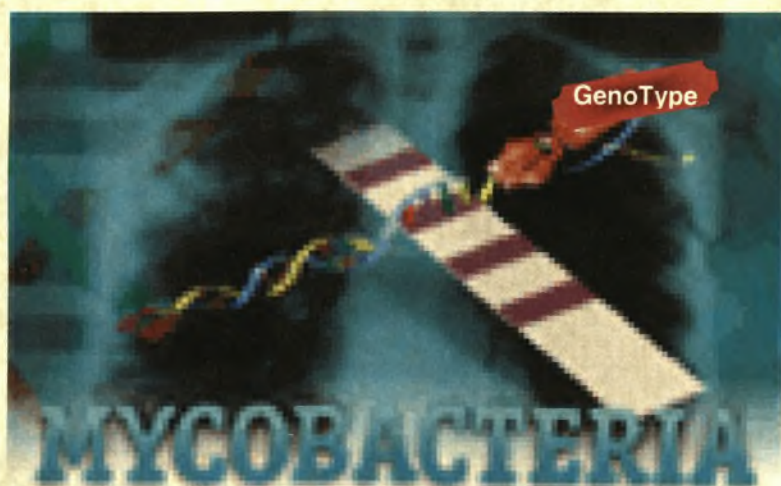


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΜΟΡΙΑΚΗ
ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

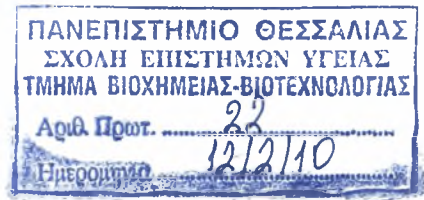
ΦΛΩΡΟΥ ΖΩΗ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ

ΤΙΤΛΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΣΤΗΝ
ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ ΠΟΥ
ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΠΙΘΑΝΗ
ΦΥΜΑΤΙΩΣΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ



ΛΑΡΙΣΑ 2010



**ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΣΤΗΝ
ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ
ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ
ΠΘΑΝΗ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ**



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 8129/1

Ημερ. Εισ.: 16-04-2010

Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: Δ

616.929 4

ΦΛΩ



ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Πετεινάκη Ευθυμία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Τμήματος
Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Μέλη:

Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του
Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μόσιαλος Δημήτριος, Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του Τμήματος
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

*Στους γονείς μου και την αδερφή μου Γεωργία,
στην καθηγήτρια μου κ. Πετεινάκη Έφη,
στους θείους μου Μαρία & Βασίλη.*

*Στην πολυαγαπημένη μου γιαγιά, Ελένη
η οποία δεν είναι πια στην ζωή.*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ως ένα ελάχιστο δείγμα αγάπης και ευγνωμοσύνης απευθύνω τις πιο θερμές μου ευχαριστίες στην επιβλέπουσα της διπλωματικής μου κ. Πετεινάκη Έφη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, να δουλέψω στο εργαστήριο Μικροβιολογίας καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Επιπλέον, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την έμπρακτη υποστήριξη της, την αμέριστη βοήθεια της, το συνεχές ενδιαφέρον της και τη καθοριστική της συμβολή στην διεξαγωγή των πειραμάτων και στη διαμόρφωση του κειμένου. Η συνεργασία μαζί της αποτέλεσε πηγή πολύτιμων γνώσεων, σωστού τρόπου σκέψης και θεώρησης της επιστήμης της Μικροβιολογίας.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής κ. Μαθιόπουλο Κωνσταντίνο, Αναπληρωτή Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και κ. Μόσιαλο Δημήτριο, Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για το ενδιαφέρον προς τη διπλωματική μου εργασία και την εμπιστοσύνη τους στο προσωπό μου.

Τις θερμές μου ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον κ. Γουργουλιάννη Κ., Καθηγητή Πνευμονιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και στην Επιμελήτρια Α΄ Πνευμονιολογίας κ. Γερογιάννη Ε. για το κλινικό υλικό που μου διέθεσαν και για το χρόνο που διέθεσαν διορθώνοντας τα κείμενά μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος την κ. Κλάβα Δήμητρα, μεταδιδακτορική φοιτήτρια για την αμέριστη βοήθειά της στην διεκπεραίωση των πειραμάτων καθώς και για την μεγάλη υπομονή της και την προθυμία της να απαντήσει σε όλες τις απορίες και προβληματισμούς μου.

Τέλος, θα ήταν πάραλειψη μου να μην αναφερθώ στην κ. Γκουτζίδου Μαίρη, Τεχνολόγο Ιατρικών Εργαστηρίων την οποία ευχαριστώ ιδιαίτερος για τη βοήθεια της στη συλλογή και στην πρωτογενή επεξεργασία των κλινικών δειγμάτων και για την πολύ καλή συνεργασία.

*Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του
Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας*

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Γενικό Μέρος

1. ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΑ	10
1.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	10
1.2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΤΟΙΧΩΜΑ & ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	10
1.3 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΩΝ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	11
2. i) ΑΤΥΠΙΑ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΑ	13
ii) <i>M.TUBERCULOSIS COMPLEX</i>	13
3. ΓΕΝΩΜΑ ΤΟΥ <i>M.tuberculosis</i>	15
ΦΥΜΑΤΙΩΣΗ	
4. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	16
5. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	20
6. ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ - ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	23
7. ΜΕΤΑΔΟΣΗ	23
8. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	24
9. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΦΥΜΑΤΙΝΗΣ – ΜΑΝΤΟΥΧ	26
10. ΔΙΑΓΝΩΣΗ	27
10.1. ΚΛΑΣΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ	28
10. 1.α. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΗΣΗ	28
10.1.β. LOWENSTEIN-JENSEN (L-J)	29
10.2. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	30
10.3. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	32
10.3.1 ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ - GEN-PROBE	32
10.3.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ, PCR	33
10.3.3 ΑΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ PCR	38
α) Αλυσιδωτή Αντίδραση της Λιγάσης (Ligase Chain Reaction, LCR)	38
β) Ποσοτική PCR σε Πραγματικό Χρόνο (Real-Time Quantitive PCR)	38
γ) Πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP- PCR)	40
δ) Ηλεκτροφόρηση σε Παλμικό Πεδίο (Pulse-Field Gel Electrophoresis)	40

ε) Ποικίλου Αριθμού Διαδοχικές Επαναλήψεις – Μυκοβακτηριακά Διάσπαρτα Επαναλαμβανόμενα Στοιχεία [Variable Number Tandem Repeat Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit (VNTR-MIRU)]	41
10.3.3 QUANTIFERON	42
11. ΕΜΒΟΛΙΟ BCG	43
12. ΘΕΡΑΠΕΙΑ	44
12.1 ΙΣΟΝΙΑΖΙΔΗ (ISONICOTINYL HYDRAZINE, INH).....	45
12.2 ΡΙΦΑΜΠΙΚΙΝΗ (RIF).....	49
12.3 ΛΟΙΠΑ ΑΝΤΙΦΥΜΑΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ	52

Ειδικό Μέρος

1. ΣΚΟΠΟΣ.....	55
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	56
2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	56
2.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA.....	57
2.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	59
2.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA	63
2.5 ΑΝΑΣΤΡΟΦΟΣ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ	66
2.6 ΑΝΤΙΒΙΟΓΡΑΜΜΑ	75

Αποτελέσματα

I. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΟΥ ΤΗΣ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ Μέθοδος CM.....	81
II. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΙΔΟΥΣ <i>M.TUBERCULOSIS COMPLEX</i> Μέθοδος MTBC.....	82
III. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗ ΡΙΦΑΜΠΙΚΙΝΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΙΣΟΝΙΑΖΙΔΗ α) Μέθοδος MTBDR plus.....	83
β) Αντιβιογράμμα.....	89
Συζήτηση	91
Συμπεράσματα	96
Περίληψη	97
Βιβλιογραφία	99

Γενικό Μέρος

1. ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΑ

Τα μυκοβακτήρια είναι γένος των *Actinobacteria* και ανήκουν στην οικογένεια *Mycobacteriaceae* (Lehmann and Neumann, 1896). Το γένος περιλαμβάνει τους παθογόνους παράγοντες που είναι γνωστό ότι προκαλούν σοβαρές ασθένειες στα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένων της φυματίωσης και της λέπρας (Ryan KJ, Ray CG, 2004). Το λατινικό πρόθεμα "myco-" προήλθε από τις λέξεις μύκητες και κήρος. Το τελευταίο είναι συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των μυκοβακτηριδίων.

1.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Τα μυκοβακτηρίδια είναι ακίνητα, αερόβια (Ryan KJ, Ray CG, 2004) και Gram-θετικά βακτήρια (Michael T. et al., 2005). Όσον αφορά τη μορφολογία τους είναι ραβδόμορφα, ευθύγραμμα ή με ελαφρή κύρτωση και κυμαίνονται μεταξύ 0,2 με 0,6 μm σε πλάτος και 1,0 με 10 μm σε μήκος. Διατάσσονται σε ζεύγη, παράλληλες σειρές ή σωρούς (Αντωνιάδης Α. κ.αλ.,1999). Όλα είναι μη σπορογόνα εκτός από τα *Mycobacterium marinum* και *Mycobacterium bovis* για τα οποία σε πρόσφατες μελέτες αποδείχτηκε σπορογονία (Ghosh et al., 2009). Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης ποικίλλει με εύρος από 25°C μέχρι 50°C, ανάλογα με το είδος. Το *Mycobacterium tuberculosis* αναπτύσσεται σε αερόβιες συνθήκες, καλύτερη όμως ανάπτυξη παρατηρείται σε ατμόσφαιρα CO₂ 10% και θερμοκρασία 37°C, ενώ η παρουσία υγρασίας στο υλικό είναι απαραίτητη. Τα μυκοβακτήρια προκαλούν χρόνιες λοιμώξεις λόγω της δυνατότητας τους να επιζούν και να αναπαράγονται μέσα στα φαγοκύτταρα (Αντωνιάδης Α. κ.αλ.,1999).

1.2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΤΟΙΧΩΜΑ & ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Όλα τα είδη μυκοβακτηρίων έχουν χαρακτηριστικό κυτταρικό τοίχωμα, παχύτερο και πιο σύνθετο από ότι σε πολλά άλλα βακτήρια. Αποτελείται από στρώμα πεπτιδογλυκάνης και διακλαδιζόμενα λιπαρά οξέα, τα μυκολικά οξέα, που περιέχουν D-αραβινόζη και D-γαλακτόζη. Το 25% αποτελείται από λιπαρά οξέα που βρίσκονται στην επιφάνεια του κύτταρου. Τα λιπίδια αποτελούνται από κήρους, ειδικές μυκοσίδες (σύμπλεγμα λιπιδίων και πεπτιδογλυκολιπιδίων) και το «σχοινοειδή παράγοντα» που περιέχει δυο μυκολικά οξέα συνδεδεμένα με το δισακχαρίτη τρεαλόζη. Ο «σχοινοειδής παράγοντας» επίσης βρίσκεται στα λοιμογόνα στελέχη και

σχετίζεται με την παράλληλη διάταξη των μυκοβακτηρίων. Αυτός είναι η αιτία των «σχοινοειδών» σχηματισμών που παρατηρούνται στην μικροσκοπική εξέταση (Αντωνιάδης Α. κ.αλ.,1999).

Η σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος προσδίδει στα μυκοβακτήρια τις εξής ιδιότητες / χαρακτηριστικά:

α) Υδροφοβο χαρακτήρα (οφείλεται στην αφθονία των λιπιδίων).

β) Χρωματίζονται δύσκολα από χρώσεις όπως Giemsa και Gram και μετά το χρωματισμό τους είναι δύσκολος ο αποχρωματισμός τους με όξινα διαλύματα. Για αυτό το λόγο χαρακτηρίζονται και οξεάντοχα (Αντωνιάδης Α. κ.αλ.,1999). Χρωστικές που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση των δειγμάτων ιστού ή μικροβιολογικών δείγματα είναι οι Fite's, Ziehl-Neelsen και Kinyoun. Τα μυκοβακτήρια φαινοτυπικά έχουν στενή σχέση με τα μέλη τα *Nocardia*, *Rhodococcus* και *Corynebacterium*. (McMurray DN, 1996).

γ) Βραδέα ανάπτυξη. διαιρούνται κάθε 12 με 24 ώρες. Για αυτό το λόγο ο σχηματισμός αποικιών στα ειδικά θρεπτικά μέσα απαιτεί χρονικά από 2 έως 4 εβδομάδες. Μόνο τα ταχέως αναπτυσσόμενα απαιτούν για την ανάπτυξη τους λιγότερο από μια εβδομάδα (Αντωνιάδης Α. κ.αλ.,1999).

δ) Ανθεκτικότητα σε πολλά αντιβιοτικά. Γι' αυτό το λόγο σήμερα οι οδοί βιοσύνθεσης των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος είναι πιθανοί στόχοι για τα νέα φάρμακα για τη φυματίωση (Bhamidi S, 2009).

1.3 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΩΝ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

α) Βάσει του ρυθμού ανάπτυξης

Τα μυκοβακτήρια ομαδοποιούνται με βάση το ρυθμό της ανάπτυξης σε δυο κατηγορίες:

i) Ταχέως αναπτυσσόμενα

Αυτά που απαιτούν επτά ήμερες για να εμφανίσουν αποικίες ορατές δια γυμνού οφθαλμού στην καλλιέργεια και χωρίς ειδικά θρεπτικά υλικά.

Π.χ. *M.chelonae*, *M. fortuitum*, *M.parafortuitum*, *M. vaccae*.

ii) Βραδέως αναπτυσσόμενα μυκοβακτήρια

Όσα απαιτούν μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα για να εμφανίσουν αποικίες. Χωρίζονται σε δυο μεγάλες υποκατηγορίες:

- *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) είναι αυτά που προκαλούν φυματίωση σε ανθρώπους και ζώα. Περιλαμβάνει: *M.tuberculosis*, την κύρια αιτία της ανθρώπινης φυματίωσης, *M.bovis*, *M.bovis BCG*, *M.africanum*, *M.canetti*, *M.caprae*, *M.microti*, *M.pinnipedii*, *M.ulcarens*.

- *Mycobacterium avium*, *M.gordonae*, *M.gastri*, *M.kansasii*, *M.terrae*, *M.africanum*, *M.chimaera*, *M.intracellulare*, *M.marinum*, *M.xenopi* (Αντωνιάδης Α. κ.αλ., 1999).

β) Βάσει της παραγωγής χρωστικής στο φως ή σκοτάδι

i) Φωτοχρωμογόνα (Ομάδα I)

Παράγουν χρωστική χωρίς φως, δίνουν χαρακτηριστικές κίτρινες αποικίες και αναπτύσσονται βραδέως (3-4 εβδομάδες).

Π.χ. *M.kansasii*, *M.marinum*, *M.simiae*.

ii) Σκοτοχρωμογόνα (Ομάδα II)

Παράγουν χρωστική στο σκοτάδι και στο φως και δίνουν χαρακτηριστικές κίτρινες αποικίες.

Π.χ. *M.xenopi*, *M.scrofulaceum*, *M.gordonae*, *M.szulgai*.

iii) Μη χρωμογόνα (Ομάδες III & IV)

Δεν παράγουν χρωστική στο φως και σκοτάδι και δίνουν άχρωμες αποικίες.

Π.χ. *M.tuberculosis*, *M.avium-intracellulare*, *M.bovis*, *M.fortuitum*, *M.chelonae* (Αντωνιάδης Α. κ.αλ., 1999).

γ) Βάσει φυματίωσης

Τα μυκοβακτηρίδια μπορούν να ταξινομηθούν σε δυο μεγάλες ομάδες για το σκοπό της διάγνωσης και θεραπείας:

i) *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC)

Κύριο αίτιο της φυματίωσης.

Π.χ. *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.africanum*, *M.microti*.

ii) Άτυπα μυκοβακτήρια (*Nontuberculous Mycobacterium*, NTM)

Όλα τα άλλα μυκοβακτηρίδια, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν πνευμονική νόσο που μοιάζει με τη φυματίωση, λεμφαδενίτιδα, ασθένεια του δέρματος.

Π.χ. *M.kansasii*, *M.avium*.

2. i) ΑΤΥΠΑ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΑ

Υπάρχουν πολυάριθμα άλλα μυκοβακτήρια που μπορούν να προκαλέσουν πνευμονική νόσο, τα οποία δεν ανήκουν στην ομάδα μικροοργανισμών του *Mycobacterium tuberculosis complex*. Αυτά ονομάζονται **άτυπα** ή **ευκαιριακά** και τα πιο συνηθισμένα είναι τα *M.kansasii*, *M.avium-intracellulare*, *M.malmoense*, *M.xenopi*. Είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση και μπορεί να βρίσκονται στο νερό και το έδαφος με αποτέλεσμα μερικές φορές η επιμόλυνση των κλινικών δειγμάτων να συμβαίνει από περιβαλλοντικές λοιμογόνες πηγές. Επίσης μπορεί να απομονωθούν και από μολυσμένα πουλερικά ή άλλα ζώα.

