

РЕТРОСПЕКТИВНА ЕВАЛУАЦИЈА COBAS AMPLICOR MTB ТЕСТА У ДЕТЕКЦИЈИ *Mycobacterium tuberculosis* ИЗ РЕСПИРАТОРНИХ УЗОРАКА

Емир Халиловић¹, Фатима Нумановић¹, Нијаз Тихић¹, Јасмина Смајловић¹, Алма
Имамовић¹, Амела Херцеговац², Адиса Ахмић², Златко Недић², Мерима Гегич¹

¹Завод за микробиологију, Поликлиника за лабораторијску дијагностику,
ЈЗУ УКЦ Тузла, Трновац бб, 75 000 Тузла, Босна и Херцеговина

²Природно-математички факултет, Универзитет у Тузли, Универзитетска 4,
75 000 Тузла, Босна и Херцеговина

Abstract

HALILOVIĆ E., Fatima NUMANOVIĆ, N. TIHIĆ, Jasmina SMAJLOVIĆ, Alma IMAMOVIĆ, Amela HERCEGOVAC, Adisa AHMIĆ, Z. NEDIĆ, Merima GEGIĆ: RETROSPECTIVE EVALUATION OF THE COBAS AMPLICOR MTB TEST FOR DETECTION OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IN RESPIRATORY SPECIMENS. [¹Institute of Microbiology, Polyclinic for Laboratory Diagnostics, University Clinical Center Tuzla, Trnovac bb, 75 000 Tuzla, Bosnia and Herzegovina; ²Faculty of Science and Mathematics, University of Tuzla, Univerzitetska 4, 75 000 Tuzla, Bosnia and Herzegovina].

Traditional methods for detection of mycobacteria are limited by low sensitivity and/or specificity, with the time necessary for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* of several weeks. A number of molecular techniques, including different biomarkers, have been developed for rapid identification of mycobacteria. The aim of this study was to evaluate the reliability of the COBAS AMPLICOR MTB Test in detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. Samples were decontaminated with *N*-acetyl-*L*-cysteine-sodium hydroxide (NALC-NaOH). One drop was used for detection of acid-fast bacilli positive-smears by Ziehl-Neelsen (ZN) staining, 200 µL to inoculate Löwenstein-Jensen (LJ) medium, 500 µL for cultivation in BACTEC MGIT 960 System, and 100 µL for the COBAS AMPLICOR MTB Test, performed according to manufacturer's recommendations. Out of 100 samples, 50 samples were smear-positive and 50 smear-negative. *Mycobacterium tuberculosis* was isolated from 59 samples by at least one cultivation method. After the analysis of inconsistent results, the overall sensitivity, specificity, positive and negative predictive value of the COBAS AMPLICOR MTB Test were 94.93%, 100%, 100% and 91.89% compared to diagnostic cultures, with an inhibition rate 2%. The values for smear-positive and smear-negative samples were 97.87%, 100%, 100%, 50%, and 83.33%, 100%, 100% and 94.29%, respectively. The greater numbers of positive samples were detected using the COBAS AMPLICOR MTB Test than by direct microscopy. Based on the obtained results, considering the methodological simplicity and completely automatized amplification and detection, the COBAS AMPLICOR MTB Test has proven to be very reliable in the diagnosis of tuberculosis (TB).

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, COBAS AMPLICOR MTB Test, polymerase chain reaction, sensitivity, specificity

Сажетак

Традиционалне методе за детекцију микобактерија ограничене су ниском осјетљивошћу и/или специфичношћу, уз вријеме неопходно за идентификацију *Mycobacterium tuberculosis* до неколико седмица. Бројне молекуларне технике, које укључују различите биомаркере, данас су развијене за брзу идентификацију микобактерија. Циљ рада је био утврдити поузданост COBAS AMPLICOR MTB Теста у детекцији *Mycobacterium tuberculosis* из респираторних узорака. Узорци су деконтаминирани *H*-ацетил-*L*-цистеин-натријум хидроксид (NALC-NaOH) методом. Једна кап је кориштена за детекцију ацидо-алкохолнорезистентних (AAR) бацила директном микроскопијом методом по Ziehl-Neelsen-у (ZN), 200 μ L за инокулацију на чврсту Löwenstein-Jensen (LJ) подлогу, 500 μ L за култивацију ВАСТЕС MGIT 960 Системом, а 100 μ L за COBAS AMPLICOR MTB Тест, који је изведен на основу препорука произвођача. Од 100 анализираних узорака, 50 узорака је било позитивно, а 50 негативно на директном микроскопском препарату. Код 59 узорака је изолиран *Mycobacterium tuberculosis* на барем једном од метода култивације. Након анализе неподударних резултата, укупна осјетљивост, специфичност, позитивна и негативна предиктивна вриједност COBAS AMPLICOR MTB Теста су били 94.93%, 100%, 100% и 91.89% у односу на дијагностичке културе, уз забиљежену стопу инхибиције од 2%. Код препарат-позитивних и препарат-негативних узорака ове вриједности су износиле 97.87%, 100%, 100% и 50%, односно 83.33%, 100%, 100% и 94.29%, респективно. Примјеном COBAS AMPLICOR MTB Теста, уочен је већи број позитивних узорака у односу на резултате директне микроскопије. На основу добивених резултата, те поједностављења током рада кроз поступке потпуно аутоматизираних амплификације и детекције, COBAS AMPLICOR MTB Тест се показао врло поузданим у дијагнози туберкулозе (ТВ).

Кључне ријечи: *Mycobacterium tuberculosis*, COBAS AMPLICOR MTB Тест, ланчана реакција полимеразе, осјетљивост, специфичност

УВОД

С готово 9 милиона новообољелих и 1,5 милиона смртних случајева у 2013. години, туберкулоза (ТВ) је и даље један од водећих здравствених проблема у свијету. Од осамдесетих година двадесетог вијека инциденца ТВ поново је у порасту, а неки од разлога су појава HIV/AIDS епидемије, варијабилна учинковитост BCG вакцине, појава мулти-резистентне ТВ и повећана имиграција становништва из земаља у развоју (WHO, 2014).

