtariama plaučių TB ir kurie sugeba iškosėti skreplių, rekomenduojama iširti bent du skreplių ėminius mikroskopiškai ir vieną – atliekant greitą genotipinį tyrimą dėl TM. Esant galimybei, ERS rekomenduoja genotipinį TM tyrimą atlikti kuo anksčiau, idealiau atveju tą pačią dieną, kai nustatomas įtariamai TB sergantis pacientas [6].

Šiuo metu pasaulyje labiausiai prieinami genotipiniai metodai yra automatizuoti tikro laiko nukleininės rūgšties amplifikacijos metodai greitai TM ir rifampicino atsparumo diagnostikai (pavyzdžiui, *GeneXpert* platforma) ir atvirkštinės hibridizacijos su specifiniais žymenimis metodas TM ir atsparumo kai kuriems vaistams nustatymui [57]. Viso TM geno sekoskaita gali būti atliekama kai kuriose šalyse moksliniais tikslais, tačiau vis dar retai taikoma klinikinėje praktikoje. Genotipinių tyrimų rezultatai turi būti patvirtinami fenotipiniais (pasėlio auginimo) metodais [56]. Fenotipinei TM diagnostikai ypatingai svarbu gauti kokybišką ėminį, kad būtų užtikrinta tinkama mikrobiologinės diagnostikos kokybė [54]. To siekiama suteikiant pacientui aiškius

nurodymus kaip iškosėti skreplius, užtikrinant tinkamą ėminio surinkimą, laikymą, transportavimą ir tyrimų atlikimą.

1.3. Tuberkuliozės mikobakterijų jautrumo vaistams tyrimas

Savalaikis TM jautrumo vaistams ištyrimas ypač svarbus gydant sergantį TB. JVT rekomenduojama atlikti visiems naujiems pacientams prieš pradedant gydymą, ir kartoti, jei gydant naują TB atvejį, skrepliuose RAB randamos trečią, penktą ar vėlesnį gydymo mėnesį [53].

JVT atlikimo metodus galima suskirstyti į dvi pagrindines grupes: fenotipiniai metodai – jais sužinoma ar TM padermė auga po pasėjimo į terpę su pasirinktu vaistu nuo TB (atspari) arba jos augimas slopinamas (jautri); genotipiniai metodai – nustatomos TM specifinės genų mutacijos, susijusios su atsparumu tam tikriems vaistams nuo TB.

Fenotipiniai JVT gali būti atliekami standžiosiose ir skystosiose mitybinėse terpėse ir yra skirstomi į tiesioginius (koncentruotas ėminys tiesiogiai pasėjamas į terpę su vaistais ir be vaistų) ir netiesioginius (proporcijų, absoliučių koncentracijų ir atsparumo proporcijų metodai). Fenotipiniai JVT geriausiai patvirtina vaistams atsparią TB, bet jų atlikimo laikas ilgas (trumpiausiai – skystose terpėse 7–10 dienos, standžiose 2–4 savaitės), tikslumas įvairiems vaistams skirtingas. Fenotipiniais metodais tiksliausi rezultatai gaunami tiriant TM jautrumą rifampicinui ir izoniazidui, mažiau tikslūs – streptomycinui, etambutoliui ir pirazinamidui [53, 58, 59]. Fenotipiniai JVT II eilės vaistams skystojoje *Bactec MGIT* terpėje yra laikomi auksiniu standartu [53, 60], tačiau jie yra mažiau tikslūs nei I eilės vaistams. PSO ekspertai rekomenduoja atsparia TB sergantiems ligoniams fenotipiniais metodais tirti jautrumą aminoglikozidams (kanamicinui ir amikacinui), polipeptidams (kapreomicinui) ir fluorochinolonams (ofloksacinui, levofloksacinui, moksifloksacinui, gatifloksacinui). Įprastai fenotipinių JVT etionamidui, protionamidui, cikloserinui, terizidonui, paraaminosalicilinei rūgščiai, klofaziminui, amoksicilinui su klavulano rūgštimi, klaritromicinui, linezolidui, imipenemui, meropenemui, tiocetazonui atlikti nerekomenduojama, nes jie nėra standartizuoti ir laboratorijos negali užtikrinti šių tyrimų patikimumo ir atkartojamumo [53].

Genotipiniai JVT turi privalumą, prieš fenotipinius, nes juos atlikti galima greičiau. Vienas dažniausiai naudojamų tai *GeneXpert MTB/RIF* (Cepheid, Kalifornija, JAV) testas. Remiantis metaanalizių duomenimis neigiamos skreplių mikroskopijos atveju *Xpert MTB/RIF* turi 67 proc. jautrumą ir 99 proc. specifiškumą, teigiamos skreplių mikroskopijos ir pasėlio atveju – 98 proc. jautrumą TM nustatymui, o rifampicino atsparumo nustatymui – 95 proc. jautrumą ir 98 proc. specifiškumą [61]. Atsparumas rifampicinui nustatomas tiriant *rpoB* regioną, kuris koduoja ribonukleininės rūgšties (RNR) polimerazę.

žės subvienetą, kuriame randama daugiau nei 95 proc. mutacijų sąlygojančių atsparumą šiam vaistui [62]. Tik rifampicinui atsparios TB ar DVA-TB atveju, II eilės vaistų (fluorochinolonams ir leidžiamiesiems vaistams) jautrumui nustatyti, rekomenduojama naudoti molekulinį *GenoType MTBDRsl VER 2.0* (Hain Lifescience, Nehren, Vokietija) tyrimą. Jis sukurtas siekiant sutrumpinti antros eilės JVT atlikimą ir juo rezultatai galima gauti per 1–2 dienas [60]. Šio testo metu nustatomos mutacijos šiuose genuose: *gyrA* (atsparumas fluorochinolonams), *rrs* (atsparumas kanamicinui, amikacinui, kapreomicinui), *embB* (atsparumas etambutoliui) [60]. *GenoType MTBDRplus* (Hain Lifescience, Nehren, Vokietija) testo metu nustatomas atsparumas rifampicinui ir izoniazidui, tai yra šiuo tyrimu galima nustatyti DVA-TB. Jo metu atliekama polimerazės grandinės reakcija ir deoksiribonukleorūgšties (DNR) hibridizacija ir amplifikacija. Vertinamos trijų genų mutacijos: *rpoB*, *katG* ir *inhA*. *GenoType MTBDRplus* jautrumas rifampicino nustatymui 100 proc. specifiskumas 97,3 proc., izoniazidui – 91,9 proc. jautrumas, 98,4 proc. specifiskumas [63]. *GenoType* tyrimai, metaanalizės duomenimis, turi didelį jautrumą ir specifiskumą tiriant TM izoliatus iš grynų kultūrų: 95 proc. jautrumas, 100 proc. specifiskumas [64]. Tiriant tiesiogiai iš klinikinių ėminių, jautrumas varijuoja tarp 80–100 proc., specifiskumas išlieka 100 proc. [65]. Dėl didelio tyrimo jautrumo ir specifiskumo, rekomenduojama tirti tiesiogiai apdorotus skreplius arba TM kultūrą, tiek suaugusiems, tiek vaikams, nepriklausomai nuo to ar mikroskopiškai aptinkamos RAB. Visgi atkreipiamas dėmesys, kad šių tyrimų rezultatai yra tikslesni iš mikroskopiškai teigiamų skreplių [53]: atsparumo ofloksacinui ir amikacinui nustatymo jautrumas atitinkamai 90,7 ir 100 proc., specifiskumas 98,1 ir 99,4 proc. [66]. Atsparumą moksifloksacinui siūloma tirti fenotipiniais metodais [67].

TM atsparumas vaistams gali būti nustatomas ir įvairiais nekomerciniais fenotipiniais metodais, kurie yra alternatyvūs automatizuotiems standartizuotiems komerciniams metodams. Vis tik, šie tyrimai mažiau standartizuoti ir labiau priklauso nuo juos atliekančio personalo kvalifikacijos, todėl turėtų būti atliekami tik referentinėse centralizuotose laboratorijose [57].

1.4. Tuberkuliozės mikobakterijų atsparumas naujiems vaistams nuo tuberkuliozės

DVA-TB gydymui vartojami medikamentai dažniausiai yra mažiau efektyvūs ir labiau toksiški, negu naudojami jautrios vaistams TB gydymui [68], dėl to įprastai DVA-TB gydymui skiriamas gydymo kursas trunka gerokai ilgiau, be to yra susietas su sunkiais šalutiniais vaistų poveikiais. Nepaisant ilgos gydymo trukmės, tik 57 proc. DVA-TB pacientų pasaulyje pavyksta sėkmingai išgydyti [42].

2012 metais JAV Maisto ir vaistų administracija (angl. *Food and drug administration* (FDA)) patvirtino pirmą naują vaistą nuo TB per daugiau nei keturiasdešimt metų – bedakviliną. Maždaug po šešių mėnesių dar vienas naujas vaistas – delamanidas, buvo patvirtintas Europos vaistų agentūros (angl. *European Medicines Agency* (EMA)).

Bedakvilinas, yra adenozino trifosfato sintetazės inhibitorius, pirmas per daugelį metų įdiegtas naujas vaistas DVA-TB gydymui. 2012 metais patvirtinta šio vaisto indikacija buvo vartojimas kombinacijoje su kitais vaistais esant plaučių DVA-TB, kai kitaip negalima sudaryti efektyvaus gydymo režimo [69]. Bedakvilino patvirtinimas buvo svarbus žingsnis siekiant pagerinti DVA-TB gydymo išeitį [70].

Delamanidas ir dar vienas naujas vaistas pretomanidas (kuris buvo patvirtintas FDA 2019 metais YVA-TB ir nepasiduodančios gydymui DVA-TB gydymui) sutrikdo rūgščių, kurios yra mikobakterijos sienelės komponentai, biosintezę [71]. Abu šie medikamentai yra provaistai, kuriems reikia metabolinės kofaktoriaus F_{420} sukeltos aktyvacijos [72].

Klofaziminas – vaistas atrastas dvidešimto amžiaus viduryje ir naudotas raupsų gydymui [73], nuo 2016 metų PSO rekomenduojamas ir DVA-TB gydymui. Klofaziminas, kaip ir bedakvilinas, pažeidžia TM energijos metabolizmą [74]. Jis veikia kaip II tipo NADH dehidrogenazės substratas ir sukelia reaktyvaus deguonies susidarymą [74].

Linezolidas – antibiotikas atrastas paskutiniame praėjusio amžiaus dešimtmetyje ir klinikiniam naudojimui aprobuotas 2000 metais. Tai oksazolidinonas, naudojamas gramteigiamų bakterijų sukeltų infekcijų ir DVA-TB gydymui. Šis vaistas geba prisijungti prie TM tRNR ant 50S ribosomos subvieneto ir jį užblokuoti [75, 76]. Šiuo metu linezolidas PSO DVA-TB vaistų klasifikacijoje priskiriamas A grupės vaistams, tai yra, turėtų būti skiriamas DVA-TB gydymui visada, išskyrus atvejus, kai nustatomos kontraindikacijos šio vaisto skyrimui. Išgėrus, linezolidas greitai ir gerai pasisavinamas [77], gerai prasiskverbia į bronchoalveolinius audinius ir slopiną bakterijos baltymų sintezę [78].

Nepaisant to, kad naujieji vaistai TB gydymui pradėti naudoti dar palyginti neseniai, jau kyla problemų dėl jiems besivystančio atsparumo [79, 80], taip pat dėl kai kurių vaistų, pavyzdžiui, bedakvilino su klofaziminu [76], kryžminio atsparumo.

Pirmasis pacientas, užsikrėtęs bedakvilinui atsparia TB, nustatytas dar 2014 metais [81], tai yra praėjus vos dviems metams nuo PSO rekomendacijos bedakviliną naudoti TB gydymui. Pakistane bedakvilinas pradėtas naudoti 2015 metais, o pirmi šeši atvejai šiam vaistui atsparių TM nustatyti jau 2017–2018 [82]. Lietuvoje bedakvilinas naudoti pradėtas 2015–2016 metais. Pirmieji duomenys apie atsparumą naujesiems vaistams paskelbti tik

2021 metais [83] – Lietuvoje taip pat jau yra pacientų, kuriems nustatyta bedakvilinui atspari TB. Pirmosios mutacijos sąlygojusios TM atsparumą bedakvilinui nustatytos *atpE* gene [84, 85]. Literatūroje aprašoma keliolika *atpE* mutacijų, sukeliančių atsparumą šiam vaistui. Priklausomai nuo konkrečios mutacijos, minimali slopinamoji koncentracija (MSK) gali padidėti nuo 8 iki 133 kartų [76]. Šiuo metu jau žinoma, kad atsparumą bedakvilinui sąlygoja mutacijos *atpE*, *Rv0678*, *pepQ* (*Rv2535c*) ir *Rv1979c* genuose [86, 87]. Kryžminis atsparumas tarp bedakvilino ir klofazimino pasireiškia dėl mutacijų *Rv0678*, *pepQ*, *mmpR* [76, 79, 88]. Dėl kiekvienos mutacijos poveikio MSK gali padidėti 2–4 kartus abiemis vaistams [76]. Dėl kryžminių atsparumą sąlygojančių mutacijų, atsparumas bedakvilinui gali būti nustatomas ir tada jei pacientas šio vaisto dar nebuvo vartojęs ar buvo vartojęs tik klofaziminą [79]. Svarbus veiksnys, sąlygojantis atsparumo bedakvilinui vystymąsi, jį vartojantiems pacientams, yra ilgas bedakvilino skilimo pusperiodis – kai pacientas nutraukia gydymą, bedakvilino koncentracija jo organizme dar ilgą laiką būna padidėjusi [79].

Kaip jau minėta, atsparumas klofaziminui gali išsivystyti dėl mutacijų *mmpR*, *Rv0678* ir *pepQ* genuose [76, 88]. Taip pat, atsparumas klofaziminui gali atsirasti dėl mutacijos *Rv1979c* gene, kur atsparumo mechanizmas dar nėra aiškus [89]. MSK, esant šiai mutacijai, padidėja sąlyginai nedaug – iki 4 kartų [76].

Remiantis literatūros duomenimis, atsparumą linezolidui sąlygoja mutacijos šiuose genuose: *rplC* (genas koduoja 217 aa L3 ribosomos baltymą, MSK koncentracija didėja 4-32 kartus), *rrl* (MSK didėja 8-50 kartų) [76].

Iš viso aprašyta bent 12 skirtingų mutacijų *fgd1*, *fbiA*, *fbiB* ir *fbiC* genuose, kurios sukelia atsparumą delamanidui ir 106 – sukeliančios atsparumą preto-manidui [76].

1.5. Tuberkuliozės gydymas

Remiantis galiojančiu Lietuvos Respublikos sveikatos apsaugos ministro įsakymu (*Nr. V-2570, 2020-11-10*) [90], patvirtinus TB diagnozę, pacientas siunčiamas stacionariniam gydymui į TB gydymo paslaugas teikiančią asmens sveikatos priežiūros įstaigą ir gydymas pradamas stacionare, nebent yra atitinkamos sąlygos izoliuotis namuose ir maža gydymo režimo pažeidimų tikimybė. Gydant TB ir ambulatoriškai, ir stacionare taikomas tiesiogiai stebimas gydymas (DOTS strategija). Gydant TB siekiama šių tikslų: paskirti tinkamą gydymo režimą, atlikti kontaktų patikrą, užtikrinti gydymo režimo laikymąsi, stebėti ir dokumentuoti gydymo išėitis [56].

Visi pacientai, kuriems nustatyta jautri vaistams TB turėtų gauti rekomendacijų patvirtintą gydymo schemą, pirmus 2 mėnesius skiriant nustatytas ri-

fampicino, izoniazido, etambutolio ir pirazinamido dozes, vėliau, tęsimo fazėje, skiriant rifampiciną ir izoniazidą dar 4 mėnesius.

Nustačius atsparumą vienam ar keliems vaistams nuo TB gydymo režimas keičiasi. Lietuvoje, sveikatos apsaugos ministro įsakymu, patvirtintos gydymo schemas pateikiamos 1.5.1 lentelėje.

1.5.1 lentelė. *Gydymo schemas esant vienam ar keliems vaistams atspariai tuberkuliozei*

Atsparumas vaistui	Gydymo schema	Minimali gydymo trukmė, mėn.	Pastabos
H	RLfxZE	6	Nerekomenduojama papildomai skirti streptomicino ar kitų injekcinių vaistų nuo tuberkuliozės.
H ir E (±S*)	R, Z ir FQ*	9–12	FQ pridedamas esant išplitusiai plaučių tuberkuliozei
H, E, Z (±S)	R, FQ, protionamidas, antraeilis injekcinis vaistas pirmus 2–3 gydymo mėn. (±Z)	18	Esant išplitusiai plaučių tuberkuliozei, antraeiliai injekciniai vaistai skiriami 6 mėn. Pirazinamidas pridedamas, kai jautrumas jam nežinomas. Jei po 2 gydymo mėn. pasėlyje aptinkama TM, reikia pakartoti jautrumo tyrimus pirmaeiliams ir antraeiliams vaistams.

*S – streptomocinas; R – rifampicinas; Z – pirazinamidas; H – izoniazidas; E – etambutolis; Lfx – levofloksacinas; FQ – fluorochinolonas; TM – tuberkuliozės mikobakterijos.

Jei patvirtinta rifampicinui atspari TB (RA-TB), DVA-TB, YVA-TB, remiantis minėtu įsakymu, intensyvi gydymo fazė trunka 240 dienų. Jei baigiantis 240 dienų gydymui paciento tiriamojoje medžiagoje išlieka RAB ar TM, intensyvi gydymo fazė tęsiama po 90 dienų iki tol, kol paciento tiriamojoje medžiagoje nebus aptinkama RAB ar TM, arba bus konstatuojama gydymo nesėkmė. Jei konstatuojama gydymo nesėkmė, gydymas pradedamas iš naujo.

Gydymo schema ilgesniems DVA-TB, YVA-TB ir RA-TB gydymo režimams sudaroma iš vaistų nurodytų 1.5.2 lentelėje.

1.5.2 lentelė. Rifampicinui ir daugeliui vaistų atsparios tuberkuliozės gydymui vartojami vaistai

Grupė	Vaistas	Santrumpa
Grupė A Skiriami trys vaistai (nebent jų skirti negalima)	Levofloksacinas arba moksifloksacinas	Lfx arba Mfx
	Bedakvilinas	Bdq
	Linezolidas	Lzd
Grupė B Skiriami vienas arba du vaistai	Klofaziminas	Cfz
	Cikloserinas arba terizidonas	Cs arba Trd
Grupė C Skiriama, nesant galimybės sudaryti gydymo schemas iš A ir B grupių vaistų	Etambutolis	E
	Delamanidas	Dlm
	Pirazinamidas	Z
	Imipenemas-cilastatinas ¹ arba meropenemas ¹	Ipm-Cln arba Mpm
	Amikacinas	Am
	(Streptomocinas, kanamicinas, kapreomicinas) ²	(S, Km, Cm)
	Etionamidas arba protionamidas	Eto arba Pto
p-aminosalicilinė rūgštis	PASR	

¹ Amoksicilinas su klavulanine rūgštimi skiriami kartu su kiekviena Imp-Cln ar Mpm doze, tačiau nėra skaičiuojamas kaip atskiras vaistas ir neturėtų būti vartojamas kaip atskiras vaistas.

² Dėl Am, S, Km ir Cm skyrimo gali būti svarstoma, jei nustatomas TM jautrumas šiems vaistams bei gali būti užtikrintas aukštos kokybės audiologinio tyrimo atlikimas vertinant klausos sutrikimus. S, Km, Cm skiriami tik nustačius TM atsparumą Am ir esant išlikusiam TM jautrumui šiems vaistams.

DVA-TB gydymui skiriami 3 vaistai iš A grupės bei mažiausiai vienas vaistas iš B grupės. Nesant galimybės (dėl TM atsparumo ar vaistų netoleravimo, trūkumo) sudaryti gydymo schemas iš A ir B grupių vaistų, skiriami vaistai iš C grupės. Intensyvaus gydymo fazėje skiriami 4–5 vaistai, gydymo tęsimo fazėje – 3–4 vaistai.

PSO rekomendacijose [91] rekomenduojama viso gydymo trukmė DVA-TB atveju yra 18–20 mėnesių (ir 15–17 mėnesių po pasėlio konversijos). Gydymo trukmė gali būti koreguojama pagal paciento atsaką į gydymą. Intensyvioje gydymo fazėje rekomenduojama skirti bent 4 vaistus, tęsimo – bent

3. Skiriant amikaciną ar streptomyciną intensyvios fazės trukmė 6–7 mėnesiai [91].

Remiantis Amerikos krūtinės ląstos draugijos/Ligų kontrolės ir prevencijos centrų/Europos respiratologų draugijos/Amerikos infekcinių ligų draugijos 2019 metų rekomendacijomis [92] DVA-TB gydymas, nors sudaromas pagal tą pačią lentelę (1.5.2 lentelė), rekomenduojamas kiek didesnės apimties: režimas sudaromas iš 5 arba daugiau vaistų. Rekomenduojama skirti bent 5 vaistus intensyvioje fazėje, bent 4 tęsimo fazėje. Rekomenduojama gydymo trukmė taip pat ilgesnė: 15–21 mėnesių po pasėlio konversijos (YVA-TB atveju – 15–24 mėn po pasėlio konversijos). Lietuvoje patvirtintose rekomendacijose rekomenduojama intensyvioje gydymo fazėje skirti 4–5 vaistus, tęsimo – 3–4 [90].

Atsiradus naujiems vaistams nuo DVA-TB, tapo įmanomas naujų, trumpesnių gydymo schemų sudarymas [68]: prieš keletą metų aprašytas 9 mėnesių Bangladešo režimas [93] su klofaziminu, vėliau 6–9 mėnesių gydymo režimas, kurio metu naudojamas pretomanidas, aprašytas Nix TB tyrime [94]. Trumpesnio RA-TB ir DVA-TB gydymo schema pateikiama ir minėtame Lietuvos Respublikos sveikatos apsaugos ministro įsakyme [90]. 4 mėnesius (su galimybe pratęsti iki 6 mėnesių, jei po keturių mėnesių gydymo paciento skrepliuose lieka RAB) skiriami bedaklivinas, levofloksacinas arba moksifloksacinas, protionamidas, etambutolis, didelėmis dozėmis izoniazidas, pirazinamidas ir klofaziminas. Gydymas bedakvilinu tęsiamas iki 24 savaičių. Po pradinio 4–6 mėn. gydymo, gydymas tęsiamas dar 5 mėnesius skiriant levofloksaciną arba moksifloksaciną, etambutolį, pirazinamidą ir klofaziminą. Trumpesnis RA-TB ir DVA-TB gydymo režimas gali būti naudojamas: esant naujam TB atvejui, kai nustatytas TM atsparumas nei vienam iš pagal režimą naudojamų vaistų (išskyrus didelės dozės izoniazidą (10–15 mg/kg/d.)); kai pacientas antraeiliais vaistais TB gydyti gydytas ne ilgiau kaip 1 mėnesį. (arba nustatytas TM jautrumas šiems vaistams); kai TB neišplitusi, nėra sunkios ekstrapulmoninės TB formos; ne nėščioms pacientėms gydyti; pacientams nuo 6 metų amžiaus. Beveik identiškose rekomendacijose pateikiamos PSO rekomendacijose, tačiau jose vietoj protionamido rekomenduojama skirti etionamidą [91].

1.6. Tuberkuliozės gydymo efektyvumo vertinimas

TB gydymo vertinimas reikalingas tam, kad būtų palengvintas sprendimų dėl TB gydymo trukmės ir gydymo korekcijos priėmimas. Nepaisant ilgo gydymo, kai kuriems pacientams vaistų dozės gali būti nepakankamos, TM infekcija gali pasikartoti, gali būti didesnė DVA-TB rizika, reikalingas ilgesnis gydymas ar jo korekcija.

Šiuo metu klinikinėje praktikoje TB gydymo vertinimui dažniausiai naudojami mikrobiologiniai ir radiologiniai metodai. Skreplių pasėlis yra auksinis TB gydymo vertinimo standartas [95]. Jau įrodyta, kad skreplių pasėlio konversija yra naudinga vertinant TB gydymo efektyvumą [96]. TB gydymo vertinimas apibrėžiamas ir teisės aktais. Lietuvoje šiuo metu galiojantis sveikatos apsaugos ministro įsakymas [90] nurodo, kokie tyrimai turi būti paimami prieš pradėdant TB gydymą. Tarp jų: skreplių ar kitos medžiagos mikroskopija dėl RAB, pasėliai dėl TM standžioje ir skystoje terpėje, JVT pirmaeiliams vaistams nuo TB, krūtinės ląstos rentgenograma, CRB koncentracija. Vertinant gydymo efektyvumą, nurodoma intensyviosios gydymo fazės pabaigoje, po penkių ir po šešių gydymo mėnesių atlikti bakteriologinius tyrimus dėl TM (pasėlį bei mikroskopiją) bei krūtinės ląstos rentgenogramą. Esant vaistams atspariai TB, nurodoma bakteriologinius TM tyrimus kartoti kas 1 mėnesį intensyvios gydymo fazės metu. Krūtinės ląstos tiesines rentgenogramas rekomenduojama kartoti kas 3 mėnesius.

Genotipiniai tyrimai, naudingi ir greitai atliekami siekiant diagnozuoti TB, gydymo monitoravimui nebetinka – dėl savo savybės nustatyti TM DNR jie gali išlikti teigiami net ir tada kai paciento skrepliuose nebelieka gyvų TM [6, 97]. Šiuo metu ieškoma metodų, kaip molekuliniais testais atskirti kada ėminyje dar yra gyvų TM. Vienas iš siūlomų sprendimų – tirti ne bakterijų DNR, o RNR [6] arba paimtą ėminį prieš tyrimą paveikti medžiagomis, kurios suskaidytų laisvą mikobakterijų DNR [98]. Tokie tyrimai išties gali būti naudingi ateityje, tačiau jų įvedimas į kasdienę klinikinę praktiką gali būti brangus ir sudėtingas [6].

Skreplių mikroskopija ilgą laiką buvo naudota gydymo monitoravimui ir ankstyva skreplių mikroskopijos konversija iki šiol yra vienas iš sėkmingo TB gydymo požymių [99]. Skreplių mikroskopija išlieka naudingu tyrimu siekiant nustatyti gydymo nesėkmės galimybę ir naudojama sprendžiant dėl gydymo trukmės ilginimo. Vis tik, atliktuose tyrimuose nurodoma, kad skreplių mikroskopija po 2 gydymo mėnesių turi mažą jautrumą (34–80 proc.) [100] ir vidutinį specifiškumą vertinant gydymo nesėkmės ir recidyvo tikimybę [101].

Nurodoma, kad pasėlio konversija po 2 gydymo mėnesių prognozuoja sėkmingą gydymą be recidyvo ateityje (koreliacijos koeficientas $R^2 = 0,86$) [102]. Skreplių pasėlio konversija laikoma situacija, kai dviejuose iš eilės skreplių pasėliuose su 30 dienų pertrauka, nebeaptinkamos TM, kai pasėlyje prieš tai jos buvo aptiktos. Pasėlio konversijos laikas skaičiuojamas nuo pirmo neigiamo pasėlio [7]. Pasėlio konversija, kaip dabartinis gydymo efekto vertinimo standartas, naudojamas antros fazės klinikiniuose tyrimuose. Kai kurių tyrėjų nurodoma, kad pasėlio konversija – stiprus teigiamos gydymo išėities prediktorius [6], vis tik kitų autorių duomenimis, pasėlio konversija

po 2 gydymo mėnesių turi mažą jautrumą ir tik vidutinišką specifiškumą prognozuojant sėkmingą gydymą [101, 103, 104]. Vartojant kaip gydymo efektyvumo įrankį, pasėlio konversija turi dar keletą trūkumų. Visų pirma – ilgas pasėlio atsakymo laukimo laikas, taip pat kontaminacijos galimybė, skreplių iškosėjimo reikalingumas gydant plaučių TB. Pastarasis trūkumas ypač aktualus gydant vaikus ir pacientus, kuriems įprastai nustatoma TB su mažai bacilų skrepliuose, pavyzdžiui ŽIV infekuoti pacientai. Mikrobiologinių tyrimų atlikimas taip pat gali būti apsunkintas gydant ekstrapulmoninę TB, be to, net ir esant plaučių TB, skreplių kiekis ir kokybė mažėja gydymo eigoje, kas taip pat apsunkina ėminio paėmimą.

Dar vienas, dažnai klinikinėje praktikoje naudojamas tyrimas plaučių TB gydymo vertinimui, yra krūtinės ląstos rentgenograma. Tai taip pat yra ir pagrindinis radiologinis metodas TB diagnostikai ir patikrai [105]. Šis tyrimas, atliekant pakartotinai gydymo metu, gali pasitarnauti ir vertinant gydymo efektyvumą [6]. Šiam tikslui šiuo metu tyrinėjamai ir kiti radiologiniai metodai, pavyzdžiui, pozitronų emisinė tomografija – kompiuterinė tomografija [106].

Rečiau gydymo monitoravimui gali būti pasitelkiamas vaistų koncentracijos kraujyje matavimas. Tai gali būti naudinga įvairiose klinikinėse situacijose, pavyzdžiui, gydant pacientus, kuriems nustatoma didelė gydymo nesėkmės tikimybė, siekiant nustatyti optimalią vaisto dozę [107], esant nedidelio laipsnio atsparumui skiriamams vaistams nuo TB. Tačiau vis tik dar trūksta duomenų apie tai, kokios kai kurių vaistų koncentracijos turėtų būti laikomos optimaliomis [107].

Dėl visų išvardintų priežasčių, būtų naudinga rasti žymenį, galintį pakeisti klinikinėje praktikoje šiuo metu dažniausiai vartojamus mikrobiologinius gydymo efektyvumo žymenis [6, 108]. Patikimų žymenų trūkumas vertinant TB gydymo efektą trikdo ir naujų vaistų nuo TB tyrimus [109]. TB ekspertų siūloma vietoje žymenų iš skreplių tirti galimus žymenis iš kraujo [104, 109]: tai lengviau prieinama terpė ir nepriklauso nuo TB lokalizacijos (plaučių ar ekstrapulmoninė); be to suteikia galimybę tirti daugiau nei vieną žymenį vienu metu ir taip padidinti tyrimo patikimumą; šie tyrimai lengviau prijami pasaulio vietovėse, neturinčiose modernių laboratorijų. TB gydymo monitoravime tokie žymenis gali atlikti svarbų vaidmenį: įspėti apie recidyvo tikimybę, patvirtinti, kad gydymas efektyvus, pagerinti klinikinę prognozę [110], nustatyti ligos sunkumą ir išplitimą, būti krūtinės ląstos rentgenogramos alternatyva, būti naudingi klinikinuose tyrimuose skirstant pacientus į grupes pagal riziką [109], taip pat galėtų būti naudingi ne tik monitoruojant, bet ir diagnozuojant TB [110].

1.7. Biožymenys tuberkuliozės diagnostikoje ir tuberkuliozės gydymo efektyvumo vertinime

Siekiant pagerinti TB diagnostikos ir gydymo monitoravimo galimybes, įvairūs autoriai rekomenduoja tirti biožymenis, kurie, idealiu atveju, būtų nebrangūs, neinvazyvūs, jautrūs ir specifiški [8,110].

Biožymenys gali būti: TM komponentai; antikūniai, atsiradę kaip atsakas į TM antigenus; ląstelinio imuniteto atsako ląstelės; užkrėstojo biožymenys (angl. *host biomarkers*); „omikos“ (genomika, transkriptomika, proteomika, metabolomika) metodais nustatomi biožymenys.

1.7.1. Tuberkuliozės mikobakterijos komponentai

Kaip biožymenys TB gydymo vertinimui ir/ar diagnostikai tyrinėjami šie TM komponentai: lipoarabinomanas (LAM), mikolinės rūgštys, 30-35 kDa antigeno 85 kompleksas (Ag85A, Ag85B, ir Ag85c), ankstyvos sekrecijos antigeno taikins-6 (angl. *early secretory antigen target-6*), pasėlio filtrato baltymas (angl. *culture filtrate protein-10* (CFP-10)), PT64.

Vienas daugiausiai tyrinėtų TM komponentų – LAM. Tai vienas iš trijų pagrindinių lipopolisacharidų, sudarančių TM sienelę. LAM yra imunogeninis ir vienas pagrindinių TM virulentiškumo veiksnių, sąlygojančių TM išgyvenimą žmogaus organizme [108]. Iš trijų galimų LAM variantų, svarbiausiu laikomas su manoze susijungęs LAM (angl. *mannose-capped LAM*) – tai stipriai veikiantis priešūždegiminis antigenas ir svarbus TM virulentiškumo veiksnys. Jungdamasis prie dendritinių ląstelių ir makrofagų receptorių ManLAM sutrikdo dendritinių ląstelių brendimą ir fagocitinį aktyvumą, moduliuoja citokinų išskyrimą ir sukelia imuninių reakcijų slopinimą [111–114]. Esant TB infekcijai, LAM patenka į aplinkinius audinius ir iš metaboliškai aktyvių, ir iš žūstančių TM, cirkuliuoja kraujyje ir pereina per glomerulų bazinę membraną [108,115,116]. Šlapimas – lengviau nei skrepliai surenkamas diagnostinis ėminys ir ELISA (imunofermentinė analizė (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)) metodu LAM gali būti nustatomas TB sergančiųjų šlapime [115]. Yra ir klinikinių tyrimų, kurių metu LAM nustatinėtas plaučių TB sergančiųjų skrepliuose, tačiau tokių tyrimų kol kas nedaug [117]. Tyrėjų duomenimis, LAM koncentracija šlapime gali būti naudinga prognozuojant mirties tikimybę sergant TB [118]. Tyrimo atsakymo greitis priklauso nuo naudojamo testavimo būdo ir trunka nuo 20 minučių iki 6 valandų. Vis tik, PSO nerekomenduoja LAM tyrimo iš šlapimo TB diagnostikai, išskyrus tuos atvejus kai TB įtariama ŽIV infekuotam pacientui, kurio CD4 ląstelių skaičius yra $\leq 200/\mu\text{l}$ ar ŽIV infekuotam pacientui, kuris sunkiai serga, nepriklausomai nuo CD4 ląstelių skaičiaus, taip pat esant TB įtarimui pacientui

infekuotam ŽIV ir turinčiam TB simptomų [119]. Tiriant ne ŽIV infekuotus pacientus LAM tyrimo jautrumas labai mažas (kai kurių autorių duomenimis siekia tik 13 proc.) [108, 110].

Mikolinės rūgštys yra lipidinis TM sienelės komponentas. Jos prisideda prie TM sienelės struktūros palaikymo, apsaugo mikobakteriją nuo cheminio pažeidimo ar dehidratacijos ir leidžia jai saugiai augti makrofagų viduje [108]. Mikolinių rūgščių nustatoma įvairių tipų, labiausiai paplitusios – alfa-mikolatai [120]. Pastebėta, kad nuo mikolinių rūgščių variacijos TM sienelėje priklauso TM virulentiškumas ir fiziologija [108]. Šis TM komponentas tyrinėjamas kaip galimas TB biožymuo, tačiau kol kas šio žymens tyrimai apsiriboja paleopatologiniais tyrimais [121].

Antigeno 85 kompleksas (Ag 85) – vienas svarbiausių TM sekretuojamų antigenų, randamas ir TM sienelėje. Šis kompleksas sudarytas iš trijų atskirų baltymų – A, B ir C, kurie yra koduojami trijų genų *fbpA*, *fbpB* ir *fbpC2*. Biologiškai aktyviausias iš šių baltymų – C baltymas [122], tačiau visi trys Ag 85 baltymai geba jungtis prie žmogaus fibronektino, ekstraceliulinio matricos glikoproteino, dėl ko sumažėja makrofagų gebėjimas fagocituoti TM ir palengvėja TM diseminacija į kitus organus [123]. Šis antigeno kompleksas buvo nustatytas daugelyje TB sergančių pacientų biologinių ėminių, tarp jų kraujyje, šlapime, skrepliuose ir cerebrospinaliniame skystyje [124,125]. Vis tik šio Ag 85 tyrimo jautrumas įvairiuose klinikiniuose tyrimuose išsiskiria [110, 126, 127]. Ag 85, kaip TM biožymens, potencialas lieka neaiškus ir reikalauja tolimesnių tyrimų [108].

Kiti TM išskiriami baltymai taip pat tirti dėl galimybės juos naudoti diagnostikai: ESAT-6, CFP-10 ir PT64 [110]. Šių baltymų naudojimo diagnostikai jautrumas, įvairių autorių duomenimis, išsiskiria [110]. Vieno tyrimo metu bandyta naudoti visus šiuos baltymus, kas padidino diagnostikos jautrumą iki 90 procentų, tačiau specifiškumas TB išliko mažiau 30 proc. [128].

1.7.2 Antikūnų atsakas į tuberkuliozės mikobakterijų antigenus

Patogenams specifiški antikūnai yra gana dažnai naudojami ligų diagnostikoje, nes yra pakankamai lengvai atliekami ir dažniausiai nebrangūs tyrimai. Tačiau humoralinis imunitetas TB atveju yra ganėtinai neaktyvus, todėl kai kurie autoriai teigia, kad serologiniai TB testai diagnostikai, prognozei ir gydymo vertinimui nėra tinkami [110]. Vis tik, suprantama, kad TB infekcijos metu humoralinis imunitetas taip pat atlieka funkciją. B limfocitai randami TB granulomoje, taip pat stebimi B limfocitų kraujyje pokyčiai susiję su TB infekcija [129].

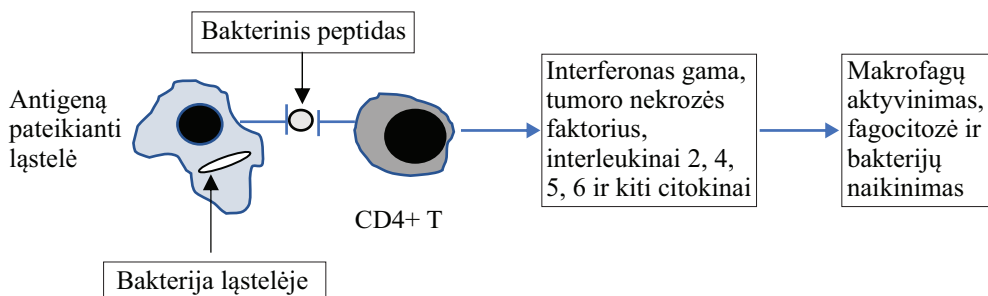
Iš TM specifiškų antikūnų detaliausiai aprašyti antikūnai prieš išgrynintą tuberkulino baltymo derivatą (PPD, angl. *purified protein derivative*), antige-

na 60, ESAT-6, CFP-10, lipidų kilmės antigenus, karščio šoko baltymą [110]. Deja, šių antikūnų tyrimai kol kas parodo tik ganėtinai mažą jų jautrumą (14–85 proc.) ir specifiškumą (53–98,7 proc.) [130–134].

Palyginti neseniai pradėti tirti antikūnai prieš kitus TM antigenus, tokius kaip *RV0310c-E* ir *RV1255c-E*. Sprendimus priimančiojo ypatybių kreivės (angl. *receiver operating characteristic*, ROC) analizės duomenimis, serumo IgG šiems antigenams jautrumas ir specifiškumas pralenkia ESAT-6 ir CFP-10 antikūnų tyrimų jautrumą ir specifiškumą [135]. Tiriant antikūnus prieš TM antigeną *P12037*, tyrimo jautrumas ir specifiškumas aktyviai TB nustatyti, naudojant kartu su tirpaus CD14 žymens nustatymu, yra atitinkamai 92 ir 91 proc. [136]. Yra duomenų, kad TM antigenų, tokių kaip pro-lino-prolino-glutaminės rūgšties baltymo 17 (angl. *proline-proline-glutamic acid protein 17*) [137] ir mikobakterinę DNR surišančio baltymo (angl. *mycobacterial DNA binding protein*) [138] antikūnai gali padėti diferencijuoti latentinę ir aktyvią TB.

1.7.3. Ląstelinio imuniteto atsakas į tuberkuliozės mikobakterijos antigenus

T limfocitai yra pagrindinis organizmo imuniteto prieš TM komponentas. Tinkamas jų funkcionavimas ir diferenciacija apsaugo organizmą nuo sunkios TB infekcijos, o esant jų trūkumui (ypač trūkstant CD4 limfocitų) yra ženkliai didesnė tikimybė ne tik pirminės TB išsivystymui (1.7.1 pav.), bet ir TB reaktyvacijai [139]. Nors anksčiau manyta, kad CD8 T limfocitai yra mažiau aktyvūs imuninėse reakcijose prieš TB, pastaruoju metu pripažįstama ir jų svarba [140].



1.7.1 pav. Mikroorganizmų sukeliama imuninio atsako schema esant viduląstelinėms bakterijoms [141]

Antigeno pristatymas T limfocitams indukuoja ląstelinį imuninį atsaką. Tai įvyksta praėjus 2-6 savaitėms po infekcijos TM. Manoma, kad toks uždelstas atsakas TB atveju yra dėl įvairių veiksnių, tokių kaip lėtas TM augimas, TM

inhibuojama infekuotų makrofagų ir neutrofilų apoptozė, sulėtėjusi dendritinių ląstelių migracija ir aktyvacija [142]. Pagrindinės ląstelinio imuniteto funkcijos TB metu yra citokinų produkcija ir tiesioginis antimikrobinis antigenui specifinių T limfocitų poveikis [142]. Ne taip kaip humoralinis, ląstelinio imuniteto atsakas į TM specifiskus antigenus gali pateikti nuoseklesnius atsakymus sprendžiant dėl TB gydymo efektyvumo ir ligos prognozės.

Aktyvios TB metu vyksta TM specifinio ląstelinio imuninio atsako slopinimas [143]. CD4+ T limfocitai ypatingai svarbūs pirminės TB infekcijos kontrolei, bei TB granulomos, iš kurios vyksta TB reaktyvacija, priežiūrai [144]. Su tinkama CD4+ limfocitų veikla susijęs imuninės sistemos sugebėjimas išlaikyti TB latentinėje fazėje [145], o CD4+ limfocitų funkcijos sutrikimas susijęs su pirminės aktyvios TB išsivystymu [146]. CD4+ T limfocitų svarba puikiai pademonstruojama ŽIV infekcijos atveju, kai dėl CD4+ limfocitų sumažėjimo TB reaktyvacijos galimybė padidėja nuo 5–10 proc. per gyvenimą iki 10 proc. per kiekvienių gyvenimo metus [147].

CD4+ T limfocitai sąveikauja su infekuotais makrofagais, kad sustabdytų viduląstelinę TM replikaciją, taigi imuninio atsako efektyvumas priklauso nuo antigenui specifinių CD4+ T limfocitų migracijos iš limfoidinio audinio į infekcijos vietą. Pastebėta, kad CD4+ T limfocitai, kurie sekretuoja IL-17 (Th17), ir FoxP3+ reguliatoriniai CD4+ T limfocitai prisideda prie atsako į TB infekciją, tačiau tikslus Th17 ląstelių vaidmuo infekcijos patogenezėje nėra iki galo aiškus. FoxP3+ CD4+ T limfocitai ar T reguliatoriniai limfocitai gali ir prisidėti prie TB infekcijos vystymosi, nes sulėtina CD4+ ir CD8+ T limfocitų klonų ekspansiją [148].

CD8+ T limfocitai yra vienas iš svarbiausių įgyto imuniteto dalyvių, kuris prisideda prie TB reaktyvacijos slopinimo [142]. Tyrimų su beždžionėmis metu pastebėta, kad CD8+ T limfocitų trūkumas veda prie to, kad susilpnėja apsauginis imunitetas po vakcinacijos nuo TB BCG (*Bacillus Calmette–Guérin*) vakcina [149]. Kaip ir CD4+ T limfocitai, CD8+ T limfocitai geba produkuoti IL-2, interferoną gama (IFN- γ) ir tumoro nekrozės faktorių (angl. *tumor necrosis factor*, TNF) – citokinus turinčius ypatingai svarbią funkciją TB infekcijos metu. Taip pat, CD8+ T limfocitai geba atlikti citolitinę funkciją ir nužudyti TM infekuotas ląsteles naudodami perforiną, granzimus ir granulizną ar Fas-Fas ligandų sąveiką indukuojančią apoptozę [140]. Pastebėta, kad skiriant pacientams anti TNF- α gydymą dėl kitų ligų, organizme sumažėja CD8+ T limfocitų, sekretuojančių granulizną ir ekspresuojančių ląstelių paviršiaus TNF [150]. Tai galėtų bent iš dalies paaiškinti kodėl skiriant anti TNF- α gydymą didėja rizika reaktyvuotis latentinei TB.

Pro-uždegiminis T limfocitų produkuojamas IFN- γ , aktyvuoja makrofagus. Klasikiniu atveju, nespecifinis imuninis atsakas infekcijos metu pakeičiamas antigenui specifiniu Th-1 IFN- γ atsaku [146]. IFN- γ yra kritiškai svar-

bus makrofagų aktyvacijos ir baktericidinių mechanizmų mediatorius [146]. Šis mechanizmas svarbiausias ankstyvoje infekcijos fazėje ir yra vienas iš svarbiausių veiksnių apsaugai nuo mikobakterinės infekcijos [142]. IFN- γ gali aktyvuoti infekuotas mieloidines ląsteles ir inhibuoti bakterijų replikaciją [142]. Kartu su kalcitrioliu (aktyviausiu vitamino D metabolitu) IFN- γ sukelia viduląstelinę TM žūtį [151].

Ląstelinio imuniteto atsako tyrimai dažniau naudojami ne pradinei TB diagnostikai, o gydymo monitoravimui. T limfocitų atsakas gali būti tiriamas remiantis interferono gama išskyrimo testais (pvz. *QuantiFERON TB Gold in-tube* ir *T-SPOT.TB*), tačiau šiais metodais dažniausiai nenustatoma statistškai reikšmingų skirtumų tarp tyrimų rezultatų prieš ir po TB gydymo [6, 152]. Tiksliesiems, ląstelinio imuniteto tyrimams, ląstelių kiekiui ir fenotipui nustatyti pasitelkiama tėkmės citometrija.

Tėkmės citometrija – galinga technologija, galinti daugiaparametriškai analizuoti individualių ląstelių charakteristikas heterogeninėse populiacijose. Šis tyrimo metodas plačiai naudojamas imunofenotipavimui, ląstelių skaičiavimui, genų raiškos analizei. Tėkmės citometrijos principas – analizės metu tūkstančiai ląstelių per sekundę teka pro lazerio spindulio apšviestą plotą ir šviesa, atspindėta kiekvienos ląstelės, registruojama ir analizuojama. Taip apskaičiuojamos ląstelių charakteristikos, tokios kaip dydis, kompleksiškas, fenotipas, būklė. TB kontekste, tėkmės citometrija vis dar naudojama tik mokslinių tyrimų tikslais, tačiau vis tik daugėja tyrimų, kurie rodo, kad tėkmės citometrija gali būti naudingas tyrimo metodas klinikinėje praktikoje. Jos metu galima įvertinti ląstelių skaičių produkuojančių atitinkamą citokiną ir fenotipinę diferenciaciją ir padaryti išvadas apie imuninį organizmo atsaką į TM. Dažniausiai šie tyrimai atliekami su antigenams specifiskais limfocitais [143].

Tyrimų duomenimis, TM specifiski CD4+ T limfocitų kiekis susijęs su TM antigenų/bacilų kiekiu organizme ir gali būti geras biožymuo gydymo monitoravimui [110]. CD4+ T limfocitų populiacija yra daug labiau heterogeniška nei manyta iki šiol, ir joje randama įvairių fenotipų, diferenciacijos fazių, funkcijų ir anatominių lokalizacijų [153]. Šie limfocitų skirtumai gali suteikti svarbios informacijos vertinant gydymo efektyvumą [154]. T limfocitų aktyvacijos ir diferenciacijos žymenys leidžia atskirti įvairias TB infekcijos fazes (ankstyvos, vėlyvos ir terminalinės diferenciacijos efektorinės ląstelės) [6].

Po infekcijos TM pirmiausia stimuliuoja Th1 tipo citokinų reakciją, kurią pradeda CD4+ T limfocitai. Pagrindiniai citokinai čia yra IFN- γ ir TNF- α , kurie aktyvuoja makrofagus. Po ekspozicijos antigenų CD4+ ir CD8+ T limfocitai pereina įvairaus laipsnio diferenciaciją. Iš naivių T limfocitų jie tampa centriniais atminties T limfocitais (TCM), kurie sekretuoja tik IL-2; efektoriniais atminties T limfocitais (TEM), kurie sekretuoja IFN- γ ir IL-2; ir ga-

lutinai diferencijuotais T limfocitais (TEMRA), kurie sekretuoja tik IFN- γ [143,155]. Remiantis šiais principais, atliekami tyrimai siekiant nustatyti funkcines T limfocitų charakteristikas, susijusias su TB ligos eiga. Pavyzdžiui, žemas antigenų lygis ir ilgalaikė imuninė kontrolė (po persirgtos TB ligos, BCG vakcinacijos ar esant latentinei TB infekcijai) susiję su imunologiniu profiliu, kuriame dominuoja TEM, sekretuojantys IFN- γ ir IL-2 bei TCM sekretuojantys IL-2. Tuo tarpu aktyvios TB metu daugiausia nustatoma tik IFN- γ sekretuojančių TEMRA ląstelių [156–159].

Naivūs CD4+ T limfocitai tipiška ekspresuoja CCR7, CD62L ir CD45RA, ir neekspresuoja CD45RO [160]. CCR7 ir CD62L susiję su T limfocitų migracija į antrinius limfinius organus ir sąveikauja su ligandais ant venulių endotelio [161]. CD45RA ir CD45RO svarbios T limfocitų receptoriaus signalo transdukcijai ir jų raiška apibrėžia skirtingus T limfocitų pogrupius [161]. Randama vis daugiau įrodymų, kad net ir naivūs T limfocitai turi visą spektrą fenotipų su skirtingomis savybėmis [153,162]. Palyginti neseniai pacientų sergančių TB kraujyje atrastas efektorinių/atminties CD4+ T limfocitų pogrupis su neklasikiniu į naivų panašiu T limfocitų fenotipu [163]. Tai limfocitų fenotipas apibrėžiamas CD45RO–, CD45RA+, CCR7+, CD62L+, CD27+. Šie limfocitai, kaip atsaką į TM antigenus, sugeba greitai sekretuoti įvairius citokinus (IFN- γ , TNF- α , IL-2) [163]. Po TB išgydymo, šių ląstelių kiekiai iš karto sumažėja, o jų kiekis didėja, organizme didėjant TM kiekiui [163].

PPD specifiški CD4+ T limfocitai, neturintys CD27 paviršiaus receptoriaus gana gerai tinka diferencijuoti tarp aktyvios ir latentinės TB infekcijos [6, 164]. CD27+ [165–168] ir TM specifiški CD4+ T limfocitai [110, 165] koreliuoja su TM antigeno ir bacilų kiekiu organizme ir gali būti geras biožymuo ligos progreso įvertinimui.

CD27 labiau ekspresuojamas naivių ir ankstyvos diferenciacijos efektorinių T limfocitų, tačiau mažiau ekspresuojamas vėlesnėse T limfocitų diferenciacijos stadijose, todėl tolimesnės diferenciacijos T limfocitai ekspresuoja mažą CD27 kiekį arba šio žymens iš viso neturi [169]. Taip pat buvo nustatyta, kad CD27– IFN- γ + CD4+ ląstelių dažnis stipriai koreliuoja su plaučių pažeidimo ir matrikso destrukcijos dydžiu [170] ir gali būti naudojama kaip geras prediktorius sėkmingam TB gydymui [171].

CD69 yra kostimuliuojantis receptorius ir ankstyvos aktyvacijos žymuo [172] ir didėjantys CD4+CD69+IFN- γ + T limfocitų kiekiai susiję su ankstyva aktyvia TB ar nesena TB infekcija [173].

CD38 – transmembraninis glikoproteinas, imuninės aktyvacijos žymuo. Aktyvios TB metu dažniau nustatoma CD38+CD27low (maža raiška), o latentinės TB – CD38+CD27high (didelė raiška) [174]. Nustatyta, kad CD38 ir HLA-DR raiška ant T limfocitų buvo ženkliai susilpnėjusi po 9 savaičių prieštuberkuliozinio gydymo ir šių žymenų raiškos mažėjimas buvo susijęs

su pasėlio konversija [174]. Didelė CD38, HLA-DR ir intraląstelinė Ki67 raiška *M. tuberculosis* specifėškuose CD4+ T limfocituose gali bŭti daug ŗadantis ankstyvos TB infekcijos bioŷymuo, jŷ raiškos maŷėjimas siejamas su teigiamu gydymo efektu [6].

Vis tik ne visiems pacientams ŗie ŷymenys bus naudingi – kai kuriems pacientams jie negali bŭti nustatomi dėl per maŷo T limfocitŷ atsako [175]. Reėiau, kaip TB bioŷymenys, tyrinėjami nespeciŗki TM T limfocitai. Pavyzdŷiui, tyrime atliktame Rodrigues et al. nurodoma, kad pacientams sergantiems TB nustatomas periferiniŷ CD4+ ir CD8+ T limfocitŷ sumaŷėjimas, kuris atsistato po sėkmingo gydymo [176].

1.7.4. Uŷkrėstojo bioŷymenys

Uŷkrėsto TM ŷmogaus organizmas gamina molekules, tokias kaip citokinai, ŷmios fazės baltymai, kiti baltymai kurie patenka į kraujŷ įvykus audiniŷ paŷaidai. Ŗios molekulės, nors nespeciŗškos TM, taip pat gali turėti reikŷmę aktyvios TB diagnostikai ir gydymo monitoravimui [177]. Daugumoje atliktŷ tyrimŷ ŗie bioŷymenys yra išmatuojami prieš gydymŷ, ankstyvoje gydymo fazėje bei paskutiniais TB gydymo mėnesiais. Priklausomai nuo tiriamos molekulės, tokiu bŭdu galima gauti ŷinių apie TM kiekį organizme, plauėiŷ paŷeidimo išplitimŷ ar gydymo prognozę.

1.7.4.1. Tirpus urokinazės tipo plazminogeno aktyvatoriaus receptorius

Tirpus urokinazės tipo plazminogeno aktyvatoriaus receptorius (angl. *soluble urokinase type plasminogen activator receptor* (suPAR)) tai tirpi membranos baltymo, randamo daugelyje imuninės sistemos, endotelio, lygiŷ raumenŷ ląsteliŷ, forma. SuPAR koncentracija kraujyje randama padidėjusi įvairiŷ ligŷ, taip pat ir infekciŷ metu, suPAR koncentracijos didėjimas ligos metu susietas su blogesne ligos prognoze [34, 178, 179]. SuPAR taip pat laikomas potencialiu TB bioŷymeniu [36]. SuPAR patenka į kraujotakŷ esant imuninės sistemos aktyvacijai. SuPAR koncentracija didėja ir didėjant amŷiui [178]. Įvairiŷ tyrimŷ duomenimis, normali suPAR koncentracija kraujyje sveikiems ŷmonėms laikoma 2–3 ng/ml, o kritinės bŷklės pacientams nustatoma 9–10 ng/ml [178, 180–182, 183].

Aktyvios TB metu suPAR koncentracija kraujyje randama padidėjusi, lyginant su TB neserganėiais asmenimis ir didŷiausia nustatoma tiems pacientams, kuriems skrepliŷ mikroskopijos metu randamas didŷiausias RAB kiekis [34]. Didesnės suPAR koncentracijos gydymo pradŷioje taip pat susietos su didesne mirties nuo TB tikimybe [184]. SuPAR koncentracija kraujyje maŷėja efektyvaus TB gydymo metu [185]. Taip pat yra duomenŷ, kad didesnė

suPAR koncentracija nustatoma esant DVA-TB [36], TB/ŽIV koinfekcijai [186]. Kita vertus, atliekant suPAR tyrimus vaikams, nepastebėta kad suPAR koncentracija serume mažėtų po dviejų TB gydymo mėnesių, taip pat nerasta ir suPAR sąsajos su vaikų amžiumi, mitybine būkle, radiologiniu TB išplitimu [187].

1.7.4.2. Tirpi tarpląstelinės adhezijos molekulė-1

Ląstelių adhezijos molekulės susietos su daugelio uždegiminių plaučių ligų patogenezė [31]. Intraląstelinės adhezijos molekulės (ang. *intercellular adhesion molecules* (ICAM)) priklauso imunoglobulinų superšeimai. Jos ekspresuojamos ant kraujagyslių endotelio ir dalyvauja įvairiuose ląstelių procesuose, įskaitant šeimininko-patogeno sąveiką [188].

ICAM-1 ekspresuojamas ant įvairių ląstelių, tame tarpe ir makrofagų [189]. Veikiant uždegiminiams citokinams ICAM-1 raiška ant ląstelių paviršiaus didėja, dėl to didėja ir leukocitų adhezija bei migracija pro endotelį [188]. Įvairių autorių duomenimis, tirpios šios molekulės formos (angl. *soluble intercellular adhesion molecule-1* (sICAM-1) gali būti serumo (ar bronchoalveolinio lavažo [190]) žymuo, leidžiantis įvertinti uždegiminį procesą granulomų ligų metu [31, 33, 109, 189]. Nustatyta, kad sICAM-1 koncentracija kraujo serume turi sąsajas su kavitacijos buvimu [109], TB išplitimu plaučiuose [33], TB ligos sunkumu [31, 188]. Aprašoma, kad sICAM-1 gali būti naudingas biožymuo vertinant TB gydymo efektyvumą [33, 188] bei gali padėti diferencijuoti TB nuo kitų plaučių ligų [33, 190].

Normali sICAM-1 koncentracija kraujyje suaugusiųjų populiacijoje aprašoma nevienodai: 60,2–218,4 ng/ml [194], 128,9–347,48 ng/ml [195], 197 ± 35 ng/ml [196], $276 \pm 87,3$ [197], iki 350 ng/ml [198].

1.7.4.3. C reaktyvusis baltymas

CRB yra jautrus ir specifiškas aktyvios uždegimo fazės žymuo [191]. CRB naudojimas TB gydymo monitoravimui ištyrinėtas gana plačiai ir šis biožymuo labai dažnai naudojamas klinikinėje praktikoje. CRB koreliuoja su TB gydymo efektyvumu, taip pat susijęs su TB ligos sunkumu [192, 193], bakterijų kiekiu organizme prieš skiriant prieštuberkuliozinį gydymą [109, 191], radiologiniais pažeidimais po 2 gydymo mėnesių [193]. Nustatyta stipri CRB sąsaja su pasėlio konversija po 8 TB gydymo savaičių [109], o CRB nesumažėjimas po dviejų gydymo savaičių susijęs su blogesne TB prognoze [191]. CRB siūloma naudoti vertinant TB eigą ir prognozę [191].

1.7.4.4. Kiti užkrėstojo biožymenys

Be mūsų pasirinktų sICAM-1, suPAR ir CRB, tyrinėjama ir aibė kitų užkrėstojo biožymenų: kraujagyslių endotelio augimo veiksnys (angl. *vascular endothelial growth factor*) ekspresuojamas epitelio ląstelių ir TM infekuotų makrofagų [199] (jo koncentracija aktyvios TB metu kraujyje nustatoma padidėjusi [199], o sėkmingai gydant mažėja [200]); interferonas gama (IFN- γ) (dažnai naudojamas tirti vakcinų nuo TB kandidatus [201], koncentracija mažėja TB gydymo eigoje [202]), serumo amiloido baltymas A1 (reikšmingai susijęs su kavernų buvimu prieš pradedant TB gydymą, su skreplių pasėlio konversija po 8 savaitių [109]), interleukinas-1 beta (turi sąsajas su RAB kiekiu skreplių mikroskopijoje, plaučių pažeidimo išplitimu, kavitacijos plaučiuose buvimu [109]), interleukinas-6 (koncentracija kraujo serume nustatoma padidėjusi esant aktyviai TB infekcijai [203, 204], turi sąsajas su RAB kiekiu skreplių mikroskopijoje, plaučių pažeidimo išplitimu ir mažėja esant efektyviam TB gydymui [109, 202]), interleukinas-15 (koncentracija kraujo serume nustatoma padidėjusi esant aktyviai TB infekcijai [205], sąsajos su dienų kiekiu, reikalingu TM augimui nustatyti skystoje MGIT terpėje [109]), pentraksinas-3 (angl. *pentraxin 3*) (koncentracija TB pacientams nustatoma padidėjusi lyginant su sveikais žmonėmis [206], sąsajos su RAB kiekiu skreplių mikroskopijoje bei plaučių pažeidimo išplitimu [109, 206]), IFN- γ sužadinamas baltymas 10 (koncentracija kraujyje ir šlapime randama padidėjusi pacientams sergantiems aktyvia TB [207], nustatoma didesnė esant didesniam TB išplitimui krūtinės ląstos rentgenogramose [109]), osteokalcinas (TB gydymo metu koncentracija kraujyje didėja [109]), matrikso metaloproteinazė-8 (susiję su gydymo efektyvumu, kavitacijos buvimu plaučiuose, pradiniu TM kiekiu organizme, TB ligos sunkumu [109]), indoleamino 2,3-dioksigenazė (padidėjęs aktyvumas siejamas su TB progresavimu ŽIV infekuotiems pacientams, koncentracijos kraujyje mažėjimas stebimas skiriant TB gydymą [208]), neopterinas (TB gydymo metu koncentracija mažėja [209]), alfa-defensinas (koncentracija mažėja skiriant TB gydymą [210]), matrikso metaloproteinazė-9, transformuojantis augimo faktorius β 1, III tipo prokolageno aminoterminalinis peptidas (kaip kandidatai TB gydymo efektyvumo vertinimui [6]), baltymai monocitų chemoatraktantai MCP-1, MPC-4 (koncentracijos didėja TB gydymo metu [109, 211]), neuralinių ląstelių adhezijos molekulė, feritinas, serumo amiloido P komponentas, audinių plazminogeno aktyvatorius, I-309, chemokinas MIG (kaip žymenys TB diagnostikai [212]) ir kiti.

1.7.5. Genomika, transkriptomika, proteomika, metabolomika

Genomika, transkriptomika, proteomika ir metabolomika yra metodai leidžiantys tirti tūkstančius galimų biožymenų [213]. Genomika tyrinėja genes DNR instrukcijas, transkriptomika – genų raiškos modelius, proteomika – baltyminių produktų dinamiką, o metabolomika – visą individualų metabolizmą tam tikros ligos atveju. TB atveju šie metodai praplėtė supratimą ligos patogenezėje ir geba pateikti labiau holistinį ligos mechanizmų vaizdą [110]. Vis daugiau aukščiau aprašytų užkrėstojo baltymų, kaip potencialūs biožymenys, tyrinėjami genomikos, transkriptomikos metodais [206, 214–216].

Vieno transkriptomikos tyrimo metu nustatytas 393 transkriptų raiškos profilis kraujyje charakterizuojantis aktyvią TB infekciją ir 86 transkriptų profilis, kuris leidžia atskirti TB nuo kitų infekcijų [110]. Citotoksinių ląstelių genų transkriptai taip pat gali būti naudojami gydymo pabaigoje, vertinant TB atkryčio tikimybę [217, 218].

Šio tipo tyrimų dar nėra daug, nes jų atlikimui įprastai reikia didelio finansinio kapitalo [110], o klinikinėje praktikoje juos kol kas pernelyg sudėtinga atlikti [219].

1.8. Tuberkuliozės gydymo išeitis ir jas įtakojantys veiksniai

PSO ir kitos pasaulinės organizacijos TB gydymo išeitis apibrėžia kaip sėkmingas (kai TB gydymas baigtas ir kai pacientas yra išgydomas) ir nesėkmingas (mirtis, gydymo nesėkmė, nutrauktas gydymas) [220, 221]. Išskiriamos tokios TB gydymo išeitys:

Pacientas išgydytas – jautrios vaistams TB atveju, pacientas, kuriam buvo rastos TM skrepliuose prieš gydymą, o po jo 5-ą ir 6-ą gydymo mėnesį TM skrepliuose neaptinkama [7]. Pagal PSO apibrėžimą, tinkantį ir DVA-TB atveju, išgydytu gali būti laikomas toks pacientas, kuriam gydymo pradžioje bakteriologiškai patvirtinta TB ir kuris pabaigė nacionalinių rekomendacijų apibrėžtą TB gydymą ir yra nustatomas bakteriologinis atsakas bei nėra gydymo nesėkmės įrodymo [220].