Έχουν χαμηλή λοιμογόνο επίδραση και δεν θέτουν σε κίνδυνο τα φυσιολογικά άτομα. Προκαλούν κυρίως λοιμώξεις σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς π.χ. ασθενείς με AIDS ή με σοβαρή βλάβη πνευμόνων (π.χ. προχωρημένο εμφύσημα ή βλάβη στους πνεύμονες από προηγούμενη λοίμωξη με *M.tuberculosis*). Συχνά συσχετίζονται με χρόνια συμπτώματα όπως βήχα, παραγωγή πτυέλων, αιμόπτυση και απώλεια βάρους. Δεν παρατηρείται μετάδοση από άτομο σε άτομο. Η διάγνωση γίνεται στο εργαστήριο με καλλιέργεια και με μοριακές τεχνικές. Η θεραπεία είναι συχνά δύσκολη και απαιτεί μακροχρόνια (π.χ. 2 χρόνια) χορήγηση ριφαμπικίνης και εθαμβουτόλης καθώς αυτοί οι μικροοργανισμοί συχνά εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε ένα από τα δυο αντιφυματικά αντιβιοτικά. Κάποια νεότερα αντιβιοτικά όπως η κλαριθρομυκίνη μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθούν. Αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι χαμηλής λοιμογόνου ικανότητας και δεν αποτελούν κίνδυνο για το περιβάλλον των ασθενών (Γουργουλιάννης Κ., Μπούρος Δ., 2002).

ii) *M. TUBERCULOSIS COMPLEX*

Τα στελέχη *Mycobacterium tuberculosis complex* είναι η κυριότερη αιτία της φυματίωσης, η οποία παραμένει ένα πολύ σοβαρό πρόβλημα μέχρι σήμερα στην κοινωνία μας. Τα πιο συνηθισμένα είδη που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι τα μυκοβακτήρια: *M.tuberculosis*, *M.africanum*, *M.canettii*, *M.microti* και *M.bovis* (Prodinger WM et al. 2005, Brosch R. et al. 2002, Cousins D. V., R. Bastida, A. Cataldi et al, 2003). Έχουν υψηλή συγγένια μεταξύ τους γενετικά παρουσιάζοντας

αξιοσημείωτη ομοιότητα στην νουκλεοτιδική τους αλληλουχία. Όμως, διαφέρουν στην παθογονικότητα, στο γεωγραφικό εύρος και στα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους.

Τα μυκοβακτήρια *M. tuberculosis* είναι παθογόνα για ανθρώπους στην Ευρώπη και Αμερική, ενώ το *M.africanum* είναι ευρέως κατανεμημένα μεταξύ Αφρικανών ασθενών (David H. L., et al. 1978, Niemann, S., et al, 2000).

Σύμφωνα με τα βιοχημικά χαρακτηριστικά, το *M.africanum* χωρίζεται σε δυο μεγάλες ομάδες βάση των γεωγραφικών περιοχών που ανήκουν οι ασθενείς που προσβάλλονται από το συγκεκριμένο μυκοβακτήριο. Ο υποτύπος *M.africanum* I της Δυτικής Αφρικής και είναι κοντά συγγενικά με το *M.bovis*. Ο υποτύπος *M.africanum* II της Ανατολικής είναι κοντά συγγενικά στο *M.tuberculosis* (David, H. L. et al, 1978).

Το μυκοβακτήριο *M.bovis* αποτελείται από δυο υποείδη: *M.bovis spp bovis* και *M.bovis BCG*. Προσλαμβάνουν θηλαστικά και ζώα όπως βοειδή και κατσίκες (Kubica, T., et al, 2003). Η μετάδοση του *M.bovis* στον άνθρωπο γίνεται από βοειδή και μη παστεριωμένο γάλα (Kubica, T., et al, 2003, Wedlock, D. N., et al, 2002). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν τα στελέχη *M.bovis spp bovis* τα οποία είναι ανθεκτικά στην πυραζιναμίδη, το οποίο είναι ένα φάρμακο πρώτης επιλογής (Konno, K., 1967, Niemann, S., 2002). Τα στελέχη εμβολίου *M.bovis BCG* χρησιμοποιούνται συχνά για ανοσοθεραπεία του καρκίνου της ουροδόχου κύστης με αποτέλεσμα να ανιχνεύονται σε δείγματα ούρων των συγκεκριμένων ασθενών (Brandau, S., and A. Bohle. 2001, Durek, C. Et al, 2001).

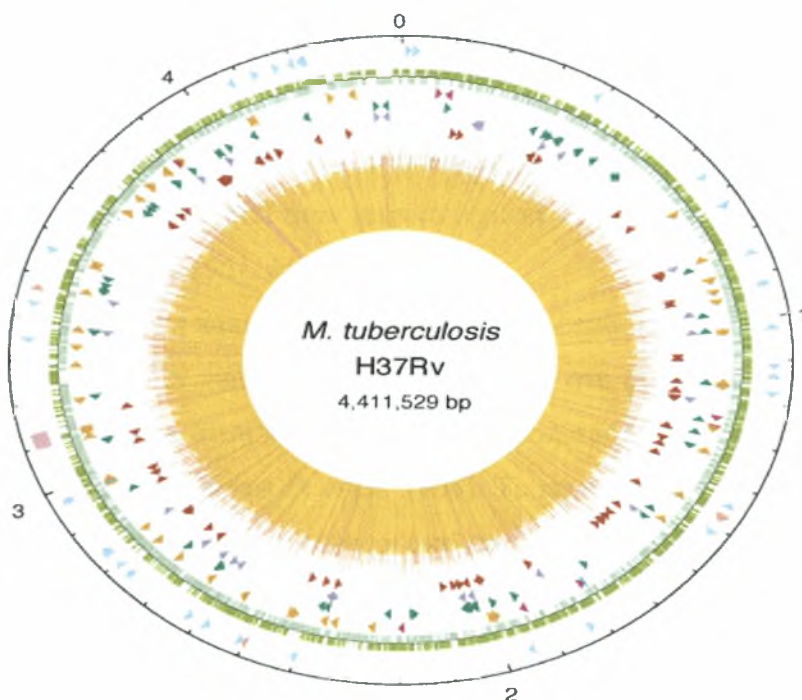
Το *M.canettii* έχει περιγραφεί ως μια νέα μικρή ομάδα ταξινόμησης του *M.tuberculosis complex* και περιγράφηκε πρώτη φορά από τους van Soolingen D, et al. 1997 (Van Soolingen, D., et al. 1998). Σπάνια προσβάλλει ασθενείς που μένουν στην Αφρική.

Το μυκοβακτήριο *M.microti* έχει αναφερθεί ότι μολύνει μικρά τρωκτικά όπως αρουραίους και πιο πρόσφατα ανθρώπους (Niemann, S., et al. 2000, Van Soolingen, D., et al. 1998, Wayne, L. G., and G. P. Kubica. 1986).

3. ΓΕΝΩΜΑ ΤΟΥ *M.tuberculosis*

Το γένωμα του *M.tuberculosis* είναι το πρώτο μεγάλο γένωμα από παθογόνο μικροοργανισμό που αλληλουχήθηκε. Αποτελείται από 4,411,529 bp, έχει 65.6% περιεκτικότητα σε GC.

Η **εικόνα 1** απεικονίζει έναν χάρτη που κατασκευάστηκε από υπολογιστικό πρόγραμμα το οποίο χρησιμοποίησε την πλήρη αλληλουχία του *M.tuberculosis*. Ο εξωτερικός κύκλος δείχνει το μέγεθος του χρωμοσώματος σε μεγαβάσεις, με το 0 να αποτελεί το σημείο έναρξης της αντιγραφής του DNA. Στο εσωτερικό υπάρχει ένας δακτύλιος με τις θέσεις των γονιδίων του tRNA (κυανό) και το μοναδικό οπερόνιο rRNA (πορτοκαλί). Ο επόμενος δακτύλιος δείχνει τα ORF που μεταγράφονται δεξιόστροφα (σκούρο πράσινο) και αριστερόστροφα (ανοιχτό πράσινο). Πιο μέσα υπάρχει ένας δακτύλιος όπου φαίνονται οι θέσεις ορισμένων επαναλαμβανόμενων στοιχείων DNA, μαζί με τις αλληλουχίες ένθεσης (πορτοκαλί). Το ιστόγραμμα στο κέντρο της εικόνας δείχνει την κατά τόπους αναλογία σε GC, με τις κίτρινες ακτίνες να υποδεικνύουν περιοχές με λιγότερο από 65% GC και τις πορτοκαλί ακτίνες να υποδεικνύουν περιοχές με τουλάχιστον 65% GC.



Εικόνα 1. Χάρτης χρωμοσώματος του *M.tuberculosis*. Η εικόνα σχεδιάστηκε με λογισμικό της εταιρείας DNASTAR και αναδημοσιεύτηκε κατόπιν άδειας του περιοδικού (Cole S. T. et al 1998, Nature 393: 527-54).

ΦΥΜΑΤΙΩΣΗ

4. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η φυματίωση είναι μια νόσος με μεγάλη ιστορία και πολλούς θανάτους στο πέρασμα των χρόνων. Έχει κινήσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων από τα αρχαία χρόνια μέχρι σήμερα. Το πρόβλημα είναι όμως ότι παρόλη τη μακρόχρονη πορεία ερευνών ακόμη και στις μέρες μας πεθαίνει αρκετός κόσμος σε παγκόσμιο επίπεδο. Στην ιστορία της φυματίωσης διακρίνουμε τέσσερις χρονικές περιόδους (Λιώκης Θ. , 1974):

1^η Περίοδος: Περιγραφική ή Ιπποκρατική

Είναι η μεγαλύτερη διάρκεια σε ανθρώπινο πόνο και προσπάθεια. Διαρκεί από τη Νεολιθική Εποχή και μέχρι το τέλος περίπου του 18^{ου} αιώνα, που είναι η εποχή των Beyle και Laennec.

Τα πρώτα ευρήματα αφορούν ευρωπαϊκούς και αιγυπτιακούς σκελετούς. Στην προϊστορική περίοδο οι σκελετοί από την Νεολιθική Εποχή (7000π.Χ.) στην Ανατολική Μεσόγειο αποδεικνύουν ότι οι άνθρωποι έπασχαν από φυματίωση (Hershkovitz, I, Donoghue, HD et al., 2008) και στην σπονδυλική στήλη μούμιας από 3000 – 2400 π.Χ. (Zink A, Sola C, Reischl U et al. 2003). Έχουμε πολλές ανεξάρτητες αναφορές από:

α) Μεσοποταμία: από τις ανασκαφές στη Νινευή βρέθηκαν 20000 πήλινες πλάκες σε σφηνοειδή γραφή όπου οι 800 ήταν ιατρικά θέματα και ιατρικές εργασίες (Beriety et al., 1963, Castiglioni A., 1961, Morce D. 1967).

β) Αίγυπτος: ανακάλυψη παπύρων (Κούζης Α., 1929, Leake D.C. 1952). Στην παλιά ιστορική βιβλιογραφία δεν υπάρχουν πολλές αναφορές στη φυματίωση (Leake D.C., 1952). Έχει βρεθεί βέβαια ότι η πνευμονική φυματίωση αποτελούσε συχνότερη αιτία θανάτου (Morce D., 1967, Morce D. et al., 1964). Το κενό από την έλλειψη γραπτών αναφορών από τη φυματίωση καλύπτουν οι σκελετοί, οι φυματιώδεις αλλοιώσεις στις μούμιες (Morce D., 1967, Castiglioni A., 1961) και η καλλιτεχνική ευαισθησία των Αιγυπτίων.

γ) Ισραήλ: Οι Εβραίοι σύμφωνα με την παλιά διαθήκη γνωρίζουν τη νόσο και απαγόρευαν το φάγωμα ζώων που έπασχε από φυματίωση (Bishop J., 1966, Meachen N.G. 1936).

δ) Ινδία: Στις Ινδίες αναφέρεται σαν βασιλική νόσος (*Meachen N.G. 1936, Jaggi's O.P. 1961, Ρόζος Β. 1973*) ή με το όνομα Yaksa σε αρχαίο ινδικό ύμνο.

ε) Άπω Ανατολή: Σε γραπτά κείμενα από 2700π.Χ. γίνεται μια περιγραφή της νόσου με το όνομα "Chaoring" (*Ρόζος Β., 1973*). Ο αρχαίος Κινέζος αυτοκράτορας Shen-Nung (3216π.Χ.) ασχολήθηκε με την νόσο και ονομάστηκε πατέρας της ιατρικής στην Κίνα (*Morce D., 1967, Παπαβασιλείου Ι. και Ρόζος Β., 1979*).

Έχουν βρεθεί σε αυτές τις περιοχές ακριβής αναφορές για τη συμπτωματολογία της νόσου και συμβουλές θεραπείας που περιέχουν κυρίως βότανα και ορυκτά (*Grmek M.D, 1989*). Ως αίτια της νόσου την εποχή εκείνη θεωρούνται και ονοματίζονται κάποια πνεύματα ή δαίμονες και για τη θεραπεία της συνιστώνται κάποιες εξευμενιστικές ιερουργίες και ξόρκια (*Morce D, 1967*). Στα ερωτήματα της κληρονομικότητας και της μεταδοτικότητας της νόσου η απάντηση ήταν στις πιο πολλές περιπτώσεις θετική στο πρώτο και αρνητική στο δεύτερο.

Στην Νότια Αμερική, οι αρχαιότερες ενδείξεις φυματίωσης είναι από το 750π.Χ. μέχρι 100μ.Χ. (*Konomi N et al., 2002*).

Στην Ελλάδα ο Ιπποκράτης (460-359 π.Χ.) ταυτοποίησε τη φυματίωση ως την νόσο με το πιο ευρύ φάσμα περιλαμβάνοντας από βήχα με αίμα και πυρετό μέχρι και το θάνατο (*Hippocrates, 2006*). Αυτός ήταν ο πρώτος που απέρριψε τις προλήψεις και τα μαγικά στοιχεία και στήριξε τη διάγνωση στην παρατήρηση και τη λογική. Εισήγαγε τον όρο "φθίση" ο οποίος παρέμεινε στη διεθνή βιβλιογραφία μέχρι το 1839 όταν ο Johan Lucas Schönlein εισήγαγε τον όρο φυματίωση (φύμα, φυμάτιο) (*Λεμπέσης Ι, 1983*). Ο Αριστοτέλης (348-332π.Χ.) αναγνώρισε τη λοιμώδη φύση της πάθησης: «Πρόσωπα που έρχονται σε επαφή με φθισικούς κολλάνε την ασθένεια και αυτό οφείλεται σε κάποια ύλη που εκπνέεται από το στόμα του αρρώστου και η οποία παράγει φθίση» (*Λαμέρας Ι, 1967*).

Μεταξύ εκείνων που ασχολήθηκαν με το θέμα μετά τον Ιπποκράτη και μέχρι το 1200μ.Χ., εξέχουσες θέσεις κατέχουν οι εξής: Ηρόφιλος (323-285π.Χ.), Ερασίστρατος (310-250), Γαληνός (130-200μ.Χ.) από την Πέργαμο ο μεγαλύτερος γιατρός μετά τον Ιπποκράτη (ακολουθεί τις θέσεις του Ιπποκράτη) (*Meachen N.G., 1936*), Αυρήλιος Κορνήλιος Κέλσος (25πΧ – 50μΧ, ονομάστηκε ο Λατίνος Ιπποκράτης) (*Piery M., Roshem J., 1931*) και οι Άραβες ιατροί Αλ Ραζί (865-926μ.Χ.) και Αβικέννα. Από πλευράς περιγραφής και αιτιολογίας της φυματίωσης κατά το διάστημα αυτό δεν εμφανίζεται κάτι νεότερο, έχουμε όμως εξαιρετικές περιγραφές καθώς και τακτοποίηση των παλαιότερων απόψεων του Ιπποκράτη και

του Γαληνού. Οι κύριες θεραπευτικές που χρησιμοποιούσαν καθ' όλη τη διάρκεια του Μεσαίωνα ήταν η εφαρμογή καυτηριασμών, αφαιμάξεων, αλλαγής κλίματος και διαίτας (*Bariety et al., 1963, Meachen N.G., 1936, Castiglioni A., 1961*).

Στην Βερόνα, ο Jerome Fracastoro αναφέρεται στο βιβλίο του "De Morbis Contagiosis" στη μολυσματικότητα της φυματίωσης με τη μορφή που τη δεχόμαστε σήμερα (*Piery M., Roshem J., 1931, Meachen N.G., 1936*). Υποστηρικτής του είναι ο J.B.Montano (1498-1552). Τον 17^ο αιώνα διάσημος γιατρός που ασχολήθηκε με τη φυματίωση ήταν ο Francois de la Boe (1614-1671) που ονομάζει "φυμάτια" (tubercle) την ανατομική βλάβη της πνευμονικής φυματίωσης το 1680 (*Meachen N.G., 1936, Λεμπέσης I., 1983*). Οι παρατηρήσεις του επιβεβαιώνονται από τον Thomas Willis 1621-1675 (*Ροζος B., 1973*). Τα αίτια του σχηματισμού των φυματίων στη συνέχεια αποδίδονται από τον R. Morton (1635-1698) σε κάποιο παθογόνο παράγοντα του αίματος. Οι αμφιβολίες για τη μεταδοτικότητα της νόσου διαλύθηκαν οριστικά το 1865, όταν ο Jean-Antoine Villemin απέδειξε ότι μεταδίδεται από τον άνθρωπο στα βοοειδή και τα κουνέλια. Ενώ η θεωρία της μεταδοτικότητας της νόσου είναι πλέον διαδεδομένη στη νότια Ευρώπη, διάσημοι ιατροί της εποχής διακηρύσσουν την κληρονομικότητα της. Την εποχή αυτής της σύγχυσης, όσον αφορά την αιτιολογία της νόσου, έχουμε το μέγα σταθμό στην ιστορία της.

2^η Περίοδο: την Παθολογοανατομική

Περικλείει το τέλος του 18^{ου} αιώνα και το μεγαλύτερο μέρος του 19^{ου} αιώνα (μέχρι την εποχή των Villemin και R.Koch).

Στην Ευρώπη τον 18^ο αιώνα η νόσος χαρακτηριζόταν ως ο «αρχηγός των στρατιωτών του θανάτου», ενώ έναν αιώνα αργότερα την αποκάλεσαν «λευκή χολέρα» (*Castiglioni A., 1961*).

Ο Ιπποκράτης την θεωρούσε κληρονομική και η θεωρία αυτή ανετράπη μόνο με την ανακάλυψη του αιτιολογικού παράγοντα της φυματίωσης από τον Robert Koch, όταν και άλλαξε και η θεραπευτική προσέγγιση.

