



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
MEDICINSKI FAKULTET  
AKADEMSKE DOKTORSKE STUDIJE  
JAVNO ZDRAVLJE

**IMUNOHROMATOGRFSKI TEST  
U DIFERENCIJALNOJ LABORATORIJSKOJ  
DIJAGNOSTICI TUBERKULOZE PLUĆA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:

Prof. dr Ivana Hrnjaković – Cvjetković

Prof. dr Mirjana Bećarević

Kandidat:

Dipl. farm. Tijana Savković

Novi Sad, 2015. godine

**UNIVERZITET U NOVOM SADU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada: VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Tijana Savković
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Ivana Hrnjaković – Cvjetković, vanredni profesor na Katedri za mikrobiologiju sa parazitologijom Medicinskog fakulteta u Novom Sadu  Prof. dr Mirjana Bećarević, vanredni profesor na Katedri za farmaciju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu
Naslov rada: NR	Imunohromatografski test u diferencijalnoj laboratorijskoj dijagnostici tuberkuloze pluća
Jezik publikacije: JP	srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srpski / engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2015.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Medicinski fakultet, Hajduk Veljkova 3
Fizički opis rada: FO	Broj poglavlja: 8, stranica: 95, slika: 15, grafikona: 3, tabela 19, referenci: 219.

Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Mikrobiologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Imunohromatografija; tuberkuloza; mycobacterium tuberculosis; dijagnoza; kliničke laboratorijske metode; molekularne dijagnostičke metode; netuberkulozne mikobakterijske infekcije; senzitivnost i specifičnost
UDK	616.24-002.5-078/-079.4
Čuva se: ČU	Biblioteka Medicinskog fakulteta, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad Sad, Srbija
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>UVOD: Tuberkuloza je odavno poznata bolest koja i danas u 21. veku još uvek predstavlja veliki javnozdravstveni problem, uprkos primeni moćnih antituberkuloznih lekova. Trećina svetske populacije inficirana je bacilom tuberkuloze. Svake godine oboli oko osam miliona, a umre oko dva miliona ljudi, zbog čega je tuberkuloza i dalje infektivno oboljenje sa najvećom stopom smrtnosti. Kasna dijagnoza, multirezistentna tuberkuloza i udruženost sa HIV infekcijom predstavljaju jednu od najvećih prepreka za efikasnu kontrolu ove bolesti u svetu. Rano otkrivanje se oslanja na kvalitetnu bakteriološku dijagnostiku koja je kamen temeljac svakog nacionalnog programa za kontrolu tuberkuloze. Brza i tačna mikrobiološka dijagnostika predstavlja osnovu programa kontrole tuberkuloze i zbog toga je uvođenje novih i brzih laboratorijskih testova od veoma velikog značaja. Razvijen je novi komercijalno dostupni imunohromatografski test koji se zasniva na detekciji antigena MPT64 glavnog sekretovanog proteina <i>M. tuberculosis</i>. Test je brz i pouzdan u identifikaciji izolovanih sojeva <i>M. tuberculosis</i> i jeftiniji je od konvencionalnih biohemijskih i molekularnih testova. CILJ: Ciljevi istraživanja su bili da se evaluiraju karakteristike novog brzog imunohromatografskog testa u identifikaciji mikobakterija izolovanih iz respiratornih uzoraka bolesnika sa tuberkulozom pluća i referentnih sojeva klinički značajnih vrsta netuberkuloznih mikobakterija (NTM). MATERIJAL I METODE: Istraživanje je sprovedeno u periodu od 1.1.2010. do 31.12.2013. i obuhvatilo je 43 563 respiratornih uzoraka dobijenih od bolesnika hospitalizovanih u Institutu za plućne bolesti Vojvodine. Iz obrađenih respiratornih uzoraka izolovano je 3 469 izolata mikobakterija. Identifikacija do nivoa vrste urađena je primenom standardnih biohemijskih testova,</p>

	<p>molekularnog testa (<i>GenoType® Mycobacterium</i>) i imunohromatografskog testa (BDMGIT Tbc). U istraživanje je uključeno 100 sojeva Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija (n = 19 vrsta) izolovanih iz respiratornih kliničkih uzoraka. Identifikacija do nivoa vrste je potvrđena komercijalnim identifikacionim sistemima. REZULTATI: U toku četvorogodišnjeg istraživanja izolovano je 3 469 izolata mikobakterija iz respiratornih uzoraka. U ispitivanom periodu ne postoji opadajući trend izolacije mikobakterija što potvrđuje i koeficijent korelacije (r = 0,31). Svi izolati mikobakterija su identifikovani konvencionalnim biohemijskim ispitivanjima koja pokazuju da je 89 % od svih izolata identifikovano kao <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>M. tuberculosis</i>), a 11% izolata kao NTM. <i>Mycobacterium xenopi</i> je bila najzastupljenija NTM vrsta identifikovana kod 55,3 % izolata. Nakon biohemijske identifikacije kod 300 izolata <i>M. tuberculosis</i> i 100 izolata NTM, identifikacija je potvrđena komercijalno dostupnim molekularnim i imunohromatografskim testom. Na osnovu rezultata testiranja mikobakterija imunohromatografskim testom, senzitivnost, specifičnost, pozitivne i negativne prediktivne vrednosti bile su: 99,7 %, 100 %, 100 % i 99 %. U poređenju imunohromatografskog testa sa konvencionalnim biohemijskim ispitivanjima nije nađena statistički značajna razlika (p &gt; 0,5). Kappa vrednost testa je iznosila 0,993, a interval poverenja CI = 0,98 – 1,00. U poređenju imunohromatografskog sa molekularnim testom vrednost kappa je iznosila 0,993, a interval poverenja CI = 0,98 – 1,00. Slaganje rezultata je potvrđeno i McNemar testom sa vrednošću 0,99. Utvrđena je stabilnost sekretovanog antigena MPT64 i posle 5 godina od prvog testiranja. ZAKLJUČAK: Visoka senzitivnost i specifičnost imunohromatografskog testa omogućuju tačnu i preciznu identifikaciju <i>M. tuberculosis</i> kao i pouzdanu diferencijaciju <i>M. tuberculosis</i> od NTM – a. Imunohromatografski test može da predstavlja zamenu za konvencionalne biohemijske i molekularne testove u identifikaciji <i>M. tuberculosis</i>. Jeftiniji je, jednostavniji za izvođenje i brže se dobijaju rezultati čime se skraćuje vreme za postavljanje dijagnoze.</p>
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	25.3.2014.
Datum odbrane: DO	

Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	<p>Predsednik: Prof. dr Vesna Milošević, redovni profesor, Institut za javno zdravlje Vojvodine, Medicinski fakultet, Novi Sad</p> <p>Član: Docent dr Božana Nikolić, docent, Katedra za farmaciju, Medicinski fakultet, Novi Sad</p> <p>Član: Prof dr Vesna Lalošević, redovni profesor, Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad</p>
---	---

**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF MEDICINE  
KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Ph. D. Thesis
Author: AU	Tijana Savkovic, M. Pharm.
Mentor: MN	Prof. Ivana Hrnjakovic - Cvjetkovic, M.D., Ph.D. Prof. Mirjana Becarevic, M. Pharm, Ph.D.
Title: TI	Immunochromatographic test in differential laboratory diagnostic of tuberculosis
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian / English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2015.
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljkova 3

Physical description: PD	Number of chapters: 8, pages: 95, images: 15, graphs 3, tables 19, references: 219.
Scientific field: SF	Medicine
Scientific discipline: SD	Microbiology
Subject, Key words SKW	Immunochromatography; Tuberculosis; Mycobacterium tuberculosis; Diagnosis; Clinical Laboratory Techniques; Molecular Diagnostic Techniques; Mycobacterium Infections, Nontuberculous; Sensitivity and Specificity
UC	616.24-002.5-078/-079.4
Holding data: HD	Library of Medical Faculty Novi Sad, 21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3, Serbia
Note: N	
Abstract: AB	<p>INTRODUCTION: Tuberculosis (TB) has been known as a disease for a long time, but nevertheless it represents a major public health issue even nowadays in the 21st century, despite potent antituberculous drugs applied. One third of the world population is infected by the TB bacillus. About eight million people get infected and two million die of tuberculosis in a year, so tuberculosis is still an infectious disease with the greatest mortality rate. Late diagnosis, multiresistant tuberculosis and concomitant HIV infection interfere mostly with an efficient control of the disease all over the world. Early TB detection largely depends on the high-quality bacteriological diagnostics, which is the corner stone of each national TB control programme. A fast and accurate microbiological TB diagnosis plays a crucial role in any TB control programme. It is therefore very important to introduce new and fast laboratory tests. A novel commercially available immunochromatographic test has been designed, based on the MPT64 antigen of the major <i>M. tuberculosis</i> – secreted protein. This is a rapid and reliable test to identify the isolated strains of <i>M. tuberculosis</i>, which is not</p>

expensive as conventional biochemical and molecular tests.

**OBJECTIVE:** The objective of the investigation was to evaluate the new immunochromatographic rapid test to identify mycobacteria isolated from respiratory samples from pulmonary TB patients, and referential strains of clinically relevant species of nontuberculous mycobacteria (NTM).

**MATERIAL AND METHODS:** The research was carried out in the period from 1<sup>st</sup> January, 2010 to 31<sup>st</sup> December, 2013. It included 43 563 respiratory samples obtained from the patients hospitalized in the Institute for Pulmonary Diseases of Vojvodina, Sremska Kamenica (Serbia). There were 3 469 mycobacterial isolates obtained from the processed respiratory samples. The species – level identification was performed by standard biochemical tests, the molecular test (*GenoType*® *Mycobacterium*), and the immunochromatographic test (BD MGIT Tbc). The study included one hundred (100) of Gram positive and Gram negative bacteria (n = 19 species) isolated from respiratory clinical samples. The species – level identification was confirmed by commercial identification systems.

**RESULTS:** During the four – year investigation, 3 469 mycobacterial isolates were obtained from respiratory samples. No declining tendency of mycobacterial isolation was registered in the examined period, as confirmed by the correlation coefficient ( $r = 0.31$ ). All mycobacterial isolates were identified by conventional biochemical tests showing that 89 % of all isolates were identified as *M. tuberculosis*, and 11 % of the isolates as NTM. *Mycobacterium xenopi* was the most common NTM species identified in 55.3 % of the isolates. Following the biochemical identification in 300 *M. tuberculosis* isolates and 100 NTM isolates, the identification was confirmed by commercially available molecular and immunochromatographic tests. Based on immunochromatographic testing of

	<p>mycobacteria, the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of the test were 99.7 %, 100 %, 100 % and 99 % respectively. There is no statistically significant difference (<math>p &gt; 0.5</math>) when comparing features of immunochromatographic test with conventional biochemical assay. The kappa test value was 0.993, and the confidence interval CI = 0.98 – 1.00. Comparing the immunochromatographic with the molecular test, the kappa value was 0.993, and the confidence interval CI = 0.98 – 1.00. The congruence of the tests findings was also confirmed by the McNemar test, estimated to 0.99. The stability of the secreted MPT64 antigen was registered even five years after the first testing episode.</p> <p>CONCLUSION: The high sensitivity and specificity of the imunochromatographic test enable an accurate and precise identification of <i>M. tuberculosis</i>, as well as a reliable differentiation of <i>M. tuberculosis</i> from NTM. The immunochromatographic test may substitute conventional biochemical and molecular tests to identify <i>M. tuberculosis</i>. It is easier to perform and provides faster test results, thus reducing the time of establishing the diagnosis.</p>
Accepted on Scientific Board on: AS	25.3.2014.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	President: Vesna Milosevic M.D., Ph.D.  Member: Bozana Nikolić , M.Pharm., Ph.D.  Member: Vesna Lalosevic, M.D., Ph.D.



## SKRAĆENICE

Ag - antigen

AIDS – sindrom stečene imunodeficijencije (*engl. acquired immunodeficiency syndrome*)

ARB – acidorezistentni bacili

At – antitelo

ATCC – američka kolekcija kultura sojeva (*engl. American type culture collection*)

BP – bazni par

CFU – *engl. Colony Forming Unit*

CI – interval poverenja (*engl. confidence interval*)

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina (*engl. deoxyribonucleic acid, DNA*)

DOTS – *engl. Directly Observed Treatment Short*

HCV – virus hepatitisa C (*engl. hepatitis C virus*)

HIV – virus humane imunodeficijencije (*engl. human immunodeficiency virus, HIV*)

IFN – interferon

IL – interleukin

LJ – Löewenstein – Jensen

M. bovis BCG – *lat. Mycobacterium bovis Bacille Calmette Guerin*

M. tuberculosis – *lat. Mycobacterium tuberculosis*

MAC – *lat. Mycobacterium avium complex*

MGIT – Mycobacteria Growth Indicator Tube

MPT64 – *engl. Mycobacterium Protein Tuberculosis 64*

NAA – amplifikacija nukleinskih kiselina (*engl. nucleic acid amplification acid*)

NAD – nikotinamid adenindinukleotid

NTM – netuberkulozne mikobakterije (*engl. nontuberculous mycobacteria*)

PCR – reakcija lančanog umnožavanja (*engl. Polymerase Chain Reaction*)

PFU – *engl. Plaque Forming Unit*

POC – *engl. Point of care*

QDs – kvantne tačke (*engl. quantum dots*)

RNK – ribonukleinska kiselina (*engl. ribonucleic acid, RNA*)

rRNK – ribozomalna ribonukleinska kiselina

SN – kolekcija kultura sojeva (*engl. Stamm Number*)

SZO – Svetska zdravstvena organizacija

TNF – tumor nekrozis faktor (*engl. tumor necrosis factor*)

Z – N – Ziehl – Neelsen

## SADRŽAJ

<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. Imunohromatografski test ili test lateralnog protoka .....	1
1.2. Princip imunohromatografskog testa .....	2
1.3. Varijante imunohromatografskog testa .....	5
1.3.1 Sendvič verzija .....	5
1.3.2 Kompetitivni imunohromatografski test .....	7
1.4. Prednosti i mane imunohromatografskog testa .....	8
1.5. Konfiguracija imunohromatografskog testa .....	9
1.5.1 Deo za uzorak.....	10
1.5.2 Deo za konjugat .....	10
1.5.3 Obeleživači .....	11
1.5.4 Nitrocelulozna membrana – reakcioni matriks .....	13
1.5.5 Adsorbentni deo .....	15
1.5.6 Antitela: ključ za robustnost imunohromatografskog testa .....	16
1.6 Primena imunohromatografskog testa .....	17
1.6.1 Primena imunohromatografskog testa u dijagnostici infektivnih bolesti ...	18
1.7 Aktuelnost tuberkuloze .....	19
1.7.1 Netuberkulozne mikobakterije .....	22
1.8 Laboratorijska dijagnostika tuberkuloze .....	23
1.8.1 Kultivisanje kliničkih uzoraka na mikobakterije .....	24
1.8.2 Identifikacija mikobakterija .....	25
1.8.3 Biohemijska identifikacija <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	25
1.8.4 Molekularne tehnike za identifikaciju mikobakterija .....	26
1.9 Imunohromatografski test u identifikaciji <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	29
1.9.1 Princip imunohromatografskog testa u dijagnozi <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	31
<b>2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>33</b>
<b>3 HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>34</b>

<b>4</b>	<b>MATERIJAL I METODE</b>	<b>35</b>
4.1	Biohemijska identifikacija mikobakterija	40
4.1.1	Izvođenje niacin testa po Konno-u	40
4.1.2	Izvođenje testa redukcije nitrata po Virtanen – u	41
4.1.3	Izvođenje testa katalaze	42
4.2	Izvođenje imunohromatografskog testa u identifikaciji mikobakterija	43
4.3	Molekularni test u identifikaciji mikobakterija	44
4.3.1	Izolacija DNK mikobakterija	44
4.3.2	Amplifikacija – umnožavanje DNK PCR	44
4.3.3	Hibridizacija DNK	45
4.4	Statistička obrada rezultata	47
<b>5</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>48</b>
5.1	Izolacija mikobakterija iz respiratornih uzoraka	48
5.1.1.	Identifikacija izolovanih sojeva mikobakterija	50
5.2	Karakteristike imunohromatografskog testa MGIT TBc Id	54
5.2.1	Upoređivanje imunohromatografskog testa sa biohemijskim testom kao standardnom metodom.....	60
5.2.2	Upoređivanje imunohromatografskog testa sa molekularnim testom GenoType® Mycobacterium	61
5.2.3	Ponovljeni imunohromatografski test	62
<b>6</b>	<b>DISUKSIJA</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>ZAKLJUČCI</b>	<b>74</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>76</b>

# 1 UVOD

## 1.1 Imunohromatografski test ili imunotest lateralnog protoka

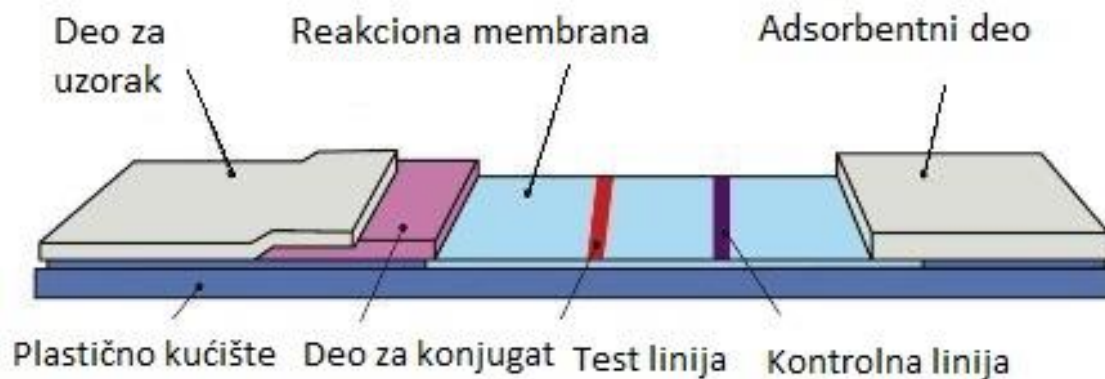
Jedan od zadataka savremene laboratorijske dijagnostike jeste izbor odgovarajućih metoda kojima se brzo i pouzdano može utvrditi uzročnik infekcije. Identifikacija uzročnika u najkraćem vremenskom roku, vodeći je zahtev u dijagnostici infektivnih oboljenja. U skladu sa ovim tendencijama razvijeni su imunohromatografski testovi (1).

Osnovni principi hromatografije i imunotestova iskorišćeni su za formiranje imunohromatografskih kit sistema kojima se jednostavnim i brzim izvođenjem testa mogu lako detektovati različiti mikroorganizmi (1). Koncept nastanka imunohromatografskog testa (engl. *lateral flow immunochromatographic test*) potiče još od sredine 50 – tih godina 20. veka, kada su Plotz i Singer (2) prvi razvili tehniku imunohromatografskog testa zasnovanog na lateks aglutinaciji. Prvobitni naziv tehnike je bio „*sol particle immunoassay*“ (2, 3). Razvoj tehnologije imunohromatografskog testa nastavlja se sve do ranih 80 – tih godina 20. veka kada počinju da se kombinuju dve tehnike, hromatografija i enzimski imunotest, koristeći prednosti iz jedne i druge, da bi se dobila što bolja analiza uzorka (1). Imunohromatografski test ima iste komponente kao enzimski imunotest, ali je antitelo/antigen obeleženo na papiru imunohromatografske trake. Tehnologija imunohromatografskog testa zasnovana je na hromatografskim principima i na imunološkoj reakciji između antitela i antigena. Kombinacija imunotestova sa tankoslojnom hromatografijom je visoko efikasna, daje više podataka o nepoznatom uzorku koji se ispituje, nego upotreba samo jedne od navedenih tehnika, a postignuta je veća osetljivost i specifičnost testa (4, 5). Ova tehnika se koristi za kvalitativno ili semikvantitativno detektovanje antigena (Ag), antitela (At), haptena, oligonukleotida. Razvoj čvrste faze testa i napredak tehnologije u proizvodnji antitela omogućio je dostupnost komercijalnih varijanti imunohromatografskog testa za detekciju *Streptococcus*, *Chlamydia*, virusa humane imunodeficijencije (HIV) i virusa hepatitis C (HCV) (6).

Imunohromatografski test je imunotest sa čvrstom fazom koji kombinuje principe tankoslojne hromatografije i imunološke reakcije između antigena i antitela. Test sadrži suve reagense koji se aktiviraju dodatkom tečnog uzorka značajnog za dijagnostičko ispitivanje. Uzorci za imunohromatografsko ispitivanje mogu da budu različite telesne tečnosti, feces, brisevi i biopsije tkiva. Uzorci se testiraju direktno bez obrade ili se uzorak obrađuje ekstrakcijom (6, 7).

## 1.2 Princip imunohromatografskog testa

Imunohromatografski test funkcioniše duž jedne ose tako da odgovara formatu za test trake (1). Uobičajeno, test traka se sastoji od četiri zone koje sadrže različite reagense: deo za nanošenje uzorka, deo za konjugat, membrana za detekciju na kojoj se nalaze test i kontrolna linija i deo za apsorbovanje (*Slika 1*).



Slika 1. Delovi imunohromatografskog test stripa (7)

Prethodno je navedeno da se imunohromatografskim testom mogu detektovati ili Ag ili At iz ispitivanih uzoraka.

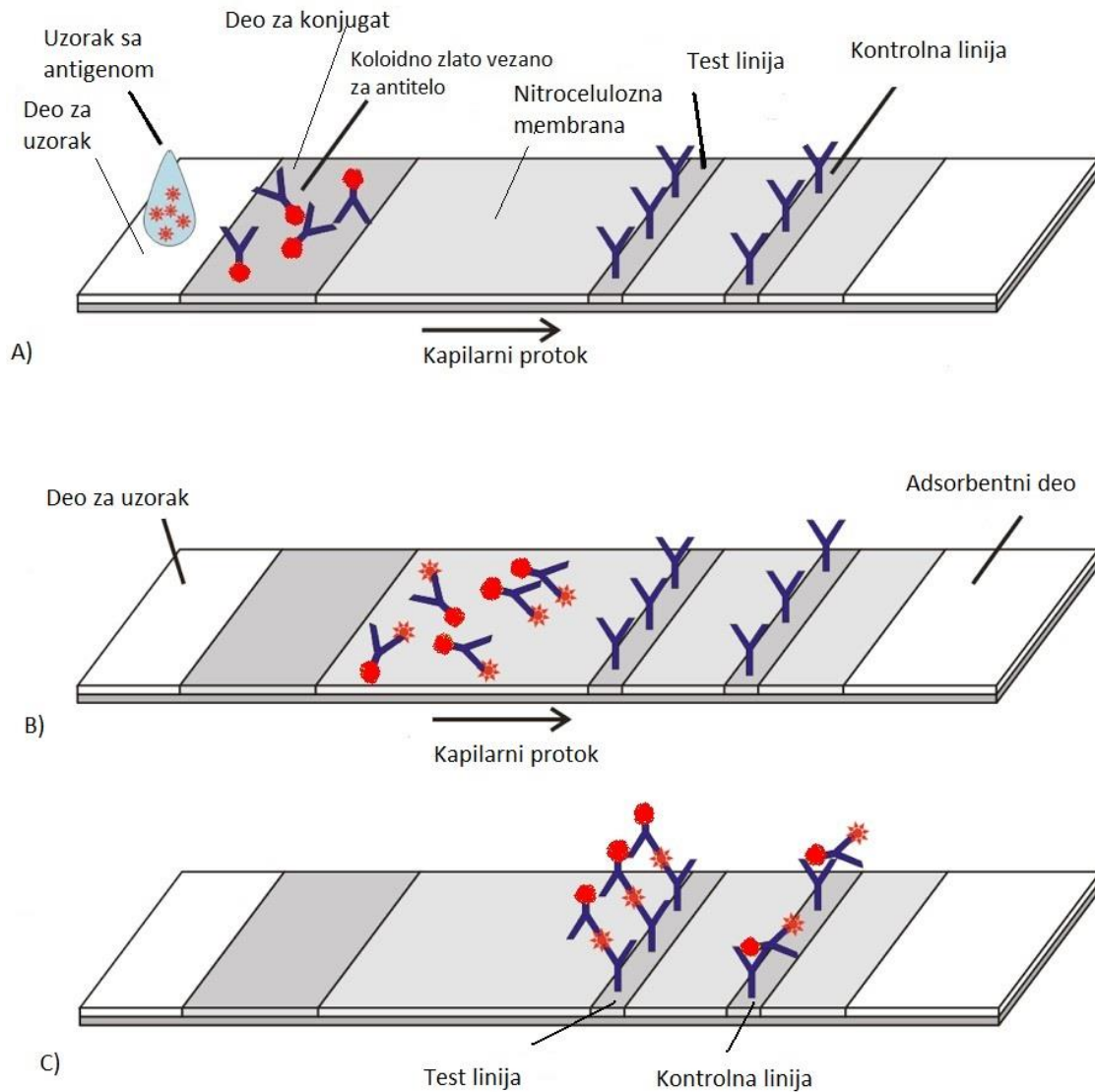
❖ Detekcija antigena iz ispitivanih uzoraka

Ispitivani tečni uzorak (u kojem se detektuju antigeni) dodaje se u otvor za uzorak u proksimalnom delu testa i antigen se pokreće kapilarnim silama ka delu test trake za konjugat. Deo za konjugat se sastoji od antitela koja su konjugovana česticama koloidnog zlata, a koja su specifična za epitope antigena koji se detektuje iz uzorka. Zatim, antigen iz uzorka se veže za konjugat (tj. za antitelo koje je konjugovano koloidnim zlatom) i difunduje do reakcionog dela nitrocelulozne membrane. U porama nitrocelulozne membrane testa imobilisana su specifična antitela (za antigen koji se detektuje) u vidu linije gde dolazi do reakcije između antigena (iz uzorka) i antitela (7, 8). Višak konjugata se "hvata" anti – IgG antitelima na kontrolnoj liniji (formiranje dve crvene linije na membrani ukazuje na pozitivan rezultat). Na *Slici 2* je simbolično prikazan princip imunohromatografskog testa za detekciju Ag. U daljem tekstu (*Poglavlje 1.3.*) će biti navedene varijante imunohromatografskog testa koje se mogu koristiti za detekciju antigena iz ispitivanih uzoraka.