Gydymas baigtas – jautrios vaistams TB atveju tai pacientas baigęs visą gydymą kursą, tačiau neatitinka išgydyto TB atvejo kategorijos, nes trūksta 5-o ir 6-o gydymo mėnesio pasėlio tyrimo rezultatų [7]. Pagal PSO apibrėžimą, tinkantį ir DVA-TB atveju, šiai registracijos kategorijai priklauso pacientai, kurie pabaigė nacionalinių rekomendacijų apibrėžtą TB gydymą, tačiau neatitinka išgydymo ar gydymo nesėkmės apibrėžimo [220].

Gydymo nesėkmė – pacientas, kurio teigiami skreplių mikroskopijos arba pasėlio tyrimo rezultatai išlieka ar atsiranda 5-o gydymo mėnesio pabaigoje

arba vėliau. Šiai kategorijai priskiriami ir pacientai, kuriems diagnozuojama DVA-TB bet kuriame, anksčiau nustatytos vaistams jautrios TB, gydymo etape, nepriklausomai nuo teigiamų ar neigiamų mikroskopijos rezultatų [7]. Pagal PSO apibrėžimą, tinkantį ir DVA-TB atveju, šiai registracijos kategorijai priklauso pacientai, kuriems gydymas turėjo būti nutrauktas ar keistas į naują gydymo režimą [220].

Mirtis – pacientas mirė gydymo nuo TB metu, nepriklausomai nuo mirties priežasties [7, 220].

Prarastas atvejis (nutrauktas gydymas) – pacientas, kuris gydymą nutraukė 2 mėnesius ar ilgiau [7].

TB gydymo išeitys bei skreplių pasėlio konversija, remiantis atliktais tyrimais, priklauso nuo daugelio veiksnių. Dažniausiai aprašomas – TM atsparumas vaistams. DVA-TB pacientams visame pasaulyje maždaug du kartus dažniau nustatomos nesėkmingos gydymo išeitys, lyginant su jautria vaistams TB sergančiais pacientais [40]. Remiantis PSO pateikiama informacija, DVA-TB pasaulyje sėkmingai išgydoma 43,1 proc. atvejų (2016 metų duomenys), YVA-TB – 25,4 proc. [222]. Yra duomenų, kad DVA-TB gydymo išeitys susiję ir su konkrečių vaistų TB gydyti pasirinkimu. Geresnės gydymo išeitys stebėtos, jei DVA-TB gydymui naudotas linezolidas, levofloksacinas, karbapenemas, bedakvilinas, klofaziminas [223]. Tuo tarpu kanamicino ir kapreomicino naudojimas buvo susietas su blogesnėmis TB gydymo išeitimis [223]. Optimaliausias gydymo režimas DVA-TB gydymui, tyrimų duomenimis, buvo 5 efektyvūs vaistai intensyvioje gydymo fazėje ir 4 – gydymo tęsimo fazėje [223].

Kitas neabejotinai svarbus veiksnys – gydymo režimo laikymasis [224, 225], kuris priklauso nuo daugelio su pacientu susijusių ir nesusijusių veiksnių. Visame pasaulyje, gydant TB, rekomenduojama laikytis tiesiogiai stebimo gydymo strategijos principų (DOTS), kai pacientas vaistus nuo TB kasdien išgeria medicinos personalo priežiūroje. Tai nesunku vykdyti kol pacientas gydomas ligoninėje, tačiau ambulatorinio gydymo metu, DOTS susiduria su įvairiais iššūkiais, tarp kurių ir paciento motyvacijos gydytis trūkumas. Remiantis atliktais tyrimais, Etiopijoje, Brazilijoje, Zambijoje stebėta, kad gydymo išeitys ženkliai susiję su vietinėmis socioekonominėmis sąlygomis [226–228], o psichoemocinės ir socioekonominės intervencijos padedančios pacientams laikytis gydymo režimo susijusios su geresnėmis TB gydymo išeitimis [229]. Įvairios intervencijos papildomai motyvuojančios laikinuose DOTS kabinetuose dirbančią personalą, ambulatoriškai gydomus pacientus taikomos ir Lietuvoje (pavyzdžiui, kelionių į kabinetą apmokėjimas, kortelės, leidžiančios įsigyti maisto prekių).

Pasaulyje daugiau vyrų nei moterų suseraga TB ir nuo šios ligos miršta: 2017 metais beveik 6 mln. vyrų susirgo TB ir 840 000 mirė, lyginant su

3,2 mln. susirgusių moterų, iš kurių mirė beveik 0,5 mln. [230]. Taip pat pastebėta, kad vyrams dažniau nustatoma sunkesnė TB, kas siejama su kol kas pilnai nesuprastais biologiniais [231] ir socialiniais veiksniais [232]. Vyriška lytis susieta ir su lėtesne skreplių mikroskopijos konversija [233, 234] bei didesniu mirtingumu nuo TB [234, 235].

Vyresnio amžiaus pacientams dažniau nustatomos įvairios gretutinės ligos, taip pat dažnesni šalutiniai vaistų poveikiai [236]. Aprašyta, kad vyresnio amžiaus pacientams nustatoma lėtesnė skreplių pasėlio konversija [233]. Vyresnis amžius kai kurių autorių aprašytas kaip blogos gydymo išeities rizikos veiksnys [237–239], vis tik kiti autoriai tokių sąsajų neranda [238].

Alkoholio vartojimas priskiriamas prie penkių svarbiausių rizikos veiksnių ligų išsivystymui, invalidumui ir mirčiai [240]. TB atveju alkoholio vartojimas – pripažintas rizikos veiksnys ne tik TB išsivystymui, bet ir nesėkmingoms TB gydymo išeitims [241–243, 244]. Kai kurių autorių duomenimis, maždaug 10 proc. visų TB atvejų yra susiję su alkoholio vartojimu [245], 10–20 proc. visų mirčių nuo TB siejamos ir su alkoholio vartojimu [243]. Pasaulyje alkoholi vartojantys yra 15–70 proc. TB susirgusių pacientų [246–249]. Pacientai, sergantys vaistams jautria ar DVA-TB ir vartojantys alkoholį, turėjo ženkliai didesnę nesėkmingos gydymo išeities tikimybę: reliatyvi rizika (RR) 2,55, pasikliautinis intervalas (PI) 1,77–3,66 [244]. Vartojantys alkoholį, dažnai turi ir kitų gydymo sėkmę mažinančių rizikos veiksnių susijusių su elgesiu, pavyzdžiui, gydymo režimo nesilaikymas, gydymo nutraukimas (RR 1,87–2,25) [244, 250]. Aprašomos ir biologinės alkoholio vartojimo priežastys blogesnei TB prognozei, pavyzdžiui, alkoholio sukeliamas imuniteto slopinimas [139, 251, 252] hepatotoksiškumas [253], plaučių funkcijos sutrikimas, barjerinių organizmo funkcijų pažeidimas [244], keičiama prieš-tuberkuliozinių vaistų absorbcija virškinamajame trakte [254].

Pasyvus ir aktyvus tabako rūkymas, remiantis metaanalizių ir sisteminių apžvalgų duomenimis, nepalankiai susijęs su TB infekcija, aktyvia TB [255] ir TB sukelta mirtimi [256, 257, 258]. Rūkymas didina reliatyvią riziką susirgti TB 2–3,4 karto, palyginus su nerūkančiais [259, 260]. Cigarečių rūkymas prisideda prie TB išsivystymo [258] sukeldamas cilijų disfunkciją ir defektus imuninio atsako mechanizme, ypač makrofagų funkcijoje [261]. Rūkymas taip pat aprašomas kaip rizikos veiksnys blogoms TB gydymo išeitims [262, 263]. Rūkantiems lėčiau įvyksta skreplių mikroskopijos konversija gydymo metu [233]. Po to kai žmogus meta rūkyti, mirties nuo TB rizika ženkliai sumažėja (iki 65 proc. palyginus su teberūkančiais asmenimis) – tai parodo, kad rūkymo metimas yra svarbus veiksnys sumažinantis su TB susijusį mirtingumą [255, 264].

Gretutinės ligos taip pat gali sąlygoti blogesnes TB gydymo išeitis. Dažnai literatūroje analizuojama ŽIV ir TB koinfekcija. Metaanalizių ir atskirų tyri-

mų duomenimis, ŽIV infekuoti pacientai sergantys TB turi 1,41–2,46 karto didesnę riziką nesėkmingam TB gydymui, lyginant su ŽIV neinfekuotais TB sergančiais pacientais [265, 266]. Pacientai, sergantys cukriniu diabetu turi tris kartus didesnę riziką TB išsivystymui [267]. Taip pat nustatyta, kad TB ir cukriniu diabetu sergantiems pacientams vėliau įvyksta skreplių konversija [233], dažniau nustatoma gydymo nesėkmė [268, 269]. Šiems pacientams taipogi aprašyta maždaug 2 kartus didesnė mirties nuo TB tikimybė [268], didesnė TB recidyvo tikimybė [268].

Pacientams, sergantiems TB, dažniau nei bendroje populiacijoje nustatomas vitamino D deficitas [270]. Aprašoma, kad TB metu kinta vitamino D metabolizmas [271]. Yra duomenų, kad vitamino D skyrimas kartu su vaistais nuo TB gali pagreitinti skreplių pasėlio konversiją [272], tačiau, remiantis metaanalizių duomenimis, vitamino D skyrimas neturi įtakos mirtingumui nuo TB [272, 273].

Nepakankama mityba – rizikos veiksnys TB progresavimui iš latentinės iki aktyvios TB, ir šio veiksnio buvimas aktyvios TB diagnozavimo metu yra mirties ir TB recidyvo prediktorius [274]. Didesnis kaip 10 proc. kūno svorio netekimas laikomas predisponuojančiu veiksniumi TB išsivystymui [275]. Tačiau vis dar kyla klausimas kas atsiranda pirmiau – TB ar nepakankama mityba. Pastebėta, kad TB metu yra sumažėjęs pacientų apetitas, nustatoma makro ir mikro nutrientų malabsorbcija ir pakitęs metabolizmas, kas prisideda prie kacheksijos vystymosi [276]. Mažas KMI susijęs su mažesne INF- γ koncentracija kraujyje ir, tuo pačiu, su mažesne apsauga nuo TB reaktyvacijos [277]. Anksčiau atliktuose tyrimuose nustatyta, kad TB pacientai turintys per mažą KMI, turėjo labiau radiologiškai išplitusią plaučių TB, lyginant su tais, kurių KMI buvo didesnis, jiems ilgiau užtruko pasėlio konversija ir buvo didesnė gydymo nesėkmės ar mirties tikimybė [237, 278–281].

Pacientams, kuriems naujai nustatoma plaučių TB, taip pat dažniau nustatomas sumažėjęs albumino kiekis kraujyje, lyginant su sveikais žmonėmis [282]. Citokinai, cirkuliuojantys infekcijos metu, gali supresuoti albumino sintezę ir sumažinti albumino kiekį kraujyje, tačiau albumino gali būti mažiau ir dėl mitybos nepakankamumo, todėl sudėtinga vertinti albumino įtaką TB išėjimui neatsižvelgiant į KMI ir infekcijos aktyvumą [22]. Publikuotuose straipsniuose nurodoma, kad per žema albumino koncentracija kraujo serume TB pacientams buvo susieta su didesniu mirtingumu ligoninėje [283]. Pacientai, kuriems nustatyta hipoalbuminemija, taip pat buvo labiau linkę patirti TB gydymo nesėkmę [278, 279]. Hipoalbuminemija, kai kurių autorių vertinama kaip vienas iš veiksnių, sąlygojančių sunkesnę TB ligos eigą [279].

TB pacientams taip pat dažnai nustatomos pakitusios vitaminų A, E, D, geležies, cinko, seleno ir vario koncentracijos, kurios įprastai atsistato per 2 gydymo mėnesius [284]. Vieno tyrimo metu nustatyta, kad TM labai jautri

destrukcijai vitamino C indukuota Fentono reakcija, kas rodo galimą vitamino C naudą gydant TB [285].

Kitas svarbus veiksnys TB gydymo išėities prognozavimui – plaučių pažeidimo dydis. Plaučiuose radiologiškai nustatyta kavitacija, tyrimų duomenimis, prailgino laiką iki skreplių mikroskopijos ir pasėlio konversijos [225, 233, 286]. Laikas iki skreplių mikroskopijos ir pasėlio konversijos taip pat ilgėja tiems pacientams, kuriems, įvairiomis metodikomis, nustatoma radiologiškai išplitusi plaučių TB [233].

Didelis RAB kiekis skreplių mikroskopijoje prieš pradedant TB gydymą siejamas su ilgiau užtrukusia skreplių mikroskopijos ir pasėlio konversija [286].

Didelė dalis čia aprašytų veiksmų, galimai turinčių įtakos skreplių pasėlio konversijos įvykimui TB gydymo metu, buvo vertinami ir mūsų atliktame tyrime.

2. METODAI

Tyrimas vykdytas Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės Kauno klinikų (LSMUL KK) Pulmonologijos klinikoje, gavus Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimą (Nr. BE-2-11 2015.10.09) ir Valstybinės duomenų apsaugos inspekcijos leidimą (Nr. 2R-6540 (2.6-1.), 2015 m. lapkričio mėn. 10 d.).

Tyrimas buvo prospektyvinis, trukęs nuo 2015 m. balandžio 1 d iki 2020 m. gruodžio 31 dienos. Visi tyrime dalyvavę pacientai buvo tiriami ir gydomi LSMUL KK filiale Romainių tuberkuliozės ligoninėje ir LSMUL KK Pulmonologijos klinikoje.

Į tyrimą įtraukti tik informuoto asmens sutikimo formą pasirašę tiriamieji.

Atsparumas naujesiems vaistams nuo TB nustatytas klinikoje vykdyto tarptautinio tyrimo metu. Disertacijai naudoti šio tyrimo duomenis, leidimas buvo gautas.

2.1. Tiriamųjų atrankos kriterijai

Tyrime dalyvauti buvo prašoma visų pacientų, stacionarizuotų į Romainių tuberkuliozės ligoninę nuo 2016 metų balandžio mėnesio iki 2018 metų balandžio mėnesio, atitinkančių įtraukimo kriterijus ir neturinčių neįtraukimo kriterijų. Pacientai, kuriems nustatyta TB, buvo gydomi stacionare ne mažiau kaip 1 mėnesį užtikrinant tiesiogiai stebimą gydymą.

Tiriamieji turėjo atitikti šiuos kriterijus: vyrai ir moterys 18–90 metų amžiaus, kuriems skreplių mikroskopijos tyrimu įtarta ar skreplių pasėlio tyrimu, pirmą kartą gyvenime, patvirtinta plaučių TB.

Į tyrimą nebuvo įtraukiami pacientai, kuriems buvo nustatomi šie neįtraukimo kriterijai: nėščios ar krūtimi maitinančios moterys; autoimuninėmis ligomis sergantys asmenys; asmenys, kuriems 5 metų laikotarpyje buvo diagnozuota onkologinė liga; sergantys kitomis psichinėmis ar/ir vidaus organų ligomis ir būklėmis, kurios gali paveikti imuninių žymenų koncentracijas ar tyrėjo nuomone yra neįtraukimo kriterijus. Iš tyrimo buvo pašalinti pacientai, skreplių pasėlio metodu nustačius atipinę mikobakteriozę ar gydymo metu nustačius gretutines ligas, kurios aprašytos neįtraukimo kriterijuose.

2.2. Tyrimo eiga

Tiriamąjį dalyvavimą tyrime trukmė buvo vieneri metai arba iki gydymo pabaigos, jei nustatyta vaistams atspari TB. Jei tyrimo dalyviui skreplių mikroskopijos tyrimu įtarta ar skreplių pasėlio tyrimu patvirtinta plaučių TB:

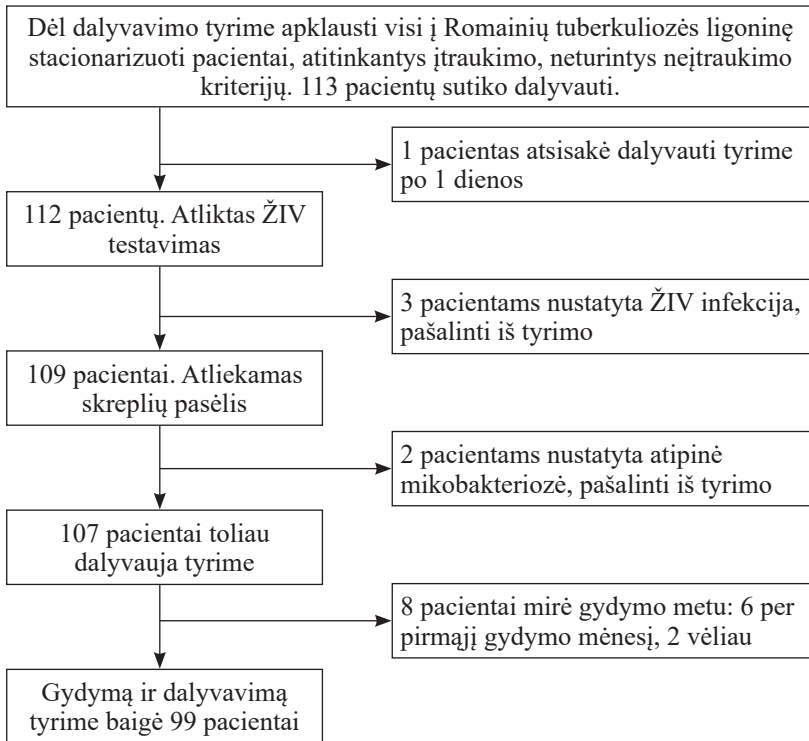
1. Po informuoto asmens sutikimo formos pasirašymo, prieš pradėdant gydymą pacientui buvo duota užpildyti Šv. Jurgio ligoninės kvėpavimo klausimyną (angl. *St. George Respiratory Questionnaire* (SGRQ)), patikslinta anamnezė įvertinant rūkymo, alkoholio vartojimo anamnezę, socialinius veiksnius (pilietybė, gyvenamoji vieta (miestas/kaimas/be nuolatinės gyvenamosios vietos), šeiminė padėtis, išsilavinimas, užsiėmimas (dirbantis/nedirbantis), lytis, amžius, narkotikų vartojimas anamnezėje), atlikta krūtinės ląstos rentgenograma, paimtas kraujas iš periferinės venos, ištiriant CRB, albumino, vitamino D koncentraciją. Taip pat paimtas periferinio kraujo tyrimas suPAR, sICAM-1 nustatymui imunofermentiniu (ELISA) metodu bei periferinių T limfocitų imunofenotipinei charakteristikai tėkmės citometrijos metodu nustatyti. Skrepliai sėti į skystą mitybinę terpę bakteriologiniam TB patvirtinimui ir atsparumo vaistams nustatymui. Buvo atliktas antikūnų prieš ŽIV1/ŽIV2 ir p24 antigenus tyrimas, pagal nacionalines rekomendacijas. Jei buvo patvirtinta ŽIV infekcija, pacientas pašalintas iš tyrimo.

2. Nustačius plaučių TB ir žinant jautrumą pirmos eilės vaistams nuo TB, arba dar laukiant TM atsparumo vaistams atsakymo, gydymas pradėdamas pagal jautrios vaistams TB gydymo schemą (2HREZ/4HR – pirmus dvejus mėnesius skiriami izoniazidas, rifampicinas, etambutolis, pirazinamidas, vėliau dar keturis mėnesius – izoniazidas ir rifampicinas). Jei gydymo metu gaunamas atsakymas, kad TM atspari vienam ar daugiau vaistų nuo TB, gydymas koreguojamas pagal nacionalines rekomendacijas. DVA-TB atveju skiriamas ilgesnis iš galimų gydymo režimų. Gydymo pradžia laikoma diena kuomet pacientui pirmą kartą paskirti vaistai nuo TB. Praėjus mėnesiui nuo gydymo pradžios kartota skreplių mikroskopija dėl RAB (du kartus, dvi dienas iš eilės), skreplių pasėlis dėl TM, paimamas kraujas iš periferinės venos ištiriant CRB koncentraciją. Taip pat periferinio kraujo tyrimas suPAR, sICAM-1 nustatymui ELISA metodu.

3. Praėjus penkiems mėnesiams nuo gydymo pradžios, vėl atlikta krūtinės ląstos rentgenograma, kartota skreplių mikroskopija dėl RAB ir pasėlis dėl TM, paimtas kraujas iš periferinės venos ištiriant CRB koncentraciją. Taip pat periferinio kraujo tyrimas suPAR, sICAM-1 nustatymui ELISA metodu bei periferinių T limfocitų imunofenotipinei charakteristikai tėkmės citometrijos metodu nustatyti.

4. Praėjus metams nuo gydymo pradžios susisiekiama su pacientu ar jo gydytoju, siekiant sužinoti gydymo išėtis. Jei pacientui buvo nustatyta vaistams atspari TB ir gydymas po metų dar nebuvo baigtas, gydymo išėtis įvertinta po TB gydymo užbaigimo. TB gydymo išėitys suskirstytos į dvi grupes pagal PSO pateikiamus apibrėžimus: sėkmingas gydymas (pasveikimas); nesėkmingas gydymas (mirtis, nutrauktas gydymas).

Pacientų įtraukimas parodytas schematiškai 2.2.1 paveiksle.



2.2.1 pav. Pacientų įtraukimo į tyrimą diagrama

2.3. Tyrimų metodai

2.3.1. Gyvenimo kokybės vertinimas

Gyvenimo kokybei vertinti vartotas šv. Jurgio ligoninės kvėpavimo klausimynas (kitur „šv. Džordžo ligoninės klausimynas apie kvėpavimo sutrikimus“, angl. *Saint George Respiratory Questionnaire (SGRQ)*). Tai standartizuotas klausimynas, skirtas matuoti sveikatos sutrikimą ir gyvenimo kokybę sergant kvėpavimo ligomis. Jis sukurtas siekiant lyginti sveikatos skirtumus tarp atskirų pacientų ir gyvenimo kokybės kitimus gydymo metu. Pradžioje SGRQ naudotas vertinti lėtine obstrukcine plaučių liga sergantiems pacientams, tačiau taip pat tirtas, validuotas ir naudojamas klinikiniuose tyrimuose su kitomis plaučių ligomis. Klausimyno metu, 76 klausimais vertinamas ligos simptomų išreikštumas, paciento aktyvumas ir ligos poveikis kasdieniam paciento gyvenimui. Klausimyną užpildyti trunka 8–15 minučių. SGRQ rezultatai reikšmingai koreliuoja su kitais ligos aktyvumo požymiais, tokiais kaip kosulys, dusulys, 6 minučių ėjimo testas ir forsuito iškvėpimo tūris per pirmąją sekundę.

Skaitinė SGRQ reikšmė apskaičiuota *MS Excel* programoje parengtu skaičiuotuvu. Apskaičiuojamas bendras rezultatas, taip pat atskirai simptomų, aktyvumo ir ligos poveikio rezultatai, kurie pateikiami skalėje nuo 0 (jokio pažeidimo) iki 100 (maksimalus gyvenimo kokybės pažeidimas). Mūsų tyrimo metu, gavus organizacijos leidimą, naudota Londono medicinos mokyklos Šv. Jurgio universiteto puslapyje pateikiama oficiali lietuviška klausimyno versija ir rezultatų skaičiuotuvus.

Pirmasis klausimyno klausimas, kur pacientai vertino savo bendrą sveikatos būklę nuo 1 (labai bloga) iki 5 (labai gera) rezultatuose pateiktas atskirai.

2.3.2. Rūkymo anamnezės įvertinimas

Rūkymo anamnezė vertinta pakmečių skaičiumi. Pakmečių skaičius suskaičiuotas remiantis paciento apklausa – surūkomas cigarečių pakelių skaičius per dieną padauginamas iš rūkymo metų skaičiaus, ir pateikiamas gauta skaitine išraiška.

2.3.3. Krūtinės ląstos rentgenogramos vertinimas

Atliktos krūtinės ląstos rentgenogramos vertintos pasinaudojant Anna P. Ralph ir kolegų aprašyta skale [287] (toliau – „krūtinės ląstos rentgenogramos skalė“). Vertinant skaitine reikšme (nuo 0 iki 140) išreiškiamas TB sukeltas plaučių pažeidimas. Kiekvienos rentgenogramos vertinimui atliekami tokie žingsniai: vertintojas padalina matomą plaučių atvaizdą rentgenogramoje į šešias, maždaug vienodo dydžio zonas dviem horizontaliomis linijomis. Tuomet vaizdas vertinamas nuo viršaus į apačią, lyginant kairę ir dešinę puses ir siekiant įvertinti kiek procentų matomo plaučių vaizdo kiekvienoje zonoje yra pažeista. Vertinama ar pažeidimas židininis ar homogeniškas. Jei židininis – gautas procentinis skaičius dauginamas iš 0,5, jei homogeniškas – iš 1. Jei rentgenogramoje stebima kavitacija, prie gauto skaičiaus pridedama 40. Vadinasi, skaitinė skalės reikšmė sudaroma pagal tokią formulę: TB pažeista plaučių dalis (proc.) + 40 (jei nustatoma kavitacija).

Ši skalė kitų tyrėjų jau buvo susieta su RAB radimu skrepliuose (kuo daugiau RAB, tuo didesnis rentgeno skalės įvertis) bei pasėlio konversija po 2 mėnesių [279]. Mūsų tyrime krūtinės ląstos rentgenogramų vertinimas atliktas patyrusios radiologės, kuri specializuojasi plaučių radiologijos vertinime (dr. Jurgita Zaveckienė).

2.3.4. Skreplių mikroskopija dėl rūgščiai atsparių bakterijų

Skreplių mikroskopija dėl RAB buvo atliekama dviem etapais, pagal Lietuvos sveikatos mokslų universiteto (LSMU) laboratorinės medicinos klini-

kos laboratorijoje patvirtintą metodiką: iš pradžių mėginys buvo dažomas fluorescencijos metodu, po to, jei mėginyje matomas būdingas švytėjimas – Cylio-Nielseno metodu. Rezultatai buvo pateikiami remiantis PSO/Tarptautinės sąjungos prieš tuberkuliozę ir plaučių ligas (angl. *International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*) pasiūlyta sistema: „pavieniai“ arba užrašomas rastų bakterijų kiekis (1–9 RAB peržiūrėjus 100 aliejaus imersijos regėjimo laukų); „1+“ (10–99 RAB 100 aliejaus imersijos regėjimo laukų); „2+“ (1–10 RAB viename aliejaus imersijos regėjimo lauke) ir „3+“ (>10 RAB viename aliejaus imersijos regėjimo lauke).

2.3.5. Pasėlis dėl *Mycobacterium tuberculosis*

Prieš atliekant tiriamosios medžiagos išsėjimą į terpę, ji buvo apdorojama, kad būtų sunaikinti nespecifiniai mikroorganizmai bei suskystintas pats mėginys. Mikobakterijų auginimui pasėlyje naudotos specifinės selektyvios standžiosios ir skystosios mitybinės terpės. Diagnozės nustatymo metu laboratorijoje naudotos skystos terpės, gydymo efektyvumo ir konversijos po 1 gydymo mėnesio įvertinimui – kietos terpės. Kaip jau minėta, skreplių pasėlio konversija laikoma situacija, kai dviejuose iš eilės skreplių pasėliuose, su 30 dienų pertrauka, nebeaptinkamos TM, kai pasėlyje prieš tai jos buvo aptiktos. Pasėlio konversijos laikas skaičiuojamas nuo pirmo neigiamo pasėlio laiko.

Į laboratoriją mėginys pristatomas *Falcon* steriliame mėgintuvėlyje per 2 valandas nuo surinkimo. Mėgintuvėlyje ėminys užpilamas NALC-NaOH tirpalu, po 15–20 min centrifuguojama. Centrifugatas nusiurbiamas, o nuosėdos sumaišomos su 1–2 ml buferio. Inokuliatas sėjamas į Levenšteino–Jenseno terpę (kieta terpė) arba į *BACTEC MGIT 960* (skysta terpė). Iš likusių nuosėdų ruošiamas tepinėlis RAB mikroskopijai. Pasėliai inkubuojami CO₂ inkubatoriuje 37 °C temperatūroje iki 8 savaičių (kieta terpė) arba 6 savaičių (skysta terpė). Esant augimui, iš gryno pasėlio ruošiamas tepinėlis mikroskopijai ir vertinami jo rezultatai. Atmetus bakterijų užteršimą pašaline terpe, jos identifikuojamos, nustatomas *M. tuberculosis* komplekso bakterijų jautrumas prieš tuberkulioziniams vaistams.

Jautrumas vaistams, mūsų tyrimo metu, buvo nustatomas fenotipiniais metodais. Jautrumas antros eilės prieš tuberkulioziniams vaistams buvo tiriamas tiems pacientams, kurių skreplių pasėliuose išaugo poli vaistams atsparūs ar daugeliui vaistų atsparūs TM izoliatai. Bedakvilino MSK buvo matuojama 7H11 agaro tirpalo ir 7H9 sultinio mikroskiedimo metodais, panaudojant specialiai pagamintas užšaldytas *Thermo Fisher* plokšteles ir laikantis gamintojo nurodymų. Kitų vaistų atvejais buvo taikomas tik 7H9 sultinio mikroskiedimo metodas, panaudojant specialiai pagamintas užšaldytas *Thermo Fisher*

plokšteles ir laikantis gamintojo nurodymų. Vaistai ir atskiedimo intervalai surašyti 2.3.5.1 lentelėje.

2.3.5.1 lentelė. *Vaistai ir skiedimų sultinio mikroskiedimo metodu intervalai*

Vaistas pavadinimas	Intervalas (µg/ml)	Kokybės kontrolės intervalas (µg/ml)
Bedakvilinas	0,008–4	0,015–0,06
Rifampicinas	0,06–4	0,03–0,25
Izoniazidas	0,03–16	0,03–0,12
Etambutolis	0,25–16	0,25–2
Ofloksacinas	0,12–8	0,25–2
Levofloksacinas	0,06–4	0,12–1
Moksifloksacinas	0,06–4	0,06–0,5
Kanamicinas	0,12–16	0,25–2
Amikacinas	0,12–16	0,25–2
Kapreomicinas	0,12–16	0,5–4
Linezolidas	0,12–8	0,25–2
Klofaziminas	0,015–4	0,03–0,25

2.3.6. Periferinio kraujo ištyrimas

Laboratoriniai tyrimai buvo atliekami LSMU laboratorinės medicinos klinikos laboratorijoje. Periferinis kraujas analizei buvo surenkamas į *BD Vacutainer K3EDTA* mėgintuvėlius (*BD, JAV*). CRB buvo nustatomas naudojantis klinikinės biochemijos sistema *Becman Coulter UniCel Dx C Synchron 800* (*JAV*). Normali CRB reikšmė – < 7,5 mg/l. Vitamino D tyrimo reikšmių rezultatai buvo suskirstyti šiais intervalais: < 50 nmol/l – vitamino D trūkumas, 51–69 nmol/l – nepakankamumas, 70–250 nmol/l optimalus vitamino D kiekis, > 250 nmol/l – intoksikacija. Albumino koncentracijos normos ribos – 35–48 g/l.

SuPAR ir sICAM-1 koncentracijoms nustatyti buvo naudojamas ELISA metodas (imunofermentinė analizė). Periferinis kraujas, surinktas į *BD* vaku-tainerį (*BD, JAV*) buvo centrifuguojamas 15 min 1600 apsisukimų per minutę greičiu. Atskirta plazma buvo saugoma –70 °C temperatūroje iki analizavimo. SuPAR buvo tiriama naudojantis komerciniu rinkiniu *Human suPAR* ELISA (*BioVendor – Laboratorní medicína, Čekija*) remiantis gamintojo pateiktomis instrukcijomis. Apatinė aptikimo riba buvo 5,1 pg/ml. sICAM-1 koncentracijos nustatymui serume buvo naudojami *RayBio Human sICAM-1* ELISA komerciniai rinkiniai (*RayBiotech, JAV*), kurių žemiausia nustatymo riba buvo 150 pg/ml. SuPAR norma, remiantis atliktais tyrimais, 2–3 ng/ml [178, 180–183]. Normali sICAM-1 koncentracija kraujyje suaugusiųjų populiacijoje, remiantis atliktais tyrimais, aprašoma nevienodai, todėl mūsų tyrimo

metu normos riba pasirinkta didžiausia iš aprašomų normalios koncentracijos ribų – 350 ng/ml [198].

Tiriant limfocitus tėkmės citometrijos metodu buvo taikyta tiesioginio dažymo metodika su ląstelių lizavimu ir plovimu (angl. *Stain Lyse Wash*). Veninio kraujo mėginiai buvo inkubuojami su fluorochromais žymėtais monokloniniais antikūnais prieš šiuos žmogaus ląstelių antigenus: CD3 (FITC, klonas UCHT1), CD4 (PE-CyTM7, klonas SK3), CD8 (APC-CyTM7, klonas SK1), CD45RA (PerCP-CyTM5.5, klonas HI100), CD27 (APC, klonas M-T271), CD38 (PE, klonas HIT2). Mėginiai buvo analizuoti naudojant *FACS Canto* tėkmės citometrą (*BD Immunocytometry Systems*, JAV). Duomenų analizei naudota *FACSDiva* programinė įranga (*Becton Dickinson*, JAV). T limfocitų populiacija buvo identifikuota ir jos santykinis dydis apskaičiuotas remiantis morfologinių savybių – ląstelių dydžio ir struktūriškumo, nustatytų pagal priekinę ir šoninę sklaidą, deriniu su CD3 raiška. Limfocitų populiacijų santykiniai dydžiai nustatyti vertinant populiacijai specifinių žymenų raišką, nurodant limfocitų populiacijos dydį procentais nuo T limfocitų populiacijos skaičiaus.

Analizės metu analizuotos šios populiacijos: CD4+CD45RA+CD27+ (naivūs); CD4+CD45RA-CD27+ (atminties); CD4+CD45RA+CD27-; CD4+CD45RA-CD27- (atminties/efektoriniai); CD8+CD45RA+CD27+ (naivūs); CD8+CD45RA-CD27+ (atminties); CD8+CD45RA+CD27- (citotoksiniai efektoriniai); CD8+CD45RA-CD27- (atminties/efektoriniai); CD8+CD38+CD3+ (aktyvuoti supresoriai/citotoksiniai); CD8+CD38-CD3+.

Absoliutūs T limfocitų ir jų populiacijų skaičiai apskaičiuoti naudojant bendrą limfocitų skaičių, nustatytą automatine hematologine sistema *Sysmex XE-5000* (*Sysmex Corporation*, Japonija), bei santykinės (procentinės) reikšmes, nustatytas tėkmės citometrijos metodu.

2.4. Statistinė analizė

Remiantis standartine baigtinės imties dydžio apskaičiavimo formule apskaičiuotas reikalingas imties tūris:

$$[(Z^2) \times (P) \times (1 - p) \div (e^2)] \div [1 + (Z^2) \times (P) \times (1 - p) \div (e^2) \times (N)],$$

kur:

N – tiriama populiacija sergančiųjų TB – 888

Z – 1,96

e – pasirinktas tikslumas – 5 proc.

P – populiacijos proporcija ar sergamumo veiksnys – 4 proc.

p – pasikliautinumo intervalas.

Reikalingas imties tūris – 55 tiriamieji. Imties tūris apskaičiuotas 5 proc. statistiniu reikšmingumu, esant 95 proc. pasikliautinumo intervalui.

Statistinė analizė atlikta naudojant *SPSS v.23.0 Statistical Package for the Social Sciences* (Čikaga, JAV).

Naudoti aprašomosios ir analitinės statistikos metodai. Duomenų normalumas buvo vertintas Kolmogorovo ir Smirnovu testu. Normalųjį skirstinį tenkinantys duomenys pateikti kaip vidurkis ir standartinė vidurkio paklaida, normaliojo skirstinio netenkinantys – kaip mediana ir interkvartilinis intervalas. Kategoriniai kintamieji buvo lyginti naudojantis Pearson χ^2 testu, tolydieji kintamieji – naudojant Mann-Whitney U testą. Koreliacijoms įvertinti – Spearman ranginės koreliacijos koeficientas. Dvireikšmė logistinė regresija naudota su dichotominiais kintamaisiais. Kai dvireikšmės logistinės regresijos metu vertinti tolydieji kintamieji, jie perkoduoti į dviejų reikšmių kintamąjį, medianą naudojant kaip ribą tarp dviejų reikšmių.

Rezultatai laikyti statistiškai reikšmingais, kai statistinis patikimumas (p) buvo $< 0,05$.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Tiriamųjų charakteristikos

Į tyrimą buvo įtraukti 113 pacientų. Penki iš jų vėliau iš tyrimo pašalinti (3 – nustatčius ŽIV infekciją; 2 – skreplių pasėlyje identifikavus atipines mikobakterijas). Vienas pacientas atsisakė toliau dalyvauti po pirmojo vizito dėl asmeninių priežasčių. Viso analizuoti 107 pacientai.

Viso ištirti 62 jautria vaistams TB sergantys pacientai, 31 DVA-TB sergantys pacientai (iš jų 17 DVA-TB, pre YVA-TB – 10, YVA-TB – 4), 14 mono- ar poli- atsparia vaistams TB, kuri nepriskiriama DVA-TB.

Dėl tyrimo dizaino įtraukiant visus stacionarizuotus pacientus, turinčius įtraukimo ir neturinčius neįtraukimo kriterijų, grupės skiriasi pagal pacientų skaičių, jų amžių ir lytį. 77 pacientai buvo vyrai, 30 – moterys. Duomenys nėra pasiskirstę pagal normalųjį skirstinį, todėl rezultatuose pateikiama mediana ir interkvartilinis plotis.

KMI mediana jautrios vaistams TB grupėje 21,53 [19,77–23,24], mono-/poli- vaistams atsparios TB grupėje 21,71 [17,9–24,94], DVA-TB grupėje 21,77 [20,13–24,22]. Demografiniai pacientų duomenys pateikiami 3.1.1 lentelėje.

3.1.1 lentelė. Demografiniai tirtų pacientų duomenys

	Jautri vaistams TB	Mono-/poli-vaistams atspari TB	DVA-TB
Lytis vyrai/moterys	49/13	10/4	18/13
Amžius, metais, mediana [IQR]	37 [31,3–48]	37,25 [32,5–47,5]	29 [20–44]
Sėkmingas/nesėkmingas gydymas	53/9	12/2	28/3
Gyvena mieste/kaime	28/34	7/7	18/12
Išsilavinimas vidurinis ar žemesnis/aukštesnis nei vidurinis	38/24	8/6	16/15
Gyvena su šeima/vienišas	26/36	8/6	15/16
Dirba, mokosi/nedirba, pensijoje	29/33	7/7	13/18

IQR – interkvartilinis plotis; DVA-TB – daugeliui vaistų atspari tuberkuliozė.

3.2. Tuberkuliozės mikobakterijų atsparumas vaistams nuo tuberkuliozės ir atsparumo vaistams įtaka skreplių pasėlio konversijai

Tarp tirtų pacientų DVA-TB nustatyta 28,7 proc. Atsparumas rifampicinui nustatytas 31 pacientui (28,7 proc.), atsparumas izoniazidui – 45 (42 proc.) pacientams. Mono atsparumas rifampicinui nustatyta nebuvo, taigi visiems pacientams, kuriems nustatytas atsparumas rifampicinui buvo patvirtinta DVA-TB.

Tarp tyrimo pacientų dalinis atsparumas bedakvilinui buvo nustatytas tik vienam pacientui, kuris TB susirgo pirmą kartą gyvenime ir anksčiau nei klofazimino, nei bedakvilino nevartojo. Kartu šiam pacientui nustatytas ir atsparumas izoniazidui, etambutoliui, levofloksacinui, ofloksacinui, moksi-floksacinui ir kanamicinui. Įdomu tai, kad nei atsparumo klofaziminui, nei atsparumo rifampicinui nenustatyta, todėl pacientas priklauso ne DVA-TB grupei, bet poli vaistams atsparios TB grupei. Nežinant kontakto, neatliekant detalaus epidemiologinio tyrimo ir genetinių TM mutacijų paieškų neįmano- ma būtų pasakyti kas šiuo atveju sąlygojo atsparumo išsivystymą.

Tarp tirtų pacientų, TM atsparumo linezolidui ir klofaziminui nenustatyta.

Pabandėme įvertinti kaip atsparumas vaistams įtakoja skreplių pasėlio konversiją po pirmojo TB gydymo mėnesio. Vertinant visas išskirtas grupes atskirai (jautri vaistams TB, mono-/poli- vaistams atspari TB, DVA-TB) stati- stišškai patikimo skirtumo nestebėta (3.2.1 lentelė).

3.2.1 lentelė. Atsparumas vaistams skirtingose skreplių pasėlio konversijos grupėse gydant plaučių tuberkuliozę

Veiksny	Įvykusios konversijos grupė N = 41	Neįvykusios konversijos grupė N = 56	p reikšmė
Jautri ar vaistams atspari plaučių TB:			0,457 [#]
Jautri vaistams TB	23 (56,1)	34 (60,7)	
Mono-/poli- vaistams atspari TB	7 (17,1)	5 (8,9)	
DVA-TB	11 (26,8)	17 (30,4)	

DVA-TB – daugeliui vaistų atspari tuberkuliozė; N – tiriamųjų skaičius.

Suskirsčius pacientus į dvi grupes (sergantys jautria vaistams TB ir ri- fampicinui atsparia TB) bei atlikus dvireikšmės logistinės regresijos analizę gauta, kad nustačius atsparumą rifampicinui rizika konversijai neįvykti po pirmojo mėnesio didėja (RR – 39,13, PI 3,04–503,8, p = 0,005).

3.2.1. Rezultatų aptarimas

DVA-TB dalis, nustatyta tarp visų mūsų tirtų pacientų yra reikšmingai didesnė nei bendra Lietuvoje nurodoma DVA-TB dalis tarp naujų TB atvejų (11,7 proc. pagal 2018 metų Europos ligų prevencijos ir kontrolės centro (angl. *European Centre for Disease Prevention and Control*) pateikiamus duomenis [52]). Nors Romainių tuberkuliozės ligoninės pacientai turėtų gerai atspindėti situaciją tarp Kauno regiono pacientų (Romainių tuberkuliozės ligoninė yra pagrindinė TB ligoninė Kauno regione ir dauguma TB pacientų gydoma čia), reikia atsižvelgti į tai, kad į tyrimą neįtraukti pacientai gydyti ambulatoriškai, bei turintys neįtraukimo kriterijų, tokių kaip ŽIV infekcija ar kitos gretutinės ligos.

Tiriant atsparumą rifampicinui ir izoniazidui atskirai, mūsų tyrime nustatyta, kad mono atsparumo rifampicinui tarp tiriamųjų nebuvo. Remiantis kitų tyrėjų duomenimis, daugiau nei 90 proc. atvejų, esant atsparumui rifampicinui kartu nustatomas ir atsparumas izoniazidui, todėl vien atsparumas rifampicinui gali būti naudojamas kaip DVA-TB žymuo [288].

Tarp poli vaistams atsparios TB ir DVA-TB pacientų tirtas ir atsparumas vieniems iš naujausių prieštuberkuliozinių vaistų: bedakvilinui, klofaziminui bei linezolidui. Šie vaistai ypatingai svarbūs DVA-TB gydymui, nes priklauso patiems efektyviausiems, pirmojo pasirinkimo vaistams nuo DVA-TB [91]. Pasaulinėse rekomendacijose pateikiamoje gydymo scheme [91] bedakvilinas ir linezolidas priklauso pirmajai – A grupei, klofaziminas – B grupei. Nors visi šie vaistai TB gydymui pradėti naudoti pakankamai neseniai, pasaulyje jiems jau nustatomas vis didėjantis atsparumas [79, 80].

Linezolidas Lietuvoje TB pacientams centralizuotai pradėtas skirti nuo 2016 metų, nors pavienių TB gydymo šiuo vaistu atvejų būta ir anksčiau. Kokio atsparumo paplitimo galėtume tikėtis po kelerių metų galima bandyti suprasti remiantis kitų šalių duomenimis. Pirmieji atvejai linezolidui atsparių TM Vokietijoje aprašyti 2007 metais: tuomet iš 210 izoliatų ištirtų nacionalinėje referentinėje laboratorijoje 2003–2005 metais, atsparumas linezolidui nustatytas 4 pacientams t.y. 1,9 proc. tiriamųjų [289]. Vėliau (2008–2013 m.) toje pačioje šalyje atlikto tyrimo metu atsparumas linezolidui nustatytas jau 3 proc. tirtų pacientų, nors tiesiogiai rezultatus sunku palyginti, nes pastarojo tyrimo metu vertinta tik migrantų populiacija [290]. 2019 metais Pietų Afrikoje tyrimo metu, atsparūs linezolidui TM izoliatai nustatyti maždaug trečdaliui pacientų tarp jau gydytų nuo DVA-TB ir patyrusių gydymo nesėkmę [291]. Tyrėjų nuomone, viena iš to priežasčių galėjo būti tai, kad linezolidas buvo pridedamas kaip papildomas vaistas prie TB gydymo režimo, kuris jau buvo neefektyvus. Taigi, nors, turimais duomenimis, atsparumas linezolidui Lietuvoje nustatomas retai, remiantis kitų šalių duomenimis, negalima atmes-

ti, kad ateityje, vis dažniau ši vaistą skiriant, tikėtinas atsparumo linezolidui dažnio augimas.

Tarp tirtų pacientų, atsparumo klofaziminui nenustatyta nei vienam, tačiau svarbu pažymėti, kad šio tyrimo atlikimo metu klofaziminas Lietuvoje dar nebuvo naudojamas. Šis vaistas pradėtas teikti ligoninėms Lietuvoje tik 2020 metais. Siekiant suprasti kaip gali keistis atsparumas klofaziminui tarp Lietuvos pacientų taip pat naudinga įvertinti kitų šalių patirtį. Pietų Afrikoje klofaziminas naudojamas jau nuo 2012 metų, o 2020 metais atliekant viso TM genomo sekoskaitą čia nustatyti 92 TM izoliatai turintys mutaciją Rv0678, kuri gali sąlygoti atsparumą bedakvilinui ir klofaziminui [74, 292]. Nei vienas iš pacientų, infekuotų šiais TM izoliatais anksčiau nebuvo gavęs gydymo šiais vaistais [292]. Yra duomenų, kad mutacijos susijusios su atsparumu bedakvilinui ir klofaziminui Pietų Afrikoje cirkuliavo dar ir 2009–2012 metais, t. y. prieš bedakvilino ir klofazimino įtraukimą į TB gydymo klinikinę praktiką [74]. 2014 m. Vokietijoje atlikto tyrimo metu atsparumas klofaziminui nustatytas 5 proc. tirtų pacientų [290].

Kaip matome iš pasaulyje atliktų tyrimų, bėgant laikui, atsparumo naujiems vaistams nuo TB nustatoma vis daugiau. Siekiant to išvengti, remiantis ekspertų susitarimais, būtina laikytis TB gydymo rekomendacijų, nepridėti naujo vaisto kaip vienintelio galimai efektyvaus vaisto prie esamo DVA-TB gydymo režimo, kai manoma, kad skiriamas gydymas nebeefektyvus [291, 293].

3.3. Skreplių pasėlio konversiją įtakoiantys veiksniai

Tarp tirtų pacientų visi buvo Lietuvos piliečiai, imigrantų iš kitų šalių nebuvo, visi neigė narkotikų vartojimą, tik vienas pacientas neturėjo nuolatinės gyvenamosios vietos, todėl šių veiksnių įtakos skreplių pasėlio konversijai iširti nepavyko.

Atskirai įvertintos jautrios ir atsparios vaistams TB grupės, kad rezultatų neiškreiptų atsparumas vaistams ir taikomas gydymas.

3.3.1. Skreplių pasėlio konversiją įtakoiantys veiksniai gydant vaistams jautrią plaučių tuberkuliozę

Šiam disertacijos uždaviniui atsakyti ir pirmam straipsniui disertacijos tema naudoti 52 pirmieji į tyrimą įtraukti pacientai, kuriems nustatyta vaistams jautri plaučių TB.

Iš 52 į šią grupę patekusių pacientų, skreplių pasėlio konversija po pirmojo gydymo mėnesio stebėta mažesnei daliai: 20 pacientų (38,5 proc.). 32 (62,5 proc.) pacientams pasėlio konversija po pirmo gydymo mėnesio neįvy-

ko. Prie pastarosios grupės priskiriami ir tie 3 pacientai, kurie mirė per pirmą gydymo mėnesį.

Tirtų veiksmų pasiskirstymas tarp tirtų pacientų pateikiamas 3.3.1.1 lentelėje.

3.3.1.1 lentelė. Pacientų socialiniai ir kiti tirti veiksniai skirtingose skreplių pasėlio konversijos grupėse gydant vaistams jautrią tuberkuliozę

Veiksnys	Įvykusios konversijos grupė N = 20	Neįvykusios konversijos grupė N = 32	P reikšmė
Lytis, n (proc.):			0,677 [#]
Vyrai	16 (80,0)	24 (75)	
Moterys	4 (20,0)	8 (25)	
Amžius metais, mediana [IQR]	36 [29–45]	–	0,587 [*]
Amžiaus grupės, n (proc.):			0,768 [#]
≥40 m.	11 (55)	22 (68,75)	
<40 m.	9 (45)	10 (31,25)	
Gyvenamoji vieta, n (proc.):			0,07 [#]
Miestas	12 (60,0)	11 (34,37)	
Kaimas	8 (40,0)	21 (65,63)	
Šeiminė padėtis, n (proc.):			0,93 [#]
Vienišas	11 (55)	18 (62,1)	
Su šeima/partneriu	9 (45)	14 (60,9)	
Darbas, n (proc.):			0,508 [#]
Dirba, mokosi	10 (50)	13 (40,62)	
Bedarbis, pensininkas	10 (50)	19 (59,38)	
Išsilavinimas, n (proc.):			0,284 [#]
Vidurinis ar žemesnis	10 (50)	21 (65,62)	
Aukštesnysis ar aukštasis	10 (50)	11 (34,38)	
Subjektyviai įvertinta sveikatos būklė, n (proc.):			0,113 [#]
Labai gera	3 (15)	1 (3,125)	
Gera	8 (40)	4 (12,5)	
Vidutiniška	7 (35)	17 (53,125)	
Bloga	2 (10)	8 (25)	
Labai bloga	0 (0)	2 (6,25)	
Subjektyviai įvertintos sveikatos būklės grupės, n (proc.):			0,007 [#]
Labai gera, gera sveikata	11 (55)	6 (18,75)	
Vidutiniška, bloga ir labai bloga sveikata	9 (45)	26 (81,25)	
SGRQ bendras balas, mediana [IQR]	22,13 [4,03–29,05]	32,79 [26,17–47,86]	0,009 [*]
SGRQ bendras balas, n (proc.):			0,008 [#]
≥30	4 (20)	19 (59,37)	
<30	15 (80)	13 (40,63)	

3.3.1.1 lentelės tęsinys

Veiksny	Įvykusios konversijos grupė N = 20	Neįvykusios konversijos grupė N = 32	P reikšmė
Alkoholio vartojimas, n (proc.): 2–3 k. per savaitę ir dažniau Rečiau nei 2–3 k./sav. Nevartoja	8 (40) 8 (40) 4 (20)	10 (31,25) 14 (43,75) 8 (25)	0,91 [#]
Krūtinės ląstos rentgenogramos skalė, mediana [IQR]	53,33 [8,3–58,33]	95,83 [74,16–109,16]	<0,001*
Albumino koncentracija kraujyje (g/l), mediana [IQR]	36 [28–39]	25,5 [24–35]	0,012*
Hipoalbuminemija (≤35 g/l), n (proc.): Taip Ne	5 (25) 15 (75)	17 (53,12) 15 (46,88)	0,046 [#]
KMI (kg/m ²), mediana [IQR]	22,37 [19,89–24,06]	22,21 [19,94–23,93]	0,837*
KMI grupės, n (proc.): Nepakankamas svoris (KMI <18,5 kg/m ²) Normalus svoris 18,5–24,9 kg/m ² Viršsvoris 25–29,9 kg/m ² Nutukimas >30 kg/m ²	3 (15) 13 (65) 4 (20) 0 (0)	3 (9,375) 24 (75) 3 (9,375) 2 (6,25)	0,252 [#]
Rūkantis, n (proc.) nerūkantis, n (proc.)	15 (75) 5 (25)	28 (87,5) 4 (23,5)	0,246 [#]
Pakmečiai, mediana [IQR]	12,5 [5–16]	20 [5–25]	0,33*
Rūko daugiau nei 20 pakmečių, n (proc.): Taip Ne	5 (25) 15 (75)	17 (53,12) 15 (46,88)	0,046 [#]
RAB kiekis skrepliuose prieš pradedant gydymą, n (proc.): RAB 3+ RAB 2+ RAB 1+ Pavieniai RAB RAB nerasta	0 (0) 5 (25) 3 (15) 4 (20) 8 (40)	21 (65,6) 5 (15,6) 4 (12,5) 2 (6,3) 0 (0)	<0,0001 [#]
Vitamino D koncentracija (nmol/l), mediana [IQR]	35,2 [24,5–43,5]	29,35 [24,58–38,55]	0,342*
Vitamino D grupė, n (proc.): <50 nmol/l 50–69 nmol/l Optimalus kiekis (70–250 nmol/l)	13 (65) 6 (30) 1 (5)	25 (78,125) 7 (21,875) 0 (0)	0,43 [#]

* – Mann-Whitney U testas

[#] – Pearson chi-kvadrato testas

IQR – interkvartilinis plotis; SGRQ – Šv. Jurgio ligoninės kvėpavimo klausimynas (angl. *St. George Respiratory Questionnaire*); KMI – kūno masės indeksas; RAB – rūgščiai atsparios bakterijos.

Tarp tirtų pacientų mažiausias KMI buvo 16,56, didžiausias – 34,05 kg/m². Vitamino D koncentracija – 17,8–73,9 nmol/l (vidurkis 43,39, standartinis nuokrypis (SN) 2,01). Tik vienam pacientui, remiantis laboratorijos pateikiamomis reikšmėmis, nustatyta normali vitamino D koncentracija (70–250 nmol/l).

Kaip parodyta pateiktoje lentelėje (3.3.1.1), veiksniai, kurie tarp vaistams jautrios TB pacientų statistiškai reikšmingai skyrėsi abiejose skreplių pasėlio konversijos grupėse, buvo pacientų subjektyviai įsivertinta sveikatos būklė, SGRQ balai, skreplių mikroskopijos duomenys, krūtinės ląstos rentgenogramos skalės balų skaičius, albumino koncentracija kraujyje bei tai, ar pacientas rūkė daugiau, ar mažiau kaip 20 pakmečių.

Atlikus dvireikšmės logistinės regresijos analizę (3.3.1.2 lentelė), statistiškai reikšmingą įtaką skreplių pasėlio konversijai po pirmojo gydymo mėnesio turėjo prieš gydymą rastas RAB kiekis skreplių mikroskopijoje, krūtinės ląstos rentgenogramos skalės balų skaičius bei subjektyvus paciento sveikatos įsivertinimas.

3.3.1.2 lentelė. *Dvireikšmės logistinės regresijos analizė jautrios vaistams tuberkuliozės grupėje, vertinant kurie iš tirtų veiksnių reikšmingai įtakoja skreplių pasėlio konversijos įvykimą*

Tirtas veiksnys	Beta koeficientas	Standartinis nuokrypis	p reikšmė	Šansų santykis	95 proc. PI	
RAB kiekis skrepliuose prieš gydymą	-1,553	0,518	0,003	0,212	0,077	0,584
Albumino koncentracija	-0,186	0,134	0,164	0,830	0,639	1,079
Rentgeno skalės įvertis	-0,062	0,027	0,019	0,939	0,892	0,990
Vitamino D koncentracija	0,056	0,045	0,214	1,057	0,968	1,154
Subjektyvus sveikatos būklės įsivertinimas	-1,624	0,727	0,026	0,197	0,047	0,820
SGRQ įvertis	-0,013	0,030	0,674	0,987	0,930	1,048
Lytis (vyras/moteris)	-0,237	1,000	0,813	0,789	0,111	5,600
Amžius	-0,011	0,046	0,812	0,989	0,905	1,082
Gyvenamoji vieta (miestas/kaimas)	0,178	0,987	0,857	1,195	0,173	8,267
Pakmečių skaičius	0,115	0,082	0,159	1,122	0,956	1,318
Alkoholio vartojimo įpročiai	0,843	0,698	0,227	2,324	0,591	9,134
Išsilavinimas	0,475	0,482	0,324	1,608	0,625	4,138
KMI	-0,008	0,133	0,953	0,992	0,764	1,288
Dirba/bedarbis	0,474	0,865	0,583	1,607	0,295	8,755

3.3.1.2 lentelės tęsinys

Tirtas veiksnys	Beta koeficientas	Standartinis nuokrypis	p reikšmė	Šansų santykis	95 proc. PI	
Vienišas/gyvenantis su šeima	0,053	0,942	0,955	1,055	0,167	6,679

PI – pasikliautinis intervalas; SGRQ – Šv. Jurgio ligoninės kvėpavimo klausimynas (angl. *St. George Respiratory Questionnaire*); KMI – kūno masės indeksas; RAB – rūgščiai atsparios bakterijos.

Vertinant statistiškai reikšmingai konversijos grupėse besiskiriančius veiksnius, kiekybinius bei ranginius kintamuosius perkodavus į dvireikšmius, dvireikšmės logistinės regresijos analizė atlikta pakartotinai (lentelė 3.3.1.3). Pritaikius žingsninės regresijos procedūrą gautas optimalus modelis, kuriame liko trys požymiai. Modelio Nagelkerkės pseudodeterminacijos koeficientas – 0,578, teisingas klasifikavimas – 82,4 proc. Kaip matoma lentelėje (lentelė 3.3.1.3), pacientai, kuriems prieš gydymą skrepliuose mikroskopiškai buvo nustatyta 2+ RAB ar 3+ RAB, lyginant su tais, kurių skrepliuose nustatyta mažiau RAB, turėjo 20,8 kartų didesnę riziką, kad po pirmojo TB gydymo mėnesio skreplių pasėlio konversija neįvyks. Skreplių pasėlio konversiją taip pat galėjo prognozuoti SGRQ klausimynas: pacientai, kurie šiame klausimyne surinko 30 ar daugiau balų turėjo 7 kartus didesnę riziką, kad skreplių pasėlio konversija po pirmojo TB gydymo mėnesio neįvyks. Rūky-mo anamnezė (daugiau kaip 20 pakmečių rūkymo), vertinant atskirai, nebuvo statistiškai patikimas veiksnys prognozuojant skreplių pasėlio konversiją.

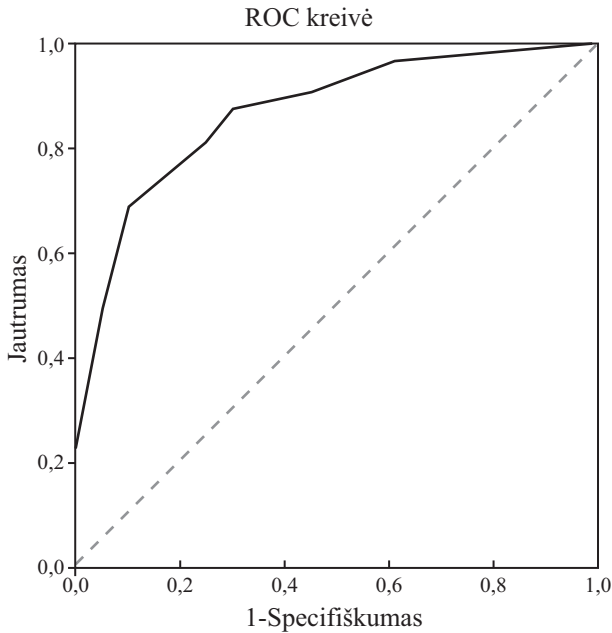
3.3.1.3 lentelė. *Dvireikšmės logistinės regresijos žingsninės analizės optimalus modelis, vertinant veiksnius turinčius įtaką skreplių pasėlio konversijos neįvykimui po 1 mėnesio jautrios vaistams plaučių tuberkuliozės grupėje*

Tirtas veiksnys	Šansų santykis	95 proc. PI	P reikšmė
SGRQ klausimyno bendras įvertis (<30/≥30)	7,1	1,26–39,99	0,026
Tabako rūkymo pakmečiai (<20 pakmečių/≥20 pakmečių)	5,2	0,93–29,1	0,061
Skreplių mikroskopijos įvertinimas prieš gydymą (<2+ RAB/≥2+ RAB)	20,8	3,77–114,72	<0,0001

PI – pasikliautinis intervalas; SGRQ – Šv. Jurgio ligoninės kvėpavimo klausimynas (angl. *St. George Respiratory Questionnaire*); RAB - rūgščiai atsparios bakterijos.

Remiantis 3.3.1.3 lentelėje pateiktais šansų santykiais bandėme sukurti skreplių pasėlio konversijos neįvykimo po pirmojo gydymo mėnesio rizikos skalę. Jei pacientas surinko 30 ar daugiau SGRQ balų jam rizikos skalėje skirti 7 balai, jei SGRQ balų buvo mažiau – rizikos skalėje skirta 0 balų. Jei rūky-

mo pakmečių paciento anamnezėje buvo 20 ar daugiau, rizikos skalėje skirta 5 balai, o jei prieš paskiriant TB gydymą skrepliuose rasta 2+ ar 3+ RAB, pacientui skirtas 21 balas. Minimalus rizikos skalės įvertis buvo 0, maksimalus – 33. Rizikos skalės ROC kreivė pateikiama 3.3.1.1 paveikslėlyje. Plotas po kreive (angl. *area under curve* (AUC)) – 0,87, 95 proc. PI 0,733–0,968.



3.3.1.1 pav. ROC kreivė vertinant sudarytą rizikos skalę nepatirti skreplių pasėlio konversijos po pirmojo tuberkuliozės gydymo mėnesio esant jautriai vaistams tuberkuliozei

Remiantis šia ROC kreive, konversijos prognozės skalės reikšmė 16,5 skreplių pasėlio konversijos neįvykimą prognozuoja su 81,3 proc. jautrumu ir 75 proc. specifiškumu. Teigiama predikcinė vertė 83,88 proc., neigiama predikcinė vertė – 71,48 proc.

3.3.2. Skreplių pasėlio konversiją įtakojantys veiksniai gydant daugeliui vaistų atsparią plaučių tuberkuliozę

Atskirai tirta DVA-TB grupė, kuriai priklausė 31 pacientas. Trūko duomenų apie 3 pacientų konversiją (netinkamai paimtas ar nepaimtas skreplių ėminys). Iš tirtų pacientų skreplių pasėlio konversija po 1 gydymo mėnesio įvyko 11 pacientų, neįvyko – 17. Kaip konversijos grupėse pasiskirstė tirti veiksniai pateikta 3.3.2.1 lentelėje.