Η νόσος από φθίση μετονομάζεται σε φυματίωση το 1839 από τον Johan Lucas Schönlein αναγνωρίζοντας το φυμάτιο ως θεμελιώδη ανατομική βλάβη (*Frank Ryan, 1992, Rossman MD et al., 1994*).

3^η Περίοδο: Πειραματική και Βακτηριολογική

Σφραγίζεται από τις προσωπικότητες των Villemin και Koch.

Ο Robert Koch (1843-1910) είναι ο πρώτος που είδε το βακτήριο της φυματίωσης. Το 1882 Koch κατάφερε να απομονώσει (χρησιμοποιώντας χρωστικές ανιλίνης) και να ταυτοποιήσει το βάκιλο της φυματίωσης σε κάθε ανθρώπινη ή άλλων ζώων βλάβη και επίσης το καλλιέργησε εκτός οργανισμού (*Frank Ryan, 1992, Sakula A., 1882*).

Το 1905, ο Robert Koch τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ ιατρικής και φυσιολογίας, για το εξαίρετο έργο του.

Το 1854 ο Hermann Brehmer ιδρύει το πρώτο σανατόριο σε συνθήκες με υψηλό υψόμετρο και ξηρό κλίμα για φυματικούς στο Gorbisdorf της Γερμανίας, πεπεισμένος ότι ο φρέσκος και κρύος αέρας του βουνού δυνάμωνε την καρδιοπνευμονική λειτουργία, βελτίωνε την κυκλοφορία και επιτάχυνε την ίαση. Έτσι, ξεκινάει η άνθηση των σανατορίων σχεδόν μέχρι το πρώτο ήμισυ του 20^{ου} αιώνα (*Λεμπέσης Ι, 1983*).

Το 1896 ο Roentgen (1845-1923) ανακαλύπτει τις ακτίνες X και πολύ γρήγορα αποδείχθηκε η μεγάλη διαγνωστική αξία τους στις παθήσεις του θώρακα και βέβαια στη διάγνωση της φυματίωσης (*Rossmann MD et al., 1994*).

4^η Περίοδο: Θεραπευτική

Αρχίζει από τα μέσα του 20^{ου} αιώνα μέχρι τις ημέρες μας (*Λιώκης Θ., 1974*). Πριν από εξήντα περίπου χρόνια, το 1944, ανακαλύφθηκε η στρεπτομυκίνη.

Ο Αμερικανός Selman Abraham Waksman (1888-1973) με την ανακάλυψη της στρεπτομυκίνης (1944) είναι ο πρωτοπόρος μιας πραγματικά αποτελεσματικής φαρμακευτικής θεραπείας. Η πυραζιναμίδη ανακαλύφθηκε το 1952 από τον Kushner, έχοντας ως αφετηρία τη νικοτιναμίδη. Αρχικά θεωρήθηκε τοξικό φάρμακο και εγκαταλείφθηκε, καθώς την επισκίαζε η χρήση της ισονιαζίδης.

Το 1921 οι Calmette-Guerin στο Ινστιτούτο Pasteur (Lille) στο Ινστιτούτο Παστέρ παρασκεύασαν το BCG (Bacillus Calmette Guerin), ένα εμβόλιο ζώντων εξασθενημένων βακτηριδίων.

Τα αντιφυματικά φάρμακα το 1950 και μετά οδήγησαν σε μείωση του προβλήματος της φυματίωσης στη χώρα μας άλλα και στην Ευρώπη. Η κατάσταση αυτή ανατράπηκε όμως το 1980 σε παγκόσμιο επίπεδο και μέχρι σήμερα παρατηρείται αναζωπύρωση της νόσου.

5. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Σύμφωνα με τα στοιχεία της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (Π.Ο.Υ.) του 2009:

- ☞ Δύο δισεκατομμύρια άνθρωποι, δηλαδή το ένα τρίτο της ανθρωπότητας, έχει ήδη μολυνθεί από το μυκοβακτηρίδιο που προκαλεί τη φυματίωση. 15-20 εκατομμύρια άνθρωποι υποφέρουν από ενεργό λοίμωξη, ενώ 8 εκατομμύρια νοσούν από φυματίωση ετησίως και 3 εκατομμύρια πεθαίνουν (Γουργουλιάννης Κ., Μπούρος Δ., 2002).
- ☞ Η φυματίωση μεταδίδεται αερογενώς και αν δεν θεραπευθεί, κάθε άτομο με ενεργό φυματίωση μολύνει κατά μέσο όρο 10-15 άτομα σε ένα χρόνο.
- ☞ Ένα στα δέκα άτομα, που είναι μολυσμένο με μυκοβακτηρίδιο, αναπτύσσει φυματίωση κατά τη διάρκεια της ζωής του. Άτομα HIV θετικά διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο.
- ☞ Η φυματίωση είναι νόσημα της φτώχειας. Προσβάλλει κυρίως νέους ενήλικες, στη παραγωγική τους ηλικία. Η μεγάλη θνητότητα απαντάται στις αναπτυσσόμενες χώρες με το 50% των θανάτων να παρατηρείται στην Ασία.
- ☞ Το 2005 1.6 εκατομμύρια άνθρωποι πέθαναν από φυματίωση, που ισοδυναμεί με 4400 θανάτους την ημέρα.
- ☞ Η φυματίωση αποτελεί τη σημαντικότερη αιτία θανάτου των ατόμων με HIV. Περίπου 200.000 άτομα με HIV/AIDS πεθαίνουν από φυματίωση κάθε χρόνο, τα περισσότερα των οποίων βρίσκονται στην Αφρική.
- ☞ Η παγκόσμια ετήσια συχνότητα της φυματίωσης είναι τώρα σταθερή ή μειώνεται. Εντούτοις, ο αριθμός των περιπτώσεων φυματίωσης εξακολουθεί να αυξάνεται στην Αφρική, Α. Μεσόγειο και Ν.Α. Ασία.
- ☞ Η φυματίωση μπορεί να χαρακτηριστεί ως παγκόσμια πανδημία. Αν και η μεγαλύτερη συχνότητα απαντάται στην Αφρική, οι μισές από τις νέες περιπτώσεις απαντώνται σε 6 Ασιατικές χώρες (Μπαγκλαντές, Κίνα, Ινδία, Ινδονησία, Πακιστάν, Φιλιππίνες).
- ☞ Η πολυανθεκτική φυματίωση είναι μορφή της νόσου που δεν ανταποκρίνεται στη συνηθισμένη θεραπεία με αντιφυματικά φάρμακα πρώτης γραμμής. Είναι παρούσα σε όλες τις χώρες.
- ☞ Υπολογίζεται ότι υπάρχουν 450.000 νέες περιπτώσεις πολυανθεκτικής φυματίωσης κάθε έτος, με μεγαλύτερη συχνότητα στην Κίνα.

- ↳ Η ανθεκτική φυματίωση δεν ανταποκρίνεται ούτε και στα αντιφυματικά φάρμακα δεύτερης γραμμής.
- ↳ Απαντάται σε όλες τις χώρες και η αντιμετώπισή της είναι εξαιρετικά δύσκολη (W.H.O., 2009).

Κατά το πρώτο ήμισυ του 20^{ου} αιώνα υπήρξε μια μείωση στα ποσοστά των ατόμων που νοσούσαν από φυματίωση σε όλο τον κόσμο (Σωτήριου Α.Ράπτη, 2006). Η βελτίωση των συνθηκών διαβίωσης σε συνδυασμό με τη δυνατότητα χορήγησης δραστικής αντιφυματικής αγωγής είναι οι παράγοντες που οδήγησαν στη μείωση της φυματίωσης στις αναπτυγμένες χώρες και τις πιθανότητες θανάτου από την έκθεση στο παθογόνο μικροοργανισμό (Αντωνιάδης Α. κ.αλ., 1999).

Όμως αυτή η κατάσταση ανατράπηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1980. Η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (Π.Ο.Υ.) υπολόγισε ότι μεταξύ των τριών δεκαετιών 1884-1986 και 1989-1991 το ποσοστό των ατόμων που νοσούν από φυματίωση αυξήθηκαν κατά 28,7% σε παγκόσμιο επίπεδο. Επίσης, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια αναζωπύρωση της νόσου. Υπάρχουν μια σειρά από γνωστούς παράγοντες που κάνουν τους ανθρώπους πιο επιρρεπείς σε λοίμωξη φυματίωσης και οδηγούν στην αύξηση των ασθενών, οι οποίοι είναι οι εξής:

1. AIDS: Είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας. Οι πάσχοντες αλλά και οι φορείς από το σύνδρομο της ανοσοανεπάρκειας λόγω της ανοσοκαταστολής παρουσιάζουν αυξημένη πιθανότητα νόσησης. Σύμφωνα με την ΠΟΥ το 35% των περιπτώσεων της φυματίωσης οφείλεται στη συνύπαρξη με την λοίμωξη HIV/AIDS. Είναι ένα ιδιαίτερο πρόβλημα στην Αφρική λόγω της μεγάλης επίπτωσης του ιού HIV σε αυτές τις χώρες (Davies PDO et al., 2006, Jha P. et al. 2008).

2. Μετανάστευση: Η μετανάστευση πληθυσμού από χώρες με αυξημένη επίπτωση της νόσου και ιδίως η λαθρομετανάστευση. Η Ευρώπη δέχεται μετανάστες από χώρες του τρίτου κόσμου ή προσφύγων από τις πρώην ανατολικές χώρες. Αυτοί που εισέρχονται νόμιμα σε μια χώρα συνήθως ελέγχονται, ενώ οι παράνομοι αφ' ενός δεν ελέγχονται προληπτικά, αφ' ετέρου όταν παρουσιάζουν συμπτώματα δεν προσέρχονται για έλεγχο επειδή φοβούνται το ενδεχόμενο απέλασης.

Κατά την οκταετία 2000-2007 δηλώθηκαν στο ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ συνολικά 5398 κρούσματα φυματίωσης και κατά μέσο όρο το 24% (10-33%) αφορούσε σε αλλοδαπούς. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι το ποσοστό των αλλοδαπών ασθενών συνεχώς αυξάνεται με τη πάροδο των ετών. Με την σημερινή μεγάλη μετακίνηση

πληθυσμών "Κανένας δεν μπορεί να είναι ασφαλής αν όλοι δεν είναι ασφαλείς", διακηρύσσει ο Π.Ο.Υ.

3. Κοινωνικοοικονομικοί και περιβαλλοντολογικοί παράγοντες: Κυρίως στις υπό ανάπτυξη χώρες είναι οι άσχημες συνθήκες διαβίωσης, κακή διατροφή, έλλειψη προληπτικού ελέγχου, η ανεπάρκεια φαρμάκων αντιφυματικών, η φτώχεια ορισμένων κοινωνικών ομάδων. Η κακή διατροφή μπορεί να συμβάλλει στη στενή σχέση που παρατηρήθηκε μεταξύ της φυματίωσης και της φτώχειας (*Davies PD et al., 2003, Spence DP et al, 1993*).

4. Αύξηση επιρρεπών ομάδων ατόμων: Τέτοιες ομάδες είναι τα άτομα τρίτης ηλικίας, οι άστεγοι, οι φυλακισμένοι, οι χρήστες ναρκωτικών ουσιών, οι αλκοολικοί (*Kumar et al., 2007*), οι καπνιστές (*Davies PDO et al., 2006, Jha P et al. 2008*), οι τρόφιμοι γηροκομείων, οι πάσχοντες από ανοσοκατασταλτικά νοσήματα (*Kumar et al., 2007, CDC 2006*) όπως το AIDS και τα κακοήθη νοσήματα του αιμοποιητικού συστήματος, το ψυχοκοινωνικό stress, ο αλκοολισμός, ο σακχαρώδης διαβήτης και άλλοι. Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι επίσης ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου στις αναπτυσσόμενες χώρες (*Restrepo BI, 2007*). Όλες οι παραπάνω ομάδες αυξάνονται στις σημερινές κοινωνίες και επομένως μεγεθύνεται και το πρόβλημα της φυματίωσης. Έτσι, ενώ η φυματίωση είναι μια νόσος της οποίας είναι γνωστά η αίτια, η παθογένεια, η διάγνωση, η θεραπεία και η πρόληψη παρ' όλα αυτά συνεχίζει να φονεύει πολλούς ανθρώπους.

5. Ανάπτυξη ανοχής μυκοβακτηριδίων: Η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών έναντι των αντιφυματικών φαρμάκων αποτελεί αυξανόμενο πρόβλημα των τελευταίων ετών. Από το 2000 έως το 2004, το 20% των κρουσμάτων εμφάνισαν ανθεκτικότητα στη φυματίωση με τη συνήθη θεραπεία και το 2% ανθεκτικότητα στις δεύτερης γραμμής φάρμακα (*CDC 2006*).

Τέλος, σε πρόσφατη συνάντησή τους οι Υπουργοί Υγείας κήρυξαν την φυματίωση "επείγον τοπικό πρόβλημα για την Ευρώπη" και πήραν αποφάσεις με σκοπό να επιτευχθούν οι στόχοι του Global Plan to Stop Tb 2006-2015. Αυτοί είναι ο περιορισμός στο μισό της νοσηρότητας και των θανάτων από φυματίωση ως το 2015 και η εκρίζωση της νόσου ως το 2050 σε παγκόσμια κλίμακα. Για να επιτευχθούν αυτοί οι στόχοι ζητήθηκε από όλες τις Ευρωπαϊκές Χώρες η εκπόνηση Εθνικού Προγράμματος Ελέγχου της Φυματίωσης (Ε.Π.Ε.Φ.). Η Επιτροπή Φυματίωσης του ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ. είχε ήδη ξεκινήσει την εκπόνηση ενός τέτοιου προγράμματος για την Ελλάδα από το 2006.

6. ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ - ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η φυματίωση είναι συστηματικό νόσημα που εμφανίζεται με ποικιλία συμπτωμάτων, χωρίς όμως κανένα από αυτά να είναι παθογνωμονικό. Η κλινική εικόνα δεν είναι ειδική και ποικίλλει ανάλογα με την έκταση και τη μορφή της νόσου. Τα συνηθέστερα συμπτώματα είναι: βήχας με πτύελα ή με αιμόπτυση, πυρετός, πόνους στο στήθος, εφιδρώσεις, εύκολη κόπωση, ανορεξία, απώλεια βάρους, δύσπνοια, βράγχος φωνής (λαρυγγίτιδα) και άλγος πλευριτικού τύπου (πλευρίτιδα) (*W.H.O., 2007*).

Ως προς το τόπο εντόπισης της, η φυματίωση διακρίνεται σε πνευμονική και εξωπνευμονική (*Σωτήριου Α.Ράπτη, 2006*). Στην τελευταία οι τοποθεσίες λοίμωξης περιλαμβάνουν την υπεζωκοτική σε πλευρίτιδα φυματίωση, φυματίωση του περικαρδίου, φυματική λεμφαδενίτιδα, φυματίωση του λάρυγγα, κεχροειδής ή διάσπαρτη φυματίωση, φυματίωση του ΚΝΣ, φυματίωση του οφθαλμού, φυματίωση του σκελετού, φυματίωση του πεπτικού, φυματίωση του ουροποιητικού και φυματίωση του γεννητικού (*Σωτήριου Α.Ράπτη, 2006*). Εξωπνευμονική φυματίωση μπορεί να συνυπάρχει με πνευμονική φυματίωση (*CDC, 2000*).

7. ΜΕΤΑΔΟΣΗ

Η φυματίωση μεταδίδεται κυρίως από άνθρωπο σε άνθρωπο μέσω της αναπνευστικής οδού με την εισπνοή μικροσταγινιδίων διαμέτρου 1- 5 μm τα οποία περιέχουν μυκοβακτηρίδια, *M.tuberculosis* και παραμένουν μολυσματικά για 8-10 ημέρες (*Δημητρακόπουλος Γ.Ο., 1982*). Πηγή μόλυνσης είναι μόνο οι νοσούντες από την φυματίωση του αναπνευστικού, οι οποίοι εκπέμπουν μολυσματικά σωματίδια μέσω του βήχα, του φτερνίσματος και την ομιλία (*CDC., 1990*). Τα εισπνεόμενα σταγονίδια φτάνουν μέχρι τις κυψελίδες, όπου εγκαθίστανται και προκαλούν τη νόσο (*Σωτήριου Α.Ράπτη, 2006*). Η μετάδοση απαιτεί την επίμονη επαφή και μέσα στα άτομα της ίδιας οικογένειας περιορίζεται στο 30% (*Nicas M et al., 2005*). Σπάνια μπορεί να μεταδοθεί με την είσοδο του μικροβίου από την πεπτική ή από δερματικό τραύμα. Ο άνθρωπος είναι η μόνη φυσική πηγή. Βέβαια, μπορεί να εμφανιστεί στα θηλαστικά ή και σε πειραματόζωα.

Ένας άλλος τρόπος μετάδοσης είναι ο άμεσος ενοφθαλμισμός του δέρματος ή των βλεννογόνων (πολύ σπάνιος τρόπος). Παρατηρείται ιδιαίτερα στους μικροβιολόγους, παθολογοανατόμους ή χειρουργούς, εφ' όσον υπάρχει λύση της συνέχειας του δέρματος ή των βλεννογόνων (Δημητρακόπουλος Γ.Ο., 1982).

Επίσης άφθονα μολυσματικά σωματίδια παράγονται κατά τη θεραπεία με εισπνεόμενα φάρμακα και κατά τη βρογχοσκόπη, ενώ λιγότερα παράγονται σε εργαστήρια όπου επεξεργάζονται βιολογικά δείγματα (Σωτήριου Α.Ράπτη, 2006).

Τέλος, το *M. bovis* μεταδίδεται με το γάλα και η είσοδος γίνεται από το γαστρεντερικό σωλήνα. Το γάλα προστατεύει τα κύτταρα του μικροβίου από το γαστρικό υγρό του στομάχου. Σήμερα με τη γενίκευση της παστεριώσεως του γάλακτος εξαφανίσθηκε σχεδόν πλήρως η φυματίωση του τύπου αυτού (Δημητρακόπουλος Γ.Ο., 1982, O'Reilly LM et al., 1995).