❖ Detekcija antitela iz ispitivanih uzoraka

Ispitivani tečni uzorak (u kojem se detektuju antitela) dodaje se u otvor za uzorak u proksimalnom delu testa i antitela se pokreću kapilarnim silama ka delu test trake za konjugat. Deo za konjugat se sastoji od antigena koji su konjugovani česticama koloidnog zlata, a za čije epitope su antitela iz uzorka specifična. Zatim, antitelo iz uzorka se veže za konjugat (tj. za antigen koji je konjugovan koloidnim zlatom) i difunduje do reakcionog dela nitrocelulozne membrane. U porama nitrocelulozne membrane testa imobilisani su specifični antigeni (za antitela koja se detektuju) u vidu linije gde dolazi do reakcije između antitela (iz uzorka) i antigena (7, 8). Višak konjugata se "hvata" anti – imunoglobulinskim antitelima na kontrolnoj liniji (formiranje dve crvene linije na membrani ukazuje na pozitivan rezultat). U daljem tekstu (*Poglavlje 1.3.*)

će biti navedene varijante imunohromatografskog testa koje se mogu koristiti za detekciju antitela iz ispitivanih uzoraka.



Slika 2. Princip imunohromatografskog testa kojim se detektuju antigeni (10)

- Aplikacija ispitivanog uzorka
- Kapilarno proticanje kompleksa antigen/antitelo – konjugat do test linije
- Reakcija antigen – antitelo u test i kontrolnoj liniji

### 1.3. Varijante imunohromatografskog testa

Imunohromatografski test se može obavljati na nekoliko načina, tj. postoji nekoliko varijanti ili verzija ovog testa u zavisnosti od odlika ispitivanih antigena ili antitela. Najčešće korišćene varijante imunohromatografskog testa su:

- ❖ "sendvič" verzija imunohromatografskog testa (engl. *sandwich format*) i
- ❖ kompetitivni imunohromatografski test (9).

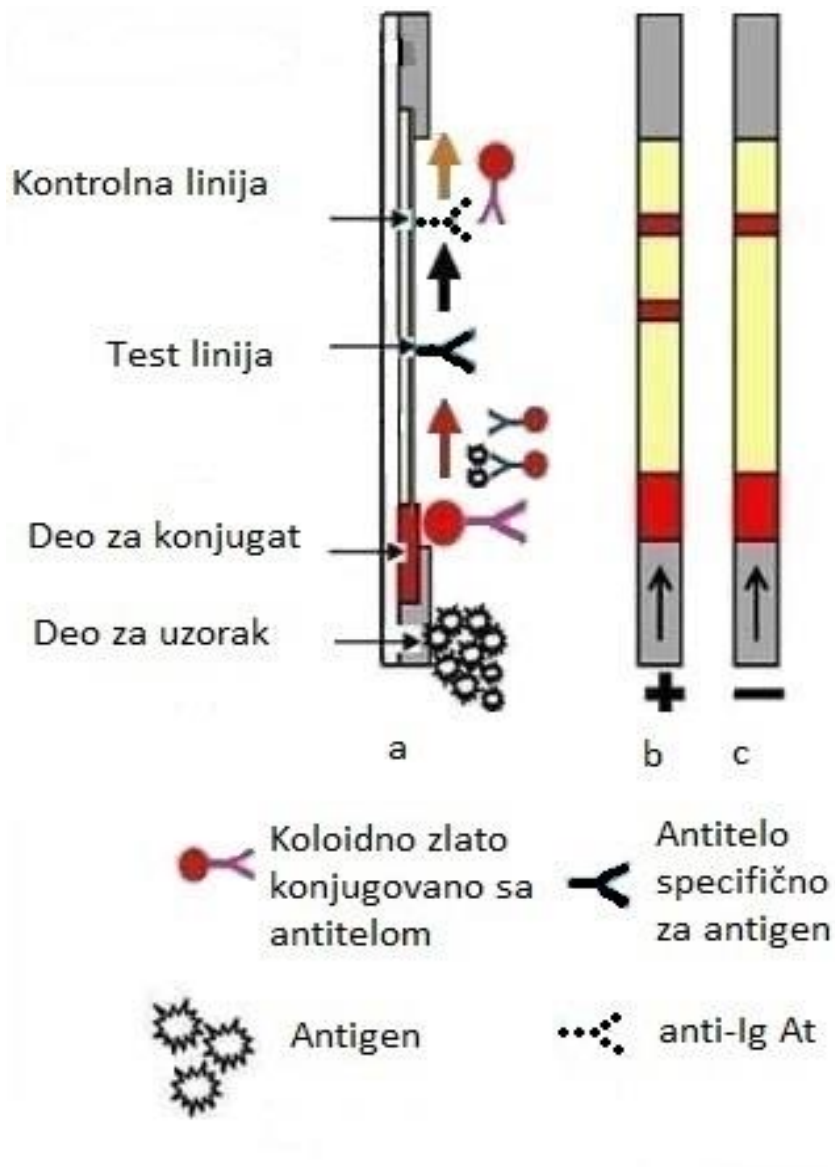
"Sendvič" verzija imunohromatografskog testa se koristi za detektovanje molekula sa više vezujućih mesta (npr. virusi), dok se kompetitivni imunohromatografski test koristi za detektovanje malih molekula sa jednom antigenskom determinantom (lekovi, hormoni).

#### 1.3.1 "Sendvič" verzija imunohromatografskog testa

Ova verzija imunohromatografskog testa se može koristiti za detektovanje Ag ili At. U slučaju detekcije Ag, konjugovano At će prepoznavati i vezivati se za Ag iz uzorka, a formirani kompleksi Ag – At se vezuju za imobilisana At (na test liniji). Višak konjugata (tj. nevezani konjugati) se odstranjuje ("hvata") anti – IgG At na kontrolnoj liniji (formiranje dve crvene linije ukazuje na pozitivan rezultat, a crvena boja potiče od čestica koloidnog zlata kojim su konjugovana At) (1, 6, 11). *Slika 3* simbolično prikazuje sendvič verziju imunohromatografskog testa za detekciju Ag.

U slučaju detekcije At, iz uzorka će antitelo reagovati sa konjugovanim antigenom pri čemu nastaje kompleks Ag – At koji se imobilise anti – imunoglobulinskim antitelima na test liniji. Višak konjugata se "hvata" antitelima koja prepoznaju konjugovane Ag na kontrolnoj liniji (formiranje dve crvene linije ukazuje na pozitivan rezultat, a crvena boja potiče od čestica koloidnog zlata kojim su konjugovani Ag) (1, 7, 11).



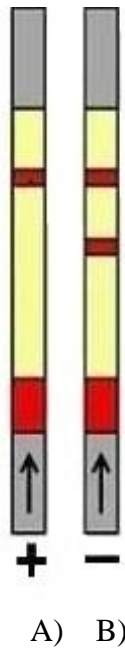


Slika 3. Sendvič verzija imunohromatografskog testa za detekciju antigena (12)

- a) Kapilarno proticanje kompleksa konjugat – antigen do test linije
- b) Pozitivan test (+) vidljiva test i kontrolna linija
- c) Negativan test (-) vidljiva kontrolna linija.

### 1.3.2 Kompetitivni imunohromatografski test

U kompetitivnom imunohromatografskom testu se slobodni Ag iz rastvora "takmiči" sa imobilisanim Ag na test liniji za vezivanje za antitela koja su konjugovana česticama koloidnog zlata. Debljina test linije zavisi od koncentracije slobodnog Ag koji je prisutan u ispitivanom uzorku. Na sličan se način ovim testom mogu detektovati i antitela iz ispitivanih tečnih uzoraka. Slobodna At iz rastvora se "takmiče" sa imobilisanim At na test liniji za vezivanje za Ag koji je prethodno konjugovan česticama koloidnog zlata (1, 7, 9).



Slika 4. Kompetitivni imunohromatografski test (7)

- A) Test pozitivan ( + ) vidljiva samo kontrolna linija
- B) Test negativan ( - ) vidljive i kontrolna i test linija

## 1.4 Prednosti i mane imunohromatografskog testa

U poređenju sa laboratorijskim instrumentalnim metodama, imunohromatografski test ima:

- ❖ visoku senzitivnost i specifičnost
- ❖ jednostavniju upotrebu
- ❖ brže dobijanje rezultata (od 5 do 15 minuta)
- ❖ jednostavniju interpretaciju rezultata
- ❖ mali volumen ispitivanog uzorka (100 µL)
- ❖ relativno jeftinu proizvodnju
- ❖ dugotrajnu stabilnost u širokom opsegu klimatskih uslova
- ❖ prikladnu formu testa.

Ove karakteristike čine imunohromatografski test idealnim za kućno testiranje i u kliničkim laboratorijama, kao i za testiranje na terenu (engl. *Point of care*, POC) (6).

Nedostaci imunohromatografskog testa su:

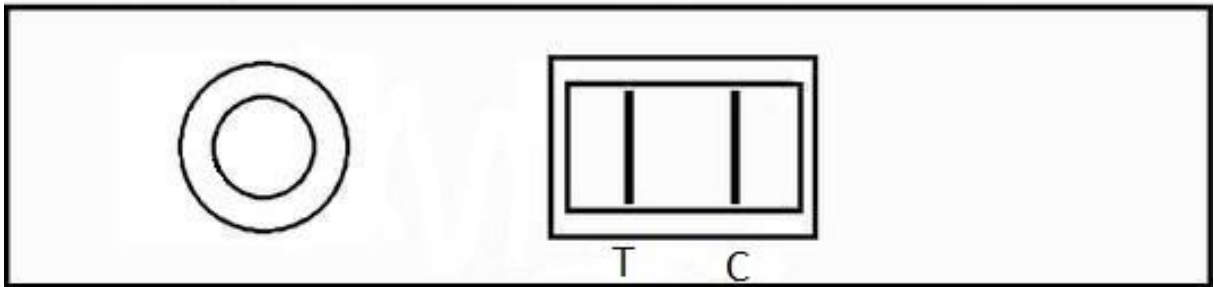
- ❖ samo jedan agens se može detektovati na test traci,
- ❖ različita osetljivost testova za određene agense, testovi za detekciju bakterija su najosetljiviji i mogu da detektuju  $2 \times 10^5$  do  $2 \times 10^6$  CFU (engl. *Colony Forming Unit*) / ml, raspon za toksine je od 50 pg / ml do 50 ng / ml, a za viruse je najniža osetljivost  $2 \times 10^5$  do  $2 \times 10^7$  PFU (engl. *Plaque Forming Unit*) / ml,
- ❖ samo jedan rezultat (identifikacija patogenog mikroorganizma), bez podataka o osetljivosti na antimikrobne lekove,
- ❖ vizuelno čitanje, osetljivost je ograničena na ono što se može videti golim okom (6, 13).

## 1.5 Konfiguracija imunohromatografskog testa

Imunohromatografski test koji se danas upotrebljava može imati različite konfiguracije od jednostavnih oblika do veoma složenih konfiguracija. Najjednostavniji oblik testa je test strip postavljen u plastičnom kućištu. Prethodno je navedeno da su delovi imunohromatografskog test stripa:

- ❖ deo za uzorak
- ❖ deo za konjugat ili reagens deo
- ❖ reakciona membrana
- ❖ adsorbentni deo (*Slika 1*). Spoljašnji izgled test trake je ilustrovan na *Slici 5* (1, 9).

Otvor za aplikaciju uzorka      Prozor za očitavanje rezultata



Slika 5. Spoljašnji izgled test trake (6)

T – test linija

C – kontrolna linija

### **1.5.1 Deo za uzorak**

Deo za uzorak je proksimalni kraj test stripa u koji se dodaje ispitivani uzorak. Uloga dela za uzorak je prihvatanje uzorka i oslobađanje antitela / antigena iz uzorka sa visokom efikasnošću (1).

Materijal koji se upotrebljava za izradu dela za uzorak zavisi od primene ispitivanog uzorka. Materijal može biti celuloza, staklena vlakna ili drugi filtrirajući materijal koji će prihvatiti sav volumen ispitivanog uzorka.

Deo za uzorak može biti impregniran sa proteinima, deterdžentima i solima pufera koji mogu uticati na proticanje uzorka, povećati viskoznost uzorka, što može produžiti vreme reakcije u delu za konjugat ili čak hemijski izmeniti uzorak.

Pore u delu za uzorak su raspoređene simetrično, obezbeđuju početnu filtraciju uzorka, uklanjajući velike molekule (1, 9).

### **1.5.2 Deo za konjugat**

Deo za konjugat povezuje deo za uzorak sa membranom testa, a sadrži detektor reagens (osušene obojene nanočestice koloidnog zlata vezane sa antitelom). Osušeni obeleženi konjugat se lako oslobađa u kontaktu sa tečnim uzorkom i veže za ispitivani antitelo / antigen iz uzorka. Koncentracija konjugata utiče na formiranje signala na test liniji, odnosno na senzitivnost testa.

Materijal za izradu ovog dela je izrađen od staklenih vlakana ili veštačke svile, mora biti hidrofilan i da omogućava brz protok uzorka (1, 9).

### 1.5.3 Obeleživači

Detekcija i vizuelizacija antigena postiže se primenom antitela koja su obeležena. Prvi obeleživači antitela bile su lateks čestice, jednostavne i ekonomične za upotrebu, izgrađene od organskih polimera različitih boja koje omogućuju dobru vidljivost testa. Antitela se vezuju za površinu čestica fizičkom adsorpcijom ili koloidnim vezivanjem zavisno od prisustva funkcionalnih grupa (amino ili karboksilne grupe) (5).

Najčešći obeleživači antitela u imunohromatografskom testu su nanočestice koloidnog zlata. Daju najbolju vidljivost, senzitivnost i reproducibilnost testa. Razlog za široku upotrebu nanočestica je veliki broj razvijenih procedura za njihovo dobijanje i mogućnost kontrolisanja njihovog oblika (14). Nanočestice koloidnog zlata nastaju redukcijom tetrahloroauratne(III) kiseline,  $\text{HAuCl}_4$ , ili kalijum – tetrahloroaurata(III),  $\text{KAuCl}_4$ . Nakon rastvaranja  $\text{HAuCl}_4$  ili  $\text{KAuCl}_4$ , u rastvor koji se brzo meša dodaje se redukujući agens pri čemu se  $\text{Au}^{3+}$  joni redukuju do neutralnih atoma zlata. Najčešće korišćena redukciona sredstva su natrijum – tiocijanat, natrijum – borhidrid ili citratni joni, a u literaturi je opisana i sinteza nanočestica zlata u prisustvu različitih aminokiselina (14, 15). Pri sintezi koloidnog zlata reakcioni rastvor na početku je skoro crne boje, na kraju boja rastvora prelazi u rubin – crvenu. Od redukcionog sredstva zavisi oblik i veličina koloidnih čestica (16).

Sastav nanočestica zlata čini elementarno jezgro okruženo dvostrukim difuznim slojem jona. Koloidne čestice zlata sadrže prosečno  $10^3$  do  $10^9$  atoma, usled njihovih malih veličina, značajan deo ukupnog broja atoma, nalazi se na površinama čestica. Kao posledica velikog broja površinskih atoma, za nanočestice su karakteristične i velike vrednosti površinske energije koja povećava nestabilnost ovih sistema (17).

Nanočestice zlata karakteriše i prisustvo velikog broja slobodnih elektrona, koje omogućava njihove kolektivne oscilacije (plazmonske oscilacije) ograničene na površinu čestica pri interakciji sa elektromagnetnim zračenjem. Kada se frekvencija elektromagnetnog polja nađe u rezonanciji sa koherentnim kretanjem elektrona, javlja se intenzivna apsorpcija u spektru odakle potiče intenzivno obojenje koloidnih rastvora (17).

Veličina nanočestica je od 5 do 100 nm, a najčešća je 40 nm koja daje najbolju vidljivost crvene linije. Brzina protoka uzorka i senzitivnost imunohromatografskog testa zavisi od veličine čestica (15). Studije Aveyard i saradnika (18) pokazuju da velike čestice mogu dati bolju senzitivnost testa, ali se sa povećanjem veličine čestica smanjuje koloidna stabilnost rastvora. Najčešća metoda vezivanja čestica za antitela je proces pasivne adsorpcije i kovalentno vezivanje kada nastaju stabilno obeležene koloidne suspenzije. Konjugacija koloidnih zlatnih čestica i antitela zavisi od položaja rezidua tri aminokiseline lizina, triptofana i cisteina. Za optimalnu senzitivnost testa, ove tri aminokiseline trebale bi biti smeštene u Fc fragmentu antitela (15, 16).

Kao obeleživači, ali znatno ređe, mogu se upotrebljavati koloidni ugljenik, selen ili fluorescentni obeleženi lipozomi (16). Početkom 21. veka kao obeleživači antitela upotrebljavaju se magnetne nanočestice i kvantne tačke (engl. *quantum dots*, *QDs*). Kvantne tačke su poluprovodni nanokristali čiji su nosioci naelektrisanja prostorno ograničeni u sve tri dimenzije. Građene su od elemenata iz grupa II do VI periodnog sistema elemenata. Veličine su od 2 do 10 nm i predstavljaju fluorescentne obeleživače antitela (19, 20, 21).

Magnetne nanočestice su velika grupa nanočestica koje pokazuju magnetne osobine, a sastoje se od magnetnih elemenata gvožđa, nikla, kobalta i njihovih hemijskih jedinjenja. Veličine su od 10 do 20 nm. Pokazuju superparamagnetnu osobinu, što znači da imaju magnetnu osobinu samo kada su u spoljašnjem magnetnom polju. Superparamagnetizam je od ključnog značaja za obeležavanje analita. Površinske osobine magnetnih nanočestica omogućuju da se antitela vežu za čestice pasivnom adsorpcijom ili kovalentnim vezama. Slično nanočesticama zlata, magnetne nanočestice su jednostavne za upotrebu i stvaraju žuto obojenu test liniju (22, 23).

### 1.5.4 Nitrocelulozna membrana – reakcioni matriks

Membrana ili reakcioni matriks imunohromatografskog testa je značajan deo test sistema, jer se na njoj odvija imunološka reakcija tj. stvara imunološki kompleks i omogućava vizuelna detekcija imunološkog kompleksa (1).

Najčešći materijal koji se upotrebljava za izradu membrane je nitroceluloza, a mnogo ređe se upotrebljavaju drugi polimerski materijali kao što su najlon, polietersulfon, polietilen. Nitrocelulozna membrana je porozna membrana na kojoj su imobilisana antitela ili antigeni, smešteni u vidu linije gde se vezuju sa kompleksom antitelo / antigen – konjugat (6). Uloga membrane imunohromatografskog testa je vezivanje proteina u test i kontrolnoj liniji, održavanje njihove stabilnosti i aktivnosti u predviđenom roku za upotrebu (6, 7). Porozna nitrocelulozna membrana je polimer koji se koristi od 1800. godine, a poznata je i pod nazivom celulozni nitrat (1). Nitrocelulozna membrana je komercijalno dostupna. Reakcijom celuloze sa azotnom kiselinom, hidroksilne grupe celuloze zamenjuju se nitratnim grupama i nastaje nitroceluloza. Nitrocelulozna membrana je prvi put 1960. godine upotrebljena za imobilizaciju biomolekula, a poslednjih decenija 21. veka postala je veoma važan deo imunohromatografskog testa (1).

Karakteristike nitrocelulozne mebrane su:

- ❖ omogućava kapilarnu migraciju
- ❖ visoka sposobnost za vezivanje proteina
- ❖ jednostavna za rukovanje
- ❖ relativno jeftina u proizvodnji (24).

Za funkciju membrane neophodni su proteini koji su adsorbovani na membrani. Nitrocelulozna membrana je hidrofobna i ima visoki adsorptivni kapacitet za proteine. Membrana testa adsorbira više od  $100 \mu\text{g IgG} / \text{cm}^2$ , a to je 5 – 10 puta veća koncentracija proteina nego što je potrebno za funkciju testa (24).

Jedan od ključnih elemenata za senzitivnost i reproducibilnost testa je čvrstoća imobilizacije imunološki aktivnih proteina za test i kontrolnu liniju. Poznato je da veliki proteini gube u svojoj imunološkoj aktivnosti posle vezivanja za površinu membrane.



Proteini se vežu za nitroceluloznu membranu pomoću elektrostatskih, hidrofobnih sila i vodonikovih veza (Slika 6) (25).



Slika 6. Struktura dipola nitroceluloznog estra i dipola peptidne veze proteina (25)

Na proces vezivanja proteina za membranu utiču mnogi faktori:

- ❖ izbor reagensa: nespecifični proteini albumin i kazein kompeticijom za vezujuća mesta; formamid i urea interferencijom sa vodonikovim vezama; Tween interferencijom sa hidrofobnim vezivanjem; polivinil acetat, polivinilpirolidon i polietilen glikol interferencijom sa vezujućim proteinima
- ❖ uslovi sredine (potrebna vlažnost za optimalno vezivanje je 25 – 50 % na sobnoj temperaturi)
- ❖ izbor metode vezivanja (disperzni i suvi metod) (1, 24).

Performanse membrane zavise od:

- ❖ veličine pora
- ❖ debljine membrane
- ❖ tipa polimera koji se upotrebljava za izradu membrane (1, 6, 24).

Veličina pora membrane kreće se od 0,05 do 12  $\mu\text{m}$  i određena je debljinom membrane. Ukoliko je veličina pora veća od navedenih, dolazi do proširenja test linije i smanjuje se senzitivnost testa zbog slabe vidljivosti test linije (24).

Debljina membrane je značajan parametar zbog:

- ❖ volumena uzorka
- ❖ raspodele reagensa
- ❖ smeštaja u plastično kućište.

Po standardu nitrocelulozna membrana je debljine 100 do 150  $\mu\text{m}$  (6, 24).

Struktura polimera od koje je izgrađena nitrocelulozna membrana značajna je za migraciju tečnosti i partikula. Najznačajnije performanse nitrocelulozne membrane imunohromatografskog testa su vreme i brzina kapilarnog protoka. Vreme kapilarnog protoka se definiše kao vreme koje je potrebno da tečni uzorak migrira do kraja test trake. Ova vrednost se izražava u s / cm dužine membrane (ili s / 4 cm zbog standardne dužine membrane) i u obrnutoj je vezi sa brzinom protoka. Vreme kapilarnog protoka tečnosti značajno je za kinetiku i brzinu testa i utiče na senzitivnost testa (25). Brzina kapilarnog proticanja je brzina kojom se obeleženi kompleks i antigen/antitelo iz uzorka transportuju kroz membranu u optimalnom vremenu za reakciju. Od veličine pora koje su paralelno raspoređene na membrani zavisi brzina kapilarnog proticanja. Veličina pora i brzina kapilarnog proticanja su direktno proporcionalne. Postoje membrane koje imaju vreme kapilarnog proticanja 60 s / 4 cm i membrane sa najsporijim kapilarnim proticanjem od 240 do 300 s / 4 cm. Kod membrana sa brzim kapilarnim proticanjem, rezultati testa se brže dobijaju, ali zahtevaju više reagensa i manja je senzitivnost testa (1, 24, 26).

### **1.5.5 Adsorbentni deo**

Distalni deo testa u kome se prihvata višak tečnosti, građen je od filterceluloze koja ima sposobnost adsorpcije. Sve komponente imunohromatografskog testa su smeštene u plastičnom kućištu (1).

### 1.5.6 Antitela: ključ za robustnost imunohromatografskog testa

Robustnost neke analitičke metode je mera njene sposobnosti da se odupre malim i namernim promenama u parametrima metode, a ujedno je i mera pouzdanosti metode tokom rutinske primene (27). Antitela (mono – i poliklonska) su najznačajnije komponente u imunohromatografskom testu. Da bi se ostvarila robustnost imunohromatografskog testa potrebna su antitela visoke specifičnosti, čistoće, stabilnosti i visokog afiniteta za ciljni antigen. Različiti klonovi B – ćelija produkuju poliklonska antitela. Poliklonska antitela predstavljaju smešu molekula imunoglobulina, od kojih svaki prepoznaje isti antigen, ali reaguje sa različitim antigenskim determinantama datog antigena. Monoklonska antitela su monospecifična antitela koja su identična, zato što ih produkuje jedan jedini tip B – limfocita. Sve ćelije koje produkuju određeni tip monoklonskog antitela klonovi su jedine materinske ćelije (28).

Imunizacija je prvi korak u proizvodnji poli – ili monoklonskih antitela. Proizvodnja antitela zavisi od:

- ❖ načina imunizacije (supkutano, intravenozno, intraperitonealno)
- ❖ vremena između pojedinačnih imunizacija
- ❖ životinje odabrane za imunizaciju (miš, zec, kokoška)
- ❖ vrste antigena koji ima ulogu antigena (28).

Tehniku produkcije monoklonskih antitela prvi put su opisali Kohler i Milsten 1975. godine. Za ovo značajno otkriće 1984. godine dobili su Nobelovu nagradu.

Tehnologija proizvodnje monoklonskih antitela omogućava produkciju velike količine prečišćenih antitela, a proces se može podeliti na nekoliko faza:

- ❖ izolovanje makrofaga (*feeder*) iz peritoneuma i njihov rast u kulturi
- ❖ izolacija splenocita imunizovane životinje
- ❖ priprema besmrtno linije mijeloma ćelije
- ❖ fuzija i kloniranje (29).