3.3.2.1 lentelė. Pacientų socialiniai ir kiti tirti veiksniai skirtingose skreplių pasėlio konversijos grupėse gydant daugeliui vaistų atsparią tuberkuliozę

Veiksnys	Įvykusios konversijos grupė N = 11	Neįvykusios konversijos grupė N = 17	P reikšmė
Lytis, n (proc.): Vyrų Moterų	6 (54,54) 5 (45,45)	10 (58,8) 7 (41,2)	0,823 [#]
Amžius metais, mediana [IQR]	56 [20–60]	43 [32,5–52]	0,43*
Amžiaus grupės, n (proc.): ≥40 m. <40 m.	6 (54,54) 5 (45,45)	9 (53) 8 (47)	0,934 [#]
Gyvenamoji vieta, n (proc.): Miestas Kaimas	8 (72,7) 2 (18,2)	8 (47) 9 (53)	0,093 [#]
Šeiminė padėtis, n (proc.): Vienišas Su šeima/partneriu	3 (27,3) 8 (72,7)	10 (58,8) 7 (41,2)	0,102 [#]
Darbas, n (proc.): Dirba, mokosi Bedarbis, pensininkas	7 (63,6) 4 (36,4)	6 (35,3) 11 (64,7)	0,142 [#]
Išsilavinimas, n (proc.): Vidurinis ar žemesnis Aukštesnysis ar aukštasis	5 (45,45) 6 (54,54)	12 (70,6) 5 (29,4)	0,184 [#]
Subjektyviai įvertinta sveikatos būklė, n (proc.): Labai gera Gera Vidutiniška Bloga Labai bloga	1 (9,1) 3 (27,3) 4 (36,4) 3 (27,3) 0 (0)	1 (5,9) 5 (29,4) 9 (53) 2 (11,8) 0 (0)	0,705 [#]
Subjektyviai įvertintos sveikatos būklės grupės, n (proc.): Labai gera, gera sveikata Vidutiniška, bloga ir labai bloga sveikata	4 (36,4) 7 (63,6)	6 (35,3) 11 (64,7)	0,954 [#]
SGRQ bendras balas, mediana [IQR]	33,15 [10,35–54,27]	24,62 [15,28–35,99]	0,194*
SGRQ bendras balas, n (proc.): ≥30 <30	5 (45,45) 9 (81,81)	8 (47) 9 (53)	0,934 [#]
Alkoholio vartojimas, n (proc.): 2–3 k. per savaitę ir dažniau Rečiau nei 2–3 k./sav. Nevartoja	1 (9,1) 3 (27,3) 7 (63,6)	6 (35,3) 10 (58,8) 1 (5,9)	0,004 [#]
Krūtinės ląstos rentgenogramos skalė, mediana [IQR]	14,25 [1,33–42,09]	61,83 [40,33–77,5]	0,019*

3.3.2.1 lentelės tęsinys

Veiksny	Įvykusios konversijos grupė N = 11	Neįvykusios konversijos grupė N = 17	p reikšmė
Albumino koncentracija kraujyje, g/l, mediana [IQR]	40 [39,5–41,5]	40 [37–40]	0,675*
Hipoalbuminemija (≤ 35 g/l), n (proc.):			0,239#
Taip	3 (27,3)	2 (11,8)	
Ne	7 (63,6)	15 (88,2)	
KMI (kg/m ²), mediana [IQR]	22,26 [19,2–25,5]	21,97 [20,33–23,59]	0,264*
KMI grupės, n (proc.):			0,32#
Nepakankamas svoris (KMI <18,5 kg/m ²)	0 (0)	2 (11,8)	
Normalus svoris 18,5–24,9 kg/m ²	7 (63,6)	12 (70,6)	
Viršsvoris 25–29,9 kg/m ²	4 (36,4)	3 (17,6)	
Nutukimas >30 kg/m ²	0 (0)	0 (0)	
Rūkantis, n (proc.)	7 (63,6)	15 (88,2)	0,121#
nerūkantis, n (proc.)	4 (36,4)	2 (11,8)	
Pakmečiai, mediana [IQR]	2,5 [0,5–2,25]	10[3,5–25,5]]	0,134*
Rūko daugiau nei 20 pakmečių, n (proc.):			0,066#
Taip	1 (9,1)	7 (41,2)	
Ne	10 (91)	10 (58,8)	
RAB kiekis skrepliuose prieš pradedant gydymą, n (proc.):			0,001#
RAB 3+	1 (9,1)	3 (17,6)	
RAB 2+	0 (0)	5 (29,4)	
RAB 1+	0 (0)	3 (17,6)	
Pavieniai RAB	1 (9,1)	5 (29,4)	
RAB nerasta	9 (81,8)	1 (5,9)	
Vitamino D koncentracija (nmol/l), mediana [IQR]	35,5 [19,35–60,5]	47,9 [26,25–62]	0,675*
Vitamino D grupė, n (proc.):			0,437#
<50 nmol/l	5 (45,45)	12 (70,6)	
50–69 nmol/l	4 (36,4)	3 (17,6)	
Optimalus kiekis (70–250 nmol/l)	1 (9)	2 (11,8)	

* – Mann-Whitney U testas

– Pearson chi-kvadrato testas

IQR – interkvartilinis plotis; SGRQ – Šv. Jurgio ligoninės kvėpavimo klausimynas (angl. *St. George Respiratory Questionnaire*); KMI – kūno masės indeksas; RAB – rūgščiai atsparios bakterijos.

Kaip ir jautrios vaistams TB atveju, statistiškai reikšmingai abiejose grupėse skyrėsi RAB įvertis skreplių mikroskopijoje prieš pradedant gydymą bei apskaičiuota krūtinės ląstos rentgenogramos skalė. Ne taip, kaip jautrios vaistams TB grupėje, nesiskyrė subjektyvus sveikatos vertinimas, gyvenimo

kokybės klausimyno įverčiai. Skirtingai nei jautrios vaistams TB atveju, gydant DVA-TB statistiškai reikšmingai skyrėsi alkoholio vartojimo įpročiai abiejose konversijos grupėse.

Atlikus dvireikšmę logistinę regresiją DVA-TB grupėje stebėta, kad reikšmingą įtaką skreplių pasėlio konversijai turėjo tik tai ar pacientas buvo vartojantis alkoholį ar ne. Pacientams, kurie stacionarizavimo metu teigė, kad vartojo alkoholį, buvo mažesnė tikimybė po pirmojo gydymo mėnesio nustatyti skreplių pasėlio konversiją (lentelė 3.3.2.2). Nestebėta, kad kuris nors kitas iš tirtų veiksnių turėtų įtaką skreplių pasėlio konversijos įvykiui, tačiau atkreipiamas dėmesys, kad ši grupė gana nedidelė ir rezultatai galimai skirtųsi ištyrus daugiau pacientų.

3.3.2.2 lentelė. *Dvireikšmės logistinės regresijos analizė daugeliui vaistų atsparios tuberkuliozės grupėje, vertinant kurie iš tirtų veiksnių reikšmingai įtakoja skreplių pasėlio konversijos neįvykimą po 1 gydymo mėnesio. Pateikiami tik statistiškai reikšmingą įtaką turintys veiksniai*

Tirtas veiksnys	Beta koeficientas	Standartinis nuokrypis	p reikšmė	Šansų santykis	95 proc. PI	
Ar pacientas vartoja alkoholį	3,87	1,53	0,01	48	2,4	985,24

Duomenys apie mono-/poli- vaistams atsparios TB grupę, atskirai nepateikiami, nes ši grupė buvo dar mažesnė, ir logistinės regresijos analizės metu statistiškai reikšmingos veiksnių įtakos nestebėta.

3.3.3. Skreplių pasėlio konversiją įtakoiantys veiksniai gydant plaučių tuberkuliozę

Taip pat įvertintos visos TB grupės bendrai neskirstant pagal atsparumą vaistams. Visoms šioms grupės kartu priklausė 107 pacientai, tačiau trūko duomenų apie 10 pacientų skreplių konversiją. Tarp tirtų TB pacientų konversija įvyko 41 pacientui, neįvyko – 56. Gauti rezultatai pateikiami 3.3.3.1 lentelėje.

3.3.3.1 lentelė. Pacientų socialiniai ir kiti tirti veiksniai skirtingose skreplių pasėlio konversijos grupėse gydant plaučių tuberkuliozę

Veiksnys	Įvykusios konversijos grupė N = 41	Neįvykusios konversijos grupė N = 56	P reikšmė
Lytis, n (proc.): Vyrai Moterys	30 (73,2) 11 (26,8)	39 (69,6) 17 (30,4)	0,705 [#]
Amžius metais, mediana [IQR]	42 [32–51,5]	46 [37–55,75]	0,852 [#]
Amžiaus grupės, n (proc.): ≥40 m. <40 m.	24 (58,5) 17 (41,5)	36 (64,3) 20 (35,7)	0,565 [#]
Gyvenamoji vieta, n (proc.): Miestas Kaimas	26 (63,4) 14 (34,1)	21 (37,5) 35 (62,5)	0,008 [#]
Šeiminė padėtis, n (proc.): Vienišas Su šeima/partneriu	17 (41,5) 24 (58,5)	33 (58,9) 23 (41,1)	0,089 [#]
Darbas, n (proc.): Dirba, mokosi Bedarbis, pensininkas	23 (56,1) 18 (43,9)	24 (42,9) 32 (57,1)	0,197 [#]
Išsilavinimas, n (proc.): Vidurinis ar žemesnis Aukštesnysis ar aukštasis	19 (46,3) 22 (53,7)	35 (62,5) 21 (37,5)	0,114 [#]
Subjektyviai įvertinta sveikatos būklė, n (proc.): Labai gera Gera Vidutiniška Bloga Labai bloga	5 (12,2) 13 (31,7) 15 (36,6) 6 (14,6) 1 (2,4)	2 (3,6) 11 (19,6) 28 (50) 13 (23,2) 2 (3,6)	0,215 [#]
Subjektyviai įvertintos sveikatos būklės grupės, n (proc.): Labai gera, gera sveikata Vidutiniška, bloga ir labai bloga sveikata	18 (43,9) 22 (53,7)	13 (23,2) 43 (76,8)	0,024 [#]
SGRQ bendras balas, mediana [IQR]	22,8 [7,23–39,73]	32,79 [23,14–52,96]	0,005 [#]
SGRQ bendras balas, n (proc.): ≥30 <30	14 (34,1) 27 (65,9)	31 (55,4) 25 (64,6)	0,039 [#]
Alkoholio vartojimas, n (proc.): 2–3 k. per savaitę ir dažniau Rečiau nei 2–3 k./sav. Nevartoja	14 (34,1) 16 (39) 11 (26,83)	11 (19,6) 26 (46,4) 19 (33,9)	0,27 [#]
Krūtinės ląstos rentgenogramos skalė, mediana [IQR]	41,67 [4,58–57,92]	82,25 [62–106,46]	<0,0001 [#]

3.3.3.1 lentelės tęsinys

Veiksny	Įvykusios konversijos grupė N = 41	Neįvykusios konversijos grupė N = 56	P reikšmė
Albumino koncentracija kraujyje (g/l), mediana [IQR]	40 [36,5–43,5]	37 [31,75–40]	0,089 [#]
Hipoalbuminemija (≤ 35 g/l), n (proc.):			0,698 [#]
Taip	10 (24,4)	16 (28,6)	
Ne	30 (73,2)	40 (71,4)	
KMI (kg/m ²), mediana [IQR]	21,91 [19,19–24,72]	21,72 [19,94–23,24]	0,926 [#]
KMI grupės, n (proc.):			0,307 [#]
Nepakankamas svoris (KMI <18,5 kg/m ²)	6 (14,6)	7 (12,5)	
Normalus svoris 18,5–24,9 kg/m ²	26 (63,4)	38 (67,9)	
Viršsvoris 25–29,9 kg/m ²	9 (22)	7 (12,5)	
Nutukimas >30 kg/m ²	0 (0)	3 (5,4)	
Rūkantis, n (proc.)	30 (73,2)	49 (87,5)	0,073 [#]
nerūkantis, n (proc.)	11 (26,8)	7 (12,5)	
Pakmečiai, mediana [IQR]	7 [0–19]	10 [5–25]	0,147 [#]
Rūko daugiau nei 20 pakmečių, n (proc.):			0,011 [#]
Taip	10 (24,4)	28 (50)	
Ne	31 (75,6)	28 (50)	
RAB kiekis skrepliuose prieš pradant gydymą, n (proc.):			<0,0001 [#]
RAB 3+	3 (7,3)	25 (44,6)	
RAB 2+	5 (12,2)	12 (21,4)	
RAB 1+	5 (12,2)	9 (16,1)	
Pavieniai RAB	8 (19,5)	8 (14,3)	
RAB nerasta	20 (48,8)	2 (3,6)	
Vitamino D koncentracija (nmol/l), mediana [IQR]	42,3 [35,3–56,3]	40,2 [28,13–59,15]	0,081 [#]
Vitamino D grupė, n (proc.):			0,232 [#]
<50 nmol/l	22 (53,7)	41 (73,2)	
50-69 nmol/l	15 (36,6)	13 (23,2)	
Optimalus kiekis (70-250 nmol/l)	2 (4,9)	2 (3,6)	

* – Mann-Whitney U testas

– Pearson chi-kvadrato testas

IQR – interkvartilinis plotis; SGRQ – Šv. Jurgio ligoninės kvėpavimo klausimynas (angl. *St. George Respiratory Questionnaire*); KMI – kūno masės indeksas; RAB – rūgščiai atsparios bakterijos.

Kaip matome lentelėje 3.3.3.1, įvykusios ir neįvykusios skreplių pašėlio konversijos grupėse stebėtas statistiškai reikšmingas skirtumas tarp gyvenamosios vietos, SGRQ balo, pakmečių skaičiaus, krūtinės laštos rentgenogramos skalės balų skaičiaus bei RAB kiekio prieš gydymą. Vis tik atlikus

dvireikšmę logistinę regresiją gauta, kad konversiją statistiškai reikšmingai įtakojo tik krūtinės ląstos rentgenogramos balas bei RAB kiekis prieš gydymą. Kiekvienas didesnis rentgeno skalės balas didino konversijos neįvykimo riziką (RR 1,08; 95 proc. PI 1,02–1,14; $p = 0,01$); kiekvienas aukštesnis RAB įvertis (0; pavieniai; 1+;2+;3+) taip pat didino konversijos neįvykimo riziką (RR – 4,84; 95 proc. PI 1,95–12,04; $p = 0,001$).

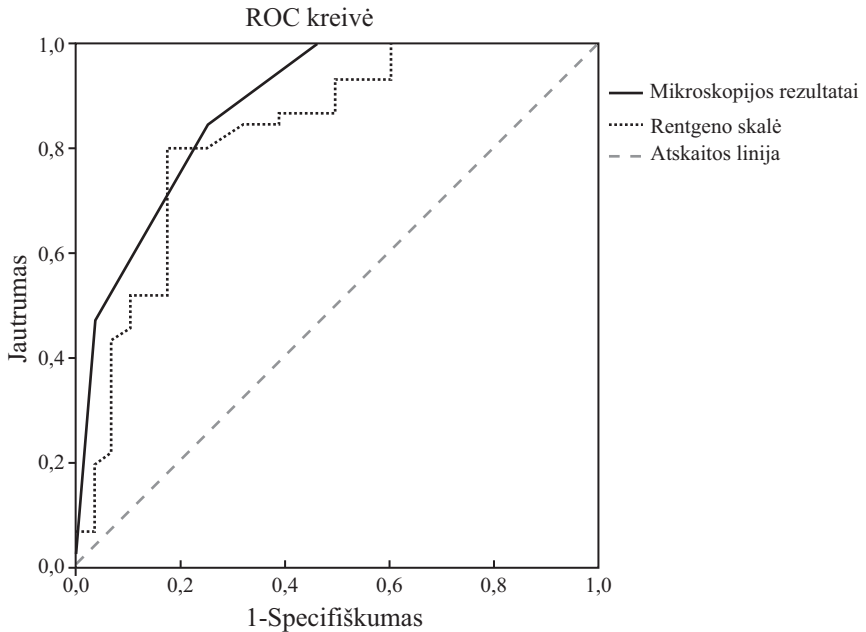
Rentgeno skalės balų skaičių ir RAB kiekį skrepliuose prieš pradedant TB gydymą sugrupavus į dvi grupes, kaip jautrios vaistams TB grupėje ir atlikus dvireikšmę logistinę regresiją (lentelė 3.3.3.2) gauname, kad statistiškai reikšmingai konversijos neįvykimą po pirmojo gydymo mėnesio įtakojo rentgenogramos skalė, RAB kiekis skrepliuose prieš pradedant gydymą, ir rūkymo pakmečių skaičius, kai jis viršija 20. Tarp kitų tirtų veiksnių, neišskiriant nei SGRQ klausimyno įverčio, statistiškai reikšmingos įtakos skreplių pasėlio konversijai po pirmojo gydymo mėnesio nerasta.

3.3.3.2 lentelė. *Dvireikšmės logistinės regresijos analizė bendroje tuberkuliozės grupėje, vertinant kurie iš tirtų veiksnių reikšmingai įtakoja skreplių pasėlio konversijos neįvykimą po 1 gydymo mėnesio. Pateikiami tik statistiškai reikšmingą įtaką turintys veiksniai*

Tirtas veiksnys	Beta koeficientas	Standartinis nuokrypis	p reikšmė	Šansų santykis	95 proc. PI	
RAB kiekis skrepliuose prieš gydymą (iki 2+/2+ ir 3+)	2,62	0,95	0,006	13,76	2,12	89,21
Rentgeno skalės įvertis (iki 70/70 ir daugiau)	1,86	0,83	0,026	6,4	1,25	32,83
Pakmečių skaičius (iki 20/20 ir daugiau)	0,92	0,34	0,008	2,5	1,27	4,9

PI – pasikliautinis intervalas; RAB – rūgščiai atsparios bakterijos.

Remiantis gautais rezultatais, konversijos neįvykimą bendroje TB grupėje geriausiai prognozavo RAB kiekis skrepliuose prieš pradedant gydymą bei krūtinės ląstos rentgenogramos skalė. Šių požymių nauda prognozuojant skreplių konversijos neįvykimą įvertinta ROC kreivių metodu. Skreplių mikroskopijoje rastą RAB kiekį perkodavome 4 balų sistema (RAB nerasta – 0 balų; rasta pavienės RAB – 1 balas; rasta 1+ RAB – 2 balai; rasta 2+ RAB – 3 balai; rasta 3+RAB – 4 balai). Rentgeno skalė naudota esama skaitine išraiška (0–140 balų). Gautos ROC kreivės pateikiamos 3.3.3.1 pav.



3.3.3.1 pav. *Konversijos neįvykimo prognozavimas pagal pradinius skreplių mikroskopijos ir rentgeno skalės įverčius. ROC kreivė*

Remiantis plotu po ROC kreive (AUC) (3.3.3.1 pav), nustatyta, kad ir skreplių mikroskopijos rezultatai, ir rentgeno skalė yra geros prognostinės vertės tyrimai (AUC – 0,8–0,9 ribose) vertinant skreplių konversijos neįvykimo riziką. Skreplių mikroskopijos AUC lygus 0,884; 95 proc. PI 0,803–0,964; $p < 0,001$. Rentgeno skalės AUC = 0,826; 95 proc. PI 0,723–0,93; $p < 0,001$. Remiantis Youden J indeksu apskaičiuotos ribinės rezultatų reikšmės konversijos neįvykimo prognozavimui. Mikroskopijos metu radus 1+ RAB ar daugiau, konversijos neįvykimas prognozuojamas esant 85 proc. jautrumui ir 75 proc. specifiškumui. Prognostinė rentgeno skalės ribinė vertė (pasitelkiant Youden J reikšmę) – 59,17. Jei rentgeno skalės vertė yra didesnė už šią, konversijos neįvykimo prognozavimo jautrumas 80 proc, specifiškumas 82 proc.

3.3.4. Rezultatų aptarimas

Skreplių pasėlio konversija po 2 mėnesių gydymo – pripažintas išgijimo nuo TB biožymuo [294] naudojamas ir klinikiniuose tyrimuose [28, 102]. Tarp DVA-TB pacientų skreplių pasėlio konversija po 2 mėnesių yra reikšmingai susijusi su gydymo išėjimu [16, 295]. Užtrukusi skreplių pasėlio kon-

versija taip pat lemia ir ilgesnį laikotarpį, kuomet pacientas gali būti epidemiologiškai pavojingas aplinkiniams.

Daugelyje šalių siekiant sumažinti našta sveikatos apsaugos sistemai, pagerinti pacientų gyvenimo kokybę siekiama pacientus sergančius TB kuo anksčiau pradėti gydyti ambulatoriškai. Tam, kad būtų nutraukta izoliacija įprasta gauti bakteriologinį skreplių mikroskopijos ar skreplių pasėlio konversijos patvirtinimą. Lietuvoje, remiantis ir galiojančiomis rekomendacijomis [7] ir Lietuvos Respublikos sveikatos apsaugos ministro įsakymu [90] skreplių pasėlio konversiją TB sergantiems pacientams rekomenduojama vertinti po dviejų gydymo mėnesių. Šiame tyrime, siekdami kuo greičiau įvertinti gydymo efektyvumą, skreplių pasėlio konversiją tyrėme po 1 mėnesio. Konversija visais atvejais buvo patvirtina po 2 gydymo mėnesių atliktu pakartotinu skreplių pasėliu (praėjus ne mažiau kaip 30 dienų nuo buvusio neigiamo pasėlio). Skreplių konversijos vertinimą po pirmojo TB gydymo mėnesio renkasi ir kai kurie kiti tyrimų autoriai [95, 296, 297]. Šie tyrimai kol kas atlikti tik su DVA-TB pacientais.

Kaip pateikta rezultatuose, svarbiausi veiksniai galintys padėti prognozuoti konversiją po pirmojo TB gydymo mėnesio yra RAB kiekis rastas mikroskopuojant skreplius ir krūtinės ląstos rentgenogramos skalės balai prieš pradedant TB gydymą.

Jau anksčiau žinoma, kad pacientai, kuriems krūtinės ląstos rentgenogramoje nustatoma kavitacija turi didesnę TM kiekį plaučiuose, jiems greičiau nustatomas TM augimas skrepių pasėliuose [298] ir vėliau nustatoma skreplių pasėlio konversija [18, 260]. Tai aiškinama ir tuo, kad farmakokinetiniuose tyrimuose nustatyta, jog prieštuberkulioziniai vaistai suboptimaliai penetruoja į kavernas [299], kuriose paprastai ir nustatoma didžiausia TB mikobakterijų koncentracija. Mūsų tyrimo atlikimo metu pavyko rasti tik vieną validuotą krūtinės ląstos rentgenogramos skalę skirtą TB gydymo monitoravimui [287], kaip aprašyta tyrimų metuose. Kai kurių kitų autorių tyrimuose rentgenogramos įvertinimos paprastesniais metodais, pavyzdžiui vien tik nustatant kavitacijos buvimą ar nebuvimą [300]. Lietuvoje vis dar naudojama rentgenologinė plaučių TB klasifikacija (židininė, infiltracinė, fibrozinė kaverninė, diseminacinė) [301], kuri pateikiama ir formuluojant TB diagnozę. Tačiau nėra įrodyta, kad šios rentgenologinės formos kaip nors įtakotų paciento prognozę ar galėtų turėti įtakos gydymo pasirinkimui. Neradome duomenų, kad ši radiologinė klasifikacija būtų plačiau naudojama kitose šalyse. Manome, kad būtų naudingiau rentgenologiniam TB išplitimo vertinimui naudoti kitas, tyrimais patvirtintas metodikas. Mūsų tyrime naudota Ralph et al. skalė, vertinanti kavitaciją ir TB išplitimą, kitų tyrėjų duomenimis, buvo reikšmingai susijusi su pradiniu mikobakterijų kiekiu skreplių mikroskopijoje [287]. Mūsų duomenys antrina anksčiau atliktiems tyrimams: kuo didesnis

skalės balų skaičius ir tuo pačiu – radiologinis ligos išplitimas, tuo didesnė ir konversijos neįvykimo tikimybė [279]. Kituose tyrimuose vertinta ir šios skalės sąsaja su kitais pacientų požymiais: nustatyta, kad pacientai, kuriems buvo nustatyta kavitacija krūtinės ląstos rentgenogramoje, turėjo mažesnę albumino koncentraciją kraujyje [279], tačiau pradinis TM kiekis skrepliuose, etninė paciento grupė, infektuotumas ŽIV, cukrinio diabeto buvimas, amžius, lytis, simptomų išreikštumas radiologinių pokyčių išreikštumui įtakos neturėjo [279]. Manome, kad Ralph et al. siūloma skalė galėtų pasitarnauti klininėje praktikoje, vertinant TB išplitimą plaučiuose ir monitoruojant gydymo efektyvumą, tačiau jos naudojimas gali būti apsunkintas kai pacientas kartu turi gretutinių plaučių ligų, sukeliančių papildomų radiologinių pokyčių.

Antrasis svarbus veiksnys galintis padėti prognozuoti skreplių pasėlio konversiją nustatytas mūsų tyrime buvo RAB kiekis skreplių mikroskopijoje prieš pradėdant TB gydymą. Mūsų tyrime stebėta, kad skreplių mikroskopijoje nustačius 2+ ar 3+ RAB, konversijos neįvykimo rizika didėjo 13 kartų. Panašius rezultatus, vertinant RAB kiekio skrepliuose gydymo pradžioje įtaką skreplių pasėlio konversijai, gavo ir kiti tyrėjai: pavyzdžiui, Eliene D Mesquita et al. [302] tyrimo metu rasta stipri sąsaja tarp didesnio bakterijų kiekio skrepliuose prieš gydymą ir teigiamo pasėlio šešiasdešimtą gydymo dieną.

Lietuvos TB registro duomenimis, 2020 metais, tarp visų TB sergančių pacientų, 65,3 proc. buvo rūkantys [51]. Žinoma, kad tabako rūkymas yra svarbus TB rizikos veiksnys [260, 303]. Kai kuriuose tyrimuose jis buvo susietas su pertekliniu sisteminiu uždegiminiu atsaku, sunkesne TB eiga ir mirtimi [256–258], kavitacija, teigiama skreplių mikroskopija ir pasėliu, lėtesne mikroskopine ir pasėlio konversija pradėjus TB gydymą [260, 303, 233]. Mūsų tyrimo metu taip pat [304] nustatėme, kad pacientai rūkę daugiau kaip 20 pakmečių turėjo didesnę riziką nepatirti skreplių pasėlio konversijos po pirmo gydymo mėnesio. Kitų autorių duomenimis, po to kai žmogus meta rūkyti, mirties nuo TB rizika ženkliai sumažėja todėl galima teigti, kad rūkymo metimas – svarbus veiksnys mažinantis su TB susijusį mirtingumą [255, 264].

Kiti tirti veiksniai nebuvo tokie svarbūs konversijos prognozavimui ir, mūsų tyrimo duomenimis, neturėjo statistiškai reikšmingos įtakos skreplių pasėlio konversijai po pirmojo TB gydymo mėnesio. Lietuvos TB registro duomenimis, 2020 metais, tarp visų TB sergančių pacientų 27,8 proc. piktnaudžiavo alkoholiu [51]. Yra aprašyta, kad alkoholis veikia slopindamas baktericidinę makrofagų funkciją [305], mažina dendritinių ląstelių [139] ir neutrofilų kiekį [252] organizme, moduliuoja T limfocitų funkciją [139], keičia priešuterkuliozinių vaistų absorbciją virškinamajame trakte [254]. Alkoholio vartojimo įtakos konversijos įvykimui nenustatėme tarp jautrios vaistams TB

pacientų, tačiau alkoholio vartojimo įpročių įtaka skreplių pasėlio konversijai stebėta tarp DVA-TB pacientų. Kitų tyrėjų duomenimis, pacientams, gausiai vartojantiems alkoholį, nustatoma lėtesnė pasėlio konversija [249], didesnė gydymo nesėkmės ir mirties tikimybė [244, 249, 306]. Manoma, kad tai susiję ir su tuo, kad alkoholį vartojantys pacientai yra labiau linkę nesilaikyti TB gydymo režimo [250], tačiau mūsų tyrimo pacientai pirmuosius gydymo mėnesius praleido lignoninėje, esant užtikrintam DOTS gydymui, todėl ši priežastis negalėtų pilnai paaiškinti alkoholio vartojimo įtakos mūsų pacientų skreplių pasėlio konversijai.

Kai kurių autorių duomenimis, mažas KMI yra susijęs su blogesne ligos prognoze [280, 281]. Didesnis kaip 10 proc. kūno svorio netekimas laikomas predisponuojančiu veiksniu TB išsivystymui [275]. Mažas KMI siejamas ir su mažesne interferono gama koncentracija kraujyje ir, tuo pačiu, su mažesne apsauga nuo TB reaktyvacijos [277]. Nustatyta, kad TB pacientai su per mažu KMI turėjo labiausiai radiologiškai išplitusią plaučių TB, jiems ilgiau užtruko pasėlio konversija ir buvo didesnė gydymo nesėkmės ar mirties tikimybė [278, 279, 307]. TB pacientams sumažėjęs apetitas, makro ir mikro nutrientų malabsorbcija ir pakitęs metabolizmas prisideda prie kacheksijos vystymosi [276]. Visgi, ne visi tyrimai patvirtina, kad mažas KMI turi įtakos TB gydymo išeitims [308]. Tarp mūsų tirtų pacientų nestebėjome statistiškai reikšmingo KMI skirtumo tarp konversijos grupių. Atkreiptinas dėmesys ir į tai, kad dauguma pasaulyje atliktų tyrimų vertina KMI ir TB gydymo išeičių ryšį, o ne skreplių pasėlio konversiją. Pavyko rasti tik vieną tyrimą, kuriame skreplių konversijos įvykimas siejamas su KMI, tačiau tuo atveju tirta tik DVA-TB pacientų populiacija [19], o kaip stebima ir mūsų tyrime – ne visuomet skreplių konversiją veikiantys veiksniai vienodi skirtingo atsparumo vaistams grupėse.

Tiriant mitybos nepakankamumą TB pacientams, kitas dažnai pasirenkamas rodiklis yra albumino koncentracija kraujyje. Aprašoma, kad pacientams, kuriems naujai nustatoma plaučių TB, dažniau nustatomas sumažėjęs albumino kiekis kraujyje, lyginant su sveikais žmonėmis [282]. Citokinai, cirkuliuojantys infekcijos metu, gali supresuoti albumino sintezę ir sumažinti albumino kiekį kraujyje, tačiau svarbu įvertinti, kad albumino koncentracija kraujyje gali būti sumažėjusi ir dėl mitybos nepakankamumo, todėl nustatyti albumino įtaką TB išeitims neatsižvelgiant į KMI ir infekcijos aktyvumą gali būti sudėtinga [22]. Publikuotuose straipsniuose nurodoma, kad per žema albumino koncentracija kraujo serume TB pacientams susieta su didesniu mirtingumu lignoninėje [283]. Pacientai, kuriems nustatyta hipoalbuminemija, taip pat buvo labiau linkę patirti TB gydymo nesėkmę [278, 279]. Hipoalbuminemija kai kurių autorių vertinama kaip vienas iš veiksnių, sąlygojančių sunkesnę TB ligos eigą [279]. Mūsų tyrime albumino koncentracija tarp kon-

versijos grupių statistiškai reikšmingai nesiskyrė, nors įvykusios konversijos grupėse stebėtos neženkliai didesnės albumino koncentracijos bei mažesnė pacientų su hipoalbuminemija dalis.

Dar vienas biocheminis tyrimas kai kur atliekamas vertinant TB gydymo efektyvumą yra vitamino D koncentracija kraujyje. Seniai žinoma, kad vitamino D koncentracija priklauso nuo geografinio regiono [309]: tiriant TB pacientus Malaizijoje, vitamino D trūkumas buvo nustatytas labai mažai daliai pacientų [310], tuo tarpu mūsų tyrime optimalus vitamino D kiekis nustatytas tik keturiems iš visų tirtų pacientų. Vis tik pacientams sergantiems TB, dažniau nei bendroje populiacijoje, nustatomas vitamino D deficitas [270]. Aprašoma, kad TB metu kinta vitamino D metabolizmas [271]. Pasaulyje vis dar išlieka diskusinis klausimas ar tikslinga TB pacientams tirti vitamino D koncentraciją. Nusprendus, kad tirti vitamino D koncentraciją tikslinga ir nustatčius šio vitamino trūkumą, tuomet reikėtų skirti gydymą vitaminu D, tačiau nepaisant aprašytų imunomoduliacinių vitamino D sąvybių [311], istorinės vitamino D reikšmės TB gydyme, skiriant vitamino D papildus pacientams sergantiems TB ne visada stebimas teigiamas efektas [312]. Papildomai prie prieštuberkuliozinio gydymo skiriant vitaminą D, net ir koregavus jo deficitą, nepastebėta, kad bendros populiacijos pacientams skreplių pasėlio konversija būtų įvykusi greičiau [312, 313]. Vis tik, jei pacientai būtų atrinkti pagal *TaqI* vitamino D receptoriaus tt genotipą, vitamino D papildai ženkliai sutrumpino laiką iki skreplių pasėlio konversijos [314]. Taip pat aprašyta, kad šiai pacientų grupei vitamino D koncentracija buvo reikšmingai mažesnė esant DVA-TB [315]. Tarp mūsų tirtų pacientų vitamino D koncentracijos skirtumų tarp DVA-TB ir jautrios vaistams TB pacientų nepastebėta ($p = 0,132$). Šiuo metu dažniau laikomasi nuomonės, kad normali vitamino D koncentracija sergant TB gali turėti kitų privalumų: pavyzdžiui, nustatyta, kad pacientai, turėję didesnę vitamino D koncentraciją kraujo plazmoje, greičiau priaugo svorio TB gydymo metu [310].

Iki šiol neradome tyrimų vertinančių TB pacientų gyvenimo kokybės klausimynus ir jų sąsają su pasėlio konversija, tačiau aprašoma, kad TB simptomų buvimas diagnozės nustatymo metu susiję su didesniu TB išplitimu [316]. Ištyrus mūsų pacientus stebėta, kad statiškai reikšmingai didesni SGRQ įverčiai (blogesnė gyvenimo kokybė) nustatyti pacientams kuriems skreplių pasėlio konversija neįvyko (išskyrus DVA-TB grupę), nors, remiantis logistine regresija, šis požymis turėjo įtakos pasėlio konversijos įvykimui tik jautrios TB grupėje. Gyvenimo kokybę, suprantama, gali įtakoti ne tik pacientui nustatyta TB, bet ir kiti jo/jos gyvenimo aspektai. Vis tik, mūsų tyrimo atveju, galima būtų daryti prielaidą, kad bloga gyvenimo kokybė galėjo būti labiau susijusi su išplitusia TB liga nei kitais paciento gyvenimo kokybės aspektais, kadangi atskirai įvertinus pacientus, kurie surinko didžiausią SGRQ klausimyno balų

skaičių, daugumai jų kartu nustatyta ir didelis bakterijų kiekis mikroskopijoje ir/arba radiologinis ligos išplitimas.

Kadangi gyvenimo kokybę įtakoja ne tik paciento ligos simptomai ir prognozė, bet ir kiti socialiniai veiksniai, nutarėme įvertinti ir kitų socialinių veiksnių įtaką skreplių pasėlio konversijai. Tyrimų, kurių metu vertinta socialinių veiksnių (išskyrus amžių ir lytį) įtaka skreplių pasėlio konversijai radome labai nedaug. 1994–1995 metais JAV atliktame tyrime nurodoma, kad tokie socialiniai veiksniai kaip buvimas be gyvenamosios vietos, injekcinių narkotikų vartojimas neturėjo įtakos skreplių pasėlio konversijai [317]. Kinijoje 2020 metais atliktame tyrime su DVA-TB pacientais tirta įvairių socialinių veiksnių įtaka (pacientų darbo pobūdis, gyvenamoji vieta (miestas, kaimas) etninė grupė, lytis), tačiau šių veiksnių įtakos skreplių pasėlio konversijai nerasta [318]. Vertinant paciento lyties įtaką skreplių pasėlio konversijai, kai kurių tyrimų duomenimis, vyriškos lyties pacientams konversija įvyksta lėčiau nei moteriškos [233, 319, 320], tačiau kiti autoriai, kaip ir mes, lyties įtakos skreplių pasėlio konversijai nerado [317]. Įvairių tyrėjų duomenimis, su skreplių pasėlio konversijos įvykimu, taip pat gali būti susijęs paciento amžius. Autoriai teigia, kad vyresnis amžius susijęs su lėtesne skreplių pasėlio konversija [233, 321], tačiau tarp mūsų tirtų pacientų amžiaus įtakos konversijai nestebėta.

Apskritai, vertinant mūsų tyrime tirtus veiksnius, svarbu atkreipti dėmesį, kad tyrimas atliktas ligoninėje, kur vykdomas tiesiogiai stebimas kontroliuojamas gydymas, kas gali turėti reikšmę vertinant aprašytų veiksnių įtaką skreplių pasėlio konversijai. Kaip pavyzdį pateikiant alkoholio vartojimą – ligoninėje gydomas pacientas turi gerokai mažiau galimybių tęsti alkoholio vartojimą, taip pat nesuvartoti skiriamų vaistų. Galima daryti prielaidą, kad gydant stacionare, kai užtikrinamas DOTS, socialinių veiksnių įtaka sumenksta.

Vienas iš mūsų tyrimo trūkumų yra tai, kad ne visiems DVA-TB grupės pacientams tinkamas gydymas pagal galiojančias DVA-TB gydymo rekomendacijas buvo pradėtas iš karto. Vietoj DVA-TB gydymo šie pacientai gavo įprastą jautrios vaistams TB gydymą. Tai nutiko dėl to, kad tyrimo atlikimo metu LSMUL KK dar nenaudoti genotipiniai TB diagnostikos metodai, todėl atsparumas vaistams buvo nustatomas fenotipiniais TB diagnostikos metodais, kas prailgino DVA-TB nustatymo ir tinkamo gydymo paskyrimo laiką.

3.4. Uždegimo žymenų gydant jautrią ir atsparią vaistams tuberkuliozę sąsajos su skreplių pasėlio konversija

Šiam uždaviniui naudoti visi iki tyrimo pabaigos įtraukti pacientai. Pacientų, kuriems nustatyta vaistams jautri TB buvo 62, kitose grupėse pa-

cientų skaičius nesiskyrė nuo tirtų pirmiesiems uždaviniams (skyrius 3.3). Čia siekėme įvertinti ar CRB, sICAM-1, suPAR koncentracijos išmatuotos prieš pradėdant gydymą turi sąsają su skreplių pasėlio konversija. Vertinta skreplių pasėlio konversija po 1 ir po 5 gydymo mėnesių.

Skreplių pasėlio konversija bendroje TB grupėje, neskirstant pacientų pagal nustatytą atsparumą vaistams nuo TB, po pirmojo gydymo mėnesio įvyko 41 pacientui, 56 pacientams neįvyko, duomenų apie 10 pacientų skreplių pasėlio konversiją nėra (gydymas nutrauktas, mirtis, netinkama medžiaga pasėliui ar kitos priežastys). Po 5 mėnesių konversija neįvyko 2 pacientams, abu jie priklausė DVA-TB grupei; 29 pacientams duomenų apie skreplių pasėlio konversiją po 5 gydymo mėnesių nėra (gydymas nutrauktas, paciento mirtis, netinkama medžiaga pasėliui ar kitos priežastys).

Konversijos įvykimo/neįvykimo po pirmojo gydymo mėnesio pasiskirstymas atskirose TB grupėse pagal atsparumą vaistams parodytas 3.4.1 lentelėje.

3.4.1 lentelė. *Skreplių pasėlio konversija po pirmojo gydymo mėnesio tuberkuliozės grupėse pagal atsparumą vaistams*

TB grupė	Konversija įvyko	Konversija neįvyko
Jautri vaistams TB	23 (40,4 proc.)	34 (59,6 proc.)
Mono-/poli- vaistams atspari TB	7 (58,3 proc.)	5 (41,7 proc.)
DVA -TB	11 (39,3 proc.)	17 (60,7 proc.)

TB – tuberkuliozė; DVA-TB – daugeliui vaistų atspari tuberkuliozė.

Uždegiminių žymenų koncentracijų skirtumai po pirmojo mėnesio įvykusios ir neįvykusios skreplių pasėlio konversijos grupėse pateikiami 3.4.2; 3.4.3 ir 3.4.4 lentelėse.

3.4.2 lentelė. *Pradinės C reaktyviojo baltymo koncentracijos įvykusios ir neįvykusios skreplių pasėlio konversijos grupėse*

	CRB koncentracija prieš gydymą (mg/ml) įvykusios konversijos grupėje, mediana [IQR]	CRB koncentracija prieš gydymą (mg/ml) neįvykusios konversijos grupėje, mediana [IQR]	p (Mann-Whitney U testas)
Jautri vaistams TB	7,92 [2,45–50,96]	41,33 [18,45–118,16]	0,008
Mono-/poli- vaistams atspari TB	10,82 [1–27,34]	35,13 [13,41–156,6]	0,149
DVA-TB	4,84 [1,67–12,97]	11,63 [3,69–39,64]	0,675
Visi TB atvejai bendrai	7,85 [2,16–26,73]	33,24 [10,88–94,55]	0,02

IQR – interkvartilinis plotis; DVA-TB – daugeliui vaistų atspari; CRB – C reaktyvusis baltymas.

3.4.3 lentelė. Pradinės tirpių tarpląstelinės adhezijos molekulių-1 koncentracijos įvykusios ir neįvykusios skreplių pasėlio konversijos grupėse

	sICAM-1 koncentracija prieš gydymą (mg/ml) įvykusios konversijos grupėje, mediana [IQR]	sICAM-1 koncentracija prieš gydymą (mg/ml) neįvykusios konversijos grupėje, mediana [IQR]	p (Mann-Whitney U testas)
Jautri vaistams TB	57,77 [51,56–101,12]	56,8 [13,1–64,905]	0,196
Mono-/poli- vaistams atspari TB	86,18 [62,0725–101,12]	57,1 [56,44–101,12]	1,0
DVA-TB	70,37 [30,055–94,4625]	101,12 [43,49–101,12]	0,414
Visi TB atvejai bendrai	64,27 [44,48–101,12]	64,905 [56,5–101,12]	0,295

IQR – interkvartilinis plotis; DVA-TB – daugeliui vaistų atspari tuberkuliozė; sICAM-1 – tirpios tarpląstelinės adhezijos molekulės.

3.4.4 lentelė. Pradinės tirpių urokinazės tipo plazminogeno aktyvatoriaus receptorių koncentracijos įvykusios ir neįvykusios skreplių pasėlio konversijos grupėse

	suPAR koncentracija prieš gydymą (mg/ml) įvykusios konversijos grupėje, mediana [IQR]	suPAR koncentracija prieš gydymą (mg/ml) neįvykusios konversijos grupėje, mediana [IQR]	p (Mann-Whitney U testas)
Jautri vaistams TB	1894,69 [1648,58–2621,05]	2443,51 [1875,15–4555,31]	0,073
Mono-/poli- vaistams atspari TB	2205,055 [1647,68–4087,07]	3011,87 [2375,07–4986,49]	0,429
DVA-TB	1676,6 [1254,25–1849,87]	2144,33 [1875,15–2616,58]	0,078
Visi TB atvejai bendrai	1875,15 [1507,27–2540,32]	2355,435 [1875,15–3158,41]	0,025

IQR – interkvartilinis plotis; DVA-TB – daugeliui vaistų atspari tuberkuliozė; suPAR – tirpūs urokinazės tipo plazminogeno aktyvatoriaus receptoriai.

Kaip matoma 3.4.2 lentelėje, įvykusios ir neįvykusios konversijos grupėse, CRB reikšmės tarp jautrios TB ir bendros TB grupės pacientų skyrėsi statistiškai reikšmingai. Šiose grupėse apskaičiuota, kad kai prieš pradėdant TB gydymą buvo nustatyta normali CRB koncentracija, konversija įvyko dažniau ($p < 0,05$). Didesni CRB įverčiai stebėti kai konversija neįvyko.

Prieš pradėdant TB gydymą, suPAR koncentracijos bendroje TB grupėje nustatytos statistiškai reikšmingai didesnės tiems pacientams, kuriems skreplių pasėlio konversija po pirmojo gydymo mėnesio neįvyko (3.4.4 lentelė). SICAM-1 koncentracijos tarp visų TB grupių pacientų ir skirtingos konversijos išeičių grupių statistiškai reikšmingai nesiskyrė (3.4.3 lentelė).

Dėl sąlyginai mažų grupių išskirsčius TB pagal atsparumą, tolesniems statistiniams skaičiavimams naudotos tik jautrios vaistams TB ir bendra TB

grupė. Atliekant dvireikšmės logistinės regresijos analizę ir jautrios vaistams TB grupėje, ir bendroje TB grupėje, nustatyta, kad nei CRB, nei sICAM-1, nei suPAR koncentracijų kiekybiniai įverčiai prieš pradedant gydymą nuo TB, neturėjo statistiškai reikšmingos sąsajos su skreplių pasėlio konversija po pirmojo ir po penktojo TB gydymo mėnesio. Taip pat nebuvo statistiškai patikimo skirtumo tarp suPAR ir sICAM-1 padidėjimo fakto bendroje TB grupėje prieš pradedant gydymą ir konversijos įvykimo (statistinėje analizėje suskirsčius pacientus į dvi grupes: tiems kuriems nustatytas suPAR/sICAM-1 padidėjimas, ir tiems, kam šie rodikliai nustatyti normos ribose).

3.4.1. Rezultatų aptarimas

CRB – turbūt vienas iš daugiausiai tyrinėtų uždegiminių žymenų esant aktyviai plaučių TB. Aukštos CRB vertės siejamos su labiau išreikšta kavitacija plaučiuose ir plaučių funkcijos sutrikimu [322, 323]. CRB koncentracija linkusi mažėti TB gydymo metu [324], o šios koncentracijos nemažėjimas po 2 gydymo savaičių susijęs su blogesne TB prognoze [191]. Vis tik remiantis kitais anksčiau atliktais tyrimais, CRB reikšmė prognozuojant skreplių pasėlio konversiją yra diskutuotina. Vienu autorių duomenimis, aukštos CRB vertės gali būti susiję su vėlyvesne skreplių pasėlio konversija [325, 326], tačiau kiti autoriai tokio ryšio nepastebi [260]. Mūsų atlikto tyrimo metu nustatyta, kad nors įvykusios/neįvykusios skreplių pasėlio konversijos grupėse stebėtas reikšmingas skirtumas tarp CRB koncentracijų, CRB nebuvo naudingas prognozuojant skreplių pasėlio konversiją.

CRB nėra specifiskas uždegiminis biožymuo, ir kadangi pats vienas CRB turi žemą prognostinę vertę [327], kai kurių autorių TB atveju siūloma naudoti ne vieną biožymenį o jų rinkinius [8, 37]. Dėl šios priežasties, kartu su CRB pasirinkome vertinti ir du kitus biožymenis – sICAM-1 ir suPAR. Kaip jau minėta literatūros apžvalgos skiltyje, ir suPAR, ir sICAM-1 laikomi potencialiais TB biožymenimis ir yra susieti su TB išplitimu, ligos sunkumu bei prognoze [178, 179].

Kitų autorių duomenimis sICAM-1 koncentracijos nustatomos padidėję esant TB [328] ir nustatomos didesnės esant labiau išplitusiai TB [109]. Siawaya et al [325] tyrime nustatyta, kad sICAM-1 koncentracijos reikšmingai nekito iki tryliktos TB gydymo savaitės, tuo tarpu Demir et al [33] tyrimo metu nustatyta, kad po 1 mėnesio TB gydymo sICAM-1 koncentracija reikšmingai sumažėjo. Nustatyti statistiškai reikšmingi sICAM-1 koncentracijos skirtumai tarp TB ir kitų plaučių ligų (pneumonijos, bronhektazių, plaučių vėžio) [33]. Reikalinga atkreipti dėmesį, kad ir anksčiau atliktuose tyrimuose, nagrinėjančiuose sICAM-1 reikšmę TB gydymo monitoravime, ir mūsų tyrime naudotos salyginai mažos tiriamųjų grupės.

Įvairių autorių duomenys leidžia teigti, kad suPAR TB gydyme gali turėti savo vertę: V. Indumati et al. [185] tyrimo metu nustatyta, kad suPAR koncentracija reikšmingai sumažėjo po dviejų TB gydymo mėnesių, o Paulo Rabna et al. [184] tyrimo metu pademonstruota, kad didesnės suPAR koncentracijos prieš pradėdant TB gydymą susiję su didesne mirties nuo TB tikimybe. H. Schulman et al. [35] tyrime parodyta, kad TB aktyvumas koreliuoja su suPAR koncentracija kraujyje. Vis tik, tiriant TB sergančius vaikus, suPAR koncentracijos kitimo po dviejų TB gydymo mėnesių nebuvo rasta [187]. Prieštarin-gi rezultatai vertinant suPAR biožymens naudą TB atveju taip pat tikriausiai gali būti dėl mažų tiriamųjų grupių.

Nepavyko rasti nei vieno publikuoto tyrimo, kurio metu būtų vertinta suPAR ar sICAM-1 įtaka skreplių pasėlio konversijai esant TB, todėl negalime detaliau palyginti mūsų gautų rezultatų su kitų autorių duomenimis.

3.5. T limfocitų populiacijų sąsajos su tuberkuliozės gydymo išėjimais ir tuberkuliozės sukelta plaučių destrukcija

3.5.1. T limfocitų populiacijos ir tuberkuliozės gydymo išėjys

Gydymo išėjys vertintos atskirai jautrios TB grupėje (siekiant kad rezultatu neiškreiptų skirtingas gydymas) ir bendrai tarp visų TB pacientų. Atskirai nevertintos mono-/poli- vaistams atsparios ir DVA-TB grupės dėl per mažo tiriamųjų skaičiaus. Šiam uždaviniui naudotos tik pradinės (prieš gydymą išmatuotos) T limfocitų populiacijų reikšmės.

Pradiniai T limfocitų populiacijų dydžiai pateikiami 3.5.1.1 lentelėje.

3.5.1.1 lentelė. Pradiniai T limfocitų populiacijų dydžiai, pacientams, kuriems nustatyta jautri vaistams plaučių tuberkuliozė ir bendroje tuberkuliozės grupėje

Limfocitai ir T limfocitų populiacijos	Jautrios vaistams tuberkuliozės grupėje, mediana [IQR]	Bendroje tuberkuliozės grupėje (neskirstant pagal atsparumą), mediana [IQR]
Bendras limfocitų kiekis (N) $\times 10^9/l$	1,53 [1,14–2,15]	1,61 [1,24–2,22]
Bendras limfocitų kiekis (proc.)	19,85 [12,95–26,6]	21,4 [13,6–28]
CD3+ ($\times 10^9/l$)	0,99 [0,59–1,50]	1,07 [0,72–1,55]
CD3+ (proc.)	66,55 [52,4–71,52]	68,2 [56,2–73,1]
CD4+ ($\times 10^9/l$)	0,64 [0,33–0,85]	0,68 [0,43–0,9]
CD4+ (proc.)	63,0 [53,27–70,6]	63 [56,8–70,1]
CD8+ ($\times 10^9/l$)	0,34 [0,21–0,55]	0,41 [0,25–0,55]
CD8+(proc.)	35,25 [29,03–43,15]	34,6 [29,3–42,8]
CD4/CD8	1,79 [1,21–2,45]	1,8 [1,34–2,39]
CD4+/CD45RA+/CD27- ($\times 10^9/l$)	0,004 [0,002–0,02]	0,006 [0,001–0,02]

3.5.1.1 lentelės tęsinys

Limfocitai ir T limfocitų populiacijos	Jautrios vaistams tuberkuliozės grupėje, mediana [IQR]	Bendroje tuberkuliozės grupėje (neskirstant pagal atsparumą), mediana [IQR]
CD4+/CD45RA+/CD27- (proc.)	0,7 [0,07–3,4]	1 [0,2–3,2]
CD4+/CD45RA+/CD27+ ($\times 10^9/l$)	0,2 [0,11–0,37]	0,25 [0,13–0,37]
CD4+/CD45RA+/CD27+ (proc.)	40,65 [30,55–54,9]	38,9 [25,7–51,4]
CD4+/CD45RA-/CD27- ($\times 10^9/l$)	0,06 [0,03–0,1]	0,07 [0,04–0,12]
CD4+/CD45RA-/CD27- (proc.)	11,2 [7,07–16,9]	12,3 [7,3–18,1]
CD4+/CD45RA-/CD27+ ($\times 10^9/l$)	0,29 [0,14–0,4]	0,29 [0,16–0,42]
CD4+/CD45RA-/CD27+ (proc.)	41,6 [35,73–51,05]	41,8 [36–51,5]
CD8+/CD45RA+/CD27- ($\times 10^9/l$)	0,07 [0,02–0,15]	0,09 [0,02–0,16]
CD8+/CD45RA+/CD27- (proc.)	23,0 [13,25–44,35]	22,7 [13,1–43,8]
CD8+/CD45RA+/CD27+ ($\times 10^9/l$)	0,09 [0,04–0,15]	0,1 [0,05–0,17]
CD8+/CD45RA+/CD27+ (proc.)	23,7 [14,7–38,95]	24,2 [16–40,6]
CD8+/CD45RA-/CD27- ($\times 10^9/l$)	0,06 [0,03–0,11]	0,06 [0,03–0,11]
CD8+/CD45RA-/CD27- (proc.)	15,3 [10,18–26,15]	15,3 [9,8–25]
CD8+/CD45RA-/CD27+ ($\times 10^9/l$)	0,08 [0,04–0,12]	0,09 [0,05–0,13]
CD8+/CD45RA-/CD27+ (proc.)	22,15 [13,48–30,75]	23,4 [14–32]
CD8+/CD38- ($\times 10^9/l$)	0,27 [0,17–0,5]	0,33 [0,19–0,49]
CD8+/CD38- (proc.)	83,35 [70,45–90,57]	84,4 [72,4–90,3]
CD8+/CD38+ ($\times 10^9/l$)	0,05 [0,02–0,1]	0,06 [0,03–0,09]
CD8+/CD38+ (proc.)	16,65 [9,42–29,55]	15,6 [9,7–27,6]

IQR – interkvartilinis plotis.

Jautrios vaistams TB grupėje sėkminga gydymo išeitis (pasveikimas) nustatyta 53 pacientams, nesėkminga – 9 (gydymo nutraukimas (4) ar mirtis (5)). Vertinant jautrios vaistams TB grupę, tarp skirtingų gydymo išeičių pacientų rasti statistiškai reikšmingi, vėliau išvardintų, prieš TB gydymą tirtų, limfocitų populiacijų skirtumai. Reikšmingai skyrėsi bendras limfocitų kiekis tarp skirtingų gydymo išeičių grupių. Didesnis limfocitų kiekis stebėtas pacientams, kurių gydymo išeitis buvo sėkminga ($p = 0,001$). Taip pat nustatyta, kad nesėkmingos gydymo išeities pacientų grupėje statistiškai reikšmingai mažesnės buvo šios T limfocitų populiacijos: CD3+ ($p < 0,001$); CD4+ ($p = 0,001$); CD8+ ($p < 0,001$); CD4+/CD45RA+/CD27+ ($p = 0,021$); CD4+/CD45RA-/CD27+ ($p < 0,001$); CD8+/CD45RA+/CD27- ($p < 0,001$); CD8+/CD45RA+/CD27+ ($p < 0,001$); CD8+/CD45RA-/CD27+ ($p = 0,032$); ir CD8+/CD38- ($p < 0,001$). Lyginant procentinę T limfocitų populiacijų dalį tarp visų limfocitų, pastebėta, kad procentinė CD4+/CD45RA-/CD27+ ($p < 0,001$), CD8+/CD45RA-/CD27+ ($p = 0,032$), ir CD8+/CD38- ($p < 0,001$) dalis buvo mažesnė nesėkmingos gydymo išeities pacientų grupėje. Vis tik atliekant logistinę regresinę analizę nebuvo stebėta, kad kuri nors T limfocitų

populiacija turėtų statistiškai reikšmingą įtaką jautrios vaistams TB gydymo išėičiai.

Vertinant TB bendrai ir neskirstant pagal atsparumą vaistams, skirtingų gydymo išėičių grupėse rasti statistiškai reikšmingi skirtumai ($p < 0,05$) mažesnėje tirtų T limfocitų populiacijų dalyje (žr. 3.5.1.2 lentelę).

3.5.1.2 lentelė. T limfocitų populiacijų skirtumai tarp sėkmingos ir nesėkmingos gydymo išėities pacientų bendroje tuberkuliozės grupėje. Pateikiamos tik tos populiacijos, kurios reikšmingai skyrėsi gydymo išėičių grupėse

Limfocitų populiacija	Sėkminga gydymo išėitis, mediana [IQR] N = 86	Nesėkminga gydymo išėitis, mediana [IQR] N = 13
CD8+/CD45RA+/CD27+ (proc.)	26,5 [16,45–42,55]	17,1 [13,15–24,95]
CD8+/CD45RA+/CD27+ ($\times 10^9/l$)	0,11 [0,05–0,17]	0,04 [0,013–0,10]
CD4+/CD45RA+/CD27- (proc.)	0,85 [0,2–2,75]	2,0 [0,7–12,1]
CD8+/CD45RA-/CD27+ ($\times 10^9/l$)	23,85 [15,05–32,77]	13,7 [5,65–28,05]
CD8+/CD38- (proc.)	84,9 [73,0–90,57]	75,3 [43,8–84,3]
CD8+/CD38+ (proc.)	15,1 [9,42–27,0]	27,7 [15,7–56,2]

3.5.2. T limfocitų populiacijos ir skreplių pasėlio konversija

Skreplių pasėlio konversija vertinta atskirai jautrios, mono-/poli- atsparios TB ir DVA-TB grupėje ir bendrai tarp visų TB pacientų. Šiam uždaviniui naudotos tik pradinės (prieš gydymą išmatuotos) T limfocitų populiacijų reikšmės.

Jautrios vaistams TB grupėje reikšmingai skyrėsi bendras procentinis limfocitų kiekis tarp skirtingų konversijos po pirmojo gydymo mėnesio grupių ($p = 0,023$). Reikšmingi T limfocitų populiacijų skirtumai tarp konversijos grupių pateikiami 3.5.2.1 lentelėje.

3.5.2.1 lentelė. T limfocitų populiacijų skirtumai tarp jautria plaučių TB sergančių pacientų grupės kai skreplių pasėlio konversija įvyko ir grupės kai skreplių pasėlio konversija po pirmojo mėnesio gydymo neįvyko. Pateikiamos tik tos populiacijos, kurios reikšmingai skyrėsi

Limfocitų populiacija	Įvykusios konversijos grupė, mediana [IQR]	Neįvykusios konversijos grupė, mediana [IQR]	p reikšmė (Mann-Whitney U)
CD4+/CD45RA-/CD27- (proc.)	9,25 [5,82–12,42]	13,55 [9,57–21,7]	0,006
CD8+/CD45RA-/CD27- ($\times 10^9/l$)	0,056 [0,02–0,11]	0,064 [0,04–0,12]	0,037
CD8+/CD45RA-/CD27- (proc.)	11,75 [6,35–19,75]	20,5 [13,15–50,05]	0,002
CD8+/CD45RA+/CD27+ ($\times 10^9/l$)	1,31 [0,06–1,83]	0,07 [0,03–0,12]	0,011

3.5.2.1 lentelės tęsinys

Limfocitų populiacija	Įvykusios konversijos grupė, mediana [IQR]	Neįvykusios konversijos grupė, mediana [IQR]	p reikšmė (Mann-Whitney U)
CD8+/CD45RA+/CD27+ (proc.)	31,4 [21,85–45,55]	19,7 [12,92–28,72]	0,016
CD8+/CD38- (proc.)	89,1 [79,15–95,12]	84,9 [70,87–90,07]	0,033
CD8+/CD38+ (proc.)	10,9 [4,87–20,85]	15,1 [9,92–29,12]	0,033

Mono-/poli- vaistams atsparios ir DVA-TB grupėje reikšmingų T limfocitų populiacijų skirtumų tarp konversijos grupių nerasta.

Vertinant TB bendrai ir neskirstant pagal atsparumą vaistams, stebėta, kad reikšmingai skyrėsi bendras limfocitų kiekis tarp skirtingų konversijos grupių ($p = 0,007$). Didėnis limfocitų kiekis stebėtas pacientams, kuriems skreplių pasėlio konversija įvyko (mediana 1,93 [1,31–2,35]), nei tiems, kuriems konversija neįvyko (mediana 1,6 [1,25–2,25]). Reikšmingi T limfocitų populiacijų skirtumai tarp konversijos grupių, neskirstant TB pagal atsparumą vaistams, pateikiami 3.5.2.2 lentelėje.

3.5.2.2 lentelė. *T limfocitų populiacijų skirtumai tarp plaučių TB sergančių pacientų grupės kai skreplių pasėlio konversija įvyko ir grupės kai skreplių pasėlio konversija po pirmojo mėnesio gydymo neįvyko. Pateikiamos tik tos populiacijos, kurios reikšmingai skyrėsi*

Limfocitų populiacija	Įvykusios konversijos grupė, mediana [IQR]	Neįvykusios konversijos grupė, mediana [IQR]	p reikšmė (Mann-Whitney U)
CD8+/CD45RA+/CD27+ ($\times 10^9/l$)	0,13 [0,08–0,19]	0,08 [0,04–0,14]	0,036
CD8+/CD45RA-/CD27- (proc.)	11,75 [6,5–19,67]	17,0 [12,1–26,8]	0,003

Atlikus dvireikšmės logistinės regresijos analizę, rasta, kad ir bendroje, ir jautrios vaistams TB grupėje skreplių konversijai įtakos gali turėti CD8+/CD45RA-/CD27- (proc.) populiacija ir bendras limfocitų skaičius (proc.) (lentelė 3.5.2.3). Jautrios vaistams TB grupėje taip pat stebėta kai kurių populiacijų įtaka konversijai. Teisinga išėičių klasifikacija jautrios vaistams TB grupėje 76,8 proc; bendroje TB grupėje 68,2 proc.

3.5.2.3 lentelė. Dvireikšmės logistinės regresijos analizė jautrios vaistams ir bendroje tuberkuliozės grupėje, vertinant kurios iš tirtų T-limfocitų populiacijų reikšmingai įtakoja skreplių pasėlio konversijos neįvykimą po pirmojo gydymo mėnesio. Pateikiamos tik tos populiacijos, kurios buvo statistiškai reikšmingos

Limfocitų (sub) populiacija	Beta koeficientas	Standartinis nuokrypis	p reikšmė	Šansų santykis	95 proc. pasikliautinis intervalas	
Bendra TB grupė						
Limfocitų bendras skaičius (proc.)	-0,069	0,027	0,009	0,933	0,885	0,983
CD8+/CD45RA-/CD27- (proc.)	0,074	0,028	0,007	1,077	1,020	1,136
Jautrios vaistams TB grupė						
Limfocitų bendras skaičius (proc.)	-0,117	0,045	0,009	0,890	0,815	0,972
CD8+/CD45RA-/CD27- (proc.)	0,075	0,036	0,035	1,078	1,005	1,156
CD4+/CD45RA-/CD27- (proc.)	0,153	0,064	0,017	1,165	1,028	1,321

Atlikus dvireikšmės logistinės regresijos analizę, šias populiacijas (CD8+/CD45RA-/CD27- (proc.); CD4+/CD45RA-/CD27- (proc.)) bei bendrą limfocitų skaičių procentais padalinus per medianą bendroje TB grupėje, gauti rezultatai pateikiami 3.5.2.4 lentelėje.

3.5.2.4 lentelė. Dvireikšmės logistinės regresijos analizės rezultatai bendroje tuberkuliozės grupėje, vertinant CD8+/CD45RA-/CD27- (proc.); CD4+/CD45RA-/CD27- (proc.) bei bendro limfocitų skaičiaus (proc.) įtaką skreplių pasėlio konversijos įvykimui. Pateikiamos tik tos populiacijos, kurios buvo statistiškai reikšmingos

Limfocitų grupė	Beta koeficientas	Standartinis nuokrypis	p reikšmė	Šansų santykis	95 proc. pasikliautinis intervalas	
Limfocitų bendras skaičius (≤21,45/>21,45 proc.)	1,476	0,692	0,033	4,376	1,128	16,971
CD8+/CD45RA-/CD27- (≤15,3/>15,3 proc.)	-1,178	0,480	0,014	0,308	0,120	0,789

Kaip matome lentelėje 3.5.2.4, jei bendras limfocitų skaičius, prieš pradedant gydymą viršijo 21,45 proc. tarp visų leukocitų, konversijos įvykimo tikimybė padidėjo maždaug 4 kartus. Jei CD8+/CD45RA-/CD27- prieš pradedant gydymą viršijo 15,3 proc. tarp visų T limfocitų, skreplių pasėlio kon-

versijos įvykimo tikimybė mažėjo maždaug 3 kartus (RR 3,249, 95 proc. PI 1,267–8,326, $p = 0,014$).