Род *Mycobacterium* данас обухвата 172 врсте и 13 подврста описаних у попису бактеријских врста с одобреним именима (www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html). Искључиви патогени човјека су чланови *Mycobacterium tuberculosis* комплекса (MTBC) и *M. leprae*, док се све остале врсте уобичајено називају нетуберкулозним микобактеријама (*non-tuberculous mycobacteria*, NTM). Микобактерије груписане у MTBC имају различите фенотипске карактеристике и преферирају различите домаћине. Комплекс укључује облигатне патогене људи *M. tuberculosis*, *M. africanum* и *M. canettii*, док су врсте прилагођене на животиње *M. bovis* (говеда), *M. caprae* (овце и козе), *M. microti* (глодавци) и *M. pinnipedii* (туљани и морски лавови) (Gagneux and Small, 2007), те недавно описани нови чланови *M. mungi* (мунгоси) (Alexander *et al.*, 2010) и *M. orygis* (животиње из фамилије *Bovidae*) (van Ingen *et al.*, 2012). Иако све наведене врсте могу да изазову обољења људи, најчешћи узрочник ТВ човјека је *M. tuberculosis*.

Тачна идентификација микобактерија и дискриминација MTBC од NTM су неопходни за одговарајући терапијски третман и ране епидемиолошке интервенције. Идентификација

микобактерија до нивоа врсте на основу културелних и биохемијских својстава је тешка и, у неким случајевима, није могућа. Овај поступак је дуготрајан и често склон грешкама. Микроскопско доказивање присуства ацидо-алкохолнорезистентних (AAR) бацила је брза и најстарија дијагностичка метода, али је ограничена ниском осетљивошћу (45-80% или 5.000 до 10.000 бацила/mL узорка) и специфичношћу, због тога што детектује и NTM, као и друге микроорганизме који су AAR (Palomino, 2009). Методе култивације микобактерија представљају "златни стандард" у дијагностици ТВ. Осим изолације, ове методе омогућавају идентификацију микобактерија и испитивање осјетљивости на антитуберкулотике. Осјетљивост метода култивације је далеко већа од микроскопије (10-100 бацила/mL узорка) (Partish and Carrol, 2011), али је за коначну лабораторијску потврду њиховом примјеном неопходно неколико седмица (Drobniewski *et al.*, 2012).

Увођење врло осјетљивих и специфичних молекуларних метода за брзу идентификацију микобактерија промијенило је алгоритам лабораторијске дијагностике микобактерија и знатно повећало брзину и тачност поступка. У посљедње двије деценије развијено је неколико комерцијалних система за директну детекцију MTBC у клиничким узорцима, као на примјер Cobas Amplicor MTB Test (Roche Diagnostic Systems Inc., Branchburg, New Jersey, USA), Amplified *M. tuberculosis* Direct Test (Gen-Probe Inc., San Diego, California, USA), BD ProbeTec ET Direct TB System (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA), INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 (Innogenetics, Ghent, Belgium), GenoType Mycobacterium CM/AS (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany) i GeneXpert MTB/RIF Test (Cepheid, Sunnyvale, California and FIND Diagnostics, Geneva, Switzerland) (Drobniewski *et al.*, 2012). Ове методе такођер укључују и широку разноврсност *in house* тестова с вишеструким протоколима екстракције нуклеинске киселине и амплификације различитих генских циљева (*IS6110*, *rpoB*, *hsp65*, *16S rRNA* или *MBP64*).

У односу на директну микроскопију ови тестови могу брзо открити присуство *M. tuberculosis* у 50-85% препарат-негативних, култура-позитивних узорака, док је њихова позитивна предиктивна вриједност (PPV), код препарат-позитивних узорака, виша (>95%) од PPV директне микроскопије у географским подручјима у којима је висока инциденца NTM. Примјеном молекуларних метода може се детектовати присуство *M. tuberculosis* неколико седмица раније од метода култивације у 80-90% болесника с високим степеном сумње на ТВ (CDC, 2009).

COBAS AMPLICOR MTB Тест је квалитативни *in vitro* тест, намијењен за детекцију организама MTBC употребом родовско специфичних почетница за дефинисање циљне секвенце од 584 нуклеотида унутар регије гена који кодира 16S подјединицу rRNA. Базира се на комбинацији PCR амплификације циљне секвенце и хибридизације умноженог продукта са специфичним пробама у реакционим посудама за детекцију (Roche, 2003). Од 1996. године тест је одобрен од стране америчке Управе за храну и лијекове за примјену на препарат-позитивним респираторним узорцима (CDC, 2009). Бројне студије су показале високу осјетљивост код препарат-позитивних респираторних (90-100%), те нижу код препарат-негативних респираторних (50-95.9%) и нереспираторних узорака (23.53-98%). За респираторне узорке, укупна осјетљивост теста варира од 83% до 100%, а укупна специфичност од 91.3% до 100% (Parsons *et al.*, 2011; Tortoli *et al.*, 2012). PPV COBAS AMPLICOR MTB Теста варира од 61.2% до 100%, док је негативна предиктивна вриједност (NPV) од 33.3% до 98.4%, у овисности од врсте

респираторних узорака (Fegou *et al.*, 2005). Стога је циљ овог рада био да се одреди осјетљивост, специфичност, PPV и NPV COBAS AMPLICOR MTB Теста у детекцији *M. tuberculosis* из респираторних клиничких узорака у односу на резултате добивене култивацијом микобактерија на LJ подлози.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Ретроспективном студијом је обухваћено 100 респираторних узорака анализираних у периоду од марта 2009. до јула 2012. године у Заводу за микробиологију УКЦ Тузла као дио рутинске дијагностичке процедуре. За сваког испитаника су прикупљени основни подаци (доб, спол), клиничка дијагноза, врста узетог клиничког материјала, као и претходни, тренутни и накнадни резултати микробиолошких анализа, и резултати добивени додатним узорцима пацијената.