Η πιθανότητα να μεταδοθεί η φυματίωση εξαρτάται από παραμέτρους όπως α) ο αριθμός των μυκοβακτηρίων στα πτύελα των ασθενειών, β) το αερόλυμα των πτυέλων, γ) ο χρόνο έκθεσης, δ) οι διαστάσεις και ο αερισμός του χώρου και ε) οι παράγοντες που αφορούν τον ξενιστή (ανοσοκαταστολή, HIV, γαστρεκτομή, σακχαρώδης διαβήτης, σοβαρή χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, αλκοολισμός) (Griffith D et al., 1996, Σωτήριου Α.Ράπτη, 2006).

8. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η νόσος εξελίσσεται για πολλά χρόνια και προέρχεται από μια σύνθετη αλληλεπίδραση μεταξύ του *M.tuberculosis* και της ειδικής ανοσολογικής απάντησης του ανθρώπου και της μη-ειδικής αντίστασης στη λοίμωξης (Γουργουλιάννης Κ., Μπούρος Δ., 2002).

Πρωτοπαθής Φυματίωση

Αρχικά τα εισπνεόμενα σταγονίδια εγκαθιδρύονται στις κυψελίδες, όπου εκεί τα μακροφάγα φαγοκυτταρώνουν τα μυκοβακτήρια (Houben E. Et al., 2006). Όταν τα τελευταία είναι χαμηλής μολυσματικότητας τότε καταστρέφονται πλήρως. Σε αντίθετη περίπτωση τα μυκοβακτήρια πολλαπλασιάζονται μέσα στα μακροφάγα. Σε 2

με 6 εβδομάδες έχουν αναπτυχθεί πολύ με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κυτταρικής ανοσίας και του επιβραδυνόμενου τύπου υπερευαισθησία.

Οι βλάβες τοπικά είναι κατά κανόνα ασήμαντες. Όμως, τα μυκοβακτήρια μπορεί να φτάσουν μέσω των λεμφαγγείων στους τοπικούς λεμφαδένες και μέσω της αιματικής ροής να διασπαρθούν στους πνεύμονες και σε άλλα απομακρυσμένα σημεία (τους περιφερικούς λεμφαδένες, τα νεφρά, τον εγκέφαλος και τα οστά) (Herrmann J. et al 2005, Kumar et al. 2007).

Συνήθως σε αυτό το στάδιο της νόσου αναπτύσσεται οζώδες ερύθημα (Σωτήριου Α.Ράπτη, 2006). Αυτό το στάδιο της νόσου είναι συνήθως ασυμπτωματικό ή συνοδεύεται από ελάχιστα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα. Η διάγνωση της φυματίωσης γίνεται με τυχαία ακτινολογική εξέταση του θώρακα. Συνήθως η εντόπιση της φυματικής πύκνωσης είναι στα κορυφοοπίσθια τμήματα των άνω λοβών και τα κορυφαία των κάτω. Συνήθως μπορεί να απεικονιστεί στην ακτινογραφία θώρακος το πρωτοπαθές σύμπλεγμα ή Ghon, μια περιοχή περιφερειακής σκίασης (Kumar et al. 2007, Γουργουλιάννης Κ., Μπούρος Δ., 2002). Η ανοσολογική απάντηση του οργανισμού αναπτύσσεται και η Mantoux είναι θετική (Γουργουλιάννης Κ., Μπούρος Δ., 2002).

Κάποιες φορές ίσως συμβεί ενεργός διασπορά της πρωτολοίμωξης με αποτέλεσμα την ιστική καταστροφή και τη δημιουργία σπηλαιών. Η νόσος που διασπείρεται κατά τη διάρκεια αυτής της αρχικής λοίμωξης μπορεί να παραμείνει λανθάνουσα σε οποιαδήποτε όργανο του σώματος (π.χ νεφρούς, οστά) για πολλά χρόνια και να αναζωπυρωθεί πολλά χρόνια αργότερα (Γουργουλιάννης Κ., Μπούρος Δ., 2002). Η νόσος αν δεν θεραπευτεί μπορεί να οδηγήσει ακόμη και στο θάνατο των νηπίων και μικρών παιδιών (Σωτήριου Α.Ράπτη, 2006).

Μεταπρωτοπαθής Φυματίωση

Είναι αποτέλεσμα είτε άμεσης εξέλιξης της αρχικής λοίμωξης είτε ενδογενής αναζωπύρωσης της νόσου είτε εξωγενούς επαναμόλυνσης. Η αναζωπύρωση συμβαίνει κυρίως σε ηλικιωμένους και σε άτομα με μειωμένη ανοσολογική άμυνα (π.χ. αλκοολικοί, ανοσοκατεσταλμένα κ.τ.λ.) (Γουργουλιάννης Κ., Μπούρος Δ., 2002). Συμβαίνει σε οποιοδήποτε όργανα άλλα κυρίως στους πνεύμονες και συγκεκριμένα στις κορυφές αυτών. Μια από τις κυριότερες εκφράσεις της είναι τα σπήλαια, όπου τα μυκοβακτήρια βρίσκουν ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης. Σε νεαρούς ενήλικες μπορεί να εξελιχθεί η νόσος σε μεταπρωτοπαθής στην πρώτη δεκαετία. Σε 1-5 χρόνια μπορεί

να παρουσιαστεί φυματίωση των οστών και της σπονδυλικής φυματίωσης και σε 5-12 χρόνια φυματίωση του ουρογεννητικού συστήματος και του δέρματος. Σε έφηβους, από 6 μέχρι 12 μήνες εμφανίζεται φυματιώδης πλευρίτιδα (Σωτήριου Α.Ράπτη, 2006). Όλα τα μέρη του σώματος μπορεί να προσβληθούν από τη νόσο, αν και σπάνια επηρεάζει την καρδιά, τους σκελετικούς μυς, το πάγκρεας και το θυρεοειδή αδέν (Agarwal R, et al 2005).

9. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΦΥΜΑΤΙΝΗΣ - MANTOUX

Η δερμοαντίδραση φυματίνης (μέθοδος Mantoux) αποτελεί τη βασική δοκιμασία για τον προσδιορισμό των ατόμων που έχουν μολυνθεί με το *M.tuberculosis*. Με τη δοκιμασία αυτή ελέγχεται η ανάπτυξη υπερευαισθησίας επιβραδυνόμενου τύπου προς τις πρωτεΐνες-αντιγόνα του μυκοβακτηριδίου. Η αντίδραση είναι τύπου IV κυτταρική αντίδραση και προσλαμβάνει τη μορφή υπερδιέγερσης και σκληρίας στην περιοχή που ενίεται, ενώ συγχρόνως εμφανίζεται ερυθρότητα του δέρματος (Γουργουλιάνης Κ., Μπούρος Δ., 2002). Η μέθοδος εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από το Γάλλο γιατρό Charles Mantoux το 1908.

Πρόκειται για την ενδοδερμική έγχυση ενός κεκαθαρμένου πρωτεϊνικού παράγωγου Purified Protein Derivative (PPD), το οποίο παρασκευάζεται ως εξής: Η φυματίνη, η οποία αποτελεί μίγμα θερμοανθεκτικών πρωτεϊνών με μικρό μοριακό βάρος από 2.000-9.000, παραλαμβάνεται από το διήθημα καλλιέργειας μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης σε συνθετικό υγρό θρεπτικό υλικό μετά από αποστείρωση στο αυτόκαυστο. Το διήθημα συμπυκνώνεται και καθιζάνουν οι πρωτεΐνες μεθειϊκό αμμώνιο (Δημητρακόπουλος Γ.Ο., 1982). Έχουν παρασκευαστεί διάφορες φυματίνες με επικρατούσα μορφή διεθνώς μέχρι σήμερα την PPD-S φυματίνη που παρασκευάστηκε το 1939. Η χορηγούμενη ποσότητα είναι 0,1 ml διαλύματος φυματίνης που περιέχει 5 μονάδες φυματίνης (δηλαδή 0,1 mg PPD).

Η δερματική περιοχή ελέγχεται μετά από 48-72 ώρες μετά την ένεση. Θετική θεωρείται η δοκιμασία όταν εμφανιστεί ερυθρότητα και η διήθηση στην περιοχή έχει διάμετρο τουλάχιστον 10mm, χωρίς να υπάρχει απαραίτητα ενεργός λοίμωξη. Η αντίδραση αποβαίνει θετική 3 με 4 βδομάδες μετά την έκθεση στο μυκοβακτήριο. Επειδή ορισμένα αντιγόνα της κεκαθαρμένης φυματίνης είναι κοινά στο

M.tuberculosis και σε άλλα μυκοβακτηρίδια μπορεί να εμφανιστεί ψευδώς θετική φυματινοαντίδραση σε άτομα που μολύνθηκαν με άτυπα μυκοβακτηρίδια ή εμβολιάστηκαν με BCG (Σωτήριου Α.Ράπτη,2006). Επιπλέον, μπορεί στο 25% να ανευρίσκεται ψευδώς αρνητική σε περιπτώσεις όπως ιογενείς λοιμώξεις (HIV, ιλαρά, ανεμοβλογιά), μικροβιακές λοιμώξεις, κακοήθη νοσήματα, λήψη ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων, μεγάλη ηλικία. Παρά τους περιορισμούς είναι απαραίτητη η συμβολή της δοκιμασίας φυματίνης για την διάγνωση πιθανών νοσησεων από φυματίωση άλλα και την ανεύρεση των ατόμων που χρειάζονται προληπτική αντιφυματική αγωγή (Αντωνιάδης Α. κ.αλ.,1999).

10. ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Το ιστορικό του ασθενούς, η κλινική εικόνα, η δερμοαντίδραση φυματίνης (κατά Mantoux) και η ακτινογραφία θώρακος παρέχουν μόνο ενδείξεις για τη διάγνωση. Η επιβεβαίωση της νόσου γίνεται μόνο με την απομόνωση και ταυτοποίηση του *M.tuberculosis complex* σε διάφορα βιολογικά υλικά. Η νόσος μπορεί να προσβάλει οποιοδήποτε όργανο, γι' αυτό το βιολογικό υλικό των δειγμάτων μπορεί να ποικίλει. Συγκεκριμένα μπορεί να είναι πτύελα, βρογχικές εκκρίσεις, βρογχοκυψελικό έκπλυμα, πλευριτικό υγρό, γαστρικό υγρό, ούρα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, αναρρόφημα από απόστημα, ξάσματα ενδομητρίου και υλικό βιοψίας ανάλογα με την εντόπιση της νόσου. Τοποθετούνται σε αποστειρωμένα φιαλίδια ή σωληνάρια (Σωτήριου Α.Ράπτη,2006).

Η διάγνωση μπορεί να γίνει με τις κλασσικές τεχνικές οι οποίες για τα μυκοβακτήρια είναι χρονοβόρες όπως θα δούμε παρακάτω. Μετά την εισαγωγή του όρου "μοριακή νόσο" στο ιατρικό λεξιλόγιο από το Pauling το 1949 και την ανακάλυψη της δομής του DNA από τους Watson και Crick το 1953 ακολούθησε μια περίοδος ανάπτυξης της μοριακής βιολογίας που οδήγησε στην ανάπτυξη και την εγκαθίδρυση της μοριακής διαγνωστικής. Η χρυσή εποχή για την μοριακή διάγνωση ξεκίνησε το 1985 με την ανακάλυψη της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) (George P.Patrinou, 2005). Με την τελευταία η ανίχνευση του *M.tuberculosis* επιτυγχάνεται σε σύντομο σχετικά χρονικό διάστημα συγκριτικά με τις κλασσικές τεχνικές.

10.1. ΚΛΑΣΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

10. 1.α. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΗΣΗ

Η μικροσκοπική παρατήρηση των οξεάντοχων μυκοβακτηρίων είναι ένας γρήγορος τρόπος επιβεβαίωσης της μυκοβακτηριακής λοίμωξης (Αντωνιάδης Α. κ.αλ.,1999). Είναι απαραίτητο να προηγηθεί επεξεργασία των δειγμάτων με ειδική χρώση, με σκοπό την καλύτερη ορατότητα και την παροχή μιας πρώτης διαφοροδιαγνωστικής δυνατότητας όσον αφορά το μέγεθος, τη μορφολογία και τον τρόπο χρώσεων του οργανισμού με μια συγκεκριμένη χρωστική.

Η ειδική χρώση για τα οξεάντοχα μυκοβακτηρίδια ονομάζεται Ziehl-Neelsen. Επινοήθηκε το 1882 από τους Franz Ziehl (1859-1926) και Friedrich Neelsen (1854-1894). Ο σκοπός της χρώσης είναι η διαφοροποίηση των οξεάντοχων μικροοργανισμών από τους υπόλοιπους. Η ιδιότητα της οξεοαντοχής αποκτάται σε κάποιο συγκεκριμένο στάδιο του βιολογικού κύκλου, λόγω της παρουσία μυκολικών οξέων πάνω στην επιφάνεια του κυττάρου του (Michael T. Madican et al., 2003).

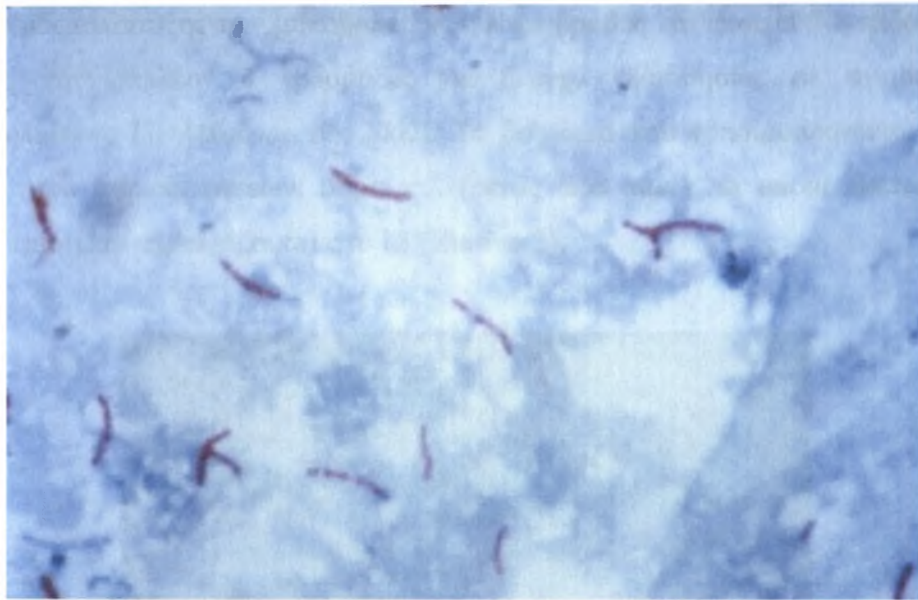
Για την διαδικασία στρώνουμε το πιο πυώδες μέρος του υλικού (πτύελα, βρογχικές εκκρίσεις, γαστρικά) σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα και χρησιμοποιείται ένα μείγμα φαινόλης και της χρωστικής ουσίας, βασική φουξίνη. Αρχικά, το παρασκεύασμα χρωματίζεται με το διάλυμα φουξίνης το οποίο βάφει κόκκινα τα μυκοβακτήρια. Η χρωστική εισέρχεται στα κύτταρα με αργή μέχρι εξατμίσεως θέρμανση με φλόγα του επιχρισμένου σε αντικειμενοφόρο πλάκα εναιωρήματος κυττάρων για 2-3 λεπτά. Ρόλος της φαινόλης είναι η ενισχυμένη διείσδυση της φουξίνης στα λιπίδια. Μετά από έκπλυση με απεσταγμένο νερό, προστίθεται αιθυλική αλκοόλη που περιέχει 3% HCl, για αποχρωματισμό. Τέλος έπειτα από μια ακόμη έκπλυση προστίθεται μια άλλη χρωστική το κυανούν του μεθυλενίου, για να χρωματίζονται κυανά όλα τα βακτήρια και τα επιθηλιακά κύτταρα. Αυτή είναι μια χαρακτηριστική ιδιότητα η οποία οφείλεται στην μεγάλη περιεκτικότητα του κυτταρικού τοιχώματος σε λιπίδια. Τελικά οι οξεάντοχοι οργανισμοί φαίνονται στο παρασκεύασμα κόκκινοι ενώ οι μη οξεάντοχοι φαίνονται κυανοί. Το *M.tuberculosis* φαίνεται κόκκινο (Michael T. Madican et al., 2003, Αντωνιάδης Α. κ.αλ.,1999).

Το παρασκεύασμα εξετάζεται στην συνέχεια σε μικροσκόπιο κοινό, όπου το μυκοβακτήριο *M.tuberculosis* φαίνεται ως κόκκινα ραβδία σε μπλε υπόστρωμα (Γουργουλιάννης Κ., Μπούρος Δ., 2002) (Εικόνα 2). Επίσης μπορεί να

χρησιμοποιηθεί και μικροσκόπιο φθορισμού το οποίο έχει μεγαλύτερη ευαισθησία (Αντωνιάδης Α. κ.αλ., 1999). Σημαντικά σημεία που χρήζουν προσοχής είναι:

1. Μεγαλύτερη ευαισθησία έχουν τα δείγματα από αναπνευστική εντόπιση της λοίμωξης.

2. Δεν είναι απαραίτητο τα οξεάντοχα βακτήρια που παρατηρούνται να είναι μυκοβακτήρια. Υπάρχουν και άλλα μικρόβια, όπως Νοκάρδιες και ακτινομύκητες οι οποίοι βάφονται κόκκινοι με Ziehl Neelsen και δεν είναι μυκοβακτηρίδια.



Εικόνα 2. Θετικό δείγμα σε χρώση Ziehl Neelsen. Το *M.tuberculosis* είναι οι κόκκινοι βακίλλοι.