CD4+/CD45RA-/CD27- populiacijos dydis turėjo įtakos skreplių pasėlio konversijai tik vaistams jautrios TB grupėje. Konversijos tikimybė sumažėjo 1,16 karto, jei CD4+/CD45RA-/CD27- populiacija prieš pradėdant tuberkuliozės gydymą viršijo 12,6 proc. visų T limfocitų.

3.5.3. T limfocitų populiacijų ir tuberkuliozės sukeltos plaučių destruktijos sąsajos

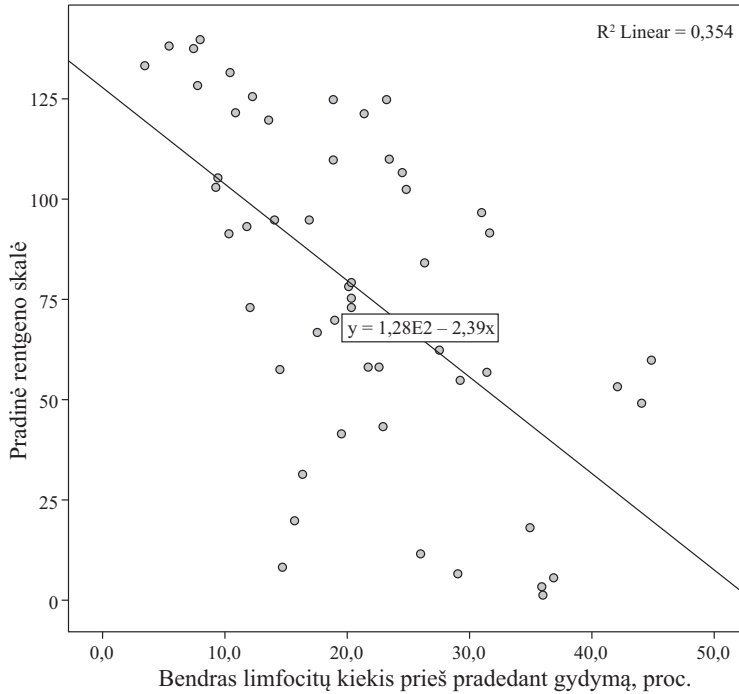
Šiam uždaviniui vertinti TB grupės neskirstytos pagal atsparumą vaistams (mūsų rezultatai tik su jautrios vaistams TB grupe pateikti straipsnyje „Is analysis of inflammatory biomarkers and lymphocyte populations useful in prediction of tuberculosis treatment outcomes?“). Naudoti T limfocitų populiacijų bei krūtinės ląstos rentgenogramos skalės įverčiai prieš pradėdant plaučių TB gydymą ir po 5 mėnesių TB gydymo.

Tikrinant duomenų pasiskirstymą pagal normalumą, krūtinės ląstos rentgenogramos skalės įverčiai pasiskirstę normaliai, tačiau dauguma T limfocitų populiacijų – nenormaliai, todėl šio uždavinio vertinimui pasirinktas Spearman koreliacijos koeficientas. 3.5.3.1 lentelėje pateikiamos statistiškai reikšmingos sąsajos tarp pradinių rentgeno skalės ir T limfocitų populiacijų bei bendro limfocitų skaičiaus.

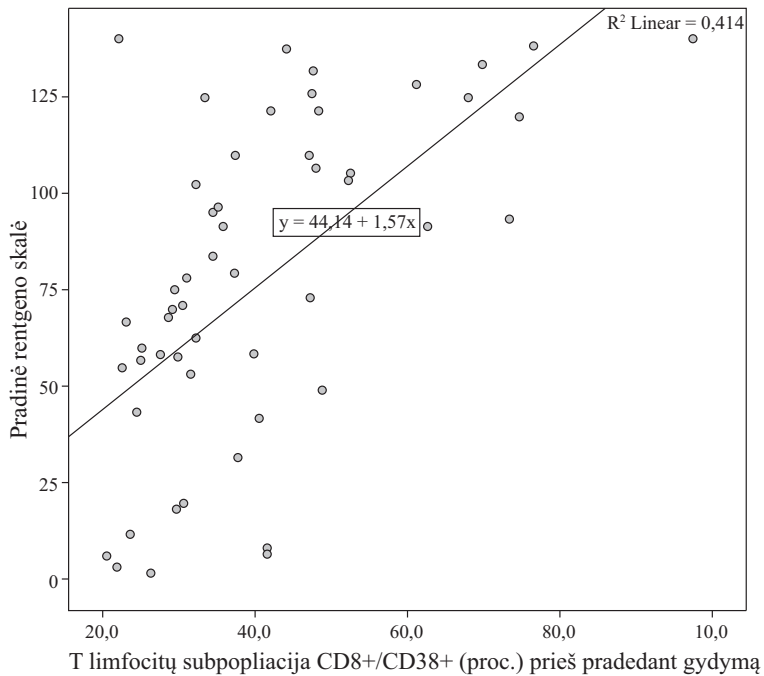
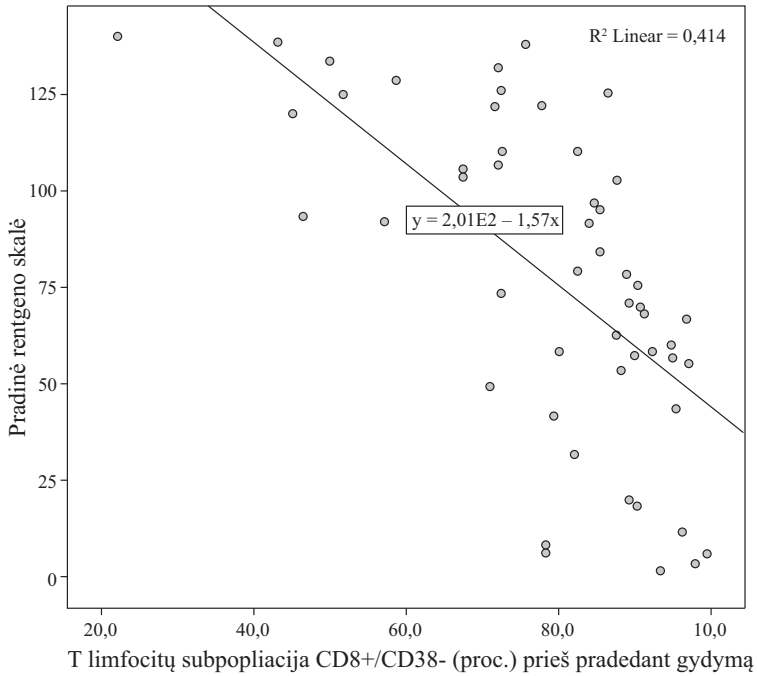
3.5.3.1 lentelė. Statistiškai reikšmingos sąsajos tarp pradinių rentgeno skalės ir limfocitų populiacijų dydžio bendroje tuberkuliozės grupėje neskirstant pagal atsparumą vaistams

Limfocitų populiacija	Sąsaja su rentgeno skale (Spearman koreliacijos koeficientas)	P reikšmė
Bendras limfocitų skaičius ($\times 10^9/l$)	-0,355	0,001
Bendras limfocitų skaičius (proc)	-0,625	<0,001
CD3+ ($\times 10^9/l$)	-0,433	<0,001
CD3+ (proc.)	-0,404	<0,001
CD4+ ($\times 10^9/l$)	-0,419	<0,001
CD8+ ($\times 10^9/l$)	-0,411	<0,001
CD4+/CD45RA-/CD27+ (proc.)	0,265	0,018
CD4+/CD45RA-/CD27+ ($\times 10^9/l$)	-0,493	<0,001
CD4+/CD45RA-/CD27- ($\times 10^9/l$)	-0,334	0,002
CD8+/CD45RA-/CD27+ ($\times 10^9/l$)	-0,46	<0,001
CD8+/CD45RA-/CD27+ (proc.)	-0,229	0,041
CD8+/CD38- ($\times 10^9/l$)	-0,478	<0,001
CD8+/CD38- (proc.)	-0,649	<0,001
CD8+/CD38+ (proc.)	0,649	<0,001

Kaip matoma 3.5.3.1 lentelėje, stiprios sąsajos ($\geq 0,7$) tarp limfocitų ir rentgeno skalės pradinių įverčių nerasta, tačiau stebėtos vidutinės, silpnos sąsajos. Stipriausių (vidutinio stiprumo) sąsajų grafikai pateikiami 3.5.3.1; 3.5.3.2 paveikslėliuose.



3.5.3.1 pav. Pradinės krūtinės ląštos rentgenogramos skalės sąsajos su bendru limfocitų kiekiu procentais pacientams, kuriems nustatyta plaučių tuberkuliozė, prieš pradant gydymą



3.5.3.2 pav. Pradinės krūtinės ląstos rentgenogramos skalės sąsajos su CD8+/CD38- ir CD8+/CD38+ limfocitų populiacijų kiekiu procentais pacientams, kuriems nustatyta plaučių tuberkuliozė, prieš pradedant gydymą

Lyginant krūtinės ląstos rentgenogramos skalę, pakartotinai vertintą po 5 mėnesių ir pradinius tėkmės citometrijos rezultatus, statistiškai reikšminga sąsaja stebėta rečiau. Vidutinio stiprumo sąsaja nustatyta tarp rentgeno skalės ir bendro limfocitų skaičiaus procentais (-0,408, $p = 0,003$); CD8+/CD38- (proc.) (-0,435, $p = 0,002$); CD8+/CD38+ (proc.) (0,435, $p = 0,002$). Lyginant krūtinės ląstos rentgenogramos skalės po 5 gydymo mėnesių ir limfocitų populiacijų po 5 mėnesių sąsajas statistiškai reikšmingų sąsajų nerasta.

3.5.4. Rezultatų aptarimas

T limfocitų atsakas yra būtinas efektyviam imuniniam atsakui į *M. tuberculosis* infekciją. Šis atsakas gali būti detaliau aprašomas vertinant T limfocitų fenotipus periferiniame kraujyje [176]. Dalis tyrėjų renkasi vertinti imuniteto atsaką į TB tirdami *in vitro* stimuliuotus limfocitus, kad įvertintų specifinį atsaką į TB [329], tačiau mes nusprendėme ištirti nespecifines T limfocitų populiacijas, nes atlikti šiuos tyrimus klinikinėje praktikoje būtų pigiau ir paprasčiau. Tyrimų su nespecifiniais T limfocitais TB atveju iki šiol nėra daug [176, 330, 331].

T limfocitų populiacija, kuri tarp skirtingos išeities grupių bendroje TB grupėje statistiškai reikšmingai skyrėsi tiek procentine išraiška, tiek absoliučiu apskaičiuotu ląstelių kiekiu buvo tik CD8+/CD45RA+/CD27+. Tai naivūs efektoriniai limfocitai (žymenys CD27 ir CD45RA ekspresuojami naivių, ankstyvos diferenciacijos efektorinių T limfocitų [169, 332]). CD4+ T limfocitai turintys žemą CD27 raišką aprašomi kaip aktyvios TB biožymuo [333, 334], o mažėjanti CD27 raiška gali rodyti, kad dėl ekspozicijos antigenų vyksta T limfocitų efektorių diferenciacija [333]. Mūsų tyrimo metu gauti rezultatai rodo, kad nesėkmingos TB gydymo išeities atveju CD8+/CD45RA+/CD27+ populiacijos nustatoma statistiškai reikšmingai mažiau. Nors šiame tyrime neįrodėme, kad pradinis šios populiacijos limfocitų kiekis gali turėti įtaką TB gydymo išeičiai, galbūt būtų tikslinga ištirti didesnę kiekį pacientų norint gauti tikslesnius duomenis.

CD38 – transmembraninis glikoproteinas, imuninės aktyvacijos žymuo [174]. CD38+ atsiradimas yra susietas su ląstelinio imuniteto aktyvacija [335]. Yra duomenų, kad, lyginant su latentine TB, didesni CD8+/CD38+ T limfocitų kiekiai nustatomi asmenims sergantiems aktyvia TB [176], o pasveikus nuo TB TM specifiskų T limfocitų su ekspresuojamu CD38 sumažėja [174]. Tiriant nespecifinius T limfocitus TB ligos metu taip pat nustatytas didesnis procentinis CD38+ T limfocitų kiekis, nei sveikiems savanoriams [176]. Šio tyrimo autorių nuomone, tai susiję su bendra T limfocitų aktyvacija esant aktyviai TB infekcijai [176]. Mūsų tyrimo metu nestebėta, kad tarp gydymo išeičių grupių reikšmingai skirtingai populiacijos eks-

presuojančios CD38, tačiau stebėta, kad reikšmingai skyrėsi CD8+ limfocitų ekspresuojančių ir neekspresuojančių CD38 dalis tarp visų T limfocitų. Nesėkmingos gydymo išėties grupėje nustatyta didesnė CD8+/CD38+ dalis. Tai atitinka ir kitų autorių stebėtus pakitimus būdingus aktyviai TB infekcijai tiriant ir specifiskus TM limfocitus [174]. Mūsų tyrimo rezultatai rodo, kad esant TB, būdingi T limfocitų populiacijų pokyčiai gali būti nustatomi ir tiriant nespecifinius T limfocitus.

Vertinant T limfocitų populiacijų sąsają su TB sukelta plaučių destrukcija prieš gydymo pradžią, rasta statistiškai patikimų korelacijų. Didžiausios sąsajos rastos tarp bendro procentinio limfocitų kiekio ir CD8+/CD38+ bei CD8+/CD38- limfocitų populiacijų. Šie radiniai pagrįstų jau minėtus kitų autorių pastebėjimus, kad esant aktyviai TB ligai (o tuo pačiu tikriausiai ir didesnei destrukcijai plaučiuose) nustatomas didesnis CD38+ limfocitų skaičius [176]. Mažėjant bendram limfocitų skaičiui krūtinės ląstos rentgenogramos skalė didėja, kas taip pat iliustruoja jau anksčiau kitų autorių aprašytą teiginį, kad aktyvios TB metu vyksta ląstelinio imuniteto slopinimas [143]. Žinoma, ir tai, kad CD4+ ir CD8+ T limfocitų kiekis mažėja aktyvios TB atveju [336, 337], mažiau nustatoma ir CD3+ T limfocitų [330]. Prieinamoje literatūroje neradome jokio kito tyrimo, kurio metu būtų lyginamos nespecifinių T limfocitų populiacijos su radiologiniais aktyvios plaučių TB simptomais, todėl palyginti šio tyrimo rezultatų su kitais negalime.

IŠVADOS

1. Rūkantiems daugiau kaip 20 pakmečių, rizika neįvykti skreplių pasėlio konversijai po pirmojo tuberkuliozės gydymo mėnesio padidėjo. Alkoholio vartojimo įpročiai skreplių pasėlio konversijos dažniui įtakos turėjo daugeliui vaistų atsparios tuberkuliozės grupėje, kur skreplių pasėlio konversijos neįvykimo rizika buvo didesnė alkoholi vartojantiems asmenims. Skreplių pasėlio konversijos sąsajų su kitais tirtais paciento socialiniais veiksniais, kūno masės indeksu ir gyvenimo kokybės nerasta.
2. Atsparumas rifampicinui tarp naujai diagnozuotos tuberkuliozės nustatytas 28,7 proc. pacientų. Šiems pacientams rizika neįvykti skreplių pasėlio konversijai po pirmo gydymo mėnesio padidėjo 39 kartus. Vertinant atsparumą naujiems vaistams nuo tuberkuliozės patvirtintas tik vienas dalinio atsparumo bedakvilinui atvejis, linezolidui ir klofaziminui atsparumo nenustatyta.
3. Kuo didesnis tuberkuliozės išplitimas plaučiuose ir daugiau rūgščiai atsparių bakterijų skrepliuose prieš pradedant tuberkuliozės gydymą, tuo mažesnė skreplių pasėlio konversijos po pirmojo gydymo mėnesio tikimybė.
4. Skreplių pasėlio konversija, tuberkulioze sergantiems pacientams, įvyko dažniau, kai prieš tuberkuliozės gydymą C reaktyvusis baltymas (CRB) nebuvo padidėjęs. Skreplių pasėlio konversijos sąsajų su uždegimo žymenų (CRB, sICAM-1, suPAR) koncentracijomis kraujyje prieš pradedant plaučių tuberkuliozės gydymą nerasta. Sąsajų tarp albumino, vitamino D koncentracijų kraujyje prieš gydymą ir skreplių pasėlio konversijos nerasta.
5. Po pirmojo tuberkuliozės gydymo mėnesio nustatytos bendro limfocitų skaičiaus ir jų CD8+/CD45RA-/CD27- populiacijos sąsajos su skreplių pasėlio konversijos dažniu. CD4+/CD45RA-/CD27- populiacijos dydis turėjo įtakos skreplių pasėlio konversijai vaistams jautrios tuberkuliozės grupėje. Nustatytas tiesioginis ryšys tarp CD3+, CD4+, CD8+, CD4+/CD45RA-/CD27+, CD4+/CD45RA-/CD27-, CD8+/CD45RA-/CD27+, CD8+/CD38-, CD8+/CD38+ T limfocitų populiacijų ir plaučių pažeidimo apimtį, vertinant radiologiškai, tačiau T limfocitų ir jų populiacijų kiekio pokyčiai neturėjo įtakos tuberkuliozės gydymo išeitims.

PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

1. Vertinant turimus duomenis, rekomenduotume atlikti greitą genotipinį testą dėl tuberkuliozės mikobakterijų visais atvejais nustatčius didelės apimties plaučių pažeidimą radiologiškai bei didelį rūgščiai atsparių bakterijų (RAB) kiekį skrepliuose. Tai įgalina greitai pradėti tinkamą gydymą.
2. Nepaisant to, kad šiuo metu Lietuvoje atsparumo naujiems vaistams nuo tuberkuliozės praktiškai nenustatoma, remiantis kitų šalių duomenimis, atsparumas šiems vaistams palaipsniui didėja, todėl tikslinga ir toliau tirti atsparumą šiems vaistams gydant vaistams atsparią tuberkuliozę.
3. Svarbiausi veiksniai, leidžiantys prognozuoti skreplių pasėlio konversiją – rentgeninis plaučių pažeidimo išplitimas ir rūgščiai atsparių bakterijų kiekis skrepliuose prieš pradedant tuberkuliozės gydymą. Kol neįvyksta skreplių pasėlio konversija, dėl padidėjusio aplinkinių užkrečiamumo, šiuos pacientus būtina gydyti stacionare, taikant adekvačias infekcijos kontrolės priemones.
4. Mūsų nuomone, Anna P. Ralph ir kolegų pasiūlyta krūtinės ląstos rentgenogramos vertinimo skalė galėtų būti naudinga ir taikoma kasdieninėje klinikinėje praktikoje objektyvizuojant ir monitoruojant radiologinę tuberkuliozės išplitimą bei gydymo efektyvumą.
5. Pacientai, sergantys plaučių tuberkulioze, turėtų būti skatinami atsiskyti rūkymo ir alkoholio vartojimo, nes šie žalingi įpročiai tiesiogiai susiję su blogesniais gydymo rezultatais.
6. Uždegiminiai žymenys suPAR, sICAM-1, galimai nėra naudingi klinikinėje praktikoje prognozuojant skreplių pasėlio konversijos įvykimą po pirmojo tuberkuliozės gydymo mėnesio.
7. Vertinant tuberkuliozės gydymo rezultatus, nespecifinių T limfocitų populiacijų tyrimas nebuvo naudingesnis nei bendro limfocitų kiekio matavimas, todėl manome, kad šie tyrimai greičiausiai nebus naudingi klinikinėje praktikoje. Šiems rezultatams patvirtinti reikėtų atlikti detalesnius tyrimus su didesnėmis tiriamųjų grupėmis.

SUMMARY

ABBREVIATIONS

AFB	– acid fast bacilli
BMI	– body mass index
CI	– confidence interval
CRP	– C reactive protein
DOT	– directly observed treatment
IQR	– interquartile range
LUHS	– Lithuanian University of Health Sciences
MDR-TB	– multidrug-resistant tuberculosis (resistant to at least isoniazid and rifampin)
MT	– <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
RR	– relative risk
SD	– standard deviation
SGRQ	– St. George Respiratory Questionnaire
sICAM-1	– soluble intercellular adhesion molecule-1
suPAR	– soluble urokinase-type plasminogen activator receptor
TB	– tuberculosis
WHO	– World Health Organization.

INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) – is an infectious, inflammatory disease caused by mycobacteria, belonging to *Mycobacterium tuberculosis* (MT) complex. Worldwide, TB is among the leading infectious killers [39].

Based on expert recommendations [5, 6], to reduce the incidence of TB, it is recommended to: identify socio-economic factors influencing the spread of TB; collect data on the molecular epidemiology of TB and prevent drug resistance; diagnose TB as early as possible; provide adequate TB treatment; seek new diagnostic methods and new safer, more effective, and shorter treatment regimens.

Depending on national laws and treatment recommendations, patients with positive sputum culture or microscopy may be isolated in hospital until they are no longer considered to be infectious. These patients are also usually hospitalized in Lithuania. It is recommended to repeat sputum cultures for mycobacteria after two months of treatment to assess sputum culture conversion [7]. Although sputum culture conversion after two months of treatment is a

good predictor of TB treatment success [8, 9], 2 months spent in hospital can have a significant impact on a patient's personal and professional life.

To date, there is no universally accepted single biomarker that can predict the outcome of TB treatment at an early stage. Such biomarker would be a major achievement in effective TB control, clinical trials of new anti-tuberculosis drugs, and, in the case of an individual patient, it could help to decide on whether treatment time can be shortened or if treatment failure can be suspected.

Study aim:

To evaluate the potential influence of social, laboratory and other factors on sputum culture conversion in the treatment of drug-susceptible and drug-resistant tuberculosis.

Objectives:

1. To evaluate the associations between social factors, smoking, body mass index (BMI), quality of life, and sputum culture conversion in drug-susceptible and drug-resistant tuberculosis (TB).
2. To determine the frequency of infection with drug resistant mycobacteria among the studied patients and to evaluate the influence of drug resistance on sputum culture conversion.
3. To determine and evaluate the associations between sputum culture conversion and the X-ray spread of TB-induced lung injury and the number of acid-fast bacilli (AFB) in sputum
4. To determine the changes of biochemical and immune markers (albumin, vitamin D, C-reactive protein (CRP), soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (suPAR)) in patients with TB and to evaluate their association with sputum culture conversion in the treatment of drug-susceptible and drug-resistant TB.
5. To determine and evaluate the associations of T lymphocyte populations in blood with sputum culture conversion, spread of TB-induced lung injury and TB treatment outcomes.

Novelty of the study

To date, it is not entirely clear what factors may affect sputum culture conversion in the treatment of TB. To our knowledge, there have been no such studies in Lithuania so far. We also found only a few published studies evaluating factors influencing sputum culture conversion in multidrug-resistant TB (MDR-TB) patients.

We also investigated some possible biomarkers as factors influencing sputum culture conversion and treatment outcomes. In addition to CRP, various immune markers are being investigated. Many of them are not specific for TB and their practical benefits are not yet clear. Based on the current literature, we chose sICAM-1, suPAR and non-specific T-lymphocyte populations as possible TB biomarkers. Data on the association of these molecules with clinical or other treatment efficacy criteria are not yet sufficient. Chest X-ray is one of the cornerstones in the diagnosis of TB and the assessment of the severity of the disease, but no studies have been performed to evaluate the association of radiological TB spread with the biomarkers used in our study.

We also chose to evaluate the frequency of TB drug resistance among the studied patients. Among the drugs studied, were some of the newest drugs for TB treatment: bedaquiline, clofazimine and linezolid. No studies on resistance to these drugs and the effect of this resistance on sputum conversion have been performed in Lithuania.

METHODS

The study was performed at the hospital Lithuanian University of Health Sciences Kaunas Clinics (LUHS KC), Clinic of Pulmonology. All patients admitted to the LUHS KC affiliated hospital Romainiai TB Hospital from April 2016 to April 2018 who met the inclusion criteria and did not have the exclusion criteria were asked to participate in the study. Patients were treated in an inpatient setting for at least 1 month under directly observed treatment (DOT).

Only subjects who have signed an informed consent form were included in the study.

The resistance to new TB drugs (bedaquiline, clofazimine, linezolid) has been determined in an international clinical trial. Permission to use the data of this study for the dissertation has been obtained.

Inclusion criteria were the following: men and women 18 to 90 years of age with bacteriologically suspected (acid fast bacilli (AFB) in sputum microscopy) of confirmed (growth of MT in sputum culture) pulmonary TB for the first time in their lifetime.

Exclusion criteria were: pregnant or breastfeeding women; persons with autoimmune diseases; persons diagnosed with oncological disease within a period of 5 years; patients with other mental and/or internal organ diseases and conditions that may affect the levels of immune markers or are considered by the investigator to be an exclusion criterion.

The duration of the participation in the study was one year or until the end of treatment if drug-resistant TB was detected.

After signing the informed consent form, before the start of the treatment, patient completed St. George's Respiratory Questionnaire (SGRQ), medical and social history (citizenship, place of residence (urban/rural /without a residence), marital status, education, occupation (employed/unemployed), gender, age, history of drug use) was clarified, chest X-ray was done, peripheral blood was drawn for CRP, albumin, vitamin D. Peripheral blood was also drawn for suPAR, sICAM-1 testing with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and for immunophenotypic characterization of peripheral T lymphocytes by flow cytometry. Sputum was inoculated into liquid medium for bacteriological confirmation of TB and drug resistance testing. Chest X-ray scale score was calculated by a method described by Anna P. Ralph et al. [287]. Testing for antibodies to HIV1/HIV2 and p24 antigens was performed according to national guidelines. If HIV infection was confirmed, the patient was excluded from the study.

If pulmonary TB was diagnosed and susceptibility to first-line anti-TB drugs was known, or still pending treatment with the drug-susceptible TB regimen was initiated (2HREZ/4HR: isoniazid, rifampicin, ethambutol, pyrazinamide for the first two months and then isoniazid and rifampicin for four more months). If drug resistance was detected during treatment, treatment regimen was adjusted according to national guidelines. Longer of the available treatment regimens were assigned to the MDR-TB patients. The start of treatment was the day on which the patient was first prescribed anti-TB drugs.

One month after the start of treatment, sputum microscopy for AFB and sputum culture for TM was repeated, blood was drawn for CRP, suPAR and sICAM-1 testing.

Five months after starting treatment, chest X-ray was performed again, sputum microscopy for AFB and sputum culture for MT was performed, blood was drawn for CRP, suPAR, sICAM-1 and immunophenotypic characterization of peripheral T lymphocytes.

One year after the start of treatment (or after completion of TB treatment if patient was diagnosed with MDR-TB), the patient or his physician was contacted to find out the outcome of the TB treatment. Outcomes for TB treatment were divided into two groups according to WHO definitions: successful treatment (cured); treatment failure (death, loss to follow-up).

Patient inclusion is shown schematically in Figure 1.

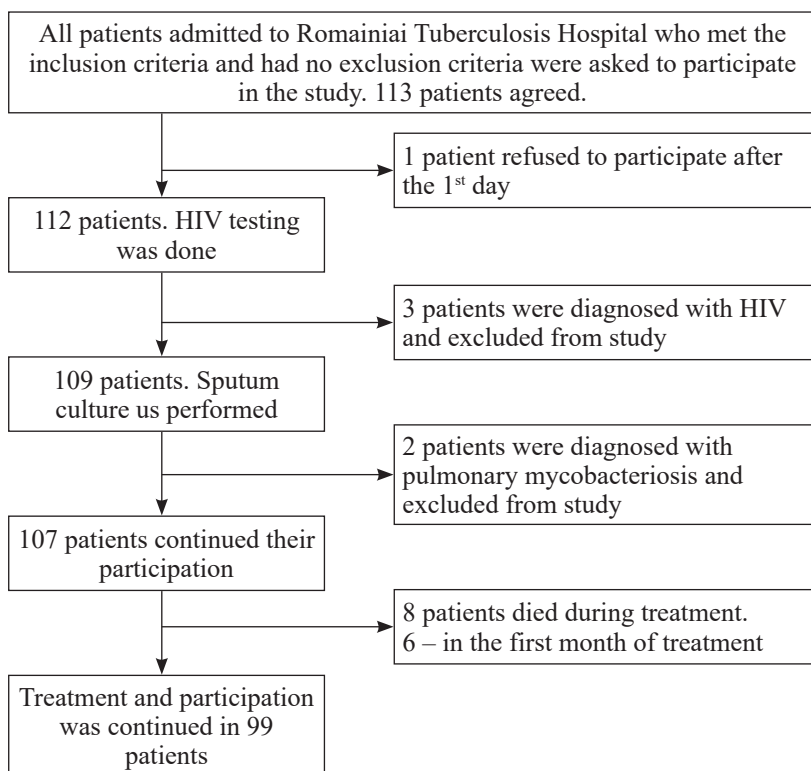


Figure 1. Patient inclusion diagram.

Evaluation of the quality of life

St. George’s Respiratory Questionnaire (SGRQ) was used to assess the quality of life. It is a standardized questionnaire used to measure disorder of health and quality of life in respiratory diseases. It is designed to compare differences in health between individual patients and changes in the quality of life during treatment. The questionnaire assesses the severity of the symptoms of the disease, the activity of the patient and the impact of the disease on the patient’s daily life in 76 questions. It takes 8-15 minutes to complete the questionnaire. In previous studies, SGRQ results have significantly correlated with other signs of disease activity, such as cough, dyspnea, 6-minute walking test, and forced expiratory volume in the first second.

The numerical value of SGRQ was calculated with a calculator prepared in *MS Excel*. The overall score was calculated, as well as separate results for symptoms, activity and disease effect which are presented on a scale from 0 to 100. In our study we used the official Lithuanian version of the SGRQ and the calculator available on the St. George University page with the permission of the organization.

The first question of the questionnaire when patients rate their overall health condition on a five-point scale from 1 (very good) to 5 (very poor) was presented separately in the results section.

Evaluation of smoking history

The smoking history was assessed by the calculation of pack-years. The number pack-years was calculated on the basis of a patient survey – the number of packs of cigarettes smoked per day was multiplied by the number of years of smoking and expressed in numerical terms.

Evaluation of chest X-ray

Chest radiographs were evaluated using a scale described by Anna P. Ralph and colleagues [287]. The numerical score from 0 to 140 was used to describe lung injury caused by pulmonary TB. For the evaluation of each radiograph, the following steps were performed: the radiologist divided the visible image of the lungs into six zones of approximately equal size in two horizontal lines. The image was then evaluated from top to bottom by comparing the left and right sides and assessing what percentage of the visible lung image in each area was damaged. The assessment was made whether the injury was focal or homogeneous. If the injury was focal, the percentage was multiplied by 0.5, if homogeneous – the percentage was multiplied by 1. If cavitation was observed on the radiograph, 40 was added to the number obtained. The numerical value of the scale was given by the following formula: the percentage of lung injury + 40 (if cavitation was detected).

In our study, the evaluation of chest radiographs was performed by an experienced radiologist who specializes in the evaluation of pulmonary radiology.

Sputum smear for acid-fast bacilli

Sputum smear for acid-fast bacilli (AFB) was performed in two stages according to the methodology approved by the clinic of Laboratory Medicine of the Lithuanian University of Health Sciences (LUHS): the sample was first stained by the fluorescence method, followed by the Ziehl-Neelsen method if the sample showed a characteristic glow.

The results were presented according to the system proposed by the WHO and International Union Against Tuberculosis and Lung Disease: “scanty” or recording the number of bacteria found (1-9 AFB after reviewing 100 fields of oil immersion); “1+” (10–99 AFB after reviewing 100 oil immersion fields); “2+” (1–10 AFB per field of oil immersion) and “3+” (> 10 AFB per field of oil immersion).

Sputum culture for *Mycobacterium tuberculosis*

Prior to inoculation, the test sample was treated to eliminate non-specific microorganisms and to liquefy the sample itself. Solid and liquid media were used to grow mycobacteria. Liquid media were used during initial diagno-

sis, and solid media were used to evaluate the treatment efficacy and sputum culture conversion. Sputum culture conversion was defined as two consecutive negative cultures after the first sputum sample, collected at least 30 days apart. Culture conversion time was reported as the date where the first negative sample was collected.

The samples were delivered to the laboratory in a sterile Falcon tube within 2 hours after collection. Then samples were filled with NALC-NaOH solution and centrifuged after 15 to 20 minutes. The supernatant was then aspirated and the sediments were mixed with 1–2 mL of phosphate buffer. The inoculum was inoculated into Levenstein-Jensen medium (solid medium) or BACTEC MGIT 960 (liquid medium). A smear for AFB microscopy was prepared from the remaining sediment. The culture was incubated in a CO₂ incubator at 37°C for up to 8 weeks (solid medium) or 6 weeks (liquid medium). If growth was detected, a smear was prepared from the pure culture for microscopy. If bacterial contamination was ruled out, mycobacteria were identified and the susceptibility of MT complex bacteria to anti-TB drugs was determined.

Drug susceptibility in our study was determined by phenotypic methods. Resistance to second-line anti-TB drugs was determined in the samples of patients whose sputum cultures had grown poly-drugresistant or multi-drug resistant MT isolates. Minimal inhibitory concentration for bedaquiline was measured by microdilution of 7H11 agar and 7H9 broth using specially prepared frozen *Thermo Fisher* plates and following the manufacturer’s instructions. For other drugs, only the 7H9 broth microdilution method was used, using specially prepared frozen *Thermo Fisher* plates and following the manufacturer’s instructions. Drugs and dilution intervals are listed in Table 1.

Table 1. *Drugs and broth dilution intervals*

Drug name	Interval (µg/mL)	Quality control interval (µg/mL)
Bedaquiline	0.008–4	0.015–0.06
Rifampicine	0.06–4	0.03–0.25
Isoniasid	0.03–16	0.03–0.12
Ethambutol	0.25–16	0.25–2
Ofloxacin	0.12–8	0.25–2
Levofloxacin	0.06–4	0.12–1
Moxifloxacin	0.06–4	0.06–0.5
Kanamycin	0.12–16	0.25–2
Amikacin	0.12–16	0.25–2
Capreomycin	0.12–16	0.5–4
Linezolid	0.12–8	0.25–2
Clofazimine	0.015–4	0.03–0.25

Peripheral blood testing

Laboratory tests were performed in the laboratory of Department of Laboratory Medicine of LHUS. Peripheral blood was collected for analysis in *BD Vacutainer K3EDTA* tubes. CRP was determined using the *Becman Coulter UniCel DxC Synchron 800* clinical biochemistry system (USA). The normal CRP value was <7.5 mg/L. The results of the vitamin D test were divided into the following ranges: <50 nmol/L – vitamin D deficiency, 51–69 nmol/L – insufficiency, 70–250 nmol/L optimal vitamin D concentration, >250 nmol/L – intoxication. Normal albumin concentration limits were 35–48 g/L.

Peripheral blood for ELISA assays was collected into plain BD Vacutainer tubes (BD, USA), centrifuged at 1600×g for 15 min. Sera were separated from the blood, aliquoted and stored at –70°C temperature until analysis. Serum suPAR was assessed using commercial kits Human suPAR ELISA (BioVendor – Laboratorní medicína, Czech Republic) according to manufacturer's instructions. Lower detection limit was 5.1 pg/mL for suPAR. *RayBio* Human sICAM-1 ELISA commercial kits (RayBiotech, USA) with a lower detection limit of 150 pg/mL were used for assessment of sICAM-1 in serum. CRP level was detected using clinical chemistry system *Becman Coulter UniCel DxC Synchron 800* (USA).

For flow cytometry cell aliquots were directly stained following a standard procedure with monoclonal anti-human antibodies (BD Biosciences Pharmingen, USA): CD3 (FITC, clone UCHT1), CD4 (PE-CyTM7, clone SK3), CD8 (APC-CyTM7, clone SK1), CD45RA (PerCP-CyTM5.5, clone HI100), CD27 (APC, clone M-T271), CD38 (PE, clone HIT2). Subsequently samples were analysed using *FACS Canto flow cytometer* (BD Immunocytometry Systems, USA). The T lymphocyte population was identified based on side scatter and the level of CD3 expression. The number of positive cells with CD expression was evaluated as a percentage of cells in the T lymphocyte gate. These T-cell subsets were assessed during analysis: CD4⁺/CD45RA⁺/CD27⁺ (naive); CD4⁺/CD45RA⁻/CD27⁺ (memory); CD4⁺/CD45RA⁺/CD27⁻; CD4⁺/CD45RA⁻/CD27⁻ (memory/effector); CD8⁺/CD45RA⁺/CD27⁺ (naive); CD8⁺/CD45RA⁻/CD27⁺ (memory); CD8⁺/CD45RA⁺/CD27⁻ (cytotoxic effector); CD8⁺/CD45RA⁻/CD27⁻ (memory/effector); CD8⁺/CD38⁺/CD3⁺ (activated suppressor/cytotoxic); CD8⁺/CD38⁻/CD3⁺. Absolute counts of T-cell subsets were calculated from total cell counts, enumerated by automated hematology system *Sysmex XE-5000* (Sysmex Corporation, Japan).

Statistical analysis

The required sample size was calculated according to the formula for calculating the finite sample size:

$$[(Z^2) \times (P) \times (1 - p) \div (e^2)] \div [1 + (Z^2) \times (P) \times (1 - p) \div (e^2) \times (N)]$$

Where:

N – population of TB patients (888)

Z – 1.96

e – selected accuracy – 5%

P – population proportion – 4%

p – significance level.

Sample size – 55. The sample volume was estimated at 5% statistical significance with 95% confidence interval. Statistical analysis was performed using *SPSS v.23.0 Statistical Package for the Social Sciences* (Chicago, IL, USA).

Descriptive and analytical statistical methods were used. The normality of the data was assessed by the Kolmogorov and Smirnov test. Data with the normal distribution were presented as mean and standard error of mean, and data with no normal distribution were presented as median and interquartile range. Categorical variables were compared using the Pearson χ^2 test, continuous variables – using the Mann-Whitney U test. Spearman rank correlation coefficient was used to evaluate correlations. Binary logistic regression was used with dichotomous variables. When continuous variables were evaluated with binary logistic regression, they were recoded into a two-value variables, using the median as the cut-off between the two values.

The results were considered statistically significant when p was <0.05.

RESULTS AND DISCUSSION

A total of 62 drug- susceptible TB patients, 31 MDR-TB, and 14 mono- or poly-resistant TB patients were studied. 77 patients were men, 30 – women. The data was not normally distributed so the results are presented as median and interquartile range.

Median BMI in the drug-susceptible TB group was 21.53 [19.77–23.24], 21.71 [17.9–24.94] in mono- / poly-resistant TB group, 21.77 [20.13–24.22] in MDR-TB group. Patient demographics are presented in Table 2.

Table 2. Demographic data of study patients

	Drug-susceptible TB	Mono-/poly-resistant TB	MDR-TB
Gender: men/women	49/13	10/4	18/13
Age, yers (median, IQR)	37 [31.3–48]	37.25 [32.5–47,5]	29 [20–44]
Successfull/unsuccessfull treatment	53/9	12/2	28/3
Urban/rural living	28/34	7/7	18/12

Table 2 continued

	Drug-susceptible TB	Mono-/poly-resistant TB	MDR-TB
Education: secondary or lower/higher than secondary	38/24	8/6	16/15
Lives with family/lives alone	26/36	8/6	15/16
Student or employed/retired or unemployed	29/33	7/7	13/18

IQR – interquartile range; MDR-TB – multidrug-resistant TB.

Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* and the influence of drug resistance to sputum culture conversion

Among the patients studied, MDR-TB was detected in 28.7%. Resistance to rifampicin was identified in 31 patients (28.97%) and resistance to isoniazid – 45 patients (42.05%). Mono-resistance to rifampicin was not identified, therefore all patients with rifampicin resistance were confirmed to be MDR-TB patients.

Among the patients in the study, partial resistance to bedaquiline was found in one patient. MT resistance to linezolid was not identified. We found no patients with MT resistance to clofazimine or linezolid.

We also attempted to evaluate how drug resistance affects sputum culture conversion after the first month of TB treatment. We found there was an increased risk of non-conversion after the first month of TB treatment if resistance to rifampicin was detected (RR – 39.13, CI 3.04–503.8, $p = 0.005$).

Discussion

The percentage of MDR-TB among our patients was significantly higher than the total share of reported MDR-TB among new TB cases in Lithuania (11.7% according to European Center for Disease Prevention and Control [52]). Although our patients should accurately reflect the situation among patients in Kaunas region, it should be considered that some patients with TB were not included in the study due to exclusion criteria, such as HIV or other concomitant diseases and some did not agree to participate.

In our study we found that there was no mono resistance to rifampicin among the patients. According to other researchers, more than 90 percent of resistance to rifampicin is also associated with resistance to isoniazid, and rifampicin alone can be used as a marker for MDR-TB [288].

Among poly-resistant TB and MDR-TB patients, resistance to the new anti-TB drugs (bedaquiline, clofazimine and linezolid) has also been studied. These drugs are particularly important for the treatment of MDR-TB, as they are among the most effective, first choice drugs for MDR-TB [91]. Although

these drugs have only recently been introduced for the treatment of TB, there is already data on emerging resistance worldwide [79, 80].

Linezolid has been centrally administered to TB patients in Lithuania since 2016. To understand if we can expect wider linezolid resistance in the coming years it would be useful to study the situation in other countries. The first cases of linezolid-resistant MT in Germany were reported in 2007 (out of 210 isolates tested in the national reference laboratory, linezolid resistance was found in 4 patients (1.9%)) [289]. Later (in 2008–2013), a study in the same country found linezolid resistance in 3% of patients, although it is difficult to directly compare the results, since the latter study only assessed the migrant population [290]. In a 2019 study in South Africa, linezolid-resistant MT isolates were identified in approximately one-third of MDR-TB patients who have already experienced treatment failure [291]. According to these researchers, one of the reasons for such prevalent linezolid resistance, may have been that linezolid was added as an adjunct to the already failing TB treatment regimen. So although, according to the available data, resistance to linezolid in Lithuania is rarely detected, it cannot be ruled out that an increase in the frequency of linezolid resistance is expected in the future.

Clofazimine has not been used in Lithuania at the time of this study. This drug was introduced to hospitals in Lithuania only in 2020. To understand how resistance to clofazimin may change among Lithuanian patients, it would also be useful to evaluate the experience of other countries. In South Africa, clofazimin has been used since 2012, and 92 TM isolates with the Rv0678 mutation have been identified in the whole MT genome sequencing in 2020 [74, 292].

According to previous studies, resistance to new TB drugs is increasing over time [74, 290, 331]. Based on expert agreements, to avoid the spread of drug resistance, it is necessary to follow TB treatment recommendations and not to add a new drug as an only potentially effective drug to the already failing TB treatment [291, 293].

Factors associated with sputum culture conversion

Among the studied patients, all were of Lithuanian nationality, there were no immigrants from other countries, all denied illicit drug use, only one patient did not have a permanent place of residence. Therefore, the influence of these factors on sputum culture conversion could not be investigated.

Factors influencing sputum culture conversion in the treatment of drug-susceptible pulmonary tuberculosis

The first 52 patients included in the study who were diagnosed with drug-sensitive pulmonary TB were used to answer this question of the disser-

tation. Out of the 52 patients in this group, sputum culture conversion after the first month of treatment was observed in 20 patients (38.5%).

The distribution of the studied factors among our patients is presented in Table 3.

Table 3. Social and other factors in different sputum culture conversion groups (conversion/non-conversion) after the first month of drug-susceptible tuberculosis treatment

Factor	Conversion group N = 20	Non-conversion group N = 32	P value
Gender, n (%):			0.677 [#]
Men	16 (80.0)	24 (75)	
Women	4 (20.0)	8 (25)	
Age, years, median [IQR]	36 [29–45]	37 [32.6–46.5]	0.587 [*]
Age groups, n (%):			0.768 [#]
≥40 years	11 (55)	22 (68.75)	
<40 years	9 (45)	10 (31.25)	
Living environment, n (%):			0.07 [#]
Urban	12 (60.0)	11 (34.37)	
Rural	8 (40.0)	21 (65.63)	
Family status, n (%):			0.93 [#]
Alone	11 (55)	18 (62.1)	
With family/partner	9 (45)	14 (60.9)	
Occupation, n (%):			0.508 [#]
Employed, student	10 (50)	13 (40.62)	
Unemployed, retired	10 (50)	19 (59.38)	
Education, n (%):			0.284 [#]
Secondary or lower	10 (50)	21 (65.62)	
Higher education	10 (50)	11 (34.38)	
Subjective self-assessment of the patient's overall health, n (%):			0.113 [#]
Very good	3 (15)	1 (3.125)	
Good	8 (40)	4 (12.5)	
Average	7 (35)	17 (53.125)	
Bad	2 (10)	8 (25)	
Very bad	0 (0)	2 (6.25)	
Subjective self-assessment of the patient's overall health (grouped), n (%):			0.007 [#]
Good and very good	11 (55)	6 (18.75)	
Average, bad and very bad	9 (45)	26 (81.25)	
SGRQ total score, median [IQR]	22.13 [4.03–29.05]	32.79 [26.17–47.86]	0.009 [*]
SGRQ total score, n (%):			0.008 [#]
≥30	4 (20)	19 (59.37)	
<30	15 (80)	13 (40.63)	

Table 3 continued

Factor	Conversion group N = 20	Non-conversion group N = 32	P value
Alcohol use, n (%): 2–3 times per week and more Less frequently Never	8 (40) 8 (40) 4 (20)	10 (31.25) 14 (43.75) 8 (25)	0.91 [#]
Chest X-ray scale, median [IQR]	53.33 [8.3–58.33]	95.83 [74.16–109.16]	<0.001*
Albumin concentration in blood (g/L) , median [IQR]	36 [28–39]	25.5 [24–35]	0.012*
Hypoalbuminemia (≤ 35 g/L), n (%): Yes No	5 (25) 15 (75)	17 (53.12) 15 (46.88)	0.046 [#]
BMI (kg/m ²), median [IQR]	22.37 [19.89–24.06]	22.21 [19.94–23.93]	0.837*
BMI grouped, n (%): Underweight (<18.5 kg/m ²) Normal weight (18.5–24.9 kg/m ²) Overweight (25–29.9 kg/m ²) Obesity (>30 kg/m ²)	3 (15) 13 (65) 4 (20) 0 (0)	3 (9.375) 24 (75) 3 (9.375) 2 (6.25)	0.252 [#]
Smoker, n (%) Non-smoker, n (%)	15 (75) 5 (25)	28 (87.5) 4 (23.5)	0.246 [#]
Pack-years, median [IQR]	12.5 [5–16]	20 [5–25]	0.33*
Smoker for more than 20 pack- years, n (%): Yes No	5 (25) 15 (75)	17 (53.12) 15 (46.88)	0.046 [#]
AFB in sputum before the start of treatment, n (%): AFB 3+ AFB 2+ AFB 1+ Scanty AFB No AFB	0 (0) 5 (25) 3 (15) 4 (20) 8 (40)	21 (65.6) 5 (15.6) 4 (12.5) 2 (6.3) 0 (0)	<0.0001 [#]
Vitamin D concentration (nmol/L), median [IQR]	35.2 [24.5–43.5]	29.35 [24.58–38.55]	0.342*
Vitamin D concentration (grouped), n (%): <50 nmol/L 50–69 nmol/L Optimal (70–250 nmol/L)	13 (65) 6 (30) 1 (5)	25 (78.125) 7 (21.875) 0 (0)	0.43 [#]

* – Mann-Whitney U test

[#] – Pearson chi-quadrat test

IQR – interquartile range; SGRQ – St. George Respiratory Questionnaire; BMI – body mass index; AFB – acid fast bacilli.

As seen in table 3, the amount of AFB found in the sputum microscopy, the chest X-ray scale score and the subjective self-assessment of the patient's overall health had a statistically significant impact on sputum culture conversion after the first month of TB treatment.

We also performed logistic regression analysis. Patients who were microscopically detected with 2+ or 3+ AFB in their sputum prior TB treatment had a 20.8-fold increased risk of sputum culture non-conversion after the first month of TB treatment. Patients who scored 30 or more on SGRQ were 7 times more likely to have no sputum culture conversion after the first month of TB treatment. Smoking history (more than 20 pack-years of smoking) alone, was not a statistically significant factor in predicting sputum culture conversion.

Factors influencing sputum culture conversion in the treatment of multidrug-resistant pulmonary tuberculosis

The MDR-TB group of 31 patients were studied separately. There were no data on sputum culture conversion in 3 patients. Of the patients studied, 11 patients experienced sputum culture conversion after 1 month of treatment and 17 did not. Factors that were analyzed are presented in table 4.

Table 4. Social and other factors in different sputum culture conversion groups (conversion/non-conversion) after the first month of multidrug-resistant tuberculosis treatment

Factor	Conversion group N = 11	Non-conversion group N = 17	P value
Gender, n (%):			0,823 [#]
Men	6 (54,54)	10 (58,8)	
Women	5 (45,45)	7 (41,2)	
Age, years, median [IQR]	56 [20–60]	43 [32,5–52]	0,43 [*]
Age groups, n (%):			0.934 [#]
≥40 years	6 (54.54)	9 (53)	
<40 years	5 (45.45)	8 (47)	
Living environment, n (%):			0.093 [#]
Urban	8 (72.7)	8 (47)	
Rural	2 (18.2)	9 (53)	
Family status, n (%):			0.102 [#]
Alone	3 (27.3)	10 (58.8)	
With family/partner	8 (72.7)	7 (41.2)	
Occupation, n (%):			0.142 [#]
Employed, student	7 (63.6)	6 (35.3)	
Unemployed, retired	4 (36.4)	11 (64.7)	
Education, n (%):			0.184 [#]
Secondary or lower	5 (45.45)	12 (70.6)	
Higher education	6 (54.54)	5 (29.4)	

Table 4 continue

Factor	Conversion group N = 11	Non-conversion group N = 17	P value
Subjective self-assessment of the patient's overall health, n (%):			0.705 [#]
Very good	1 (9.1)	1 (5.9)	
Good	3 (27.3)	5 (29.4)	
Average	4 (36.4)	9 (53)	
Bad	3 (27.3)	2 (11.8)	
Very bad	0 (0)	0 (0)	
Subjective self-assessment of the patient's overall health (grouped), n (%):			0.954 [#]
Good and very good	4 (36.4)	6 (35.3)	
Average, bad and very bad	7 (63.6)	11 (64.7)	
SGRQ total score, median [IQR]	33.15 [10.35–54.27]	24.62 [15.28–35.99]	0.194 [*]
SGRQ total score, n (%):			0.934 [#]
≥30	5 (45.45)	8 (47)	
<30	9 (81.81)	9 (53)	
Alcohol use, n (%):			0.004 [#]
2–3 times per weak and more	1 (9.1)	6 (35.3)	
Less frequently	3 (27.3)	10 (58.8)	
Never	7 (63.6)	1 (5.9)	
Chest X-ray scale, median [IQR]	14.25 [1.33–42.09]	61.83 [40.33–77.5]	0.019 [*]
Albumin concentration in blood (g/L), median [IQR]	40 [39.5–41.5]	40 [37–40]	0.675 [*]
Hypoalbuminemia (≤35 g/L), n (%):			0.239 [#]
Yes	3 (27.3)	2 (11.8)	
No	7 (63.6)	15 (88.2)	
BMI (kg/m ²) , median [IQR]	22.26 [19.2–25.5]	21.97 [20.33–23.59]	0.264 [*]
BMI grouped, n (%):			0.32 [#]
Underweight (<18.5 kg/m ²)	0 (0)	2 (11.8)	
Normal weight (18.5–24.9 kg/m ²)	7 (63.6)	12 (70.6)	
Overweight (25–29.9 kg/m ²)	4 (36.4)	3 (17.6)	
Obesity (>30 kg/m ²)	0 (0)	0 (0)	
Smoker, n (%)	7 (63.6)	15 (88.2)	0.121 [#]
Non-smoker, n (%)	4 (36.4)	2 (11.8)	
Pack-years, median [IQR]	2.5 [0.5–2.25]	10[3.5–25.5]	0.134 [*]
Smoker for more than 20 pack-years, n (%):			0.066 [#]
Yes	1 (9.1)	7 (41.2)	
No	10 (91)	10 (58.8)	

Table 4 continued

Factor	Conversion group N = 11	Non-conversion group N = 17	P value
AFB in sputum before the start of treatment, n (%):			0.001 [#]
AFB 3+	1 (9.1)	3 (17.6)	
AFB 2+	0 (0)	5 (29.4)	
AFB 1+	0 (0)	3 (17.6)	
Scanty AFB	1 (9.1)	5 (29.4)	
No AFB	9 (81.8)	1 (5.9)	
Vitamin D concentration (nmol/L), median [IQR]	35.5 [19.35–60.5]	47.9 [26.25–62]	0.675 [*]
Vitamin D concentration (grouped), n (%):			0.437 [#]
<50 nmol/L	5 (45.45)	12 (70.6)	
50–69 nmol/L	4 (36.4)	3 (17.6)	
Optimal (70–250 nmol/L)	1 (9)	2 (11.8)	

* – Mann-Whitney U test

– Pearson chi-quadrat test

IQR – interquartile range; SGRQ – St. George Respiratory Questionnaire; BMI – body mass index; AFB – acid fast bacilli.

There was a statistically significant difference of AFB quantity in the sputum microscopy and the X-ray score between the two conversion groups. Patients who reported of using alcohol prior hospitalization were less likely to have sputum culture conversion after the first month of treatment (RR 48; 95% CI 2.4–985.24; $p = 0.01$).

It was not observed that any of the other studied factors influenced the sputum culture conversion, but it should be noted that MDR-TB group is relatively small, and the results may differ if more patients would be analyzed.

Data for the group of mono-/poly- drug-resistant TB are not presented separately because this group was even smaller and no statistically significant influence of studied factors to sputum culture conversion was observed.

Factors influencing sputum culture conversion in the treatment of pulmonary tuberculosis

We also evaluated all TB groups (drug-susceptible, mono-/poly-resistant, MDR-TB) as a whole. A total of 107 patients were included, but there were missing data on sputum conversion after 1st month of TB treatment in 10 patients. After first month of treatment, 41 patients converted and 56 did not. Factors that were analyzed, are presented in table 5.

Table 5. Social and other factors in different sputum culture conversion groups (conversion/non-conversion) after the first month of tuberculosis treatment (both drug-susceptible and drug-resistant)

Factor	Conversion group N = 41	Non-conversion group N = 56	P value
Gender, n (%):			0.705 [#]
Men	30 (73.2)	39 (69.6)	
Women	11 (26.8)	17 (30.4)	
Age, years, median [IQR]	42 [32–51.5]	46 [37–55.75]	0.852 [*]
Age groups, n (%):			0.565 [#]
≥40 years	24 (58.5)	36 (64.3)	
<40 years	17 (41.5)	20 (35.7)	
Living environment, n (%):			0.008 [#]
Urban	26 (63.4)	21 (37.5)	
Rural	14 (34.1)	35 (62.5)	
Family status, n (%):			0.089 [#]
Alone	17 (41.5)	33 (58.9)	
With family/partner	24 (58.5)	23 (41.1)	
Occupation, n (%):			0.197 [#]
Employed, student	23 (56.1)	24 (42.9)	
Unemployed, retired	18 (43.9)	32 (57.1)	
Education, n (%):			0.114 [#]
Secondary or lower	19 (46.3)	35 (62.5)	
Higher education	22 (53.7)	21 (37.5)	
Subjective self-assessment of the patient's overall health, n (%):			0.215 [#]
Very good	5 (12.2)	2 (3.6)	
Good	13 (31.7)	11 (19.6)	
Average	15 (36.6)	28 (50)	
Bad	6 (14.6)	13 (23.2)	
Very bad	1 (2.4)	2 (3.6)	
Subjective self-assessment of the patient's overall health (grouped), n (%):			0.024 [#]
Good and very good	18 (43.9)	13 (23.2)	
Average, bad and very bad	22 (53.7)	43 (76.8)	
SGRQ total score, median [IQR]	22.8 [7.23–39.73]	32.79 [23.14–52.96]	0.005 [*]
SGRQ total score, n (%):			0.039 [#]
≥30	14 (34.1)	31 (55.4)	
<30	27 (65.9)	25 (44.6)	
Alcohol use, n (%):			0.27 [#]
2–3 times per week and more	14 (34.1)	11 (19.6)	
Less frequently	16 (39)	26 (46.4)	
Never	11 (26.83)	19 (33.9)	
Chest X-ray scale, median [IQR]	41.67 [4.58–57.92]	82.25 [62–106.46]	<0.0001 [*]
Albumin concentration in blood (g/L), median [IQR]	40 [36.5–43.5]	37 [31.75–40]	0.089 [*]

Table 5 continued

Factor	Conversion group N = 41	Non-conversion group N = 56	P value
Hypoalbuminemia (≤ 35 g/L), n (%):			0.698 [#]
Yes	10 (24.4)	16 (28.6)	
No	30 (73.2)	40 (71.4)	
BMI (kg/m ²), median [IQR]	21.91 [19.19–24.72]	21.72 [19.94–23.24]	0.926 [*]
BMI grouped, n (%):			0.307 [#]
Underweight (<18.5 kg/m ²)	6 (14.6)	7 (12.5)	
Normal weight (18.5–24.9 kg/m ²)	26 (63.4)	38 (67.9)	
Overweight (25–29.9 kg/m ²)	9 (22)	7 (12.5)	
Obesity (>30 kg/m ²)	0 (0)	3 (5.4)	
Smoker, n (%)	30 (73.2)	49 (87.5)	0.073 [#]
Non-smoker, n (%)	11 (26.8)	7 (12.5)	
Pack-years, median [IQR]	7 [0–19]	10 [5–25]	0.147 [*]
Smoker for more than 20 pack-years, n (%):			0.011 [#]
Yes	10 (24.4)	28 (50)	
No	31 (75.6)	28 (50)	
AFB in sputum before the start of treatment, n (%):			<0.0001 [#]
AFB 3+	3 (7.3)	25 (44.6)	
AFB 2+	5 (12.2)	12 (21.4)	
AFB 1+	5 (12.2)	9 (16.1)	
Scanty AFB	8 (19.5)	8 (14.3)	
No AFB	20 (48.8)	2 (3.6)	
Vitamin D concentration (nmol/L), median [IQR]	42.3 [35.3–56.3]	40.2 [28.13–59.15]	0.081 [*]
Vitamin D concentration (grouped), n (%):			0.232 [#]
<50 nmol/L	22 (53.7)	41 (73.2)	
50–69 nmol/L	15 (36.6)	13 (23.2)	
Optimal (70–250 nmol/L)	2 (4.9)	2 (3.6)	

* – Mann-Whitney U test

[#] – Pearson chi-quadrat test

IQR – interquartile range; SGRQ – St. George Respiratory Questionnaire; BMI – body mass index; AFB – acid fast bacilli.

After performing logistic regression analysis, it was shown that sputum culture conversion was only affected by chest X-ray scale score and quantity of AFB in sputum microscopy. Higher X-ray score and quantity of AFB increased the risk of non-conversion.

After grouping the X-ray score and quantity of AFB in sputum microscopy into two groups and performing binary logistic regression analysis (Table 6), we found that the failure to convert after the first month of TB treatment was

significantly affected by X-ray score, quantity of AFB in sputum microscopy prior TB treatment, and tobacco smoking pack-years when they exceed 20.

Table 6. Binary logistic regression analysis in the overall tuberculosis group, assessing which of the studied factors significantly influenced the absence of sputum culture conversion after 1 month of treatment. Only factors with statistically significant influence are presented

Studied factor	Beta coefficient	Standard deviation	Relative risk	95% CI	
AFB in sputum microscopy prior TB treatment (less than 2+/2+ and 3+)	2,62	0,95	13,76	2,12	89,21
X-ray scale score (less than 70/70 and more)	1,86	0,83	6,4	1,25	32,83
Tobacco smoking pack-years (less than 20/20 and more)	0,92	0,34	2,5	1,27	4,9

CI – confidence interval; AFB – acid fast bacilli.

Discussion

The aim in many countries is to start outpatient treatment for TB patients as early as possible, to reduce the burden on the health care system and improve the quality of life of the patient. Bacteriological confirmation of sputum microscopy or sputum culture conversion is routinely obtained to terminate isolation in Lithuania. According to the current order of the Lithuanian Minister of Health, sputum tests should be repeated after two months of TB treatment. In this study, to evaluate the effectiveness of the treatment as soon as possible, we chose to evaluate sputum culture conversion after the first month of TB treatment. Evaluation of sputum conversion after the first month of TB treatment is also chosen by some other study authors [95, 296, 297], however, these studies have so far only been performed with MDR-TB patients.

In Lithuania, radiographic classification of pulmonary TB (focal, infiltrative, fibrous, cavernous, disseminated) is still used. However, these radiological forms have not been shown to affect the patient’s prognosis or to influence treatment choices. We believe that it would be more beneficial to use other research-proven methodologies to assess the radiological spread of TB. It is already known that patients with more cavities in the lungs have higher levels of MT [298] and subsequently later sputum culture conversion [18, 260]. We found only one scale (by Anna P. Ralph et al.) for evaluating chest X-rays during TB treatment [287]. This scale was used in our study. Our data are in line with previous studies: the higher the chest X-ray scale score and thus the radiographic spread of the disease, the higher the probability of non-conversion [279]. We believe that this chest X-ray scale could be useful

in clinical practice to assess the initial lung injury and to monitor the effectiveness of TB treatment. However, its use may be hampered if the patient has concomitant pulmonary disease that may cause additional radiological changes.

The second important factor that could help predict sputum culture conversion that was found in our study, was the amount of AFB in the sputum microscopy prior to TB treatment. Similar results were acquired by other researchers [302].

We also found that patients who smoked for more than 20 pack-years were at higher risk of sputum culture non-conversion after the first month of TB treatment. According to other authors, after a patient quits smoking, the risk of death from TB is significantly reduced, so it can be argued that smoking cessation is an important factor in reducing TB-related mortality [255, 264].

We found no effect of alcohol consumption on sputum culture conversion among drug-susceptible TB patients, but there was an effect of alcohol consumption habits on sputum culture conversion among MDR-TB patients. Other researchers have found that patients with heavy alcohol consumption have a slower rate of sputum culture conversion [249], a higher risk of TB treatment failure, and death [244, 249, 306]. This is believed to be, because alcohol users are more likely not to adhere to the TB treatment regimen [250]. However, in our study, patients spent the first months of TB treatment in hospital with DOT and this reason might not fully explain the impact of alcohol use on our patients.

Other factors that we have analyzed were found to be not as important in predicting conversion. Low BMI is sometimes associated with a poorer prognosis of TB [280, 281], however some authors find no such association [308]. We did not observe a statistically significant difference in BMI between the conversion groups among our patients. It should be noted that most previous studies assess the relationship between BMI and TB treatment outcomes rather than the conversion of sputum culture.

Previously published articles suggested that lower serum albumin levels in TB patients have been associated with higher in-hospital mortality [283] and TB treatment failure [278, 279]. In our study, there was no statistically significant difference in albumin concentrations between the conversion groups, although slightly higher albumin concentrations and a lower proportion of patients with hypoalbuminemia were observed in the conversion groups.

Vitamin D levels have long been known to vary by geographic region [309], but vitamin D deficiency is more common in patients with TB than in the general population [270]. In a study of TB patients in Malaysia, vitamin D deficiency was found in a very small proportion of patients [312], whereas

in our study, optimal vitamin D levels were found in only four of all patients, and its concentrations did not affect sputum culture conversion.