Примарна обрада узорака. Сви узорци су деконтаминирани *N*-ацетил-*L*-цистеин-натријум хидроксид (NALC-NaOH) методом. У 50 mL епрувету помијешано је 2 mL узорка с једнаким волуменом раствора NALC-NaOH (4% NaOH, 1.45% Na-цитрата, 0.5% *N*-ацетил-*L*-цистеина) и инкубирано на собној температури у трајању од 20 минута ради деконтаминације. Додатком фосфатног пуфера (67 mM; pH 6.8) до ознаке од 50 mL извршена је неутрализација. Садржај у епрувети је вортексиран, а потом концентриран центрифугирањем при брзини од 3.000 x *g* у трајању од 15 минута. Након центрифугирања, супернатант је одливен, а седимент је ресуспендиран у 2 mL истог фосфатног пуфера. Сви клинички узорци су након деконтаминације анализирани директним прегледом микроскопског препарата и паралелно култивирани на чврстој и течној подлози. Квалитативна детекција *M. tuberculosis* је извршена примјеном COBAS AMPLICOR MTB Теста.

Директна микроскопија. За потврду присуства AAR бацила директном микроскопијом једна кап ресуспендираног седимента је кориштена за припрему препарата бојених карбол-фуксином, методом по Ziehl-Neelsen-у (ZN).

Методe култивације микобактерија. Чврсте Löwenstein-Jensen (LJ) подлоге су инокулиране са 200 µL обрађеног седимента. Овако засијане подлоге су инкубиране на 37°C до дванаест седмица, при чему је пораст контролисан два пута седмично у прве три седмице, а затим једном седмично. ВАСТЕС MGIT 960 епрувете, допуњене с 500 µL ODAC и 100 µL MGIT PANTA саплементa, су инокулиране с 500 µL обрађеног узорка. Засијане епрувете, унијете у ВАСТЕС MGIT 960 Систем, су инкубиране на 37°C, а интензитет флуоресценције је аутоматски праћен сваких 60 минута. Епрувете су инкубиране до појаве флуоресценције, односно детекције раста, или 42 дана након чега их инструмент проглашава негативним.

COBAS AMPLICOR MTB Тест. За квалитативну детекцију *M. tuberculosis* кориштен је COBAS AMPLICOR MTB Тест, уз примјену процедуре мануелне изолације нуклеинске киселине на основу упута датих од стране произвођача. COBAS AMPLICOR Анализатор, са намјенским софтвером AmpliLink 2.41, кориштен је за аутоматизовану амплификацију и детекцију. Дио обрађеног узорка (100 µL) је помијешан с 500 µL реагенса за испирање и центрифугиран 10 минута на 14.000 x *g*. Супернатант је одстрањен, а на седимент је додато 100 µL лизирајућег реагенса након чега је суспензија вортексирана. Како би се задовољила квалитативна валидација теста, паралелно са узорцима су процесуиране

негативна и позитивна контрола. Узорци и контроле су инкубирани на $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 45 минута до потпуне алкалне лизе микобактерија. Лизирани материјал је неутрализован додатком 100 μL реагенса за неутрализацију након чега је вортексиран. Радна амплификацијска смјеша је припремљена додатком 100 μL *Mycobacterium* интерне контроле амплификације (IAC) и 100 μL AmpErase LD ензима у MYCO MMX (*Mycobacterium Master Mix*) тубу. У реакционе тубе је додато по 50 μL радне амплификацијске смјеше и 50 μL обрађених узорака и контрола, а затим су постављене на COBAS AMPLICOR Анализатор за амплификацију и детекцију. Интерпретација резултата вршена је на основу препорука датих од стране произвођача. Позитивни су били узорци са колориметријским читањем апсорбанце већим од 0.350 јединица OD₆₆₀. Узорци који су показали инхибицију IAC су поновљени након разрјеђења с лизирајућим реагенсом у омјеру 1:10.

Анализа неподударних резултата микробиолошких метода. У случајевима када су иницијални резултати метода култивације били различити од резултата COBAS AMPLICOR MTB Теста, у обзир су узети други подаци из лабораторијског регистра, укључујући претходне и накнадне резултате микробиолошких анализа, и резултате добивене с додатним узорцима пацијената. Ради лакшег праћења и процјене вриједности COBAS AMPLICOR MTB Теста за рану дијагнозу ТВ извршена је клиничка класификација испитаника у пет група на основу препорука америчког торакалног друштва (American Thoracic Society, 2000): група 1 (искључење ТВ), негативан туберкулински кожни тест, препарат и култура негативни, дефинитивна друга дијагноза добивена бактериолошком културом; група 2 (ТВ инфекција), препарат и култура негативни, клинички неактивна болест (позитиван туберкулински кожни тест), дефинитивна друга дијагноза; група 3 (ТВ инфекција), препарат позитиван или негативан, култура негативна, клинички активна болест (позитиван туберкулински кожни тест, историја ТВ, искључење друге дефинитивне дијагнозе, унапрјеђење лијечењем антитуберкулозном хемотерапијом); група 4 (ТВ инфекција), препарат негативан, култура позитивна, клинички активна болест; група 5 (ТВ инфекција), препарат и културе позитивни, клинички активна болест. Ови подаци су узети у обзир с циљем успоставе комбинације клиничке дијагнозе и културе као "референтног метода". Након ове анализе, иницијални резултати COBAS AMPLICOR MTB Теста су прикладно рекласифицирани.

Статистичка обрада података. Осјетљивост, специфичност, PPV и NPV COBAS AMPLICOR MTB Теста су израчунати успоредбом резултата PCR амплификације с резултатима култивације на LJ подлози. У статистичкој обради података кориштен је χ^2 тест распореда фреквенција, *McNemar*-ов χ^2 тест, односно *Fischer*-ов тест тачне вјероватноће у случајевима када нису били задовољени услови за кориштење χ^2 теста, и ϕ корелација. Статистичке хипотезе су тестиране на нивоу значајности од $p < 0.05$, а подаци су обрађени статистичким програмом SPSS Statistics 17.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA).

РЕЗУЛТАТИ

Анализа иницијалних резултата истраживања. Примјеном COBAS AMPLICOR MTB Теста анализирано је 100 респираторних узорака примљених у лабораторију за почетну дијагнозу ТВ, праћење микобактеријских инфекција или евентуално искључење

ТВ. Најбројнији узорци су били спутуми (93/100), док су преостали узорци били бронхо-алвеоларне лаваже (BAL) (4/100) и аспирати бронха (3/100) (Табели 1).