Da bi se proizvela monoklonska antitela, B – ćelije (koje imaju kratkotrajan životni vek *in vitro*) iz životinje imunizovane određenim antigenom podvrgavaju se procesu fuzije sa ćelijama mijeloma (tumora plazma ćelija) koje mogu beskonačno dugo da se

umnožavaju u ćelijskoj kulturi. Ćelijska linija mijeloma mutirana je tako da joj nedostaje enzim neophodan za rast u prisustvu toksičnog agensa. Ćelije nastale fuzijom neometano proliferišu jer normalne B – ćelije obezbeđuju potreban enzim. Fuzijom dve ćelijske populacije i selekcijom u prisustvu toksičnog agensa moguće je izdvojiti tzv. ćelije hibridoma, nastale fuzijom normalnih B – ćelija i mijelomskih ćelija (28). Iz populacije hibridoma mogu se selektovati i klonirati ćelije koje se kontinuirano umnožavaju i proizvode antitela željene specifičnosti.

Antitela produkovana na ovaj način da bi se komercijalno mogla koristiti moraju se prečistiti od ostalih komponenti koje su prisutne u medijumu kulture ćelije. U upotrebi su metode prečišćavanja, različiti tipovi hromatografija (jonoizmenjivačka i afinitetna). Dobro prečišćena antitela nalaze primenu u dijagnostici, naučnim istraživanjima i terapiji (30). Tokom poslednjih godina 20. veka poliklonska antitela su u velikoj meri zamenjena monoklonskim antitelima (30).

## 1.6 Primena imunohromatografskog testa

Jednostavno i brzo izvođenje imunohromatografskog testa omogućilo je njegovu široku primenu u mnogim oblastima (31):

- ❖ kliničkoj dijagnostici (detekcija biomarkera kardiovaskularnih oboljenja, dokazivanje okultnog krvarenja, hormona, lipida, holesterola, opijatnih droga) (31)
- ❖ laboratorijskoj medicini (detekcija virusnih i bakterijskih patogenih mikroorganizama, parazita, toksina) (32 – 41)
- ❖ veterinarskoj medicini (dijagnoza bakterijskih i virusnih infekcija, adeno, noro, korona, parvo, rota virusa, leptospiroze, Lajmske bolesti) (42, 43)
- ❖ farmaceutskoj industriji (31)
- ❖ prehrambenoj industriji (detekcija i kvantifikacija ostataka nedozvoljenih supstanci u hrani) (44)
- ❖ poljoprivredi (45)
- ❖ ekologiji (detekcija kontaminanata okoline) (31).

Prvi brzi testovi koji su se izvodili van laboratorija pojavili su se osamdesetih godina 20. veka za analizu urina, glukoze, okultnog krvarenja, kada je započelo tzv. vreme POC testiranja tj. testiranja koje se sprovodi uz bolesnika. U upotrebi su i drugi nazivi za POC testiranje, kao što su ispitivanja pored posetelje (engl. *bedside testing*), pored pacijenta (engl. *near – patient testing*), u lekarskoj ordinaciji (engl. *physicians’s office testing*), izvan laboratorije (engl. *extra – laboratory testing*) i drugi (46). Osnovna metoda na kojoj se bazira većina savremenih POC testova je imunohromatografija. Osnovni cilj POC testiranja je što brže dobiti rezultat koji će uticati na ishod bolesti i omogućiti uvođenje odgovarajuće terapije (46, 47).

### **1.6.1 Primena imunohromatografskog testa u dijagnostici infektivnih bolesti**

U laboratorijskoj dijagnostici infektivnih bolesti najčešće su neophodni brzi rezultati mikrobioloških pregleda. Potreba dobijanja što bržih rezultata sa ciljem skraćivanja vremena boravka u zdravstvenoj ustanovi odnosno usmeravanja ciljne terapije, dovela je do razvoja brzih imunohromatografskih testova koji su skratili vreme od uzimanja uzorka do dobijanja rezultata (48). Poslednjih desetak godina 21. veka u laboratorijskoj dijagnostici infektivnih bolesti razvijen je veliki broj brzih testova koji se upotrebljavaju za dijagnostiku:

- ❖ respiratornih uzročnika: legionela, virus influence, adenovirus, pneumokok, respiratorni sincicijelni virus
- ❖ uzročnika koji se prvenstveno prenose krvlju: virus humane imunodeficijencije (HIV), hepatitis C virus (HCV)
- ❖ uzročnika polno prenosivih bolesti (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*)
- ❖ *Helicobacter pylori*
- ❖ toksina *Clostridium difficile*
- ❖ uzročnika gljivičnih oboljenja i mikotoksina
- ❖ virusnih gastroenteritisa (rotavirus, norovirus, adenovirus)

- ❖ infektivne mononukleoze, tuberkuloze, malarije, denga groznice, hanta virusa (49 – 53).

Imunohromatografski testovi mogu se koristiti za:

- ❖ postavljanje dijagnoze kod simptomatskog bolesnika,
- ❖ sigurno propisivanje terapije i praćenje uspešnosti lečenja,
- ❖ epidemiološka ispitivanja, praćenje incidencije, prevalencije,
- ❖ sprovođenje javnozdravstvenih (tzv. engl. *out reach*) programa za teško dostupne rizične grupe (54, 55).

Imunohromatografski test omogućuje brzo dobijanje rezultata koji utiču na dalji postupak sa bolesnikom u primeni odgovarajuće antimikrobne terapije koja omogućuje bolji klinički i ekonomski ishod bolesti (56). Izvođenje testova je jednostavno bez posebnih aparata uz minimalnu, ali obaveznu edukaciju izvođenja. Važan faktor u izvođenju imunohromatografskog testa je strogo pridržavanje mera zaštite i sprečavanje širenja bolesti što je posebno važno u dijagnostici infektivnih uzročnika. Uzorak za dijagnostiku zaraznih bolesti može da sadrži veliki broj patogenih mikroorganizama što predstavlja rizik od zaraze za osoblje koje izvodi testiranje, zato je potrebno strogo pridržavanje protokola koji mora biti dostupan i jasno definisan. Preduslov za optimalnu upotrebu brzih testova je ispravno izvođenje testiranja i pravilna interpretacija rezultata uz sagledavanje težine kliničke slike i epidemioloških podataka (57, 58).

## 1.7 Aktuelnost tuberkuloze

Tuberkuloza je jedna od najčešćih zaraznih bolesti na svetu, koja prati ljudski rod od samog njegovog početka, a njen uzročnik *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) je najrasprostranjeniji patogeni mikroorganizam u svetu (59).

Iako je od otkrića *M. tuberculosis* prošlo više od 120 godina, i uprkos primeni moćnih antituberkulotika koji su se pojavili sredinom 20. veka, nije došlo do očekivanog suzbijanja tuberkuloze. Tuberkuloza i danas na početku 21. veka predstavlja veliki zdravstveni i socijalno – ekonomski problem širom sveta, a naročito u zemljama u razvoju (59). Svetska zdravstvena organizacija (SZO) je krajem 20. veka ovu bolest

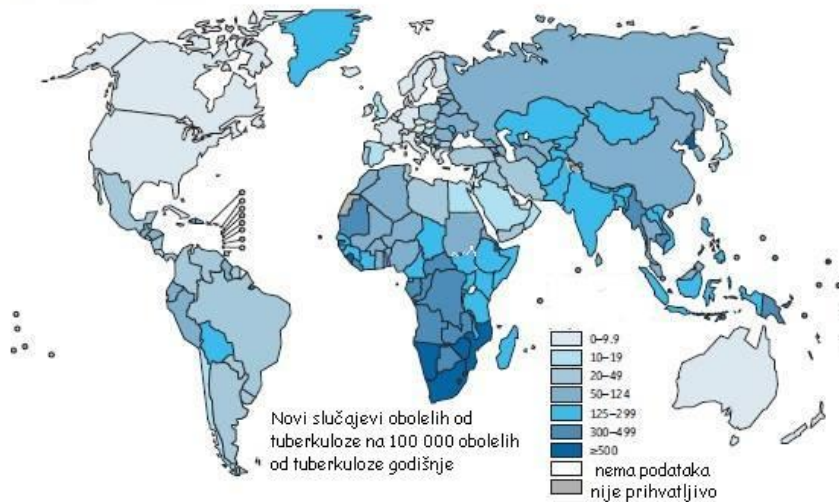
proglasila globalnom zdravstvenom opasnošću i predložila internacionalnu strategiju za kontrolu ovog oboljenja (60, 61).

Širenju tuberkuloze doprinose:

- ❖ brz porast svetske populacije i produženi životni vek
- ❖ migratorna kretanja,
- ❖ socijalno – ekonomski faktori
- ❖ bolesti moderne civilizacije: sindrom stečene imunodeficijencije (engl. *acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS), šećerna bolest, maligne bolesti, bubrežna insuficijencija i bolesti zavisnosti (narkomanija, alkoholizam) (62).

Podaci Svetske zdravstvene organizacije ukazuju na globalnu raširenost tuberkuloze. U svetu je u 2012. godini obolelo od tuberkuloze od 8,3 do 9 miliona ljudi (oko 80 % u svojim najproduktivnijim godinama) a oko 2 miliona je umrlo od tuberkuloze (60, 62). Najveći broj obolelih od tuberkuloze živi u subsaharskoj Africi, jugoistočnoj Aziji i Južnoj Americi, gde je stopa incidencije od 100 – 250 / 100 000 stanovnika (*Slika 7*) (62).

U evropskoj regiji najveća incidencija tuberkuloze je u Rusiji i drugim zemljama bivšeg Sovjetskog Saveza. Iako je incidencija tuberkuloze u Zapadnoj Evropi u sporom padu i manja je od 20 / 100 000 stanovnika, relativno je visok procenat zaraženih migranata i izbeglica iz drugih zemalja (63).



Slika 7. Incidencija tuberkuloze u svetu 2012. godine (62)

U Republici Srbiji devedesetih godina 20. veka dolazi do porasta incidencije tuberkuloze (41 / 100 000 stanovnika), usled ratnih dešavanja i migracije stanovništva. Od devedesetih godina 20. veka prati se postupni pad incidencije tuberkuloze koja je 2013. godine iznosila 17 / 100 000 stanovnika (64). Procenjuje se da je trećina svetskog stanovništva (2 milijarde ljudi) zaražena *M. tuberculosis* što predstavlja mogući izvor novih infekcija. Očekuje se da će preko 300 miliona ljudi biti inficirano bacilom tuberkuloze u trećoj deceniji 21. veka (65). Približno 95 % tuberkuloznih bolesnika i 98 % smrtnih ishoda tuberkuloze dešava se u zemljama u razvoju, gde su terapijske mogućnosti ograničene, a bolest često udružena sa HIV infekcijom. Koinfekcija sa virusom HIV – a značajno povećava rizik za razvoj tuberkuloze. Oko 12 % svetske populacije obolelih od tuberkuloze ima i HIV infekciju (66). Zemlje u kojima postoji visoka prevalencija HIV – a, posebno zemlje subsaharske Afrike i južnoistočne Azije, imaju dvostruki ili čak trostruki porast obolelih od tuberkuloze. Tuberkuloza je postala vodeći uzrok smrti među obolelim od HIV – a, dok je infekcija sa HIV – om najveći faktor rizika za latentnu tuberkuloznu infekciju (66).

Sredinom devedesetih godina 20. veka kao rezultat lošeg sprovođenja lečenja tuberkuloze, pojavljuje se rezistencija bacila tuberkuloze na veći broj antituberkulotika prve linije i nastanak novog vida tuberkuloze koja se naziva multirezistentna tuberkuloza (67). Multirezistentna tuberkuloza je oblik bolesti gde je *M. tuberculosis* rezistentan na izoniazid i rifampicin, glavne lekove u lečenju tuberkuloze. Zbog toga je lečenje multirezistentne tuberkuloze neuporedivo duže (traje nekoliko godina) i skuplje do 100 puta od uobičajenog šestomesečnog lečenja (67).

Pojava rezistencije *M. tuberculosis* na lekove predstavlja najozbiljniji problem u suzbijanju epidemije tuberkuloze. Svake godine se beleži pola miliona novih slučajeva multirezistentne tuberkuloze sa najvećom prevalencijom u zemljama istočne Evrope, subsaharske Afrike, Indiji i Kini. Rezistencija na antituberkulotike je veća u zemljama Istočne Evrope u odnosu na druge evropske regione (68 – 70). U 2013. godini u Republici Srbiji evidentirano je ukupno 12 bolesnika sa multirezistentnom tuberkulozom (64).



### 1.7.1 Netuberkulozne mikobakterije

Poslednjih godina 20. veka iz kliničkih uzoraka sve se više izoluju i druge mikobakterije – netuberkulozne mikobakterije (engl. *nontuberculous mycobacteria*, NTM) usled primene tečnih podloga za izolaciju i molekularnih tehnika za identifikaciju (71). Netuberkulozne mikobakterije su velika heterogena grupa bakterija roda *Mycobacterium* koji obuhvata 163 različitih vrsta (72). Epidemiološke studije ukazuju na široku rasprostranjenost NTM u čovekovoј okolini, nalaze se u zemlji, prašini, svim vrstama površinskih voda, u moru. Različito su geografski rasprostranjene (73). Iako su NTM poznate još od vremena Roberta Koh – a dugo nisu bile prepoznate kao uzročnici oboljenja, smatrane su prolaznom kolonizacijom ili samo kontaminacijom kliničkih uzoraka. Klinički značaj NTM prepoznat je tek sredinom 20. veka, kada raste interes za istraživanje infekcija uzrokovanih NTM (74). Davidson (75) je 1989. godine podelio NTM prema kliničkoј važnosti na uslovno patogene ili oportunističke bakterije i čiste saprofite. Granicu između jednih i drugih nije lako odrediti tako da se smatra da i saprofiti u određenim uslovima mogu biti uzročnici bolesti. Većina patogenih NTM pripada grupi oportunističkih bakterija kako za čoveka tako i za domaće životinje. Netuberkulozne mikobakterije u stanjima smanjene otpornosti domaćina mogu izazvati različita oboljenja koja se zovu mikobakterioze (74).

Za razliku od tuberkuloze, infekcija izazvana NTM se ne prenosi sa čoveka na čoveka ili direktno sa životinje na čoveka. Različite infekcije: plućne, kože i mekog tkiva, limfadenitis i diseminovane infekcije mogu biti izazvane NTM. Dominantan put infekcije je inhalacija čestica aerosola iz okoline. Čovek se može inficirati preko kontaminirane zemlje, prašine, vode, unošenjem bacila kod traume (76). Infekcijska doza mora biti velika i kontakt duži. Netuberkulozne mikobakterije su multirezistentni bacili slabe virulencije, nesposobni da uzrokuju oboljenje kod zdrave osobe. Predisponirajući faktori za nastanak infekcija izazvani NTM su hronične opstruktivne bolesti, dijabetes, tuberkulozne sekvele, maligne bolesti i imunodeficijencija. Mikobakterioze se ne prijavljuju epidemiološkoј službi te javnozdravstveni značaj ovih infekcija nije sagledan (74, 76).

Incidencija mikobakterioza u razvijenim zemljama sveta je 1 – 1,8 / 100 000 stanovnika. Značajan je trend rasta učestalosti infekcija uzrokovanih NTM – a dok incidencija tuberkuloze pada. Značajnu promenu u epidemiologiji i biološkom ponašanju NTM donosi pandemija AIDS – a. Najčešći uzročnici infekcija su *Mycobacterium avium complex* (MAC), *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum* (77).

Patogeneza infekcija izazvanih NTM još uvek nije poznata, niti je poznato da li bolest nastaje odmah po infekciji ili postoji period latencije. Sa sigurnošću se zna da mikobakterije fagocituju makrofagi koji produkuju interleukin 12 (IL – 12) koji aktivira CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T – limfocite koji luče interferon gama (IFN –  $\gamma$ ), a koji aktivira neutrofile i makrofage koji ubijaju mikobakterije (78).

Osim mikrobiološke dijagnoze tuberkuloze, veoma je značajna i dijagnoza mikobakterioza. Potrebna je brza identifikacija izolovanih mikobakterija odnosno razlikovanje NTM od *M. tuberculosis*, jer je terapija mikobakterioza dugotrajna i skupa, a protokoli za lečenje ovih infekcija se razlikuju od protokola za lečenje tuberkuloze (79).

## 1.8 Laboratorijska dijagnostika tuberkuloze

Bakteriološka dijagnostika tuberkuloze sastoji se od:

- ❖ mikroskopskog ispitivanja
- ❖ kultivisanja kliničkih uzoraka
- ❖ identifikacije izolovanog soja mikobakterija
- ❖ testa osetljivosti na antituberkulotike (80).

Mikroskopskim pregledom preparata respiratornih uzoraka (sputum, trahealni aspirat, bronhoalveolarni lavat), gastrolavata, različitih telesnih tečnosti, obojenih po *Ziehl – Neelsen* – u (Z – N) detektuju se acidorezistentni bacili (ARB). Dokazivanje acidorezistentnih bacila je brza dijagnostička metoda, ali ima nisku osetljivost i specifičnost. Za pozitivan nalaz neophodno je prisustvo velikog broja bacila u bolesničkom materijalu više od 10<sup>4</sup> bacila / ml uzorka. Pregledom mikroskopskog

preparata može se samo dokazati prisustvo acidoalkoholnerezistentnih bacila, jer se *M. tuberculosis* ne može morfološki razlikovati od ostalih mikobakterija (81).

### 1.8.1 Kultivisanje kliničkih uzoraka na mikobakterije

Metode kultivisanja mikobakterija jesu klasične konvencionalne metode i predstavljaju „zlatni standard“ mikobakteriološke dijagnostike tuberkuloze. Konvencionalne metode kultivisanja podrazumevaju izolovanje mikobakterija na čvrstim hranjivim podlogama sa jajima kao što je *Löwenstein - Jensen* (L – J), odnosno njene modifikacije. Nedostatak konvencionalnih čvrstih hranjivih podloga je dugo vreme potrebno za porast vidljivih kolonija spororastućih mikobakterija, kojima pripada i *M. tuberculosis* (80). Velika promena u načinu kultivisanja mikobakterija napravljena je osamdesetih godina 20. veka uvođenjem tečnih podloga kao deo automatizovanih sistema za kultivisanje sa osetljivom detekcijom porasta (81).

Novi sistemi za izolaciju mikobakterija su MGIT 960 (engl. *Mycobacteria Growth Indicator Tube, Becton Dickinson Diagnostic*), MB / Bact Alert (Bio Merieux, France) i VersaTrek (Trek Diagnostic System, USA) koji koriste selektivne tečne hranljive podloge na kojima se prisustvo bacila tuberkuloze može znatno brže detektovati na osnovu količine oslobođenog ugljen – dioksida ili potrošnje kiseonika (82). Tečne podloge su modifikovani *Middlebrook 7H9* bujon sa dodatkom suplementa za stimulaciju rasta mikobakterija. S obzirom na to da je učestalost kontaminacije drugim mikroorganizmima, kao i kod ostalih tečnih podloga, viša nego kod čvrstih podloga, obavezno je dodavanje antimikrobne smeše (83). Inokulisane hranljive podloge stavljaju se u aparat koji predstavlja zatvoren sistem za inkubiranje i detekciju porasta očitavanjem fluorescencije na svakih 60 minuta. Kada intenzitet fluorescencije dostigne detektabilan nivo, aparat signalizira pozitivnost kulture npr. MGIT aparat. Dok se kod BacT / Alert sistema detekcija porasta meri kolorimetrijski na osnovu oslobođenog ugljen – dioksida (84, 85). Kultivisanjem obrađenih kliničkih uzoraka na tečnim podlogama automatizovanih neradiometrijskih sistema značajno je skraćen postupak kultivisanja mikobakterija na 10 – 14 dana i povećana osetljivost izolacije mikobakterija (86).

## 1.8.2 Identifikacija mikobakterija

U postupku identifikacije *M. tuberculosis* i diferencijacije od ostalih mikobakterija najčešće se određuju:

- ❖ mikroskopski izgled bacila (crveni bacili obojeni po Z – N)
- ❖ makroskopski izgled kolonija (hrapave kolonije liče na karfiol)
- ❖ brzina rasta (rast nakon inkubacije od 3 do 6 nedelja na temperaturi 35 do 37°C)
- ❖ biohemijski testovi (pozitivan niacin test i test redukcije nitrata)
- ❖ dezoksiribonukleinska kiselina (DNK) probe (82, 87).

## 1.8.3 Biohemijska identifikacija *Mycobacterium tuberculosis*

U identifikaciji izolovanih sojeva mikobakterija opisan je veliki broj biohemijskih testova. Neki od ovih testova se mogu koristiti za razlikovanje dve ili tri vrste, te je neekonomično sve te testove izvoditi za svaki izolat. Kako se iz kliničkih uzoraka najčešće izoluje *M. tuberculosis*, preporučuje se upotreba *screening* testova za razlikovanje *M. tuberculosis* od ostalih mikobakterija (82). Upotreba niacin testa i testa redukcije nitrata u kombinaciji sa kulturelnim i mikroskopskim katarakteristikama *M. tuberculosis*, omogućuje identifikaciju više od 95 % sojeva *M. tuberculosis* (80).

### ❖ Niacin test

Sve mikobakterije proizvode niacin ili nikotinsku kiselinu, koji učestvuju u metabolizmu stvaranja energije. Niacin je prekursor u biosintezi koenzima nikotinamid adenin dinukleotid (NAD) (85). Međutim, *M. tuberculosis* nema enzim potreban za konverziju slobodnog niacina do NAD što rezultira akumulacijom niacina u kulturi i to je od pomoći u definitivnoj dijagnozi *M. tuberculosis* (87). U reakciji niacina sa hlorcijanidom i hloraminom T, otvara se piridinski prst u niacinu i nastaje aldehid gama – karboksi glutamat koji vezuje aromatični amin stvarajući žutu boju. Niacin negativni sojevi *M. tuberculosis* su vrlo retki (87).

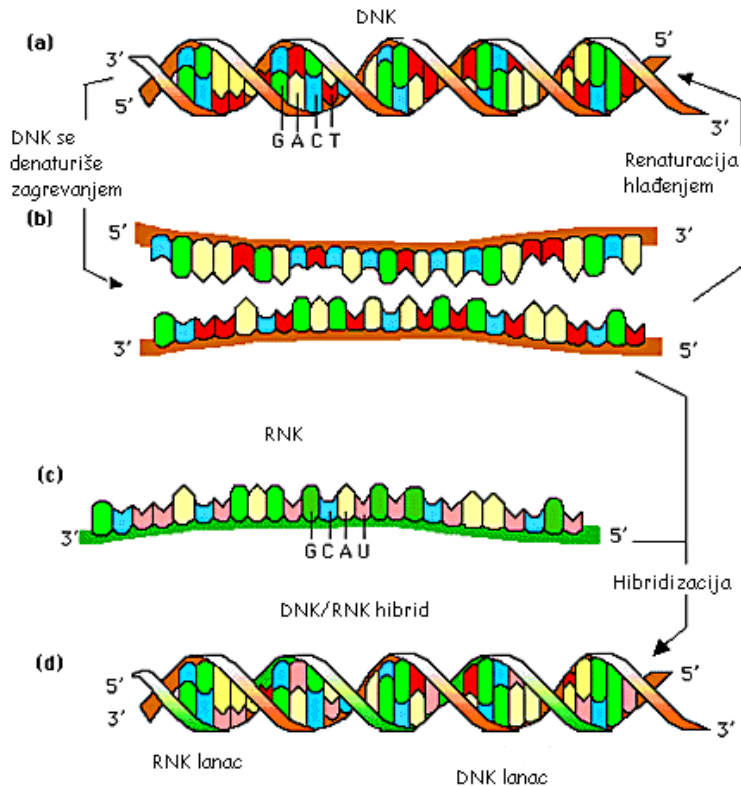
❖ Test redukcije nitrata

*M. tuberculosis* je jedan od najjačih reduktora među mikobakterijama koji sadrži enzim nitroreduktazu koja je sposobna da redukuje nitrata do nitrita. To omogućava primenu ovog testa u kombinaciji sa niacin testom u diferencijaciji *M. tuberculosis* od drugih mikobakterija (85, 87).

#### **1.8.4. Molekularne tehnike za identifikaciju mikobakterija**

Krajem osamdesetih godina 20. veka za detekciju i tipizaciju mikobakterija počinju da se primenjuju metode molekularne biologije koje se zasnivaju na detekciji specifičnih redosleda nukleotida u genomu mikobakterija (84). Jedna od molekularnih tehnika koje se primenjuju u identifikaciji mikobakterija jesu DNK probe (88). Tehnika DNK proba u identifikaciji klinički najznačajnijih vrsta mikobakterija zasniva se na hibridizaciji nukleinske kiseline ispitivane mikobakterije sa obeleženim probama. DNK probe su fragmenti DNK koji sadrže nukleotide (15 do 30) specifične za deo nekog gena ili genoma koji želimo detektovati, a koji se specifično vežu za komplementarnu ribonukleinsku kiselinu (RNK) mikobakterije stvarajući stabilni hibrid DNK – RNK (Slika 8). Najčešće je hibridizacija ribozomalne RNK (rRNK), zbog velikog broja ciljnih kopija RNK (više od 1000) u jednoj bakterijskoj ćeliji (88, 89).

Probe su prvobitno bile obeležene izotopima, a kasnije neradioaktivnim obeleživačima, kao što su biotin ili hemiluminiscentne materije. Prvi test DNK proba komercijalno dostupan bio je *AccuProbe® assay (gen – Probe, Bedford, USA)* test. *AccuProbe® assay* je test koji omogućava identifikaciju sedam značajnih mikobakterija, a osetljivost i specifičnost testa je veća od 90 % (88 – 90).



Slika 8. Proces stvaranja hibridnog lanca DNK / RNK (91)

(a – b) Denaturacija na oko 120°C

(c – d) Proces renaturacije – hibidizacije

U rutinsku dijagnostiku identifikacije mikobakterija uvode se komercijalno dostupni testovi:

- ❖ INNO – LIPA *Mycobacteria* v2 (Innogenetics NV, Belgium) i
- ❖ *GenoType*® *Mycobacterium* (Hain Lifescience, Germany).