To date, we have not found studies evaluating quality of life questionnaires in TB patients and their association with culture conversion. However, it is described, that the presence of TB symptoms at diagnosis is associated with a higher severity of TB [316]. In our study, higher SGRQ scores were observed in patients in the non-conversion group (with the exception in the MDR-TB group), although, based on logistic regression analysis, this only had an influence on the culture conversion in the drug-susceptible TB group. It could be assumed, that poor quality of life may have been more associated with advanced TB than other aspects of patients' life, as the patients who scored highest on the SGRQ questionnaire also had higher quantity of AFB in sputum microscopy and/or higher radiological spread of the disease.

We found very few studies evaluating the influence of social factors (other than age and gender) on sputum culture conversion. One study found that homelessness and injectable illicit drug use did not affect sputum culture conversion [317]. Another study with MDR-TB patients, examined the influence of various social factors but found no influence on sputum culture conversion [318]. Some studies have shown that conversion occurs more slowly in male patients than in females [233, 319, 320], but other authors, including us, have found no effect of gender on sputum culture conversion [317]. Some authors state that older age is associated with slower sputum culture conversion [233, 321], however no effect of age on culture conversion was observed among our patients.

In general, when evaluating the factors analyzed in our study, it is important to note that the study was performed in a hospital where DOT was implemented. This may be relevant in assessing the influence of the described factors on sputum culture conversion. As an example of alcohol use, a patient treated in hospital is significantly less likely to continue drinking alcohol while staying in hospital. It can be assumed that the influence of social factors is reduced during inpatient treatment when DOT is ensured.

One of the disadvantages of our study is that not all patients in the MDR-TB group were started on appropriate treatment during the first days in the hospital and instead got the drug-susceptible TB treatment until the diagnosis of MDR-TB was confirmed. Genotypic TB diagnostic methods were not yet used in LUHS at the time of the study; therefore, drug resistance was determined only by phenotypic TB diagnostic methods, which prolonged the detection time of MDR-TB.

Influence of inflammatory biomarkers on the sputum culture conversion in the treatment of drug-susceptible and drug-resistant tuberculosis

Sputum culture conversion in the overall TB group after the first month of treatment occurred in 41 patients, did not occur in 56 patients. No data on sputum culture conversion was available in 10 patients. After 5 months of TB treatment no conversion was seen only in 2 patients, both of whom, belonged to the MDR-TB group. There was no data on sputum culture conversion in 29 patients after 5 months of treatment (due to treatment discontinuation, death, inappropriate culture material or other causes). Culture conversion after the first month of TB treatment occurred in 40.4% of patients in drug-susceptible TB group, 58.3% in mono-/poly-resistant TB group and 39.3% in MDR-TB group.

CRP values statistically significantly differed between different conversion groups in the drug-susceptible TB and in overall TB groups. Conversion was estimated to be more frequent ($p < 0.05$) when normal CRP levels were detected prior to TB treatment. Higher CRP values were observed when sputum culture conversion did not occur.

Prior to TB treatment, suPAR concentrations were found to be significantly higher in patients who did not undergo sputum culture conversion after the first month of treatment in the overall TB group. There were no statistically significant differences in sICAM-1 concentrations between conversion groups.

Due to the relatively small groups of TB patients, only drug-susceptible TB and the overall TB group were used for further statistical calculations, however CRP, sICAM-1, suPAR concentrations did not appear to have influenced sputum culture conversion after the first or the fifth month of TB treatment.

Discussion

CRP is probably one of the most studied biomarkers in active pulmonary TB, however its role in predicting sputum culture conversion is still debatable. According to some authors, high CRP values may be associated with later sputum culture conversion [325, 326], but other authors do not observe such association [260]. In our study we found that although there was a significant difference of CRP concentrations between the different conversion groups, CRP was not useful in predicting sputum culture conversion.

Some authors suggest using more than one biomarker for the monitoring of TB treatment [8, 37]. We chose to evaluate two other biomarkers along with CRP: sICAM-1 and suPAR, since these molecules are considered to be potential TB biomarkers [178, 179]. According to other authors, sICAM-1

concentrations are found to be elevated in TB [328] and are found to be higher in more severe TB [109].

Data from various authors would suggest that suPAR may have value in the TB treatment monitoring [35,185] and may predict unsuccessful treatment outcomes [184]. However, in a study of children with TB, no change in suPAR concentrations was found after two months of TB treatment [187].

However, we were not able to find any published study that would evaluate the effect of suPAR or sICAM-1 on sputum culture conversion in TB patients, so we cannot compare our results in more detail with those of other authors.

Associations of T lymphocyte populations with tuberculosis treatment outcomes and tuberculosis-induced lung destruction

T lymphocyte populations and tuberculosis treatment outcomes

TB treatment outcomes were assessed separately in the drug-susceptible TB group (to ensure that the results were not skewed by different treatment regimens) and in overall TB group. Mono-/poly-resistant and MDR-TB groups were not evaluated separately due to too small groups.

In the drug-susceptible TB group 53 patients were successfully treated and 9 had unsuccessful outcomes. Statistically significant differences of some tested T lymphocyte populations between different treatment outcomes were found. Higher total lymphocyte counts were observed in patients who were successfully treated. The following populations of T lymphocytes were found to be statistically significantly lower in the treatment failure group: CD3+; CD4+; CD8+; CD4+/CD45RA+/CD27+; CD4+/CD45RA-/CD27+; CD8+/CD45RA+/CD27-; CD8+/CD45RA+/CD27+; CD8+/CD45RA-/CD27+; CD8+/CD38-. The percentage of CD4+/CD45RA-/CD27+; CD8+/CD45RA-/CD27+ and CD8+/CD38- among all T lymphocytes were lower in the unsuccessful treatment outcome group. However, in a logistic regression analysis, no population of T lymphocytes was observed to have a statistically significant effect on the outcome of drug-susceptible TB treatment.

Assessing overall TB group, there were statistically significant differences between some of T lymphocyte populations among different treatment outcome groups (CD8+/CD45RA+/CD27+; CD8+/CD45RA+/CD27+; CD4+/CD45RA+/CD27-; CD8+/CD45RA-/CD27+; CD8+/CD38-; CD8+/CD38+). However, logistic regression analysis revealed no evidence that any population of T lymphocytes affected the outcome of TB treatment.

T lymphocyte populations and sputum culture conversion

In the drug-susceptible TB group, there was a significant difference in the total percentage of lymphocytes between the different first month conversion groups and some of the tested T lymphocyte populations. Higher lev-

els of CD8+/CD45RA+/CD27+ and CD8+/CD38- were found in conversion group. Higher levels of CD4+/CD45RA-/CD27-; CD8+/CD45RA-/CD27-; CD8+CD38+ were found in non-conversion group. Logistic regression analysis revealed no evidence that any of the tested T lymphocyte populations affected sputum culture conversion after the first month of drug-susceptible TB treatment.

No significant differences in T lymphocyte populations were found between the conversion groups in the mono-/poly-resistant and MDR-TB groups.

There was a significant difference of the total number of lymphocytes between the different conversion groups when assessing overall TB group. Higher lymphocyte counts were observed in patients with sputum culture conversion after 1 month of treatment than in those without conversion. Significant differences in T lymphocyte populations between conversion groups in overall TB group were observed in CD8+CD45RA+CD27+ and CD8+CD45RA-CD27- populations.

We also performed logistic regression analysis in overall TB group. We found that if total lymphocyte count exceeded 21.45%. among all leukocytes before treatment, the probability of conversion was approximately 4-fold higher. If CD8+/CD45RA-/CD27- exceeded 15.3% among all T lymphocytes before start of TB treatment, the probability of sputum culture conversion after 1st month of TB treatment decreased approximately 3-fold (RR 3.249, 95% CI 1.267–8.326, $p = 0.014$). CD4+/CD45RA-/CD27- population only influenced sputum culture conversion in drug-susceptible TB group. The probability of conversion was reduced 1.16-fold if the CD4+/CD45RA-/CD27- population exceeded 12.6%. of all T lymphocytes before the start of TB treatment.

Association between T lymphocyte populations and tuberculosis-induced lung destruction

To assess this objective, TB groups were not grouped by drug resistance. T lymphocyte population and chest X-ray scale prior to TB treatment and after 5 months of treatment were used.

Table 7 shows the statistically significant correlations between baseline X-ray scale score and T lymphocyte populations, total lymphocyte counts.

Table 7. Statistically significant correlations between baseline X-ray scale and the lymphocyte populations in the overall tuberculosis group

Lymphocyte (sub)population	Correlation with X-ray scale score (Spearman correlation coefficient)
Total lymphocyte count ($\times 10^9/l$)	-0.355
Total lymphocyte count (%)	-0.625
CD3+ ($\times 10^9/l$)	-0.433
CD3+ (%)	-0.404
CD4+ ($\times 10^9/l$)	-0.419
CD8+ ($\times 10^9/l$)	-0.411
CD4+/CD45RA-/CD27+ (%)	0.265
CD4+/CD45RA-/CD27- ($\times 10^9/l$)	-0.334
CD4+/CD45RA-/CD27+ ($\times 10^9/l$)	-0.493
CD8+/CD45RA-/CD27+ ($\times 10^9/l$)	-0.46
CD8+/CD45RA-/CD27+ (%)	-0.229
CD8+/CD38- ($\times 10^9/l$)	-0.478
CD8+/CD38- (%)	-0.649
CD8+/CD38+ (%)	0.649

No strong correlations (≥ 0.7) were found between baseline lymphocyte and X-ray scale scores, but moderate to weak correlations were observed.

A statistically significant correlation was observed less frequently when comparing the chest X-ray scale score re-evaluated after 5 months and the baseline results of flow cytometry. Medium strength correlation was observed between the chest X-ray scale score and total lymphocyte count (%); (-0.408, $p = 0.003$); CD8+/CD38- (%) (-0.435, $p = 0.002$); CD8+/CD38+ (%) (0.435, $p = 0.002$).

No statistically significant correlations were found when comparing the correlations of the chest radiograph scale after 5 months of treatment and lymphocyte populations after 5 months.

Discussion

The T lymphocyte response can be described in detail by evaluating T lymphocyte phenotypes in peripheral blood [176]. Some researchers choose to test *in vitro* stimulated lymphocytes to assess specific response to TB [329], but we decided to investigate non-specific populations of T lymphocytes because these studies would be cheaper and simpler in clinical practice. Studies with non-specific T lymphocytes in TB are still scarce [176, 330, 331].

The only population of T lymphocytes, which differed statistically significantly between the different treatment outcome groups in the overall TB group, both in absolute count and percentage, was CD8+/CD45RA+/CD27+. These are naive effector lymphocytes [169, 332]. CD4+ T lymphocytes with

low CD27 expression have been described to be a biomarker of active TB [333, 334], and decreasing CD27 expression is believed to indicate that T lymphocyte differentiation occurs due to antigen exposure [333]. The results obtained in our study show that CD8+/CD45RA+/CD27+ population is significantly lower in unsuccessful TB outcomes. Although we have not demonstrated that baseline counts of CD8+/CD45RA+/CD27+ can affect the outcome of TB treatment, larger studies may be needed to get more accurate data.

The emergence of CD38 + is associated with the activation of cellular immunity [335]. There is evidence that after the recovery from TB, the number of MT-specific T lymphocytes expressing CD38 decreases [174]. In our study, there was no significant difference in lymphocyte populations expressing CD38 between treatment outcome groups. However, a higher proportion of CD8+/CD38+ was found in the unsuccessful outcome group. This is consistent with the changes observed in active TB infection with MT specific lymphocytes found by other authors [174].

We also attempted to evaluate the potential effect of T lymphocyte populations on sputum culture conversion after the first month of treatment. CD27 and CD45RA are expressed in naïve, early-differentiation effector T lymphocytes, and decreasing CD27 expression indicates ongoing T-lymphocyte differentiation [333]. We did not find studies evaluating the effect of expression of these markers on nonspecific TB lymphocytes and their influence on sputum culture conversion.

When assessing the correlation of T lymphocyte populations with TB-induced lung destruction (via the X-ray scale proposed by Ralph et al. [287]) prior to treatment, statistically significant correlations were found. The highest correlations were between the total percentage of lymphocytes and the populations of CD8+/CD38+ and CD8+/CD38-. These findings would support the observations by other authors that a higher number of CD38 + lymphocytes is detected in the presence of active TB disease (and thus probably greater destruction in the lungs) [176]. As the number of lymphocytes decrease, the chest X-ray scale score increases, which also illustrates that suppression of cellular immunity occurs during active TB [143]. We have not found any other study in the available literature comparing populations of nonspecific T lymphocytes with the radiological symptoms of active pulmonary TB, so we cannot compare the results of this study with others.

CONCLUSIONS

1. The risk of sputum culture non-conversion after the first month of tuberculosis treatment increased in smokers who have been smoking for more than 20 pack-years. Alcohol use influenced sputum culture conversion in multidrug-resistant tuberculosis group: sputum culture non-conversion risk was higher in alcohol users. We found no association between sputum culture conversion and social factors, body mass index and quality of life.
2. Resistance to rifampicin was identified in 28.7% patients and these patients had the risk of sputum culture non-conversion increased 39-fold. When resistance to new anti tuberculosis drugs was determined only 1 case of partial resistance to bedaquiline and no resistance to linezolid and clofazimine was found.
3. The greater the radiographic spread of lung injury and the more acid-fast bacilli in sputum before the start of tuberculosis treatment, the less likely possibility of sputum culture conversion after first month of TB treatment.
4. Sputum culture conversion occurred more frequently when C reactive protein (CRP) was not elevated before the start of tuberculosis treatment. No association between sputum culture conversion and inflammation biomarkers (CRP, sICAM-1, suPAR) before the start of tuberculosis treatment was found. No association between pre-treatment albumin, vitamin D blood levels and sputum culture conversion was found.
5. Significant associations between total lymphocyte count, CD8+/CD45RA-/CD27- population and sputum culture conversion rates after first month of TB treatment were observed. The size of CD4+/CD45RA-/CD27- population had an influence on sputum culture conversion in drug susceptible TB group. We found significant correlations between CD3+, CD4+, CD8+, CD4+/CD45RA-/CD27+, CD4+/CD45RA-/CD27- , CD8+/CD45RA-/CD27+, CD8+/CD38-, CD8+/CD38+ T lymphocyte populations and radiographic spread of lung injury, however there was no association between T lymphocyte populations and tuberculosis treatment outcomes.

PRACTICAL RECOMMENDATIONS

1. Based on the available data, we recommend a rapid genotypic test for tuberculosis mycobacteria in all cases of high radiographic spread of tuberculosis and high levels of acid-fast bacteria (AFB) in sputum. This allows the rapid start the appropriate treatment.
2. Even though resistance to new tuberculosis drugs is currently practically not detected in Lithuania, based on data from other countries, resistance to these drugs is gradually increasing, so it is appropriate to continue resistance testing for these drugs during the treatment of drug-resistant tuberculosis.
3. The most important factors in predicting sputum culture conversion are the radiographic spread of lung injury and the number of AFB found in the sputum prior to initiating tuberculosis treatment. Inpatient tuberculosis treatment and appropriate infection control measures are necessary for these patients.
4. We believe that the X-ray score proposed by Anna P Ralph et al. could be useful in clinical practice in objectifying and monitoring the radiological spread and treatment efficacy of TB.
5. Patients with pulmonary TB should be encouraged to refrain from smoking and alcohol use as these harmful habits are linked to poorer treatment outcomes.
6. Inflammatory biomarkers suPAR, sICAM-1, may not be useful in clinical practice to predict sputum culture conversion after the first month of TB treatment.
7. Measuring nonspecific T lymphocyte populations was not more useful than measuring total lymphocyte count, therefore, we believe that these tests are unlikely to be useful in clinical practice. More detailed studies with larger study groups would be required to confirm these results.

LITERATŪRA

1. Ending tuberculosis is a race against time and drug resistance [Internet]. [cited 2021 May 11]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/ending-tuberculosis-race-against-time-and-drug-resistance>
2. Weiss P, Chen W, Cook VJ, Johnston JC. Treatment outcomes from community-based drug resistant tuberculosis treatment programs: a systematic review and meta-analysis. *BMC infectious diseases*. BioMed Central; 2014;14(1):1–9.
3. Migliori GB, Sotgiu G, Gandhi NR, Falzon D, DeRiemer K, Centis R et al. Drug resistance beyond extensively drug-resistant tuberculosis: individual patient data meta-analysis. *European Respiratory Journal*. Eur Respiratory Soc; 2013;42(1):169–79.
4. ECDC, regional office for Europe. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2020-2018 data. Stockholm: ECDC; 2020.
5. Blasi F, Barnes PJ, Gama M, Migliori GB. Future directions for the ERS: Presidential plans. *Eur Respiratory Soc*; 2013;
6. Goletti D, Arlehamn CSL, Scriba TJ, Anthony R, Cirillo DM, Alonzi T, et al. Can we predict tuberculosis cure? What tools are available? *European Respiratory Journal*. Eur Respiratory Soc; 2018;52(5).
7. Zablockis R, Danila E, Miliauskas S, Malakauskas K, Davidavičienė E, Vasiliauskienė E, et al. Plaučių tuberkuliozės diagnostikos ir gydymo rekomendacijos. Vilnius: Eventas. 2018;
8. Zumla A, Wallis R, Doherty M, Klein N, Parida S, Olesen O, et al. Joint TDR/EC expert consultation on biomarkers in tuberculosis: Report of the joint TDR/EC expert consultation to evaluate the potential roles of biomarkers in the management of HIV-infected and HIV-uninfected patients with tuberculosis. World Health Organization, Geneva, Switzerland . 2008;
9. Wallis R, Johnson J. Surrogate markers to assess clinical efficacy of new antituberculous drugs. *The development of new antituberculosis drugs* Hauppauge, NY: Nova Science Publishers. 2006;95–113.
10. Craig G, Daftary A, Engel N, O’driscoll S, Ioannaki A. Tuberculosis stigma as a social determinant of health: a systematic mapping review of research in low incidence countries. *International Journal of Infectious Diseases*. Elsevier; 2017;56:90–100.
11. Fox W, Ellard GA, Mitchison DA. Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council tuberculosis units, 1946-1986, with relevant subsequent publications. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 1999;3(10s2):S231–S279.
12. Fox KA, Kirwan DE, Whittington AM, Krishnan N, Robertson BD, Gilman RH, et al. Platelets regulate pulmonary inflammation and tissue destruction in tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. American Thoracic Society; 2018;198(2):245–55.
13. Lienhardt C, Lönnroth K, Menzies D, Balasegaram M, Chakaya J, Cobelens F, et al. Translational research for tuberculosis elimination: priorities, challenges, and actions. *PLoS medicine*. Public Library of Science San Francisco, CA USA; 2016;13(3):e1001965.
14. Goletti D, Petruccioli E, Joosten SA, Ottenhoff TH. Tuberculosis biomarkers: from diagnosis to protection. *Infectious disease reports*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2016;8(2):24–32.
15. Goletti D, Lee M-R, Wang J-Y, Walter N, Ottenhoff TH. Update on tuberculosis biomarkers: from correlates of risk, to correlates of active disease and of cure from disease. *Respirology*. Wiley Online Library; 2018;23(5):455–66.

16. Kurbatova EV, Cegielski JP, Lienhardt C, Akksilp R, Bayona J, Becerra MC, et al. Sputum culture conversion as a prognostic marker for end-of-treatment outcome in patients with multidrug-resistant tuberculosis: a secondary analysis of data from two observational cohort studies. *The Lancet Respiratory medicine*. Elsevier; 2015;3(3):201–9.
17. Magee MJ, Kempker RR, Kipiani M, Tukvadze N, Howards PP, Narayan KV, et al. Diabetes mellitus, smoking status, and rate of sputum culture conversion in patients with multidrug-resistant tuberculosis: a cohort study from the country of Georgia. *PLoS One*. Public Library of Science; 2014;9(4):e94890.
18. Hernandez-Romieu AC, Little BP, Bernheim A, Schechter MC, Ray SM, Bizune D et al. Increasing Number and Volume of Cavitory Lesions on Chest Computed Tomography Are Associated With Prolonged Time to Culture Conversion in Pulmonary Tuberculosis. *Open forum infectious diseases*. 2019. p. ofz232.
19. Putri FA, Burhan E, Nawas A, Soepandi P, Sutoyo D, Agustin H, et al. Body mass index predictive of sputum culture conversion among MDR-TB patients in Indonesia. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 2014;18(5):564–70.
20. Unsematham S, Kateruttanakul P. Factors predicting sputum smear conversion and treatment outcomes in new smear-positive pulmonary tuberculosis. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 2013;96(6):644–9.
21. Arnedo-Pena A, Juan-Cerdan J, Romeu-Garcia M, Garcia-Ferrer D, Holguin-Gomez R, Iborra-Millet J, et al. Vitamin D status and incidence of tuberculosis infection conversion in contacts of pulmonary tuberculosis patients: a prospective cohort study. *Epidemiology and infection*. Cambridge Univ Press; 2015;143(08):1731–41.
22. Moraes ML de, Ramalho DM de P, Delogo KN, Miranda PFC, Mesquita EDD, Oliveira HM de MG, et al. Association between serum selenium level and conversion of bacteriological tests during antituberculosis treatment. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. SciELO Brasil; 2014;40(3):269–78.
23. Uzundağ IA, Dulkar G, Selçuk SO, Yılmaz AL, Yılmaz B. Factors that effect sputum culture conversion rate in hospitalized patients with pulmonary tuberculosis who were applied directly observation therapy and non-directly observation therapy. *Tuberkuloz ve toraks*. 2009;58(1):44–52.
24. Tekalegn Y, Woldeyohannes D, Assefa T, Aman R, Sahiledengle B. Predictors of Time to Sputum Culture Conversion Among Drug-Resistant Tuberculosis Patients in Oromia Region Hospitals, Ethiopia. *Infection and Drug Resistance*. Dove Press; 2020;13:2547.
25. Akinsola OJ, Yusuf OB, Ige OM, Okonji PE. Models for predicting time to sputum conversion among multi-drug resistant tuberculosis patients in Lagos, South-West Nigeria. *Frontiers in public health*. Frontiers; 2018;6:347.
26. Russkikh A, Korotych O, Sereda Y, SamoiloVA A, Achar J, Yedilbayev A, et al. Factors associated with culture conversion among adults treated for pulmonary extensively drug-resistant tuberculosis during 2018-2019 in the Russian Federation: an observational cohort study. *Monaldi Archives for Chest Disease*. 2021;91(1).
27. Jafri S, Ahmed N, Saifullah N, Jawad N, Siddiqui IA. Liaison of Sugar Control With Time to Sputum Culture Conversion in Multi-Drug Resistant Tuberculosis. *Cureus*. Cureus Inc.; 2020;12(7).
28. Ferrian S, Manca C, Lubbe S, Conradie F, Ismail N, Kaplan G, et al. A combination of baseline plasma immune markers can predict therapeutic response in multidrug resistant tuberculosis. *PloS one*. Public Library of Science San Francisco, CA USA; 2017;12(5):e0176660.

29. Li N, Xie W, Kong H, Min R, Hu C, Zhou X, et al. Enrichment of regulatory T-cells in blood of patients with multidrug-resistant tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 2015;19(10):1230–8.
30. Tan Q, Xie W, Min R, Dai G, Xu C-C, Pan H, et al. Characterization of Th1-and Th2-type immune response in human multidrug-resistant tuberculosis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. Springer; 2012;31(6):1233–42.
31. Mukae H, Ashitani J, Tokojima M, Ihi T, Kohno S, Matsukura S. Elevated levels of circulating adhesion molecules in patients with active pulmonary tuberculosis. *Respirology*. Wiley Online Library; 2003;8(3):326–31.
32. Walzl G, Ronacher K, Siawaya JFD, Dockrell HM. Biomarkers for TB treatment response: challenges and future strategies. *Journal of Infection*. Elsevier; 2008;57(2):103–9.
33. Demir T, Yalcinoz C, Keskinel I, Demiröz F, Yildirim N. sICAM-1 as a serum marker in the diagnosis and follow-up of treatment of pulmonary tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 2002;6(2):155–9.
34. Eugen-Olsen J, Gustafson P, Sidenius N, Fischer T, Parner J, Aaby P, et al. The serum level of soluble urokinase receptor is elevated in tuberculosis patients and predicts mortality during treatment: a community study from Guinea-Bissau. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 2002;6(8):686–92.
35. Schulman H, Niward K, Abate E, Idh J, Axenram P, Bornefall A et al. Sedimentation rate and suPAR in relation to disease activity and mortality in patients with tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 2019;23(11):1155–61.
36. Raras TYM, Astuti T, Chozin IN. Soluble urokinase plasminogen activator receptor levels in tuberculosis patients at high risk for multidrug resistance. *Tuberculosis research and treatment*. Hindawi Limited; 2012;2012.
37. Wei Z, Li Y, Wei C, Li Y, Xu H, Wu Y, et al. The meta-analysis for ideal cytokines to distinguish the latent and active TB infection. *BMC Pulmonary Medicine*. BioMed Central; 2020;20(1):1–12.
38. Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. Tuberculosis. *Lancet*. 2003;
39. WHO page [Internet]. [cited 2020 10]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
40. Global tuberculosis report 2018. World Health Organisation; 2018.
41. Banuls A-L, Sanou A, Van Anh NT, Godreuil S. Mycobacterium tuberculosis: ecology and evolution of a human bacterium. *Journal of Medical Microbiology*. Microbiology Society; 2015;64(11):1261–9.
42. World Health Organization. Global tuberculosis report 2020. World Health Organization; 2020;
43. J C. The chemotherapy of tuberculosis. With special reference to patients whose bacilli are resistant to the standard drugs. *British medical bulletin*. Oxford University Press; 1960;16(1):55–60.
44. Migliori GB, Sotgiu G, D’Ambrosio L, Centis R, Lange C, Bothamley G et al. TB and MDR/XDR-TB in European Union and European Economic Area countries: managed or mismanaged? *European Respiratory Journal*. Eur Respiratory Soc; 2012;39(3):619–25.
45. Caminero J. Multidrug-resistant tuberculosis: epidemiology, risk factors and case finding [State of the art series. Drug-resistant tuberculosis. Edited by CY. Chiang. Number 4 in the series]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 2010;14(4):382–90.

46. Gandhi NR, Nunn P, Dheda K, Schaaf SH, Zignol M, van Soolingen D, et al. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *The Lancet*. Elsevier; 2010;375(9728):1830–43.
47. Tuberculosis [Internet]. [cited 2021 May 9]. Available from: <https://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/tuberculosis/tuberculosis-read-more>
48. Hargreaves S, Lönnroth K, Nellums LB, Olaru ID, Nathavitharana RR, Norredam M, et al. Multidrug-resistant tuberculosis and migration to Europe. *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier; 2017;23(3):141–6.
49. VšĮ Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos T valstybės informacinės sistemos skyrius. Lietuvos tuberkuliozės registras.
50. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2021–2019 data [Internet]. [cited 2021 May 11]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/tuberculosis-surveillance-and-monitoring-europe-2021-2019-data>
51. Davidavičienė E. Tuberkuliozės epidemiologija ir gydymo ypatumai Lietuvoje ir pasaulyje. Paskaita pristatyta 2021.03.23 nuotolinėje konferencijoje.
52. European Centre for Disease Prevention and Control. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2021. ECDC; 2021.
53. Davidavičienė E, Danila E, Naujokaitė A, Nargėla RV, Sakalauskas R, Sosnovskaja A et al. Plaučių tuberkuliozės diagnostikos ir gydymo metodinės rekomendacijos. 2009.
54. Tuberculosis Coalition for Technical Assistance. International standards for tuberculosis care: diagnosis, treatment, public health. Tuberculosis Coalition for Technical Assistance; 2006.
55. Storla DG, Yimer S, Bjune GA. A systematic review of delay in the diagnosis and treatment of tuberculosis. *BMC public health*. Springer; 2008;8(1):15.
56. Migliori GB, Sotgiu G, Rosales-Klintz S, Centis R, D’Ambrosio L, Abubakar I, et al. ERS/ECDC Statement: European Union standards for tuberculosis care, 2017 update. *European Respiratory Journal*. Eur Respiratory Soc; 2018;51(5):1702678.
57. Pai M, Nicol MP, Boehme CC. Tuberculosis diagnostics: state of the art and future directions. *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*. Wiley Online Library; 2017;361–78.
58. Scarparo C, Ricordi P, Ruggiero G, Piccoli P. Evaluation of the fully automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide, streptomycin, isoniazid, rifampin, and ethambutol and comparison with the radiometric BACTEC 460TB method. *Journal of clinical microbiology*. Am Soc Microbiol; 2004;42(3):1109–14.
59. Bergmann JS, Woods GL. Reliability of mycobacteria growth indicator tube for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to ethambutol and streptomycin. *Journal of clinical microbiology*. Am Soc Microbiol; 1997;35(12):3325–7.
60. Oommen S, Banaji N, others. Laboratory diagnosis of tuberculosis: Advances in technology and drug susceptibility testing. *Indian Journal of Medical Microbiology*. Medknow Publications; 2017;35(3):323.
61. Steingart KR, Sohn H, Schiller I, Kloda LA, Boehme CC, Pai M, et al. Xpert[®] textregistered MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane database of systematic reviews*. John Wiley & Sons, Ltd; 2013;(1).
62. Eigner U, Veldenzer A, Holfelder M. Evaluation of the FluoroType MTB assay for the rapid and reliable detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory tract specimens. *Clin Lab*. 2013;59(9-10):1179–81.
63. Raveendran R, Wattal C, Oberoi J, Goel N, Datta S, Prasad K, et al. Utility of GenoType MTBDRplus assay in rapid diagnosis of multidrug resistant tuberculosis at a tertiary care centre in India. *Indian journal of medical microbiology*. Medknow Publications; 2012;30(1):58.

64. Leylabadlo HE, Kafil HS, Yousefi M, Aghazadeh M, Asgharzadeh M. Pulmonary tuberculosis diagnosis: where we are? *Tuberculosis and respiratory diseases*. 2016;79(3):134–42.
65. Morgan M, Kalantri S, Flores L, Pai M. A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *BMC infectious Diseases*. BioMed Central Ltd; 2005;5(1):62.
66. Tortoli E, Benedetti M, Fontanelli A, Simonetti MT. 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. *Journal of clinical microbiology*. *Am Soc Microbiol*; 2002;40(2):607–10.
67. Diagnostics T. Molecular Line-probe Assay for the Detection of Resistance to Second-line Anti-TB Drugs (SL-LPA)-WHO Recommendations on the Use of the SL-LPA; 2016.
68. Gandhi NR, Brust JC, Shah NS. A new era for treatment of drug-resistant tuberculosis. *Eur Respiratory Soc*; 2018;
69. Cohen J. Approval of novel TB drug celebrated—with restraint. *American Association for the Advancement of Science*; 2013;
70. Ismail N, Ismail NA, Omar SV, Peters RPH. In vitro study of stepwise acquisition of rv0678 and atpE mutations conferring bedaquiline resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. *Am Soc Microbiol*; 2019;63(8):e00292–19.
71. Gurumurthy M, Mukherjee T, Dowd CS, Singh R, Niyomrattanakit P, Tay JA, et al. Substrate specificity of the deazaflavin-dependent nitroreductase from *Mycobacterium tuberculosis* responsible for the bioreductive activation of bicyclic nitroimidazoles. *The FEBS journal*. *Wiley Online Library*; 2012;279(1):113–25.
72. Schena E, Nedialkova L, Borroni E, Battaglia S, Cabibbe AM, Niemann S, et al. Delamanid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using the resazurin microtitre assay and the BACTEC™ MGIT™ 960 system. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. *Oxford University Press*; 2016;71(6):1532–9.
73. Browne S, Hogerzeil L, others. “B 663” in the treatment of leprosy. Preliminary report of a pilot trial. *Leprosy review*. 1962;33(1):6–10.
74. Nimmo C, Millard J, van Dorp L, Brien K, Moodley S, Wolf A, et al. Population-level emergence of bedaquiline and clofazimine resistance-associated variants among patients with drug-resistant tuberculosis in southern Africa: a phenotypic and phylogenetic analysis. *The Lancet Microbe*. *Elsevier*; 2020;1(4):e165–e174.
75. Köser CU, Javid B, Liddell K, Ellington MJ, Feuerriegel S, Niemann S, et al. Drug-resistance mechanisms and tuberculosis drugs. *The Lancet*. *Elsevier*; 2015;385(9965):305–7.
76. Kadura S, King N, Nakhoul M, Zhu H, Theron G, Köser CU, et al. Systematic review of mutations associated with resistance to the new and repurposed *Mycobacterium tuberculosis* drugs bedaquiline, clofazimine, linezolid, delamanid and pretomanid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. *Oxford University Press*; 2020;75(8):2031–43.
77. French G. Safety and tolerability of linezolid. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. *Oxford University Press*; 2003;51(suppl_2):ii45–ii53.
78. Ford CW, Hamel JC, Stapert D, Moerman JK, Hutchinson DK, Barbachyn MR, et al. Oxazolidinones: new antibacterial agents. *Trends in Microbiology*. *Elsevier*; 1997;5(5):196–200.
79. Li Y, Sun F, Zhang W. Bedaquiline and delamanid in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: Promising but challenging. *Drug development research*. *Wiley Online Library*; 2019;80(1):98–105.

80. Nieto Ramirez LM, Quintero Vargas K, Diaz G. Whole genome sequencing for the analysis of drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review for Bedaquiline and Delamanid. *Antibiotics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2020;9(3):133.
81. Hoffmann H, Kohl TA, Hofmann-Thiel S, Merker M, Beckert P, Jatou K, et al. Delamanid and bedaquiline resistance in *Mycobacterium tuberculosis* ancestral Beijing genotype causing extensively drug-resistant tuberculosis in a Tibetan refugee. *American journal of respiratory and critical care medicine*. American Thoracic Society; 2016;193(3):337–40.
82. Ghodousi A, Rizvi AH, Baloch AQ, Ghafoor A, Khanzada FM, Qadir M, et al. Acquisition of cross-resistance to bedaquiline and clofazimine following treatment for tuberculosis in Pakistan. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Am Soc Microbiol; 2019;63(9).
83. Kaniga K, Hasan R, Jou R, Vasiliauskiene E, Chuchottaworn C, Ismail N, et al. Bedaquiline Drug Resistance Emergence Assessment in MDR-TB (DREAM): a 5-Year Prospective In-Vitro Surveillance Study of Bedaquiline and Other Second-Line Drug-Susceptibility Testing in MDR-TB Isolates. *Journal of clinical microbiology*. Am Soc Microbiol; 2021;JCM–02919.
84. Huitric E, Verhasselt P, Koul A, Andries K, Hoffner S, Andersson DI. Rates and mechanisms of resistance development in *Mycobacterium tuberculosis* to a novel diarylquinoline ATP synthase inhibitor. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Am Soc Microbiol; 2010;54(3):1022–8.
85. Segala E, Sougakoff W, Nevejans-Chauffour A, Jarlier V, Petrella S. New mutations in the mycobacterial ATP synthase: new insights into the binding of the diarylquinoline TMC207 to the ATP synthase C-ring structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Am Soc Microbiol; 2012;56(5):2326–34.
86. Hartkoorn RC, Uplekar S, Cole ST. Cross-resistance between clofazimine and bedaquiline through upregulation of MmpL5 in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Am Soc Microbiol; 2014;58(5):2979–81.
87. Villellas C, Coeck N, Meehan CJ, Lounis N, de Jong B, Rigouts L, et al. Unexpected high prevalence of resistance-associated Rv0678 variants in MDR-TB patients without documented prior use of clofazimine or bedaquiline. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Oxford University Press; 2017;72(3):684–90.
88. Nguyen TVA, Anthony RM, Bañuls A-L, Nguyen TVA, Vu DH, Alffenaar J-WC. Bedaquiline resistance: its emergence, mechanism, and prevention. *Clinical Infectious Diseases*. Oxford University Press US; 2018;66(10):1625–30.
89. Zhang S, Chen J, Cui P, Shi W, Zhang W, Zhang Y. Identification of novel mutations associated with clofazimine resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Oxford University Press; 2015;70(9):2507–10.
90. LR SAM Įsakymas dėl Lietuvos Respublikos sveikatos apsaugos ministro 2019 08 22 įsakymo nr. V012 pakeitimo [Internet]. [cited 2022 26]. Available from: <https://e-seimas.lrs.lt/portal/legalAct/lt/TAD/c7048e70c4da11e993cff47c25bfa28c?jfwid=-zr22zyry2>
91. World Health Organization. WHO consolidated guidelines on tuberculosis: module 4: treatment: drug-resistant tuberculosis treatment. World Health Organization; 2020.
92. Nahid P, Mase SR, Migliori GB, Sotgiu G, Bothamley GH, Brozek JL, et al. Treatment of drug-resistant tuberculosis. An official ATS/CDC/ERS/IDSA clinical practice guideline. *American journal of respiratory and critical care medicine*. American Thoracic Society; 2019;200(10):e93–e142.

93. Van Deun A, Maug AKJ, Salim M, Das PK, Sarker MR, Daru P, et al. Short, highly effective, and inexpensive standardized treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. American Thoracic Society; 2010;182(5):684–92.
94. Conradie F, Diacon A, Everitt D, Mendel C, Van Niekerk C, Howell P, et al. The NIX-TB trial of pretomanid, bedaquiline and linezolid to treat XDR-TB. *Conference on retroviruses and opportunistic infections (CROI)*. 2017. p. 13–6.
95. Lv L, Li T, Xu K, Shi P, He B, Kong W, et al. Sputum bacteriology conversion and treatment outcome of patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Infection and drug resistance*. Dove Press; 2018;11:147.
96. Lu P, Liu Q, Martinez L, Yang H, Lu W, Ding X, et al. Time to sputum culture conversion and treatment outcome of patients with multidrug-resistant tuberculosis: a prospective cohort study from urban China. *European Respiratory Journal*. Eur Respiratory Soc; 2017;49(3).
97. Banada PP, Sivasubramani SK, Blakemore R, Boehme C, Perkins MD, Fennelly K, et al. Containment of bioaerosol infection risk by the Xpert MTB/RIF assay and its applicability to point-of-care settings. *Journal of clinical microbiology*. Am Soc Microbiol; 2010;48(10):3551–7.
98. Miotto P, Bigoni S, Migliori GB, Matteelli A, Cirillo DM. Early tuberculosis treatment monitoring by Xpert[®] MTB/RIF. *European Respiratory Journal*. Eur Respiratory Soc; 2012;39(5):1269–71.
99. Gilpin C, Kim S, Lumb R, Rieder H, Van Deun A, Microscopy WG on SS, et al. Critical appraisal of current recommendations and practices for tuberculosis sputum smear microscopy [Workshop Report]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 2007;11(9):946–52.
100. Davies P, Pai M. The diagnosis and misdiagnosis of tuberculosis [State of the art series. Tuberculosis. Edited by ID Rusen. Number 1 in the series]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 2008;12(11):1226–34.
101. Horne DJ, Royce SE, Gooze L, Narita M, Hopewell PC, Nahid P, et al. Sputum monitoring during tuberculosis treatment for predicting outcome: systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious diseases*. Elsevier; 2010;10(6):387–94.
102. Wallis RS, Peppard T, Hermann D. Month 2 culture status and treatment duration as predictors of recurrence in pulmonary tuberculosis: model validation and update. *PLoS one*. Public Library of Science; 2015;10(4):e0125403.
103. Phillips PP, Mendel CM, Burger DA, Crook AM, Nunn AJ, Dawson R, et al. Limited role of culture conversion for decision-making in individual patient care and for advancing novel regimens to confirmatory clinical trials. *BMC medicine*. BioMed Central; 2016;14(1):1–11.
104. Nahid P, Saukkonen J, Kenzie WRM, Johnson JL, Phillips PP, Andersen J, et al. Tuberculosis biomarker and surrogate endpoint research roadmap. *American journal of respiratory and critical care medicine*. Am Thoracic Soc; 2011;184(8):972–9.
105. Bomanji JB, Gupta N, Gulati P, Das CJ. Imaging in tuberculosis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015;5(6):a017814.
106. Malherbe ST, Shenai S, Ronacher K, Loxton AG, Dolganov G, Kriel M, et al. Persisting positron emission tomography lesion activity and Mycobacterium tuberculosis mRNA after tuberculosis cure. *Nature medicine*. Nature Publishing Group; 2016;22(10):1094–100.
107. Alsultan A, Peloquin CA. Therapeutic drug monitoring in the treatment of tuberculosis: an update. *Drugs*. Springer; 2014;74(8):839–54.

108. Druszczyńska M, Wawrocki S, Szewczyk R, Rudnicka W. Mycobacteria-derived biomarkers for tuberculosis diagnosis. *The Indian journal of medical research*. Wolters Kluwer-Medknow Publications; 2017;146(6):700.
109. Sigal GB, Segal MR, Mathew A, Jarlsberg L, Wang M, Barbero S, et al. Biomarkers of tuberculosis severity and treatment effect: a directed screen of 70 host markers in a randomized clinical trial. *EBioMedicine*. Elsevier; 2017;25:112–21.
110. Yong YK, Tan HY, Saeidi A, Wong WF, Vignesh R, Velu V, et al. Immune biomarkers for diagnosis and treatment monitoring of tuberculosis: current developments and future prospects. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media SA; 2019;10.
111. Shah M, Hanrahan C, Wang ZY, Dendukuri N, Lawn SD, Denkinger CM, et al. Lateral flow urine lipoarabinomannan assay for detecting active tuberculosis in HIV-positive adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd; 2016;(5).
112. Dulphy N, Herrmann J-L, Nigou J, Réa D, Boissel N, Puzo G, et al. Intermediate maturation of *Mycobacterium tuberculosis* LAM-activated human dendritic cells. *Cellular microbiology*. Wiley Online Library; 2007;9(6):1412–25.
113. Mazurek J, Ignatowicz L, Kallenius G, Svenson SB, Pawlowski A, Hamasur B. Divergent effects of mycobacterial cell wall glycolipids on maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells. *PLoS One*. Public Library of Science; 2012;7(8):e42515.
114. Ehlers S. DC-SIGN and mannosylated surface structures of *Mycobacterium tuberculosis*: a deceptive liaison. *European journal of cell biology*. Elsevier; 2010;89(1):95–101.
115. Drain PK, Gounder L, Grobler A, Sahid F, Bassett IV, Moosa M-YS. Urine lipoarabinomannan to monitor antituberculosis therapy response and predict mortality in an HIV-endemic region: a prospective cohort study. *BMJ open*. British Medical Journal Publishing Group; 2015;5(4).
116. Cox JA, Lukande RL, Kalungi S, Van Marck E, Van de Vijver K, Kambugu A, et al. Is urinary lipoarabinomannan the result of renal tuberculosis? Assessment of the renal histology in an autopsy cohort of Ugandan HIV-infected adults. *PLoS One*. Public Library of Science; 2015;10(4):e0123323.
117. Kawasaki M, Echeverri C, Raymond L, Cadena E, Reside E, Gler MT, et al. Lipoarabinomannan in sputum to detect bacterial load and treatment response in patients with pulmonary tuberculosis: Analytic validation and evaluation in two cohorts. *PLoS medicine*. Public Library of Science San Francisco, CA USA; 2019;16(4):e1002780.
118. Suwanpimolkul G, Kawkitinarong K, Manosuthi W, Sophonphan J, Gatechompol S, Ohata PJ, et al. Utility of urine lipoarabinomannan (LAM) in diagnosing tuberculosis and predicting mortality with and without HIV: prospective TB cohort from the Thailand Big City TB Research Network. *International Journal of Infectious Diseases*. Elsevier; 2017;59:96–102.
119. Bjerrum S, Schiller I, Dendukuri N, Eisenhut M, Kohli M, Nathavitharana RR, et al. Lateral flow urine lipoarabinomannan assay († LF-LAM)† for the diagnosis of active tuberculosis in people living with HIV: policy update († 2019)†. *World Health Organization*; 2019;
120. Jeffrey North E, Jackson M, E Lee R. New approaches to target the mycolic acid biosynthesis pathway for the development of tuberculosis therapeutics. *Current pharmaceutical design*. Bentham Science Publishers; 2014;20(27):4357–78.
121. Borowska-Strugińska B, Druszczyńska M, Lorkiewicz W, Szewczyk R, \.Z\ kadzińska E zbieta. Mycolic acids as markers of osseous tuberculosis in the Neolithic skeleton from Kujawy region (central Poland). *Anthropol Rev*. 2014;77(2):137–49.

122. Ronning DR, Klabunde T, Besra GS, Vissa VD, Belisle JT, Sacchettini JC. Crystal structure of the secreted form of antigen 85C reveals potential targets for mycobacterial drugs and vaccines. *Nature structural biology*. Nature Publishing Group; 2000;7(2):141–6.
123. Armitige LY, Jagannath C, Wanger AR, Norris SJ. Disruption of the genes encoding antigen 85A and antigen 85B of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: effect on growth in culture and in macrophages. *Infection and immunity*. Am Soc Microbiol; 2000;68(2):767–78.
124. Kashyap RS, Dobos KM, Belisle JT, Purohit HJ, Chandak NH, Taori GM, et al. Demonstration of components of antigen 85 complex in cerebrospinal fluid of tuberculous meningitis patients. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. Am Soc Microbiol; 2005;12(6):752–8.
125. Wallis RS, Phillips M, Johnson JL, Teixeira L, Rocha LMMC, Maciel E, et al. Inhibition of isoniazid-induced expression of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85 in sputum: potential surrogate marker in tuberculosis chemotherapy trials. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Am Soc Microbiol; 2001;45(4):1302–4.
126. Bentley-Hibbert SI, Quan X, Newman T, Huygen K, Godfrey HP. Pathophysiology of antigen 85 in patients with active tuberculosis: antigen 85 circulates as complexes with fibronectin and immunoglobulin G. *Infection and immunity*. Am Soc Microbiol; 1999;67(2):581–8.
127. Kashyap RS, Rajan AN, Ramteke SS, Agrawal VS, Kelkar SS, Purohit HJ, et al. Diagnosis of tuberculosis in an Indian population by an indirect ELISA protocol based on detection of Antigen 85 complex: a prospective cohort study. *BMC infectious diseases*. Springer; 2007;7(1):74.
128. Turbawaty DK, Sugianli AK, Soeroto AY, Setiabudiawan B, Parwati I. Comparison of the performance of urinary *Mycobacterium tuberculosis* antigens cocktail (ESAT6, CFP10, and MPT64) with culture and microscopy in pulmonary tuberculosis patients. *International Journal of Microbiology*. Hindawi; 2017;2017.
129. Cliff JM, Lee J-S, Constantinou N, Cho J-E, Clark TG, Ronacher K, et al. Distinct phases of blood gene expression pattern through tuberculosis treatment reflect modulation of the humoral immune response. *The Journal of infectious diseases*. Oxford University Press; 2013;207(1):18–29.
130. Steingart KR, Henry M, Laal S, Hopewell PC, Ramsay A, Menzies D, et al. Commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. *PLoS Med*. Public Library of Science; 2007;4(6):e202.
131. Steingart KR, Flores LL, Dendukuri N, Schiller I, Laal S, Ramsay A, et al. Commercial serological tests for the diagnosis of active pulmonary and extrapulmonary tuberculosis: an updated systematic review and meta-analysis. *PLoS Med*. Public Library of Science; 2011;8(8):e1001062.
132. Steingart KR, Dendukuri N, Henry M, Schiller I, Nahid P, Hopewell PC, et al. Performance of purified antigens for serodiagnosis of pulmonary tuberculosis: a meta-analysis. *Clinical and vaccine immunology*. Am Soc Microbiol; 2009;16(2):260–76.
133. Achkar JM, Ziegenbalg A. Antibody responses to mycobacterial antigens in children with tuberculosis: challenges and potential diagnostic value. *Clinical and Vaccine Immunology*. Am Soc Microbiol; 2012;19(12):1898–906.
134. Lagrange PH, Thangaraj SK, Dayal R, Deshpande A, Ganguly NK, Girardi E, et al. A toolbox for tuberculosis (TB) diagnosis: an Indian multi-centric study (2006-2008); evaluation of serological assays based on PGL-Tb1 and ESAT-6/CFP10 antigens for TB diagnosis. *Plos one*. Public Library of Science; 2014;9(5):e96367.

135. Luo L, Zhu L, Yue J, Liu J, Liu G, Zhang X, et al. Antigens Rv0310c and Rv1255c are promising novel biomarkers for the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection. *Emerging microbes & infections*. Taylor & Francis; 2017;6(1):1–8.
136. López-Ramos JE, Macias-Segura N, Cuevas-Cordoba B, Araujo-Garcia Z, Bastián Y, Castañeda-Delgado JE, et al. Improvement in the diagnosis of tuberculosis combining Mycobacterium tuberculosis immunodominant peptides and serum host biomarkers. *Archives of Medical Research*. Elsevier; 2018;49(3):147–53.
137. Abraham PR, Devalraju KP, Jha V, Valluri VL, Mukhopadhyay S. PPE17 (Rv1168c) protein of Mycobacterium tuberculosis detects individuals with latent TB infection. *PloS one*. Public Library of Science San Francisco, CA USA; 2018;13(11):e0207787.
138. Maekura R, Kitada S, Osada-Oka M, Tateishi Y, Ozeki Y, Fujicawa T, et al. Serum antibody profiles in individuals with latent Mycobacterium tuberculosis infection. *Microbiology and immunology*. Wiley Online Library; 2019;63(3-4):130–8.
139. Jasenosky LD, Scriba TJ, Hanekom WA, Goldfeld AE. T cells and adaptive immunity to Mycobacterium tuberculosis in humans. *Immunological reviews*. Wiley Online Library; 2015;264(1):74–87.
140. Lin PL, Flynn JL. CD8 T cells and Mycobacterium tuberculosis infection. *Seminars in immunopathology*. 2015. p. 239–49.
141. Šitkauskienė B. Imunodeficitai (imuniteto nepakankamumas): mokomoji knyga. Kaunas: Kauno medicinos universiteto leidykla; 2006;
142. Sia JK, Rengarajan J. Immunology of Mycobacterium tuberculosis infections. *Gram-Positive Pathogens*. Wiley Online Library; 2019;1056–86.
143. Rovina N, Panagiotou M, Pontikis K, Kyriakopoulou M, Koulouris NG, Koutsoukou A. Immune response to mycobacterial infection: lessons from flow cytometry. *Clinical and Developmental Immunology*. Hindawi; 2013;2013.
144. Harding CV, Boom WH. Regulation of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis: a role for Toll-like receptors. *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group; 2010;8(4):296–307.
145. Philips JA, Ernst JD. Tuberculosis pathogenesis and immunity. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. Annual Reviews; 2012;7:353–84.
146. Korb VC, Chuturgoon AA, Moodley D. Mycobacterium tuberculosis: manipulator of protective immunity. *International journal of molecular sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2016;17(3):131.
147. Corbett EL, Watt CJ, Walker N, Maher D, Williams BG, Raviglione MC, et al. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Archives of internal medicine*. American Medical Association; 2003;163(9):1009–21.
148. Shafiani S, Tucker-Heard G, Kariyone A, Takatsu K, Urdahl KB. Pathogen-specific regulatory T cells delay the arrival of effector T cells in the lung during early tuberculosis. *Journal of Experimental Medicine*. The Rockefeller University Press; 2010;207(7):1409–20.
149. Chen CY, Huang D, Wang RC, Shen L, Zeng G, Yao S, et al. A critical role for CD8 T cells in a nonhuman primate model of tuberculosis. *PLoS Pathog*. Public Library of Science; 2009;5(4):e1000392.
150. Bruns H, Meinken C, Schauenberg P, Härter G, Kern P, Modlin RL, et al. Anti-TNF immunotherapy reduces CD8+ T cell-mediated antimicrobial activity against Mycobacterium tuberculosis in humans. *The Journal of clinical investigation*. Am Soc Clin Invest; 2009;119(5):1167–77.
151. Rook GA, Steele J, Fraher L, Barker S, Karmali R, O’riordan J, et al. Vitamin D3, gamma interferon, and control of proliferation of Mycobacterium tuberculosis by human monocytes. *Immunology*. Wiley-Blackwell; 1986;57(1):159.

152. Denkinger CM, Pai M, Patel M, Menzies D. Gamma interferon release assay for monitoring of treatment response for active tuberculosis: an explosion in the spaghetti factory. *Journal of clinical microbiology*. Am Soc Microbiol; 2013;51(2):607–10.
153. Caccamo N, Joosten SA, Ottenhoff TH, Dieli F. Atypical human effector/memory CD4+ T cells with a naive-like phenotype. *Frontiers in immunology*. Frontiers; 2018;9:2832.
154. Saharia KK, Petrovas C, Ferrando-Martinez S, Leal M, Luque R, Ive P, et al. Tuberculosis therapy modifies the cytokine profile, maturation state, and expression of inhibitory molecules on Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+ T-cells. *PLoS One*. Public Library of Science San Francisco, CA USA; 2016;11(7):e0158262.
155. Harari A, Rozot V, Enders FB, Perreau M, Stalder JM, Nicod L, et al. Dominant TNF-alpha Mycobacterium tuberculosis-Specific CD4 T Cell Responses Discriminate Between Latent Infection and Active Disease. 2011;
156. Sester U, Fousse M, Dirks J, Mack U, Prasse A, Singh M, et al. Whole-blood flow-cytometric analysis of antigen-specific CD4 T-cell cytokine profiles distinguishes active tuberculosis from non-active states. *PloS one*. Public Library of Science; 2011;6(3):e17813.
157. Casey R, Blumenkrantz D, Millington K, Montamat-Sicotte D, Kon OM, Wickremasinghe M, et al. Enumeration of functional T-cell subsets by fluorescence-immunospot defines signatures of pathogen burden in tuberculosis. *PloS one*. Public Library of Science; 2010;5(12):e15619.
158. Sutherland JS, Adetifa IM, Hill PC, Adegbola RA, Ota MO. Pattern and diversity of cytokine production differentiates between Mycobacterium tuberculosis infection and disease. *European journal of immunology*. Wiley Online Library; 2009;39(3):723–9.
159. Caccamo N, Guggino G, Joosten SA, Gelsomino G, Di Carlo P, Titone L, et al. Multifunctional CD4+ T cells correlate with active Mycobacterium tuberculosis infection. *European journal of immunology*. Wiley Online Library; 2010;40(8):2211–20.
160. Sallusto F. Heterogeneity of human CD4+ T cells against microbes. *Annual review of immunology*. Annual Reviews; 2016;34:317–34.
161. Van den Broek T, Borghans JA, van Wijk F. The full spectrum of human naive T cells. *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2018;18(6):363–73.
162. Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2014;14(1):24–35.
163. Orlando V, La Manna MP, Goletti D, Palmieri F, Lo Presti E, Joosten SA, et al. Human CD4 T-cells with a naive phenotype produce multiple cytokines during Mycobacterium tuberculosis infection and correlate with active disease. *Frontiers in immunology*. Frontiers; 2018;9:1119.
164. Streitz M, Tesfa L, Yildirim V, Yahyazadeh A, Ulrichs T, Lenkei R, et al. Loss of receptor on tuberculin-reactive T-cells marks active pulmonary tuberculosis. *PLoS One*. Public Library of Science; 2007;2(8):e735.
165. Adekambi T, Ibegbu CC, Kalokhe AS, Yu T, Ray SM, Rengarajan J. Distinct effector memory CD4+ T cell signatures in latent Mycobacterium tuberculosis infection, BCG vaccination and clinically resolved tuberculosis. *PloS one*. Public Library of Science; 2012;7(4):e36046.
166. Nikitina IY, Kondratuk NA, Kosmiadi GA, Amansahedov RB, Vasilyeva IA, Ganusov VV, et al. Mtb-specific CD27 low CD4 T cells as markers of lung tissue destruction during pulmonary tuberculosis in humans. *PLoS One*. Public Library of Science; 2012;7(8):e43733.

167. Chiacchio T, Petruccioli E, Vanini V, Cuzzi G, Pinnetti C, Sampaolesi A, et al. Polyfunctional T-cells and effector memory phenotype are associated with active TB in HIV-infected patients. *Journal of Infection*. Elsevier; 2014;69(6):533–45.
168. Portevin D, Moukambi F, Clowes P, Bauer A, Chachage M, Ntinginya NE, et al. Assessment of the novel T-cell activation marker-tuberculosis assay for diagnosis of active tuberculosis in children: a prospective proof-of-concept study. *The Lancet infectious diseases*. Elsevier; 2014;14(10):931–8.
169. Fritsch RD, Shen X, Sims GP, Hathcock KS, Hodes RJ, Lipsky PE. Stepwise differentiation of CD4 memory T cells defined by expression of CCR7 and CD27. *The Journal of Immunology*. Am Assoc Immunol; 2005;175(10):6489–97.
170. Panteleev AV, Nikitina IY, Burmistrova IA, Kosmiadi GA, Radaeva TV, Amanshedov RB, et al. Severe tuberculosis in humans correlates best with neutrophil abundance and lymphocyte deficiency and does not correlate with antigen-specific CD4 T-cell response. *Frontiers in immunology*. Frontiers; 2017;8:963.
171. Schuetz A, Haule A, Reither K, Ngwenyama N, Rachow A, Meyerhans A, et al. Monitoring CD27 expression to evaluate Mycobacterium tuberculosis activity in HIV-1 infected individuals in vivo. *PloS one*. Public Library of Science; 2011;6(11):e27284.
172. Yong YK, Tan HY, Saeidi A, Rosmawati M, Atiya N, Ansari AW, et al. Decrease of CD69 levels on TCR V α 7. 2+ CD4+ innate-like lymphocytes is associated with impaired cytotoxic functions in chronic hepatitis B virus-infected patients. *Innate Immunity*. SAGE Publications Sage UK: London, England; 2017;23(5):459–67.
173. Nikolova M, Markova R, Drenska R, Muhtarova M, Todorova Y, Dimitrov V, et al. Antigen-specific CD4-and CD8-positive signatures in different phases of Mycobacterium tuberculosis infection. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. Elsevier; 2013;75(3):277–81.
174. Ahmed MI, Ntinginya NE, Kibiki G, Mtafya BA, Semvua H, Mpagama S, et al. Phenotypic changes on Mycobacterium tuberculosis-specific CD4 T cells as surrogate markers for tuberculosis treatment efficacy. *Frontiers in immunology*. Frontiers; 2018;9:2247.
175. Musvosvi M, Duffy D, Filander E, Africa H, Mabwe S, Jaxa L, et al. T-cell biomarkers for diagnosis of tuberculosis: candidate evaluation by a simple whole blood assay for clinical translation. *European Respiratory Journal*. Eur Respiratory Soc; 2018;51(3).
176. Rodrigues D do S da S, Medeiros EAS de, Weckx LY, Bonnez W, Salomão R, Kallas EG. Immunophenotypic characterization of peripheral T lymphocytes in Mycobacterium tuberculosis infection and disease. *Clinical & Experimental Immunology*. Wiley Online Library; 2002;128(1):149–54.
177. Walzl G, Ronacher K, Hanekom W, Scriba TJ, Zumla A. Immunological biomarkers of tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2011;11(5):343–54.
178. suPAR Monograph [Internet]. [cited 2021 Oct 1]. Available from: <https://www.virogates.com/publications-about-supar/>
179. Lyngbæk S, Marott JL, Sehestedt T, Hansen TW, Olsen MH, Andersen O, et al. Cardiovascular risk prediction in the general population with use of suPAR, CRP, and Framingham Risk Score. *International journal of cardiology*. Elsevier; 2013;167(6):2904–11.
180. Winnicki W, Sunder-Plassmann G, Sengölge G, Handisurya A, Herkner H, Kornauth C, et al. Diagnostic and prognostic value of soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (suPAR) in focal segmental glomerulosclerosis and impact of detection method. *Scientific reports*. Nature Publishing Group; 2019;9(1):1–9.

181. Donadello K, Scolletta S, Taccone FS, Covajes C, Santonocito C, Cortes DO, et al. Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor as a prognostic biomarker in critically ill patients. *Journal of critical care*. Elsevier; 2014;29(1):144–9.
182. Yilmaz G, Mentese A, Kaya S, Uzun A, Karahan SC, Koksali I. The diagnostic and prognostic significance of soluble urokinase plasminogen activator receptor in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Journal of clinical virology*. Elsevier; 2011;50(3):209–11.
183. Höybye C, Faseh L, Himonakos C, Pielak T, Eugen-Olsen J. Serum soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) in adults with growth hormone deficiency. *Endocrine connections*. Bioscientifica Ltd; 2019;8(6):772–9.
184. Rabna P, Andersen A, Wejse C, Oliveira I, Gomes VF, Bonde Haaland M et al. Utility of the plasma level of suPAR in monitoring risk of mortality during TB treatment. *PLoS One*. Public Library of Science; 2012;7(8):e43933.
185. Indumati V, Vijay V, Krishnaswamy D, Rajeshwari V, Ramesh A, Shantala D et al. Serum levels of soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) as a marker of tuberculosis treatment efficacy. *Indian Journal of Tuberculosis*. Elsevier; 2017;64(3):206–11..
186. Raras TYM, Retnowati D, Astuti T. Prospective use of soluble urokinase plasminogen activator receptor to screen TB co-infected with HIV patient among TB patient. *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis*. Elsevier; 2017;66(4):631–4.
187. Ni W, Han Y, Zhao J, Cui J, Wang K, Wang R, et al. Serum soluble urokinase-type plasminogen activator receptor as a biological marker of bacterial infection in adults: a systematic review and meta-analysis. *Scientific reports*. Nature Publishing Group; 2016;6:39481.
188. Oh SM, Jang JH, Choi SI, Lee HB, Lee YC, Rhee YK. sICAM-1, sE-selectin, sVCAM-1 Concentration in Patients with Pulmonary Tuberculosis. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*. The Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory Diseases; 2001;44(6):1256–62.
189. Bhalla K, Chugh M, Mehrotra S, Rathore S, Tousif S, Dwivedi VP, et al. Host ICAMs play a role in cell invasion by Mycobacterium tuberculosis and Plasmodium falciparum. *Nature communications*. Nature Publishing Group; 2015;6(1):1–13.
190. Bäumer I, Zissel G, Schlaak M, Müller-Quernheim J. Soluble intercellular adhesion molecule 1 (sICAM-1) in bronchoalveolar lavage (BAL) cell cultures and in the circulation of patients with tuberculosis, hypersensitivity pneumonitis and sarcoidosis. *European journal of medical research*. 1998;3(6):288–94.
191. Kwas H, Guermazi E, Zendah I, Jemia EB, Khattab A, Khouaja I, et al. C-reactive protein and pulmonary tuberculosis: what correlation with disease severity. *Eur Respiratory Soc*; 2015;
192. Kedia K, Wendler JP, Baker ES, Burnum-Johnson KE, Jarsberg LG, Stratton KG, et al. Application of multiplexed ion mobility spectrometry towards the identification of host protein signatures of treatment effect in pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis*. Elsevier; 2018;112:52–61.
193. Miranda P, Gil-Santana L, Oliveira MG, Mesquita ED, Silva E, Rauwerdink A, et al. Sustained elevated levels of C-reactive protein and ferritin in pulmonary tuberculosis patients remaining culture positive upon treatment initiation. *PloS one*. Public Library of Science San Francisco, CA USA; 2017;12(4):e0175278.
194. Andrys C, Pozler O, Krejsek J, Derner V, Drahosová M, Kopecky O. Serum soluble adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1 and sE-selectin) in healthy school aged children and adults. *Acta Medica-Hradec Karlove*. 2000;43(3):103–6.
195. Deneva-Koycheva TI, Vladimirova-Kitova LG, Angelova EA, Tsvetkova TZ. Serum levels of sICAM-1, sVCAM-1, sE-selectin, sP-selectin in healthy Bulgarian people. *Folia Med (Plovdiv)*. 2011;53(2):22–8.