Табела 1. Врста анализираних узорака, иницијални резултати анализа и инхибиција IAC.

Узорак	Микроскопија	LJ култура		ВАСТЕС култура		COBAS AMPLICOR		
		Позитиван	Негативан	Позитиван	Негативан	Позитиван	Негативан	Инхибиран
спутум	Позитиван (50)	45	5	47	3	46	2	2
	Негативан (43)	9	34	11	32	13	30	0
BAL	Позитиван (0)	0	0	0	0	0	0	0
	Негативан (4)	0	4	1	3	0	4	0
аспират бронха	Позитиван (0)	0	0	0	0	0	0	0
	Негативан (3)	2	1	2	1	2	1	0

Од укупног броја тестираних узорака, 61 узорак (61%) је био позитиван на барем једном од метода који је кориштен за култивацију микобактерија; 56 узорака (56%) је било позитивно на LJ култури, док је 61 узорак (61%) био позитиван након култивације микобактерија аутоматизираним ВАСТЕС MGIT 960 Системом. COBAS AMPLICOR МТВ Тест је био позитиван за 61 узорак (61%). Иницијални резултати микробиолошких анализа, COBAS AMPLICOR МТВ Теста и инхибиција IAC приказани су у Табели 1.

Од 100 анализираних узорака, 50 узорака је било позитивно, а 50 негативно на директном микроскопском препарату. Од 50 узорака који су били препарат-позитивни, COBAS AMPLICOR МТВ Тест је код 46 узорака (92%) био позитиван, а код 2 узорка (4%) негативан. Преостала 2 узорка (4%) су показала инхибицију IAC, али са позитивним читањем OD₆₆₀ циљне секвенце. Ови узорци су били позитивни на оба примјењена метода култивације микобактерија.

Од 50 препарат-негативних узорака, COBAS AMPLICOR МТВ Тест је код 15 узорака (30%) био позитиван, а негативан код преосталих 35 узорака (70%) (Табела 2). Уочен је већи број COBAS AMPLICOR МТВ позитивних узорака у односу на негативне резултате микроскопског прегледа препарата, те утврђена висока корелација позитивних микроскопских препарата са позитивним резултатима COBAS AMPLICOR МТВ Теста ($\phi=0.68$, $p<0.01$) и статистички значајна разлика између резултата добивених директном микроскопијом и COBAS AMPLICOR МТВ Тестом ($\chi^2=46.72$, $df=1$, $p<0.01$).

Табела 2. Резултати COBAS AMPLICOR MTB Теста компарирани са резултатима директне микроскопије.

COBAS AMPLICOR	Позитиван	Негативан	Инхибиција	Укупно
ZN позитиван	46	2	2	50
ZN негативан	15	35	0	50
Укупно	61	37	2	100

Поређењем резултата COBAS AMPLICOR MTB Теста са резултатима култивације микобактерија на LJ подлози уочено је да је 51 узорак (91.07%) био позитиван примјеном обје методе. Резултати се нису поклапали код 5 узорака (8.93%) који су били позитивни на LJ култури, а негативни на COBAS AMPLICOR MTB Тесту или су показали инхибицију PCR амплификације. Код 10 узорака (10%) који су били позитивни на COBAS AMPLICOR MTB Тесту изостао је пораст микобактерија на LJ подлози. Преостали узорци су били негативни примјеном обје методе (Табела 3). Утврђено је да не постоји статистички значајна разлика између резултата COBAS AMPLICOR MTB Теста и резултата добивених култивацијом микобактерија на LJ подлози ($\chi^2=1.99$, $df=1$, $p=0.16$).

Табела 3. Резултати COBAS AMPLICOR MTB Теста компарирани са резултатима култивације на LJ подлози.

COBAS AMPLICOR	Позитиван	Негативан	Инхибиција	Укупно
LJ позитиван	51	3	2	56
LJ негативан	10	34	0	44
Укупно	61	37	2	100

Од укупног броја тестираних узорака, 61 узорак (61%) је био позитиван култивацијом примјеном BACTEC MGIT 960 Система. Поређењем резултата COBAS AMPLICOR MTB Теста са резултатима култивације микобактерија BACTEC MGIT 960 Системом уочено је да су 54 узорка (88.52%) била позитивна примјеном обје методе. Резултати се нису поклапали код 7 узорака (11.48%) који су били позитивни култивацијом BACTEC MGIT 960 Системом, а негативни примјеном COBAS AMPLICOR MTB Теста или су показали инхибицију PCR амплификације. Детекција раста примјеном BACTEC MGIT 960 Система је изостала код 7 узорака (7%) који су били позитивни на COBAS AMPLICOR MTB Тесту. Преостали узорци су били негативни примјеном обје методе (Табела 4). Утврђено је да не постоји статистички значајна разлика између резултата COBAS AMPLICOR MTB Теста и резултата добивених култивацијом микобактерија BACTEC MGIT 960 Системом ($\chi^2=0.17$, $df=1$, $p=0.68$).

Табела 4. Резултати COBAS AMPLICOR MTB Теста компарирани са резултатима култивације BACTEC MGIT 960 Системом.

COBAS AMPLICOR	Позитиван	Негативан	Инхибиција	Укупно
ВАСТЕС позитиван	54	5	2	61
ВАСТЕС негативан	7	32	0	39
Укупно	61	37	2	100