10.1.β. LOWENSTEIN-JENSEN (L-J)

Το μέσο καλλιέργειας Löwenstein-Jensen αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τον Löwenstein (Lowenstein E., 1933, Lowenstein E., 1931) χρησιμοποιώντας μια χρωστική, το πράσινο του μαλαχίτη για να αναστέλλει τα ανεπιθύμητα βακτήρια και μεταγενέστερα πρόσθεσε το κιτρικό ο Jensen (Jensen, F., et al., 1932).

Το Lowenstein-Jensen (L-J) είναι υλικό καλλιέργειας κατάλληλο για μικροοργανισμούς με υψηλές και σύνθετες διατροφικές απαιτήσεις, όπως τα μυκοβακτήρια και συγκεκριμένα το *M.tuberculosis* (Elbir H, et al 2008). Το υλικό αυτό περιέχει λεύκωμα, λεκιθίνη του αυγού της όρνιθας, γλυκερίνη (διευκολύνει την ανάπτυξη του μικροβίου), ασπαραγίνη, δισοξινοφωσφορικό κάλιο, θειϊκό μαγνήσιο, κιτρικό μαγνήσιο και μια χρωστική, το πράσινο του μαλαχίτη. Το τελευταίο αναστέλλει την ανάπτυξη άλλων μικροβίων. Η παρασκευή του L-J γίνεται ως εξής:

Αρχικά, μοιράζεται σε σωληνάρια τα οποία τοποθετούνται σε λοξή θέση και αφήνονται στους 85°C για 50 λεπτά ώστε το υλικό να στερεοποιηθεί σε λοξή θέση. Τα σωληνάρια κλείνουν με κοχλιωτό ή ελαστικό πώμα για να μην ξεραθεί το υλικό. Οι συνθήκες που επικρατούν είναι ιδανικές για την ανάπτυξη των μυκοβακτηρίων της φυματίωσης, δηλαδή ατμόσφαιρα CO₂ 10% και θερμοκρασία 37°C (Δημητρακόπουλος Γ.Ο., 1997, Αντωνιάδης Α. κ.αλ., 1999).

Για καλλιέργεια *M.bovis*, παραλείπεται η γλυκερόλη και προστίθεται πυροσταφυλικό νάτριο.

Ο ρυθμός ανάπτυξης των μυκοβακτηρίων είναι βραδύς και απαιτεί 3-8 εβδομάδες επώασης και επιπλέον 3 εβδομάδες για έλεγχο ευαισθησίας σε αντιβιοτικά (Γουργουλιάννης Κ., Μπούρος Δ., 2002). Τα δείγματα που χρησιμοποιούνται είναι πτύελα, υγρά παρακεντήσεων, ούρα κτλ (εκτός από αίμα), τα οποία έπειτα από φυγοκέντριση και εμβολιάζονται στο LJ (Εικόνα 3).



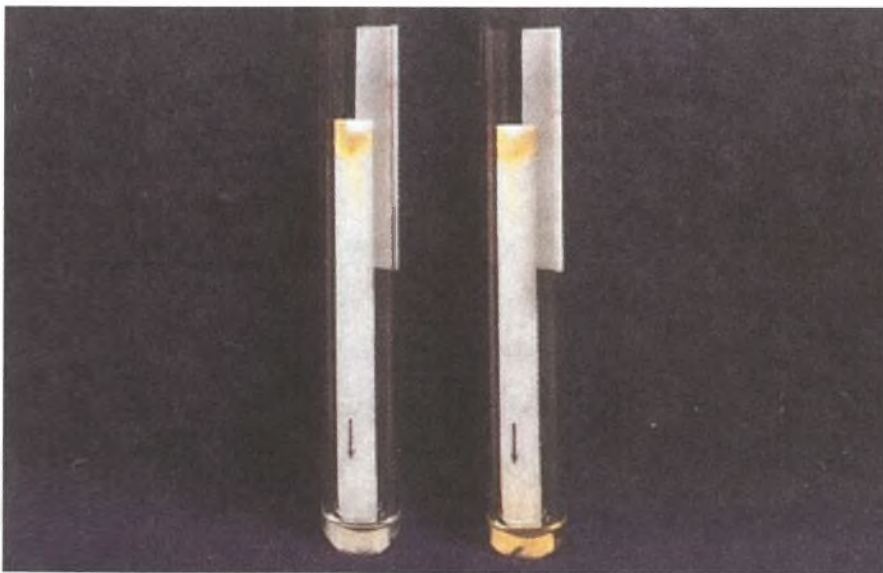
Εικόνα 3. Καλλιέργεια του *Mycobacterium tuberculosis* σε μέσο καλλιέργειας Löwenstein-Jensen. Οι κιτρινωποί σωροί υποδηλώνουν την ανάπτυξη του *M. tuberculosis* (Agarwal et al. 2005).

10.2. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα χαρακτηριστικά της ανάπτυξης και η μορφολογία των αποικιών αποτελούν τα πρωταρχικά στοιχεία για την αδρή ταυτοποίηση των μυκοβακτηρίων. Η πλήρη ταυτοποίηση τους απαιτεί την εκτέλεση ειδικών βιοχημικών δοκιμασιών, όπως είναι οι δοκιμασίες παραγωγής νιασίνης, καταλάσης, ουρεάσης και αναγωγής νιτρικών. Το

πρόβλημα που παρουσιάζεται είναι ότι η ταυτοποίηση αυτή απαιτεί χρονικό διάστημα όχι μικρότερο από τρεις εβδομάδες. Τελευταία έχουν αναπτυχθεί αυτοματοποιημένα συστήματα στα οποία η ταυτοποίηση ολοκληρώνεται σε πέντε μέρες (Αντωνιάδης Α. κ.αλ., 1999).

Η κυριότερη βιοχημική δοκιμασία που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του *M.tuberculosis* είναι η παραγωγή νιασίνης (νικοτινικού οξέος). Για την αντίδραση αυτή είναι απαραίτητο να είναι οι καλλιέργειες καθαρές, γιατί οι μεικτές καλλιέργειες δεν δίνουν αξιόπιστα αποτελέσματα. Όλα τα μυκοβακτηρίδια παράγουν νιασίνη (Koneman E. W., 1997). Όμως, τα είδη *M. tuberculosis* και σπάνια κάποια στελέχη *M.africanum*, *M.bovis* και *M.chelonae*, δεν συνθέτουν το ένζυμο που είναι απαραίτητο για την μετατροπή της νιασίνης σε ριβονουκλεοτίδιο της νιασίνης. Αυτό οδηγεί στη συσσώρευση της νιασίνης στο υλικό της καλλιέργειας ιδιαίτερα σε στελέχη *M. tuberculosis*. Πολύ σπάνια απομονώνονται στελέχη *M. tuberculosis* που δεν παράγουν νιασίνη. Η παρουσία νιασίνης στο υλικό καλλιέργειας ελέγχεται με την προσθήκη διαλύματος ανιλίνης και διαλύματος βρωμιούχου κυανίου. Εάν εμφανισθεί κίτρινο χρώμα η αντίδραση είναι θετική (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Παραγωγή Νιασίνης. Στο πάτω του δεξιού φιαλιδίου και στο κάτω μέρος του strip που είναι βυθισμένο εντός του παρατηρείται η εμφάνιση κίτρινου χρώματος, δηλώνοντας την ύπαρξη του *M.tuberculosis*.

10.3. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Χρησιμοποιήθηκαν στην κλινική διάγνωση των λοιμώξεων συμπληρωματικά με τις κλασσικές μικροβιολογικές τεχνικές για να διασφαλίσουν ένα γρηγορότερο αποτέλεσμα στις περιπτώσεις εκείνες όπου πρόκειται για μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται βραδέα στη θρεπτική καλλιεργητικά υγρά.

Χωρίζονται κυρίως σε δυο μεγάλες κατηγορίες:

α) Στις τεχνικές υβριδοποίησης

β) Στην τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

10.3.1 ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ - GEN-PROBE

Οι τεχνικές υβριδοποίησης με ιχνηθέτες DNA, είναι οι πρώτες ιστορικά τεχνικές που στηρίζονται στα νουκλεϊνικά οξέα για την ανίχνευση μικροοργανισμών σε κλινικά δείγματα (*Musial CE et al., 1988, Drake et al, 1987*). Πρόκειται για μια ταχεία εξέταση με ιχνηθέτη DNA (DNA probe) η οποία χρησιμοποιεί την τεχνική υβριδισμού νουκλεϊνικού οξέως για την ταυτοποίηση του *Mycobacterium tuberculosis* που απομονώνεται από καλλιέργεια.

Οι εξετάσεις υβριδισμού νουκλεϊνικών οξέων βασίζονται στην ικανότητα των συμπληρωματικών αλυσίδων των νουκλεϊνικών οξέων να παρατάσσονται η μια απέναντι στην άλλη και να συνδέονται μεταξύ τους ειδικά σχηματίζοντας σταθερά δίκλιωνα σύμπλοκα.

Οι ιχνηθέτες DNA είναι μικρά, σεσημασμένα, μονής έλικας τμήματα DNA, τα οποία σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν για να υβριδοποιηθούν με συμπληρωματικές αλληλουχίες μικροβίων στόχων. Αποτελούν ένα απαραίτητο εργαλείο για την ταχεία διάγνωση της φυματίωσης και ανίχνευση των μυκοβακτηριδίων των *M. tuberculosis*, *M.avium*, *M.intracellulare* και *M.gordonae* (*Conville PS et al, 1989, Lim SD et al, 1991*). Εμπορεύσιμα kits της Gen-Probe σε πολλά εργαστήρια έχουν αντικαταστήσει επιτυχώς τις κλασσικές μεθόδους και χρησιμοποιούν δείγμα από καθαρό καλλιέργημα. Υπάρχουν kits για κάθε είδος ξεχωριστά.

Στα διαγνωστικά kits, χρησιμοποιείται ένας μονόκλωνος ανιχνευτής DNA με σήμανση χημειοφωταύγειας ο οποίος είναι συμπληρωματικός στο ριβοσωμικό RNA του οργανισμού στόχου, στην προκειμένη περίπτωση *M.tuberculosis*. Ο πολλαπλασιασμός (ενίσχυση) και η ανίχνευση λαμβάνουν χώρα σε ένα σωληνάριο. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε τρία στάδια:

1° Λύση κυττάρου. Σε αυτό το στάδιο απελευθερώνονται τα νουκλεϊνικά οξέα από τα μυκοβακτηριακά κύτταρα με κατεργασία με υπέρηχους για 15 λεπτά.

2° Ενίσχυση ριβοσωμικού RNA. Σε αυτό το στάδιο χρησιμοποιείται θερμότητα 95°C για 15 λεπτά για την αποδιάταξη των νουκλεϊνικών οξέων και τη διάσπαση της δευτερογενούς δομής του rRNA. Προστίθεται κατάλληλο ένζυμο σε θερμοκρασία 42°C για 30λεπτά με σκοπό τον πολλαπλασιασμό με ενδιάμεση Μεταγραφή (Transcription-Mediated Amplification) (TMA) ενός ειδικού μυκοβακτηριακού rRNA-στόχου μέσω μεταγραφής με ενδιάμεσο στάδιο DNA, με αποτέλεσμα πολλαπλά αντίτυπα του μυκοβακτηριακού RNA αντίγραφου (RNA amplicon).

3° Υβριδισμός. Τέλος, προστίθεται ο ιχνηθέτης στους 60°C για 15λεπτά για να ενωθεί με το DNA του *M.tuberculosis* και να σχηματίσει ένα σταθερό υβρίδιο DNA-RNA. Η συγκεκριμένη θερμοκρασία βοηθά να γίνει ανασύνδεση του ιχνηθέτη, δηλαδή να δημιουργηθούν δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στον ιχνηθέτη και τις συμπληρωματικές αλληλουχίες που τυχόν υπάρχουν στο αποδιαταγμένο μόριο-στόχος. Τα υβρίδια DNA - RNA μετρώνται σε αναλυτή χημειοφωταύγειας.

Η ταχύτητα μιας αντίδρασης υβριδοποίησης εξαρτάται από τη θερμοκρασία, τη συγκέντρωση του άλατος, το pH, τη συγκέντρωση και το μέγεθος του ιχνηθέτη.

Ο ιχνηθέτης του *M.tuberculosis* ανιχνεύει όλα τα μέλη του *M.tuberculosis complex*, συμπεριλαμβανομένων και των *M.bovis* και *M.africanum*. Το διαγνωστικό τεστ γίνεται σε καθαρή αποικία, πριν γίνει τυποποίηση με κλασικές μεθόδους.

10.3.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ, PCR

Ιστορικά

Η μέθοδος PCR επινοήθηκε από τον Kary Mullis στα μέσα της δεκαετίας του 1980 στην εταιρεία Cetus, ο οποίος τον Οκτώβριο του 1993 βραβεύτηκε με Νόμπελ Χημείας. Η ανακάλυψη της (Saiki *et al*, 1985, Mullis and Faloona, 1987) και η γρήγορη βελτιστοποίηση της με τη χρήση μιας θερμοσταθερής Taq DNA πολυμεράσης από το *Thermus aquaticus* (Saiki *et al*, 1988) έχει διευκολύνει σε τεράστιο βαθμό και έχει φέρει επανάσταση στη μοριακή διαγνωστική.

Εφαρμογές

Η τεχνική της PCR έχει πολλές εφαρμογές, όπως στην παλαιοντολογία, στην αρχαιολογία, στην εγκληματολογία, στις επιδημιολογικές μελέτες και στην ταυτοποίηση

μικροοργανισμών σε δείγματα ασθενών. Επίσης χρησιμοποιείται για τον αποκλεισμό υπόπτων, για απόδειξη σε δικαστικό επίπεδο της ενοχής ενός υπόπτου, για αμφισβητούμενη πατρότητα, για προσδιορισμό μακρινών συγγενικών σχέσεων σε περιπτώσεις ατόμων που επιθυμούν να γράφουν την καταγωγή τους και για την αναγνώριση θύματος σε περίπτωση μαζικών καταστροφών (Watson J. et al, 2007).

Πλεονεκτήματα

Τα πλεονεκτήματα της είναι ο μεγάλος αριθμός αντιγράφων της επιθυμητής αλληλουχίας που παράγεται με την εκθετική ενίσχυση της, γεγονός που επιτρέπει την ανίχνευση της σε σύντομο χρονικό διάστημα. Έχει επίσης μειώσει την ανάγκη για χρήση ραδιενέργειας στη μοριακή διάγνωση ρουτίνας. Τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη αντιδραστηρίων PCR σε kits, η αυξημένη διάθεση σύνθεσης ολιγονουκλεοτιδίων με χαμηλό κόστος και η αύξηση των διαθέσιμων πληροφοριών για τις αλληλουχίες των νουκλεοτιδίων στο DNA με τις τεχνικές προσδιορισμού αλληλουχιών (sequencing), επέτρεψαν την εφαρμογή νέας τεχνολογίας για την επίλυση ακόμη και παλιών προβλημάτων και στα ερευνητικά εργαστήρια μικροβιολογίας.

Βασικές αρχές της PCR

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην κινητική επανασύνδεσης των αποδιαταγμένων συμπληρωματικών αλυσίδων δίκλωνου νουκλεϊκού οξέος που ανέπτυξαν οι Britten και Kohne στα τέλη της δεκαετίας του 1960. Με αυτή επιτυγχάνεται η σύνθεση και ο πολλαπλασιασμός ενός τμήματος DNA-στόχου, ανεξαρτήτου προέλευσης, *in vitro*. Το DNA στόχος αποτελεί το πρότυπο DNA της τεχνικής. Ως αφετηρίες χρησιμοποιούνται 2 συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μεγέθους 18-22 βάσεων, που ονομάζονται εκκινητές (primers). Η δομή τους είναι συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση. Γι αυτό είναι απαραίτητο να είναι γνωστή η αλληλουχία του DNA στόχου. Με τη δράση του ενζύμου Taq πολυμεράση και την παρουσία των τεσσάρων dNTPs και ιόντων Mg^{++} συνθέτει *in vitro* έναν τεράστιο αριθμό αντιγράφων από το αρχικό μόριο.

Στη στοιχειώδη μορφή της η PCR περιλαμβάνει τρία στάδια, τα οποία είναι τα εξής (Εικόνα 5):

1^ο Το στάδιο της μετουσίωσης του εκμαγείου DNA (denaturation) κατά το οποίο το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Η επώαση γίνεται σε υψηλή θερμοκρασία

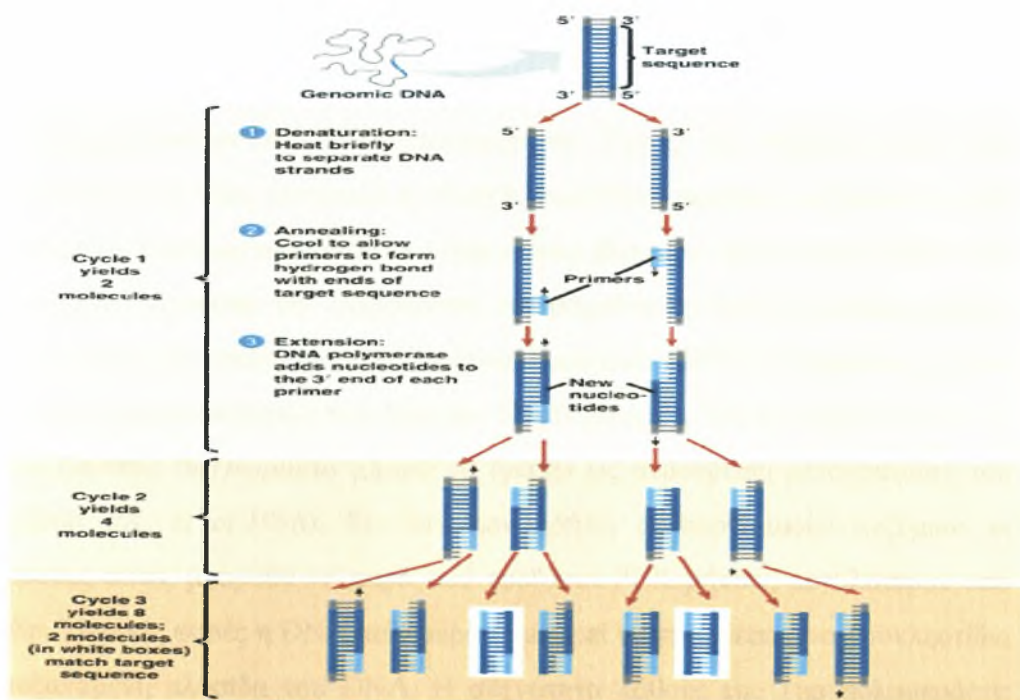
(90-95°C) για να διασπαστούν οι δεσμοί υδρογόνου που συνδέουν τους δυο κλώνους, οι οποίοι λειτουργούν στην συνέχεια ως εκμαγεία για τη σύνθεση των θυγατρικών αλυσίδων.