196. De Bellis A, Di Martino S, Fiordelisi F, Muccitelli V, Sinisi A, Abbate G, et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) concentrations in Graves' disease patients followed up for development of ophthalmopathy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Oxford University Press; 1998;83(4):1222–5.
197. Alves-Leon SV, Batista E, Papais-Alvarenga R, Qu'irico-Santos T. Determination of soluble ICAM-1 and TNF α in the cerebrospinal fluid and serum levels in a population of Brazilian patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Arquivos de neuro-psiquiatria*. SciELO Brasil; 2001;59:18–22.
198. Tanne D, Haim M, Boyko V, Goldbourt U, Reshef T, Matetzky S, et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and risk of future ischemic stroke: a nested case-control study from the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) study cohort. *Stroke*. Am Heart Assoc; 2002;33(9):2182–6.
199. Polena H, Boudou F, Tilleul S, Dubois-Colas N, Lecoite C, Rakotosamimanana N, et al. Mycobacterium tuberculosis exploits the formation of new blood vessels for its dissemination. *Scientific reports*. Nature Publishing Group; 2016;6(1):1–11.
200. Alatas F, Metintas M, Erginel S, Yildirim H, others. Vascular endothelial growth factor levels in active pulmonary tuberculosis. *Chest*. Elsevier; 2004;125(6):2156–9.
201. Pydi SS, Bandaru AR, Venkatasubramanian S, Jonnalagada S, Valluri VL. Vaccine for tuberculosis: up-regulation of IL-15 by Ag85A and not by ESAT-6. *Tuberculosis*. Elsevier; 2011;91(2):136–9.
202. ObeaguEI OI, NwanjoHU ND. Evaluation of interferon-gamma, interleukin 6 and interleukin 10 in tuberculosis patients in Umuahia. *Ann Clin Lab Res*. 2019;7(2):307.
203. Lopes FHA, Assis LC de, Pires Neto R da J, Botelho KP, Sá KM, Frota CC, et al. Serum levels of interleukin-6 in contacts of active pulmonary tuberculosis. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. SciELO Brasil; 2013;49(6):410–4.
204. Estévez O, Anibarro L, Garet E, Pallares Á, Pena A, Villaverde C, et al. Identification of candidate host serum and saliva biomarkers for a better diagnosis of active and latent tuberculosis infection. *PLoS one*. Public Library of Science San Francisco, CA USA; 2020;15(7):e0235859.
205. Chandrashekhara S, Anupama K, Sambarey A, Chandra N. High IL-6 and low IL-15 levels mark the presence of TB infection: A preliminary study. *Cytokine*. Elsevier; 2016;81:57–62.
206. Sheneef A, Hussein MT, Mohamed T, Mahmoud AA, Yousef LM, Alkady OA. Pentraxin 3 Genetic Variants and The Risk of Active Pulmonary Tuberculosis. *The Egyptian journal of immunology*. 2017;24(1):21–7.
207. Petrone L, Cannas A, Vanini V, Cuzzi G, Aloï F, Nsubuga M, et al. Blood and urine inducible protein 10 as potential markers of disease activity. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 2016;20(11):1554–61.
208. Adu-Gyamfi CG, Snyman T, Hoffmann CJ, Martinson NA, Chaisson RE, George JA, et al. Plasma indoleamine 2, 3-dioxygenase, a biomarker for tuberculosis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clinical Infectious Diseases*. Oxford University Press US; 2017;65(8):1356–63.
209. Turgut T, Akbulut H, Deveci F, Kacar C, Muz MH. Serum interleukin-2 and neopterin levels as useful markers for treatment of active pulmonary tuberculosis. *The Tohoku journal of experimental medicine*. Tohoku University Medical Press; 2006;209(4):321–8.
210. Maertzdorf J, Weiner J, Mollenkopf H-J, Network Tb, Bauer T, Prasse A, et al. Common patterns and disease-related signatures in tuberculosis and sarcoidosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Acad Sciences; 2012;109(20):7853–8.

211. Djoba Siawaya J, Beyers N, Van Helden P, Walzl G. Differential cytokine secretion and early treatment response in patients with pulmonary tuberculosis. *Clinical & Experimental Immunology*. Wiley Online Library; 2009;156(1):69–77.
212. Jacobs R, Malherbe S, Loxton AG, Stanley K, Van Der Spuy G, Walzl G, et al. Identification of novel host biomarkers in plasma as candidates for the immunodiagnosis of tuberculosis disease and monitoring of tuberculosis treatment response. *Oncotarget. Impact Journals, LLC*; 2016;7(36):57581.
213. Kell DB, Oliver SG. Here is the evidence, now what is the hypothesis? The complementary roles of inductive and hypothesis-driven science in the post-genomic era. *Bioessays*. Wiley Online Library; 2004;26(1):99–105.
214. Garay-Baquero DJ, White CH, Walker NF, Tebruegge M, Schiff HF, Ugarte-Gil C, et al. Comprehensive plasma proteomic profiling reveals biomarkers for active tuberculosis. *JCI insight*. American Society for Clinical Investigation; 2020;5(18).
215. Lee M-R, Chang L-Y, Chang C-H, Yan B-S, Wang J-Y, Lin W-H. Differed il-1 beta response between active tb and ltb cases by ex vivo stimulation of human monocyte-derived macrophage with tb-specific antigen. *Disease markers*. Hindawi; 2019;2019.
216. Martinez AN, Mehra S, Kaushal D. Role of interleukin 6 in innate immunity to Mycobacterium tuberculosis infection. *The Journal of infectious diseases*. Oxford University Press; 2013;207(8):1253–61.
217. Joosten S, Goeman J, Sutherland J, Opmeer L, De Boer K, Jacobsen M, et al. Identification of biomarkers for tuberculosis disease using a novel dual-color RT-MLPA assay. *Genes & Immunity*. Nature Publishing Group; 2012;13(1):71–82.
218. Cliff JM, Cho J-E, Lee J-S, Ronacher K, King EC, van Helden P, et al. Excessive cytolytic responses predict tuberculosis relapse after apparently successful treatment. *The Journal of infectious diseases*. Oxford University Press; 2016;213(3):485–95.
219. Singhania A, Wilkinson RJ, Rodrigue M, Haldar P, O’Garra A. The value of transcriptomics in advancing knowledge of the immune response and diagnosis in tuberculosis. *Nature immunology*. Nature Publishing Group; 2018;19(11):1159–68.
220. World Health Organisation. Meeting report of the WHO expert consultation on drug-resistant tuberculosis treatment outcome definitions, 17-19 November 2020. World Health Organization; 2021;
221. Varaine F, Rich M, Grouzard V. Tuberculosis: Practical guide for clinicians, nurses, laboratory technicians and medical auxiliaries. *Medecins Sans Frontieres and Partners in Health*. 2014;
222. World Health Organisation. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2020: 2018 data. World Health Organization. Regional Office for Europe; 2020;
223. Collaborative Group for the Meta-Analysis of Individual Patient Data in MDR-TB treatment–2017, Ahmad N, Ahuja SD, Akkerman OW, Alffenaar J-WC, Anderson LF, et al. Treatment correlates of successful outcomes in pulmonary multidrug-resistant tuberculosis: an individual patient data meta-analysis. *The Lancet*. Elsevier; 2018;392(10150):821–34.
224. Alipanah N, Jarlsberg L, Miller C, Linh NN, Falzon D, Jaramillo E, et al. Adherence interventions and outcomes of tuberculosis treatment: A systematic review and meta-analysis of trials and observational studies. *PLoS medicine*. Public Library of Science San Francisco, CA USA; 2018;15(7):e1002595.
225. Wang JY, Lee LN, Yu CJ, Chien YJ, Yang PC, Tami Group. Factors influencing time to smear conversion in patients with smear-positive pulmonary tuberculosis. *Respirology*. Wiley Online Library; 2009;14(7):1012–9.
226. Alene KA, Viney K, Gray DJ, McBryde ES, Wagnew M, Clements AC. Mapping tuberculosis treatment outcomes in Ethiopia. *BMC infectious diseases*. Springer; 2019;19(1):1–11.

227. Belo M, Luiz R, Teixeira E, Hanson C, Trajman A. Tuberculosis treatment outcomes and socio-economic status: a prospective study in Duque de Caxias, Brazil. *The International journal of tuberculosis and lung disease*. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 2011;15(7):978–81.
228. Boccia D, Hargreaves J, De Stavola BL, Fielding K, Schaap A, Godfrey-Faussett P, et al. The association between household socioeconomic position and prevalent tuberculosis in Zambia: a case-control study. *PLoS one*. Public Library of Science; 2011;6(6):e20824.
229. Van Hoorn R, Jaramillo E, Collins D, Gebhard A, van den Hof S. The effects of psycho-emotional and socio-economic support for tuberculosis patients on treatment adherence and treatment outcomes—a systematic review and meta-analysis. *PLoS one*. Public Library of Science San Francisco, CA USA; 2016;11(4):e0154095.
230. Tuberculosis and gender [Internet]. [cited 2021 May 27]. Available from: <https://www.who.int/tb/areas-of-work/population-groups/gender/en/>
231. Murphy M, Wills G, Murthy S, Louw C, Bateson A, Hunt R, et al. Gender differences in tuberculosis treatment outcomes: a post hoc analysis of the REMoxTB study. *BMC medicine*. BioMed Central; 2018;16(1):1–11.
232. Dale K, Tay E, Trauer J, Trevan P, Denholm J. Gender differences in tuberculosis diagnosis, treatment and outcomes in Victoria, Australia, 2002-2015. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 2017;21(12):1264–71.
233. Güler M, Ünsal E, Dursun B, Aydin Ö, Capan N. Factors influencing sputum smear and culture conversion time among patients with new case pulmonary tuberculosis. *International journal of clinical practice*. Wiley Online Library; 2007;61(2):231–5.
234. Feng JY, Huang SF, Ting WY, Chen YC, Lin YY, Huang RM, et al. Gender differences in treatment outcomes of tuberculosis patients in Taiwan: a prospective observational study. *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier; 2012;18(9):E331–E337.
235. Chidambaram V, Tun NL, Majella MG, Castillo JR, Aye SK, Kumar A, et al. Sex differences in TB treatment outcomes: Retrospective cohort study and meta-analysis. medRxiv. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2021;
236. Negin J, Abimbola S, Marais BJ. Tuberculosis among older adults—time to take notice. *International Journal of Infectious Diseases*. Elsevier; 2015;32:135–7.
237. Chaves Torres NM, Quijano Rodriguez JJ, Porras Andrade PS, Arriaga MB, Netto EM. Factors predictive of the success of tuberculosis treatment: A systematic review with meta-analysis. *PLoS One*. Public Library of Science San Francisco, CA USA; 2019;14(12):e0226507.
238. Kwon YS, Chi SY, Oh IJ, Kim KS, Kim YI, Lim SC, et al. Clinical characteristics and treatment outcomes of tuberculosis in the elderly: a case control study. *BMC Infectious Diseases*. BioMed Central; 2013;13(1):1–7.
239. Lee CH, Wang JY, Lin HC, Lin PY, Chang JH, Suk CW, et al. Treatment delay and fatal outcomes of pulmonary tuberculosis in advanced age: a retrospective nationwide cohort study. *BMC infectious diseases*. Springer; 2017;17(1):1–11.
240. Global health risks [Internet]. [cited 2020 3]. Available from: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks_report_full.pdf
241. Imtiaz S, Shield KD, Roerecke M, Samokhvalov AV, Lönnroth K, Rehm J. Alcohol consumption as a risk factor for tuberculosis: meta-analyses and burden of disease. *European Respiratory Journal*. Eur Respiratory Soc; 2017;50(1).
242. Simou E, Britton J, Leonardi-Bee J. Alcohol consumption and risk of tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 2018;22(11):1277–85.

243. Kyu HH, Maddison ER, Henry NJ, Mumford JE, Barber R, Shields C, et al. The global burden of tuberculosis: results from the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet Infectious Diseases*. Elsevier; 2018;18(3):261–84.
244. Ragan E, Kleinman M, Sweigart B, Gnatienco N, Parry C, Horsburgh C, et al. The impact of alcohol use on tuberculosis treatment outcomes: a systematic review and meta-analysis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 2020;24(1):73–82.
245. Rehm J, Samokhvalov AV, Neuman MG, Room R, Parry C, Lönnroth K, et al. The association between alcohol use, alcohol use disorders and tuberculosis (TB). A systematic review. *BMC public health*. Springer; 2009;9(1):450.
246. Veerakumar A, Sahu SK, Sarkar S, Kattimani S, Govindarajan S. Alcohol use disorders among pulmonary tuberculosis patients under RNTCP in urban Pondicherry, India. *Indian Journal of Tuberculosis*. Elsevier; 2015;62(3):171–7.
247. Laprawat S, Peltzer K, Pansila W, Tansakul C. Alcohol use disorder and tuberculosis treatment: A longitudinal mixed method study in Thailand. *South African Journal of Psychiatry*. 2017;23.
248. Peltzer K, Louw J, Mchunu G, Naidoo P, Matseke G, Tutshana B. Hazardous and harmful alcohol use and associated factors in tuberculosis public primary care patients in South Africa. *International journal of environmental research and public health*. Molecular Diversity Preservation International; 2012;9(9):3245–57.
249. Volkmann T, Moonan P, Miramontes R, Oeltmann J. Tuberculosis and excess alcohol use in the United States, 1997-2012. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 2015;19(1):111–9.
250. Myers B, Bouton TC, Ragan EJ, White LF, McIlleron H, Theron D, et al. Impact of alcohol consumption on tuberculosis treatment outcomes: a prospective longitudinal cohort study protocol. *BMC infectious diseases*. BioMed Central; 2018;18(1):1–9.
251. Molina PE, Happel KI, Zhang P, Kolls JK, Nelson S. Focus on: alcohol and the immune system. *Alcohol Research & Health*. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism; 2010;33(1-2):97.
252. Simet SM, Sisson JH. Alcohol's effects on lung health and immunity. *Alcohol research: current reviews*. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism; 2015;37(2):199.
253. Saukkonen JJ, Cohn DL, Jasmer RM, Schenker S, Jereb JA, Nolan CM, et al. An official ATS statement: hepatotoxicity of antituberculosis therapy. *American journal of respiratory and critical care medicine*. American Thoracic Society; 2006;174(8):935–52.
254. Ferrando R, Ganigues T, Bermejo M, Martin-Algarra R, Merino V, Polache A. Effects of ethanol on intestinal absorption of drugs: In situ studies with ciprofloxacin analogs in acute and chronic alcohol-fed rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. Wiley Online Library; 1999;23(8):1403–8.
255. Silva DR, Muñoz-Torrico M, Duarte R, Galvão T, Bonini EH, Arbex FF, et al. Risk factors for tuberculosis: diabetes, smoking, alcohol use, and the use of other drugs. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. SciELO Brasil; 2018;44(2):145–52.
256. Bates MN, Khalakdina A, Pai M, Chang L, Lessa F, Smith KR. Risk of tuberculosis from exposure to tobacco smoke: a systematic review and meta-analysis. *Archives of internal medicine*. American Medical Association; 2007;167(4):335–42.
257. Lin HH, Ezzati M, Murray M. Tobacco smoke, indoor air pollution and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med*. Public Library of Science; 2007;4(1):e20.

258. Altet M, Alcaide J, Plans P, Taberner J, Salto E, Folguera L, et al. Passive smoking and risk of pulmonary tuberculosis in children immediately following infection. A case-control study. *Tubercle and Lung Disease*. Elsevier; 1996;77(6):537–44.
259. Ai JW, Ruan QL, Liu QH, Zhang WH. Updates on the risk factors for latent tuberculosis reactivation and their managements. *Emerging microbes & infections*. Taylor & Francis; 2016;5(1):1–8.
260. Visser ME, Stead MC, Walzl G, Warren R, Schomaker M, Grewal HM, et al. Baseline predictors of sputum culture conversion in pulmonary tuberculosis: importance of cavities, smoking, time to detection and W-Beijing genotype. *PloS one*. Public Library of Science; 2012;7(1):e29588.
261. Van Zyl Smit RN, Pai M, Yew W-W, Leung C, Zumla A, Bateman E, et al. Global lung health: the colliding epidemics of tuberculosis, tobacco smoking, HIV and COPD. *European respiratory journal*. Eur Respiratory Soc; 2010;35(1):27–33.
262. Jeyashree K, Kathirvel S, Shewade HD, Kaur H, Goel S. Smoking cessation interventions for pulmonary tuberculosis treatment outcomes. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd; 2016;(1).
263. Burusie A, Enquesilassie F, Addissie A, Dessalegn B, Lamaro T. Effect of smoking on tuberculosis treatment outcomes: A systematic review and meta-analysis. *PloS one*. Public Library of Science San Francisco, CA USA; 2020;15(9):e0239333.
264. Wen CP, Chan TC, Chan HT, Tsai MK, Cheng TY, Tsai SP. The reduction of tuberculosis risks by smoking cessation. *BMC infectious diseases*. Springer; 2010;10(1):156.
265. Samuels JP, Sood A, Campbell JR, Khan FA, Johnston JC. Comorbidities and treatment outcomes in multidrug resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Scientific reports*. Nature Publishing Group; 2018;8(1):1–13.
266. Eshetie S, Gizachew M, Alebel A, van Soolingen D. Tuberculosis treatment outcomes in Ethiopia from 2003 to 2016, and impact of HIV co-infection and prior drug exposure: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. Public Library of Science San Francisco, CA USA; 2018;13(3):e0194675.
267. Jeon CY, Murray MB. Diabetes mellitus increases the risk of active tuberculosis: a systematic review of 13 observational studies. *PLoS med*. Public Library of Science; 2008;5(7):e152.
268. Baker MA, Harries AD, Jeon CY, Hart JE, Kapur A, Lönnroth K, et al. The impact of diabetes on tuberculosis treatment outcomes: a systematic review. *BMC medicine*. BioMed Central; 2011;9(1):1–15.
269. Jiménez-Corona ME, Cruz-Hervert LP, Garc'ia-Garc'ia L, Ferreyra-Reyes L, Delgado-Sánchez G, Bobadilla-del-Valle M, et al. Association of diabetes and tuberculosis: impact on treatment and post-treatment outcomes. *Thorax*. BMJ Publishing Group Ltd; 2013;68(3):214–20.
270. Nnoaham KE, Clarke A. Low serum vitamin D levels and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *International journal of epidemiology*. Oxford University Press; 2008;37(1):113–9.
271. Davies P, Church H, Charumilind A, Byrachindra S, Bovonr kitt S. Altered vitamin-D homeostasis in tuberculosis. *Thorax*. 1988. p. P855–P856.
272. Wu H, Xiong X, Zhu M, Wei J, Zhuo K, Cheng D. Effects of vitamin D supplementation on the outcomes of patients with pulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *BMC pulmonary medicine*. Springer; 2018;18(1):1–12.
273. Zhang J, Chen C, Yang J. Effectiveness of vitamin D supplementation on the outcome of pulmonary tuberculosis treatment in adults: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Chinese medical journal*. Wolters Kluwer Health; 2019;132(24).

274. Hood M. A narrative review of recent progress in understanding the relationship between tuberculosis and protein energy malnutrition. *European journal of clinical nutrition*. Nature Publishing Group; 2013;67(11):1122–8.
275. American Thoracic Society, ECDC, IDS of America. American thoracic society, centers for disease control and prevention/infectious diseases society of america: controlling tuberculosis in the United States. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005;172(9):1169–227.
276. MacAllan DC, McNurlan MA, Kurpad AV, De Souza G, Shetty PS, Calder AG, et al. Whole body protein metabolism in human pulmonary tuberculosis and undernutrition: evidence for anabolic block in tuberculosis. *Clinical science*. Portland Press Ltd.; 1998;94(3):321–31.
277. Shaviya N, Budambula V, Webale MK, Were T. Circulating interferon-gamma levels are associated with low body weight in newly diagnosed Kenyan non-substance using tuberculosis individuals. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*. Hindawi; 2016;2016.
278. Kornfeld H, Sahukar SB, Procter-Gray E, Kumar NP, West K, Kane K, et al. Impact of diabetes and low body mass index on tuberculosis treatment outcomes. *Clinical Infectious Diseases*. Oxford University Press US; 2020;71(9):e392–e398.
279. Murthy S, Chatterjee F, Crook A, Dawson R, Mendel C, Murphy M, et al. Pretreatment chest X-ray severity and its relation to bacterial burden in smear positive pulmonary tuberculosis. *BMC medicine*. BioMed Central; 2018;16(1):1–11.
280. Matos E, Moreira Lemos A. Association between serum albumin levels and in-hospital deaths due to tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 2006;10(12):1360–6.
281. Kim H, Lee C, Shin S, Lee J, Kim Y, Chung H, et al. The impact of nutritional deficit on mortality of in-patients with pulmonary tuberculosis. *The international journal of tuberculosis and lung disease*. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 2010;14(1):79–85.
282. Wiid I, Seaman T, Hoal E, Benade A, Van Helden PD. Total antioxidant levels are low during active TB and rise with anti-tuberculosis therapy. *IUBMB life*. Wiley Online Library; 2004;56(2):101–6.
283. Kim S, Kim H, Kim W, Lee S, Hong Y, Lee H, et al. Mortality and predictors in pulmonary tuberculosis with respiratory failure requiring mechanical ventilation. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 2016;20(4):524–9.
284. Choi R, Kim H-T, Lim Y, Kim M-J, Kwon OJ, Jeon K, et al. Serum concentrations of trace elements in patients with tuberculosis and its association with treatment outcome. *Nutrients*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2015;7(7):5969–81.
285. Vilchèze C, Hartman T, Weinrick B, Jacobs WR. Mycobacterium tuberculosis is extraordinarily sensitive to killing by a vitamin C-induced Fenton reaction. *Nature communications*. Nature Publishing Group; 2013;4(1):1–10.
286. Telzak EE, Fazal BA, Pollard CL, Turett GS, Justman JE, Blum S. Factors influencing time to sputum conversion among patients with smear-positive pulmonary tuberculosis. *Clinical infectious diseases*. The University of Chicago Press; 1997;25(3):666–70.
287. Ralph AP, Ardian M, Wiguna A, Maguire GP, Becker NG, Drogumuller G, et al. A simple, valid, numerical score for grading chest X-ray severity in adult smear-positive pulmonary tuberculosis. *Thorax*. BMJ Publishing Group Ltd and British Thoracic Society; 2010;65(10):863–9.
288. Pang Y, Lu J, Wang Y, Song Y, Wang S, Zhao Y. Study of the rifampin mono-resistance mechanism in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Am Soc Microbiol; 2013;57(2):893–900.

289. Richter E, Rüscher-Gerdes S, Hillemann D. First linezolid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Am Soc Microbiol; 2007;51(4):1534–6.
290. Otto-Knapp R, Bös L, Schönfeld N, Wagner S, Starzacher A, Weiss T, et al. Resistance to second-line drugs in migrants with multidrug-resistant tuberculosis in the Berlin region. *Pneumologie (Stuttgart, Germany)*. 2014;68(7):496–500.
291. Wasserman S, Louw G, Ramangoela L, Barber G, Hayes C, Omar SV, et al. Linezolid resistance in patients with drug-resistant TB and treatment failure in South Africa. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Oxford University Press; 2019;74(8):2377–84.
292. Nimmo C, Millard J, Brien K, Moodley S, van Dorp L, Lutchminarain K, et al. Bedaquiline resistance in drug-resistant tuberculosis HIV co-infected patients. *European Respiratory Journal*. Eur Respiratory Soc; 2020;55(6).
293. Ormerod LP. Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB): epidemiology, prevention and treatment. *British medical bulletin*. Oxford University Press; 2005;73(1):17–24.
294. Wallis RS, Doherty TM, Onyebujoh P, Vahedi M, Laang H, Olesen O, et al. Biomarkers for tuberculosis disease activity, cure, and relapse. *The Lancet infectious diseases*. Elsevier; 2009;9(3):162–72.
295. Holtz TH, Sternberg M, Kammerer S, Laserson KF, Rieckstina V, Zarovska E, et al. Time to sputum culture conversion in multidrug-resistant tuberculosis: predictors and relationship to treatment outcome. *Annals of internal medicine*. American College of Physicians; 2006;144(9):650–9.
296. Zhdanova E, Goncharova O, Davtyan H, Alaverdyan S, Sargsyan A, Harries AD, et al. 9-12 months short treatment for patients with MDR-TB increases treatment success in Kyrgyzstan. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2021;15(09.1):66S–74S.
297. Carroll MW, Jeon D, Mountz JM, Lee JD, Jeong YJ, Zia N, et al. Efficacy and safety of metronidazole for pulmonary multidrug-resistant tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Am Soc Microbiol; 2013;57(8):3903–9.
298. Perrin F, Woodward N, Phillips P, McHugh T, Nunn A, Lipman M, et al. Radiological cavitation, sputum mycobacterial load and treatment response in pulmonary tuberculosis. *The International journal of tuberculosis and lung disease*. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 2010;14(12):1596–602.
299. Kjellsson MC, Via LE, Goh A, Weiner D, Low KM, Kern S, et al. Pharmacokinetic evaluation of the penetration of antituberculosis agents in rabbit pulmonary lesions. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Am Soc Microbiol; 2012;56(1):446–57.
300. Diktanas S, Korotych O, Sereda Y, Gozalov O, Rubcova O, Achar J. Factors associated with time to sputum culture conversion of rifampicin-resistant tuberculosis patients in Klaipeda, Lithuania in 2016-2019: a cohort study. *Monaldi Archives for Chest Disease*. 2021;91(1).
301. Sakalauskas R, Barkauskienė D, Malakauskas K, Miliauskas S, Serapinas D, Staikūnienė J, et al. Diagnostinių formulavimų rekomendacijos. *Pulmonologija ir alergologija*. 2009;6(2):4–14.
302. Mesquita ED, Gil-Santana L, Ramalho D, Tonomura E, Silva EC, Oliveira MM, et al. Associations between systemic inflammation, mycobacterial loads in sputum and radiological improvement after treatment initiation in pulmonary TB patients from Brazil: a prospective cohort study. *BMC Infectious Diseases*. BioMed Central; 2016;16(1):368.
303. Mahishale V, Patil B, Lolly M, Eti A, Khan S. Prevalence of Smoking and Its Impact on Treatment Outcomes in Newly Diagnosed Pulmonary Tuberculosis Patients: A Hospital-Based Prospective Study. *Chonnam medical journal*. 2015;51(2):86–90.

304. Musteikiene G, Miliauskas S, Zaveckienė J, Žemaitis M, Sakalauskas R. Factors associated with sputum culture conversion in patients with pulmonary tuberculosis. *Medicina (Kaunas)* 2018 Feb 9 pii: S1010-660X(18)30008-9. 2017;
305. Liang Y, Harris FL, Brown LAS. Alcohol induced mitochondrial oxidative stress and alveolar macrophage dysfunction. *BioMed research international*. Hindawi; 2014;2014.
306. Yohanes A, Abera S, Ali S. Smear positive pulmonary tuberculosis among suspected patients attending Metehara sugar factory hospital; eastern Ethiopia. *African health sciences. Makerere University Medical School (Uganda)*; 2012;12(3):325–30.
307. Assemie MA, Alene M, Petrucka P, Leshargie CT, Ketema DB. Time to sputum culture conversion and its associated factors among multidrug-resistant tuberculosis patients in Eastern Africa: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases*. Elsevier; 2020;98:230–6.
308. Kim D, Kim H, Kwon S, Yoon H, Lee C, Kim Y, et al. Nutritional deficit as a negative prognostic factor in patients with miliary tuberculosis. *European Respiratory Journal. Eur Respiratory Soc*; 2008;32(4):1031–6.
309. Palacios C, Gonzalez L. Is vitamin D deficiency a major global public health problem? *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. Elsevier; 2014;144:138–45.
310. Ralph AP, Ali MRSR, William T, Piera K, Parameswaran U, Bird E, et al. Vitamin D and activated vitamin D in tuberculosis in equatorial Malaysia: a prospective clinical study. *BMC infectious diseases*. Springer; 2017;17(1):1–11.
311. Coussens AK, Martineau AR, Wilkinson RJ. Anti-inflammatory and antimicrobial actions of vitamin D in combating TB/HIV. *Scientifica*. Hindawi; 2014;2014.
312. Tukvadze N, Sanikidze E, Kipiani M, Hebbar G, Easley KA, Shenvi N, et al. High-dose vitamin D3 in adults with pulmonary tuberculosis: a double-blind randomized controlled trial. *The American journal of clinical nutrition*. *Am Soc Nutrition*; 2015;102(5):1059–69.
313. Ganmaa D, Munkhzul B, Fawzi W, Spiegelman D, Willett WC, Bayasgalan P, et al. High-dose vitamin D3 during tuberculosis treatment in Mongolia. A randomized controlled trial. *American journal of respiratory and critical care medicine*. *American Thoracic Society*; 2017;196(5):628–37.
314. Martineau AR, Timms PM, Bothamley GH, Hanifa Y, Islam K, Claxton AP, et al. High-dose vitamin D 3 during intensive-phase antimicrobial treatment of pulmonary tuberculosis: a double-blind randomised controlled trial. *The Lancet*. Elsevier; 2011;377(9761):242–50.
315. Rathored J, Sharma S, Singh B, Banavaliker J, Sreenivas V, Srivastava A, et al. Risk and outcome of multidrug-resistant tuberculosis: vitamin D receptor polymorphisms and serum 25 (OH) D. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. *International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*; 2012;16(11):1522–8.
316. Hales CM, Heilig CM, Chaisson R, Leung CC, Chang KC, Goldberg SV, et al. The association between symptoms and microbiologically defined response to tuberculosis treatment. *Annals of the American Thoracic Society*. *American Thoracic Society*; 2013;10(1):18–25.
317. Liu Z, Shilkret KL, Ellis HM. Predictors of sputum culture conversion among patients with tuberculosis in the era of tuberculosis resurgence. *Archives of internal medicine*. *American Medical Association*; 1999;159(10):1110–6.
318. Li Q, Lu M, Hsieh E, Wu L, Wu Y, Wang M, et al. Time to sputum culture conversion and its predictors among patients with multidrug-resistant tuberculosis in Hangzhou, China: A retrospective cohort study. *Medicine*. *Wolters Kluwer Health*; 2020;99(50).

319. Heunis J, Kigozi N, van der Merwe S, Chikobvu P, Beyers N. Sex-related trends in non-conversion of new smear-positive tuberculosis patients in the Free State, South Africa. Public health action. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 2014;4(1):66–71.
320. Su W, Feng J, Chiu Y, Huang S, Lee Yc. Role of 2-month sputum smears in predicting culture conversion in pulmonary tuberculosis. European Respiratory Journal. Eur Respiratory Soc; 2011;37(2):376–83.
321. Banu Rekha V, Balasubramanian R, Swaminathan S, Ramachandran R, Rahman F, Sundaram V, et al. Sputum conversion at the end of intensive phase of Category-1 regimen in the treatment of pulmonary tuberculosis patients with diabetes mellitus or HIV infection: An analysis of risk factors. Indian Journal of Medical Research. Indian Council of Medical Research; 2007;126(5):452–8.
322. Plit M, Anderson R, Van Rensburg C, Page-Shipp L, Blott J, Fresen J, et al. Influence of antimicrobial chemotherapy on spirometric parameters and pro-inflammatory indices in severe pulmonary tuberculosis. European Respiratory Journal. Eur Respiratory Soc; 1998;12(2):351–6.
323. Shaikh MK, Samo JA, Devrajani BR, Shah SZA, Shaikh S, Shaikh I. C-reactive protein in patients with pulmonary tuberculosis. World Applied Sciences Journal. 2012;17(2):140–4.
324. Peresi E, Silva SMUR, Calvi SA, Marcondes-Machado J. Cytokines and acute phase serum proteins as markers of inflammatory regression during the treatment of pulmonary tuberculosis. Jornal brasileiro de pneumologia. SciELO Brasil; 2008;34(11):942–9.
325. Siawaya JFD, Bapela NB, Ronacher K, Veenstra H, Kidd M, Gie R, et al. Immune parameters as markers of tuberculosis extent of disease and early prediction of anti-tuberculosis chemotherapy response. Journal of Infection. Elsevier; 2008;56(5):340–7.
326. Dominguez-Castellano A, Muniain M, Rodriguez-Bano J, Garcia M, Rios M, Galvez J, et al. Factors associated with time to sputum smear conversion in active pulmonary tuberculosis. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 2003;7(5):432–8.
327. Bajaj G, Rattan A, Ahmad P. Prognostic value of C reactive protein in tuberculosis. Indian pediatrics. 1989;26(10):1010–3.
328. Lopez Ramirez GM, Rom WN, Ciotoli C, Talbot A, Martiniuk F, Cronstein B, et al. Mycobacterium tuberculosis alters expression of adhesion molecules on monocytic cells. Infection and immunity. Am Soc Microbiol; 1994;62(6):2515–20.
329. Agrawal S, Parkash O, Palaniappan AN, Bhatia AK, Kumar S, Chauhan DS, et al. Efficacy of T regulatory cells, Th17 cells and the associated markers in monitoring tuberculosis treatment response. Frontiers in Immunology. Frontiers; 2018;9:157.
330. Bernal-Fernández G, Hermida C, Espinosa-Cueto P, Cubilla-Tejeda AC, Salazar-González JF, Ortiz-Ortiz L, et al. Impact of opportunistic Mycobacterium tuberculosis infection on the phenotype of peripheral blood T cells of AIDS patients. Journal of clinical laboratory analysis. Wiley Online Library; 2006;20(3):80–6.
331. Goovaerts O, Jennes W, Massinga-Loembé M, Ondoa P, Ceulemans A, Vereecken C, et al. Lower pre-treatment T cell activation in early-and late-onset tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome. PloS one. Public Library of Science; 2015;10(7):e0133924.
332. Pathakumari B, Devasundaram S, Raja A. Altered expression of antigen-specific memory and regulatory T-cell subsets differentiate latent and active tuberculosis. Immunology. Wiley Online Library; 2018;153(3):325–36.

333. Latorre I, Fernández-Sanmartín MA, Muriel-Moreno B, Villar-Hernández R, Vila S, Souza-Galvão MLD, et al. Study of CD27 and CCR4 markers on specific CD4+ T-cells as immune tools for active and latent tuberculosis management. *Frontiers in immunology*. Frontiers; 2019;9:3094.
334. Müller C, Rumetshofer R, Winkler H-M, Bécède M, Kneussl M, Winkler S. Loss of T cells expressing CD27 at the site of active tuberculosis-A prospective diagnostic study. *Tuberculosis*. Elsevier; 2020;125:102009.
335. Lund F, Solvason N, Grimaldi JC, Parkhouse RM, Howard M. Murine CD38: an immunoregulatory ectoenzyme. *Immunology today*. Elsevier; 1995;16(10):469–73.
336. Beck JS, Potts R, Kardjito T, Grange J. T4 lymphopenia in patients with active pulmonary tuberculosis. *Clinical and experimental immunology*. Wiley-Blackwell; 1985;60(1):49.
337. Singhal M, Banavalikar J, Sharma S, Saha K. Peripheral blood T lymphocyte subpopulations in patients with tuberculosis and the effect of chemotherapy. *Tubercle*. Elsevier; 1989;70(3):171–8.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Straipsniai, kuriuose paskelbti tyrimo rezultatai:

1. **Musteikienė G**, Miliauskas S, Zaveckienė J, Žemaitis M, Vitkauskienė A. Factors associated with sputum culture conversion in patients with pulmonary tuberculosis. *Medicina (Kaunas)*. 2017;53(6):386-393. doi: 10.1016/j.medi.2018.01.005. Epub 2018 Feb 9.
2. **Musteikienė G**, Miliauskas S, Zaveckienė J, Urbonienė D, Vitkauskienė A, Žemaitis M, Naudžiūnas A. Is analysis of inflammatory biomarkers and lymphocyte populations useful in prediction of tuberculosis treatment outcomes? *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis*. 2021 Sep 8;25:100275. doi: 10.1016/j.jctube.2021.100275.
3. Kaniga K, Hasan R, Jou R, Vasiliauskienė E, Chuchottaworn C, Ismail N, Metchock B, Miliauskas S, Viet Nhung N, Rodrigues C, Shin S, Simsek H, Smithtikarn S, Le Thi Ngoc A, Boonyasopun J, Kazi M, Kim S, Kamolwat P, **Musteikiene G**, Sacopon CA, Tahseen S, Vasiliauskaitė L, Wu MH, Vally Omar S. J Bedaquiline Drug Resistance Emergence Assessment in MDR-TB (DREAM): a 5-Year Prospective In-Vitro Surveillance Study of Bedaquiline and Other Second-Line Drug-Susceptibility Testing in MDR-TB Isolates. *Clin Microbiol*. 2021 Oct 27;JCM0291920. doi: 10.1128/JCM.02919-20

Tarptautinės konferencijos, kuriose pristatyti darbo rezultatai:

1. **Musteikienė G**, Miliauskas S, Žemaitis M, Sakalauskas R. Factors associated with sputum culture conversion in patients with pulmonary tuberculosis. Mokslinės tezės, pristatytos tarptautiniame Europos respiratologų draugijos kongrese, vykusiame 2017 09 11. Milanai (Italija)
2. **Musteikienė G**, Miliauskas S, Zaveckienė J, Urbonienė D, Vitkauskienė A, Žemaitis M, Naudžiūnas A. Dynamics of inflammation biomarkers in drug sensitive tuberculosis and pneumonia. Mokslinės tezės nuotoliniu būdu pristatytos Europos Respiratologų draugijos kongrese 2020 09 05-09



Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/medici>



Original Research Article

Factors associated with sputum culture conversion in patients with pulmonary tuberculosis

Greta Musteikienė^{a,*}, Skaidrius Miliauskas^a, Jurgita Zaveckienė^b, Marius Žemaitis^a, Astra Vitkauskienė^c

^aDepartment of Pulmonology, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania

^bDepartment of Radiology, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania

^cDepartment of Laboratory Medicine, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 August 2017

Received in revised form

4 November 2017

Accepted 22 January 2018

Available online 9 February 2018

Keywords:

Smoking

Smear grade

St. George respiratory questionnaire

Tuberculosis

Culture conversion

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to determine what factors are associated with sputum culture conversion after 1 month of tuberculosis (TB) treatment.

Materials and methods: A total of 52 patients with new drug susceptible pulmonary TB were included in the study. Patients completed St. George respiratory questionnaire (SGRQ), they were asked about smoking, alcohol use, living conditions and education. Body mass index (BMI) measurements, laboratory tests (C reactive protein [CRP], vitamin D, albumin) were performed, and chest X-ray was done. After 1 month of treatment sputum culture was repeated.

Results: Culture conversion after 1 month of treatment was found in 38.5% cases. None of investigated social factors appeared to have an effect on conversion, but worse overall health status (as reported in SGRQ) and longer duration of tobacco smoking were detected in the “no conversion” group. Concentrations of albumin, CRP, X-ray score and the time it took *Mycobacterium tuberculosis* culture to grow also differed. Patients who scored 30 or more on SGRQ were more than 7 times as likely to have no conversion. However, the most important factor predicting sputum culture conversion was sputum smear grade at the beginning of treatment: patients with grade of 2+ or more had more than 20-fold higher relative risk for no conversion. Using receiver operating characteristic curve analysis, we also developed a risk score for no conversion.

Conclusions: The most important factors in predicting sputum culture conversion after 1 month of treatment were grades of acid-fast bacilli in sputum smears at time of diagnosis and scores of SGRQ.

© 2018 The Lithuanian University of Health Sciences. Production and hosting by Elsevier Sp. z o.o. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Corresponding author at: Department of Pulmonology, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Eivenių 2, 50161 Kaunas, Lithuania.

E-mail address: greta.musteikiene@lsmuni.lt (G. Musteikienė).

<https://doi.org/10.1016/j.medic.2018.01.005>

1010-660X/© 2018 The Lithuanian University of Health Sciences. Production and hosting by Elsevier Sp. z o.o. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

According to the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Lithuania is still a high tuberculosis (TB) priority country [1] and, although the prevalence of TB is slowly decreasing, in 2015 there were still 41.89 new TB cases per 100 000 population [2]. Among those 11.5% were multi drug-resistant TB (MDR-TB) [2]. The prevalence of human immunodeficiency virus (HIV) infection in Lithuania was 4.8 per 100 000 population (2014) [3] and the main AIDS-defining illness was TB [4].

It is well known that TB is not only a medical condition but also a social problem. Patients diagnosed with TB are contagious and, at least at the beginning of treatment, are kept in hospitals where they are separated from their family, work and social life. It is a national policy to keep patients isolated until they become culture negative.

In the national guidelines [5] it is recommended that sputum smears and culture should be repeated after two months of treatment. Sputum smear conversion at this time is believed to be one of the best biomarkers for prognosis of treatment success without the probability of relapse in the future [6–8]. However, two months of isolation in hospital can make a significant impact on professional or personal life of a TB patient.

According to the previously published studies, the presence of cavitary TB disease appears to be associated with an increased time to sputum smear conversion [9]. It is assumed that cavitation is related to a higher grade of bacteria in the lungs. Other studies also found different factors that are associated with sputum culture conversion. It was shown that culture conversion could be influenced by history of smoking [10], body mass index (BMI) [11], sputum smear grade before the treatment [12], vitamin D concentration [13], albumin concentration [14] and various social factors [15].

In this study we performed the microbiological testing after 1 month of treatment and aimed to determine what factors were associated with faster sputum culture conversion in cases of pulmonary TB.

2. Materials and methods

The study was carried out in one of the largest TB hospitals in Lithuania. Approximately 95% of patients treated here are from Kaunas district, which is the second largest district in Lithuania and constitutes around 12.4% of Lithuania's territory and 20% of population. Only adults are treated in our hospital and directly observed treatment (DOT) is fully implemented as the staff ensures that patients are taking their medication seven days a week.

From November 2015 all patients with first-time diagnosis of pulmonary TB, meeting no exclusion criteria (significant morbidity due to other illnesses (e.g. cancer, autoimmune diseases, renal insufficiency); HIV positive; pregnant or breastfeeding) were asked to participate in this clinical trial. We selected these exclusion criteria to avoid the variability of laboratory tests and radiological changes, caused or influenced by other diseases, except TB. There were no patients with

diabetes mellitus in our study group. During the period of one year (up to November 2016) 96 patients were included in the study, and 52 of them with drug susceptible pulmonary TB were analyzed in this article. Upon inclusion, acid-fast bacilli (AFB) had to be found in sputum with Ziehl–Nielsen histochemical reaction or positive *Mycobacterium tuberculosis* culture in MGIT BACTEC had to be detected. Selection process can be seen in Fig. 1. Two of sputum smear positive patients later were confirmed to have atypical mycobacteriosis and were excluded from the study. All patients in this study, eventually were bacteriologically confirmed to be infected with *M. tuberculosis* on MGIT BACTEC culture.

Quality control of smear microscopy was performed by the Central Tuberculosis Reference Laboratory. AFB smear positive results were as per World Health Organization/International Union Against Tuberculosis and Lung Disease grading: “scanty” with of 1–9 AFB per 100 oil immersion fields; “1+” with 10–99 AFB per 100 oil immersion fields; “2+” with 1–10 AFB per 1 oil immersion field and “3+” with >10 AFB per oil immersion field. All TB patients were offered rapid HIV testing foreseen in the National guidelines [3,5]. None declined to be tested. If a patient was found to be HIV positive, he/she was excluded from the trial.

Before the initiation of the TB treatment postero-anterior chest X-ray was done, patients completed St. George respiratory questionnaire (SGRQ) and answered the question about their overall health status (multiple-choice question with 5 possible answers: “very good”, “good”, “average”, “bad”, and “very bad”) in the Lithuanian (native) language, they were asked about smoking habits, alcohol use, occupation, living conditions (rural or urban residence; family status) and education. The result of SGRQ was calculated using a program provided by St George's University of London. Body mass index (BMI) measurement, and laboratory tests from peripheral blood (C reactive protein (CRP), vitamin D, and albumin) were performed before the start of TB treatment. Pack-years of cigarette smoking were calculated based on the interview with a patient (by multiplying the number of packs of cigarettes smoked per day by the number of years the person has been smoking). Chest X-ray was evaluated by an experienced radiologist and the score of disease spread was calculated according to the method described by Ralph et al.: presence of baseline cavitation and the total percentage of lung affected were recorded and a score was calculated (CXR score = proportion of total lung affected (%) + 40 if cavitation is present) [16]. CRP, albumin and vitamin D testing was performed at the hospital of Lithuanian University of Health Sciences Kaunas Clinics, an externally quality-assured laboratory. We defined vitamin D values 70–250 nmol/L as optimal; 51–69 nmol/L, as insufficient, and below 50 nmol/L, as deficient. Reference values for CRP were 0–7.5 mg/L and for albumin, 35–48 g/L.

After 1 month of in-hospital DOT, sputum microscopy, sputum culture and CRP were repeated.

Statistical analysis was performed using SPSS version 23.0 for Windows (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL, USA). The following descriptive statistics were reported: proportions with their 95% confidence intervals for dichotomous variables and medians with their interquartile ranges (IQR) for continuous variables. Categorical variables were evaluated using the Pearson χ^2 test. Comparisons of

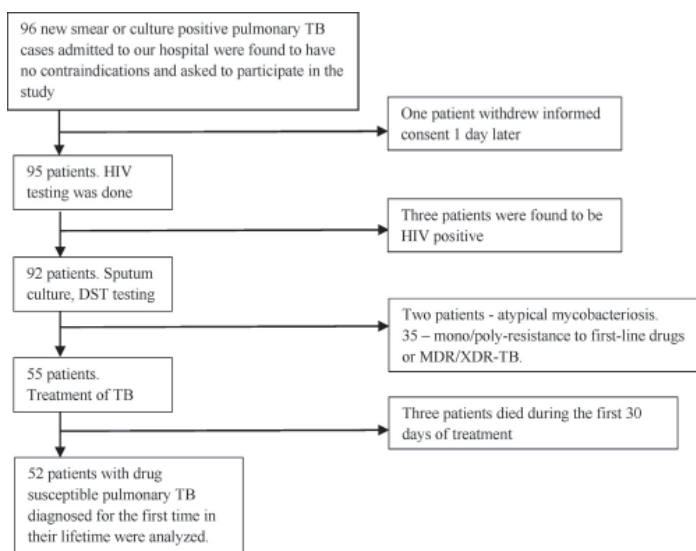


Fig. 1 – Flow chart of study participants. HIV, human immunodeficiency virus; DST, drug susceptibility testing; MDR-TB, multidrug-resistant tuberculosis; XDR-TB, extensively drug-resistant tuberculosis.

continuous variables between “conversion” and “no-conversion” group were made using Mann-Whitney U test, as there were relatively few observations. $P \leq 0.05$ was considered statistically significant. Binary logistic regression was performed with dichotomous variables (continuous variables were transformed to categorical variables by splitting them into two groups with the median being a cut-off value). Dichotomous variables that had $P < 0.1$ were entered into the logistic regression model.

All patients were examined as part of a clinical research protocol approved by regional bioethics committee and informed written consent was obtained from all participants. All TB patients received the standardized TB treatment regimen in line with national TB treatment guideline [5] (isoniazid, rifampicin, ethambutol, pyrazinamide for 2 months, later continuing isoniazid and rifampicin for four months, with doses adjusted according to their weight).

3. Results

Culture conversion after 1 month of treatment was seen in 20 (38.5%) cases. Conversion after 1 month of treatment was confirmed by repeated sputum culture test after two months of treatment (at least 30 days apart).

Of the 52 patients, 40 (76.9%) were men. All were Lithuanian born, and there were no immigrants. None admitted to using any illicit drugs. Most had a place to live and only one was

homeless. Other characteristics of the two groups can be seen in Table 1.

Two groups (those who converted, and those who did not) are relatively small, and we found no statistically significant difference of age, sex or BMI. BMI ranged from 16.56 to 34.05 kg/m², with 9 (15.4%) patients being overweight and 6 (11.5%) underweight (BMI <18.5). We did not detect any effect of BMI on sputum culture conversion. However, there were statistically significant differences in albumin concentrations (as seen in Table 1). Albumin concentration was significantly lower ($P < 0.05$) in patients, who did not convert at the end of 1 month of treatment. Vitamin D concentrations between two groups did not differ in a statistically significant way. Vitamin D levels ranged from 17.8 to 73.9 (mean, 43.387; SD, 2.01). Findings were abnormal in most of our patients: 51 patient (98.1%) had insufficient values of vitamin D. Out of those, 36 had deficient values (below 50 nmol/L). Only one patient had normal value of vitamin D before treatment initiation.

None of the investigated social factors (education, occupation, area of residence, family status or previous alcohol consumption) appeared to influence culture conversion. However, those with no conversion had higher scores on SGRQ ($P < 0.05$), and, in the same questionnaire, reported worse overall health status (Table 1). Patients with long history of tobacco smoking (20 pack-years or more) also converted less frequently ($P = 0.046$).

It was detected that concentration of CRP in blood plasma and CRX score were higher in the group with no sputum culture conversion ($P < 0.05$). Other finding that varied

Table 1 – Sociodemographic, clinical and laboratory characteristics by conversion status after 1 month of treatment.

Characteristics	Conversion group (n = 20)	No-conversion group (n = 32)	P value
Sex			0.677 ^b
Male	16 (40.0)	24 (60.0)	
Female	4 (33.3)	8 (66.7)	
Age, median (IQR), years	36 (29–45)	37 (32.6–46.5)	0.587 ^a
Age, years			1.0 ^b
≤45	10 (38.5)	16 (61.5)	
>45	10 (38.5)	16 (61.5)	
BMI, kg/m ² , median (IQR)	22.37 (19.89–24.06)	22.21 (19.94–23.24)	0.837 ^a
BMI, kg/m ²			0.895 ^b
≤22	9 (37.5)	15 (62.5)	
>22	11 (39.3)	17 (60.7)	
Area of residence			0.070 ^b
Urban	12 (52.5)	11 (47.6)	
Rural	8 (27.6)	21 (72.4)	
Family status			0.930 ^b
Single	11 (37.9)	18 (62.1)	
With family/partner	9 (39.1)	14 (60.9)	
Occupation			0.508 ^b
Employed	10 (43.5)	13 (56.5)	
Unemployed/retired	10 (34.5)	19 (65.5)	
Education			0.284 ^b
High school or lower	10 (32.8)	21 (67.7)	
Higher education	10 (47.6)	11 (52.4)	
Health status (self-reported)			0.007 ^b
Very good, good	11 (64.7)	6 (35.3)	
Average, bad, very bad	9 (25.7)	26 (74.3)	
SGRQ score, median (IQR)	22.13 (4.03–29.05)	32.79 (26.17–47.86)	0.009 ^a
SGRQ score			0.008 ^b
<30	15 (53.6)	13 (46.4)	
≥30	4 (17.4)	19 (82.6)	
Tobacco smoking history			0.246 ^b
Pack-years of tobacco smoking, median (IQR)	12.5 (5–16)	20 (5–25)	0.330 ^a
Pack-years of tobacco smoking			0.046 ^b
<20	15 (50.0)	15 (50.0)	
≥20	5 (22.7)	17 (77.3)	
Alcohol consumption			0.963 ^b
2–3 times/week or more often	7 (38.9)	11 (61.1)	
Less often	13 (38.2)	21 (61.8)	
Sputum smear grade			<0.0001 ^b
3+	0	21 (65.6)	
2+	5 (25)	5 (15.6)	
1+	3 (15)	4 (12.5)	
Scanty	4 (20)	2 (6.3)	
0	8 (40)	0	
Sputum smear grade			<0.0001 ^b
<2+	15 (71.4)	6 (28.6)	
≥2+	5 (16.1)	26 (83.9)	
CRP, median (IQR), mg/L	2.16 (1–7.8)	18.07 (5.57–41.32)	0.001 ^a
CRP, mg/L			0.027 ^b
<30	15 (51.7)	14 (48.3)	
≥30	5 (21.7)	18 (78.3)	
Albumin, median (IQR), g/L	36 (28–39)	25.5 (24–35)	0.012 ^a
Albumin, g/L			0.046 ^b
≤35	5 (22.7)	17 (77.3)	
>35	15 (50.0)	15 (50.0)	
Vitamin D, median (IQR), nmol/L	35.2 (24.5–43.5)	29.35 (24.58–38.55)	0.342 ^a
Vitamin D, nmol/L			0.136 ^b
<41	7 (28.0)	18 (72.0)	
≥41	13 (48.1)	14 (51.9)	
1st culture, median (IQR), days required to grow	14 (10–30)	9.5 (7–16.5)	0.015 ^a
1st culture, days required to grow			0.031 ^b
<10	4 (20.0)	16 (80.0)	
≥10	16 (50.0)	16 (50.0)	
CRX score, median (IQR)	53.33 (8.33–58.33)	95.83 (74.16–109.16)	<0.001 ^a

Table 1 (Continued)

Characteristics	Conversion group (n = 20)	No-conversion group (n = 32)	P value
CRX score			<0.001 ^b
<80	12 (70.6)	5 (29.4)	
≥80	3 (16.7)	15 (83.3)	

Values are number (percentage) unless noted otherwise.

^a Mann-Whitney U test.

^b Pearson chi-square test.

IQR, interquartile range; BMI, body mass index; SGRQ, St. George respiratory questionnaire; CRP, C reactive protein; CXR score, proportion of total lung affected (%) + 40 if cavitation is present.

Table 2 – Binary logistic regression analysis (stepwise selection) for factors associated with sputum culture conversion after 1 month of tuberculosis treatment (classification, 82.4% correct).

Factor	OR (95% CI)	P value
SGRQ total score (<30/≥30)	7.104 (1.262–39.992)	0.026
Tobacco smoking (<20 pack-years/≥20 pack-years)	5.191 (0.926–29.102)	0.061
Sputum smear grade before treatment (<2+/≥2+)	20.808 (3.774–114.717)	<0.0001

OR, odds ratio; CI, confidence interval; SGRQ, St. George respiratory questionnaire.

significantly between the two groups was the number of days it took the culture to grow – in the conversion group it took longer time period for *M. tuberculosis* to grow in liquid medium.

As seen in Table 2, the most important factor determining conversion after 1 month was the sputum smear grade before the start of treatment. As presented in Table 1, none of the patients, having smear grade of 3+ converted after 1 month of treatment, and those who had grade of 2+ or more were 20.808 times as likely not to convert after 1 month ($P < 0.001$) (Table 2). The score of SGRQ can also be used in the model predicting sputum culture conversion – patients who scored 30 or more on SGRQ before the start of treatment were 7.104 times as likely not to convert after the first month of treatment ($P = 0.026$). Tobacco smoking for 20 or more pack-years was also included in the regression model (Table 2); nonetheless, this factor did not appear to be statistically significant ($P = 0.061$).

We also tried to develop a no conversion risk score using the factors found to have an influence on culture conversion after 1 month of treatment. We constructed this score based on odds ratios of logistic regression (Table 2): if the patient scored 30 or more points on SGRQ, 7 points were allocated to no conversion risk score, and if he/she scored less on SGRQ, 0 points; in the patient was smoking for 20 or more pack-years, 5 points on risk score, and if less, 0 points; if sputum smear grade before the treatment initiation was 2+ or more, the patient got 21 points on risk score, and if less, 0 points. The minimum and maximum number of points was 0 and 33, respectively. The ROC curve is presented in Fig. 2.

Using the ROC curve, a cut-off value of 16.5 could discriminate no conversion with a sensitivity of 81.3% and a specificity of 75% (positive predictive value 83.88%, negative predictive value 71.48%).

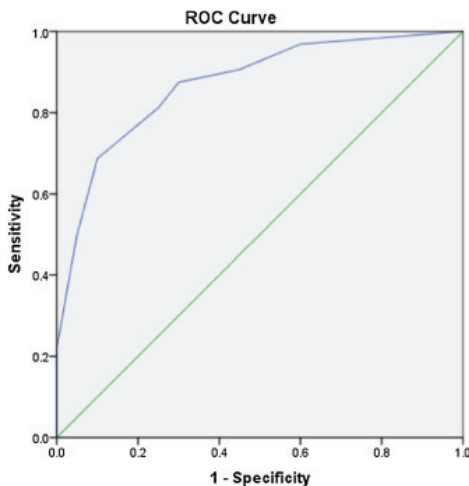


Fig. 2 – Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis for sputum culture conversion, based on a developed score using SGRQ score, pack-years of smoking and sputum smear grade before the initiation of treatment. A ROC curve analysis was performed to investigate whether this score is able to predict the culture conversion. The corresponding area under the curve (AUC) value is 0.87 and the 95% confidence Interval (CI) is 0.773–0.968.

4. Discussion

We have identified that there are some factors which may contribute toward predicting sputum culture conversion event after 1 month of treatment, the most significant of them being sputum smear grade and SGRQ score before TB treatment initiation. The present study highlights that these findings can also have a practical application – there may be no need to repeat bacteriological testing in high smear grade patients after the first month of treatment, because of the unlikely event of sputum culture conversion. Our findings are comparable to those in the study of Mesquita et al. [17] that has shown a strong association between higher pre-treatment mycobacterial loads and higher risk for culture positivity at day 60 of treatment.

Another factor in predicting culture conversion was found to be a smoking history (smoking for more than 20 pack-years). It is known, that tobacco smoking is an important risk factor for TB [18]. Previous studies have also shown that tobacco smoking is associated with a considerably increased risk of advanced and more severe disease in the form of lung cavitations, positive sputum smear and culture results, and slower smear and culture conversion after initiation of treatment [18]. Other factors, such as CRP and albumin concentrations can also have a role in bacteriological outcome after 1 month of treatment. Previous studies have shown similar results: highest concentrations of CRP were found in patients with severe TB disease [19,20], lower albumin concentrations were associated with higher in-hospital mortality [21].

Practical application of vitamin D testing in TB patients is still debatable. There are conflicting evidence of vitamin D supplementation as an adjunct therapy of TB [22]. In the study of Tukvadze et al. a high-dose vitamin D3 regimen given to the patient with insufficient vitamin D concentrations safely corrected the deficiency, but did not improve the rate of Mycobacteria clearance from sputum in pulmonary TB cohort [23]. Similar results were demonstrated in other studies [24,25]. However, others have found that vitamin D significantly shortens time to culture conversion in patients with the tt genotype of the TaqI vitamin D receptor polymorphism [26] and serum concentrations of vitamin D were significantly lower in multidrug-resistant TB (MDR-TB) patients, furthermore they inversely correlated with time to sputum smear conversion [27]. Most of our patients had insufficient values of vitamin D. Although, vitamin D concentration was higher in the conversion group of our study, this difference was not statistically significant. It is stated that vitamin D deficiency might be a risk factor for TB development [28], however, similar tendencies of vitamin D deficiency are seen in our yet unpublished results with pneumonia patients.

In the current literature we were able to find only one validated chest X-ray score for pulmonary TB, which could be used in monitoring radiological changes in the lungs during the course treatment. In the study of Ralph et al. [16] this X-ray score was associated with baseline sputum smear grade. In patients with unfavorable outcomes this score was higher than in those with favorable outcomes. While using this score

in our study, statistically significant differences were found in the two study groups, however more data are still needed to broaden our understanding in its practical use.

We found no studies evaluating quality of life questionnaires or SGRQ and its association with culture conversion. In our study statistically significant differences between conversion and no-conversion groups were shown, with lower scores of SGRQ and better overall health status more common in the conversion group.

Also, there were factors which did not appear to influence culture conversion. We found no difference of BMI between our study groups. There were previous studies on associations between BMI and TB mortality, but results of those were inconsistent [29,30]. Some studies found that lower BMI was associated with higher mortality among TB patients [31], one found no such association [29], and one – that overweight was associated with a lower mortality rate [32]. There are still few studies on BMI association with culture conversion, but most are done with MDR-TB patients [11].

Though previous studies state that excess alcohol use in TB patients is associated with greater mortality, lower rates of sputum culture conversion [33] and poor TB treatment outcomes [34], we found no statistically significant difference of alcohol consumption between conversion and no-conversion groups in our study.

We believe that one of the strengths of our study is it being prospective study of in-hospital patients on DOT. There is no doubt that patients were taking their medication and were not missing doses. All of them were in the same environment and were treated according to the same methodology. However, it cannot be assumed that the same results would be found if patients were taking medication in the community. All patients admitted to our hospital in the year the study was carried out were asked to participate, and study population can represent the population of TB patients in Kaunas district. One of the weaknesses of this study was relatively small enrollment numbers. However, it is still ongoing and more data will be available later.

5. Conclusions

According to the findings of our study, there are several factors that can be used in predicting culture conversion in pulmonary TB patients after 1 month of treatment. Most important of them were grades of acid-fast bacilli in sputum smears and scores of SGRQ.

Conflicts of interest

The authors state no conflict of interest.

REFERENCES

- [1] Beauté J, de Colombani P, Dara M, Ehsani S, Hovhannesyán A, Ködmön C, et al. WHO Regional Office for Europe and ECDC; 2016.