Princip testova je reverzna hibridizacija produkata reakcije lančane polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) na nitroceluloznom stripu sa imobilisanim probama za različite vrste mikobakterija. Ciljna sekvenca koja omogućava diferencijaciju vrsta

mikobakterija je 23S rDNK regiona. Testovi omogućuju visoko specifičnu i osetljivu identifikaciju izolovanih kultura mikobakterija u roku od svega nekoliko sati (92, 93).

U našoj zemlji u Referentnoj laboratoriji za mikobakterije u Beogradu koristi se *GenoType® Mycobacterium* testovi za brzu identifikaciju izolovanih mikobakterija. U poređenju sa ostalim komercijalno dostupnim testovima, *GenoType® Mycobacterium* testovi omogućavaju identifikaciju sedam vrsta odnosno podvrsta u okviru *M. tuberculosis* kompleksa i još 29 vrsta / kompleksa medicinski značajnih NTM – a izolovanih iz različitih kliničkih uzoraka. Mnogobrojna ispitivanja su pokazala da je njihova osetljivost 100 %, a specifičnost 97 – 100 % (93, 94).

#### **❖ Princip *GenoType® Mycobacterium* za identifikaciju izolovanih kultura mikobakterija**

Prvi korak u izvođenju ovih testova je izolacija DNK, za koju se prema uputstvima proizvođača koristi jednostavan protokol. Razbijanje ćelijskog zida mikobakterija i oslobađanje DNK iz ćelija postiže se delovanjem visoke temperature i ultrazvuka.

Sledeća faza je reakcija lančane polimeraze PCR amplifikacija ciljnih sekvenci specifičnih za vrstu u okviru 23S rDNK regiona. Prajmeri koji se koriste u ovoj multipleks PCR reakciji obeleženi su biotinom, što znači da su i dobijeni PCR produkti već obeleženi. Nakon hemijske denaturacije dobijenih PCR produkata sledi reverzna hibridizacija sa probama koje su imobilisane na membrani i nisu obeležene. Posle završene hibridizacije i vizuelizacije rezultata, odnosno nakon pojave tamno obojenih linija, na mestima gde je došlo do reakcije hibridizacije, izvodi se interpretacija rezultata u skladu sa uputstvima proizvođača testa. Svi navedeni testovi omogućuju visoko specifičnu i osetljivu identifikaciju izolovanih kultura mikobakterija u roku od svega nekoliko sati (94, 96).

## 1.9 Imunohromatografski test u identifikaciji *Mycobacterium tuberculosis*

U borbi protiv tuberkuloze od velikog je značaja uvođenje novih i lako izvodljivih laboratorijskih testova za brzu i pouzdanu identifikaciju *M. tuberculosis*. Za brzu identifikaciju *M. tuberculosis* iz pozitivnih čvrstih i tečnih kultura razvijena su tri komercijalno dostupna imunohromatografska testa zasnovana na tehnologiji imunohromatografije (97):

- ❖ *Capilia*® (Taunus laboratories, Numazu Japan)
- ❖ *SD Bioline Rapid*® (Standard Diagnostic, Inc, Kyonggi – do, South Korea)
- ❖ BD MGIT Tbc Id® (BD Diagnostic Systems, Sparks, USA).

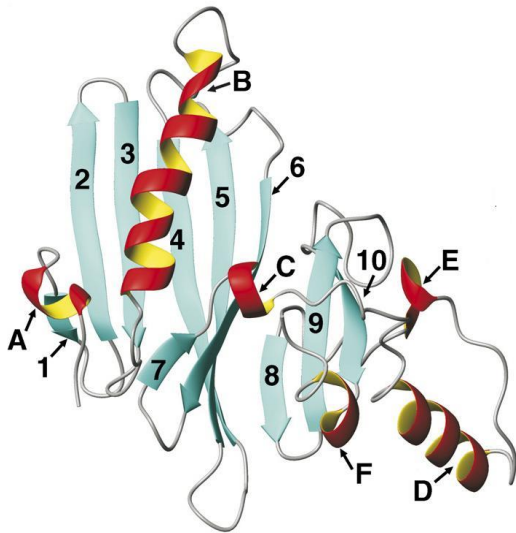
Testovi se razlikuju po svojim karakteristikama, senzitivnosti i specifičnosti. Najčešća primena *Capilia*® testa je u siromašnim zemljama sa visokom incidencijom tuberkuloze (98). Studije u Zambiji i Južnoj Africi pokazuju da su senzitivnost i specifičnost testa u identifikaciji *M. tuberculosis* 99,6 % i 99,5 % (99). Evaluirane su karakteristike *SD Bioline Rapid*® i BD MGIT Tbc Id® testova u identifikaciji *M. tuberculosis* u kojima je dokazana visoka osetljivost i specifičnost testova (100, 101).

Imunohromatografski test se zasniva na detekciji antigena MPT64 (*Mycobacterium Protein Tuberculosis 64*). MPT64 ili *Rv1980c* je sekretovani protein *M. tuberculosis* (102). Harboe i saradnici (103) su prvi otkrili u filtratu kultura *M. tuberculosis* i *M. bovis* 24 kDa antigen MPB64, kasnije nazvan MPT64. Jedan je od dominantnih antigena koji sekretuje *M. tuberculosis* u eksponencijalnoj fazi rasta (104). Od ukupnih proteina koji se nalaze u filtratu kulture *M. tuberculosis*, 8 % pripada MPT64 proteinu sa 228 aminokiselina molekularne mase oko 24 000 (105). Gen koji kodira sintezu proteina MPT64 je *Rv1980c* gen koji je smešten u RD2 (engl. *Region of Difference 2*) genskom lokusu *M. tuberculosis* (106). Studije iz 2010. godine (107) su pokazale da je antigen visoko konzerviran, ali u novijim studijama Jianga i saradnika (108) analizirane su sekvence gena *mpt64* posle amplifikacije koje pokazuju polimorfizam gena što može biti odgovor za promene u produkciji antigena. Antigen MPT64 je visoko specifičan za članove *M. tuberculosis complex*, uključujući: *M.*



*tuberculosis*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedi*, *M. mungi*, *M. orygis* i za neke supsojeve *M. bovis* BCG (engl. *Bacille Calmette – Guerin*, BCG). Nije prisutan kod NTM – a pa tako predstavlja idealnog kandidata za nove vakcine i dijagnostičke testove (109). Struktura antigena MPT64 (Slika 9) otkrivena NMR tehnikom pokazuje C – i N – terminalni deo. Aminoterminalni deo obuhvata dve – trećine proteina sekundarne strukture. U ovom delu zastupljena je  $\beta$  – nabrana ploča gde se pruža dugi  $\alpha$  – heliks pod izrazito ostrim uglom u odnosu na nju. U C – terminalnom delu najdominantniji motiv je  $\alpha$  – heliks sa četiri zavoja koji se pruža ortogonalno iza  $\beta$  – nabrane ploče (110).

Protein MPT64 ima važnu ulogu u imunosti tuberkuloze, jer predstavlja imunodominantni antigen. Vezivanjem antigena MPT64 za površinu makrofaga dolazi do oslobađanja proinflamatornih citokina: IL – 1B, IL – 6, faktor nekroze tumora – alfa (TNF –  $\alpha$ ) i IL – 10 koji se smatra da je povezan sa inhibicijom apoptoze ćelija inficiranih sa virulentnim sojevima mikobakterija (111, 112).



Slika 9. Struktura antigena MPT64 (110)

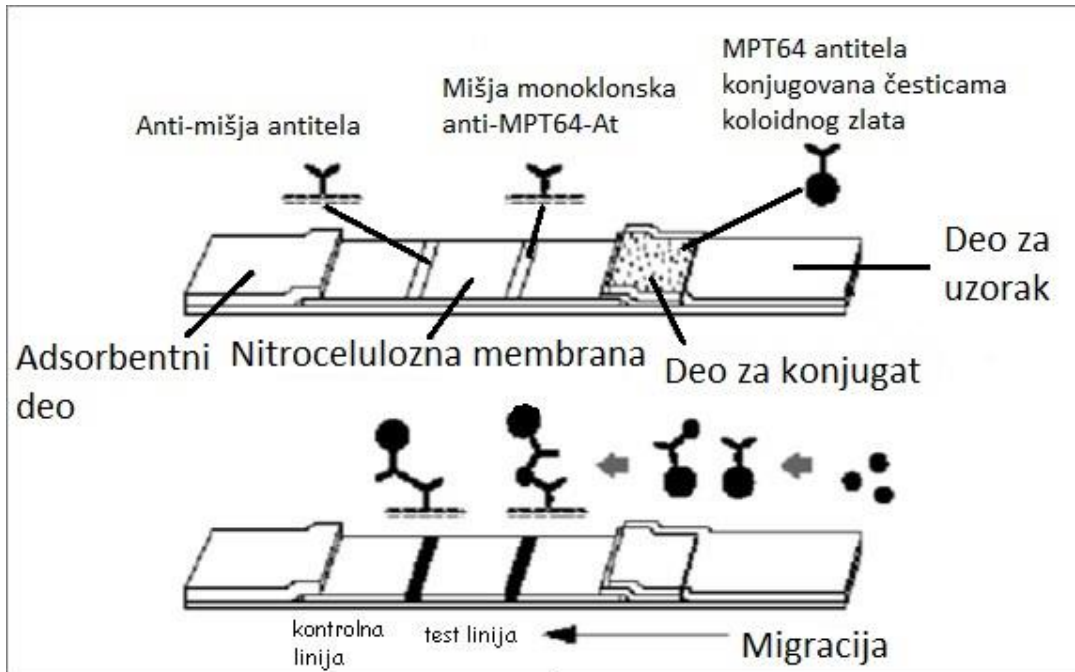
Brojevi pokazuju plavo obojene  $\beta$  – lance, a slova crveno obojene  $\alpha$  – helikse, od N – do C – terminalnog dela, gde N – deo čini dve trećine proteina sekundarne strukture.

### **1.9.1 Princip imunohromatografskog testa u dijagnozi *Mycobacterium tuberculosis***

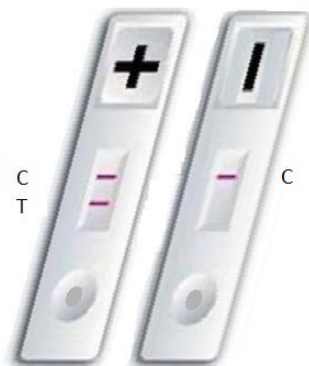
Princip imunohromatografskog testa je vezivanje antigena *M. tuberculosis* MPT64 za mišja monoklonska anti – MPT64 – At koja su imobilisana na nitroceluloznoj membrani. Druga antitela koja prepoznaju drugi epitop MPT64 su konjugovana sa česticama koloidnog zlata i koriste se za vezivanje i detekciju antigena u imunohromatografskom testu „sendvič metoda“. Test je obeležen slovima T i C (test i kontrolna linija), ni jedna linija se ne vidi pre dodavanja uzorka.

Uzorak se dodaje u otvor za uzorak i kreće se kapilarnom migracijom ka delu za konjugat gde se konjugovana antitela vežu za antigen MPT64. Kompleks migrira dalje nitroceluloznom membranom i na test liniji veže se za mišja monoklonska anti – MPT64 – At stvarajući crvenu boju. Ukoliko u uzorku nije prisutan traženi antigen, ne pojavljuje se obojena linija. Pojava jasno vidljive crvene linije uz kontrolnu liniju označava pozitivan rezultat (*Slika 10*) (113).

A)



B)



Pozitivan test    Negativan test

Slika 10. Imunohromatografski test u dijagnostici tuberkuloze (113)

A) Princip testa

B) Rezultat testa

## 2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja su:

- ❖ uporediti konvencionalno biohemijsko ispitivanje sa imunohromatografskim testom u identifikaciji *Mycobacterium tuberculosis*,
- ❖ uporediti molekularni test *Gen – Probe* sa imunohromatografskim testom u identifikaciji *Mycobacterium tuberculosis*,
- ❖ dokazati pouzdanost imunohromatografskog testa u diferencijaciji *Mycobacterium tuberculosis* od netuberkuloznih mikobakterija (NTM) i
- ❖ utvrditi senzitivnost i specifičnost imunohromatografskog testa u identifikaciji *Mycobacterium tuberculosis* na ispitivanom kliničkom uzorku.

### 3 HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Hipoteze istraživanja su:

- ❖ imunohromatografski test je senzitivniji i specifičniji u poređenju sa konvencionalnim biohemijskim ispitivanjem u identifikaciji *Mycobacterium tuberculosis*,
- ❖ imunohromatografski test je u istom opsegu senzitivnosti i specifičnosti sa molekularnim testom (*Gen – Probe*) u identifikaciji *Mycobacterium tuberculosis*,
- ❖ imunohromatografski test je visoko specifičan u dijagnostici *Mycobacterium tuberculosis* i pouzdan u diferenciranju od netuberkuloznih mikobakterija i
- ❖ senzitivnost i specifičnost imunohromatografskog testa na ispitivanom kliničkom uzorku u identifikaciji *Mycobacterium tuberculosis* veći su od 90 %.

## 4 MATERIJAL I METODE

Istraživanje je sprovedeno u periodu od 1.1.2010. do 31.12.2013. godine u Laboratoriji za mikobakterije, Centra za mikrobiologiju, virusologiju i imunologiju Instituta za plućne bolesti Vojvodine u Sremskoj Kamenici. Deo istraživanja obavljen je u Laboratoriji za mikobakterije Univerzitetske Klinike za plućne bolesti i alergije Golnik, Slovenija i u Nacionalnoj referentnoj laboratoriji za tuberkulozu (NRL) u Beogradu.

Identifikacija 50 sojeva *M. tuberculosis* i 50 sojeva NTM – a urađena je molekularnim testom *GenoType® Mycobacterium CM / AS assay* (Hain Lifescience, Germany) u Laboratoriji za mikobakterije Univerzitetske Klinike za plućne bolesti i alergije Golnik. U Nacionalnoj referentnoj laboratoriji za tuberkulozu u Beogradu, kao deo Projekta “Kontrola tuberkuloze u Srbiji“, urađena je identifikacija 250 sojeva *M. tuberculosis* i 50 sojeva NTM – a primenom molekularnog testa *GenoType® Mycobacterium CM / AS assay* (Hain Lifescience, Germany).

Istraživanjem je obuhvaćeno 415 sojeva mikobakterija: 300 sojeva *M. tuberculosis*, 10 sojeva *M. bovis*, 5 sojeva *M. bovis* BCG, 9 referentnih vrsta NTM iz kolekcije sojeva SN (engl. *Stamm Number*) i 100 sojeva različitih vrsta NTM – a (*Tabela 1, 2 i 3*). Kao kontrolni sojevi korišćeni su pozitivna kontrola standardnog referentnog soja *M. tuberculosis* ATCC 25 177 (engl. *American Type Culture Collection*) i negativna kontrola referentnog soja *M. fortuitum* ATCC 6841.

Imunohromatografski test je bio ponovljen kod 90 sojeva *M. tuberculosis* različite starosti kultura od 1 do 5 godina.

Sojevi mikobakterija su izolovani iz respiratornih kliničkih uzoraka: sputuma, uzoraka uzetih tokom bronhoskopije (kateter biopsija, bronholavati i trahealni aspirati) bolesnika lečenih od tuberkuloze u Institutu za plućne bolesti Vojvodine.

Za izolaciju mikobakterija (*M. tuberculosis* i NTM) primenjeno je standardno kulturelno ispitivanje mikobakterija (114).

Uzorci su obrađivani sa 2% natrijum – hidroksidom u toku 15 minuta. Posle centrifugiranja (15 minuta, 3000 xg), sediment je neutralizovan hlorovodoničnom kiselinom 1 % u prisustvu fenoltaleina kao indikatora i zasejavan na dve L – J podloge.

Podloge su inkubirane na 37°C i posmatrane jednom nedeljno u toku tri meseca. Registrovano je vreme pojave prvih vidljivih kolonija (114).

Mikobakterije su identifikovane do nivoa vrste, primenom standardnih biohemijskih testova (115), molekularnog testa *GenoType*® *Mycobacterium* (Hain Lifescience, Germany) i imunohromatografskog testa BD MGIT Tbc Id, Becton Dickinson Diagnostic, Sparks USA (116, 117).

Tabela 1. Različiti sojevi mikobakterija testirani imunohromatografskim testom – MGIT TBc Id

<b>Vrsta</b>	<b>Izolati (n)</b>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	300
<i>Mycobacterium bovis</i>	10
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	5

Tabela 2. Vrste netuberkuloznih mikobakterija testirane imunohromatografskim testom MGIT TBc Id

Vrsta	Izolati (n)
<i>Mycobacterium xenopi</i>	25
<i>Mycobacterium avium</i>	15
<i>Mycobacterium kansasii</i>	10
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	5
<i>Mycobacterium abscessus</i>	15
<i>Mycobacterium shimoidei</i>	2
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	5
<i>Mycobacterium malmoensae</i>	2
<i>Mycobacterium gordonae</i>	5
<i>Mycobacterium terrae</i>	5
<i>Mycobacterium flavescens</i>	4
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	3
<i>Mycobacterium marinum</i>	2
<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	1
<b>Ukupno</b>	100



Tabela 3. Vrste referentnih sojeva NTM – a testirane imunohromatografskim testom MGIT TBc Id

Vrsta	Soj
<i>Mycobacterium vaccae</i>	SN 901
<i>Mycobacterium xenopi</i>	SN 1266
<i>Mycobacterium avium</i>	SN 304
<i>Mycobacterium kansasii</i>	SN 2061
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	ATCC 13950
<i>Mycobacterium abscessus</i>	ATCC 19977
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	SN 208
<i>Mycobacterium terrae</i>	ATCC 15755
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	SN 6

Kao negativna kontrolna u istraživanje je uključeno 100 sojeva Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija (n = 19 vrsta) izolovanih iz kliničkih uzoraka: bris grla i nosa, sputuma, trahealnog aspirata i bronholavata bolesnika hospitalizovanih u Institutu za plućne bolesti Vojvodine, *Tabela 4*.

Za izolaciju i identifikaciju Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija primenjeno je standardno bakteriološko – kulturelno i biohemijsko ispitivanje. Konačna identifikacija do nivoa vrste potvrđena je komercijalnim identifikacionim sistemima za Gram pozitivne bakterije (BBL Crystal Identification Systems Gram positive ID kit, Beckton Dickinson, USA), za slabofermentujuće bakterije i enterobakterije (BBL Crystal Identification Systems, Enteric / Nonfermenter ID kit, Beckton Dickinson, USA) (118).

Tabela 4. Vrste Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija izolovane iz respiratornih kliničkih uzoraka (negativna kontrola)

Vrsta	Broj izolata (n)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	5
<i>Streptococcus pyogenes</i>	5
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	10
<i>Streptococcus viridans</i>	5
<i>Enterococcus faecalis</i>	3
<i>Enterococcus faecium</i>	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
<i>Escherichia coli</i>	10
<i>Enterobacter cloacae</i>	5
<i>Proteus mirabilis</i>	3
<i>Citrobacter freundii</i>	3
<i>Haemophilus influenzae</i>	2
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1
<i>Oligella ureolytica</i>	1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2
<b>Ukupno</b>	100

## 4.1 Biohemijska identifikacija mikobakterija

U cilju identifikacije mikobakterija do nivoa vrste primenjeni su biohemijski testovi: produkcija niacina, redukcije nitrata, semikvantitativni test katalaze.

### 4.1.1 Izvođenje niacin testa po Konno-u

Ispitivana kultura mikobakterija prelivena je sterilnom destilovanom vodom (1 do 2 ml) i ostavljena na sobnoj temperaturi 60 – 90 minuta u ukošenom položaju, tako da tečnost prekriva celu površinu podloge i omogućava da se niacin ekstrahuje.

Pipetom iz podloge je preneto 0,5 ml tečnog ekstrakta i dodano 1 ml 1% rastvora cijanida i 1 ml 5 % rastvora hloramina T.

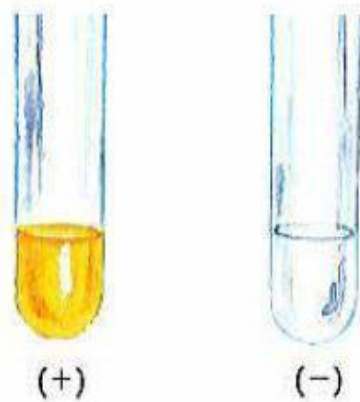
Reakcija je očitana nakon 5 minuta stajanja na sobnoj temperaturi.

#### Očitavanje rezultata:

- ❖ Pozitivna reakcija je detektovana pojavom žute boje (hloraminska kiselina u prisustvu amina sa jedinjenjima cijanida stvara žuto obojenje) (*Slika 11*) (119).

#### Kontrole:

- ❖ pozitivna kontrola *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv
- ❖ negativna kontrola neinokulisana podloga.



Slika 11. Test niacina (119)

Test pozitivan (+), negativan (-).

### 4.1.2 Izvođenje testa redukcije nitrata po Virtanen – u

Kulture koje su se testirale na redukciju nitrata moraju biti stare četiri nedelje i preporučena je L – J podloga sa obilnim porastom. Sa supkulture L – J podloge napravljena je gusta suspenzija mikobakterija u koju je dodano 2 ml natrijum – nitrata supstrata i inkubirano je na 37°C tri sata. Nakon inkubacije dodano je:

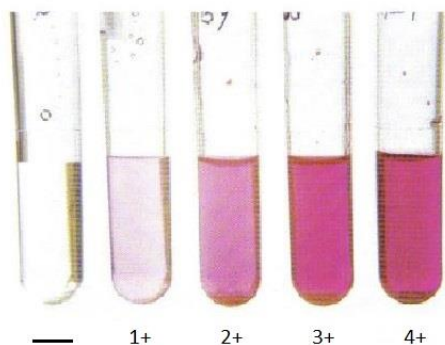
- ❖ reagens A – 0,25ml rastvora hlorovodonične kiseline
- ❖ reagens B – 0,25ml rastvora sulfonil – amida
- ❖ reagens C – 0,25ml N – naftiletilen – diamin .

#### Očitavanje rezultata:

- ❖ Test je pozitivan ako je reakcija od ružičaste do tamno crvene boje.
- ❖ Negativna reakcija – nema promene boje.

#### Kotrole:

- ❖ negativna kontrola – *Mycobacterium bovis* BCG
- ❖ pozitivna kontrola – *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (Slika 12) (120).



Slika 12. Redukcija nitrata (120)

Test je pozitivan ako je reakcija od ružičaste do tamnocrvene boje:

- ❖ jasnoružičasto = 1+
- ❖ tamnoružičasto = 2+
- ❖ crveno = 3+
- ❖ tamnocrveno = 4+

Negativna reakcija ( – ): nema promene boje.

### 4.1.3 Izvođenje testa katalaze

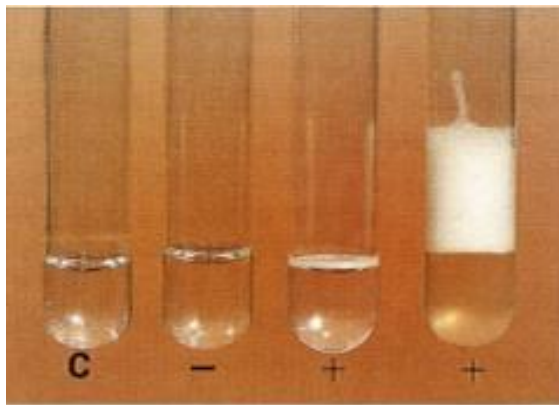
Test se izvodio u epruveti u koju je dodano sterilnom pipetom 0,5 ml 0,67 M fosfatnog pufera pH 7,0 i napravljena je suspenzija ispitivane kulture mikobakterija. Napravljena gusta suspenzija ispitivane kulture mikobakterija zagrevana je u vodenom kupatilu na 68°C dvadeset minuta. Ohlađenoj suspenziji dodano je 0,5 ml sveže pripremljene mešavine Tween peroksida.

#### Očitavanje rezultata:

Posmatrano je formiranje mehurića koji su se pojavili na površini tečnosti. Test je bio negativan kod *M. tuberculosis*, a pozitivan test ukazivao je na NTM (Slika 13) (115).

#### Kontrole:

- ❖ pozitivna kontrola – *Mycobacterium fortuitum* (*M. fortuitum*)
- ❖ negativna kontrola – neinokulisana podloga.



Slika 13. Test katalaze (115)

C- negativna kontrola

(-) – test katalaze negativan

(+) – nizak stub katalaze

(+) – umereno visok stub mehurića

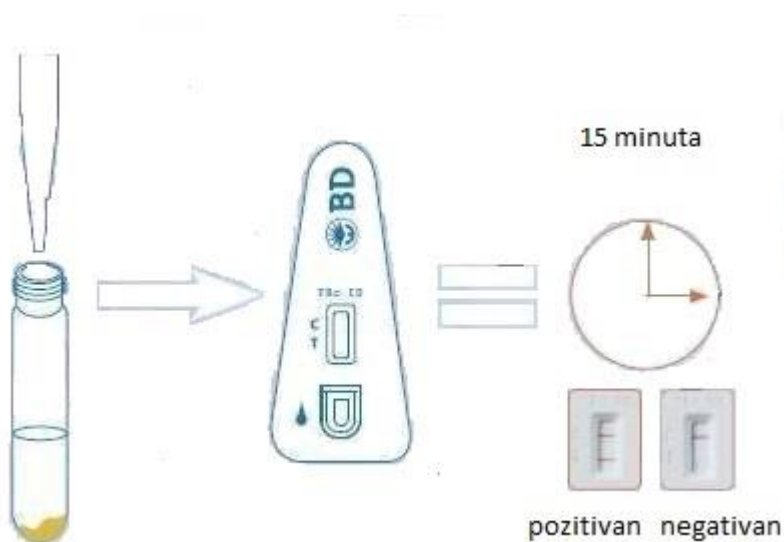
## 4.2 Izvođenje imunohromatografskog testa u identifikaciji mikobakterija

Testiranje je izvršeno u skladu sa uputstvom proizvođača. Sa L – J pozitivne podloge 2 – 4 kolonije se suspenduju u 200  $\mu$ l ekstrakcionog pufera (fosfatni pufer sa 0,05 % Tween 20 i 0,02 % natrijum – azida). Zatim se 100  $\mu$ l doda u otvor test trake. Nakon 15 minuta očitava se rezultat (Slika 14).