2^ο Το στάδιο υβριδισμού (annealing) των εκκινητών, όπου συνδέονται "υβριδίζονται" οι δυο εκκινητές στις δυο πλευρές (5' και 3' άκρο) του DNA στόχου στους αντίστοιχους κλώνους DNA. Η σύνδεση γίνεται συνήθως σε θερμοκρασία που κυμαίνεται μεταξύ 50 °C έως 70 °C, ανάλογα με το μήκος των εκκινητών και την αλατότητα του διαλύματος.

3^ο Το στάδιο της επέκτασης (extension), όπου με τη δράση της Taq DNA πολυμεράσης προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο του DNA κάθε εκκινητή με κατεύθυνση 5' προς 3' και η αλυσίδα επεκτείνεται. Λαμβάνει χώρα σε μέση θερμοκρασία 68-72°C.

Το αποτέλεσμα είναι δυο καινούριες αλυσίδες συμπληρωματικές προς αυτές των δυο κλώνων του αρχικού DNA με αποτέλεσμα το διπλασιασμό του DNA στόχου. Τα τρία αυτά στάδια αποτελούν ένα «θερμικό κύκλο» και επαναλαμβάνονται για 30 περίπου κύκλους συνήθως. Γενικά κυμαίνονται από 25 έως 40 κύκλοι (Mullis KB.1990, Eisenstein BI. 1990).

Κάθε φορά που συμπληρώνεται ένας κύκλος, η αλληλουχία-στόχος θεωρητικά διπλασιάζεται, αυξάνοντας τον αριθμό των αντιγράφων. Έτσι, στο τέλος κάθε κύκλου ο στόχος πολλαπλασιάζεται 2ⁿ, όπου n ο αριθμός των κύκλων. Δηλαδή επιτυγχάνεται μια γεωμετρική συσσώρευση των πολλαπλασιασθέντων αλληλουχιών-στόχων (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).

Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας ανάμεσα σε κάθε κύκλο επιτυγχάνονται με αυτοματοποιημένες συσκευές, τους θερμικούς κυκλοποιητές οι οποίοι έχουν την ικανότητα να ανεβοκατεβάζουν την θερμοκρασία. Εισάγεται το πρόγραμμα θερμοκρασιών και η αντίστοιχη χρονική διάρκεια στην εκάστοτε θερμοκρασία σε κάθε στάδιο του κύκλου και μπορεί να γίνεται μετάβαση από το ένα στάδιο στο άλλο για όσους κύκλους επιθυμούμε. Στην ουσία ένα θερμαντικό σώμα με δυνατότητα προγραμματισμού, που μπορεί να εκτελεί κύκλους θέρμανσης και ψύξης μόνος του ώστε να αποφεύγονται οι μεταφορές των σωλήνων από υδατόλουτρο σε υδατόλουτρο. Μπορεί να δεχτεί μέχρι 48 ή 96 μικρά eppendorf (0,2ml).

Τα συστατικά της PCR είναι το DNA εκμάγειο, οι εκκινητές (primers), τα τριφωσφορικά δεσοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), DNA πολυμεράση και ρυθμιστικό διάλυμα (buffer). Παρακάτω αναλύεται το καθένα συστατικό ξεχωριστά:

✓ DNA εκμάγειο

Είναι η αλληλουχία στόχος της PCR. Είναι αρκετό λιγότερο από ένα μικρογραμμάριο του ολικού γενωμικού DNA για την ενίσχυση του με τη μέθοδο της PCR. Η διαδικασία της απομόνωσης των νουκλεϊκών οξέων πρέπει να αποφεύγει τη μόλυνση με ξένο DNA/RNA και να απομονώνει ανέπαφο το DNA ή RNA. Το DNA μπορεί προέρχεται από διαφορετικούς τύπους δειγμάτων όπως αίμα, ούρα, πτύελα, τραχηλικό, τρίχες, ENY κτλ.

✓ DNA πολυμεράση

Πριν την ανακάλυψη των θερμοσταθερών ενζύμων το θραύσμα Κλεωσον του *E.coli* χρησιμοποιούταν ως DNA πολυμεράση. Όμως, τα ένζυμα αυτά ήταν θερμοευαίσθητα και ήταν αναγκαία η συνεχής προσθήκη φρέσκου ενζύμου σε κάθε PCR κύκλο. Το *Thermua aduaticus* ένα θερμοφύλο βακτήριο που απομονώθηκε στις αρχές του 1980 καταλύει την επιμήκυνση της συμπληρωματικής αλυσίδας, καθώς προσθέτει μονομερή τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) σύμφωνα με τον κανόνα συμπληρωματικότητας των βάσεων. Η πολυμεράση Tth προερχόμενη από το βακτήριο *Thermus thermophilus* μπορεί να δράσει ως ανάστροφη μεταγραφάση του RNA (Saiki RK, et al.1988). Με επιπλέον χρήση επιδιορθωτικών ενζύμων, οι πολυμεράσες αυτές μπορούν να παράγουν προϊόντα PCR μήκους μεγαλύτερου από 30.000bp. Μερικές φορές η DNA πολυμεράση μπορεί να προσθέσει ένα νουκλεοτίδιο στην αυξανόμενη αλυσίδα του DNA. Η συχνότητα λάθους της Taq πολυμεράσης είναι περίπου 1 στα $2 \cdot 10^4$ νουκλεοτίδια *in vitro*.

✓ Τριφωσφορικά δεσοξυριβουοκλεοτίδια (dNTPs)

Αποτελούν το υπόστρωμα του ενζύμου DNA πολυμεράση, η οποία τα προσθέτει με κατεύθυνση 5'→3'. Τα τέσσερα δεσοξυριβουοκλεοτίδια (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) απαιτούνται σε ισομοριακές ποσότητες στο μείγμα αντιδραστηρίων της PCR. Οι συγκεντρώσεις τους κυμαίνονται μεταξύ 50 μέχρι 200μM. Σε συγκεντρώσεις 5 μέχρι 100μM η πολυμεράση παρουσιάζει μεγαλύτερη πιστότητα. Όμως επειδή τα ιόντα μαγνησίου δημιουργούν ένα διαλυτό σύμπλεγμα με τα dNTPs το οποίο είναι απαραίτητο για την ενσωμάτωσή τους στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA, η βέλτιστη συγκέντρωση των dNTPs εξαρτάται και από την συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου (MgCl₂). Όμως μικρότερες συγκεντρώσεις ιόντων μαγνησίου ελαττώνουν την απόδοση της PCR αντίδρασης, ενώ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ελαττώνουν την ειδικότητα της αντίδρασης και προκαλούν την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων (Myers TW, Gelfand DH. 1991).

✓ Εκκινητές (primers)

Είναι ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες DNA συμπληρωματικές ως προς το DNA στόχο μεγέθους 20-30bp. Για την κατασκευή τους απαιτείται η γνώση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας γύρω από την περιοχή που επιθυμούμε να ενισχύσουμε. Το ποσοστό των αζωτούχων βάσεων GC επηρεάζει τον υβριδισμό τους με το στόχο. Η θερμοκρασία που γίνεται ο υβριδισμός (συμβολίζεται με T_m) είναι ένας σημαντικός παράγοντας και εξαρτάται από το μήκος και τη σύσταση των εκκινητών σε βάσεις. Συγκεκριμένα, ο υπολογισμός της θερμοκρασίας υβριδισμού γίνεται ως εξής: $T_m = (\text{αριθμός των βάσεων A+T}) \cdot 2^\circ\text{C} + (\text{αριθμός των βάσεων G+C}) \cdot 4^\circ\text{C}$ και κυμαίνεται μεταξύ 37°C και 60°C. Υψηλές θερμοκρασίες επιτυγχάνουν πιο εξειδικευμένο υβριδισμό άλλα χαμηλότερης απόδοσης. Η επιλογή χαμηλότερης θερμοκρασίας αυξάνει την απόδοση εις βάρος της ειδικότητας, με αποτέλεσμα τον κίνδυνο δημιουργίας παραπροϊόντων της PCR αντίδρασης, εάν οι εκκινητές προσδεθούν σε άλλες μόνο θέσεις του γονιδιώματος με σχετική μόνο ομολογία ως προς αυτούς.

✓ Ρυθμιστικό Διάλυμα (Buffer)

Ρυθμίζει την τιμή του pH δηλαδή το βέλτιστο pH στο οποίο η δραστητικότητα της πολυμεράσης είναι η καλύτερη δυνατή. Περιέχει άλατα μονοσθενών κατιόντων για την ρύθμιση της θερμοκρασίας αποδιάταξης και επιμήκυνσης αυξάνοντας την ειδικότητα της αντίδρασης και βοηθώντας τον υβριδισμό των εκκινητών. Οι συγκεντρώσεις των αλάτων στο διάλυμα εξαρτώνται από το εκμαγείο και τους

εκκινητές. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση των αλάτων στο διάλυμα, τόσο πιο γρήγορα αποδιατάσσονται τα μεγάλα τμήματα DNA σε σχέση με μικρότερα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι το χλωριούχο κάλιο και το χλωριούχο μαγνήσιο. Στο εμπόριο υπάρχουν διαθέσιμα αρκετά ρυθμιστικά διαλύματα.

10.3.3 ΑΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ PCR

Οι ανάγκες για πιο ευαίσθητη και ακριβής διάγνωση των μικροοργανισμών οδήγησε στην ανάπτυξη άλλων μεθόδων PCR. Οι κυριότερες είναι:

α) Αλυσιδωτή Αντίδραση της Λιγάσης (Ligase Chain Reaction, LCR)

Η αντίδραση πολλαπλασιασμού με λιγάση που ονομάζεται αλυσιδωτή αντίδραση λιγάσης έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση *M.tuberculosis*. Πρόκειται για μια τεχνική ανίχνευσης ή πολλαπλασιασμού μιας αλληλουχίας-στόχου (Winn-Deen and Inonannisci, 1991). Σε γενικές γραμμές είναι ίδια η αρχή της με αυτή της PCR άλλα η κύρια διαφορά της είναι ότι το ένζυμο που χρησιμοποιεί είναι μια θερμοσταθερή λιγάση για ένωση δυο ολιγονουκλεοτιδίων που βρίσκονται ακριβώς δίπλα το ένα στο άλλο.

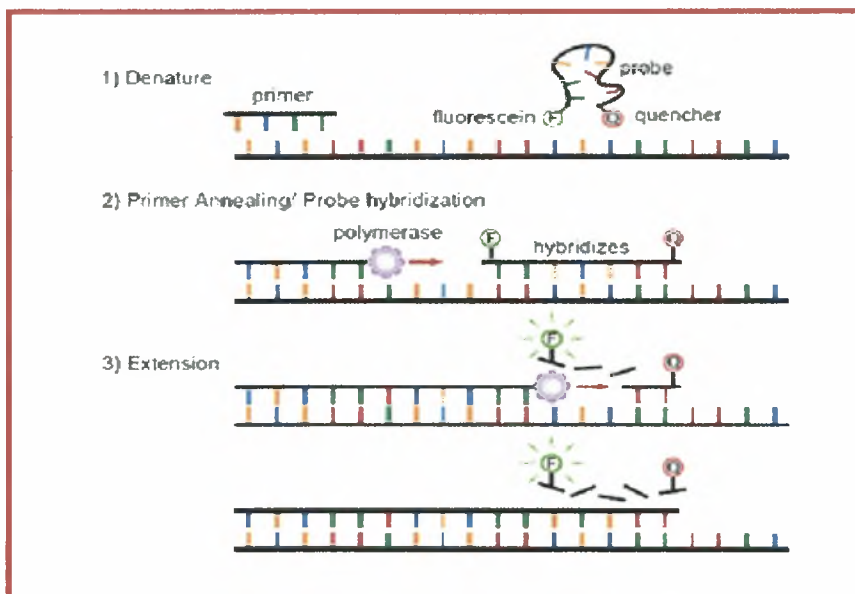
β) Ποσοτική PCR σε Πραγματικό Χρόνο (Real-Time Quantitive PCR)

Είναι μια μέθοδος που επιτρέπουν την μέτρηση της ποσότητας των προϊόντων και κατ' επέκταση την παρακολούθηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού του *M.tuberculosis* σε όλη τη διάρκεια της αντίδραση PCR. Ύστερα από μια αρχική φάση κατά την οποία δεν είναι ανιχνεύσιμο το προϊόν της PCR λόγω του ότι βρίσκεται σε πολύ μικρή ποσότητα ακολουθεί μια εκθετική φάση κατά την οποία η ποσότητα του προϊόντος σχεδόν διπλασιάζεται σε κάθε βήμα. Αν υπάρχουν περισσότερα μόρια-στόχοι στην αρχή, θα χρειαστούν λιγότεροι κύκλοι για να αρχίσει η εκθετική φάση. Συγκρίνοντας τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται για την έλευση της εκθετικής φάσης σε διαφορετικές αντιδράσεις, μπορούμε να προσδιορίσουμε την αρχική ποσότητα των μορίων που χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα στις αντιδράσεις.

Ο προσδιορισμός του ποσότητας της PCR που υπάρχει στο τέλος κάθε κύκλου βασίζεται στην ανίχνευση μιας φθορίζουσας ουσίας η οποία συνδέεται σε κάθε μόριο που συντίθεται. Οι πρώτες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το βρωμιούχο αιθίδιο και το SYBR Green I.

Σήμερα χρησιμοποιούνται κυρίως ολιγονουκλεοτιδικοί ιχνηθέτες οι οποίοι υβριδοποιούνται σε μια εσωτερική αλληλουχία του μορίου στόχου. Ο τύπος

ανιχνευτή που χρησιμοποιείται ονομάζεται μοριακός φάρος (Molecular beacon). Πρόκειται για ολιγονουκλεοτίδια που φέρουν στο ένα άκρο μια φθορίζουσα ουσία (FAM) και στο άλλο άκρο μια ομάδα απορρόφησης φθορισμού κατά αναλογία προς τα ολιγονουκλεοτίδια. Τα δυο άκρα του είναι συμπληρωματικά με αποτέλεσμα τη δημιουργία δομής φουρκέτας που φέρνει κοντά τη φθορίζουσα ουσία και της απορρόφησης, με αποτέλεσμα να μην παράγεται φθορισμός. Αυτό οφείλεται στη διαδικασία μεταφοράς ενέργειας μέσω απορρόφησης φθορισμού, FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) κατά την οποία η ακτινοβολία UV διεγείρει την φθορίζουσα ουσία, η οποία παράγει ενέργεια που απορροφάται από την ουσία απορρόφησης. Μόνο η αλλαγή της στεροδιαμόρφωσης της φουρκέτας οδηγεί στην παραγωγή φωτός. Αυτό επιτυγχάνεται με θέρμανση η οποία διασπά τους δεσμούς υδρογόνου και το τμήμα ευθυγραμμίζεται και γίνεται η ενίσχυση του με την πρόσδεση των εκκινητών. Τώρα η UV διεγείρει την φθορίζουσα ουσία να παράγει φως (Kramer R and Tyagi S, 1996, VetJ.A. and Marras S.A., 2005) (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Τα στάδια της Real-Time RCR με τη χρήση μοριακών φάρων. 1) Το στάδιο της αποδιάταξης όπου οι κλώνοι ανοίγουν. Επίσης αλλαγή της στεροδιαμόρφωσης της δομής φουρκέτας του μοριακού φάρου. 2) Οι εκκινητές και ο μοριακός φάρος συνδέονται με τον κλώνο εκμαγείο μέσω συμπληρωματικότητας των βάσεων στο κατάλληλο τμήμα. 3) Η επιμήκυνση των εκκινητών γίνεται προσθέτοντας νουκλεοτίδια συμπληρωματικά προς τον κλώνο εκμαγείο. Καθώς η προσθήκη βάσεων προχωρά η πολυμεράση συναντά την ομάδα φθορισμού του μοριακού φάρου, την οποία διασπά και παράγεται φως, το οποίο ανιχνεύεται ειδικό μηχανήμα και παρουσιάζεται στον υπολογιστή σαν καμπύλη. Ταυτόχρονα μπορεί να γίνει και υπολογισμός των αντιγράφων που παράγονται που είναι ανάλογα με την αρχική ποσότητα τα μυκοβακτηρίου.