- [2] Lithuania: Vilnius. Lithuanian National Tuberculosis Register. Annual report; 2014. Available from: <http://www.santa.lt/images/tb%20rodikliai/TBrodikliai20122015.pdf> [Internet; cited 14.06.17].
- [3] 2014 m. 141 cases of HIV infection diagnosed in Lithuania in 2014 [Lietuvoje nustatytas 141 ŽIV infekcijos atvejis]. Available from: <http://www.ulac.lt/naujienos/pranesimai-spaudai/2015-metais-ziv-infekcija-diagnozuota-157-asmenims> [Internet; cited 14.06.17].
- [4] In 2015 HIV infection was diagnosed in 157 patients [2015 metais ŽIV infekcija diagnozuota 157 asmenims]. Available from: <http://www.ulac.lt/naujienos/pranesimai-spaudai/2015-metais-ziv-infekcija-diagnozuota-157-asmenims> [Internet; cited 14.06.17].
- [5] Davidaviciene E, Danila E, Naujokaitė A, Nargėla R, Sakalauskas R, Sosnovskaja A, et al. Methodical recommendations of diagnosis and treatment of pulmonary tuberculosis [Plaučių tuberkuliozės diagnostikos ir gydymo metodinės rekomendacijos]. Lietuvos Rotary komitetas; 2009.
- [6] Zumla A, Wallis R, Doherty M, Klein N, Parida S, Olesen O, et al. Joint TDR/EC expert consultation on biomarkers in tuberculosis: report of the joint TDR/EC expert consultation to evaluate the potential roles of biomarkers in the management of HIV-infected and HIV-uninfected patients with tuberculosis. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2008.
- [7] Fox W, Ellard GA, Mitchison DA. Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council tuberculosis units, 1946–1986, with relevant subsequent publications. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999;3(10s2): S231–79.
- [8] Wallis R, Johnson J. Surrogate markers to assess clinical efficacy of new antituberculous drugs. The development of new antituberculosis drugs. Hauppauge, NY: Nova Science Publishers; 2006. p. 95–113.
- [9] Dominguez-Castellano A, Muniain M, Rodriguez-Bano J, Garcia M, Rios M, Galvez J, et al. Factors associated with time to sputum smear conversion in active pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003;7(5):432–8.
- [10] Magee MJ, Kempker RR, Kipiani M, Tukvadze N, Howards PP, Narayan KV, et al. Diabetes mellitus, smoking status, and rate of sputum culture conversion in patients with multidrug-resistant tuberculosis: a cohort study from the country of Georgia. *PLOS ONE* 2014;9(4):e94890.
- [11] Putri FA, Burhan E, Nawas A, Soepandi P, Sutoyo D, Agustini H, et al. Body mass index predictive of sputum culture conversion among MDR-TB patients in Indonesia. *Int J Tuberc Lung Dis* 2014;18(5):564–70.
- [12] Unsematham S, Kateruttanakul P. Factors predicting sputum smear conversion and treatment outcomes in new smear-positive pulmonary tuberculosis. *J Med Assoc Thai* 2013;96(6):644–9.
- [13] Arnedo-Pena A, Juan-Cerdan J, Romeu-Garcia M, Garcia-Ferrer D, Holguin-Gomez R, Iborra-Millet J, et al. Vitamin D status and incidence of tuberculosis infection conversion in contacts of pulmonary tuberculosis patients: a prospective cohort study. *Epidemiol Infect* 2015;143(08):1731–41.
- [14] Moraes ML, Ramalho DM, Delogo KN, Miranda PF, Mesquita ED, Oliveira HM, et al. Association between serum selenium level and conversion of bacteriological tests during antituberculosis treatment. *J Bras Pneumol* 2014;40(3): 269–78.
- [15] Uzundağ İşeri A, Dulkar G, Selçuk Sönmez O, Yılmaz Aydin L, Yılmaz B. Factors that effect sputum culture conversion rate in hospitalized patients with pulmonary tuberculosis who were applied directly observation therapy and non-directly observation therapy. *Tuberk Toraks* 2009;58(1): 44–52.
- [16] Ralph AP, Ardian M, Wiguna A, Maguire GP, Becker NG, Drogumuller G, et al. A simple, valid, numerical score for grading chest X-ray severity in adult smear-positive pulmonary tuberculosis. *Thorax* 2010;65(10):863–9.
- [17] Mesquita ED, Gil-Santana L, Ramalho D, Tonomura E, Silva EC, Oliveira MM, et al. Associations between systemic inflammation, mycobacterial loads in sputum and radiological improvement after treatment initiation in pulmonary TB patients from Brazil: a prospective cohort study. *BMC Infect Dis* 2016;16(1):368.
- [18] Mahishale V, Patil B, Lolly M, Eti A, Khan S. Prevalence of smoking and its impact on treatment outcomes in newly diagnosed pulmonary tuberculosis patients: a hospital-based prospective study. *Chonnam Med J* 2015;51(2):86–90.
- [19] Lee JH, Chang JH. Changes of plasma interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-8 and other serologic markers during chemotherapy in patients with active pulmonary tuberculosis. *Korean J Intern Med* 2003;18(3):138–45.
- [20] Plit M, Theron A, Fickl H, Van Rensburg C, Pendel S, Anderson R. Influence of antimicrobial chemotherapy and smoking status on the plasma concentrations of vitamin C, vitamin E, beta-carotene, acute phase reactants, iron and lipid peroxides in patients with pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998;2(7):590–6.
- [21] Kim S, Kim H, Kim W, Lee S, Hong Y, Lee H, et al. Mortality and predictors in pulmonary tuberculosis with respiratory failure requiring mechanical ventilation. *Int J Tuberc Lung Dis* 2016;20(4):524–9.
- [22] Selvaraj P, Harishankar M, Afsal K. Vitamin D: immunomodulation and tuberculosis treatment. *Can J Physiol Pharmacol* 2015;93(5):377–84.
- [23] Tukvadze N, Sanikidze E, Kipiani M, Hebbar G, Easley KA, Shenvi N, et al. High-dose vitamin D3 in adults with pulmonary tuberculosis: a double-blind randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2015;102(5):1059–69.
- [24] Daley P, Jagannathan V, John K, Sarojini J, Latha A, Vieth R, et al. Adjunctive vitamin D for treatment of active tuberculosis in India: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis* 2015;15(5):528–34.
- [25] Ralph AP, Waramori G, Ponororing GJ, Kenangalem E, Wiguna A, Tjitra E, et al. L-Arginine and vitamin D adjunctive therapies in pulmonary tuberculosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *PLOS ONE* 2013;8(8):e70032.
- [26] Martineau AR, Timms PM, Bothamley GH, Hanifa Y, Islam K, Claxton AP, et al. High-dose vitamin D 3 during intensive-phase antimicrobial treatment of pulmonary tuberculosis: a double-blind randomised controlled trial. *Lancet* 2011;377(9761):242–50.
- [27] Rathored J, Sharma S, Singh B, Banavaliker J, Sreenivas V, Srivastava A, et al. Risk and outcome of multidrug-resistant tuberculosis: vitamin D receptor polymorphisms and serum 25 (OH) D. *Int J Tuberc Lung Dis* 2012;16(11):1522–8.
- [28] Kim JH, Park J-S, Cho Y-J, Yoon H-I, Song JH, Lee C-T, et al. Low serum 25-hydroxyvitamin D level: an independent risk factor for tuberculosis? *Clin Nutr* 2014;33(6):1081–6.
- [29] Kim D, Kim H, Kwon S, Yoon H, Lee C, Kim Y, et al. Nutritional deficit as a negative prognostic factor in patients with miliary tuberculosis. *Eur Respir J* 2008;32(4):1031–6.
- [30] Zachariah R, Spielmann M, Harries A, Salaniponi F. Moderate to severe malnutrition in patients with tuberculosis is a risk factor associated with early death. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002;96(3):291–4.
- [31] Bhargava A, Chatterjee M, Jain Y, Chatterjee B, Kataria A, Bhargava M, et al. Nutritional status of adult patients with pulmonary tuberculosis in rural central India and its association with mortality. *PLOS ONE* 2013;8(10): e77979.

-
- [32] Hanrahan CF, Golub JE, Mohapi L, Tshabangu N, Modisenyane T, Chaisson RE, et al. Body mass index and risk of tuberculosis and death. *AIDS* 2010;24(10):1501-8.
- [33] Volkmann T, Moonan P, Miramontes R, Oeltmann J. Tuberculosis and excess alcohol use in the United States, 1997-2012. *Int J Tuberc Lung Dis* 2015;19(1):111-9.
- [34] Yohanes A, Abera S, Ali S. Smear positive pulmonary tuberculosis among suspected patients attending Metehara sugar factory hospital; eastern Ethiopia. *Afr Health Sci* 2012;12(3):325-30.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jctube

Is analysis of inflammatory biomarkers and lymphocyte subpopulations useful in prediction of tuberculosis treatment outcomes?

Greta Musteikienė^{a, *}, Skaidrius Miliuskas^a, Jurgita Zaveckienė^b, Daiva Urbonienė^c, Astra Vitkauskienė^c, Marius Žemaitis^a, Albinas Naudžiūnas^d

^a Department of Pulmonology, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Eiveniu 2, LT-50161 Kaunas, Lithuania

^b Department of Radiology, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Eiveniu 2, LT-50161 Kaunas, Lithuania

^c Department of Laboratory Medicine, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Eiveniu 2, LT-50161 Kaunas, Lithuania

^d Department of Internal Medicine, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Eiveniu 2, LT-50161 Kaunas, Lithuania

ARTICLE INFO

Keywords:

sICAM-1
suPAR
Tuberculosis
Sputum culture conversion
Flow cytometry

ABSTRACT

Analysis of inflammatory biomarkers and lymphocytes during the treatment of tuberculosis (TB) could yield findings that influence the routine clinical practice and use of new anti-TB drugs. This study aimed to evaluate whether the selected biomarkers—soluble intercellular adhesion molecule type 1, soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (suPAR), and C-reactive protein (CRP)—and T-cell subpopulations are useful for predicting culture conversion, treatment outcomes, and the extent of radiological lesions (calculated using X-ray score) in patients with drug-sensitive pulmonary TB. This study included 62 patients with drug-sensitive pulmonary TB. CRP and suPAR levels significantly decreased after 1 month of treatment. Before treatment initiation, CRP and suPAR levels were significantly higher in patients without culture conversion; however, none of the selected host biomarkers appeared to significantly influence the conversion status or treatment outcomes. Some lymphocyte subpopulations were correlated with X-ray scores before TB treatment initiation, but lung destruction, as determined using X-ray scores, showed the highest correlation with the baseline CRP value. We conclude that selected host biomarkers have a very limited role in predicting TB treatment outcomes and culture conversion and do not appear to be superior to CRP in monitoring TB treatment.

1. Introduction

The discovery of tuberculosis (TB) biomarkers could influence routine clinical practice by helping clinicians to assess patients' response to anti-TB treatment and confirm the sterilizing activity of the drugs, and could thus help shorten clinical trials or even indicate new clinical endpoints [1–3]. Current TB treatment monitoring relies heavily on culture conversion. However, this approach is time consuming because of the slow growth of *Mycobacterium tuberculosis*. New biomarkers, if found, could help in the prognosis of TB treatment and the decision to modify treatment. Results of our previous study suggested that several factors could be used to predict sputum culture conversion in pulmonary TB after 1 month of treatment [4]. In this study, we investigated whether biomarkers of the host's immune response are useful in predicting pulmonary TB treatment outcomes and sputum culture conversion.

Studies on the use of single host biomarkers for assessing TB therapy have repeatedly demonstrated poor sensitivity and specificity [3]. We hoped that the use of a combination of biomarkers could improve the prediction of TB outcomes. After analyzing the available literature, we selected several immune biomarkers for this study [1,2,5,6]. The first selected biomarker was soluble intercellular adhesion molecule type 1 (sICAM-1), which is reportedly a sensitive biomarker for evaluating the action of anti-TB drugs. Levels of sICAM-1 were higher in patients with TB than in those with certain other pulmonary diseases [6].

The second selected biomarker was C-reactive protein (CRP), a widely studied acute-phase protein that is produced in the liver and can opsonize pathogens and facilitate phagocytosis [3]. Studies have shown that CRP levels decrease within the first few days of anti-TB therapy [7]. High baseline CRP levels are also associated with worse TB treatment outcomes [8].

* Corresponding author at: 38 54 27, Silainiu pl. 21, LT-47101 Kaunas, Lithuania.

E-mail addresses: greta.musteikiene@ismuni.lt (G. Musteikienė), skaidrius.miliuskas@ismuni.lt (S. Miliuskas), jurgita.zaveckiene@ismuni.lt (J. Zaveckienė), daiva.urboniene@ismuni.lt (D. Urbonienė), astra.vitkauskiene@ismuni.lt (A. Vitkauskienė), marius.zemaitis@ismuni.lt (M. Žemaitis), albinas.naudziunas@ismuni.lt (A. Naudžiūnas).

<https://doi.org/10.1016/j.jctube.2021.100275>

Available online 8 September 2021

2405-5794/© 2021 The Author(s).

Published by Elsevier Ltd.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

The third selected biomarker was urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR), which is mostly expressed by monocytes and macrophages and is involved in cell motility and adhesion [3]. Levels of a soluble form of uPAR, suPAR, were shown to be elevated in active TB and were correlated with the number of acid-fast bacilli in sputum [9]. Compared with CRP, suPAR has not been widely studied in pulmonary TB. Several studies have shown that suPAR may be useful in the prognosis and differentiation of TB [10–14].

We also measured T-cell subpopulations. A better understanding of T-cell mechanisms is vital for developing vaccines and new therapies [15]. The cellular immune response plays a crucial role in controlling *M. tuberculosis* replication [16]: CD4 T cells help control primary *M. tuberculosis* infection and granuloma formation [17], whereas CD8 T cells help inhibit TB reactivation [18]. CD45RA is a marker of naive T-cell subsets that is also expressed on the CD4 and CD8 effector cells. After antigen exposure, memory T cells stop expressing CD45RA [19]. CD4 T cells with low expression of CD27 have been described as a biomarker of active TB [20]. Decreased CD27 expression may indicate that differentiated effector T cells are appearing as a result of antigen encounter [20]. CD38, one of the activation markers on *M. tuberculosis*-specific CD4 T cells [21], is believed to modulate inflammatory gene expression in helper T cells. This is because CD38 ligation results in the secretion of interferons, secretion of interleukins 6 and 10, and over-expression of CD38 on lymphocytes, which is a predictor of CD4⁺ T-cell depletion [22].

We studied whether changes in these selected biomarkers are useful in predicting culture conversion, treatment outcomes, and the extent of radiological lesions in drug-sensitive pulmonary TB.

2. Methods

2.1. Study population and design

This prospective study was conducted in Romainiai Tuberculosis Hospital, a branch of Hospital of Lithuanian University of Health Sciences Kauno Klinikos, Kaunas, Lithuania. Approximately 95% of the patients (adults only) treated in this hospital are from the Kaunas region. Directly observed treatment (DOT) is fully implemented; the staff ensure that patients with TB take their medications 7 days a week.

The clinical research protocol was approved by Kaunas Regional Biomedical Research Ethics Committee (BE-10-9 2015-10-09) and informed written consent was obtained from all participants. All patients received the standardized TB treatment regimen in line with national and World Health Organization TB treatment guidelines (isoniazid, rifampicin, ethambutol, pyrazinamide for two months, then isoniazid and rifampicin for four months, doses adjusted according to the body weight). TB drugs were distributed every day by hospital nurses, who ensured that all patients, including ambulatory patients, swallowed the drugs. There were no shortages of the TB drugs during the study.

Based on the standard finite sample size calculation formula, we determined that a sample size of 55 was needed for this study. From November 2015 to November 2017, we assessed 110 patients with new pulmonary TB diagnosed for the first time in their lives. Exclusion criteria were significant morbidity due to other illnesses (e.g., cancer, autoimmune diseases, diabetes mellitus, and renal insufficiency) and human immunodeficiency virus positivity. Pregnant or breastfeeding women were excluded, as were patients in whom drug-resistant TB was diagnosed. The final study population included 62 patients, in whom drug-susceptible pulmonary TB was diagnosed. Inclusion required acid-fast bacilli to be observed in sputum using Ziehl–Nielsen staining or sputum culture positivity for *M. tuberculosis*. All TB cases were confirmed bacteriologically (BACTEC system, Middlebrook media; BD, Franklin Lakes, NJ, USA). All included patients were treated in the hospital for at least 1 month. Treatment was continued until either treatment success or patient's death. Length of treatment was 6–7 months (7-month treatment was administered if sputum showed no microscopic

conversion after 2 months of treatment, as per national guidelines).

After enrollment in the study and before TB treatment initiation, standard posteroanterior chest X-rays were obtained and blood laboratory tests (CRP, flow cytometry, suPAR, and sICAM-1) were performed. Chest X-rays were evaluated by an experienced radiologist, and the score of disease extension was calculated according to the method described by Ralph et al. (percentage of lung affected plus 40 if cavitation was present) [23].

After 1 month of DOT in the hospital setting, sputum microscopy and culture and CRP, sICAM-1, and suPAR tests were repeated. Sputum culture conversion after 1 month of treatment was confirmed via a second negative culture 30 days later (after 2 months of treatment). Patients were assigned to one of two groups (conversion or non-conversion) after 1 month of TB treatment.

Five months after treatment initiation, sputum microscopy and culture were repeated and CRP, sICAM-1, and suPAR levels were remeasured. Flow cytometry and posteroanterior chest X-rays were repeated as well. Outcomes were recorded 1 year after treatment initiation: successful (treatment completion and cure) and unsuccessful (death). No patients experienced treatment failure (defined as a patient who is sputum smear or sputum culture positive at 5 months or later after the initiation of anti TB treatment). One patient was lost to follow-up; the data for that patient were not included in the analysis of treatment outcomes.

2.2. Laboratory testing

Laboratory testing was performed at the hospital of Lithuanian University of Health Sciences Kauno klinikos. AFB smear positive results were confirmed as per WHO/International Union Against Tuberculosis and Lung Disease grading: “scanty” with of 1–9 AFB per 100 oil immersion fields; “1+” with 10–99 AFB per 100 oil immersion fields; “2+” with 1–10 AFB per 1 oil immersion field and “3+” with > 10 AFB per oil immersion field.

Peripheral blood for ELISA assays was collected into plain BD Vacutainer tubes (BD, USA), centrifuged at 1600xg for 15 min. Sera were separated from the blood, aliquoted and stored at – 70 °C temperature until analysis. Serum suPAR was assessed using commercial kits Human suPAR ELISA (BioVendor – Laboratorní medicína, Czech Republic) according to manufacturer's instructions. Lower detection limit was 5.1 pg/mL for suPAR. RayBio Human sICAM-1 ELISA commercial kits (RayBiotech, USA) with a lower detection limit of 150 pg/ml were used for assessment of sICAM-1 in serum. CRP level was detected using clinical chemistry system Becman Coulter UniCel DxC Synchron 800 (USA). Peripheral blood for flow cytometry and hematology analysis was collected into BD Vacutainer K3EDTA tubes (BD, USA).

For flow cytometry cell aliquots were directly stained following a standard procedure with monoclonal antibodies (BD Biosciences Pharmingen, USA): anti-human CD3 (FITC, clone UCHT1), anti-human CD4 (PE-CyTM7, clone SK3), anti-human CD8 (APC-CyTM7, clone SK1), anti-human CD45RA (PerCP-CyTM5.5, clone HI100), anti-human CD27 (APC, clone M–T271), anti-human CD38 (PE, clone HIT2). Subsequently samples were analysed using FACS Canto flow cytometer (BD Immunocytometry Systems, USA). Up to 50 000 total events were collected per sample. Data were analysed using FACSDiva software (Becton Dickinson, USA). The T lymphocyte population was identified based on SSC and the level of CD3 expression. The number of positive cells with CD expression was evaluated as a percentage of cells in the T lymphocyte gate. These T-cell subsets were assessed during analysis: CD4 + CD45RA + CD27+ (naive); CD4 + CD45RA-CD27+ (memory); CD4 + CD45RA + CD27-; CD4 + CD45RA-CD27- (memory/effector); CD8 + CD45RA + CD27+ (naive); CD8 + CD45RA-CD27+ (memory); CD8 + CD45RA + CD27- (cytotoxic effector); CD8 + CD45RA-CD27- (memory/effector); CD8 + CD38 + CD3+ (activated suppressor/cytotoxic); CD8 + CD38-CD3 + . Absolute counts of T-cell subsets were calculated from total cell counts, enumerated by automated hematology

system Sysmex XE-5000 (Sysmex Corporation, Japan).

2.3. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics version 23.0 for Windows (Statistical Package for the Social Sciences, USA). The following descriptive statistics were reported: proportions with their 95% confidence intervals for dichotomous variables and medians with their interquartile ranges (IQR) for continuous variables. Comparisons of continuous variables between groups were made using Mann-Whitney *U* test for independent samples, as there were relatively few observations and no normal distribution. For correlation Spearman's coefficient was used. To estimate the risks of non-conversion and death by biomarker levels, we used logistic regression analysis. We also estimated the association between treatment outcomes, culture conversion and biomarkers using general linear model for repeated measures. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

Of the 62 patients, 48 (77.4%) were male (age range: 22–65 years, median: 46.5 years) and 14 (22.6%) were female (age range: 21–89 years, median: 48 years). Baseline levels of host biomarkers and T-cell subpopulations are presented in Table 1.

3.1. Prediction of culture conversion

After 1 month of TB treatment, sputum culture conversion was observed in 24 patients (38.7%). In other patients, sputum culture conversion was not observed after 1 month of treatment or adequate sputum samples could not be produced. Some patients died during the first month of treatment. Culture conversion was observed in every patient still alive after 5 months of TB treatment.

Table 1
Baseline levels of biomarkers and T-cell subpopulations in 62 patients with drug-sensitive pulmonary tuberculosis.

Baseline Characteristics	Median [Interquartile range]
CRP, mg/l	39.22 [8.25–98.56]
sICAM-1, ng/ml	59.94 [57.01–65.79]
suPAR, pg/ml	2621.05 [1898.36–4372.91]
Lymphocytes (N) $\times 10^9/l$	1.53 [1.14–2.15]
Lymphocytes (%)	19.85 [12.95–26.6]
CD3+ ($\times 10^9/l$)	0.99 [0.59–1.50]
CD3+ (%)	66.55 [52.4–71.52]
CD4+ ($\times 10^9/l$)	0.64 [0.33–0.85]
CD4+ (%)	63.0 [53.27–70.6]
CD8+ ($\times 10^9/l$)	0.34 [0.21–0.55]
CD8+ (%)	35.25 [29.03–43.15]
CD4/CD8	1.79 [1.21–2.45]
CD4+/CD45RA+/CD27- ($\times 10^9/l$)	0.0041 [0.0002–0.0179]
CD4+/CD45RA+/CD27- (%)	0.7 [0.07–3.4]
CD4+/CD45RA+/CD27+ ($\times 10^9/l$)	0.20 [0.11–0.37]
CD4+/CD45RA+/CD27+ (%)	40.65 [30.55–54.9]
CD4+/CD45RA-/CD27- ($\times 10^9/l$)	0.06 [0.03–0.1]
CD4+/CD45RA-/CD27- (%)	11.2 [7.07–16.9]
CD4+/CD45RA-/CD27+ ($\times 10^9/l$)	0.29 [0.14–0.4]
CD4+/CD45RA-/CD27+ (%)	41.6 [35.73–51.05]
CD8+/CD45RA+/CD27- ($\times 10^9/l$)	0.07 [0.02–0.15]
CD8+/CD45RA+/CD27- (%)	23.0 [13.25–44.35]
CD8+/CD45RA+/CD27+ ($\times 10^9/l$)	0.09 [0.04–0.15]
CD8+/CD45RA+/CD27+ (%)	23.0 [14.7–38.95]
CD8+/CD45RA-/CD27- ($\times 10^9/l$)	0.06 [0.03–0.11]
CD8+/CD45RA-/CD27- (%)	15.3 [10.18–26.15]
CD8+/CD45RA-/CD27+ ($\times 10^9/l$)	0.08 [0.04–0.12]
CD8+/CD45RA-/CD27+ (%)	22.15 [13.48–30.75]
CD8+/CD38- ($\times 10^9/l$)	0.27 [0.17–0.5]
CD8+/CD38- (%)	83.35 [70.45–90.57]
CD8+/CD38+ ($\times 10^9/l$)	0.05 [0.02–0.1]
CD8+/CD38+ (%)	16.65 [9.42–29.55]

Before treatment initiation, CRP ($p = 0.003$) and suPAR ($p = 0.01$) levels were significantly higher in the nonconversion group than in the conversion group, but sICAM-1 levels did not differ between the two groups. CRP, suPAR, and sICAM-1 levels were also measured at different time points (baseline and after 1 and 5 months of treatment) according to a general linear model (Table 2).

During general linear modeling, we found that CRP values varied significantly depending on the treatment period (Wilks' lambda; $F = 0.61$; $p < 0.001$) and interception between the time period and conversion (Wilks' lambda; $F = 0.85$; $p = 0.05$). Bonferroni post hoc test revealed that CRP values differed significantly among all tested time points ($p < 0.05$ for all cases). Levels of sICAM-1 and suPAR in general linear modeling were low as a result of laboratory errors after 5 months of treatment. Because of these limitations, we did not find statistically significant differences between the conversion and nonconversion groups.

While analyzing T-cell subpopulations, we observed statistically significant differences in the absolute numbers of total lymphocytes, and the levels of two T-cell subpopulations, CD4+/CD45RA+/CD27+ ($p = 0.007$) and CD8+/CD45RA+/CD27+ ($p = 0.001$), were higher in the conversion group. There were also statistically significant differences in the percentage of total lymphocytes ($p = 0.005$) and percentages of these T-cell subpopulations: CD4+/CD45RA-/CD27- ($p = 0.002$); CD4+/CD45RA-/CD27+ ($p = 0.007$); CD8+/CD45RA+/CD27+ ($p = 0.008$); CD8+/CD45RA-/CD27- ($p = 0.001$). Higher levels of CD4+/CD45RA-/CD27-; CD8+/CD45RA-/CD27 were found in non-conversion group.

When analyzing T-cell subpopulations using general linear models for repeated measures, we observed significant variations, depending on the treatment period, in the absolute numbers of total lymphocytes (Wilks' lambda; $F = 0.87$; $p = 0.012$) and the total number of lymphocytes in the following T-cell subpopulations: CD3+ ($F = 0.85$; $p = 0.007$); CD4+ ($F = 0.33$; $p < 0.001$); CD4+/CD45RA+/CD27- ($F = 0.817$; $p = 0.012$); CD4+/CD45RA+/CD27+ ($F = 0.9$; $p = 0.031$); CD4+/CD45RA-/CD27+ ($F = 0.858$; $p = 0.009$); and CD8+/CD38+ ($F = 0.769$; $p = 0.001$). Also, depending on treatment period, the percentages of total lymphocytes varied significantly ($F = 0.44$; $p < 0.001$), as did the percentages of the following T-cell subpopulations: CD3+ ($F = 0.88$; $p = 0.017$); CD8+ ($F = 0.85$; $p = 0.007$); CD4+/CD45RA+/CD27- ($F = 0.866$; $p = 0.034$); CD4+/CD45RA-/CD27- ($F = 0.576$; $p < 0.001$); and CD8+/CD38- ($F = 0.652$; $p < 0.001$). The general linear model analysis included 27 patients without sputum culture conversion and 20 patients with sputum culture conversion. In regression analysis, none of the host biomarkers or T-cell subpopulations showed a statistically significant effect on the

Table 2
Biomarker levels in different conversion groups at different time points during the treatment of drug-sensitive pulmonary tuberculosis. General linear model for repeated measures. Only data from patients without missing variables were included.

Biomarker	Treatment period	Conversion group (N = 17)		Non conversion group (N = 24)	
		Mean	St. deviation	Mean	St. deviation
CRP	Baseline	30,67	41,14	74,71	67,27
	After 1 month	17,41	29,84	30,58	29,23
	After 5 months	9,8	15,26	8,22	9,67
sICAM-1	Baseline	Conversion group (N = 1)		Non conversion group (N = 4)	
		57,52	-	65,84	10,6
	After 1 month	55,87	-	63,19	7,12
	After 5 months	48,38	-	58,44	2,35
suPAR	Baseline	Conversion group (N = 4)		Non conversion group (N = 10)	
		2038,23	746,56	4047,7	2403,24
	After 1 month	1678,6	190,9	2543,51	930,16
	After 5 months	1936,77	219,27	2374,89	602,96

conversion status.

3.2. Prediction of treatment outcomes

Of the patients with TB, 56 eventually recovered, 5 died during treatment, and 1 was lost to follow-up. TB treatment failure and acquired drug resistance was not observed in any patients during the study.

Baseline CRP and suPAR levels were higher in patients who died ($p < 0.001$); no differences were noted in baseline sICAM-1 levels. The general linear model for repeated measures was used to analyze CRP, sICAM-1, and suPAR levels at different time points. Values at baseline and 1 month were analyzed. All deaths occurred before the fifth month of treatment; hence, values at the fifth month could not be determined in these cases. We found that CRP values varied significantly between patients who died and those who survived, depending on the treatment period (Wilks' lambda; $F = 0.685$; $p < 0.001$), but did not vary significantly with regard to the interval between the time period and conversion (Wilks lambda; $F = 0.892$; $p = 0.052$). The suPAR and sICAM-1 levels could not be measured in the patients who died.

The baseline levels of total lymphocytes ($p = 0.001$) and the absolute number of the following T-cell subpopulations were lower in patients with worse prognosis: CD3⁺ ($p < 0.001$); CD4⁺ ($p = 0.001$); CD8⁺ ($p < 0.001$); CD4⁺/CD45RA⁺/CD27⁺ ($p = 0.021$); CD4⁺/CD45RA⁻/CD27⁺ ($p < 0.001$); CD8⁺/CD45RA⁺/CD27⁺ ($p < 0.001$); CD8⁺/CD45RA⁻/CD27⁺ ($p < 0.001$); CD8⁺/CD45RA⁺/CD27⁻ ($p < 0.001$); CD8⁺/CD45RA⁻/CD27⁻ ($p = 0.032$); and CD8⁺/CD38⁺ ($p < 0.001$). Comparisons of percentages of lymphocyte subpopulations revealed that the percentages of all lymphocytes and of CD4⁺/CD45RA⁺/CD27⁺ ($p < 0.001$), CD8⁺/CD45RA⁺/CD27⁺ ($p = 0.032$), and CD8⁺/CD38⁺ ($p < 0.001$) T-cell subpopulations were lower in patients with worse prognoses.

We were unable to use the general linear model for repeated-measures analysis of T-cell subpopulations because no measurements were made at the fifth month of treatment. In regression analysis, none of the host biomarkers or T-cell subpopulations showed a statistically significant effect on the conversion status.

3.3. Host biomarkers, T-cell subpopulations and extent of lung destruction

We found significant correlations between some T-cell subpopulations and X-ray scores before TB treatment initiation: when these T-cell subpopulations were smaller, lung destruction was more pronounced (Table 3). Correlations of total lymphocyte percentages and X-ray scores before TB treatment initiation are depicted in Fig. 1.

Baseline CRP and suPAR levels were correlated with baseline lung

Table 3

Statistically significant correlations of baseline T-cell subpopulations measured using flow cytometry with baseline X-ray scores in 62 patients with drug-sensitive pulmonary tuberculosis.

Baseline characteristics	Correlation coefficient (Spearman's rho)	P value
CD3+ ($\times 10^9/l$)	-0.523	<0.001
CD3+ (%)	-0.556	<0.001
CD4+ ($\times 10^9/l$)	-0.523	<0.001
CD8+ ($\times 10^9/l$)	-0.456	0.001
CD4+/CD45RA-/CD27- ($\times 10^9/l$)	-0.36	0.008
CD4+/CD45RA-/CD27+ ($\times 10^9/l$)	-0.504	<0.001
CD8+/CD45RA+/CD27+ ($\times 10^9/l$)	-0.488	<0.001
CD8+/CD45RA-/CD27+ ($\times 10^9/l$)	-0.439	0.001
CD8+/CD38- ($\times 10^9/l$)	-0.531	<0.001
CD8+/CD38- (%)	-0.687	<0.001
CD8+/CD38+ (%)	-0.687	<0.001

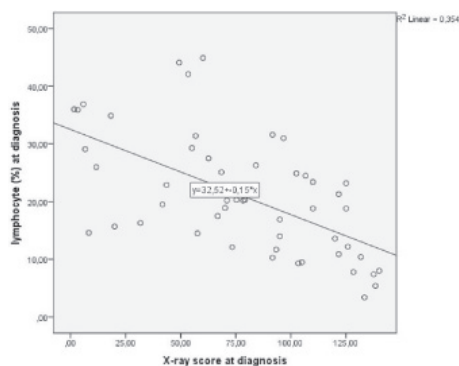


Fig. 1. Correlations of baseline total lymphocyte percentages and baseline X-ray scores in 62 patients with drug-sensitive pulmonary tuberculosis.

destruction. X-ray scores were correlated with CRP (Spearman's rho, 0.762; $p < 0.001$) and suPAR (Spearman's rho, 0.468; $p = 0.002$) levels. sICAM-1 levels were not significantly correlated with lung destruction. The correlation between CRP levels and X-ray scores is depicted in Fig. 2.

4. Discussion

Our exclusion criteria were chosen to avoid data reflecting laboratory test results and radiological changes resulting from or influenced by diseases other than TB.

CRP is possibly one of the most studied host biomarkers in pulmonary TB. CRP tends to increase most significantly from baseline as disease severity increases, is associated with week-8 culture status, and is overall a good indicator of the patient's clinical condition at the time of diagnosis [24]. We found similar results: CRP significantly decreased after 1 month of treatment, and its baseline levels were higher in patients who died and in the nonconversion group than in the conversion group. CRP was also strongly correlated with X-ray scores.

suPAR is not as well studied as CRP in pulmonary TB. However, some

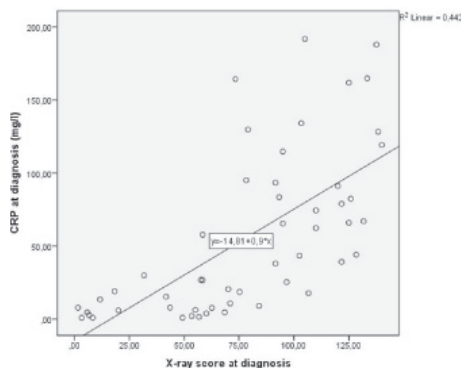


Fig. 2. Correlation of baseline C reactive protein and baseline x-ray score before in drug sensitive pulmonary tuberculosis patients who were included in the study in Romanian tuberculosis hospital ($n = 62$).

published data have shown that suPAR levels increase in patients with bacterial infections [10], sepsis [11], lung cancer [12], exacerbated chronic obstructive pulmonary disease [24], and acute respiratory distress syndrome [25]. Our findings are similar to those of previously published studies [13,14]: suPAR levels tended to decrease after initiating appropriate TB treatment and were higher in patients with an unsuccessful treatment outcome.

Studies on sICAM-1 and suPAR with regard to TB diagnosis and TB treatment monitoring are lacking. We were also unable to find much published data concerning the relationship of T-cell subpopulations with the severity of TB or radiological evidence of the extent of lung damage. These were the main reasons that we wanted to conduct this study.

In our study, sICAM-1 baseline values were not correlated with baseline X-ray scores. We were unable to find any studies using sICAM-1 levels and X-ray scoring method proposed by Ralph et al. In some studies, a simpler radiological scoring method was used [1,6,26] to show the correlation of sICAM-1 levels with the radiological extent of lung damage in TB. When sICAM-1 was used in TB treatment monitoring, the results were contradictory [1,6]. Some of these conflicting results are probably attributable to the small patient populations in these studies.

Host T-cell responses are essential for an effective immune response to *M. tuberculosis*. To gauge this response, T-cell phenotypes in the peripheral blood can be measured [15]. To evaluate response to TB treatment, some researchers have analyzed *in vitro* stimulated peripheral blood mononuclear cells to evaluate a specific response [27]. However, we decided to evaluate the nonspecific T-cell response to *M. tuberculosis* infection because testing this would be cheaper and easier to perform in clinical practice. The number of studies in which researchers evaluated nonspecific T-cell response to TB treatment is very limited [15,28,29], and we did not find any other studies in which flow cytometry results were analyzed as a factor in determining culture conversion. We did not find that T-cell subpopulation differences had a statistically significant effect on sputum conversion or treatment outcomes.

We were only able to find one validated chest X-ray score in the current literature on pulmonary TB, which could be used in monitoring radiological changes in the lungs during the treatment course [23]. In some studies, chest X-rays of patients with TB are evaluated using simpler methods, such as the presence of cavities [30]. When we used the scoring method of Ralph et al., we detected a significant correlation of X-ray scores with T-cell subpopulations, as previously mentioned. We could not find any other studies comparing T-cell subpopulations with radiological changes of active pulmonary TB. It would have been interesting to compare our results with those of other authors.

We believe that one of the strengths of our study is that it was a prospective study of in-hospital patients on DOT. Hence, we have no doubt that our patients were taking their medication and were not missing doses. All the patients were in the same environment, at least for the first month of the treatment, and were treated using the same methodology. All patients admitted to our hospital during the 2-year study were asked to participate, and the study population may represent the population of patients with TB in the Kaunas district. One of the limitations of this study was the relatively low number of participants. However, further study will be performed and will yield more data.

5. Conclusions

Selected host biomarkers play a very limited role in predicting TB treatment outcomes and culture conversion. suPAR and sICAM-1 levels did not appear to be superior to CRP levels for monitoring TB treatment. T-cell subpopulations and X-ray scores were correlated, but baseline lung destruction showed the highest correlation with baseline CRP levels.

Ethical statement

All patients were examined as part of a clinical research protocol

approved by Kaunas Regional Biomedical Research Ethics Committee (BE-10-9 2015–10-09) and informed written consent was obtained from all participants.

CRedit authorship contribution statement

Greta Musteikiene: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Writing – original draft, Writing – review & editing, Funding acquisition. **Skaidrius Miliuskas:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Resources, Writing – original draft, Writing – review & editing, Project administration, Funding acquisition. **Jurgita Zaveckiene:** Methodology, Investigation, Resources, Writing – review & editing. **Daiva Urbonienė:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Resources, Writing – review & editing. **Astra Vitkauskienė:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Resources, Writing – review & editing, Project administration, Funding acquisition. **Marius Zemaitis:** Resources, Writing – review & editing, Project administration. **Albinas Naudziūnas:** Resources, Writing – review & editing, Project administration.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors are grateful to all the patients, nurses and physicians who helped to conduct this study. We thank Edanz (<https://www.edanz.com/ac>) for editing a draft of this manuscript.

Funding

The study was supported by funding from Research Foundation of Lithuanian University of Health Sciences. The funding body had no role in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript.

Author contributions

All persons who meet authorship criteria are listed as authors, and all authors certify that they have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the content, including participation in the concept, design, analysis, writing, and revision of the manuscript. Furthermore, each author certifies that this material has not been and will not be submitted to or published in any other publication before its appearance in your journal.

References

- [1] Siawaya JFD, Bapela NB, Ronacher K, Veenstra H, Kidd M, Gie R, et al. Immune parameters as markers of tuberculosis extent of disease and early prediction of anti-tuberculosis chemotherapy response. *J Infect* 2008;56(5):340–7. Elsevier.
- [2] Qian Q, Zhan P, Sun W, Zhang Y, Song Y, Yu L. Vascular endothelial growth factor and soluble intercellular adhesion molecule-1 in lung adenocarcinoma with malignant pleural effusion: correlations with patient survival and pleural effusion control. *Neoplasma* 2011;59(4):433–9.
- [3] Walz G, Ronacher K, Siawaya JFD, Dockrell HM. Biomarkers for TB treatment response: challenges and future strategies. *J Infect* 2008;57(2):103–9. Elsevier.
- [4] Musteikiene G, Miliuskas S, Zaveckiene J, Zemaitis M, Sakalauskas R. Factors associated with sputum culture conversion in patients with pulmonary tuberculosis. *Medicina (Kaunas)*; 2018. 2017 pii: S1010-660X(18)30008-9.
- [5] Walls R, Johnson J. Surrogate markers to assess clinical efficacy of new antituberculous drugs. The development of new antituberculosis drugs Hauppauge. NY: Nova Science Publishers; 2006. p. 95–113.
- [6] Demir T, Yalcinoz C, Keskinel I, Demiroz F, Yildirim N. sICAM-1 as a serum marker in the diagnosis and follow-up of treatment of pulmonary tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease 2002;6(2):155–9.

- [7] Plit M, Theron A, Fickl H, Van Rensburg C, Pendel S, Anderson R. Influence of antimicrobial chemotherapy and smoking status on the plasma concentrations of vitamin C, vitamin E, beta-carotene, acute phase reactants, iron and lipid peroxides in patients with pulmonary tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease 1998;2(7):590–6.
- [8] Scott G, Murphy P, Gemidjoglu M. Predicting deterioration of treated tuberculosis by corticosteroid reserve and C-reactive protein. *J Infect* 1990;21(1):61–9. Elsevier.
- [9] Eugen-Olsen J, Gustafson P, Sidenius N, Fischer T, Færner J, Aaby P, et al. The serum level of soluble urokinase receptor is elevated in tuberculosis patients and predicts mortality during treatment: a community study from Guinea-Bissau. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease 2002;6(8):686–92.
- [10] Ni W, Han Y, Zhao J, Cui J, Wang K, Wang R, et al. Serum soluble urokinase-type plasminogen activator receptor as a biological marker of bacterial infection in adults: a systematic review and meta-analysis. *Scientific reports*. Nature Publishing Group 2016;6:39481.
- [11] Zeng M, Chang M, Zheng H, Li B, Chen Y, He W, et al. Clinical value of soluble urokinase-type plasminogen activator receptor in the diagnosis, prognosis, and therapeutic guidance of sepsis. *The American journal of emergency medicine*. Elsevier 2016;34(3):375–80.
- [12] Langkilde A, Hansen TW, Ladelund S, Linneberg A, Andersen O, Haugaard SB, et al. Increased plasma soluble uPAR level is a risk marker of respiratory cancer in initially cancer-free individuals. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. AACR 2011;20(4):609–18.
- [13] El-Shafey BI, El-Bedewy MM, Ezzat SE, Attia M. Role of some T-lymphocyte subsets in assessment of treatment response in tuberculosis patients. *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis*. Elsevier 2015;64(2):513–20.
- [14] Beck JS, Potts R, Kardjito T, Grange J. T4 lymphopenia in patients with active pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 1985;60(1):49. Wiley-Blackwell.
- [15] do S da S Rodrigues D, de Medeiros EAS, Weckx LY, Bonnez W, Salomão R, Kallas EG. Immunophenotypic characterization of peripheral T lymphocytes in Mycobacterium tuberculosis infection and disease. *Clin Exp Immunol* 2002;128(1):149–54. Wiley-Blackwell.
- [16] Orme I, Collins FM. Protection against Mycobacterium tuberculosis infection by adoptive immunotherapy. Requirement for T cell-deficient recipients. *J Exp Med* 1983;158(1):74–83. Rockefeller University Press.
- [17] Harding CV, Boom WH. Regulation of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis: a role for Toll-like receptors. *Nature Rev Microbiology* 2010;8(4):296–307. Nature Publishing Group.
- [18] Sia JK, Rengarajan J. Immunology of Mycobacterium tuberculosis infections. *Gram-Positive Pathogens* 2019:1056–86. Wiley Online Library.
- [19] Pathakumari B, Devasundaram S, Raja A. Altered expression of antigen-specific memory and regulatory T-cell subsets differentiate latent and active tuberculosis. *Immunology* 2018;153(3):325–36. Wiley Online Library.
- [20] Latorre I, Fernández-Sanmartín MA, Muriel-Moreno B, Villar-Hernández R, Vila S, Souza-Galvão MLD, et al. Study of CD27 and CCR4 markers on specific CD4+ T-cells as immune tools for active and latent tuberculosis management. *Frontiers in immunology*. Frontiers 2019;9:3094.
- [21] Acharya MP, Pradeep SP, Murthy VS, Chikkannaiah P, Kambar V, Narayanashetty S, et al. CD38+ CD27-TNF-α+ on Mtb-specific CD4+ T is a robust biomarker for tuberculosis diagnosis. *Clin Infect Dis* 2021.
- [22] Clarvia E, Valledor Valledor. Roles of CD38 in the Immune Response to Infection. *Cells*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute 2020;9(1):228.
- [23] Ralph AP, Ardian M, Wiguna A, Maguire GP, Becker NG, Drogumüller G, et al. A simple, valid, numerical score for grading chest x-ray severity in adult smear-positive pulmonary tuberculosis. *Thorax*. BMJ Publishing Group Ltd and British Thoracic Society 2010;65(10):863–9.
- [24] Godfredsen NS, Jørgensen DV, Marsaaq K, Ulrik CS, Andersen O, Eugen-Olsen J, et al. Soluble urokinase plasminogen activator receptor predicts mortality in exacerbated COPD. *Respiratory research*. BioMed Central 2018;19(1):97.
- [25] Geboers DG, de Beer FM, Tulp-de Boer AM, van der Poll T, Horn J, Cremer OL, et al. Plasma suPAR as a prognostic biological marker for ICU mortality in ARDS patients. *Intensive care medicine*. Springer 2015;41(7):1281–90.
- [26] Mukae H, Ashitani J, Tokojima M, Ihi T, Kohno S, Matsukura S. Elevated levels of circulating adhesion molecules in patients with active pulmonary tuberculosis. *Respirology* 2003;8(3):326–31. Wiley Online Library.
- [27] Agrawal S, Parkash O, Palaniappan AN, Bhatia AK, Kumar S, Chauhan DS, et al. Efficacy of T regulatory cells, Th17 cells and the associated markers in monitoring tuberculosis treatment response. *Frontiers in Immunology*. Frontiers 2018;9:157.
- [28] Bernal-Fernández G, Hermida C, Espinosa-Cueto P, Cubilla-Tejada AC, Salazar-González JF, Ortiz-Ortiz L, et al. Impact of opportunistic Mycobacterium tuberculosis infection on the phenotype of peripheral blood T cells of AIDS patients. *Journal of clinical laboratory analysis*. Wiley Online Library 2006;20(3):80–6.
- [29] Goovaerts O, Jennes W, Massinga-Loembé M, Ondoa P, Ceulemans A, Vereecken C, et al. Lower pre-treatment T cell activation in early- and late-onset tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome. *PLoS one*. Public Library of Science 2015;10(7):e0133924.
- [30] Diktanas S, Korotych O, Sereida Y, Gozalov O, Rubcova O, Achar J. Factors associated with time to sputum culture conversion of rifampicin-resistant tuberculosis patients in Klaipėda, Lithuania in 2016–2019: a cohort study. *Monaldi Arch Chest Dis* 2021;91(1).



Bedaquiline Drug Resistance Emergence Assessment in Multidrug-Resistant Tuberculosis (MDR-TB): a 5-Year Prospective *In Vitro* Surveillance Study of Bedaquiline and Other Second-Line Drug Susceptibility Testing in MDR-TB Isolates

✉ Koné Kaniga,^a Rumina Hasan,^{b,c} Ruwen Jou,^c Edita Vasiliauskienė,^{d,*} Charoen Chuchottaworn^e Nazir Ismail,^f Beverly Metchock,^g Skaidrius Miliauskas,^h Nguyen Viet Nhung,ⁱ Camilla Rodrigues,^j Soyoun Shin,^k Hulya Simsek,^{l,r} Saijai Smithikarn,^m Anh Le Thi Ngoc,^l Jirakan Boonyasopun,ⁿ Mubin Kazi,^j Seungmo Kim,^k Phalin Kamolwat,^m Greta Musteikiene,^h Catherine Ann Sacopon,^o Sabira Tahseen,^p Laima Vasiliauskaitė,^{d,§} Mei-Hua Wu^c Shaheed Vally Omar^f

^aJohnson & Johnson Global Public Health, Titusville, New Jersey, USA

^bDepartment of Pathology and Laboratory Medicine, Aga Khan University, Karachi, Pakistan

^cTuberculosis Research Center, Centers for Disease Control, Ministry of Health and Welfare, Taipei, Taiwan

^dInstitute of Biomedical Sciences, Department of Physiology, Biochemistry, Microbiology and Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, Vilnius University, Vilnius, Lithuania

^eDepartment of Medical Services, Ministry of Public Health, Bangkok, Thailand

^fCenter for Tuberculosis, National and WHO Supranational TB Reference Laboratory, National Institute for Communicable Diseases, National Health Laboratory Services, Johannesburg, South Africa

^gReference Laboratory, Division of TB Elimination, United States Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA

^hDepartment of Pulmonology, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania

ⁱVietnam Integrated Center for TB and Respiratory Research, National Lung Hospital, Hanoi, Vietnam

^jDepartment of Microbiology, P. D. Hinduja Hospital and Medical Research Centre, Mumbai, India

^kThe Korean Institute of Tuberculosis, Cheongju-si, Republic of Korea

^lNational Tuberculosis Reference Laboratory, Public Health Institution of Turkey, Ankara, Turkey

^mDivision of Tuberculosis, Department of Disease Control, Ministry of Public Health, Bangkok, Thailand

ⁿMycobacteriology Laboratory, Microbiology Unit, Central Chest Institute of Thailand, Department of Medical Services, Ministry of Public Health, Bangkok, Thailand

^oNational Tuberculosis Reference Laboratory, Research Institute for Tropical Medicine, Manila, Philippines

^pNational TB Reference laboratory, National TB Control Program, Islamabad, Pakistan

^rDepartment of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, United Kingdom

^sYozgat Bozok University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Yozgat, Turkey

ABSTRACT Bedaquiline Drug Resistance Emergence Assessment in Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) (DREAM) was a 5-year (2015 to 2019) phenotypic drug resistance surveillance study across 11 countries. DREAM assessed the susceptibility of 5,036 MDR-TB isolates of bedaquiline treatment-naïve patients to bedaquiline and other antituberculosis drugs by the 7H9 broth microdilution (BMD) and 7H10/7H11 agar dilution (AD) MIC methods. Bedaquiline AD MIC quality control (QC) range for the H37Rv reference strain was unchanged, but the BMD MIC QC range (0.015 to 0.12 µg/ml) was adjusted compared with ranges from a multilaboratory, multicountry reproducibility study conforming to Clinical and Laboratory Standards Institute Tier-2 criteria. Epidemiological cutoff values of 0.12 µg/ml by BMD and 0.25 µg/ml by AD were consistent with previous bedaquiline breakpoints. An area of technical uncertainty or intermediate category was set at 0.25 µg/ml and 0.5 µg/ml for BMD and AD, respectively. When applied to the 5,036 MDR-TB isolates, bedaquiline-susceptible, -intermediate, and -resistant rates were 97.9%, 1.5%, and 0.6%, respectively, for BMD and 98.8%, 0.8%, and 0.4% for AD. Resistance rates were the following:

Citation Kaniga K, Hasan R, Jou R, Vasiliauskienė E, Chuchottaworn C, Ismail N, Metchock B, Miliauskas S, Viet Nhung N, Rodrigues C, Shin S, Simsek H, Smithikarn S, Ngoc ALT, Boonyasopun J, Kazi M, Kim S, Kamolwat P, Musteikiene G, Sacopon CA, Tahseen S, Vasiliauskaitė L, Wu M-H, Vally Omar S. 2022. Bedaquiline drug resistance emergence assessment in multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB): a 5-year prospective *in vitro* surveillance study of bedaquiline and other second-line drug susceptibility testing in MDR-TB isolates. *J Clin Microbiol* 60:e02919-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.02919-20>.

Editor Christine Y. Turenne, University of Manitoba

Copyright © 2022 Kaniga et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Koné Kaniga, kkaniga@its.jnj.com.

*Present address: Edita Vasiliauskienė, Centre of Laboratory Medicine, Tuberculosis Laboratory, Vilnius University Hospital Santaros Klinikos, Vilnius, Lithuania.

§Present address: Laima Vasiliauskaitė, Centre of Laboratory Medicine, Tuberculosis Laboratory, Vilnius University Hospital Santaros Klinikos, Vilnius, Lithuania.

Received 20 November 2020

Returned for modification 4 January 2021

Accepted 21 October 2021

Accepted manuscript posted online 27 October 2021

Published 19 January 2022

35.1% ofloxacin, 34.2% levofloxacin, 33.3% moxifloxacin, 1.5% linezolid, and 2% clofazimine. Phenotypic cross-resistance between bedaquiline and clofazimine was 0.4% in MDR-TB and 1% in pre-extensively drug-resistant (pre-XDR-TB)/XDR-TB populations. Coresistance to bedaquiline and linezolid and clofazimine and linezolid were 0.1% and 0.3%, respectively, in MDR-TB and 0.2% and 0.4%, respectively, in pre-XDR-TB/XDR-TB populations. Resistance rates to bedaquiline appear to be low in the bedaquiline-treatment-naïve population. No treatment-limiting patterns for cross-resistance and coresistance have been identified with key TB drugs to date.

KEYWORDS bedaquiline, drug resistance, *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis, variants, drug susceptibility testing

Drug-resistant tuberculosis (TB) has been declared a public health crisis by the World Health Organization (WHO) (1). In 2018, 3.4% of new TB cases and 18% of previously treated TB cases had multidrug- or rifampin-resistant TB (MDR/RR-TB). Additionally, 6.2% of MDR-TB cases were extensively drug resistant (XDR) (1). These data highlight the need for new TB drugs that are effective against drug-resistant (DR) TB and drug-susceptible (DS) TB.

Use of phenotypic drug susceptibility testing (pDST) to guide anti-TB therapies minimizes the risk of developing resistance and maximizes the effectiveness of treatments (2, 3). Two main approaches for *Mycobacterium tuberculosis* routine pDST and drug resistance surveillance (DRS) are the solid-based agar proportion (AP) method and the liquid-based mycobacteria growth indicator tube (MGIT) (4). These methods generate results after an average time of up to 4 weeks for subculture and up to 4 weeks for pDST (AP) and 8 to 14 days for subculture and 8 to 14 days for pDST (MGIT) from sputum-positive culture, with results interpreted based on the single critical concentration (CC) of the drug (5). Other methods increasingly used for *M. tuberculosis* pDST are the 7H10 or 7H11 agar dilution (AD) and 7H9 broth microdilution (BMD) methods, which, in contrast to AP and MGIT, test a range of drug concentrations. The results are reported as the MIC, defined as the lowest concentration of a drug that inhibits *M. tuberculosis* growth *in vitro* (3). Although not used in routine practice, AD MIC and BMD MIC can generate more granular data for determining trends of decreased susceptibility over time during a DRS and the epidemiological cutoff value (ECV) for setting the breakpoint of a drug.

Bedaquiline (BDQ), a diarylquinoline antimycobacterial drug that inhibits ATP synthase of *M. tuberculosis* (6), is indicated as part of combination therapy in adult and pediatric patients (≥ 5 years, weighing ≥ 15 kg) with pulmonary MDR-TB. Use of BDQ-based regimens for the treatment of MDR-TB has considerably improved treatment outcomes (7–12). However, a number of resistance-associated variants (RAVs) may decrease susceptibility to BDQ (13–20), including *Rv0678* RAVs, which lead to low-level BDQ resistance and cross-resistance with clofazimine (CFZ) (14, 15, 18, 20–23), and *atpE* RAVs in the BDQ target (19, 24).

This paper reports the results from the Bedaquiline Drug Resistance Emergence Assessment in MDR-TB (DREAM) program to assess the susceptibility of BDQ treatment-naïve patients' MDR-TB isolates to BDQ over a 5-year period in 11 countries by the BMD and AD MIC methods. The study determined whether (i) any revisions were required to the MIC quality control (QC) ranges for BDQ and other anti-TB drugs from a multilaboratory, multicountry, reproducibility study conforming to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Tier-2 criteria (25, 26; also see the supplemental material); (ii) ECVs for BDQ were in agreement with those in the external quality assessment (EQA) study (27); and (iii) there was cross-resistance between BDQ and CFZ, coresistance to BDQ and linezolid (LZD), or coresistance to CFZ and LZD.

MATERIALS AND METHODS

Study design. This was a prospective *in vitro* study conducted over a 5-year period (2015–2019) in India, Lithuania, Pakistan, the Philippines, South Africa, South Korea, Taiwan, Thailand, Turkey, Vietnam, and the United States (Centers for Disease Control and Prevention).

Study materials. For AD MIC testing, laboratories were provided with BDQ active pharmaceutical ingredient lot number A13HB2843 (Janssen, Beerse, Belgium). For BMD MIC testing, custom-made frozen polystyrene microtiter plates containing BDQ and other anti-TB drugs and ancillaries were supplied by Thermo Fisher Scientific (Oakwood Village, OH). Each lot of frozen microtiter plates was tested by an independent laboratory prior to use in the study to ensure the performance of the plates was according to previously published QC parameters (25, 26). All other reagents, including Middlebrook 7H10 and 7H11 agar, oleic acid albumin dextrose catalase, *M. tuberculosis* H37Rv strain (American Type Culture Collection number 27294), and standard medium (e.g., Lowenstein-Jensen) routinely used to grow *M. tuberculosis* in the laboratory were sourced at the country level.

Microbiology methods. *M. tuberculosis* isolates were collected from BDQ treatment-naïve patients between 1 January 2015 and 31 July 2019, but only MDR-TB isolates from the 11 countries were included in BDQ DREAM program analyses. Isolates were included in the analyses based on the criteria defined in Table S1 in the supplemental material. The distribution of isolates per country is shown in Fig. S1. MIC determination of BDQ by AD and BMD was performed according to methods previously described for Tier-2 studies (25). An *M. tuberculosis* QC strain (H37Rv) was included in each testing and was required to be within previously published QC ranges for BDQ testing (25).

WGS. A total of 78 available isolates confirmed to be resistant to BDQ either by AD or BMD were analyzed at the WHO Supranational Reference Lab, National Institute for Communicable Diseases in Johannesburg, South Africa. DNA was isolated and submitted for whole-genome sequencing (WGS). DNA extraction was performed using either the automated bead-based Nuclisens EasyMag platform or the cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) method. WGS and bioinformatic analysis was performed as previously described (28; also see the supplemental material). The genetic targets investigated included the intergenic regions between *mmpL5* and *Rv0678*, *Rv0678*, *atpE*, *mmpL5*, *mmpL5S*, *pepQ*, and *Rv1979c*. Lineage was further assigned to these isolates using WGS as described previously (29).

Data management. Each laboratory was defined by its country of origin. Consistent capture and reporting of data between all laboratories was overseen by the principal investigators, who were provided with standardized data collection forms. Inconsistent data (such as MIC not within the specified dilution range, comma as decimal separator, and erroneous dilution) were queried, and the investigator was required to resubmit and update the file for the final analyses. The sponsor's clinical microbiologist assessed the quality of the data set from each laboratory and performed a final QC check.

Statistical and microbiological analyses. For the range of dilutions used in the study, the frequency and cumulative frequency of MIC distribution were calculated using SAS software version 9.2 (SAS Institute). For MIC values preceded by a less-than sign, the lower-end MIC value of the range was reported with a less-than-or-equal-to sign. For MIC values preceded by a greater-than sign, the MIC value was reported as greater than or equal to the next dilution (e.g., >1 was reported as ≥ 2). MIC distribution histograms were produced from the MIC frequency tables, and ECVs were derived by visual inspection of the histograms as the drug concentration that delineated the wild-type from the non-wild-type population. When there is no clear separation of the wild-type from the non-wild-type population, the visual inspection of the histogram becomes subjective. In that case, an iterative nonlinear regression on expanding subsets, known as ECOFFinder, was also used to estimate ECVs (30), with a 97.5% cutoff from ECOFFinder used as the ECV.

For the AD MIC methods, the combined data for 7H10 and 7H11 agars are reported, since there are no meaningful differences between the results obtained using these two media (25). For BDQ, ECVs were used to confirm the breakpoints validated in the sponsor's EQA study (27). For other drugs tested in this study, ECVs were used as surrogate interpretative criteria to determine the susceptibility rates of MDR-TB isolates. Categorical analyses between breakpoints derived from the 7H9 BMD MIC and AD MIC methods were performed. The evolution of BDQ MIC over the last 5 years (2015 to 2019) was also assessed.

Analyses were performed on the data set stratified by MDR-TB, MDR_{4dR}-TB (MDR-TB limited to isoniazid and rifampin resistance), pre-extensively drug-resistant (pre-XDR)_{4dR}-TB (MDR-TB with resistance to any fluoroquinolone tested), pre-XDR_{5r}-TB (MDR-TB with resistance to any second-line injectable tested), and XDR-TB (MDR-TB with resistance to any fluoroquinolone and any second-line injectable tested) (Table S1). The resazurin microtiter assay critical concentrations for first- and second-line drugs were used to define the *M. tuberculosis* resistance subtypes (31–35). Capreomycin (CAP) and kanamycin (KAN) critical concentrations (2.5 $\mu\text{g/ml}$) were extrapolated to 4 $\mu\text{g/ml}$ (the next dilution in the CLSI dilution scheme) (36). A small set of DS-TB found in the data set was also analyzed for susceptibility to BDQ only.

RESULTS

Tier-3 QC ranges. Each day of testing clinical isolates, the *M. tuberculosis* QC strain H37Rv was also tested to accumulate more real-world QC data. The BDQ AD MIC QC range for the H37Rv strain was 96.8% (518/535) within the established Tier-2 QC range compared with 88.3% (476/539) for BMD MICs. Therefore, the QC range for BMD MICs was adjusted to include at least 95% of repeats while remaining within a 4-dilution range (25). The result of the Tier-3 QC of BDQ for the BMD MICs is 0.015 to 0.12 $\mu\text{g/ml}$ (between the vertical lines in Fig. 1A), which includes 98.0% (528/539) of the data.

Confirmatory phenotypic DST and whole-genome sequencing of putative BDQ-R isolates. All nonduplicate clinical isolates with either BDQ BMD MIC of $>0.12 \mu\text{g/ml}$ or AD MIC of $>0.25 \mu\text{g/ml}$ were retested by BMD and MGIT at a CC of 1 $\mu\text{g/ml}$, and WGS was performed. Due to the COVID-19 pandemic, only 78 viable isolates were available for

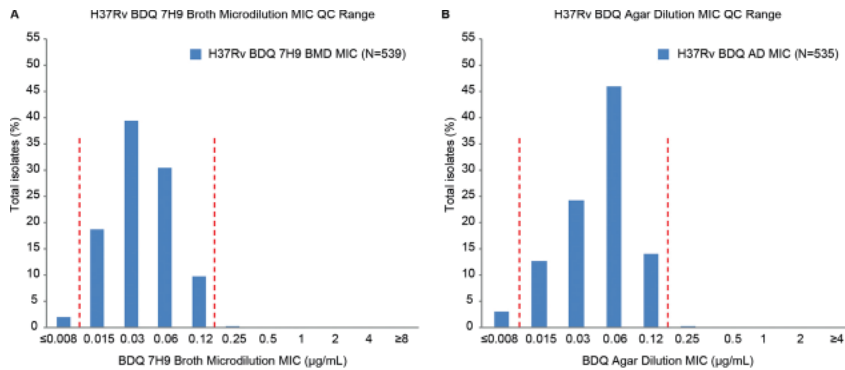


FIG 1 Bedaquiline MIC quality control ranges for H37Rv by the 7H9 broth microdilution (A) and agar (B) dilution methods. Dashed lines indicate the BDQ QC ranges established through Tier-3 studies. BDQ QC ranges determined in the Tier-2 studies were 0.015 to 0.06 for the 7H9 BMD MIC and 0.015 to 0.12 for the AD MIC (25).

retest by BMD, MGIT, and WGS analysis. No mutations were found in the BDQ target *atpE* and *pepQ* genes; 10/78 (12.8%) isolates with BDQ BMD MIC of ≤ 0.12 $\mu\text{g/ml}$ were BDQ susceptible (BDQ-S) by MGIT, and 10/10 (100%) were wild type for the *Rv0678* gene. This finding supports BDQ BMD MIC of ≤ 0.12 $\mu\text{g/ml}$ as the BDQ-S breakpoint; 23/78 (29.5%) isolates with BDQ BMD MIC of ≥ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ were BDQ-resistant (BDQ-R) by MGIT, and 21/23 (91.3%) had nonsynonymous nonsilent mutations in the *Rv0678* gene. This finding supports a BDQ BMD MIC of ≥ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ as the BDQ-R breakpoint. There were 45/78 (57.7%) isolates with BDQ BMD MIC of 0.25 $\mu\text{g/ml}$, of which 17 (37.8%) were BDQ-R by MGIT; 10/17 (58.8%) had *Rv0678* RAVs and 7/17 (41.2%) were wild type for *Rv0678*. The remaining 28/45 (62.2%) were BDQ-S by MGIT; 2/28 (7.1%) had *Rv0678* RAVs, and 26/28 (92.9%) were wild type for *Rv0678*. These data show that a BDQ BMD MIC of 0.25 $\mu\text{g/ml}$ cannot consistently define *M. tuberculosis* clinical isolates as either phenotypically BDQ-S or BDQ-R by MGIT. Similarly, a BDQ BMD MIC of 0.25 $\mu\text{g/ml}$ cannot consistently define *M. tuberculosis* clinical isolates as either genotypically BDQ-S or BDQ-R based on *Rv0678* as a marker. Thus, a BDQ BMD MIC of 0.25 $\mu\text{g/ml}$ fits the typical definition of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) area of technical uncertainty (ATU) or CLSI intermediate (I) category, although these proposed breakpoint categories are yet to be validated or approved for mycobacteria. Similar trends were seen for BDQ AD; however, the correlation between BDQ AD MIC and MGIT was weaker.

BDQ BMD MIC distribution and ECV for MDR-TB isolates. The BDQ BMD MIC distribution for all MDR-TB isolates was unimodal, with a trailing tail and a peak of 0.03 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 2A), which was similar to the H37Rv MIC distribution (Fig. 1A). The BDQ BMD MIC distribution delineated an ECV of 0.12 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 2A, indicated by S), which was consistent with the 97.5% ECV (0.125 $\mu\text{g/ml}$) determined from ECOFFinder (Fig. 2B) and previous findings (27). Based on this analysis, 2.2% of isolates had MICs above the ECV.

BDQ AD MIC distribution and ECV for MDR-TB isolates. ECOFFinder-derived ECVs at the 97.5% rate were identical for 7H10 and 7H11 agar (0.25 $\mu\text{g/ml}$). Hence, these were combined and analyzed as agar. The BDQ AD MIC distribution for all MDR-TB resistance isolates was uniform, with a trailing tail and a peak at 0.06 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 3A), which was the same for the H37Rv distribution (Fig. 1B). An ECV of 0.25 $\mu\text{g/ml}$ was determined from the histogram (Fig. 3A, indicated by S), which was consistent with the 97.5% ECV (0.25 $\mu\text{g/ml}$) determined from ECOFFinder (Fig. 3B), confirming previous findings (27). Based on this analysis, 1.2% of isolates had MICs above the ECV. MIC distribution by agar type and by country is shown in Table S2 in the supplemental material.

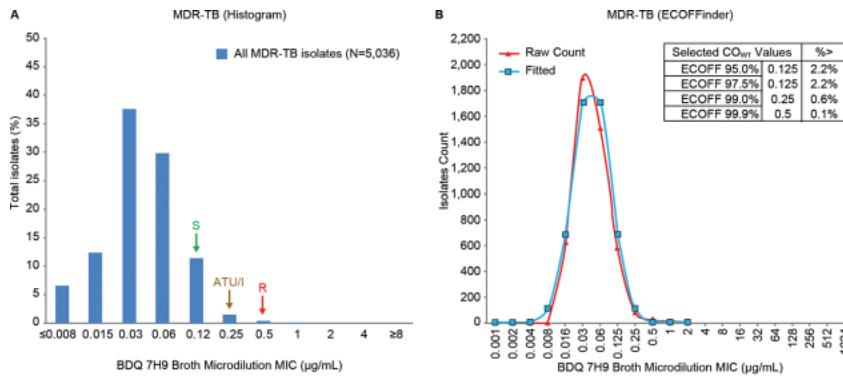


FIG 2 Bedaquiline 7H9 broth microdilution MIC distribution for MDR-TB clinical isolates. Susceptible (S), area of technical uncertainty (ATU)/intermediate (I), and resistant (R) breakpoints are indicated by arrows.