### Očitavanje rezultata:

Pozitivan test – prisutna obojena crvena linija u području T (test linija). Prisutna obojena crvena linija u području C (kontrolna linija).

Negativan test – prisutna linija u području C (kontrolna linija), nedostatak linije u području T (test linija).



Slika 14. Izvođenje imunohromatografskog testa i interpretacija rezultata.

Pozitivan rezultat – dve jasno vidljive crvene linije (prisutan antigen MPT64 *M. tuberculosis*).

Negativan rezultat – vidljiva kontrolna linija, nije prisutan antigen MPT64.

### 4.3 Molekularni test u identifikaciji mikobakterija

U identifikaciji izolovanih mikobakterija primenjen je komercijalno dostupan molekularni test *GenoType® Mycobacterium CM / AS assay* (Hain Lifescience, Germany). Ovim molekularnim testom izvodi se i amplifikacija DNK i hibridizacija DNK.

#### 4.3.1 Izolacija DNK mikobakterija

Pripremanje uzorka rađeno je prema uputstvu proizvođača.

Sa L – J podloge kolonije mikobakterija suspendovane su u vodi. Dobijena bakterijska suspenzija je centrifugirana (10000 g, 15 minuta), a sediment resuspendovan u 100 µL vode. Resuspendovan sediment je zagrevan na 95°C 20 minuta i inkubiran u ultrasoničnom kupatilu 15 minuta. Nakon toga sediment je centrifugiran (13000 g, 5 minuta) i 5 µl supernatanta se koristilo za PCR amplifikaciju (116, 117).

#### 4.3.2 Amplifikacija – umnožavanje DNK PCR

Amplifikaciona smeša (45 µl) je sadržila 5 µL ekstrahovane DNK (20 – 100 ng DNK) i reakcionu smešu koju je činilo 35 µL prajmer nukleotida i 5 µL 10 x polimeraza inkubacionog pufera za Hotstar Taq (QIAGEN, Hilden, Germany), 2 µl magnezijum – hlorida, 3 µl vode i 0,2 µl Taq polimeraze.

Amplifikacija je izvršena u TermalCycler, GMI, Inc, USA koja je obuhvatala:

- ❖ ciklus denaturacije (DEN): 15 minuta 95°C – 1 ciklus
- ❖ vezivanje prajmera 30 sekundi 95°C, 2 minuta 58°C – 10 ciklusa  
20 ciklusa: 25 sekundi 95°C, 40 sekundi 53°C, 40 sekundi 70°C
- ❖ Ekstenzija prajmera: 8 minuta 70°C – 1 ciklus

Amplifikacioni produkti čuvani su na + 8°C do – 20°C.

### 4.3.3 Hibridizacija DNK

Hibridizacija DNK je urađena u mašini za hibridizaciju *TwinCubator*® u programu P1 za hibridizaciju postupka, a istovremeno funkcioniše kao vodeno kupatilo i kao platforma za hibridizaciju.

U svaki ugao platforme za hibridizaciju dodano je po 20 µl denaturisanog rastvora (DEN) i 20 µL amplifikacionog produkta i inkubirano 5 minuta na sobnoj temperaturi.

Nakon toga je dodano 1 ml prethodno zagrejanog pufera za hibridizaciju (HYB, Green) uz blago mešanje do pojave boje. Zatim su DNK trake postavljene na platformu tako da su bile natopljene rastvorom i platforma je stavljena u inkubator, inkubirana 30 minuta na 45°C, a nakon toga je aspiriran ukupan HYB pufer. Svaka DNK traka je ispirana sa 1 ml rastvora za ispiranje, inkubirana 15 minuta na 45°C. Trake DNK su ponovo ispirane sa 1 ml Ringerovog rastvora i inkubirane 1 minut. Dodano je 1 ml razblaženog konjugata, inkubirano 30 minuta. Ponovo je ispirano sa 1 ml Ringerovog rastvora, inkubirano 1 minut. Dodano je 1 ml razblaženog supstrata i inkubirano od 2 do 10 minuta u tami. Reakcija je zaustavljena ispiranjem dva puta sa destilovanom vodom. Trake su osušene između dva sloja upijajućeg papira. Pojava tamno obojenih linija na mestima gde je došlo do hibridizacije koristila se za interpretaciju rezultata u skladu sa uputstvima proizvođača testa (*Slika 15*).

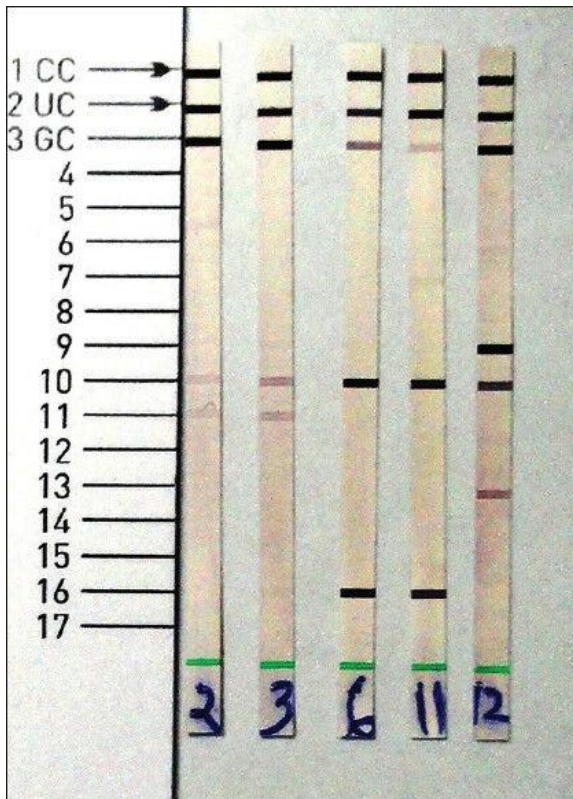
Kao kontrolni sojevi mikobakterija u izvođenju testa koristili su se:  
standardni soj *M. tuberculosis* H<sub>37</sub> Rv 27294

*M. fortuitum* ATCC 6841

*M. intracellularae* ATCC 13950

*M. abscessus* ATCC 19977





Slika 15. *GenoType*® *Mycobacterium* CM/AS assay

Test za brzu diferencijaciju različitih vrsta mikobakterija.

Sojevi 2, 3, 12 su identifikovani kao NTM, a sojevi 6 i 11 kao *M. tuberculosis*.

#### **4.4 Statistička obrada rezultata**

U statističkoj obradi rezultata korišćeni su parametri deskriptivne statistike. Za procenu značajnosti razlike korišćen je Pirsonov  $\chi^2$  - test. Statistički značajnim smatrane su vrednosti od  $p < 0,05$ . Za proračun osetljivosti i specifičnosti testova, pozitivne i negativne prediktivne vrednosti korišćen je Cochen – ov. Upoređivanje ispitivanih metoda vršeno je McNemar testom i Kappa statističkom analizom.

## 5 REZULTATI

### 5.1. Izolacija mikobakterija iz respiratornih uzoraka

U toku četvorogodišnjeg istraživanja u periodu od 1.1.2010. do 31.12.2013. izvršen je pregled 43563 respiratorna uzorka bolesnika lečenih u Institutu za plućne bolesti Vojvodine u Sremskoj Kamenici. Iz pregledanih 43 563 respiratorna uzorka, mikobakterije su izolovane iz 3469 uzoraka, dok je 40 094 uzoraka kultura ostala negativna – bez bakterijskog porasta. Ovi rezultati su prikazani u *Tabeli 5*.

Tabela 5. Distribucija pregledanih respiratornih uzoraka u odnosu na izolaciju mikobakterija izraženo procentom

Nalaz mikobakterija	Broj uzoraka	%
<b>Pozitivan</b> Mikobakterija	3 469	8
<b>Negativan</b>	40 094	92
<b>Ukupno</b>	43 563	100

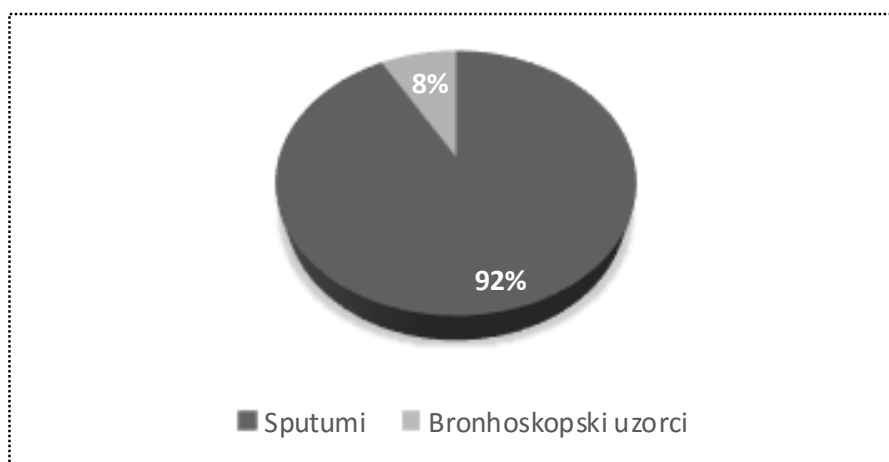
U ispitivanom periodu od ukupno 3 469 sojeva mikobakterija izolovanih iz respiratornih uzoraka, tokom 2010. godine izolovano je 1 005 sojeva mikobakterija, tokom 2011. godine 939, 746 izolata tokom 2012. godine i 779 izolata tokom 2013. godine. Ne postoji opadajući ni rastući trend izolacije mikobakterija u ispitivanom periodu što potvrđuje i koeficijent korelacije ( $r = 0,31$ ). Srednja vrednost procenta izolovanih mikobakterija varira oko  $\bar{x} = 8\%$  sa standardnom devijacijom  $\sigma = 0,45$ . Najveći broj pregledanih uzoraka bio je tokom 2010. godine 12 717 uzoraka, a najmanji broj uzoraka tokom 2013. godine 9 163 uzoraka. Ovi rezultati su prikazani u *Tabeli 6*.

Tabela 6. Prikaz distribucije izolovanih mikobakterija u odnosu na broj pregledanih uzoraka po godinama istraživanja, izraženo procentom

Godina	Broj uzoraka	Izolovane mikobakterije (n)	%
2010	12 717	1005	7,9
2011	11 648	939	8,1
2012	10 035	746	7,4
2013	9 163	779	8,5
<b>Ukupno</b>	<b>43 563</b>	<b>3 469</b>	<b>8,0</b>

Najveći procenat izolovanih mikobakterija bio je 2013. godine, a najmanji procenat 2012. godine.

Većina respiratornih uzoraka iz kojih su izolovani sojevi mikobakterija bili su sputumi, a ostale su činili bronhoskopski uzorci (kateter biopsija, aspirat bronha, aspirat traheje i bronhoalveolarnilavat) (*Grafikon 1*).



Grafikon 1. Prikaz distribucije respiratornih uzoraka

U toku četvorogodišnjeg istraživanja iz sputuma je izolovano 3 298 sojeva mikobakterija, a iz bronhoskopskih uzoraka 171 izolat. Nakon primene z – testa ( $z = 7,31$ ) dobijena je statistički značajna razlika u procentima izolovanih mikobakterija iz sputuma u odnosu na izolaciju iz bronhoskopskih uzoraka. Rezultati su prikazani u *Tabeli 7*.

Tabela 7. Prikaz distribucije izolovanih mikobakterija u odnosu na vrstu respiratornih uzoraka

	<b>Sputum</b>	<b>Bronhoskopski uzorci</b>	<b>Ukupan broj uzoraka</b>
<b>Izolovane mikobakterije</b>	3298	171	3 469
<b>%</b>	91,8	8,2	100
<b>Ukupan broj uzoraka</b>	39 992	3 571	43 563

### 5.1.1 Identifikacija izolovanih sojeva mikobakterija

Svi izolovani sojevi mikobakterija su identifikovani konvencionalnim biohemijskim ispitivanjima koja pokazuju da je 3 089 izolovanih mikobakterija identifikovano kao *M. tuberculosis* i 380 kao NTM. Na osnovu Pirsonovog  $\chi^2$  testa sa pouzdanošću  $p = 0,91$  potvrđujemo da je procenat *M. tuberculosis* 89 %, a NTM – a 11 %. Rezultati su prikazani u *Tabeli 8*.

Tabela 8. Prikaz biohemijske identifikacije mikobakterija izraženo brojem i procentom

Vrsta mikobakterija	Broj identifikovanih mikobakterija	%
<i>M. tuberculosis</i>	3 089	89
NTM	380	11
<b>Ukupno</b>	3 469	100

Među uslovno patogenim NTM sporog rasta, *M. xenopi* je bila najzastupljenija u četvorogodišnjem istraživanju, identifikovana je kod 55,3 % NTM izolata. Na drugom mestu po učestalosti izolacije je *Mycobacterium avium complex* (MAC) koji čine *M. avium* i *M. intracellulae* sa 10,5 % NTM izolata. Među uslovno patogenim NTM brzog rasta, prevladavaju *M. abscessus* i *M. fortuitum* sa 10,7 % i 6,8 % NTM izolata. Na osnovu Pirsonovog  $\chi^2$  testa sa pouzdanošću  $p = 0,80$  zaključujemo da je procenat izolacije bakterija NTM – a sporog rasta 80 %, a bakterija brzog rasta 20 %. Od saprofitnih mikobakterija najzastupljenija je *M. gordonae*, identifikovana je u 8,4 % NTM izolata. Na osnovu Pirsonovog  $\chi^2$  testa sa pouzdanošću  $p = 1,00$  procenat izolacije saprofitnih bakterija sporog rasta je 87 %, a bakterija brzog rasta 13 %. Ne postoji statistički značajna razlika u izolaciji uslovno patogenih NTM – a sporog (brzog) rasta u odnosu na izolaciju saprofitnih NTM – a ( $z = 1,17$ ). Ovi rezultati prikazani su u Tabeli 9.

Tabela 9. Prikaz izolovanih netuberkuloznih mikobakterija (NTM) u periodu od 2010 – 13. godine, izraženo brojem i procentom

Uslovno patogene mikobakterije	Vrsta	Broj	%
<b>Sporog rasta</b>	<i>Mycobacterium xenopi</i>	210	55,3
	<i>Mycobacterium avium complex</i>	40	10,5
	<i>Mycobacterium kansasii</i>	5	1,3
	<i>Mycobacterium marinum</i>	2	0,5
	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	2	0,5
	<i>Mycobacterium malmoense</i>	2	0,5
<b>Brzog rasta</b>	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	26	6,8
	<i>Mycobacterium abscessus</i>	41	10,7
<b>Saprofitne mikobakterije</b>			
<b>Sporog rasta</b>	<i>Mycobacterium gordonae</i>	34	8,4
	<i>Mycobacterium terrae</i>	8	2,1
	<i>Mycobacterium triviale</i>	2	0,5
	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	1	0,2
<b>Brzog rasta</b>	<i>Mycobacterium flavescens</i>	1	0,2
	<i>Mycobacterium spp</i>	6	1,5
<b>Ukupno</b>		380	100

Među odabranih 400 izolovanih sojeva mikobakterija 300 (75 %) su identifikovani kao *M. tuberculosis*. Svi izolati mikobakterija identifikovani kao *M. tuberculosis* su imali pozitivnu reakciju nitrata i niacin testa, dok je test katalaze bio negativan. Od 400 odabranih sojeva 100 (25 %) bile su NTM. Rezultati su prikazani u *Tabeli 10* i *Tabeli 11*.

Tabela 10. Rezultati biohemijskog ispitivanja *M. tuberculosis* izraženo brojem i procentom

Test	Rezultat	Broj sojeva <i>M. tuberculosis</i>	%
<b>Redukcija nitrata</b>	Pozitivan	300	100
	Negativan	0	-
<b>Niacin test</b>	Pozitivan	300	100
	Negativan	-	0
<b>Test katalaze 68°C</b>	Pozitivan	-	-
	Negativan	300	100
<b>Ukupno</b>		300	

Tabela 11. Rezultati biohemijskog ispitivanja NTM izraženo brojem i procentom

Test	Rezultat	Broj sojeva NTM	%
<b>Redukcija nitrata</b>	Pozitivan	30	30
	Negativan	70	70
<b>Niacin test</b>	Pozitivan	-	-
	Negativan	100	100
<b>Test katalaze 68°C</b>	Pozitivan	88	88
	Negativan	12	12
<b>Ukupno</b>		100	



Nakon biohemijske identifikacije, kod 300 sojeva *M. tuberculosis* i 100 sojeva NTM identifikacija je potvrđena komercijalno dostupnim molekularnim testom *GenoType® Mycobacterium*. Molekularni test je bio pozitivan kod svih 300 ispitivanih sojeva *M. tuberculosis*. Rezultati su prikazani u *Tabeli 12*.

Tabela 12. Prikaz rezultata identifikacije mikobakterija *GenoType® Mycobacterium* testom

<i>GenoType® Mycobacterium</i>			
Izolati (n)	Pozitivan	Negativan	Ukupno
<i>M. tuberculosis</i>	300	-	300
NTM	-	100	100

## 5.2. Karakteristike imunohromatografskog testa MGIT TBc Id

Imunohromatografskim testom identifikovano je 299 sojeva *M. tuberculosis*. Test je bio lažno negativan kod jednog soja *M. tuberculosis*. Testiranje je upoređeno sa pozitivnom i negativnom kontrolom, prikazano u *Tabeli 13*.

Tabela 13. Prikaz rezultata imunohromatografskog testa u identifikaciji *M. tuberculosis*

MGIT TBc Id test	<i>M. tuberculosis</i> (n)	Referentni soj pozitivna kontrola <i>M. tuberculosis</i> ATCC 25177	Referentni soj negativna kontrola <i>M. fortuitum</i> ATCC 6841
<b>Pozitivno</b>	299	1	0
<b>Negativno</b>	1	0	1
<b>Ukupno</b>	300	1	1
<b>%</b>	Senzitivnost $299/300 \times 100 = 99,7\%$		

U identifikaciji *M. tuberculosis complex*, imunohromatografski test je pozitivan kod *M. tuberculosis* i *M. bovis*, a negativan kod ispitivanih sojeva *M. bovis* BCG. Rezultati su prikazani u *Tabeli 14*.

Tabela 14. Prikaz rezultata imunohromatografskog testa u identifikaciji *M. tuberculosis complex*

<b>MGIT Tbc Id test</b>	<b><i>Mycobacterium tuberculosis</i> (n)</b>	<b><i>Mycobacterium bovis</i> (n)</b>	<b><i>Mycobacterium bovis BCG</i> (n)</b>
<b>Pozitivno</b>	299	10	0
<b>Negativno</b>	1	0	5
<b>Ukupno</b>	300	10	5

Rezultat imunohromatografskog testa je bio pozitivan kod referentnih sojeva *M. tuberculosis* i *M. bovis*, a negativan kod svih referentnih vrsta NTM – a. Ovi rezultati su prikazani u *Tabeli 15*.

Tabela 15. Rezultat testiranja referentnih sojeva sa imunohromatografski testom

Vrsta	Referentni soj	MGIT Tbc Id (rezultat)
<i>M. tuberculosis complex</i>		
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ATCC 25177	+
<i>Mycobacterium bovis</i>	ATCC 19210	+
Vrste NTM – a		
<i>Mycobacterium xenopi</i>	SN 1266	-
<i>Mycobacterium avium</i>	SN 304	-
<i>Mycobacterium kansasii</i>	SN 2061	-
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	ATCC 13950	-
<i>Mycobacterium abscessus</i>	ATCC 19977	-
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	SN 208	-
<i>Mycobacterium terrae</i>	ATCC 15755	-
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	SN 6	-
<i>Mycobacterium vaccae</i>	SN 901	-

Tabela 16. Prikaz rezultata testiranja imunohromatografskim testom izolovanih vrsta NTM – a iz respiratornih uzoraka u periodu 2010 – 2013. godine

Vrsta	Izolati (n)	MGIT TBc Id (rezultat)
<i>Mycobacterium xenopi</i>	25	-
<i>Mycobacterium avium</i>	15	-
<i>Mycobacterium kansasii</i>	10	-
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	5	-
<i>Mycobacterium abscessus</i>	15	-
<i>Mycobacterium shimoidei</i>	2	-
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	5	-
<i>Mycobacterium malmoensae</i>	2	-
<i>Mycobacterium gordonae</i>	5	-
<i>Mycobacterium terrae</i>	5	-
<i>Mycobacterium flavescens</i>	4	-
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	3	-
<i>Mycobacterium marinum</i>	2	-
<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	1	-
<b>Ukupno</b>	100	
<b>Specifičnost</b>		100%

Sve vrste n = 14 NTM – a testirane imunohromatografskim testom pokazale su negativan rezultat.

U istraživanje je uključeno 100 sojeva Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija (n = 19 vrsta) kao negativna kontrola. Test je bio negativan kod svih testiranih bakterija. Ovi rezultati prikazani su u *Tabeli 17*.

Tabela 17. Rezultat testiranja 100 sojeva Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija imunohromatografskim testom

<b>Vrsta</b>	<b>Broj izolata</b>	<b>MGIT TBc Id (rezultat)</b>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10	-
<i>Staphylococcus haemoliticus</i>	10	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	5	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	10	-
<i>Streptococcus viridans</i>	5	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	-
<i>Enterococcus faecium</i>	2	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	-
<i>Escherichia coli</i>	10	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	5	-
<i>Proteus mirabilis</i>	3	-
<i>Citrobacter freundii</i>	3	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	2	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1	-
<i>Oligella ureolytica</i>	1	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2	-

Na osnovu rezultata testiranja mikobakterija imunohromatografskim testom dobijene su senzitivnost, specifičnost, pozitivne i negativne prediktivne vrednosti testa, prikazane u *Tabeli 18*.

Tabela 18. Karakteristike imunohromatografskog testa

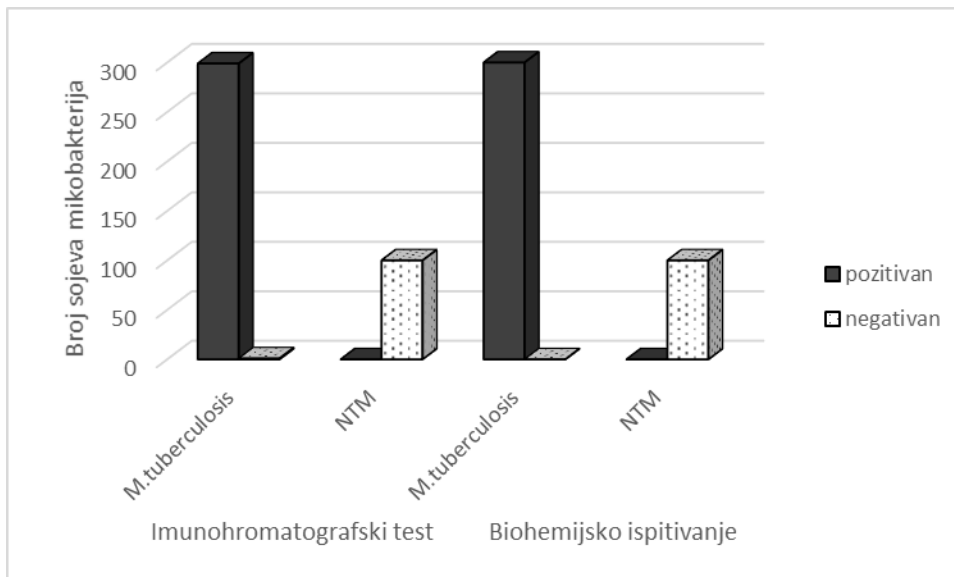
<b>Karakteristike imunohromatografskog testa</b>	<b>%</b>
<b>Senzitivnost</b>	99,7
<b>Specifičnost</b>	100
<b>PPV*</b>	100
<b>NPV**</b>	99

\*PPV – pozitivna prediktivna vrednost

\*\* NPV – negativna prediktivna vrednost

### 5.2.1 Upoređivanje imunohromatografskog testa sa biohemijskim testovima kao standardnom metodom

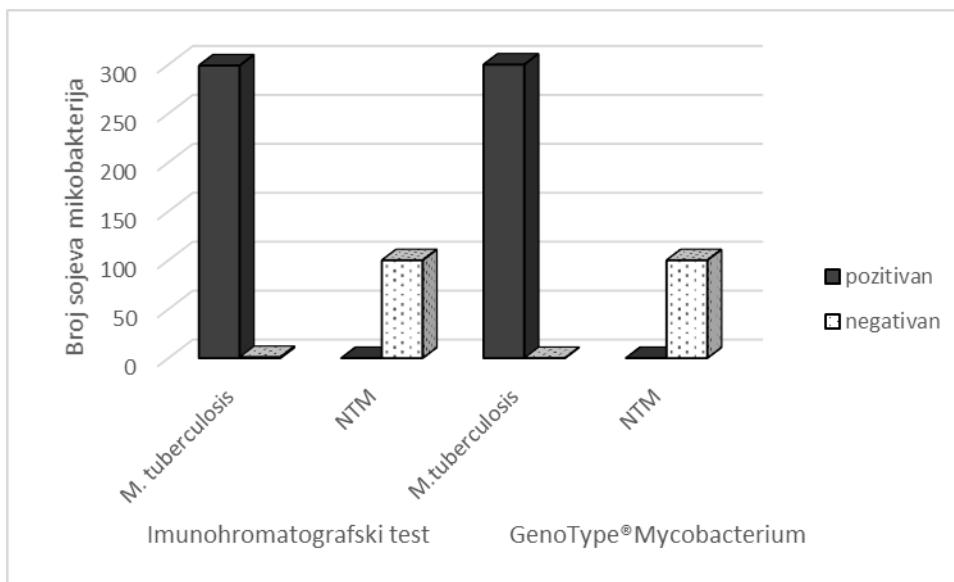
U poređenju imunohromatografskog testa sa konvencionalnim biohemijskim ispitivanjem nije nađena statistički značajna razlika ( $p > 0,5$ ). Kappa vrednost testa iznosila 0,993 a interval poverenja (CI = 0,98 – 1,00) što na osnovu stepena slaganja označava veoma dobro slaganje dva testa. Slaganje nalaza je potvrđeno i McNemar testom o simetričnosti odstupanja u odnosu na dijagonalu sa vrednošću 0,999. Ovi rezultati su prikazani u *Grafikonu 2*.