Анализа неподударних резултата истраживања. На основу увида у лабораторијски регистар микробиолошких анализа и података добивених из историја болести испитаника извршена је рекласификација иницијалних резултата и утврђена клиничка учинковитост COBAS AMPLICOR MTB Теста. Поређењем резултата COBAS AMPLICOR MTB Теста са резултатима култивације микобактерија на LJ подлози код препарат-позитивних узорка уочено је да су 42 узорка (84%) била позитивна, а 1 узорак (2%) био негативан примјеном обје методе. Резултати се нису поклапали код 4 узорка (8%) који су били негативни култивацијом на LJ подлози, а позитивни COBAS AMPLICOR MTB Тестом, као и код 3 узорка (6%) који су били позитивни култивацијом на LJ подлози, али су били негативни на COBAS AMPLICOR MTB Тесту или су показали инхибицију IAC. Анализом 4 узорка који су били негативни култивацијом на LJ подлози, а позитивни на COBAS AMPLICOR MTB Тесту установљено је да су 2 узорка била позитивна култивацијом BACTEC MGIT 960 Системом. Нађено је да су накнадни узорци ових испитаника, из којих није рађен COBAS AMPLICOR MTB Тест, били позитивни и култивацијом на LJ подлози. Стога су ови узорци рекласифицирани као позитивни култивацијом на LJ подлози (клиничка група 5). Преостала 2 узорка су потицала од испитаника који су били под терапијом у моменту давања узорка на анализу (клиничка група 3), те су представљали лажно позитивне резултате COBAS AMPLICOR MTB Теста. Од 3 узорка (клиничка група 5) који су били позитивни на LJ култури, а негативни примјеном COBAS AMPLICOR MTB Теста, код једног су порасле само 2 колоније. Исти узорак је био позитиван култивацијом BACTEC MGIT 960 Системом. Код преостала 2 узорка били су присутни инхибитори. Додатни узорци ових испитаника, који су рађени у разрјеђењу 1:10 са лизирајућим реагенсом били су позитивни, те су резултати тих узорка укључени у процјену учинковитости COBAS AMPLICOR MTB Теста. Код 1 препарат-позитивног узорка, резултати култивације на обје подлоге, као и резултат COBAS AMPLICOR MTB Теста били су негативни (клиничка група 3). Овај узорак припадао је испитанику који је претходно лијечен од ТВ. Поређењем резултата COBAS AMPLICOR MTB Теста са резултатима култивације микобактерија на LJ подлози код препарат-негативних узорка уочено је да су 33 узорка (66%) била негативна, а 9 узорка (18%) је било позитивно примјеном обје методе. Резултати се нису поклапали код 6 узорка (12%) који су били негативни култивацијом на LJ подлози, а позитивни на COBAS AMPLICOR MTB Тесту, као и код 2 узорка (4%) која

су била позитивна култивацијом на LJ подлози, а негативна на COBAS AMPLICOR MTB Тесту. Два узорка која су била позитивна култивацијом на LJ подлози, а негативна на COBAS AMPLICOR MTB Тесту, била су позитивна култивацијом примјеном ВАСТЕС MGIT 960 Система (клиничка група 4). Код једног узорка је порасла једна, а код другог само двије колоније на LJ подлози. Будући да су ови пацијенти накнадно лијечени од ТВ, резултати добивени COBAS AMPLICOR MTB Тестом сматрају се лажно негативним. Од 6 узорака који су били негативни култивацијом на LJ подлози, а позитивни на COBAS AMPLICOR MTB Тесту један узорак је био позитиван култивацијом ВАСТЕС MGIT 960 Системом (клиничка група 4). Увидом у клиничке протоколе нађено је да су наредни узорци овог испитаника, из којих није рађен COBAS AMPLICOR MTB Тест, били позитивни култивацијом на LJ подлози. Овај узорак је рекласифициран као позитиван култивацијом на LJ подлози. Преосталих 5 узорака (клиничка група 3) су потицали од пацијената који су завршили или су у моменту давања узорка примали терапију. Код 2 препарат-негативна узорка (клиничка група 1), код којих су LJ култура и COBAS AMPLICOR MTB Тест били негативни, добивен је позитиван резултат култивацијом примјеном ВАСТЕС MGIT 960 Система. Будући да су наредни узорци, добивени од ових пацијената били негативни на оба метода култивације, може се посумњати на могућу контаминацију култура.

Анализа рекласифицираних резултата истраживања. На основу рекласифицираних резултата истраживања израчуната је осјетљивост, специфичност, PPV и NPV COBAS AMPLICOR MTB Теста у односу на резултате добивене култивацијом микобактерија на LJ подлози (Табела 5).

Табела 5. Осјетљивост, специфичност, PPV и NPV рекласифицираних резултата COBAS AMPLICOR MTB Теста у односу на резултате култивације на LJ подлози.

Узорак	Микроскопија	Број	COBAS AMPLICOR	LJ култура		Осјетљивост %	Специфичност %	PPV %	NPV %
				Позитиван	Негативан				
спутум	Позитиван	50	Позитиван	46	2	97.87	33.33/100.0 ^а	95.83/100.0 ^а	50.0
			Негативан	1	1				
			Инхибиран	0	0				
спутум	Негативан	43	Позитиван	8	5	80.0	84.85/100.0 ^б	61.54/100.0 ^б	93.33
			Негативан	2	28				
			Инхибиран	0	0				
BAL	Негативан	4	Позитиван	0	0	-	100.0	-	100.0
			Негативан	0	4				
			Инхибиран	0	0				
аспират бронха	Негативан	3	Позитиван	2	0	100.0	100.0	100.0	100.0
			Негативан	0	1				
			Инхибиран	0	0				
спутум		93	Позитиван	54	7	94.74	80.56/100.0 ^ц	88.52/100.0 ^ц	90.63
			Негативан	3	29				
			Инхибиран	0	0				
	Позитиван	50	Позитиван	46	2	97.87	33.33/100.0 ^а	95.33/100.0 ^а	50.0
			Негативан	1	1				
			Инхибиран	0	0				
	Негативан	50	Позитиван	10	5	83.33	86.84/100.0 ^б	66.67/100.0 ^б	94.29
			Негативан	2	33				
			Инхибиран	0	0				
Укупно		100	Позитиван	56	7	94.92	82.93/100.0 ^ц	88.89/100.0 ^ц	91.89
			Негативан	3	34				
			Инхибиција	0	0				

- а) Искључујући два препарат-позитивна, култура-негативна узорка лијечених испитаника,
 б) Искључујући пет препарат-негативних, култура-негативних узорка лијечених испитаника,
 ц) Искључујући седам култура-негативних узорка лијечених испитаника.