Definitive interpretive criteria for BDQ phenotypic DST. Based on data from the current study, the QC parameter for BDQ AD MIC is unchanged compared to the Tier-2 study (25). However, from the current data set the QC range is 0.015 to 0.12 $\mu\text{g/ml}$ for the BDQ BMD (Table 1). Based on the totality of the data from this study and the EQA study (27), ECVs for BDQ are 0.12 $\mu\text{g/ml}$ (BMD assay) and 0.25 $\mu\text{g/ml}$ (AD assay) (Table 2). Confirmatory pDST by MGIT and WGS resulted in an ATU of 0.25 $\mu\text{g/ml}$ (BMD assay) and 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (AD assay).

A correlation between BDQ MICs by AD and BMD methods showed an essential agreement of 85%, below the 90% threshold for the methods to be considered essentially identical (37).

An analysis of categorical agreement of BDQ AD and BMD MIC breakpoints, for all isolates having AD and BMD data available ($N = 4,614$) using the error-rate-bound method (Fig. 4), showed that false resistant rates (major error), false susceptible rates (very major error), and minor errors driven by ATU/I are below the CLSI acceptability rates (37).

BDQ MIC₉₅ and ECV-based resistance profile. The BDQ BMD MIC range for all MDR-TB resistance subtypes combined ($N = 5,036$) was ≤ 0.008 to 2 $\mu\text{g/ml}$, although a single isolate with a MIC of 2 $\mu\text{g/ml}$ was identified. Applying the 0.12 $\mu\text{g/ml}$ breakpoint

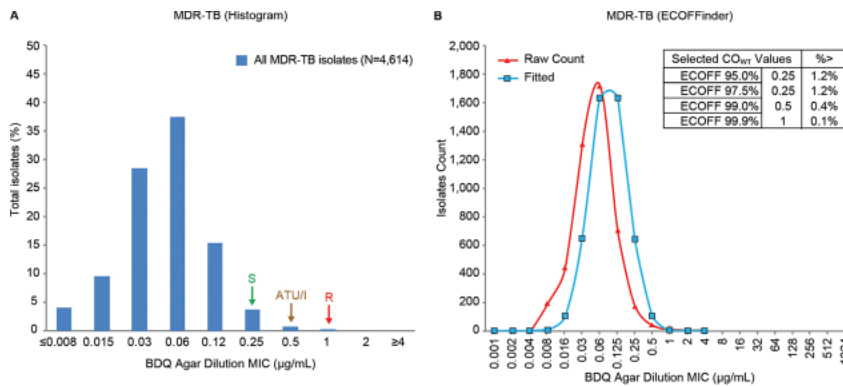


FIG 3 Bedaquiline agar dilution MIC distribution for MDR-TB clinical isolates. Susceptible (S), area of technical uncertainty (ATU)/intermediate (I), and resistant (R) breakpoints are indicated by arrows.

TABLE 1 Tier-3 bedaquiline quality control parameters for H37Rv with the 7H9 broth microdilution and agar dilution methods

Bacterium	BDQ MIC ($\mu\text{g/ml}$) by test medium	
	7H9 broth	7H10/7H11 agar
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	0.015–0.12	0.015–0.12

to the final dataset, BDQ-S, BDQ ATU/I, and BDQ-R of all MDR-TB isolates combined were 97.9%, 1.5%, and 0.6%, respectively (Table 3).

The BDQ AD MIC range for all MDR-TB resistance subtypes combined ($N = 4,614$) was ≤ 0.008 to $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ with a MIC required to inhibit the growth of 90% (MIC_{90}) and 95% (MIC_{95}) of *M. tuberculosis* isolates of $0.12 \mu\text{g/ml}$. The MIC_{95} was $0.12 \mu\text{g/ml}$ for MDR_{H37R}-TB and pre-XDR_S-TB and $0.25 \mu\text{g/ml}$ for pre-XDR_{FG}-TB and XDR-TB isolates (Table 3). Figure S2 shows there were no trends for decreased BDQ susceptibility against MDR-TB isolates over a 5-year time period from 2015 to 2019.

Assessment of resistance to fluoroquinolones, second-line injectables and other anti-TB drugs (BMD MIC method). (i) Tier 3-QC values for the drugs tested.

Overall, the number of repeats of the drugs tested against *M. tuberculosis* H37Rv was higher than the Tier-2 QC ranges (26) (539 versus 211). For most drugs, the frequencies of distribution were still $>95\%$. QC ranges were adjusted for 4/11 drugs (Table 4, in boldface) compared with the Tier-2 QC ranges (26).

(ii) Fluoroquinolone resistance profile. Ofloxacin (OFX), levofloxacin (LVX), and moxifloxacin (MXF) MIC distributions for all MDR-TB resistance subtypes combined were bimodal (Fig. S3A to C). For the fluoroquinolone resistance profile, MDR_{H37R}-TB represents the wild-type population and XDR-TB the resistant population; thus, the use of ECOFFinder was deemed unnecessary. Resultant ECVs were $2 \mu\text{g/ml}$, $1 \mu\text{g/ml}$, and $0.5 \mu\text{g/ml}$ for OFX, LVX, and MXF, respectively, which are in line with the *in vitro* and *in vivo* potency of the fluoroquinolones ($\text{OFX} < \text{LVX} < \text{MXF}$) (Table S3).

(iii) Second-line injectable resistance profile. MIC distributions for KAN, amikacin (AMI), and CAP (Fig. S3D to F) all displayed a bimodal distribution profile. As for fluoroquinolones, the wild-type population (MDR_{H37R}-TB) was clearly separated from the resistant population (XDR-TB), so ECOFFinder was not used.

For KAN, AMI, and CAP, ECVs of $4 \mu\text{g/ml}$, $2 \mu\text{g/ml}$, and $4 \mu\text{g/ml}$, respectively, delineated the wild-type population from the non-wild-type population, with nearly 100% coverage of MDR_{H37R}-TB and pre-XDR_{FG}-TB (Table S4).

(iv) Linezolid and clofazimine resistance profile. The MIC distributions for LZD and CFZ (Fig. S3G and H) were not bimodal. The trailing MICs at the upper end of the distributions made it difficult to pinpoint an ECV for both drugs. The probable ECVs of $2 \mu\text{g/ml}$ and $0.5 \mu\text{g/ml}$ were set for LZD and CFZ, respectively (Table S5). LZD-sensitive and clofazimine-sensitive (CFZ-S) rates of MDR-TB clinical isolates determined from the histograms were 98.5% and 98%, respectively (Table S5).

Because of the trailing MIC issues and the fact that no resistance subtypes were pre-defined for LZD and CFZ, the ECOFFinder tool was used to derive ECVs of $2 \mu\text{g/ml}$ for LZD and $0.25 \mu\text{g/ml}$ for CFZ at 97.5% cutoff, which were identical and lower, respectively, than values determined by the histogram (Table S5). However, the ECOFFinder-derived ECV for CFZ would split the normal MIC, so an ECV of $0.5 \mu\text{g/ml}$ was selected based upon the histogram, corresponding to 99% coverage by the ECOFFinder.

TABLE 2 Definitive bedaquiline interpretive criteria by the 7H9 broth microdilution and agar dilution methods

Test medium	BDQ MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	S	ATU/I	R
7H9 broth	≤ 0.12	0.25	≥ 0.5
7H10/7H11 agar	≤ 0.25	0.5	≥ 1

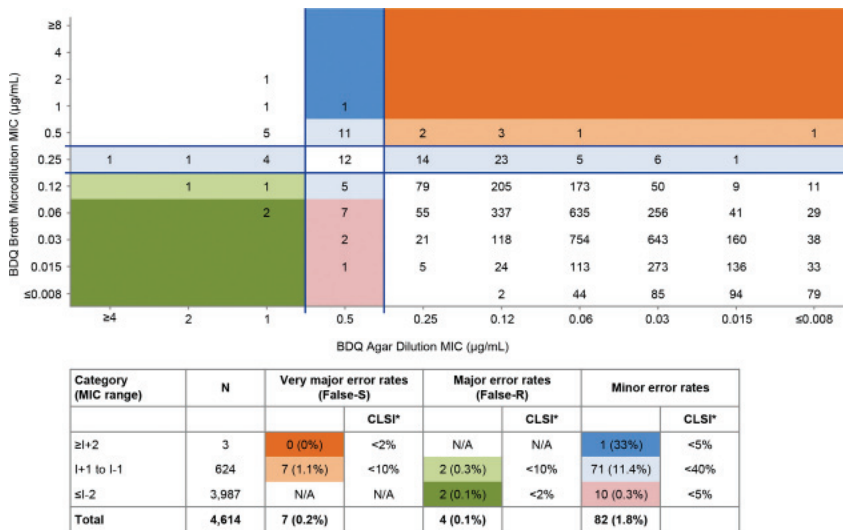


FIG 4 Categorical analysis of bedaquiline breakpoints using the error-rate-bound method. CLSI* indicates guidelines acceptable discrepancy rates (37), NA, not applicable; R, resistant; S, susceptible; I, intermediate. BDQ broth MIC S and R categories are indicated below the lower horizontal line and above the upper horizontal line, respectively. The BDQ agar MIC S and R categories are indicated to the right of the right-hand vertical line and to the left of the left-hand vertical line, respectively. The very major error rates (false susceptible by the agar method) are calculated in the upper right quadrant, where category $\geq I + 2$ is highlighted in dark orange and category $I + 1$ to $I - 1$ is highlighted in light orange. The major error rates (false resistant by the agar method) are calculated in the lower left quadrant, where category $I + 1$ to $I - 1$ is highlighted in light green and category $\leq I - 2$ is highlighted in dark green. The minor error rates are calculated between the parallel lines, where category $\geq I + 2$ is highlighted in dark blue, category $I + 1$ to $I - 1$ is highlighted in light blue, and category $\leq I - 2$ is highlighted in pink.

(v) **Proposed breakpoints for other TB drugs against MDR-TB by the 7H9 broth microdilution MIC method.** The ECVs determined for fluoroquinolones, second-line injectables, LZD, and CFZ are summarized in Table 5 by the BMD MIC method.

(vi) **Contribution of countries' BDQ-, CFZ-, and LZD-resistant isolates in the XDR-TB subsets.** As the overall resistance rate of XDR-TB isolates to BDQ (3.0% [19/635]) was 2.5 times lower than to CFZ (7.4% [47/635]) and LZD (7.4% [47/635]), we investigated whether there may be country-specific differences in the prevalence of resistance to BDQ, CFZ, and LZD. Overall, 11/19 (57.9%) and 5/19 (26.3%) isolates resistant to BDQ originated from South Africa and Lithuania, respectively, with 13/47 (27.7%) and 32/47 (68.1%) isolates resistant to CFZ, respectively, originating from these countries. For LZD, 22/47 (46.8%) and 12/47 (25.5%) isolates resistant to LZD originated from Thailand and South Africa, respectively.

Evaluation of potential cross-resistance between BDQ and CFZ, coreistance to BDQ and LZD, and coreistance to CFZ and LZD. (i) **Cross-resistance between BDQ and CFZ.** Applying the putative breakpoints defined as ECVs in this study, the potential one-way cross-resistance between BDQ and CFZ was 1.7% (85/5036) BDQ-S and clofazimine resistant (CFZ-R) in the MDR-TB population and 1.8% (89/5036) were CFZ-S and BDQ-R. In the total MDR-TB population, 16.8% (18/107) of the BDQ-R subpopulation was CFZ-R, and 17.5% (18/103) of the CFZ-R subpopulation was BDQ-R. In the pre-XDR-TB/XDR-TB population, proportions were 24% (12/50) and 16.4% (12/73), respectively. Two-way cross-resistance between BDQ and CFZ in the total MDR-TB population was 0.4% (18/5,036) and in the pre-XDR-TB/XDR-TB subset was 1.0% (12/2,067). Scattergrams of BDQ MICs versus CFZ MICs indicated a poor correlation of any cross-resistance in both all MDR-TB isolates ($N = 5,036$; Pearson correlation coefficient R value of 0.071) and pre-XDR- and XDR-TB isolates ($N = 2,067$; R value of 0.0529) (Fig. 5).

TABLE 3 Bedaquiline MICs against *M. tuberculosis* isolates based on subtypes of resistance to other antituberculous drugs^d

Resistance subtype and DST medium	N	BDQ MIC (µg/ml)				Susceptibility (%)		
		MIC range	MIC ₉₀	MIC ₉₅	ECV	S	ATU/I	R
7H9 broth								
DS-TB	137	≤0.008–0.5	0.12	0.12	0.12	97.8	1.5	0.7
MDR-TB (all)	5,036	≤0.008–2	0.12	0.12	0.12	97.9	1.5	0.6
MDR _{H46R} -TB	2,969	≤0.008–0.5	0.12	0.12	0.12	98.1	1.6	0.3
pre-XDR _{R150} -TB	1,155	≤0.008–1	0.12	0.12	0.12	97.9	1.2	0.8
pre-XDR _{S1} -TB	277	≤0.008–0.5	0.12	0.12	0.12	98.2	1.1	0.7
XDR-TB	635	≤0.008–2	0.12	0.12	0.12	97.0	1.7	0.9
Agar								
DS-TB	100	≤0.008–0.12	0.06	0.12	0.25	100		0
MDR-TB (all)	4,614	≤0.008–≥4	0.12	0.12	0.25	98.8	0.8	0.4
MDR _{H46R} -TB	2,640	≤0.008–1	0.12	0.12	0.25	99.0		1
pre-XDR _{R150} -TB	1,103	≤0.008–1	0.12	0.25	0.25	99.0		1.0
Pre-XDR _{S1} -TB	256	≤0.008–1	0.12	0.12	0.25	98.8		1.2
XDR-TB	615	≤0.008–≥4	0.12	0.25	0.25	97.6		2.4

^dDST, drug susceptibility testing; DS-TB, drug-susceptible tuberculosis; ECV, epidemiological cutoff value; MDR_{H46R}-TB, MDR-TB limited to isoniazid and rifampin resistance; MIC₉₀, MIC required to inhibit the growth of 90% of *M. tuberculosis* isolates; MIC₉₅, MIC required to inhibit the growth of 95% of *M. tuberculosis* isolates; pre-XDR_{R150}-TB, pre-extensively drug (fluoroquinolone)-resistant tuberculosis (MDR-TB with resistance to any fluoroquinolone); pre-XDR_{S1}-TB, pre-extensively drug (second-line injectable)-resistant tuberculosis (MDR-TB with resistance to any second-line injectable); XDR-TB, extensively drug-resistant tuberculosis (MDR-TB with resistance to any fluoroquinolone and any second-line injectable).

(ii) **Coreistance to BDQ and LZD and to CFZ and LZD.** As BDQ and LZD have been elevated to WHO group A and CFZ to group B, we determined the level of coreistance to BDQ and LZD and to CFZ and LZD. As expected, coreistance to BDQ and LZD (0.1% [5/5,036] in the total MDR-TB population and 0.2% [5/2,067] in the pre-XDR-TB/XDR-TB subset) was very low. Coreistance to CFZ and LZD in the respective populations (0.3% [14/5,036] and 0.4% [9/2,067]) was also very low. Simultaneous resistance to BDQ, CFZ, and LZD was seen in 3/5,036 isolates (0.06%), all from South Africa (2 XDR-TB from Eastern Cape, 1 XDR-TB from Gauteng).

DISCUSSION

The DREAM study was a prospective *in vitro* study conducted in 11 countries over a 5-year period after BDQ approval to determine the level of susceptibility of MDR-TB isolates to BDQ using the MIC pDST methodology. As expected, based on both BMD and AD methods, high susceptibility rates (≥97%) of MDR-TB, pre-XDR-TB, and XDR-TB isolates to BDQ were seen, since the isolates in this study were recovered from BDQ treatment-naïve patients. There were no changes in BDQ susceptibility against MDR-TB isolates based on BDQ BMD MIC distribution over 5 years.

The study determined that the BDQ agar dilution MIC QC range for the H37Rv strain is unchanged (0.015 to 0.12 µg/ml) compared with the Tier-2 study (25) and identified

TABLE 4 QC parameters for other TB drugs for H37Rv by the 7H9 broth microdilution MIC method

Drug name	Drug abbreviation	Tier-2 QC range ^a (µg/ml)	% Repeats within Tier-2 QC range	Tier-3 QC range ^b (µg/ml)	% Repeats within Tier-3 QC range
Rifampicin	RMP	0.03–0.25	93.5	0.03–0.5	99.1
Isoniazid	INH	0.03–0.12	95.4	0.03–0.12	95.4
Ethambutol	EMB	0.25–2	94.4	0.5–4	96.7
Ofloxacin	OFX	0.25–2	97.2	0.25–2	97.2
Levofloxacin	L VX	0.12–1	99.6	0.25–1	98.7
Moxifloxacin	MXF	0.06–0.5	97.6	0.06–0.5	97.6
Kanamycin	KAN	0.25–2	49.7	0.5–4	98.3
Amikacin	AMI	0.25–2	98.1	0.25–2	98.1
Capreomycin	CAP	0.5–4	97.0	0.5–4	97.0
Linezolid	LZD	0.25–2	99.8	0.25–2	99.8
Clofazimine	CFZ	0.03–0.25	83.7	0.03–0.25	83.7

^aData are from Kaniga et al. (26).

^bTier-3 QC ranges in boldface indicate those revised compared with the Tier-2 QC ranges (26).

TABLE 5 Proposed interpretive criteria for other TB drugs based on ECVs for MDR-TB isolates by the 7H9 broth microdilution method^a

Drug name	Drug abbreviation	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
		S	R
Rifampicin	RMP	NA	NA
Isoniazid	INH	NA	NA
Ethambutol	EMB	NA	NA
Ofloxacin	OFX	2	4
Levofloxacin	LVX	1	2
Moxifloxacin	MXF	0.5	1
Kanamycin	KAN	4	8
Amikacin	AMI	2	4
Capreomycin	CAP	4	8
Linezolid	LZD	2	4
Clofazimine	CFZ	0.5	1

^aECV, epidemiological cutoff value; NA, not applicable because only MDR-TB isolates were tested.

a new BDQ BMD MIC QC range of 0.015 to 0.12 $\mu\text{g/ml}$. Based on this study and the EQA study (27), BDQ ECVs are 0.12 $\mu\text{g/ml}$ for the BMD MIC and 0.25 $\mu\text{g/ml}$ for the AD MIC. These breakpoints are consistent with putative values determined in the phase 2 BDQ studies (7, 8), although these studies included a limited number of patients with high-MIC isolates. It is important to note that ECVs are not the same as clinical breakpoints, which are a combination of the microbiological cutoff, pharmacokinetic parameters, pharmacokinetic/pharmacodynamic cutoff (PC), and CC.

Given the essential agreement of 85%, this study also confirms previous findings that AD and BMD pDST are not identical for BDQ (25), which justifies the different interpretive criteria for those methods. Categorical analysis of BDQ breakpoints using the error rate-bound method demonstrated that when performing BDQ pDST by the AD method, some isolates may be falsely reported as sensitive to BDQ when in fact they might be phenotypically resistant. Hence, when isolates are reported as BDQ sensitive by the AD MIC method and the MIC is close to the ECV of 0.25 $\mu\text{g/ml}$, it is recommended that one repeats BDQ pDST by the MGIT method, which is the most reliable pDST method for BDQ.

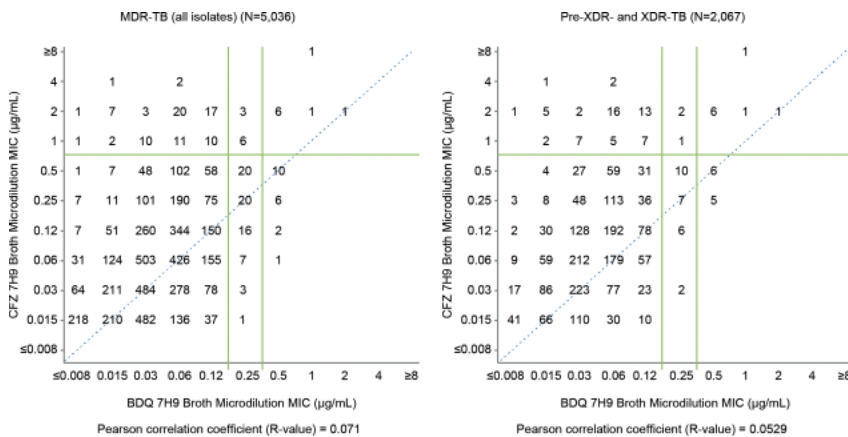


FIG 5 Cross-resistance between bedaquiline and clofazimine. Pre-XDR-TB, pre-extensively drug-resistant tuberculosis (MDR-TB with resistance to any fluoroquinolone or second-line injectable); XDR-TB, extensively drug-resistant tuberculosis (MDR-TB with resistance to any fluoroquinolone and any second-line injectable).

The prevalence of phenotypic cross-resistance between BDQ and CFZ in the current study was very low, only 0.4% in 5,036 isolates from a BDQ- and CFZ-naive overall MDR-TB population and only 1% in the pre-XDR-TB/XDR-TB subset. Although the risk for emergence of resistance should not be dismissed, currently available clinical data support this observation. A recent study found no statistical correlation between CFZ and BDQ MICs (38). Patients treated with BDQ-containing regimens achieved a comparable sputum culture conversion rate regardless of baseline CFZ susceptibility. In addition, baseline CFZ resistance had no influence on time to culture conversion in their cohort. Acquired CFZ resistance emerged in 8/94 cases, 8.5%, during treatment for MDR-TB, and 5/8 CFZ-R cases achieved culture conversion by completing 24 weeks of therapy containing BDQ (38).

While small *in vitro* and clinical studies have shown BDQ-CFZ cross-resistance and raised concerns that the effectiveness of BDQ against MDR-TB could be impaired when *Rv0678* RAVs are found (14, 20–23), adequately powered studies, such as our current study, with large numbers of patients have increasingly shown evidence of BDQ overcoming cross-resistance to CFZ, achieving more satisfactory clinical outcomes in treating MDR-TB patients. At this time, there are insufficient data from adequately sized clinical studies or treatment cohorts that indicate that the presence of *Rv0678* RAVs consistently leads to poor clinical outcome. Previous data indicate that *Rv0678* RAVs are not associated with prior BDQ or CFZ use, may not lead to elevated BDQ MICs above the breakpoint (≥ 0.25 $\mu\text{g/ml}$), and may not be correlated with increased microbiologic failures (18, 21, 39). In another recent study (40), 6/277 (2.2%) patients had BDQ phenotypically resistant isolates prior to receiving BDQ; sputum culture conversion was achieved in 5/6 patients, and 3/6 harbored *Rv0678* RAVs. Existing mutations in the *Rv0678* gene did not predict poor outcome in this limited data set. This issue is further confounded when *Rv0678* is also found in BDQ phenotypically susceptible isolates, as shown in Liu et al. (40) and the current study. In our study, for isolates with BDQ BMD MIC of 0.25 $\mu\text{g/ml}$, 37.8% were BDQ-R by MGIT, among which 58.8% had *Rv0678* RAVs and 41.2% were wild type for *Rv0678*. The remaining 62.2% were BDQ-S by MGIT, among which 7.1% had *Rv0678* RAVs and 92.9% were wild type for *Rv0678*. Further investigating the use of *Rv0678* as a genetic marker for resistance prediction should be prioritized. Meanwhile, based upon the totality of available data, we propose that the presence of *Rv0678* mutations cannot be used to make clinical decisions to initiate or halt BDQ treatment. When *Rv0678* mutations are found during treatment, we suggest MGIT pDST should be performed, and the patients' clinical presentation should be the guiding principle for clinicians.

Our study suggests that prior BDQ use may not explain the origin of *Rv0678* RAVs as all patients were BDQ treatment naive, and prior use of CFZ may not be the main reason for the presence of these mutations in the MDR-TB population. Their origin remains unknown (18), although spontaneous mutations are sometimes observed in the absence of drugs. Prior CFZ use should also not be used to exclude BDQ treatment. Development of resistance is expected for any antimicrobial drug, especially when the drug is given in inappropriate or weak regimens. Importantly, the criterion that should be relied upon currently to inform decisions for an appropriate regimen is the phenotypic resistance to BDQ or CFZ.

The prevalence of coreistance to BDQ and LZD and to CFZ and LZD was also very low in both the overall MDR-TB and pre-XDR-TB/XDR-TB populations. Previous studies have not found specific mutations associated with resistance to BDQ and LZD (19, 41, 42) or resistance to CFZ and LZD (22, 42).

Our study also determined that for 4 out of the 11 other anti-TB drugs (rifampicin, ethambutol, LVX, and KAN) evaluated in this study, adjustments were required for the Tier-2 study MIC QC ranges (26). Overall, the ECVs for the fluoroquinolones and second-line injectables tested in our study correlated well with results reported in a single-country (South Africa) study using the Sensititre BMD assay (43), except for KAN (4 versus 8 $\mu\text{g/ml}$, respectively) and CFZ (0.5 versus 0.25 $\mu\text{g/ml}$, respectively). The ECV for

KAN in the South African study may be higher due to more XDR-TB isolates and identified *eis* mutations than in our study samples. The difference for CFZ ECV between the studies may be explained by the trailing MIC in our study and, as such, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ could be considered a conservative option. Although the resistance rates of XDR-TB to KAN, AMI, and CAP were slightly lower than those for the fluoroquinolones in our study, use of second-line injectables was deprioritized in the most recent WHO guidelines (44). Resistance rates to LZD and CFZ were low and similar to those of BDQ.

The overall number of XDR-TB isolates resistant to BDQ, CFZ, or LZD was low. Nonetheless, there seemed to be a trend for resistance to BDQ and CFZ in South Africa and Lithuania and for resistance to LZD in South Africa and Thailand. In South Africa, these observations may be explained by the history of BDQ, CFZ, and LZD use through the BDQ Compassionate Use Access Program and the National TB Treatment Guidelines. At the time of the study CFZ was not used in Lithuania, so the origin of the high CFZ resistance rate in the XDR-TB isolates is unknown. In Thailand, LZD has been used in the country for approximately 15 years in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* treatment, although this use is considered unlikely to have an impact on *M. tuberculosis*, as the treatment is usually of short duration. The trend for higher resistance in XDR-TB remains unexplained. The possibility of inaccurate ECVs, leading to some XDR isolates being falsely reported as phenotypically resistant to BDQ, CFZ, or LZD, cannot be ruled out.

One limitation of the study was that it only included BDQ treatment-naïve patients. This would have allowed for comparison of the MIC QC ranges and ECVs for BDQ in DREAM with those obtained previously in the Tier-2 study (25, 26; see also the supplemental material) and EQA study (27), respectively. Inclusion of isolates from patients who had failed on a BDQ treatment regimen and were clinically resistant to BDQ would also have enabled the comparison of the MIC values of these resistant strains to those from BDQ treatment-naïve patients. Another limitation is that it was not possible to demonstrate the origin of the high CFZ-R rate in XDR-TB isolates in Lithuania. While clustered analyses and repeat DST at another center/country may have answered this question, it was beyond the scope of the study, as no genotyping was initially planned as part of the protocol.

In conclusion, resistance rates to BDQ in the period 2015 to 2019 appeared to be low in the BDQ treatment-naïve population, as expected given the early phase of drug introduction to the market. Moreover, no treatment-limiting patterns for cross-resistance were identified with key TB drugs to date. Core-resistance to BDQ and LZD and to CFZ and LZD were very low in the populations tested. In addition to clinical criteria, pDST testing remains a relevant approach for informing treatment decisions.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.8 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the staff in the respective laboratories that provided the necessary support for the successful completion of the study. Rumina Hasan thanks Sadia Shakoor, Joveria Farooqi, Sarah Baber, Zahida Azizullah, and Zabin Wajidali for their contributions to the study. Nazir Ismail thanks the staff of the Centre for Tuberculosis for their contribution to the study, in particular, Dumisani Ngcamu, Lavania Joseph, Netricia Govender, and Thabisile Gwala. Ruwen Jou thanks Wan-Hsuan Lin and Hsin-Hua Chan for their technical support of this study. Beverly Metchock thanks R. David Sikes for his contribution to this study. We also thank Ashok Kumar Kondapalli and Natalie Khutoryansky for statistical analyses and Chrispin Kambili and other Janssen staff members for their input into the manuscript. We acknowledge Ian Woolveridge (Ashfield MedComms, an Ashfield Health company, Macclesfield, United Kingdom) for assistance in drafting the manuscript and coordinating and collating author contributions, which was funded by Janssen.

The data sharing policy of Janssen Pharmaceutical Companies of Johnson & Johnson is available at <https://www.janssen.com/clinical-trials/transparency>. As noted on this

site, requests for access to the study data can be submitted through Yale Open Data Access (YODA) Project site at <http://yoda.yale.edu>. This study was sponsored by Janssen Research & Development. The Centers for Disease Control and Prevention did not receive funds for this study.

Koné Kaniga is a full-time employee of Janssen and potential stockholder of Johnson and Johnson. Rumina Hasan has received funding for study activities from Janssen Pharmaceutica, NV. Nazir Ismail has received funding from Janssen Pharmaceutica for surveillance activities related to bedaquiline. Ruwen Jou has received funding for the bedaquiline DST study from Oxford University. Skaidrius Miliauskas, Greta Musteikiene, Edita Vasiliauskienė, and Laima Vasiliauskaitė received fees for the participation in the DREAM study. Nguyen Viet Nhung has received funding from Janssen Pharmaceutica for study activities. Camilla Rodrigues has no relevant disclosures relating to *M. tuberculosis* but has received honorarium as a speaker and for ad boards from Pfizer, MSD, Astra Zeneca, Cipla, Glenmark, Sanofi, and Aventis. Hulya Simsek has conducted this study as the principal investigator in Turkey. Anh Le Thi Ngoc has received funding from Janssen Pharmaceutica for study activities. Jirakan Boonyasopun has received funding for study activities from Janssen Pharmaceutica. Shaheed Vally Omar has received funding to prepare and provide training for Janssen Pharmaceutica activities. Catherine Ann Sacopon has received funding for study activities from Janssen Pharmaceutica. Mei-Hua Wu has received funding for study activities from Oxford University. Charoen Chuchottaworn, Beverly Metchock, Soyoun Shin, Sajjai Smithitkarn, Mubin Kazi, Seungmo Kim, Phalin Kamolwat, and Sabira Tahseen report no disclosures.

The findings and conclusions in this report are those of the author(s) and do not necessarily represent the views of the Centers for Disease Control and Prevention.

All authors substantially contributed to the study's design and protocol and execution of the work described. All authors were involved in the development of the primary manuscript and interpretation of the data and have read and approved the final version and met the criteria for authorship as established by the ICMJE.

This study was sponsored by Janssen Research & Development.

REFERENCES

1. WHO. 2019. Global tuberculosis report 2019 (WHO/CDS/TB/2019.15). World Health Organization, Geneva, Switzerland. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329368/9789241565714-eng.pdf?ua=1>.
2. WHO. 2008. Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs. WHO, Geneva, Switzerland. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70500/WHO_HTM_TB_2008.392_eng.pdf?sessionid=49AA6A25FEA4412ED78CF83D189505EA?sequence=1.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2018. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes. CLSI document M24; approved standards, 3rd ed. CLSI, Wayne, PA.
4. WHO. 2018. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. WHO/CDS/TB/2018.24. WHO, Geneva, Switzerland. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275469/9789241514842-eng.pdf?ua=1>.
5. World Health Organization. 2018. Technical report on critical concentrations for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant tuberculosis. WHO/CDS/TB/2018.5. WHO, Geneva, Switzerland. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/260470>.
6. Andries K, Verhasselt P, Guillemont J, Göhlmann HW, Neefs JM, Winkler H, Van Gestel J, Timmerman P, Zhu M, Lee E, Williams P, de Chaffoy D, Huitric E, Hoffner S, Cambau E, Truffot-Pernot C, Lounis N, Jarlier V. 2005. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 307:223–227. <https://doi.org/10.1126/science.1106753>.
7. Diacon AH, Pym A, Grobusch MP, de los Rios JM, Gotuzzo E, Vasilyeva I, Leimane V, Andries K, Bakare N, De Marex T, Haxaire-Theeuwes M, Lounis N, Meyvisch P, De Paepe E, van Heeswijk R, Dannemann B, TMC207-C208 Study Group. 2014. Multidrug-resistant tuberculosis and culture conversion with bedaquiline. *N Engl J Med* 371:723–732. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1313865>.
8. Pym AS, Diacon AH, Tang S-J, Conradie F, Danilovits M, Chuchottaworn C, Vasilyeva I, Andries K, Bakare N, De Marex T, Haxaire-Theeuwes M, Lounis N, Meyvisch P, Van Baelen B, van Heeswijk R, Dannemann B, TMC207-C208 Study Group. 2016. Bedaquiline in the treatment of multidrug- and extensively drug-resistant tuberculosis. *Eur Respir J* 47:564–574. <https://doi.org/10.1183/13993003.00724-2015>.
9. Guglielmetti L, Hewison C, Avaliani Z, Hughes J, Kiria N, Lomtadze N, Ndjeka N, Setkina S, Shabangu A, Sikhondze W, Skrahina A, Veziris N, Furin J. 2017. Examples of bedaquiline introduction for the management of multidrug-resistant tuberculosis in five countries. *Int J Tuberc Lung Dis* 21:167–174. <https://doi.org/10.5588/ijtld.16.0493>.
10. Olayanju O, Limberis J, Esmail A, Oelofse S, Gina P, Pietersen E, Fadul M, Warren R, Dheda K. 2018. Long-term bedaquiline-related treatment outcomes in patients with extensively drug-resistant tuberculosis from South Africa. *Eur Respir J* 51:1800544. <https://doi.org/10.1183/13993003.00544-2018>.
11. Schnippel K, Ndjeka N, Maartens G, Meintjes G, Master I, Ismail N, Hughes J, Ferreira H, Padanilam X, Romero R, Te Riele J, Conradie F. 2018. Effect of bedaquiline on mortality in South African patients with drug-resistant tuberculosis: a retrospective cohort study. *Lancet Respir Med* 6:699–706. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30235-2](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30235-2).
12. Ahmad N, Ahuja SD, Akkerman OW, Alfenaar J-WC, Anderson LF, Baghaei P, Bang D, Barry PM, Bastos ML, Behera D, Benedetti A, Bisson GP, Boeree MJ, Bonnet M, Brode SK, Brust JCM, Cai Y, Caumes E, Cegielski JP, Centis R, Chan P-C, Chan ED, Chang K-C, Charles M, Cirule A, Dalcolmo MP, D'Ambrosio L, de Vries G, Dheda K, Esmail A, Flood J, Fox GJ, Fréchet-Jachym M, Fregona G, Gayoso R, Gegia M, Gler MT, Gu S, Guglielmetti L, Holtz TH, Hughes J, Isaakidis P, Jarlsberg L, Kempker RR, Keshavjee S, Khan FA, Kipiani M, Koenig SP, Koh W-J, Kritski A, Collaborative Group for the Meta-Analysis of Individual Patient Data in MDR-TB Treatment-2017, et al. 2018. Treatment correlates of successful outcomes in pulmonary

- multidrug-resistant tuberculosis: an individual patient data meta-analysis. *Lancet* 392:821–834. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31644-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31644-1).
13. Hultric E, Verhasselt P, Koul A, Andries K, Hoffner S, Andersson DI. 2010. Rates and mechanisms of resistance development in *Mycobacterium tuberculosis* to a novel diarylquinoline ATP synthase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 54:1022–1028. <https://doi.org/10.1128/AAC.01611-09>.
 14. Andries K, Villella C, Coeck N, Thys K, Gevers T, Vranckx L, Lounis N, de Jong BC, Koul A. 2014. Acquired resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to bedaquiline. *PLoS One* 9:e012135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120135>.
 15. Hartkorn RC, Uplekar S, Cole ST. 2014. Cross-resistance between clofazimine and bedaquiline through upregulation of MmpL5 in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 58:2979–2981. <https://doi.org/10.1128/AAC.00037-14>.
 16. Zhang S, Chen J, Cui P, Shi W, Zhang W, Zhang Y. 2015. Identification of novel mutations associated with clofazimine resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 70:2507–2510. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv150>.
 17. Almeida D, Ioeberg T, Tyagi S, Li SY, MdLuli K, Andries K, Grosset J, Sacchetti J, Nuermberger E. 2016. Mutations in p_{epC} confer low-level resistance to bedaquiline and clofazimine in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 60:4590–4599. <https://doi.org/10.1128/AAC.00753-16>.
 18. Villella C, Coeck N, Meehan CJ, Lounis N, de Jong B, Rigouts L, Andries K. 2017. Unexpected high prevalence of resistance-associated Rv0678 variants in MDR-TB patients without documented prior use of clofazimine or bedaquiline. *J Antimicrob Chemother* 72:684–690. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw502>.
 19. Zimenkov DV, Nosova EY, Kulagina EV, Antonova OV, Arslanbaeva LR, Isakova AI, Krylova LY, Peretokina IV, Makarova MV, Safonova SG, Borisov SE, Gryadunov DA. 2017. Examination of bedaquiline- and linezolid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Moscow region. *J Antimicrob Chemother* 72:1901–1906. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx094>.
 20. Ismail NA, Omar SV, Joseph L, Govender N, Blows L, Ismail F, Koornhof H, Dreyer AW, Kaniga K, Ndjeka N. 2018. Defining bedaquiline susceptibility, resistance, cross-resistance and associated genetic determinants: a retrospective cohort study. *EBioMedicine* 28:136–142. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.01.005>.
 21. Xu J, Wang B, Hu M, Huo F, Guo S, Jing W, Nuermberger E, Lu Y. 2017. Primary clofazimine and bedaquiline resistance among isolates from patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e00239-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00239-17>.
 22. Ismail N, Omar SV, Ismail NA, Peters RPH. 2018. In vitro approaches for generation of *Mycobacterium tuberculosis* mutants resistant to bedaquiline, clofazimine or linezolid and identification of associated genetic variants. *J Microbiol Methods* 153:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.08.011>.
 23. Ismail N, Peters RPH, Ismail NA, Omar SV. 2019. Clofazimine exposure in vitro selects efflux pump mutants and bedaquiline resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 63:e02141-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.02141-18>.
 24. Peretokina IV, Krylova LY, Antonova OV, Kholina MS, Kulagina EV, Nosova EY, Safonova SG, Borisov SE, Zimenkov DV. 2020. Reduced susceptibility and resistance to bedaquiline in clinical *M. tuberculosis* isolates. *J Infect* 80:527–535. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.01.007>.
 25. Kaniga K, Cirillo DM, Hoffner S, Ismail NA, Kaur D, Lounis N, Metchock B, Pfyffer GE, Venter A. 2016. A multilaboratory, multicountry study to determine bedaquiline MIC quality control ranges for phenotypic drug susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 54:2956–2962. <https://doi.org/10.1128/JCM.01123-16>.
 26. Kaniga K, Cirillo DM, Hoffner S, Ismail NA, Kaur D, Lounis N, Metchock B, Pfyffer GE, Venter A. 2016. A multilaboratory, multicountry study to determine MIC quality control ranges for phenotypic drug susceptibility testing of selected first-line antituberculosis drugs, second-line injectables, fluoroquinolones, clofazimine, and linezolid. *J Clin Microbiol* 54:2963–2968. <https://doi.org/10.1128/JCM.01138-16>.
 27. Kaniga K, Anono A, Borroni E, Cirillo DM, Desmaretz C, Hasan R, Joseph L, Mitarai S, Shakoors S, Torrea G, Ismail NA, Omar SV. 2020. Validation of bedaquiline phenotypic drug susceptibility testing methods and breakpoints: a multi-laboratory, multi-country study. *J Clin Microbiol* 58:e01677-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.01677-19>.
 28. Omar SV, Joseph L, Said HM, Ismail F, Ismail N, Gwala TL, Ismail NA. 2019. Whole genome sequencing for drug resistance determination in *Mycobacterium tuberculosis*. *Afr J Lab Med* 8:801. <https://doi.org/10.4102/ajlm.v8i1.801>.
 29. Coll F, Mallard K, Preston MD, Bentley S, Parkhill J, McNamee R, Martin N, Clark TG. 2012. SpolPred: rapid and accurate prediction of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes from short genomic sequences. *Bioinformatics* 28:2991–2993. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts544>.
 30. Turnidge J, Kahlmeter G, Kronvall G. 2006. Statistical characterization of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clin Microbiol Infect* 12:418–425. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01377.x>.
 31. Martin A, Camacho M, Portaels F, Palomino J. 2003. Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method. *Antimicrob Agents Chemother* 47:3616–3619. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.11.3616-3619.2003>.
 32. Martin A, Morcillo N, Lemus D, Montoro E, da Silva Telles MA, Simboli N, Pontino M, Porras T, León C, Velasco M, Chacon L, Barrera L, Ritacco V, Portaels F, Palomino JC. 2005. Multicenter study of MIT and resazurin assays for testing susceptibility to first-line anti-tuberculosis drugs. *Int J Tuberc Lung Dis* 9:901–906.
 33. Martin A, Palomino JC, Portaels F. 2005. Rapid detection of ofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by two low-cost colorimetric methods: resazurin and nitrate reductase assays. *J Clin Microbiol* 43:1612–1616. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.1612-1616.2005>.
 34. Martin A, Paasch F, Docx S, Fissette K, Imperiale B, Ribón W, González LA, Werngren J, Engström A, Skenders G, Juréen P, Hoffner S, Del Portillo P, Morcillo N, Palomino JC. 2011. Multicenter laboratory validation of the colorimetric redox indicator (CRI) assay for the rapid detection of extensively drug-resistant (XDR) *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 66:827–833. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq527>.
 35. Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. 2002. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 46:2720–2722. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.8.2720-2722.2002>.
 36. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 9th ed. CLSI document M07-A9. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
 37. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2016. Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters, 4th ed. CLSI guideline M23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
 38. Liu Y, Gao J, Du J, Shu W, Wang L, Wang Y, Xue Z, Li L, Xu S, Pang Y. 2021. Acquisition of clofazimine resistance following bedaquiline treatment for multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Infect Dis* 102:392–396. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.10.081>.
 39. Martinez E, Hennessy D, Jelfs P, Crighton T, Chen SC-A, Sintchenko V. 2018. Mutations associated with in vitro resistance to bedaquiline in *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Australia. *Tuberculosis (Edinb)* 111:31–34. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.04.007>.
 40. Liu Y, Gao M, Du J, Wang L, Gao J, Shu W, Wang Y, Xue Z, Li L, Pang Y. 2020. Reduced susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to bedaquiline during antituberculosis treatment and its correlation with clinical outcomes in China. *Clin Infect Dis* 73:e3391–e3397. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1002>.
 41. Yang JS, Kim KJ, Choi H, Lee SH. 2018. Delamanid, bedaquiline, and linezolid minimal inhibitory concentration distributions and resistance-related gene mutations in multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis in Korea. *Ann Lab Med* 38:563–568. <https://doi.org/10.3343/alm.2018.38.6.563>.
 42. Ismail N, Omar SV, Ismail NA, Peters RPH. 2018. Collated data of mutation frequencies and associated genetic variants of bedaquiline, clofazimine and linezolid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Data Brief* 20:1975–1983. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.09.057>.
 43. Ismail NA, Ismail F, Joseph L, Govender N, Blows L, Kaniga K, Omar SV. 2020. Epidemiological cut-offs for Sensititre susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*: interpretive criteria cross validate with whole genome sequencing. *Sci Rep* 10:1013. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57992-x>.
 44. World Health Organization. 2019. WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment. WHO, Geneva, Switzerland. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/311389/97892941550529-eng.pdf?ua=1>.

PRIEDAI



KAUNO REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, A. Mickevičiaus g. 9, LT 44307 Kaunas, tel. (+370) 37 32 68 89; el.paštas: kaunorbtek@ismuni.lt

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2015-10-09 Nr. BE-2-11

Biomedicininio tyrimo pavadinimas: „Tuberkuliozės mikobakterijų atsparumo vaistams ir kitų veiksmų, turinčių įtakos tuberkuliozės gydymo išeitims, tyrimas“	
Protokolo Nr.:	1
Data:	2015-09-03
Versija:	2
Asmens informavimo forma	Versija 3, 2015-03-05
Pagrindinis tyrėjas:	Prof. Skaidrius Miliauskas
Biomedicininio tyrimo vieta:	VšĮ LSMUL Kauno klinikos,
Įstaigos pavadinimas:	Pulmonologijos ir imunologijos klinika,
Adresas:	Eivenių g. 2, LT-50009, Kaunas

Išvada:

Kauno regioninio biomedicininis tyrimų etikos komiteto posėdžio, įvykusio 2015 m. spalio mėn. 9 d. (protokolo Nr. BE-10-9) sprendimu pritarta biomedicininio tyrimo vykdymui.

Mokslinio eksperimento vykdytojai įsipareigoja: (1) nedelsiant informuoti Kauno Regioninį biomedicininis Tyrimų Etikos komitetą apie visus nenumatytus atvejus, susijusius su studijos vykdymu, (2) iki sausio 15 dienos – pateikti metinį studijos vykdymo apibendrinimą bei, (3) per mėnesį po studijos užbaigimo, pateikti galutinį pranešimą apie eksperimentą.

Kauno regioninio biomedicininis tyrimų etikos komiteto nariai

Nr.	Vardas, Pavardė	Veiklos sritis	Dalyvavo posėdyje
1.	Prof. Romaldas Mačiulaitis	Klinikinė farmakologija	taip
2.	Prof. Edgaras Stankevičius	Fiziologija, farmakologija	taip
3.	Doc. Eimantas Peičius	Filosofija	taip
4.	Dr. Ramunė Kasperavičienė	Kalbotyra	ne
5.	Med. dr. Jonas Andriuskevičius	Chirurgija	taip
6.	Agnė Krušinskaitė	Teisė	ne
7.	Prof. Skaidrius Miliauskas	Pulmonologija, vidaus ligos	taip
8.	Med. dr. Rokas Bagdonas	Chirurgija	ne
9.	Eglė Vaižgelienė	Visuomenės sveikata	ne

Kauno regioninis biomedicininis tyrimų etikos komitetas dirba vadovaudamasis etikos principais nustatytais biomedicininis tyrimų Etikos įstatyme, Helsinkio deklaracijoje, vaistų tyrinėjimo Geros klinikinės praktikos taisyklėmis.

Pirmininkas



Prof. Romaldas Mačiulaitis



VALSTYBINĖ DUOMENŲ APSAUGOS INSPEKCIJA

Lietuvos sveikatos mokslų universitetui
A. Mickevičiaus g. 9, LT- 44307 Kaunas
(registr. laišku ir el.p. greta.musteikiene@gmail.com.)

SPRENDIMAS DĖL LEIDIMO LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETUI ATLIKTI ASMENS DUOMENŲ TVARKYMO VEIKSMUS

2015 m. lapkričio 10 d. Nr. 2R-6540 (2.6-1.)
Vilnius

Valstybinė duomenų apsaugos inspekcija, išnagrinėjusi Lietuvos sveikatos mokslų universiteto 2015-10-21 pateiktą Pranešimą dėl išankstinės patikros (toliau – Pranešimas) dėl asmens duomenų tvarkymo mokslinio medicininio tyrimo, tikslu ir 2015-11-04 raštu Nr. DVT2-1881 pateiktus patikslinimus (Inspekcijoje gauta 2015-10-21, reg. Nr. 1R-7145 ir 2015-11-09, reg. Nr. 1R-7645),

n u s t a t ė,

kad Pranešime ir patikslinimuose nurodyti asmens duomenų tvarkymo veiksmai atitinka Lietuvos Respublikos asmens duomenų teisinės apsaugos įstatyme nustatytus asmens duomenų tvarkymo ir duomenų subjektų teisių įgyvendinimo reikalavimus, bei numatytos tinkamos organizacinės ir techninės duomenų saugumo priemonės.

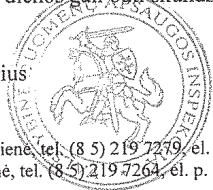
Valstybinė duomenų apsaugos inspekcija, vadovaudamasi Lietuvos Respublikos asmens duomenų teisinės apsaugos įstatymo 33 straipsniu, Valstybinės duomenų apsaugos inspekcijos direktoriaus 2006 m. vasario 2 d. įsakymu Nr. 1T-6 patvirtintų Išankstinės patikros atlikimo taisyklių 11 ir 18.1 punktais,

n u s p r e n d ž i a

Lietuvos sveikatos mokslų universitetui išduoti leidimą atlikti Pranešime ir patikslinimuose nurodytų asmens duomenų apie sveikatą tvarkymo mokslinio medicininio tyrimo „Tuberkuliozės mikobakterijų atsparumo vaistams ir kitų veiksnių, turinčių įtakos tuberkuliozės gydymo išeitims, tyrimas“, prot. Nr. 1, tikslu veiksmus.

Šis sprendimas Administracinių bylų teisenos įstatymo nustatyta tvarka per vieną mėnesį nuo jo įteikimo dienos gali būti skundžiamas Vilniaus apygardos administraciniam teismui.

Direktorius



dr. Algirdas Kunčinas

V. Perednienė, tel. (8 5) 219 7279, el. p. vanda.peredniene@ada.lt;
A. Gučienė, tel. (8 5) 219 7264, el. p. ausra.guciene@ada.lt

Biudžetinė įstaiga
A. Juozapavičiaus g. 6,
LT-09310 Vilnius

Tel. (8 5) 279 1445
Faks. (8 5) 261 9494
El. p. ada@ada.lt

Duomenys kaupiami ir saugomi
Juridinių asmenų registre
Kodas 188607912

**ST. GEORGE'S RESPIRATORY QUESTIONNAIRE
LITHUANIAN**

ŠV DŽORDŽO LIGONINĖS KLAUSIMYNAS APIE KVĖPAVIMO SUTRIKIMUS (SGRQ)

Šis klausimynas yra skirtas sužinoti daugiau, kiek Jus vargina kvėpavimo sutrikimai ir kiek tai turi įtakos Jūsų gyvenimui. Anketa padės nustatyti, kurie ligos aspektai sukelia Jums daugiausiai problemų, o ne ką gydytojai ir slaugytojos galvoja apie Jūsų problemas.

Prieš atsakydami į klausimus, atidžiai perskaitykite instrukcijas, jei ko nesuprantate, paklauskite. Per daug ilgai nedvejokite atsakydami į klausimus.

Prieš pradėdami atsakinėti į anketos klausimus:

Prašome pažymėti, kaip Jūs apibūdintumėte savo dabartinę sveikatos būklę (pažymėkite varnelę vieną langelį):

Labai gera	Gera	Vidutiniška	Bloga	Labai bloga
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Copyright reserved

P.W. Jones, PhD FRCP
Professor of Respiratory Medicine,
St. George's University of London,
Jenner Wing,
Cranmer Terrace,
London SW17 ORE, UK.

Tel. +44 (0) 20 8725 5371
Fax +44 (0) 20 8725 5955

Lithuania / Lithuanian version

1

f:\instytut\cui\adap\project\mk2188\etude2188\final\versions\author_word\sgrq\litq.doc-30/04/2004

Lithuanian SGRQ 3 months
Revised from English into Lithuanian by TransPerfect on 26JUL2013

tęsinys...

Šv. Džordžo ligoninės klausimynas apie kvėpavimo sutrikimus I DALIS

Klausimai apie per pastaruosius 3 mėnesius Jus varginusius kvėpavimo sutrikimus.

Prašome pažymėti varnele (✓) tik vieną
langelį prie kiekvieno klausimo:

- | | | beveik
kiekvieną
savaitės
dieną | keletą
dinių
per savaitę | keletą
dinių
per
mėnesį | tik esant
kvėpavimo
takų
infekcijai | nei
karto |
|----|--|--|--------------------------------|----------------------------------|--|--------------------------|
| 1. | Per pastaruosius 3 mėnesius kosėjau: | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. | Per pastaruosius 3 mėnesius atkosėdavau skreplių: | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. | Per pastaruosius 3 mėnesius man trūkdavo oro: | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 4. | Per pastaruosius 3 mėnesius švokščiančio dusulio priepuoliai mane buvo ištikę: | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 5. | Kiek per pastaruosius 3 mėnesius patyrėte stiprių ar labai nemalonių kvėpavimo sutrikimo priepuolių? | | | | | |

Prašome pažymėti varnele (✓) tik vieną langelį:

- daugiau nei 3 priepuolius
- 3 priepuolius
- 2 priepuolius
- 1 priepuolį
- priepuolių nebuvo

6. Kiek tęsėsi sunkiausias priepuolis?
(Jei sunkių priepuolių nebuvo, pereikite prie 7 klausimo)

Prašome pažymėti varnele (✓) tik vieną langelį:

- savaitę ar ilgiau
- 3 dienas ar ilgiau
- 1 ar 2 dienas
- trumpiau nei 1 dieną

7. Kiek per pastaruosius 3 mėnesius buvo gerų dienų per įprastą savaitę (kai kvėpavimo sutrikimai buvo nežymūs)?

Prašome pažymėti varnele (✓) tik vieną langelį:

- gerų dienų nebuvo
- 1 ar 2 geros dienos
- 3 ar 4 geros dienos
- beveik kiekviena diena buvo gera
- kiekviena diena buvo gera

8. Jei Jus vargina švokščiantis dusulys, ar jis stipresnis ryte Jums atsikėlus?

Prašome pažymėti varnele (✓) tik vieną langelį:

- Ne
- Taip

Šv. Džordžo ligoninės klausimynas apie kvėpavimo sutrikimus II DALIS

I skyrius

Kaip Jūs apibūdintumėte savo kvėpavimo būklę?

Prašome pažymėti varnele (✓) *tik vieną langelį*:

- Tai pats didžiausias mano rūpestis
- Sukelia man daug rūpesčių
- Sukelia man šiek tiek rūpesčių
- Nekelia man jokių rūpesčių

Jei Jūs kada nors dirbote:

Prašome pažymėti varnele (✓) *tik vieną langelį*:

- Turėjau atsisakyti darbo dėl kvėpavimo sutrikimų
- Kvėpavimo sutrikimai trukdo man dirbti ar privertė mane pakeisti darbą
- Kvėpavimo sutrikimai neturi įtakos mano darbui

II skyrius

Atsakykite, kokia veikla pastarosiomis dienomis Jums paprastai sukelia dusulį.

Prašome prie **kiekvieno teiginio** pažymėti varnele (✓) teisingą atsakymą, kuris Jums tinka **pastarosiomis dienomis**:

- | | Taip | Ne |
|---------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Ramus sėdėjimas ar gulėjimas | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Prausimasis ar rengimasis | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Vaikščiojimas po namus | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Vaikščiojimas lygioje vietoje lauke | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Lipimas laiptais aukštyn vieną aukštą | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Lipimas į kalnelį (kalvą) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Sportas ar fiziniai žaidimai | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Šv. Džordžo ligoninės klausimynas apie kvėpavimo sutrikimus II DALIS

III skyrius

Dar keli klausimai apie kosulį ir dusulį, kamuojančį Jus pastarosiomis dienomis.

Prašome prie **kiekvieno teiginio** pažymėti varnele (✓) teisingą atsakymą, kuris Jums tinka ***pastarosiomis dienomis***:

	Taip	Ne
Kosulys man sukelia skausmą	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kosulys mane vargina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kai kalbu, mane dusina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pasilenkus mane dusina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kosulys ir kvėpavimo sutrikimai trukdo man miegoti	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Aš greitai išsenku	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

IV skyrius

Klausimai apie tai, kokią dar įtaką kvėpavimo sutrikimai turi Jums pastarosiomis dienomis.

Prašome prie **kiekvieno teiginio** pažymėti varnele (✓) teisingą atsakymą, kuris Jums tinka ***pastarosiomis dienomis***:

	Taip	Ne
Kosulys ar kvėpavimo sutrikimai kitų žmonių tarpe trikdo mane	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mano kvėpavimo sutrikimai trikdo mano šeimą, draugus ar kaimynus	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Aš išsigąstu ar supanikuoju, kai negaliu atgauti kvapo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Jaučiu, kad negaliu kontroliuoti savo kvėpavimo sutrikimų	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nesitikiu, kad mano kvėpavimas pagerės	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tapau neįgalus dėl savo kvėpavimo sutrikimų	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Man sportuoti nesaugu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Atrodo, kad viskas reikalauja labai daug pastangų	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

V skyrius

Klausimai apie vartojamus vaistus. Jei Jūs vaistų nevartojate, pereikite prie VI skyriaus.

Prašome prie **kiekvieno teiginio** pažymėti varnele (✓) teisingą atsakymą, kuris Jums tinka ***pastarosiomis dienomis***:

	Taip	Ne
Mano vaistai man nelabai padeda	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Jaučiuosi nepatogiai, vartodamas vaistus kitų žmonių tarpe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vartojami vaistai man sukelia nemalonius pašalinius reiškinius	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vaistai labai trukdo mano gyvenimui	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Lithuania / Lithuanian version

4

f:\institut\cutadap\project\mk2188\etude2188\finalversions\author_word\wordsgrlitq.doc-30/04/2004

tęsinys...

Lithuanian SGRQ 3 months
Revised from English into Lithuanian by TransPerfect on 26JUL2013

Šv. Džordžo ligoninės klausimynas apie kvėpavimo sutrikimus II DALIS

VI skyrius

Šie klausimai yra apie tai, kiek kvėpavimas gali turėti įtakos Jūsų veiklai.

Prašome prie **kiekvieno teiginio** pažymėti varnelę (✓) teisingą atsakymą, **kiek tai susiję su Jūsų kvėpavimu:**

	Taip	Ne
Aš ilgai prausiuosi arba rengiuosi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Negaliu maudytis vonioje ar duše, arba tai ilgai trunka	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vaikštau lėčiau nei kiti žmonės ar sustoju pailsėti	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Darbai, tokie kaip namų tvarkymas, užima daug laiko arba turiu sustoti pailsėti	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Jei lipu laiptais vieną aukštą, turiu lipti lėtai ar sustoti	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Jei skubu ar einu greitai, turiu sustoti ar sulėtinti tempą	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dėl kvėpavimo sutrikimų man sunku kopti į kalną, nešti daiktus aukštin laiptais, dirbti nesunkius darbus sode (ravėti), šokti, žaisti lengvus žaidimus, medžioti, prižiūrėti vaikus	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dėl kvėpavimo sutrikimų man sunku nešti sunkius nešulius, kasti žemę ar sniegą, bėgti ristele ar greičiau eiti (maždaug 8 km/h greičiu), žaisti tenisą ar plaukti	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dėl kvėpavimo sutrikimų man sunku sunkiai fiziškai dirbti, bėgti, važiuoti dviračiu, greitai plaukti ar rungtyniauti žaidžiant sportinius žaidimus	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

VII skyrius

Mes norėtumėme žinoti, kokią įtaką kvėpavimo sutrikimai paprastai turi Jūsų kasdieniam gyvenimui.

Prašome prie **kiekvieno teiginio** pažymėti varnelę (✓) teisingą atsakymą, **kiek tai susiję su kvėpavimo sutrikimais:**

	Taip	Ne
Negaliu sportuoti ar žaisti	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Negaliu išeiti pasilinksinti ar praleisti laisvalaikį	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Negaliu išeiti iš namų į parduotuvę apsipirkti	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Negaliu tvarkyti namų	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Negaliu nueiti toli nuo savo lovos ar kėdės	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Šv. Džordžo ligoninės klausimynas apie kvėpavimo sutrikimus

Žemiau išvardintos kitos veiklos rūšys, kurias gali riboti Jūsų kvėpavimo sutrikimai. (Nereikia jų pažymėti, mes tik paprasčiausiai primename, kaip dusulys gali įtakoti Jūsų gyvenimą):

- Pasivaikščiojimas ar šuns vedžiojimas
- Darbas namuose ar sode
- Lytiniai santykiai
- Ėjimas į bažnyčią, kavinę ar pasilinksminimų vietą
- Išėjimas iš namų blogu oru ar buvimas prirūkytose patalpose
- Šeimos ar draugų lankymas, žaidimas su vaikais

Prašome įrašyti bet kuriuos kitus svarbius užsiėmimus, kuriais užsiimti Jums gali trukdyti Jūsų kvėpavimo sutrikimai:

.....

.....

.....

.....

Dabar pažymėkite langelyje (tik viename), kuris teiginys, Jūsų nuomone, geriausiai atitinka kvėpavimo sutrikimų įtaką Jums:

- Tai netrukdo man atlikti nieko, ką aš norėčiau
- Tai trukdo atlikti keletą dalykų, kuriuos norėčiau padaryti
- Tai trukdo atlikti daugumą dalykų, kuriuos norėčiau padaryti
- Negaliu nieko veikti, ką norėčiau

Ačiū, kad užpildėte šią anketą. Prieš baigdami, prašome patikrinti, ar atsakėte į visus klausimus.

CURRICULUM VITAE

- Name, Surname:** GRETA MUSTEIKIENĖ
- Address:** Department of Pulmonology Lithuanian University of Health Sciences Eivenių 2, LT-50009 Kaunas, Lithuania
- E-mail:** greta.musteikiene@ismuni.lt; greta.musteikiene@gmail.com
- Education:**
- 2015–2021 Lithuanian University of Health Sciences, Department of pulmonology, Doctoral (PhD) Postgraduate studies
- 2010–2014 Lithuanian University of Health Sciences, Postgraduate studies and professional qualification of Pulmonologist
- 2004–2010 Lithuanian University of Health Sciences (former Kaunas University of Medicine),
Master’s Degree of Medicine and professional qualification of physician
- Work experience:**
- 2021–present Assistant lecturer, Lithuanian University of Health Sciences, Department of pulmonology
- 2020–present Pulmonologist at Hospital of Lithuanian University of Health Sciences Kauno klinikos, II department of COVID-19.
- 2014–present Pulmonologist at Hospital of Lithuanian University of Health Sciences Kauno klinikos, Romainiai Tuberculosis hospital.
- 2017–2018 Head of I tuberculosis department, Hospital of Lithuanian University of Health Sciences Kauno klinikos, Romainiai Tuberculosis hospital.
- 2012–2014 Physician, Alytus hospital, Emergency department.
- 2010–2014 Hospital of Lithuanian University of Health Sciences Kauno klinikos, Department of Pulmonology, Resident of pulmonology
- Project work:**
- 2021–present Lithuanian University of Health Sciences project: “LSMU activities aimed at improving the competencies and qualifications of medical doctors”; Assistant expert
- 2020–2021 Participation in preparation of methodic documents of the diseases responsible for main causes of death in Lithuania. Preparation of methodic documents of pneumonia.
- Clinical practice and training:**
- 2016.09.27–29 Training on Latent Tuberculosis Infection Management, Talin, Estonia
- 2016.10.11–13 Exchange visit on tuberculosis contact investigation, Helsinki, Turku, Finland
- Memberships:**
- 2012–present Member of the Lithuanian Society of Pulmonologists and Allergologists
- 2012–present Member of the European Respiratory Society (ERS)

PADĖKA

Nuoširdi padėka doktorantūros vadovui prof. dr. Skaidriui Miliauskui bei visam Romainių tuberkuliozės ligoninės personalui už visokeriopą pagalbą disertacijos rengimo kelyje.

Ačiū ženkliai prisidėjusioms prie šio darbo atlikimo: konsultantei prof. dr. Astrai Vitkauskienei, doc. dr. Daivai Urbonienei, doc. dr. Jurgitai Zaveckienei.

Dėkoju prof. dr. Kęstučiui Malakauskui ir dr. Virginijai Kalinauskaitei-Žukauskei už skirtą laiką ir pagalbą finaliniame disertacijos rašymo etape.