*Grafikon 2.* Grafički prikaz rezultata imunohromatografskog testa i biohemijskog ispitivanja sojeva *M. tuberculosis* i NTM – a

## 5.2.2 Upoređivanje imunohromatografskog testa sa molekularnim testom *GenoType® Mycobacterium*

U poređenju imunohromatografskog testa sa molekularnim testom *GenoType® Mycobacterium*, vrednost kappa testa je iznosila 0,993 što na osnovu stepena slaganja označava veoma dobro slaganje (CI = 0,98 – 1,00) testova. Slaganje nalaza je potvrđeno i McNemar testom o simetričnosti odstupanja na dijagonalu sa vrednošću 0,99. Ovi rezultati su prikazani u *Grafikonu 3*.



Grafikon 3. Grafički prikaz rezultata imunohromatografskog testa i molekularnog *GenoType® Mycobacterium* testa



### 5.2.3 Ponovljeni imunohromatografski test

Stabilnost antigena MPT64 sekretovanog u podlozi testirana je ponovljenim imunohromatografskim testom kod 90 sojeva *M. tuberculosis*. Test ostaje pozitivan i posle 5 godina od prvog testiranja na čvrstoj L – J podlozi. Ovi rezultati prikazani su u Tabeli 19.

Tabela 19. Rezultat testiranja imunohromatografskim testom 90 sojeva *M. tuberculosis* različite starosti izolacije

<b>Starost pozitivne kulture <i>M. tuberculosis</i> Godina</b>	<b>Broj testiranih sojeva <i>M. tuberculosis</i> n = 90</b>	<b>MGIT TBc Id rezultat % pozitivnih</b>
<b>1</b>	20	100
<b>2</b>	15	100
<b>2,5</b>	15	100
<b>3</b>	10	100
<b>3,5</b>	10	100
<b>4</b>	10	100
<b>4,5</b>	5	100
<b>5</b>	5	100

## 6. DISKUSIJA

Tuberkuloza je odavno poznata bolest koja i danas u 21. veku ima veliki javnozdravstveni značaj širom sveta, a posebno u zemljama u razvoju (121). Globalna incidencija tuberkuloze u 2013. godini iznosila je 128 / 100 000 stanovnika. Podaci o globalnoj raširenosti tuberkuloze su pokazatelji da je još uvek daleka njena eliminacija (122). Sa ciljem suzbijanja tuberkuloze, SZO je kreirala DOTS (engl. *Directly Observed Treatment Short*, DOTS) strategiju lečenja po kratkotrajnom režimu i uzimanja lekova pod nadzorom. Ciljevi DOTS strategije kao osnovnog organizacionog okvira za kontrolu tuberkuloze u svetu su smanjenje mortaliteta i morbiditeta, sprečavanje prenošenja bolesti i razvoja rezistencije na antituberkulotike (123). Programi SZO i Globalnog programa za tuberkulozu za razdoblje „Post – 2015“ godine, usmereni su na razvoj novih lekova i vakcine, poboljšanje dijagnostike i eliminaciju tuberkuloze kao javnozdravstvenog problema (124, 125).

Kasna dijagnoza tuberkuloze, multirezistentna tuberkuloza i udruženost sa HIV infekcijom predstavljaju jednu od najvećih prepreka za efikasnu kontrolu tuberkuloze u svetu (121). Procenjuje se da je kod oko 3 miliona ljudi propušteno postavljanje dijagnoze tuberkuloze što predstavlja poseban problem, jer je smrtnost od nelečene tuberkuloze oko 50 %. Pretpostavlja se da jedan bolesnik sa direktno mikroskopski pozitivnim nalazom sputuma, može da zarazi 10 do 15 novih osoba, što bi se moglo sprečiti pravovremenom dijagnozom bolesti (126). Rano otkrivanje tuberkuloze oslanja se na kvalitetnu bakteriološku dijagnostiku koja je kamen temeljac strategije SZO Stop – TB (127).

U isto vreme (1882. godine) kada je Robert Koh otkrio etiološki agens tuberkuloze, opisana je i tehnika bojenja po *Ziehl – Neelsen* – u. Nalaz acidoalkoholerezistentnih bacila na direktnom preparatu iz kliničkih uzoraka još uvek je najbrži i najjeftiniji metod za detekciju mikobakterija. Njegova niska osetljivost (45 – 80 %) ograničava upotrebu u oblastima niže incidencije tuberkuloze, kod vanplućne tuberkuloze (paucibacilarna forma) i kod bolesnika sa HIV infekcijom. Značajan procenat (17 %) transmisije bolesti javlja se kod direktno negativne plućne tuberkuloze

(128). Specifičnost direktnog mikroskopskog pregleda je niska sa pozitivnim prediktivnim vrednostima (50 – 80 %) u oblastima gde je veća zastupljenost izolacije NTM – a (129).

Primena molekularnih tehnika amplifikacije nukleinskih kiselina (engl. *nucleic acid amplification*, NAA) omogućava direktnu detekciju prisustva *M. tuberculosis* za samo jedan do dva radna dana u ispitivanim uzorcima što značajno doprinosi bržem postavljanju dijagnoze tuberkuloze (130). Amplifikacioni testovi u poređenju sa direktnim mikroskopskim pregledom, imaju veću pozitivnu prediktivnu vrednost (PPV > 95%) prema 50 – 80 % kod direktno pozitivnih uzoraka u sredinama u kojima su NTM često prisutne. Omogućena je brža detekcija *M. tuberculosis* kod 50 – 80 % direktno negativnih uzoraka, a pozitivnih na kulturi. Od amplifikacionih testova najčešće primenjivana tehnika je PCR (131).

Međutim, faktor koji ograničava mogućnost široke primene amplifikacionih testova su veliki materijalni troškovi za inicijalna ulaganja u nabavku uređaja potrebnih za funkcionisanje poluautomatizovanih ili automatizovanih sistema, kao i za dalja ulaganja za nabavku takođe veoma skupog potrošnog materijala (132).

Iako se dijagnoza tuberkuloze često zasniva na radiološkom nalazu i kliničkim manifestacijama, za definitivnu dijagnozu bolesti potrebna je laboratorijska potvrda. Jedini sigurni dokaz bolesti jeste izolacija uzročnika iz kliničkih uzoraka bolesnika (133).

Postupak kultivisanja mikobakterija predstavlja zlatni standard u dijagnostici tuberkuloze i kao takav ima najvažniju ulogu u njenom dokazivanju. Izolovana kultura mikobakterija neophodna je za dalja ispitivanja odnosno postupak identifikacije i testa rezistencije na antituberkulotike (133). SZO je 2007. godine preporučila za standard dijagnostike mikobakterija primenu čvrstih podloga kao što su L – J i njegove modifikacije i primenu tečnih selektivnih podloga automatizovanih sistema (134, 135). Vreme kultivisanja u tečnim podlogama je kraće, a osetljivost im je do 10 % viša u odnosu na čvrste podloge (136, 137).

Pravovremeno otkrivanje, izolacija, identifikacija i ispitivanje osetljivosti *M. tuberculosis* na antituberkulotike je od suštinskog značaja za kontrolu tuberkuloze. Brza identifikacija *M. tuberculosis* omogućava raniju primenu odgovarajućeg lečenja, brže

izlečenje bolesnika, efikasnije sprečavanje širenja oboljenja. Zbog velikog kliničkog i epidemiološkog značaja bolesti ulažu se veliki naponi za razvoj brzih tehnika u identifikaciji uzročnika tuberkuloze (138).

Biohemijskim, imunološkim i molekularno – biološkim ispitivanjima *M. tuberculosis* otkriveno je nekoliko antigena koji bi mogli biti korisni u razvoju dijagnostičkih metoda koje bi omogućile diferencijaciju između *M. tuberculosis* i ostalih uslovno patogenih i apatogenih mikobakterija (139).

Poznato je da *M. tuberculosis* sekretuje više od 33 različita proteina, a jedan od glavnih proteina MPT64 pronađen je samo u tečnosti kultura *M. tuberculosis complex*. Razvijen je novi brzi imunohromatografski test za identifikaciju *M. tuberculosis complex* na osnovu specifičnog vezivanja antigena MPT64 za monoklonska mišja antitela (140).

Monoklonska antitela su dobijena iz hibridoma ćelija mijeloma P3U1 sa ćelijama slezine miša imunizovane sa antigenom MPT64. Brzi imunohromatografski test je jednostavan za primenu u identifikaciji izolovanih sojeva *M. tuberculosis* sa čvrstih i tečnih podloga (140).

U našem istraživanju evaluirane su karakteristike imunohromatografskog MGIT TBc Id testa koji se koristio u identifikaciji referentnih sojeva klinički značajnih vrsta mikobakterija i kliničkih izolata mikobakterija izolovanih iz respiratornih uzoraka bolesnika sa tuberkulozom pluća.

Dokazana je visoka senzitivnost testa u našem radu u identifikaciji izolovanih sojeva *M. tuberculosis* sa čvrstih kultura L – J podloga. Senzitivnost testa je iznosila 99,7 % što se slaže sa rezultatima drugih istraživanja u kojima je senzitivnost iznosila 99 % (141, 142) i 99,6 % (142). Rezultati mnogih istraživanja pokazuju da se senzitivnost MGIT TBc Id testa u identifikaciji *M. tuberculosis* kreće od 98,8 (144) do 100 % (145 – 147) dok je senzitivnost Capilia testa od 92,4 (148) do 99,6 % (149), a Bioline SD Ag MPT64 rapid test od 93,6 (150) do 99,1 % (151) u sličnim studijama. U 17 studija u kojima su primenjena sva tri komercijalno dostupna imunohromatografska testa u identifikaciji *M. tuberculosis*, meta analiza podataka pokazuje visoku osetljivost i specifičnost za sva tri testa, sa visokim PPV i NPV za testirane kliničke izolate *M. tuberculosis*. Nije nađena statistički značajna razlika između testova u osetljivosti i

specifičnosti i kada su u studijama primenjene različite validne referentne metode ( $\chi^2$  – test,  $p > 0,05$  za sva poređenja) (152).

Park i saradnici (141) u svojoj studiji pokazali su, osim visoke senzitivnosti i specifičnosti imunohromatografskog testa, i granicu detekcije antigena MPT64 koja je  $10^5$  CFU / ml. Ismail i saradnici (153) ukazali su na visoku senzitivnost i specifičnost testa sa PPV i NPV: 97 %, 100 %, 100 % i 92 %. Niža NPV (92%) u ovoj studiji se može objasniti lažno negativnim rezultatom.

U našem istraživanju imunohromatografski test bio je lažno negativan kod jednog izolata *M. tuberculosis* čija je identifikacija potvrđena biohemijskim i molekularnim testom. Nekoliko studija je takođe objavilo da su imunohromatografskim testom dobijeni lažno negativni rezultati (154 – 157). Uzrok lažno negativnih rezultata u identifikaciji *M. tuberculosis* mogu biti mutacije u genu *mpt64* ili niska koncentracija antigena koji se sekretuje u aktivnoj fazi rasta *M. tuberculosis*, a koncentracija mu opada sa vremenom stajanja izolovane kulture (154).

Kod 27 od 53 klinički nezavisna izolata kod kojih je imunohromatografski test dao lažno negativan rezultat, sekvencioniran je gen *mpt64*. Mutacije u genu *mpt64* dokazane kod 23 (85 %) izolata (152). Mutacije dovode do nepotpune sinteze proteina u antigenu MPT64 te izostaje vezivanje anti – MPT64 antitela za specifični antigen što dovodi do lažno negativnog rezultata imunohromatografskog testa (152, 154, 158).

Mutacije mogu biti delecije nukleotida, tačkaste mutacije, IS6110 inserciona mutacija na poziciji 177 ili 501 nukleotida (159). Najčešće nađena mutacija je delecija u 63bp poziciji 196 nađena kod 10 izolata u Japanu (154), Tajvanu (144) i Tajlandu (160) tačkaste mutacije u poziciji 388 ili 402 nukleotida (161).

Antigen MPT64 je visoko specifičan protein za *M. tuberculosis complex* (139). Vrste *M. tuberculosis complex* poseduju 99,9 % - tnu sličnost na nivou nukleotida i istu sekvencu 16S rRNK, ali se razlikuju prema tropizmu, fenotipskim karakteristikama i patogenosti (161). Neke vrste su striktni patogeni za čoveka (*M. tuberculosis*, *M. africanum* i *M. canetti*) ili isključivo za glodare (*M. microti*), a *M. bovis* i *M. caprae* su patogeni i za čoveka i za životinje (162 – 164).

Naše istraživanje pokazuje da je *M. tuberculosis* bila najčešće izolovana vrsta mikobakterija sa zastupljenošću 89 % izolata. Iste rezultate pokazuje studija Živanović i saradnika (165) i Žmaka i saradnika (166) o najčešćoj izolaciji *M. tuberculosis* u Srbiji i Hrvatskoj sa zastupljenošću 88 % izolata. Ovi rezultati su očekivani, jer se *M. tuberculosis* u svetu najčešće izoluje iz respiratornih uzoraka. Da je *M. tuberculosis* najčešća i najznačajnija vrsta roda *Mycobacterium* pokazuju podaci o globalnoj raširenosti tuberkuloze. Više od 8 miliona ljudi svake godine razvije aktivnu tuberkulozu, a oko 2 miliona umre (122).

U našem istraživanju imunohromatografskim testom je ispitano 10 izolata *M. bovis* iz kolekcije čuvanih sojeva mikobakterija. Rezultat imunohromatografskog testa bio je pozitivan što se slaže sa rezultatima drugih studija (141, 167). U periodu od 1970. do 1990. (poslednja godina izolacije) u Laboratoriji za mikobakterije Instituta za plućne bolesti Vojvodine izolovan je *M. bovis* kod 7 bolesnika sa bovinom tuberkulozom iz 37 respiratornih uzoraka (168). Nakon ovog perioda *M. bovis* se retko izoluje iz humanih kliničkih uzoraka, a bovina tuberkuloza se sporadično pojavljuje kod ljudi kao reaktivacija stare infekcije ili kao profesionalna bolest (169). Od 19. do sredine 20. veka bovina tuberkuloza kod ljudi, a posebno kod dece nastajala je konzumiranjem svežeg mleka bolesnih goveda ili kontaktom sa bolesnom životinjom. Sprovođenjem obaveznog tuberkulinskog testiranja goveda i žrtvovanjem svih tuberkulinskih reaktora, pasterizacijom mleka i mlečnih proizvoda, postignut je značajan pad učestalosti tuberkuloze goveda. Takve mere su povoljno uticale i na epidemiološku situaciju bovine tuberkuloze kod ljudi (170, 171).

*M. africanum* uzrokuje polovinu slučajeva tuberkuloze u Zapadnoj Africi. Veoma retko može da se izoluje u nekim zemljama Evrope, Nemačkoj, Engleskoj, Francuskoj i Španiji. Izolacija *M. africanum* van regije Zapadne Afrike se najčešće otkriva iz kliničkih uzoraka imigranata ove regije (172). U Srbiji broj imigranata uključujući i imigrante iz Afrike je beznačajan (165).

U našem istraživanju imunohromatografskim testom testirano je 5 sojeva *M. bovis* BCG. Testiran je referentni soj *M. bovis* BCG Varšava i 4 soja *M. bovis* BCG koja su izolovana iz apscesa kod dece kao lokalna komplikacija ubrizgavanja vakcine. Kod svih

testiranih sojeva *M. bovis* BCG rezultat imunohromatografskog testa bio je negativan i slaže se sa rezultatima drugih studija (140, 141, 148).

*M. bovis* BCG je živi atenuisani soj *M. bovis* koji se sporadično izoluje kod osoba sa limfadenitisom kao najčešćom komplikacijom BCG vakcinacije ili kod bolesnika sa karcinomom mokraćne bešike gde se vakcina primenjuje u imunoterapiji (173). Vakcina BCG je najstarija vakcina u upotrebi i najviše primenjivana u svetu (174). Originalni BCG vakcinalni soj koji je nastao u periodu od 1908. do 1921. godine distribuisan je u mnoge laboratorije širom sveta koje su koristile različite tehnike za održavanje njegove vijabilnosti, a to je dovelo do velikih razlika u BCG familiji (175). Tako su nastali različiti subsojevi BCG – a koji se koriste u mnogim zemljama i regionima širom sveta, a naziv su dobili po zemlji u kojoj se koriste (176, 177).

Supsojevi BCG se razlikuju po svojim morfološkim, biohemijskim i imunološkim karakteristikama. Supsojevi BCG: Japan, Brazil, Rusija i Švedska imaju konzerviran RD2 genski lokus u kome je smešten gen *mpt64* koji kodira produkciju proteina MPT64 (177, 178).

Naši testirani sojevi BCG Varšava i vakcinalni soj BCG Paster koji se koristi u Srbiji nemaju RD2 genski lokus kao i subsojevi Glaxo, Tice, Copenhagen i njihovi derivati BCG CSL (178).

Specifičnost imunohromatografskog testa je određena testiranjem izolovanih vrsta NTM – a iz respiratornih kliničkih uzoraka, referentnih sojeva NTM – a i bakterijskih izolata (19 vrsta). U našem istraživanju kod svih testiranih izolata rezultat imunohromatografskog testa je bio negativan, što ukazuje na visoku specifičnost testa (100%) i prisustvo antigena MPT64 samo kod *M. tuberculosis* complex. Visoka specifičnost testa u našem istraživanju slaže se sa rezultatima ranijih studija (142, 144, 160, 167). U našoj studiji nije nađen ni jedan lažno pozitivan rezultat što ukazuje na pouzdanu diferencijaciju između *M. tuberculosis* i NTM – a.

Specifičnost imunohromatografskog testa u diferenciranju *M. tuberculosis* od NTM – a se kreće od 96,7 % do 100 % (152). Neke studije su objavile lažno pozitivne rezultate sa *M. marinum* i *M. flavescens* koje su dale veoma slabo pozitivnu reakciju testa (140). Ove dve vrste mogu se lako razlikovati po svojim karakteristikama od *M.*

*tuberculosis*. *M. marinum* je fotohromogena mikobakterija čije su kolonije u početku kultivisanja nepigmentisane, međutim čim se kolonije izlože svetlu počinju proizvoditi tamnožuti pigment. *Mycobacterium marinum* se najčešće izoluje iz kožnih lezija (140).

*Mycobacterium flavescens* je spororastuća skotohromogena mikobakterija koja stvara pigment u tami stvarajući žuto obojene kolonije, retko uzrokuje oboljenje kod čoveka (179). Objavljena je ukrštena reakcija sa *M. avium complex* i *M. chelonae* kod testiranja sa imunohromatografskim testom *Capillia*® (160) i ukrštena reakcija sa *M. gastri* kod testiranja sa SD BIOLINE TB Ag MPT64 RAPID testom (180). Do ukrštene reakcije dolazi između MPT51, MPT64 i komponente 85 antigena kompleksa *M. tuberculosis* i *M. avium*, a sojevi *M. intracellularae* sekretuju antigen koji daje ukrštenu reakciju sa MPT64 specifičnim antitelima testa (181, 182). U našem istraživanju ni jedna od ovih vrsta NTM – a nije dala lažno pozitivan rezultat. Netuberkulozne mikobakterije su glavni uzročnici oportunističkih infekcija kod imunokompromitovanih bolesnika i bolesnika sa hroničnom plućnom bolesti. Kliničke karakteristike plućnih infekcija uzrokovanih vrstama NTM – a su veoma slične tuberkulozi. Zbog kliničkog i terapijskog pristupa bolesniku veoma je važna brza identifikacija i diferencijacija *M. tuberculosis* od NTM – a (183).

Standardni režim lečenja tuberkuloze je neefikasan kod infekcija uzrokovanih NTM – om, a za rano lečenje infekcija uzrokovanih *M. tuberculosis* dovoljno je u prvom koraku identifikacije razlikovati *M. tuberculosis* od NTM – a (184). Poslednjih decenija 20. veka značajan je trend rasta učestalosti infekcija uzrokovanih NTM – om i prevazilazi prevalenciju izolovanih *M. tuberculosis* u laboratorijama gotovo svih ekonomski razvijenih zemalja sveta (185 – 187).

Iako se navedeni trend delom može pripisati razvoju osetljivih mikrobioloških tehnika, rast prevalencije infekcija uzrokovanih NTM – om je posledica demografskih promena kao što je starenje populacije, koje sa sobom nosi slabljenje imunog sistema i pojavom niza predisponirajućih bolesti (184).

Marras i saradnici (185) su prvi ukazali na porast izolacije NTM – a u Ontariju u Kanadi. Populacijske studije sa područja Evrope beleže niže stope izolacije NTM – a u



odnosu na Severnu Ameriku, ali gotovo sve pokazuju stalan porast izolacije NTM – a (188).

U objavljenim studijama pokazano je da izolacija pojedinih vrsta NTM – a varira ne samo od kontinenta i različitih država, već i unutar samih država (189). Osim geografske rasprostranjenosti, vrste NTM – a izolovane iz respiratornih uzoraka razlikuju se i po svojoj kliničkoj značajnosti koja se može razlikovati u različitim geografskim regijama (190).

Kako bi se izbegla pogrešna dijagnoza i sprečilo nepotrebno lečenje potrebno je primenjivanje pooštrenih kriterijuma za klinički neznačajne vrste, odnosno umereni kriterijumi za one vrste koje su od većeg kliničkog značaja u lokalnom okruženju. Zbog toga postoji potreba za tačnim poznavanjem lokalne distribucije NTM – a i njihove kliničke značajnosti u pojedinoj zemlji (191).

U našem istraživanju među ukupno izolovanim mikobakterijama zastupljenost NTM – a je 11 % kao i u Republici Srbiji objavljeno u radu Živanović i saradnika (165). Najčešće izolovana uslovno patogena spororastuća vrsta NTM – a bio je *M. xenopi* sa zastupljenošću 55,3 % izolata. U Republici Srbiji prvi objavljeni rezultati o izolaciji NTM – a iz respiratornih kliničkih uzoraka pokazuju takođe da je *M. xenopi* najčešće izolovana vrsta NTM – a sa zastupljenošću 37,2 % izolata (165).

Studije iz Hrvatske (192), Francuske (193), Engleske (188), Holandije (187) i Poljske (193) pokazuju da je *M. xenopi* jedna od najčešće izolovanih vrsta NTM – a iz respiratornih uzoraka. U objavljenim studijama Grčke (194), Italije (196) i Turske (197) kao najčešći izolati opisuju se *M. avium complex* i *M. kansasii*. Od SAD – a do Hong Konga i Novog Zelanda najčešće izolovana vrsta je MAC (198 – 200).

U našem istraživanju druga najčešće izolovana vrsta NTM – a je brzo rastuća mikobakterija *M. abscessus*, koja se znatno češće izoluje u toplijim zemljama kao što su Grčka (195), Tajland (201) i Brazil (202).

U radu Živanović i saradnici (165) druga najčešće izolovana vrsta NTM – a je takođe brzorastuća mikobakterija *M. peregrinum* sa 12,8 % izolata. Mali broj sporadičnih slučajeva infekcija uzrokovanih sa *M. peregrinum* opisao je Brow – Eliot i saradnici (203), ali je retka izolacija *M. peregrinum* iz respiratornih uzoraka. Mogući izvor ove

brzorastuće mikobakterije su sistemi cevovoda za pitku vodu i tim putem dospeva do cevi u domaćinstvu (204). U Srbiji još nije sprovedeno istraživanje o distribuciji vrsta NTM – a u čovekovoј sredini. U našem istraživanju MAC je na trećem mestu po učestalosti izolacije sa 10,5 % izolata. Izolacija *M. kansasii* sa 1,3 % izolata značajno je manja nego u ostalim studijama (205, 206).

Od saprofitnih mikobakterija bila je najzastupljenija *M. gordonae* identifikovana kod 8,4 % izolata. Rezultati studije Živanović i saradnika (165) pokazuju visoku izolaciju *M. gordonae* sa 11,6 % izolata. Ovi rezultati su očekivani, jer ova vrsta NTM – a je najčešća kontaminanta respiratornih uzoraka (207).

U našem istraživanju izvršeno je poređenje MGIT TBc Id testa sa biohemijskim testovima koji se koriste u rutinskom radu u identifikaciji *M. tuberculosis* kao zlatni standard i komercijalno dostupnim molekularnim *GenoType® Mycobacterium* testom. Rezultati testiranja pokazuju da su senzitivnost, specifičnost, PPV i NPV MGIT TBc Id testa 99,7 %, 100 %, 100 % i 99 % u poređenju sa konvencionalnim biohemijskim testovima. Nije nađena statistički značajna razlika u poređenju imunohromatografskog testa sa biohemijskim testovima. Vrednost kappa testa je iznosila 0,99, što na osnovu stepena slaganja označava veoma dobro slaganje (CI = 0,98 – 1,00) između konvencionalne identifikacije biohemijskim testovima i brzog imunohromatografskog testa. Slaganje nalaza je potvrđeno i McNemar testom o simetričnosti odstupanja u odnosu na dijagonalu sa vrednošću 0,99. Ovi rezultati su slični rezultatima drugih objavljenih studija Kumar i saradnici (208) i Shenoj i saradnici (209). Primena konvencionalnih biohemijskih testova u identifikaciji mikobakterija je dugotrajan i složen proces (od 6 do 9 nedelja), uz upotrebu pozitivne i negativne kontrole za svaku seriju fenotipskih testova.