Будући да је укупна стопа позитивности у студији, на основу резултата култивације, била 59% (59/100), укупна осјетљивост COBAS AMPLICOR MTB Теста за све узорке је износила 94.92%, специфичност 82.93/100.0%, PPV 88.89/100.0% и NPV 91.89%, док су израчунате вриједности само за узорке спутума биле 94.74%, 80.56/100.0%, 88.52/100.0% и 90.63%, респективно. Код препарат-позитивних узорака ове вриједности су износиле 97.87%, 100%, 100% и 50%, односно 83.33%, 100%, 100% и 94.29% код препарат-негативних узорака (Табела 5).

ДИСКУСИЈА

Проблеми везани уз примјену конвенционалних дијагностичких метода за детекцију и идентификацију *M. tuberculosis* и повећана инциденца ТВ у свијету, стимулирали су развој молекуларних тестова намијењених за директну детекцију *M. tuberculosis* у различитим врстама клиничких узорака. Примјена ових тестова постала је рутинска процедура у многим клиничким микробиолошким лабораторијама. Брза лабораторијска потврда ТВ омогућава раније отпочињање терапије, редукују примјене емпиријске терапије која доводи до појаве резистенције, брже изљечење обољелих и превенцију трансмисије обољења (CDC, 2009).

Један од ограничавајућих фактора примјене конвенционалних метода култивације микобактерија односи се на спори раст бацила ТВ. Упркос значајној уштеди времена примјеном течних култура и аутоматизираних система, најбржи, најлакши и најјефтинији доступни метод и даље је микроскопски преглед препарата (Parrish and Carroll, 2011). У клиничкој пракси детекција пацијената обољелих од ТВ директном микроскопијом може бити изузетно тешка. У овом истраживању је уочена висока корелација позитивних микроскопских препарата са позитивним резултатима COBAS AMPLICOR MTB Теста ($\phi=0.68$, $p<0.01$).

Сличне резултате у својој студији добили су Baugram *et al.*, код којих је проценат позитивних резултата COBAS AMPLICOR MTB Теста код препарат-позитивних узорака износио 77.9% (67/86) (Baugram *et al.*, 2006), док су Ikegame *et al.* показали да проценат позитивних резултата COBAS AMPLICOR MTB Теста расте са степеном позитивности кориштеним за квантитативно извјештавање броја AAR бацила у директном микроскопском препарату (Ikegame *et al.*, 2012). И у овом истраживању добивен је већи број COBAS AMPLICOR MTB позитивних узорака у односу на негативне резултате микроскопског прегледа препарата (10/50), а присуство *M. tuberculosis* у њима је потврђено барем једним од кориштених метода култивације микобактерија. У наведеној ретроспективној студији Ikegame *et al.*, 66.7% (12/18) препарат-негативних узорака било је позитивно примјеном COBAS AMPLICOR MTB Теста (Ikegame *et al.*, 2012), док су Baugram *et al.* позитивне резултате добили код 59.7% (49/82) препарат-негативних узорака (Baugram *et al.*, 2006).

Дијагностичка осјетљивост COBAS AMPLICOR MTB Теста за све респираторне узорке у односу на LJ културу у овом истраживању је била 94.92%, а само за узорке спутума 94.74%. На ову, премда добру осјетљивост теста, утицали су 3 узорка спутума који су били негативни на COBAS AMPLICOR MTB Тесту. Ling *et al.*, на основу резултата мета-анализе дијагностичке тачности комерцијалних амплификацијских тестова,

наводе да је укупна осјетљивост за све респираторне узорке у односу на LJ културу била 85%, са значајном разликом у осјетљивости од 36% до 100% између различитих студија (Ling *et al.*, 2008). Оваква хетерогеност у мета-анализи је усљед варијабилности у нивоима одлучивања, варијација у протоколима различитих тестова, спектра болести, те истраживане популације. У свом раду, Fegou *et al.* су рачунали осјетљивост теста за сваку врсту узорака посебно. За препарат-позитивне узорке спутума осјетљивост је била 73.6%, а за препарат-негативне 52.1% (Fegou *et al.*, 2005). Осјетљивост COBAS AMPLICOR MTB Теста код препарат-позитивних респираторних узорака у истраживању које су провели Mitarai *et al.* износила је 99.4%, потврђујући оправданост примјене теста за брзу дијагнозу ТВ код ових узорака (Mitarai *et al.*, 2011). Осјетљивост примјењеног COBAS AMPLICOR MTB Теста у овом раду је била 97.87% код препарат-позитивних узорака спутума, док је код препарат-негативних узорака спутума износила 80%.

COBAS AMPLICOR MTB Тест је показао нижу осјетљивост код препарат-негативних узорака која је у овом истраживању износила 83.33%. На основу резултата досадашњих студија примјена COBAS AMPLICOR MTB Теста код препарат-негативних узорака спутума је показала осјетљивост од 50% до 95.9% (Parsons *et al.*, 2011). Rajalahti *et al.* наводе да осјетљивост теста код препарат-негативних узорака може бити знатно повећана ако се анализе раде на три узастопна узорка спутума (Rajalahti *et al.*). Анализе на додатном узорку могу бити корисне уколико су резултати COBAS AMPLICOR MTB Теста и клинички налази контрадикторни.

Лажно негативни резултати COBAS AMPLICOR MTB Теста добивени су код 3 узорка. Ови узорци су имали позитивне резултате добивене култивацијом BACTEC MGIT 960 Системом након раздобља инкубације већег од 20 дана. Негативни резултати COBAS AMPLICOR MTB Теста за ове узорке могу се објаснити малим бројем микобактерија, инхибицијом ензиматске амплификације и/или неједнаком расподјелом микобактерија у суспензији теста. Будући да код ових узорака није изостала амплификација IAS, поменути неуспјех теста је вјероватно због малог броја микобактерија присутних у њима. Ова претпоставка је поткријепљена чињеницом да су 2 од 3 узорка била препарат-негативна. Уколико се узме у обзир да је количина (0.5 mL) обрађеног седимента инокулисаног на подлоге пет пута већа од оне за COBAS AMPLICOR MTB Тест, јасно је да "учинци аликвота" могу довести до лажно негативних PCR резултата. Број лажно-негативних резултата може се додатно смањити повећањем дијела оригиналног седимента уведеног у PCR тестирање.