γ) Πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP- PCR)

Η ανακάλυψη μιας ποικιλίας επαναλαμβανόμενων στοιχείων DNA στο γένωμα του *M.tuberculosis* οδήγησε στην ανάπτυξη της τεχνικής αυτής (Eisenach KD et al, 1988). Η μέθοδος χρησιμοποιείται κυρίως για επιδημιολογικές μελέτες και για την διαφοροποίηση κλινικών στελεχών του *M.tuberculosis*. Αναφέρεται σε διαφορές στην περιοχή IS 6110 μεταξύ δύο ή περισσότερων στελεχών του *M.tuberculosis* (Van Embden JDA et al, 1993). Στην ανάλυση RFLP δυο εκκινητές συνδέονται εκατέρωθεν του πολυμορφικού σημείου αναγνώρισης από τα ένζυμα περιορισμού και ξεκινούν την ενίσχυση του. Στην συνέχεια πέπτεται με ένζυμα περιορισμού και τα θραύσματα που προκύπτουν διαχωρίζονται ανάλογα με τα μήκη τους με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

Μια μέθοδος RFLP είναι η IS6110 RFLP, η οποία αναλύει τον πολυμορφισμό στην παρεμβαλλόμενη αλληλουχία 6110 (Insertion Sequence 6110, IS6110). Πρόκειται για μια τυπικά επαναλαμβανόμενη αλληλουχία στα *Mycobacterium tuberculosis complex*. Η IS6110 RFLP έχει υψηλή διακριτική ικανότητα και ευαισθησία και χρησιμοποιείται ευρέως στην μοριακή ταυτοποίηση του (Alito A, Morcillo N et al, 1999, Roring S et al, 1998, Van Soolingen D et al, 1991). Όμως, δεν εφαρμόζεται για την ταυτοποίηση του *M.bovis* επειδή αυτό έχει μια μόνο ή ελάχιστα αντίγραφα του IS6110 (Heersma HF. et al, 1998).

δ) Ηλεκτροφόρηση σε Παλμικό Πεδίο (Pulse-Field Gel Electrophoresis, PFGE)

Η τεχνική εστιάζει στη διαφοροποίηση της γωνίας του ηλεκτρικού πεδίου κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης. Σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιούνται ένζυμα περιορισμού που υδρολύουν το DNA κατά μεγάλα διαστήματα με αποτέλεσμα τη δημιουργία μεγάλων θραυσμάτων χρωμοσωμικού DNA που μπορεί να διαχωριστούν με ειδικές ηλεκτροφορητικές διαδικασίες. Η ενδονουκλεάση περιορισμού διασπά τη διπλή έλικα DNA σε περιορισμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες αναγνώρισης. Ο αριθμός και το μέγεθος των θραυσμάτων που παράγονται από τη διαδικασία πέψης ενός δεδομένου τμήματος DNA επηρεάζονται από την αλληλουχία αναγνώρισης αλλά και από τη σύσταση του DNA. Όταν τα ένζυμα χρησιμοποιηθούν κάτω από άριστες συνθήκες, είναι εξαιρετικά ειδικά και τα παράγωγά τους είναι υψηλής αναπαραγωγιμότητας. Τα θραύσματα που παράγονται από την πέψη διαχωρίζονται

χρησιμοποιώντας ποικίλου τύπου πηκτώματα ηλεκτροφόρησης. Όταν συγκρίνονται τμήματα DNA διαφορετικών στελεχών που έχουν κοπεί με το ίδιο ένζυμο, οι διαφορές στη νουκλεοτιδική αλληλουχία θα προκαλέσουν διαφορές στο μέγεθος και συνεπώς στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα των θραυσμάτων.

Η τεχνική χρησιμοποιήθηκε για τον απευθείας διαχωρισμό βακτηριακών χρωμοσωμάτων στις περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες. Ταυτοποιεί στελέχη των *M. avium* και *M. tuberculosis*. Μειονεκτήματα της μεθόδου είναι η χρονική διάρκεια όλης της διαδικασίας, όπου η προετοιμασία κατάλληλου DNA με τον εγκλεισμό του σε δίσκους αγαρόζης κρατά τρεις ημέρες και ο ακριβός εξοπλισμός.

ε) Ποικίλου Αριθμού Διαδοχικές Επαναλήψεις – Μυκοβακτηριακά Διάσπαρτα Επαναλαμβανόμενα Στοιχεία [Variable Number Tandem Repeat - Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit (VNTR-MIRU)]

Η VNTR είναι μια μέθοδος PCR που αναλύει μικρές διαδοχικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που διανέμονται μεταξύ αρκετών περιοχών στο γένωμα (*Le Flèche P et al, 2002, Van Deutekom et al, 2005*). Το όνομα τους έχει προκύψει από τι γεγονός ότι ο αριθμός τους ποικίλει, από 15-70. Στα μυκοβακτήρια, οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες είναι όμοιες με τους μικροδορυφόρους των ευκαρυωτικών σύμφωνα με τον καθορισμό που έχει γίνει στο γένωμα *M. tuberculosis* H37Rv and *M. bovis* AF2122/976 (*Domenech P et al, 2001*).

Μια VNTR μέθοδος είναι η MIRUs. Τα Μυκοβακτηριακά Διάσπαρτα Επαναλαμβανόμενα Στοιχεία (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit) είναι διασπαρμένα μεταξύ 41 περιοχών στο γένωμα *M. tuberculosis* H37Rv και περιέχουν 51-77 bp επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες. 12 ανεξάρτητες περιοχές από 41 έχουν δείξει πολυμορφισμό και χρησιμοποιούνται για ταυτοποίηση *M. tuberculosis complex* (*Le Flèche P et al, 2002*). Η μέθοδος αυτή ταυτοποίησης έχει δείξει σταθερότητα, επαναληψιμότητα και υψηλή διακρατική ικανότητα (*O'Reilly LM, et al. 1995*).

Η μέθοδος βασίζεται στην πέψη του DNA από μια ενδονουκλεάση περιορισμού η οποία πέπτει εκατέρωθεν του καθενός επαναλαμβανόμενου στοιχείου χωριστά. Το μήκος των τμημάτων DNA που παράγονται μετά από ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζης πηκτή εξαρτάται από τον αριθμό των επαναλήψεων του. Το κόψιμο δίνει ένα χαρακτηριστικό προφίλ για το *M. tuberculosis* και τα διάφορα στελέχη του. Χρησιμοποιείται για επιδημιολογικές και φυλογενετικές διαχωρισμάτων στελεχών *M. tuberculosis*.

10.3.3 QUANTIFERON

Σήμερα στην εργαστηριακή διάγνωση της φυματίωσης έχει προστεθεί η μέτρηση της ιντερφερόνης γ (QuantiFERON-TB Gold), η οποία γίνεται με ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA.

Η εξέταση βασίζεται στο ότι όταν ένα άτομο μολυνθεί με *M.tuberculosis* ενεργοποιείται η κυτταροεξαρτώμενη ανοσία (Cell Mediated Immunity - CMI). Τα CD4+T λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται σε TH1 τα οποία παράγουν την ιντερφερόνη- γ (IFN- γ) στο αίμα. Πρόκειται για μια κυτταροκίνη η οποία ενεργοποιεί τα μακροφάγα για να φαγοκυτταρώσουν και να φονεύσουν τα μυκοβακτήρια (Σωκράτης Ι.Τζάρτος, 2004).

Στη μέθοδο QuantiFERON-TB Gold IT χρησιμοποιείται ένα μίγμα πεπτιδίων (αντιγόνα) που προσομοιώνονται με τις πρωτεΐνες ESAT-6, CFP-10 και TB7.7(p4). Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν διεγείρουν τα κύτταρα από ηπαρινισμένο πλήρες αίμα. Αυτές απουσιάζουν από όλα τα στελέχη BCG και από τα περισσότερα μη-φυματικά μυκοβακτηρίδια με εξαίρεση τα *M.kansasii*, *M.szulgai* και *M.marinum*.

Η διαδικασία αναγνώρισης γίνεται με την παραγωγή και έκκριση της κυτοκίνης ιντερφερόνης- γ . Στο αίμα ενός ασθενούς υπάρχουν αρκετά λεμφοκύτταρα τα οποία μπορούν να παράγουν ιντερφερόνη- γ . Ο εντοπισμός και η ποσοστοποίηση της IFN- γ γίνονται με ELISA.

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα αντιγονικά πεπτίδια που προαναφέρθηκαν προκαλούν αποκρίσεις της IFN- γ σε T κύτταρα ατόμων που έχουν μολυνθεί από *M.tuberculosis* αλλά συνήθως όχι από μη μολυσμένα άτομα ή άτομα εμβολιασμένα με BCG που δεν νοσούν ή που δεν κινδυνεύουν από λανθάνουσα φυματίωση. Ωστόσο, οι ιατρικές θεραπείες ή παθήσεις που εμποδίζουν τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος μπορούν δυνητικά να μειώσουν την απόκριση της IFN- γ . Οι ασθενείς με ορισμένες άλλες μυκοβακτηριακές μολύνσεις πιθανώς να παρουσιάσουν και αυτοί ευαισθησία στα ESAT-6, CFP-10 και TB7.7(p4), επειδή τα γονίδια, επάνω στα οποία βρίσκονται αυτές οι πρωτεΐνες, εμφανίζονται στα *M.kansasii*, *M.szulgai* και *M.marinum*. Ένα θετικό αποτέλεσμα στηρίζει τη διάγνωση φυματίωσης, αλλά οι μολύνσεις από άλλα μυκοβακτήρια (π.χ. *M.kansasii*) μπορούν να επιφέρουν και αυτές θετικό αποτέλεσμα. Απαιτούνται και άλλες ιατρικές και διαγνωστικές εξετάσεις για την επιβεβαίωση ή τον αποκλεισμό της φυματίωσης.

Η μέθοδος QuantiFERON-TB Gold IT χρησιμοποιεί ειδικά φιαλίδια συλλογής αίματος που χρησιμοποιούνται στη λήψη πλήρους αίματος. Τα φιαλίδια είναι τα εξής: με Γκρίζο καπάκι το φιαλίδιο για Control, με Κόκκινο καπάκι για το Αντιγόνο Φυματίωσης και με Μωβ καπάκι για Έλεγχο Μιτογόνου σαν θετικός μάρτυρας. Αυτό ενδείκνυται ειδικά όταν υπάρχει αμφιβολία ως προς την ανοσία του ατόμου και έλεγχος για τον σωστό χειρισμό και τη σωστή επώαση του αίματος. Η διαδικασία γίνεται σε δύο στάδια:

α) Συλλογή αίματος σε κάθε φιαλίδιο. Ακολουθεί επώαση στους 37°C εντός των φιαλιδίων για περίοδο 16 με 24 ωρών και φυγοκεντρώνται και αφαιρείται το πλάσμα, το οποίο μπορεί να διατηρηθεί στους 4°C.

β) Μέτρηση της τιμής της IFN-γ (IU/mL) μέσω ανάλυσης με ELISA (*Nickerson et al, 1990*). Σε επικαλυπτόμενα με αντισώματα πλάκες μικροκυψελίδων γίνεται η ανίχνευση της γ-ιντερφερόνης. Σε συγκεκριμένη περιοχή του αντισώματος συνδέεται ειδικά η γ-ιντερφερόνη, στην οποία συνδέεται ένα ειδικό ένζυμο. Με την προσθήκη ειδικού υποστρώματος παράγεται ένα ορατό σήμα, που δείχνει την ποσότητα αντιγόνου στο δείγμα. Αυτό μπορεί να μετρηθεί με ειδική συσκευή σε κατάλληλο μήκος κύματος.

Οι τιμές της ιντερφερόνης του πλάσματος που συνυπάρχει με τα ειδικά αντιγόνα, υπολογίζεται βάσει της αφαίρεσης της τιμής από την αντίστοιχη τιμή της ιντερφερόνης-γ του αρνητικού μάρτυρα για κάθε άτομο ξεχωριστά. Η οριακή τιμή για το θετικό αποτέλεσμα της δοκιμασίας θεωρείται ≥ 0.35 IU/ml, όπως συστήνεται από τον κατασκευαστή και σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες. Τα αποτελέσματα βγαίνουν με τη βοήθεια ειδικού προγράμματος στον υπολογιστή.

11. ΕΜΒΟΛΙΟ BCG

Το εμβόλιο *Bacillus Calmette-Guérin* (ή *Bacille Calmette-Guérin*, BCG) παρασκευάστηκε από τους *Albert Calmette*, Γάλλος μικροβιολόγος και το συνάδελφό του, *Camille Guérin*, κτηνίατρο, οι οποίοι εργάζονταν στο Ινστιτούτο Pasteur (Lille, Γαλλία) (*Institut Pasteur de Lille*) το 1908. Το εμβόλιο BCG χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στον άνθρωπο το 1921 (*Fine PEM et al. 1999*).

Πρόκειται για ένα εμβόλιο κατά της φυματίωσης που προέρχεται από ζώντα εξασθενημένα στελέχη του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης και συγκεκριμένα από

στελέχη του *Mycobacterium bovis* (Γουργουλιάννης Κ., Μπούρος Δ., 2002). Η παθογένεια του σε ανθρώπους έχει εξασθενήσει μετά από 13 χρόνια επανειλημμένες και συνεχείς ανακαλλιέργειες του στελέχους σε υλικό με εκχύλισμα πατάτας που προστέθηκε σε βόειο χολή (Δημητρακόπουλος Γ.Ο., 1982). Συνολικά έγιναν 231 ανακαλλιέργειες μέχρις ότου αποδειχθεί ότι αυτό το στέλεχος δεν προκαλούσε βλάβες σε πειραματόζωα.

Οδός χορήγησης του είναι η ενδοδερμική και προκαλεί τοπική δερματική αντίδραση. Ο τρόπος δράσης του είναι αδιευκρίνιστος. Το εμβόλιο δεν προφυλάσσει απαραίτητα από τη νόσο αλλά οπωσδήποτε ελαττώνει τη συχνότητα των επιπλοκών της, ιδίως τη φυματιώδη μηνιγγίτιδα και την επέκτασή της σε άλλα όργανα. Η έναρξη εμβολιασμού BCG πρέπει να γίνεται στα παιδιά ηλικίας 6-7 ετών ίσως και νωρίτερα.

Στην καλύτερη περίπτωση, το εμβόλιο BCG είναι 80% αποτελεσματικό στην πρόληψη της φυματίωσης για διάρκεια 15 ετών (Γουργουλιάννης Κ., Μπούρος Δ., 2002).

12. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Από το 1882 που ο Robert Koch ανακάλυψε το *M.tuberculosis* μέχρι το 1940, που ανακαλύφθηκαν τα πρώτα αντιφυματικά φάρμακα και δόθηκε ένα αποφασιστικό πλήγμα στη νόσο, περίπου το 50% των ασθενών πέθαιναν από τη νόσο. Οι ασθενείς εισαγόταν σε σανατόρια για ανάρρωση «ηλιοθεραπεία και καθαρό αέρα ως τρόπο θεραπείας και με καλή διατροφή, με σκοπό την ενίσχυση της άμυνας του οργανισμού για την καταπολέμηση της νόσου. Στα τέλη του 1940 η στρεπτομυκίνη ήταν το φάρμακο που χρησιμοποιήθηκε για την καταπολέμηση της φυματίωσης (Γουργουλιάννης Κ., Μπούρος Δ., 2002).

Η θεραπευτική αγωγή που ακολουθούν οι γιατροί βασίζεται σε αποτελέσματα μελετών από τους οργανισμούς United Health Service (USPHS) και Infectious Diseases Society of America (IDSA). Υπάρχουν αρκετά φάρμακα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την καταπολέμηση της φυματίωσης. Για αυτό το λόγο έχουν καθιερωθεί τέσσερις βασικές θεραπευτικές προσεγγίσεις για τα ευαίσθητα μυκοβακτήρια στις αντιφυματικές ουσίες. Οι τελευταίες είναι η ισονιαζίδη και η ριφαμικίνη. Στα θεραπευτικά σχήματα χορηγούνται σε συνδυασμούς 2 ή και περισσότερα φάρμακα, για να αποφευχθεί η ανθεκτικότητα που μπορεί αναπτύξει το

μυκοβακτήριο της φυματίωσης κατά τη χορήγηση ενός μόνο αντιφυματικού φαρμάκου. Για να θανατωθεί το σύνολο των λοιμογόνων μικροοργανισμών φορέων της νόσου, η θεραπεία πρέπει να συνεχίζεται για 9-18μήνες, ενώ επιβάλλεται η χορήγηση συνδυασμού φαρμάκων. Σφάλματα στη χορηγούμενη θεραπεία ή αδυναμία συμμόρφωσης του ασθενούς στη θεραπεία μπορεί να έχουν καταστροφικές συνέπειες στην ανάδειξη ανθεκτικών μικροοργανισμών (Γουργουλιάννης Κ., Μπούρος Δ., 2002).

12.1 ΙΣΟΝΙΑΖΙΔΗ (ISONICOTINYL HYDRAZINE, INH)

Πρόκειται για μια οργανική ένωση που αποτελεί πρώτης γραμμής φάρμακο κατά της φυματίωσης στη πρόληψη και τη θεραπεία. Είναι συνθετικό φάρμακο (υδραζίνη του ισονικοτινικού οξέος), με βακτηριοκτόνο δράση ενάντια στον βάκιλλο του Koch στις κατάλληλες πυκνότητες.

Ιστορικά

Η ανακάλυψη της έγινε για πρώτη φορά το 1912 (Meyer H). Όμως η δράση της και η αποτελεσματικότητά της κατά της φυματίωσης αναφέρθηκε αρχικά στις αρχές της δεκαετίας του 1950. Τρεις φαρμακευτικές εταιρείες προσπάθησαν ανεπιτυχώς να αποκτήσουν δίπλωμα ευρεσιτεχνίας (Hans L Riede, 2009). Χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στο Sea View Hospital της Νέας Υόρκης το 1951-1952.