Srednja vrednost vremena neophodnog za identifikaciju *M. tuberculosis* bilo je 16 dana u ovoj doktorskoј disertaciji, dok je za identifikaciju *M. tuberculosis* imunohromatografskim testom bilo potrebno od 5 do 15 minuta. Većina mikobakterioloških laboratorija sa ograničenim materijalnim resursima tj. u zemljama u razvoju za identifikaciju *M. tuberculosis* upotrebljava jeftine standardne biohemijske testove koji zahtevaju supkulturu mikobakterija na čvrstoj podlozi i odlažu izdavanje

rezultata za nekoliko nedelja. Kasno dobijanje laboratorijskih rezultata posle dva meseca od primanja kliničkih uzoraka u laboratoriju, dovodi do propusta ili odlaže dijagnozu tuberkuloze, što omogućava slabu kontrolu bolesti i širenje infekcije (210).

Iako su biohemijski testovi dugo vremena bili jedini način identifikacije mikobakterija, u poslednjoj deceniji 21. veka zamenjuju se molekularnim metodama. Dostupni su komercijalni hibridizacijski testovi za identifikaciju tridesetak najvažnijih mikobakterija (211). Hibridizacijski testovi u identifikaciji *M. tuberculosis* omogućuju brzu, visoko specifičnu i osetljivu identifikaciju izolovanih sojeva mikobakterija. Identifikacija *M. tuberculosis* je moguća za svega nekoliko sati. Relativno visoka cena većine molekularnih testova jedan je od glavnih faktora koji onemogućava široku primenu ovih testova (212).

U našem istraživanju u poređenju imunohromatografskog testa sa *GenoType® Mycobacterium* testom takođe nije nađena statistički značajna razlika (kappa vrednost i McNemar test = 0,99). Slaganje dva testa je bilo veoma dobro. Naši rezultati pokazuju da je imunohromatografski test isto kao i hibridizacijskih testovi pouzdan u identifikaciji *M. tuberculosis*. Slični rezultati objavljeni su i u drugim studijama kao što su Roberts i saradnici (213), Machado i saradnici (214) i Singh i saradnici (215). Hibridizacijski testovi u odnosu na imunohromatografski test su komplikovaniji i složeniji za rad, zahtevaju obučeni kadar i skupe reagense. Imunohromatografski test je jednostavan za primenu bez potrebe za pripremom uzorka i instrumenata. Rezultati testa bili su dostupni u okviru 15 minuta što čini imunohromatografskim testom brzim u odnosu na nekoliko sati ili nekoliko nedelja potrebnih za molekularne testove i fenotipsko ispitivanje. Primena imunohromatografskog testa u identifikaciji *M. tuberculosis* moguća je u bilo kojoj laboratoriji koja radi laboratorijsku dijagnozu tuberkuloze, posebno u zemljama sa ograničenim materijalnim resursima gde implementacija i primena molekularnih metoda često nije moguća (216).

S obzirom na to da su hibridizacijski testovi u identifikaciji *M. tuberculosis* visoko specifični i najosetljiviji metod, a naši rezultati pokazuju dobru korelaciju sa DNK probama, imunohromatografski test u identifikaciji *M. tuberculosis* može biti dobra zamena za ove skupe testove.

Imunohromatografski test se može primeniti i u identifikaciji *M. tuberculosis* direktno iz tečnih kultura automatizovanih sistema sa registrovanim mikrobiološkim porastom. Považan i saradnici (217) su dokazali visoku specifičnost i senzitivnost imunohromatografskog testa u identifikaciji *M. tuberculosis* iz tečnih kultura Bact/Alert sistema. Senzitivnost i specifičnost testa iz tečnih kultura iznosili su 98,3 % i 100 % što se slaže sa rezultatima drugih studija (153, 218).

*Mycobacterium tuberculosis* sekretuje protein MPT64 u aktivnoj fazi rasta čija se produkcija smanjuje sa dužinom inkubacije uzorka (219). Jednom sekretovan antigen MPT64 ostaje stabilan u podlozi, a imunohromatografski test pozitivan čak i ako se ponovi testiranje posle godinu dana od detekcije na čvrstoj ili tečnoj podlozi (142, 151, 167).

U našoj studiji dokazano je da ponovljeni imunohromatografski test ostaje pozitivan i posle 5 godina od detekcije porasta na čvrstoj L – J podlozi, a pozitivna test linija ostaje vidljiva mesecima.

Buduće studije treba da evaluiraju primenu imunohromatografskog testa direktno u respiratornim kliničkim uzorcima bolesnika kod sumnje na plućnu tuberkulozu.

## 7 ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata istraživanja mogu se izvesti sledeći zaključci:

- ❖ imunohromatografski test je pouzdan i osetljiv skrining test koji može da se koristi ravnopravno uz standardne biohemijske testove u identifikaciji *Mycobacterium tuberculosis*, jer poređenjem ova dva testa nije nađena statistički značajna razlika,
- ❖ dobra korelacija imunohromatografskog testa sa molekularnim testom u identifikaciji *Mycobacterium tuberculosis* obezbeđuje pouzdanost imunohromatografskog testa u diferencijalnoj dijagnozi tuberkuloze,
- ❖ imunohromatografski test je jeftiniji od konvencionalnih biohemijskih i molekularnih testova u identifikaciji *Mycobacterium tuberculosis*, jednostavan je za izvođenje, ne zahteva posebnu opremu ili pripremu uzorka, brz je, vreme potrebno za čitanje rezultata manje je od 5 minuta u odnosu na nekoliko sati ili dana potrebnih za molekularne testove ili biohemijsko ispitivanje, a interpretacija dobijenih rezultata je jednostavna što je veoma značajan kvalitet za primenu imunohromatografskog testa u rutinskom radu,
- ❖ visoka senzitivnost (99,7 %) imunohromatografskog testa omogućava tačnu i preciznu identifikaciju *Mycobacterium tuberculosis*,
- ❖ visoka specifičnost (100 %) imunohromatografskog testa omogućava pouzdanu diferencijaciju *Mycobacterium tuberculosis* od NTM – a,
- ❖ dokazano je da je antigen MPT64 stabilan i posle 5 godina od prvog ispitivanja imunohromatografskim testom,
- ❖ istraživanje pokazuje da je *Mycobacterium tuberculosis* najčešće izolovana vrsta mikobakterija sa zastupljenošću 89 % u periodu od 2010. do 2013. godine

- ❖ zastupljenost NTM bila je 11 % sa najčešće izolovanom uslovno patogenom spororastućom vrstom *Mycobacterium xenopi* 55,3 % izolata.

## 8 LITERATURA

1. O'Farrell B. Evolution in lateral flow – based immunoassay systems. In: Wong HY Tse, editor. Lateral Flow Immunoassay. 1<sup>st</sup> ed. New York: Humana Press; 2009; 1 – 33.
2. Plotz CM, Singer JM. The latex fixation test. Application to the serologic diagnosis of reumatoid arthritis. *Am J Med* 1956; 21 (6): 888 - 92.
3. Leuvering JHW, Thal PYHM, Van der Waart M, Schuurs AHWM. Sol particle immunoassay (SPIA). *J Immunoass Immunochem* 1980; 1:77 – 91.
4. Peak S, Lee S, Cho J, Kim Y. Development of rapid one – step immunochromatographic assay. *Methods* 2000; 22: 53 – 60.
5. Weller MG. Immunochromatographic techniques – a critical review. *J Anal Chem* 2000; 366: 635 – 45.
6. Zhang G, Guo J, Wang X. Immunochromatographic lateral flow strip test . *Mth Mol Biol* 2009; 504: 169 – 83.
7. Posthuma – Trumpie GA, Korf J, van Amerongen A. Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal Bioanal Chem* 2009; 393: 569 – 82.
8. Zhou G, Mao X, Juncker D. Immunochromatographic assay on thread. *Anal Chem* 2012; 84: 7736 – 43.
9. Postuma-Trumpie GA, van Amerongen A. Lateral flow assays. *Antibodies Applications and New Developments* 2012; 175 – 83.
10. Cytodiagnosics Inc. [homepage on the Internet]. Ontario 2015. [cited 2014 March 22] Available from: <http://www.cytodiagnosics.com/store/pc/Lateral-Flow-Immunoassays-d6.htm>.
11. Kelly KL, Coronado E, Zhao LL, Schatz GC. The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape and dielectric environment. *J Phys Chem B* 2003; 107: 668 – 77.
12. Ngom B, Guo Y, Wang X, Bi D. Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review. *Anal Bioanal Chem* 2010; 397: 1113 – 35.

13. Peruski AH, Peruski LF, Jr. Immunological Methods for detection and identification of infectious disease and biological warfare agents. *Clin Diagn Lab Immun* 2003; 4 (10): 506 – 13.
14. Nguyen DT, Kim D, Kim K. Controlled synthesis and biomolecular probe application of gold nanoparticles. *Micron* 2011; 42 (3): 207 – 27.
15. Chum P. Colloidal gold and other labels for lateral flow immunoassays. In: Wong HY Tse, editor. *Lateral Flow Immunoassay*. 1<sup>st</sup> ed. New York: Humana Press; 2009; 75 – 93.
16. Dykman LA, Khlebtsov NG. Gold nanoparticles in biology and medicine: recent advances and prospects. *Acta Naturae* 2011; 2 (9): 34 – 55.
17. Liz – Marzan LM. Tailoring surface plasmons through the morphology and assembly of metal nanoparticles. *Langmuir* 2006; 22 (1): 32 – 41.
18. Aveyard J, Mehrabi M, Cossins A, Braven H, Wilson R. One step visual detection of PCR products with gold nanoparticles and a nucleic acid lateral flow (NALF) device. *Chem Commun* 2007; 4251 – 3.
19. Alanazi FK, Radwan A A, Alsarra I A. Biopharmaceutical applications of nanogold. *Saudi Pharm J*. 2010; 18: 179 – 93.
20. Gao X, Xu LP, Zhou SF, Liu G, Zhang X. Recent advances in nanoparticles – based lateral flow biosensors. *Am J Biomed Sci* 2014; 6 (1): 41 – 57.
21. Jaiswal JK, Simon SM. Potentials and pitfalls of fluorescent quantum dots for biological imaging. *Trends in Cell Biology* 2004; 14 (9): 497 – 504.
22. Yu WW, Chngang E, Drezek R, Colvin VL. Water – soluble quantum dots for biomedical applications. *Biophys Res Commun* 2006; 348 (3): 781 – 6.
23. Tallury P, Malhotra A, Byrne LM, Santra S. Nanobioimaging and sensing of infectious diseases. *Adv Drug Deliv Rev* 2010; 62: 424 – 37.
24. Mansfield MA. Nitrocellulose membranes for lateral flow immunoassays: a technical treatise. In: Wong HY Tse, editor. *Lateral Flow Immunoassay*. 1<sup>st</sup> ed. New York: Humana Press; 2009; 95 – 113.
25. Milipore Corporation. Rapid lateral flow test strips: considerations for product development, 2008, <http://www.milipore.com/techpublications/tech1/tb500en00>.



26. Lee JY, Young AK, Kim MY, Lee YT, Hammock BD, Lee HS. Importance of membrane selection in the development of immunochromatographic assays for low – molecular weight compounds. *Anal Chim Acta* 2012; 757: 69 – 74.
27. Brown MC. Antibodies: key to a robust lateral flow immunoassay. In: Wong HY Tse, editor. *Lateral Flow Immunoassay*. 1<sup>st</sup> ed. New York: Humana Press; 2009; 59 – 74.
28. Pandey S. Hybridoma technology for production of monoclonal antibodies. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2010; 1 (2): 88 – 94.
29. Schunk MK, Macallum GE. Applications and optimization of immunization procedures. *ILAR J* 2005; 46 (3): 241 – 57.
30. Ansar W, Ghosh S. Monoclonal antibodies: a tool in clinical research. *Ind J Clin Med* 2013; 4: 9 – 21.
31. Rosen S, Market trends in lateral flow immunoassays. In: Wong HY Tse, editor. *Lateral Flow Immunoassay*. 1<sup>st</sup> ed. New York: Humana Press; 2009; 35 – 49.
32. Inoue Y, Shimomura Y, Fokuda M, Miyazaki D, Ohashi Y, Sasaki H et al. Multicentre clinical study of the herpes simplex virus immunochromatographic assay kit of the diagnosis of herpetic epithelial keratitis. *Br J Ophtalmol* 2013; 97 (9): 1108 – 12.
33. Wiriyachaiorn S, Howarth PH, Bruce KD, Dailey LA. Evaluation of rapid lateral flow immunoassay for *Staphylococcus aureus* detection in respiratory samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 75 (1): 28 – 36.
34. Guglielmo – Viret V, Vietri NJ, Desor F, Thullier P. Combination of cultivation and lateral flow assay for easy, highly sensitive and presumptive detection of *Bacillus anthracis* spores. *J Med Lab Diagn* 2011; 2 (5): 51 – 3.
35. Floch P, Goret J, Bessede E, Lehours P, Megraud F. Evaluation of the positive predictive value of a rapid immunochromatographic test to detect *Campylobacter* in stools. *Gut Pathogens* 2012; 4: 17.
36. Thornton CR. Lateral – flow device for diagnosis of fungal infection. *Curr Fungal Infect Rep* 2013; 7: 244 – 51.
37. Abaza SM. Immunochromatographic assays in diagnosis of parasitic diseases. *PUJ* 2008; 1 (1): 1 – 13.

38. Lindsley MD, Mekha N, Baggett HC, Surinthong Y, Auttateinchai R, Sawatwong P et al. Evaluation of a newly developed lateral flow immunoassay for the diagnosis of cryptococcosis. *Clin Infect Dis* 2011; 53 (4): 321 – 25.
39. Zheng MZ, Richard JL, Binder J. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia* 2006; 161: 261 – 73.
40. Hegazy MM, El – Tantawy NL, Soliman MM, El – Sadeek ES, El – Nagar HS. Performance of rapid immunochromatographic assay in the diagnosis of Trichomoniasis vaginalis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 74: 49 – 53.
41. Lin LR, Tong ML, Fu ZG, Dan B, Zheng WH, Zhang CG et al. Evaluation of colloidal gold immunochromatography assay in the detection of Treponema pallidum specific IgM antibody in syphilis serofast reaction patients: a serologic marker for the relapse and infection of syphilis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 70: 10 – 6.
42. Bishor VI, Siyavudeen F. Lateral flow assay in veterinary diagnosis. *JIVA* 2011; 1 (9): 60 – 1.
43. Zhang GP, Guo JQ, Wang XN, Yang JX, Yang YY, Li QM, et al. Development and evaluation of an immunochromatographic strip for trichinellosis detection. *Vet Parasitol* 2006; 137: 286 – 93.
44. Wang XW, Li K, Shi D, Xiong N, Jin X, Yi J, et al. Development of an immunochromatographic lateral – flow test strip for rapid detection of sulfonamides in eggs and chicken muscles. *J Agric Food Hem* 2007; 55: 2072 – 8.
45. Lee EH, Kim YA, Lee YT, Hammock BD, Lee HS. Competitive immunochromatographic assay for the detection of the organophosphorus pesticide EPN. *Food Agric Immun* 2013; 24 (2): 129 – 38.
46. Luppia P, Muller C, Schlichtiger A, Schlebusch H. Point – of care testing (POCT): current techniques and future perspectives. *Trends in Anal Chem* 2011; 30: 887 – 97.
47. Bissonnette L, Bergeron MG. Diagnosis infections – current and anticipated technolgis for point – of – care diagnostics and home – based testing. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 1044 – 53.
48. Gubala V, Harris LF, Ricco AJ, Tan MX, Williams DE. Point of care diagnostics: status and future. *Anal Chem* 2012; 84 (2): 487 – 517.

49. Clerc O, Greub G. Routine use of point – of – care tests: usefulness and application in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 1054 – 61.
50. Kalyani D, Bai MM. Evaluation of immunochromatographic test in early serological diagnosis of dengue fever. *Ind J Pathol Microbiol* 2012; 55: 610 – 1.
51. Morozumi M, Shimizu H, Matsushima Y, Mitamura K, Tajima T, Iwata S, et al. Evaluation of new immunochromatographic assay kit for adenovirus detection in throat swab: comparison with culture and real – time PCR results. *J Infect Chemother* 2014; 20 (5): 303 – 6.
52. Kwenti TE, Njouom R, Njunda LA, Kamga HL. Comparison of an immunochromatographic strip test, ELIZA and PCR in the diagnosis of hepatitis C in HIV patients in hospital settings in Cameroon. *Clin Med Diagn* 2011; 1 (1): 21 – 7.
53. Murray CK, Gasser RA, Magill AJ, Miller RS. Update on rapid diagnostic testing for malaria. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21: 97 – 110.
54. Junker R, Schlebusch H, Luppa PB. Point of care testing in hospital and primary care. *Dtsch Arztebl Int* 2010; 107: 561 – 7.
55. Weiner RG, Tyler JK. The impact of point of care testing on the diagnosis of infectious diseases. *MLO Med Lab Obs* 2003; 35: 36 – 7.
56. Peeling RW, Mabey D. Point – of – care tests for diagnosing infections in the developing world. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 1062 – 9.
57. Loubiere S, Moatti JP. Economic evaluation of point – of – care diagnostic technologies for infectious diseases. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 1070 – 6.
58. Hammett – Stabler CA, Nichols JH. Point – of – care testing, a critical component of laboratory medicine. *Clin Biochem* 2009; 42: 135.
59. Lawn SD, Zumla AI. Tuberculosis. *Lancet* 2011; 378: 57 – 72.
60. Glaziou P, Falzon D, Floyd K, Raviglione M. Global Epidemiology of tuberculosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2013; 34: 3 – 16.
61. Raviglione M, Marais B, Floyd K, Lonroth K, Getahun H, Magliori GB, et al. Scaling up interventions to achieve global tuberculosis control: progress and new developments. *Lancet* 2012; 379: 1902 – 13.

62. WHO Global Tuberculosis Report 2013. World Health Organization, Geneva (2013). [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2013/update/tbu\\_9.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2013/update/tbu_9.pdf). Accessed on 1st February 2013.
63. European Centre for Disease Prevention and Control / WHO Regional Office for Europe (2012). Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe, report 2012. European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm.
64. Izveštaj o tuberkulozi u Srbiji za 2013. godinu, Ministarstvo zdravlja Republike Srbije, Beograd, 2013.
65. Zumla A, George A, Sharma V, Herbert N, Masham B. WHO's 2013 global report on tuberculosis: successes, threats, and opportunities. *Lancet* 2013; 382: 1765 – 7.
66. Martinson NA, Barnes GL, Moulton LH. New regimens to prevent tuberculosis in adults with HIV infection. *N Engl J Med* 2011; 365: 11 – 20.
67. Horsburgh CR. Tuberculosis. *Eur Respir Rev* 2014; 23: 36 – 9.
68. Zumla A, Raviglione M, Hafner R, von Reyn CF. Tuberculosis. *N Engl J Med* 2013; 368: 745 – 55.
69. Gandhi NR, Nunn P, Dheda K, Schaaf HS, Zignol M, Soolingen D, et al. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *Lancet* 2010; 375: 1830 – 43.
70. Nathanson E, Nunh P, Uplekar M, Floyd K, Jaramillo E, Lonroth K, et al. MDR tuberculosis – critical steps for prevention and control. *N Engl J Med* 2010; 363: 1050 – 8.
71. Johnson MM, Odell JA. Nontuberculosis mycobacterial pulmonary infections. *J Thorac Dis* 2014; 6 (3): 210 – 20.
72. [www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html](http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html). Euzéby, J. P. List of prokaryotic names with standing in nomenclature – genus *Mycobacterium*. Last access: June 10, 2013.
73. Cook JL. Nontuberculous mycobacteria: opportunistic environmental pathogens for predisposed hosts. *Brit Med Bull* 2010; 96: 45 – 59.
74. Daley CL. Nontuberculous mycobacterial infections. *Eur Respir Med* 2011; 52: 115 – 29.

75. Davidson PT. The diagnosis and management of disease caused by *M. avium* complex, *M. kansasii* and other mycobacteria. *Clin Chest Med* 1989; 10: 431 – 43.
76. Infekcije izazvane netuberkuloznim mikobakterijama. Katalinić – Janković V, Popović Grle S, Obrovac M, Cvetnić Ž, Alfrenić T. *Liječ Vjesn* 2007; 129: 146 – 51.
77. Kendall BA, Winthrop KL. Update on the epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacterial infections. *Semin Respir Crit Care Med* 2013; 34 (1): 87 – 94.
78. Weiss C, Glassroth J. Pulmonary disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Expert Rev Respir Med* 2012; 6 (6): 597 – 613.
79. Van Ingen S. Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. *Semin Respir Crit Med* 2013; 34 (1): 103 – 9.
80. Pfyffer GE, Palicova F. *Mycobacterium*: General characteristics, laboratory detection and staining procedures. *Manual of Clinical Mycobiology*, 10<sup>th</sup> ed. J.C. Versalovic Funke KC, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW. Washington DC, ASM Press; 2011. p. 472 – 502.
81. Dinnes J, Deeks J, Kunst H, Gibson A, Cummins E, Waugh N, et al. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technol Assess* 2007; 11 (3): 1 – 196.
82. Vincet V, Gutiérrez MC. *Mycobacterium*: Laboratory characteristics of slowly growing mycobacteria. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington DC, ASM Press; 2007. p. 573 – 88.
83. Mycobacteria. In: Brooks GF, Carroll KC, Butel J, Morse S, Mietzner T, ed. *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*. New York, McGraw – Hill Medical; 2010. p. 289 – 300.
84. Parsons LM, Somoskovi A, Gutierrez C, Lee E, Paramasivan CN, Abimiku A, et al. Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource-poor countries: challenges and opportunities. *Clin Med Rev* 2011; 314 – 50.
85. Pfyffer GE. *Mycobacterium*: General characteristics, laboratory detection, and staining procedures. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA,

editors. Manual of Clinical Microbiology. 9<sup>th</sup> ed. Washington DC, ASM Press; 2007. p. 543 – 72.

86. Drobniewski FA, Caws A, Gibson A, Young D. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. Lancet Infect Dis 2003; 3: 141 – 7.

87. Witebsky FG, Kruczak – Filipov P. Identification of mycobacteria by conventional methods. Clin Lab Med 1996; 16: 569 – 601.

88. Neonakis IK, Gitti Z, Krambontis E, Spandidos DA. Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. J Microbiol Methods 2008; 75: 1 – 11.

89. Wilson ML. Rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection and drug susceptibility testing. Arch Pathol Lab Med 2013; 137: 812 – 9.

90. Jankovic V, Furci L, Cirill DM. Microbiology of *Mycobacterium tuberculosis* and a new diagnostic test for TB. Eur Respir Monograph 2012; 25 – 37.

91. Access Excellence.org [homepage on the Internet]. Atlanta: The National Health Museum. 1994-2009. [updated 2009 Dec; cited 2014 Dec 09]. Available from: <http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/nucleic.php>

92. Makinen J, Marjamaki M. Evaluation of a novel strip test, geno type *Mycobacterium* CM / AS for species identification of mycobacterial cultures. Clin Microbiol Rev Infect 2006; 12 (5): 481 – 3.

93. Richter S, Rusch – Gerdes S. Evaluation of the genotype *Mycobacterium* assay for identification of mycobacterial species from cultures. J Clin Microbiol 2006; 44 (5): 1769 – 75.

94. Savić B, Vuković D, Dakić I, Arandžević I. Vodič za mikrobiološku dijagnostiku tuberkuloze (III izdanje). Ministarstvo zdravlja Republike Srbije, Beograd, 2015.

95. Nyendak MR, Lewinsohn DA, Lewinshon PM. New diagnostic methods for tuberculosis. Curr Opin Infect Dis 2009; 22: 174 – 82.

96. Katoch VM. Newer diagnostic techniques for tuberculosis. Indian J Med Res 2004; 120: 418 – 28.

97. Mollicotti P, Bua A, Zanetti S. Cost – effectiveness in the diagnosis of tuberculosis: choices in developing countries. J Infect Dev Ctries 2014; 8 (1): 24 – 38.

98. Gomathi NS, Devi SM, Lakshmi R, Ramachandran R, Wares DF, Kumar V, et al. Capilia test for identification of *Mycobacterium tuberculosis* in MGIT™ – positive cultures. *Int J Tuberc Lung Dis* 2012; 16 (6): 788 – 92.
99. Muyoyeta M, de Has PEW, Mueller DH, van Helden PD, Mwenge L, Schaap A, et al. Evaluation of the Capilia TB assay for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* infections in Zambia and South Africa. *J Clin Microbiol* 2010; 48 (10): 3773 – 5.
100. Yin X, Zheng L, Lin L, Hu Y, Zheng F, Hu Y, et al. Commercial MPT64 – based tests for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis complex*: A meta – analysis. *J Infect* 2013; 67: 369 – 77.
101. Chikamatsu K, Aono A, Yamada H, Sugamoto T, Kato T, Kazumi Y, et al. Comparative evaluation of three immunochromatographic identification testes for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis complex*. *BMC Infect Dis* 2014; 14: 54 – 61.
102. Mustafa AS. HLA – promiscuous Th1 – cell reactivity of MPT64 (Rv1980c), a major secreted antigen of *Mycobacterium tuberculosis*, in healthy subjects. *Med Princ Pract* 2009; 18: 385 – 92.
103. Harboe M, Nagai S, Patarroyo ME, Torres ML, Ramirez C, Cruz N. Properties of proteins MPB64, MPB70, and MPB80 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* 1986; 52: 293 – 302.
104. Kumar GS, Urs TA, Ranganath RR. MPT64 antigen detection for rapid confirmation of *M.tuberculosis* isolates. *BMC Research Notes* 2011; 4: 79.
105. Liu Z, Zhu C, Yang H, Hu H, Feng Y, Qin L, et al. Clinical value of ELISA – MPT64 for the diagnosis of tuberculous pleurisy. *Curr Microbiol* 2012; 65: 313 – 8.
106. Chaves D, Sandoval A, Rodriguez L, Garcia JC, Restrepo S, Mercedes Zambrano M. Comparative analysis of six *Mycobacterium tuberculosis complex* genomes. *Biomedica* 2010; 30: 23 – 31.
107. Comas I, Chakravarti J, Small PM, Galagan J, Niemann S, Kremer K, et al. Human T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* are evolutionarily hyperconserved. *Nat Genet* 2010; 42: 498 – 503.