Повећање стопе лажно позитивних резултата у бројним студијама најчешће је посљедица укључивања узорака пацијената који су под терапијом, што у коначници доводи до ниже специфичности и PPV теста. Овакви узорци су често позитивни иако садрже невијабилне микобактерије које не могу порастати на култури. Тестирање је стога неопходно лимитирати на оне пацијенте који нису под терапијом за активну болест (CDC, 2009; Ling *et al.*, 2008). У мулти-регресионој анализи, коју су провели Greco *et al.* укупна специфичност у подскубини студија које јасно наводе да су искључиле узорке лијечених пацијената (n=206 узорака) је била 97%, док је код оних које су исте укључиле (n=707 узорака) укупна специфичност била 76%. Ово јасно показује да је

укључивање узорака лијечених пацијената био главни разлог ниже специфичност код препарат-позитивних узорака (Greco *et al.*, 2006).

Специфичност COBAS AMPLICOR MTB Теста у овом истраживању се кретала у распону од 33.33% код препарат-позитивних узорака спутума, до 100% код препарат-негативних аспириата бронха и BAL. Укупна специфичност COBAS AMPLICOR MTB Теста у студији је износила 82.93%, док је укупна специфичност израчуната само за узорке спутума била 80.56%. Ово истраживање је показало највећу специфичности код препарат-негативних респираторних узорака која је износила 86.84% и значајну разлику у специфичности код препарат-позитивних (33.33%) и препарат-негативних (86.84%) узорака. Недовољна специфичност теста код препарат-позитивних узорака нашег истраживања је последица укључивања узорака лијечених испитаника. Након анализе неподударних резултата укупна специфичност теста, као и специфичност за све врсте испитиваних узорака је износила 100%. Сличне вриједности за специфичност истог комерцијалног теста добили су и други аутори (Tortoli *et al.*, 2012).

COBAS AMPLICOR MTB Тест садржи почетнице специфичне за MTBC те, за разлику од метода култивације, не детектује NTM. Међу тестираним узорцима у овом раду није било лажно позитивних резултата који су настали унакрсном реактивношћу са NTM. Висока специфичност теста наводи да је шанса продукције лажно позитивних резултата, изузимајући испитанике који су били под терапијом, ниска. На могућност унакрсне реактивности са NTM у свом раду указали су Reischl *et al.* анализирањем култура позитивних узорака *M. xenopi*. Вриједности OD тих узорака биле су ниже од оних узорака који садрже *M. tuberculosis*, али су измјерене изнад критичне вриједности теста (Reischl *et al.*, 1998). Овај недостатак специфичности могао би бити превладан подизањем граничне вриједности COBAS AMPLICOR MTB Теста, а не биолошким основама за ову потенцијалну унакрсну реактивност. У својој студији, Bloemberg *et al.* су додатно анализирајући групу од 133 клиничка узорка, који су били лажно позитивни на COBAS AMPLICOR MTB Тесту, примјеном *real-time* COBAS TaqMan MTB Теста, добили укупну подударност између ова два теста од 98.2%, оповргавајући тако могућност опште унакрсне реактивност теста с филогенетски блиским врстама (Bloemberg *et al.*, 2013).

Контаминација узорака током лабораторијске обраде такођер може довести до појаве лажно позитивних резултата који утичу на специфичност теста. Најчешћи извори контаминације поријеклом су од других узорака. Додатком ензима AmpErase LD у амплификацијску смјешу смањен је ризик од контаминације. Међутим, контаминација која потиче од клиничких узорака може се избјећи само добром лабораторијском праксом и поштивањем поступка извођења теста.

Већина комерцијално доступних амплификацијски тестова за детекцију *M. tuberculosis*, је предвиђена само за респираторне узорке. Један од разлога је што су у нереспираторним узорцима микобактерије присутне у малом броју. Сљедећи разлог је што се у овим узорцима чешће налазе инхибиторне супстанце. Забиљежена укупна стопа инхибиције у овом раду је износила 2%. Очитања OD₆₆₀ циљне секвенце за ове узорке су била 3.954 и 3.955, што је сугерисало на присуство веће количине DNK у тестираним узорцима. Интерпретабилни резултати добивени су након што су додатни узорци ових испитаника рађени у разрјеђењу 1:10 са лизирајућим реагенсом. Како је

стопа инхибиције у раду била ниска, разматрање IAC у раду је резултирало умјереним побољшање осјетљивости и значајним побољшањем PPV теста. На значај детекције инхибитора у тестираним узорцима сугеришу и други аутори, а проценат узорака који је садржавао инхибиторе био је идентичан с нашим (Scarpato *et al.*, 2000).

PPV COBAS AMPLICOR MTB Теста у истраживању је, након анализе неподударних резултата, износила 100%. Уочено је да је нешто нижа осјетљивост (83.33%) за препарат-негативне узорке пропраћена изузетно високом PPV, што указује на малу вјероватноћу унакрсне реактивности с NTM. У свом раду Fegou *et al.* су израчунали PPV посебно за препарат-позитивне узорке, и она је била 95.7%, а за препарат-негативне 66.4% (Fegou *et al.*, 2005). Scarpato *et al.* су израчунали PPV користећи комбинацију резултата метода култивације и клиничке дијагнозе као "референтног метода". За препарат-позитивне, препарат-негативне респираторне узорке, као и све тестиране респираторне узорке у студији, она је износила 100% (Scarpato *et al.*, 2000).

За препарат-позитивне узорке NPV теста у истраживању је била 50%, док је код препарат-негативних узорака она износила 94.29%. Нижа NPV код препарат-позитивних узорака последица је лажно негативног резултата COBAS AMPLICOR MTB Теста код 1 узорка. Истовјетну NPV у свом раду добили су Fegou *et al.*, а износила је 53.6% за препарат-позитивне и 96.8% за препарат-негативне респираторне узорке (Fegou *et al.*, 2005). У случајевима када је NPV теста ниска потенцијални ризик по пацијента од погрешне терапије требао би да се одваже с потенцијалним ризиком њеног кашњења.

ЗАКЉУЧАК

COBAS AMPLICOR MTB Тест је показао да је брз, осјетљив и специфичан за детекцију *M. tuberculosis* из различитих врста препарат-позитивних респираторних узорака. Због нужности за испитивањем епидемиолошких карактеристика изолата, он не може бити замијена за методе култивације. Међутим, могућност детекције *M. tuberculosis* у већини узорака у року од неколико сати, а не седмица, представља значајан напредак. Негативан резултат COBAS AMPLICOR MTB Теста не значи искључење ТВ, те би добивене резултате требало тумачити с другим доступним клиничким подацима. Иако би повећана осјетљивост теста била пожељна, показало се да је тест довољно специфичан да поуздано детектују и оне пацијенте који су највјероватније били инфицирани. Јасне предности овог теста су стандардизирани поступци и реагенси за обраду узорака и амплификацију (*репродуцибилност*), као и IAC за праћење присуства инхибитора PCR реакције (*поузданост*). Због потпуно аутоматизираних поступака амплификације и детекције, COBAS AMPLICOR MTB Тест се показао подобним за примјену у клиничким микробиолошким лабораторијама.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alexander, K.A., P.N. Laver, A.L. Michel, M. Williams, P.D. van Helden, R.M. Warren, N.C. Gey van Pittius (2010): Novel *Mycobacterium tuberculosis* Complex Pathogen, *M. mungi*. *Emerging Infectious Diseases* 16(8): 1296-1299.
2. American Thoracic Society (2000): Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 1376-1395.
3. Bayram, A., C. Celiksöz, T. Karşlıgil, I. Balci (2006): Automated PCR evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory and nonrespiratory specimens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 46(1): 48-52.
4. Bloemberg, G.V., A. Voit, C. Ritter, V. Deggim, E.C. Böttger (2013): Evaluation of COBAS TaqMan MTB for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in comparison with the COBAS Amplicor MTB. *J Clin Microbiol* 51(7): 2112-2117.
5. Centers for Disease Control and Prevention (2009): Update Guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. *Morb Mortal Wkly Rep* 58(1): 7-10.
6. Drobniowski, F., V. Nikolayevskyy, Y. Balabanova, D. Bang, D. Papaventsis (2012): Diagnosis of tuberculosis and drug resistance: what can new tools bring us? *Int J Tuberc Lung Dis* 16(7): 860-870.
7. Fegou, E., E. Jelastopulu, M. Sevdali, E.D. Anastassiou, G. Dimitracopoulos, I. Spiliopoulou (2005): Sensitivity of the Cobas Amplicor system for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and extrapulmonary specimens. *Clin Microbiol Infect* 11(7): 593-6.
8. Gagneux, S., P.M. Small (2007): Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis* 7(5): 328-337.
9. Greco, S., E. Girardi, A. Navarra, C. Saltini (2006): Current evidence on diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Thorax* 61(9): 783-790.
10. Ikegame, S., Y. Sakoda, N. Fujino, K. Taguchi, M. Kawasaki, A. Kajiki (2012): Clinical Evaluation of COBAS TaqMan PCR for the Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium* Complex. *Tuberc Res Treat* 170459.
11. Ling, D. I., L.L. Flores, L.W. Riley, M. Pai (2008): Commercial nucleic-acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: meta-analysis and meta-regression. *PLoS One* 3(2): e1536.
12. Mitarai, S., M. Okumura, E. Toyota, T. Yoshiyama, A. Aono, A. Sejimo, Y. Azuma, K. Sugahara, T. Nagasawa, N. Nagayama, A. Yamane, R. Yano, H. Kokuto, K. Morimoto, M. Ueyama, M. Kubota, R. Yi, H. Ogata, S. Kudoh, T. Mori (2011): Evaluation of a simple loop-mediated isothermal amplification test kit for the diagnosis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 15(9): 1211-1217.
13. Palomino, J.C. (2009): Molecular detection, identification and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 56(2): 103-111.

14. Parrish, N.M., K.C. Carroll (2011): Role of the Clinical Mycobacteriology Laboratory in Diagnosis and Management of Tuberculosis in Low-Prevalence Settings. *Journal of Clinical Microbiology* 49(3): 772-776.
15. Parsons, L. M., Á. Somoskövi, C. Gutierrez, E. Lee, C.N. Paramasivan, A. Abimiku, S. Spector, G. Roscigno, J. Nkengasong (2011): Laboratory Diagnosis of Tuberculosis in Resource-Poor Countries: Challenges and Opportunities. *Clin Microbiol Rev* 24(2): 314-350.
16. Rajalahti, I., P. Vuorinen, M.M. Nieminen, A. Miettinen (1998): Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Sputum Specimens by the Automated Roche Cobas Amplicor Mycobacterium Tuberculosis Test. *J Clin Microbiol* 36(4): 975-978.
17. Reischl, U., N. Lehn, H. Wolf, L. Naumann (1998): Clinical evaluation of the automated Cobas Amplicor MTB assay for testing respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol* 36(10): 2853-60.
18. Roche Molecular Systems (2003): COBAS AMPLICOR MTB Test. Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA.
19. Scarparo, C., P. Piccoli, A. Rigon, G. Ruggeiro, M. Scagnelli, C. Piersimoni (2000): Comparison of Enhanced *Mycobacterium tuberculosis* Amplified Direct Test with COBAS AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* Assay for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Respiratory and Extrapulmonary Specimens. *J Clin Microbiol* 38(4): 1559-1562.
20. Tortoli, E., P. Urbano, F. Marcelli, T.M. Simonetti, D.M. Cirillo (2012): Is Real-Time PCR Better than Conventional PCR for *Mycobacterium tuberculosis* Complex Detection in Clinical Samples? *J Clin Microbiol* 50(8): 2810-2813, 2012.van Ingen, J., Z. Rahim, A. Mulder, M.J. Boeree, R. Simeone, R. Brosch, D. van Soolingen: Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerg Infect Dis* 18(4): 653-655.
21. World Health Organization (2014): Global tuberculosis report 2014.WHO/HTM/TB/2014.08. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
22. www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html. Euzeby, J.P. (2015): List of prokaryotic names with standing in nomenclature - genus *Mycobacterium*. Последњи приступ: 27. septembar.

Примљено: 14. 10. 2015.
Одобрено: 28. 04. 2016.