108. Jiang Y, Liu H, Wang H, Dou X, Zhao X, Yun B et al. Polymorphism of antigen MPT64 in *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Clin Microbiol* 2013; 51 (5): 1558 – 62.
109. Li H, Ulstrup JC, Jonassen TO, Melby K, Nagai S, Harboe M. Evidence for absence of the MPB64 gene in some substrains of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* 1993; 61: 1730 – 4.
110. Wang Z, Potter BM, Gray AM, Sacksteder KA, Geisbrecht BV, Laity JH. The solution structure of antigen mpt64 from *Mycobacterium tuberculosis* defines a new family of beta-grasp proteins. *J Mol Biol* 2007; 366: 375 – 81.
111. Fan Q, Lu M, Xia ZY, Bao L. *Mycobacterium tuberculosis* MPT64 stimulates the activation of murine macrophage modulated by IFN –  $\gamma$ . *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013; 17: 3296 – 3305.
112. Wang Q, Liu S, Tang Y, Liu Q, Yao Y. MPT64 protein from *Mycobacterium tuberculosis* inhibits apoptosis of macrophages through NF – kB - miRNA21 – Bcl – 2 pathway. *Plos One* 2014; 9 (7): e100949.doi: 10.1371/journal.pone.0100949.
113. BD MGIT™ TBc identification test. Available from: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=11376>.
114. Della – Latta P. Mycobacteriology and antimicrobial susceptibility testing. In: Isenberg HD, ed. *Clinical microbiology procedures handbook Vol 2*. 2th ed. Washington DC: AMS; 2004. p. 7.1 – 7.8.8.1.
115. Kent PT, Kubica GP. *Public Health Mycobiology: A Guide for the Level III Laboratory*, US Department of Health and Human Services, Centres for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA, 1985.
116. Yam WC, Yuen KY, Kam SY, Yiu LS, Chan KS, Leung CC, et al. Diagnostic application of genotypic identification of mycobacteria. *J Med Microbiol* 2006; 55: 529 – 36.
117. Lee AS, Jelfs P, Sintchenko V, Gilbert GL. Identification of nontuberculous mycobacteria: utility of the GenoType Mycobacterium CM / AS assay compared with HPLC and 16S rRNA gene sequencing. *J Med Microbiol* 2009; 58: 900 – 4.



118. Thomson RB, Miller JM. Specimen collection, transport and processing: bacteriology. In: Murray PR, Baron EJ, Tenover JC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 8<sup>th</sup> ed. Washington: ASM Press; 2003. p. 286 – 330.
119. Runyon EH, Seline MJ, Harris HW. Distinguishing mycobacteria by the niacin test. *Am Rev Tuberc Pulm Dis* 1959; 79: 663 – 5.
120. Virtanen S. A study of nitrate reduction by mycobacteria. *Acta Tuberc Scand* 1960; 48: 1 – 119.
121. Sulis G, Roggi A, Matteelli A, Raviglione MC. Tuberculosis: epidemiology and control. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2014; 6 (1): e2014070.
122. World Health Organization. Global tuberculosis report 2014. <http://www.int/tb/publications/global-report/en/> (Accessed on November 11, 2014)
123. Dye C, Walt CJ, Bleed DM, Williams BG. What is the limit to case detection under the DOTS strategy for tuberculosis control? *Tuberculosis* 2003; 83 (1 – 3): 35 – 43.
124. World Health Organization. Global strategy and targets for tuberculosis prevention, care and control after 2015. Report by the secretariat. Geneva, WHO, 2013.
125. D'Ambrosio L, Dara M, Tadolini M, Centis R, Sotgiu G, van der Werf MJ, et al. Tuberculosis elimination: theory and practice in Europe. *Eur Respir J* 2014; 43 (5): 1410 – 20.
126. Katalinić – Janković V, Obrovac M, Žmak Lj. Mikrobiološka dijagnostika tuberkuloze od Kocha do „Point – of – care“ testa. *Infektološki glasnik* 2013; 33 (2): 53 – 8.
127. Gupta R, Espinal MA, Raviglione MC. Tuberculosis as a major global health problem in the 21st century: a WHO perspective. *Semin Respir Crit Care Med* 2004; 25 (3): 245 – 53.
128. Alcaide F, Coll P. Advances in rapid diagnosis of tuberculosis disease and anti-tuberculous drug resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 29 (1): 34 – 40.
129. Siddi K, Lambert ML, Walley J. Clinical diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in low – income countries: the current evidence. *Lancet Infect Dis* 2003; 3 (5): 288 – 96.

130. Moore DF, Guzman JA, Mikhail LT. Reduction in turnaround time for laboratory diagnosis of pulmonary tuberculosis by routine use of a nucleic acid amplification test. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 52 (3): 247 – 54.
131. CDC. Update Guidelines for the use of nucleic acid amplification test in the diagnosis of tuberculosis. *MMWR* 2009; 58 (1): 7 – 10.
132. Floyd K. Costs and effectiveness – the impact of economic studies on TB control. *Tuberculosis* 2003; 83: 187 – 200.
133. Hatta M, Sultan AR. Diagnostic evaluation of tuberculosis. In: Bassam H, Mahboub M, Vats G, editors. *Tuberculosis – current issues in diagnosis and management*. 1st ed. Rijeka: InTech; 2013. p. 153-61.
134. Chihota VN, Grant AD, Fielding K, Ndibongo B, van Zyl A, Muirhead D, et al. Liquid vs. solid culture for tuberculosis: performance and cost in a resource – constrained setting. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010; 14 (8): 1024 – 31.
135. World Health Organization. Use of liquid TB culture and drug susceptibility testing (DST) in low and medium income settings. Summary report of the Expert Group Meeting, Geneva, WHO, 2007.
136. Ragaede F, Picot N, Blanc – Michaud A, Chatellier S, Mirande C, Fortin E, et al. Performance of solid and liquid culture media for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical materials: meta – analysis of recent studies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 33: 867 – 70.
137. Naveen G, Peerapur BV. Comparison of the Löwenstein – Jensen medium, the Middlebrook 7H10 medium and MB / BacT for the isolation of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) from clinical specimens. *J Clin Diagn Res* 2014; 6: 1704 – 9.
138. Anochie PI, Edwina CO, Ogu AC, Onyeozirila AC, Aluru S, Onyejebu NO, et al. Recent advances in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*. *GERMS* 2012; 2 (3): 110 – 20.
139. Bekmurzayeva A, Marzhan S, Kanayeva D. Tuberculosis diagnosis using immunodominant, secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2013; 93: 381 – 88.

140. Abe C, Hirano K, Tomiyama T. Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis complex* by immunochromatographic assay using anti – MPB64 monoclonal antibodies. J Clin Microbiol 1999; 37 (11): 3693 – 7.
141. Said Tohir AO, Rasolofo V, Andrianarisoa SH, Ranjalahy GM, Ramarokoto H. Validation of an immunochromatographic assay kit for the identification of the *Mycobacterium tuberculosis complex*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2011; 106 (6): 777 – 80.
142. Park MY, Kim YJ, Hwang SH, Kim HH, Lee EY, Jeong SH, et al. Evaluation of an immunochromatographic assay kit for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis complex* in clinical isolates. J Clin Microbiol 2009; 47 (2): 481 – 4.
143. Gaillard T, Fabre M, Martinaud C, Vong R, Brisou P, Soler C. Assessment of the SD BIOLINE Ag MPT64 rapid and the MGIT TBc identification tests for the diagnosis of tuberculosis. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 70 (1): 154 – 6.
144. Yu MC, Chen HY, Wu MH, Huang WL, Kuo YM, Yu FL, et al. Evaluation of the rapid MGIT TBc identification test for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis complex* strain detection. J Clin Microbiol 2011; 49 (3): 802 – 7.
145. Lu PL, Yang YC, Huang SC, Jenh YS, Lin YC, Huang HH, et al. Evaluation of the Bactec MGIT 960 system in combination with MGIT TBc identification test for detection of *Mycobacterium tuberculosis complex* in respiratory specimens. J Clin Microbiol 2011; 49 (6): 2290 – 2.
146. Said HM, Ismail N, Osman A, Velsman C, Hoosen AA. Evaluation of TBc identification immunochromatographic assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis complex* in samples from broth cultures. J Clin Microbiol 2011; 49 (5): 1939 – 42.
147. Barouni AS, Alnajh ZB, Aboguttaia NB, Alamri WM. Evaluation of the BD MGIT™ TBc identification test for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis complex* from positive BACTEC MGIT 960 cultures in a routine laboratory work. African J Microbiol Res 2012; 6 (5): 1065 – 8.
148. Hillemann D, Rusch – Gerdes S, Richter E. Application of the Capilia TB assay for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis complex* isolates. Int J Tuberc Lung Dis 2005; 9 (12): 1409 – 11.

149. Muyoyeta M, Mwanza WC, Kasese N, Cheeba – Lengwe M, Moyo M, Kaluba-Milimo D, et al. Sensitivity, specificity, and reproducibility of the Capilia TB – Neo assay. *J Clin Microbiol* 2013; 51 (12): 4237 – 9.
150. Fabre M, Vong R, Gaillard T, Merens A, Gérome P, Saint – Blancard P, et al. Evaluation of the SD BIOLINE TB Ag MPT64 rapid for the diagnosis of tuberculosis. *Pathol Biol* 2011; 59 (1): 26 – 8.
151. Canade S, Nataraj G, Suryawanshi R, Mehta P. Utility of MPT64 antigen detection assay for rapid characterisation of mycobacteria in a resource constrained setting. *Indian J Tuberc* 2012; 59: 92 – 6.
152. Brent AJ, Mugo D, Musyimi R, Mutiso A, Morepeth S, Levin M, et al. Performance of the MGIT TBc identification test and meta-analysis of MPT64 assays for identification of the *Mycobacterium tuberculosis complex* in liquid culture. *J Clin Microbiol* 2011; 49 (12): 4343 – 6.
153. Ismail NA, Baba K, Pombo D, Hoosen AA. Use of an immunochromatographic kit for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* from broth cultures. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13 (8): 1045 – 7.
154. Hirano K, Aono A, Takahashi M, Abe C. Mutations including IS6110 insertion in the gene encoding the MPB64 protein of Capilia TB – negative *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* 2004; 42 (1): 390 – 2.
155. Martin A, Bombeeck D, Fissette K, de Rijk P, Hernandez – Neuta I, Portilo PD, et al. Evaluation of the BD MGIT TBc identification test a rapid chromatographic immunoassay the detection of *Mycobacterium tuberculosis complex* from liquid culture. *J Microbiol Methods* 2011; 84: 255 – 7.
156. Marzouk M, Kahla IB, Hannachi N, Frjeni A, Salma WB, Ghezal S, et al. Evaluation of an immunochromatographic assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis complex* in clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 69: 396 – 9 .
157. Arora J, Singhal R, Bhalla M, Reza S, Visalakshi P, Bhera D, et al. Diagnostic utility of Capilia TB assay for identification of *Mycobacterium tuberculosis complex*. *Curr Resear Tuberc* 2012; 4 (1): 13 – 8.

158. Halima MS, Ismail N, Osman A, Velsmna C, Hoosen AA. Evaluation of TBc identification of immunochromatographic assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* in samples from broth cultures. J Clin Microbiol 2011; 49 (5): 1939 – 42.
159. Ngamlert K, Sinthuwattanawibool C, McCarthy KD, Sohn H, Starks A, Kanjanamongkolsiri, et al. Diagnostic performance and costs of Capilia TB for *Mycobacterium tuberculosis* complex identification from broth – based culture in Bangkok, Thailand. Trop Med I Health 2009; 14 (7): 748 – 53.
160. Ngeow YF, Wong YL, Peng KP, Ong CS, Aung WW. Rapid, cost-effective application of Tabilia TB rapid test for culture confirmation of live and heat – killed *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2011; 49 (7): 2776 – 7.
161. Wang JY, Lee LN, Palai HC, Hsu HL, Jan IS, Ju CJ, et al. Performance assessment of the Capilia TB assay and the BD ProbeTec ET system for rapid culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis*. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 59: 395 – 9.
162. Krysztopa – Grzybowska K, Brzezinska S, Augustynowicz – Kopeć E, Zwolska Z, Augustynowicz E, Lutynska A. The capacity of *Mycobacterium tuberculosis complex* species and *M.bovis* BCG substrains specific identification – implications for optimized PCR – based diagnostics in adverse events following vaccination suspected cases. Polish J Microbiol 2012; 61 (4): 299 – 303.
163. Wirth T, Hildebrand F, Allix – Béguec C, Wölbeling F, Kubica T, Kremer K et al. Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis complex*. PLoS Pathog 2008;4,e1000160.
164. Gagneux S, Small PM. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. Lancet Infect Dis 2007; 7: 328 – 37.
165. Živanović I, Vuković D, Dakić I, Savić B. Species of *Mycobacteria tuberculosis complex* and nontuberculous mycobacteria in respiratory specimens from Serbia. Arch Biol Sci 2014; 66 (2): 553 – 61.
166. Žmak Lj, Janković M, Obrovac M, Katalinić – Janković V. Netuberkulozne mikobakterije. Infektološki glasnik 2013; 33 (2): 95 – 101.

167. Hasegawa N, Miura T, Ishii K, Yamaguchi K, Linder TH, Merritt S, et al. New simple and rapid test for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex: a multicenter study. J Clin Microbiol 2002; 43 (3): 908 – 12.
168. Lovodić – Sivčev B, Vujić P. *Mycobacterium bovis* izolovan u Institutu za plućne bolesti i tuberkulozu 1968 – 1978. Saopštenja Instituta za plućne bolesti i tuberkulozu Sremska Kamenica 1979; 1 – 2: 29 – 35.
169. Bajrović T, Nurkić M, Zvizdić Š. Tuberkuloza. Veterinaria 2009; 58 (1 – 2): 121 – 36.
170. Cvetnić Ž, Špičić S, Račić I, Zdelar Tuk M, Duvnjak S. *Mycobacterium caprae* na farmi mliječnih krava. Veterinarska stanica 2011; 42 (3): 219 – 26.
171. Cvetnić Ž, Lojkić M, Majnarić D, Krznarić M, Šeparović S, Katalinić – Janković V. Tuberkuloza goveda u Hrvatskoj s osvrtom na situaciju u Europi i u svijetu. Praksys vet 2000; 48: 33 – 9.
172. De Jong BC, Aqntonio M, Gagneux S. *Mycobacterium africanum* – review of an important cause of human tuberculosis in West Africa. Plos Negl Trop Dis 2010;4,e744.
173. Korać M, Milošević B, Lavadinović L, Janjić A, Brmbolić B. Diseminovana BCG infekcija kod bolesnika sa karcinomom mokraćne bešike. Med Pregl 2009; LXII (11 – 12): 592 – 5.
174. Ritz N, Hanekom WA, Robins – Browne R, Britton WJ, Curtis N. Influence of BCG vaccine strain on the immune response and protection against tuberculosis. FEMS Microbiol Rev 2008; 32: 821 – 41.
175. Oettinger T, Jorgensen M, Ladefoged A, Haslov K, Andersen P. Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. Tuber Lung Dis 1999; 79 (4): 243 – 50.
176. Hayashi D, Takii T, Mukai T, Makino M, Jasyda E, Horita Y, et al. Biochemical characteristics among *Mycobacterium bovis* BCG substrains. FEMS Microbiol Lett 2010; 306 (2): 103 – 9.
177. Bedwell J, Kairo SK, Behr MA, Bygraves JA. Identification of substrains BCG vaccine using multiplex PCR. Vaccine 2001; 19 (15 – 16): 2146 – 51.

178. Zhang W, Zhang Y, Zheng H, Pan Y, Liu H, Du P, et al. Genome sequencing and analysis of BCG vaccine strains. *PLoS ONE* 2013; 8 (8): e71243.
179. Sethi S, Gupta V, Bhattacharyya S, Sharma M. Post-laparoscopic wound infection caused by scotochromogenic nontuberculous mycobacterium. *Jpn J Infect Dis* 2011; 64: 426 – 7.
180. Shen GH, Chen CH, Hung CH, Wu KM, Lin CF, et al. Combining the Capilia TB assay with smear morphology for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13 (3): 371 – 6.
181. Wiker HG, Nagai S, Harboe M, Ljungqvist L. A family of cross – reacting proteins secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol* 1992; 36 (2): 307 – 19.
182. Ohara N, Ohara – Wada N, Kitaura H, Nishiyama T, Matsumoto S, Yamada T. Analysis of the genes encoding the antigen 85 complex and MPT51 from *Mycobacterium avium*. *Infect Immun* 1997; 65 (9): 3680 – 5.
183. Chan ED, Iseman MD. Underlying host risk factors for nontuberculous mycobacterial lung disease. *Semin Respir Crit Care Med* 2013; 34: 110 – 23.
184. Winthrop KL, Mcnelly E, Kendall B, Marshall – Olson A, Morris C, Cassidy M, et al. Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease prevalence and clinical features: an emerging public health disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182 (7): 977 – 82.
185. Marras TK, Chedore P, Ying AM, Jamieson F. Isolation prevalence of pulmonary non-tuberculous mycobacteria in Ontario, 1997 – 2003. *Thorax* 2007; 62: 661 – 6.
186. Martin – Casabona N, Bahrmand AR, Bennedsen J, Thomsen VO, Curcio M, Fauville – Dufaux M, et al. Spanish group for non – tuberculosis mycobacteria. Non – tuberculous mycobacteria: patterns of isolation. A multi – country retrospective survey. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8 (10): 1186 – 93.
187. Andrejak C, Thomsen V, Johansen IS, Riis A, Benfield TL, Duhaut P, et al. Nontuberculous pulmonary mycobacteriosis in Denmark: incidence and prognostic factors. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181 (5): 514 – 21.
188. Moore JE, Kruijshaar ME, Ormerod LP, Drobniewski F, Abubakar I. Increasing report of non – tuberculous mycobacteria in England, Wales and northern Ireland, 1995 – 2006. *BMC Public Health* 2010; 10: 612.

189. Kendall BA, Winthrop KL. Update on the epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacterial infections. *Semin Respir Crit Care Med* 2013; 34: 87 – 94.
190. van Ingen J, Bendien SA, de Lange WCM, Hoefsloot W, Dekhuijzen PNR, et al. Clinical relevance of non – tuberculous mycobacteria isolated in Nijmegen – Arnhem region, the Netherlands. *Thorax* 2009; 64: 502 – 6.
191. Hoefsloot W, van Ingen J, Andrejak C, Angeby K, Bauriaud R, Bemer P, et al. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: a NTM – NET collaborative study. *Eur Respir J* 2013; 42: 1604 – 13.
192. Marušić A, Katalinić – Janković V, Popović – Grle S, Janković M, Mažuranić I, Puljić I et al. *Mycobacterium xenopi* pulmonary disease – epidemiology and clinical features in nonimmunocompromised patients. *J Infect* 2009; 58 (2): 108 – 12.
193. Andrejak C, Lescure FX, Pukenyte E, Douadi Y, Yazdanpanah Y, Laurans G et al. *Mycobacterium xenopi* pulmonary infections: a multicentric retrospective study of 136 cases in north – east France. *Thorax* 2009; 64 (4): 291 – 6.
194. Van der Werf MJ, Kódmón C, Katalinić – Janković V, Kummunik T, Soini H, Richter E, et al. Inventory study of nontuberculous mycobacteria in European Union. *BMC Infect Dis* 2014; 14: 62.
195. Gitti Z, Mantadakis E, Maraki S, Samonis G. Clinical significance and antibiotic susceptibilities of nontuberculous mycobacteria from patients in Crete, Greece. *Future Microbiol* 2011; 6 (9): 1099 – 109.
196. del Giudice G, Ladevaia C, Santoro G, Moscariello E, Smeraglia R, Marzo C. Nontuberculous mycobacterial lung disease in patients without HIV infection: a retrospective analysis over 3 years. *Clin Respir J* 2011; 5 (4): 203 – 10.
197. Bicmen C, Coskun M, Gunduz AT, Senol G, Cirak AK, Tibet G. Nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary specimens between 2004 and 2009: causative agent or not? *New Microbiol* 2010; 33 (4): 399 – 403.
198. Adjemian J, Olivier KN, Seitz AE, Holland SM, Prevots DR. Prevalence of nontuberculous mycobacterial lung disease in U.S. Medicare beneficiaries. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185: 881 – 6.



199. Simons S, van Ingen J, Hsueh PR. Non – tuberculous mycobacteria in respiratory tract infections, eastern Asia. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 343 – 9.
200. Freeman J, Morris A, Blackmore T, Hammer D, Munroe S, McKnight L. Incidence of nontuberculous mycobacterial disease in New Zeland, 2004. *N Z Med J* 2007; 120 (1256): U2580.
201. Lai C, Tan CK, Lin SH. Clinical significance of nontuberculous mycobacteria isolates in elderly Taiwanese patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; 30: 779 – 83.
202. Pedro Hda S, Pereira MI, Goloni Mdo R, Ueki SY, Chimara E. Nontuberculous mycobacteria isolated in Sao José do Rio Preto, Brazil between 1996 and 2005. *J Bras Pneumol* 2008; 34 (11): 950 – 5.
203. Brown – Elliott BA, Wallace RJ. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late – pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 716 – 46.
204. Griffith DE, Aksamit T, Brown – Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATC / IDSA statement: diagnosis, treatment and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 367 – 416.
205. Gunaydin M, Yanik K, Eroglu C, Sanic A, Ceyhan I, Erturan Z, et al. Distribution of nontuberculous mycobacteria strains. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2013; 12: 33.
206. Braun E, Sprecher H, Davidson S, Kassis I. Epidemiology and clinical significance of non – tuberculous mycobacteria isolated from pulmonary specimens. *Int J Tuberc Lung Dis* 2013; 17 (1): 96 – 9.
207. Mazumder SA, Hicks A, Norwood J. *Mycobacterium gordonae* pulmonary infection in an immunocompetent adult. *North Am J Med Sci* 2010; 205 – 7.
208. Kumar GS, Urs TA, Ranganath RR. MPT64 antigen detection for rapid confirmation of *M.tuberculosis* isolates. *BMC Research Notes* 2011; 4: 79 – 84.
209. Shenoy VP, Mukhopadhyay C. Rapid immunochromatographic test for the identification and discrimination of *Mycobacterium tuberculosis complex* isolates from non-tuberculous mycobacteria. *J Clin Diagn Res* 2014; 8 (4): 13 – 5.

210. Ang CF, Cajucom AM, Kim Y, Bang H, Lee H, Cho SN, et al. Evaluation of a rapid assay for identification of *Mycobacterium tuberculosis* grown in solid and liquid media. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011; 15 (11): 1475 – 7.
211. Russo C, Tortoli E, Menichella D. Evaluation of the new GenoType Mycobacterium assay for identification of mycobacterial species. *J Clin Microbiol* 2006; 44 (2): 334 – 9.
212. Sharma N, Sharma V, Singh PR, Jawed B, Babu V, Kandpal J, et al. Tuberculosis and molecular diagnosis. *WebmedCentral Biotechnology* 2013; 4 (2): WMCOO3992.
213. Roberts SA, Lowe O, Pandey S, Williamson DA, Newton S, Vaughan R. Comparison of the MGIT Tbc immunochromatographic assay with the Accuprobe Gen – Probe TB assay for identification of Mycobacterium tuberculosis complex: results from a low – burden tuberculosis setting. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 74: 415 – 6.
214. Machado D, Ramos J, Couto I, Cadir N, Narciso I, Coelho E, et al. Assesment of the BD MGIT Tbc identification test for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in a network of mycobacteriology laboratories *Biomed Res Int* 2014; 398 – 404.
215. Singh AK, Maurya AK, Umrao J, Kant S, Singh Kushwaha RA, Nag VL, et al. Role of GenoType Mycobacterium common mycobacterial/additional species assay for rapid differentiation between *Mycobacterium tuberculosis complex* and different species of non – tuberculous mycobacteria. *J Lab Physicians* 2013; 5 (2): 83 – 9.
216. Vadwai V, Sadani M, Sable R, Chavan A, Balan K, Naik A, et al. Immunochromatographic assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: what is the perfect time to test? *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 74: 282 – 7.
217. Považan A, Vukelić A, Savković T, Kurucin T. Use of immunochromatographic assay for rapid identification of Mycobacterium tuberculosis complex from liquid culture. *Bosn J Basic Med Sci* 2012; 12 (1): 33 – 6.
218. Garcia – Martos P, Garcia – Agudo L, Rodriguez – Jimenez MJ, Rodriguez – Iglesias M. Rapid identification of Mycobacterium tuberculosis complex from broth cultures by immunochromatographic assay. *Rev Esp Quimioter* 2010; 23 (4): 206 – 9.
219. Ang CF, Cajucom MAM, Kim J, Bang H, Lee H, Cho N, et al. Evaluation of a rapid assay for identification of *Mycobacterium tuberculosis* grown in solid and liquid media. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011; 15 (11): 1475 – 7.