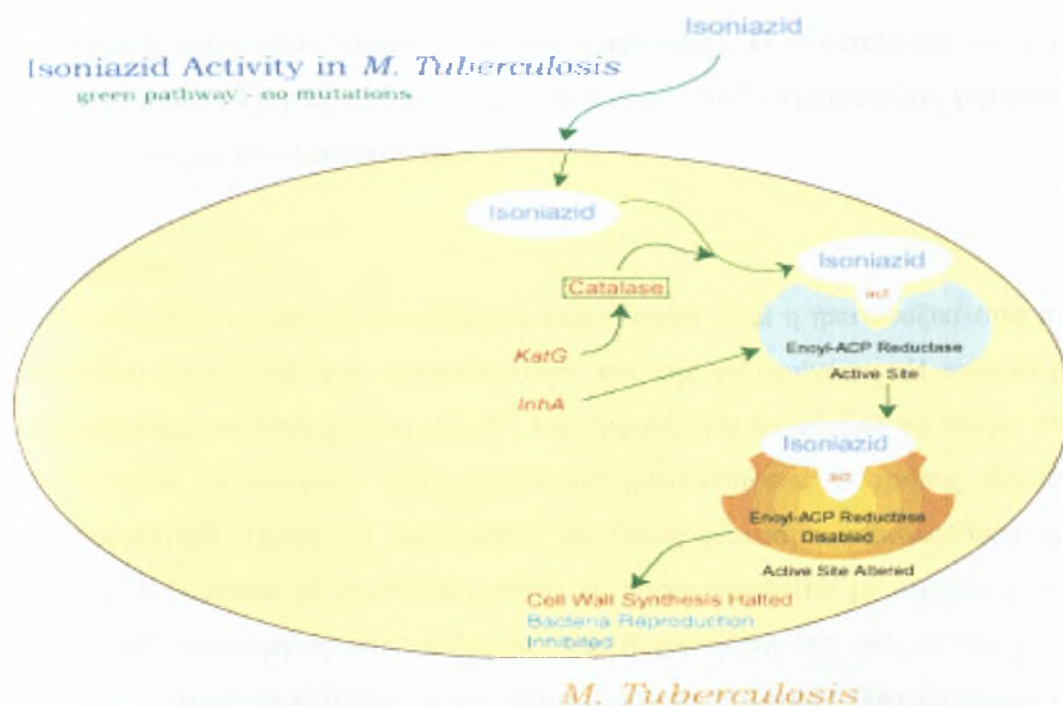
Δράση

Στόχος της είναι η αναστολή της βιοσύνθεσης των μυκολικών οξέων, σημαντικών συστατικών του τοιχώματος των μυκοβακτηρίων. Η αντιμικροβιακή της δράση είναι βακτηριοστατική για βραδέως αναπτυσσόμενα μυκοβακτήρια και βακτηριοκτόνος για ταχέως αναπτυσσόμενα.

Μηχανισμός δράσης

Η ισονιαζιδή είναι ένα προφάρμακο και ενεργοποιείται από το βακτηριακό ένζυμο καταλάση που ονομάζεται KatG (Suarez J. et al. 2009). Αυτό συνδέει το ισονικοτινικό-ακυλο (δηλαδή την ισονιαζιδή) με NADH για να σχηματίσει το σύμπλεγμα ισοτονικό-ακυλο-NADH. Το τελευταίο συνδέεται στενά με την ενυλο-ACP ρεδουκτάση γνωστή ως InhA, εμποδίζοντας έτσι το φυσικό υπόστρωμα να συνδεθεί και σταματώντας τη δράση της συνθάσης λιπαρών οξέων. Αυτή η

διαδικασία αναστέλλει τη σύνθεση μυκολικού οξέος, που απαιτούνται για τα μυκοβακτηριακά κυτταρικά τοιχώματα (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Μηχανισμός δράσης ισονιαζίδης. Το βακτηριακό ένζυμο *katG* ενεργοποιεί την ισονιαζίδη η οποία αλλάζει την δράση του ενζύμου *InhA*, με αποτέλεσμα τη διακοπή της σύνθεσης του τοιχώματος του *M.tuberculosis*.

Μεταβολισμός

Οι θεραπευτικές συγκεντρώσεις φτάνουν στον ορό και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ). Έχει την ιδιότητα να εισβάλλει σ' όλους τους ιστούς και τα υγρά του σώματος, αλλά και ενδοκυττάρια. Επίσης διαχέεται στον πλακούντα, αλλά και στο μητρικό γάλα. Η ισονιαζίδη μεταβολίζεται στο ήπαρ μέσω ακετυλίωσης όπου και αδρανοποιείται, σχηματίζοντας την ακετυλοϊσονιαζίδη και μέσω αφυδραζινοποίησης το ισονικοτινικό οξύ. Υπάρχουν δύο μορφές ένζυμου που ευθύνεται για ακετυλίωση, έτσι ώστε ορισμένοι ασθενείς που μεταβολίζουν το φάρμακο πιο γρήγορα από τους άλλους. Οι μεταβολίτες απεκκρίνονται στα ούρα σε 24 ώρες σε ποσοστό 75-95% της δόσης από το στόμα. Δόσεις συνήθως δεν πρέπει να προσαρμόζονται σε περίπτωση νεφρικής ανεπάρκειας.

Χορήγηση- Δοσολογία

Η κανονική δόση του ισονιαζίδη στους ενήλικες είναι 5 mg/kg/ημέρα (μέγιστο 300mg ημερησίως). Όταν τους χορηγούνται κατά διαστήματα (δύο ή τρεις φορές την εβδομάδα) η δόση είναι 15mg/kg (900mg ημερησίως). Η συνιστώμενη δόση για παιδιά από 8 έως 12 mg/kg/ημέρα (McIlleron H et al., 2009). Η ισονιαζίδη χορηγείται είτε από το στόμα, είτε παρεντερικά.

Παρενέργειες

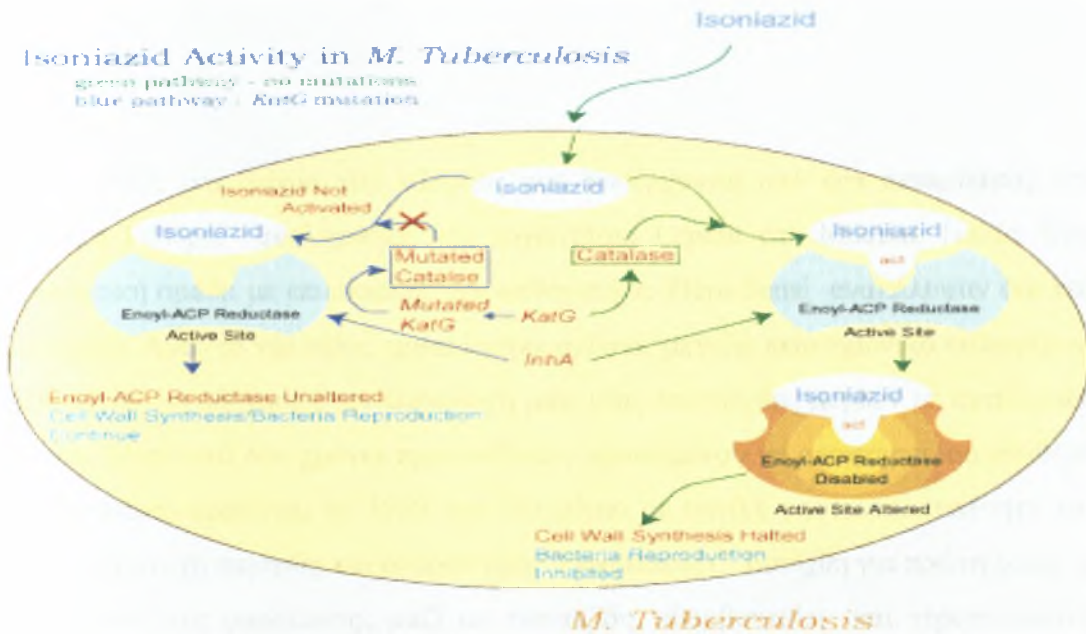
Η πρώτη και πιο σοβαρή ανεπιθύμητη παρενέργεια είναι η ηπατοτοξικότητα που εμφανίζεται με αύξηση των τρανσαμινασών και της χολερυθρίνης. Η πιθανότητα φαρμακευτικής ηπατίτιδας είναι 0,2-5% και εμφανίζεται συχνότερα σε άτομα άνω των 35 ετών με ιστορικό ηπατικής νόσου, χολολιθιάσεως ή χρήσης αλκοόλ. Ηπατοτοξικότητα μπορεί να αποφευχθεί με στενή κλινική παρακολούθηση του ασθενούς. Η θεραπεία με ισονιαζίδη πρέπει να παρακολουθείται με μηνιαίο έλεγχο της ηπατικής λειτουργίας και να διακόπτεται η χορήγησή της, εάν οι τιμές των ηπατικών ενζύμων υπερβαίνουν το πενταπλάσιο του φυσιολογικού (Θεοχαρίδης Θ.Κ., 1997). Ωστόσο, αργή ακετυλίωση μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στο αίμα με χρόνια χορήγηση του φαρμάκου, με αυξημένο κίνδυνο τοξικότητας. Μικρές ποσότητες απεκκρίνονται επίσης στο σάλιο, πτύελα και περιττώματα. Η περιφερική νευρίτιδα και επιδράσεις στο Κ.Ν.Σ. από INH φαίνεται να οφείλεται σε έλλειψη Β6 (πυριδοξίνης). Αλλεργικές αντιδράσεις είναι σπάνιες (4-5%) και γενικά μικρής σημασίας ώστε να μην είναι αναγκαία η διακοπή χορήγησης του φαρμάκου. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνουν εξάνθημα, κνησμός, κνίδωση, αγγειοοίδημα, πυρετός, φαρμακευτικός λύκος και αρθραλγίες ή ρευματοειδές σύνδρομο που φυσικά αποτελούν αιτίες διακοπής χορήγησης του φαρμάκου. Επίσης, πονοκέφαλος, χαμηλή συγκέντρωση, κακή μνήμη και κατάθλιψη. Όλοι οι ασθενείς θα πρέπει να γνωρίζουν αυτές τις σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες, ιδιαίτερα αν έχουν τάσεις αυτοκτονίας (Alao AO et al., 1998, Pallone KA et al., 1993).

Αντοχή στην ισονιαζίδη

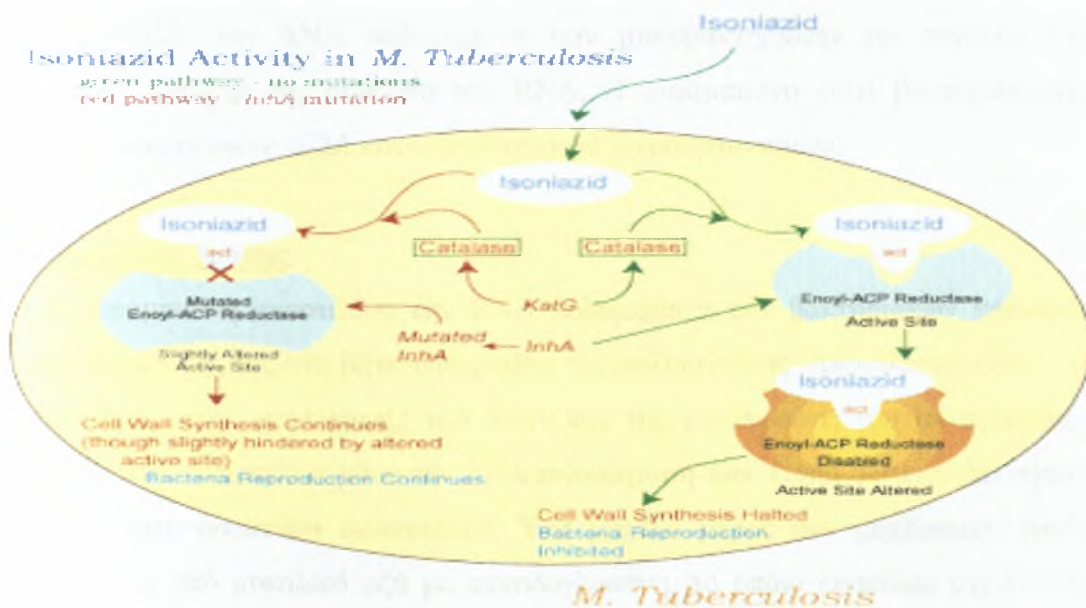
Φαίνεται ότι φυσικά μεταλλαγμένα μυκοβακτηρίδια έχουν γενετικά καθορισθεί να είναι ανθεκτικά στην ισονιαζίδη. Η μετάλλαξη αφορά το γονίδιο *inhA* ή το γονίδιο *katG* που εμπλέκεται στην βιοσύνθεση των μυκολικών οξέων. Ο μηχανισμός των

μεταλλαγμένων γονιδίων παρουσιάζεται στις εικόνες 8 και 9 για τα *katG* και *inhA* αντίστοιχα.

Αναπτύσσει γρήγορα αντοχή γι' αυτό δεν χρησιμοποιείται ποτέ μόνη της για τη θεραπεία της ενεργού φυματίωσης. Από ένα πληθυσμό βακίλων της φυματίωσης περίπου $1/10^7$ είναι φυσικά ανθεκτικοί στην ισονιαζίδη.



Εικόνα 8. Μηχανισμός δράσης του μεταλλαγμένου γονιδίου *katG*. Η καταλάση δεν μπορεί να ενεργοποιήσει την ισονιαζίδη.



Εικόνα 9. Μηχανισμός δράσης του μεταλλαγμένου γονιδίου *inhA*. Η ρεδοκτάση δεν αναγνωρίζει την ισονιαζίδη και έτσι συνεχίζεται η σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος.

12.2 ΡΙΦΑΜΠΙΚΙΝΗ (RIF)

Η ριφαμπικίνη ένα ημισυνθετικό προϊόν και αναστέλλει τη σύνθεση RNA των βακτηρίων με αποτέλεσμα να οδηγεί στην αναστολή της μεταγραφής (*Wehri W et al., 1968*). Είναι ένα βακτηριοκτόνο αντιβιοτικό, ημισυνθετικό προϊόν της ριφαμυκίνης Β που προέρχεται από τον *Streptomyces mediterranei* (*Sensi P et al., 1959*).

Ιστορία

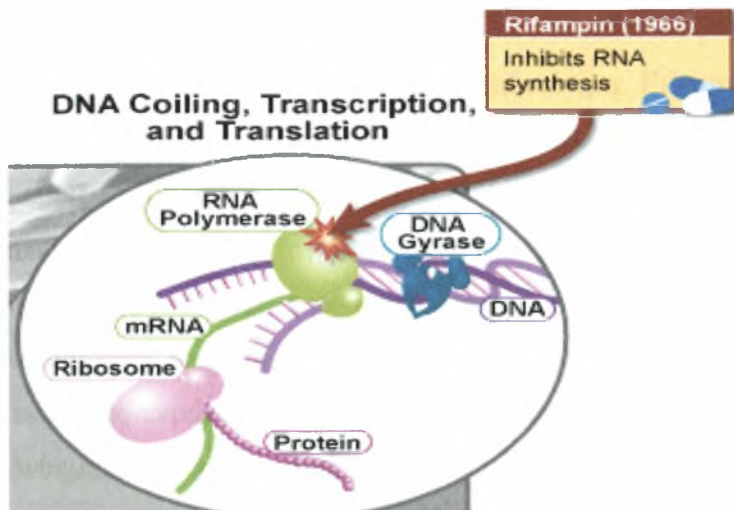
Το 1957, ένα δείγμα του εδάφους που προέρχονται από ένα πευκοδάσος στη γαλλική Ριβιέρα, αναλήφθηκε στο εργαστήριο Lepetit στο Μιλάνο, Ιταλία. Μια ερευνητική ομάδα με επικεφαλής τον καθηγητή κ. Piero Sensi ανακάλυψαν ένα νέο βακτήριο. Αυτό το νέο είδος εμφανίστηκε αμέσως μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον, δεδομένου ότι οδήγησε στην παραγωγή μιας νέας κατηγορίας μορίων με αντιβιοτική δράση. Μετά από δύο χρόνια προσπαθειών, προκειμένου να αποκτήσει πιο σταθερή ημισυνθετικά προϊόντα, το 1959 ένα νέο μόριο με υψηλή αποτελεσματικότητα και την καλή ανοχή παρήχθη και ονομάστηκε "Ριφαμπικίνη". Εισήχθη για πρώτη φορά το 1967, κατά της φυματίωσης μαζί με ισονιαζίδη, εθαμβουτόλη και στρεπτομυκίνη (*Long, James W., 1991*).

Δράση

Αναστέλλει την RNA πολυμεράση των μυκοβακτηριδίων με συνέπεια την αναστολή έναρξης της σύνθεσης του RNA. Η ριφαμπικίνη είναι βακτηριοκτόνος έναντι έξωκυττάρων αλλά και ενδοκυττάρων μικροοργανισμών.

Μηχανισμός δράσης

Η ριφαμπικίνη αναστέλλει την RNA πολυμεράση των βακτηριακών κύτταρων μέσω δέσμευσης της στη βήτα-υπομονάδα της πολυμεράσης. Αποτέλεσμα είναι το σταμάτημα της μεταγραφής του RNA και της μετάφρασης του σε πρωτεΐνες. (**Εικόνα 10**). Αναστέλλει μόνο την RNA πολυμεράση των Gram-θετικών βακτηρίων και του *Mycobacterium tuberculosis*. Ένα μεγάλο μέρος των μεμβρανών αυτών αποτελείται από μυκολικό οξύ με πεπτιδογλυκάνη, το οποίο επιτρέπει την εύκολη διακίνηση των ουσιών στο κύτταρο.



Εικόνα 10. Μηχανισμός δράσης της ριφαμπικίνης.

Χορήγηση- Δοσολογία

Η κανονική δόση της ριφαμπικίνης στους ενήλικες είναι 10 mg/kg/ημέρα. Η μέγιστη δόση είναι 300 mg καθημερινά. Θα πρέπει να χορηγείται τακτικά για πολλούς μήνες χωρίς διακοπή, αλλιώς ο κίνδυνος των ανθεκτικών μυκοβακτηρίων είναι πολύ αυξημένος (Long, James W., 1991). Αυτός είναι ο κύριος λόγος που χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τα τρία προαναφερθέντα φάρμακα, ιδιαίτερα ισονιαζίδη (Erlich et al., 1973).

Μεταβολισμός

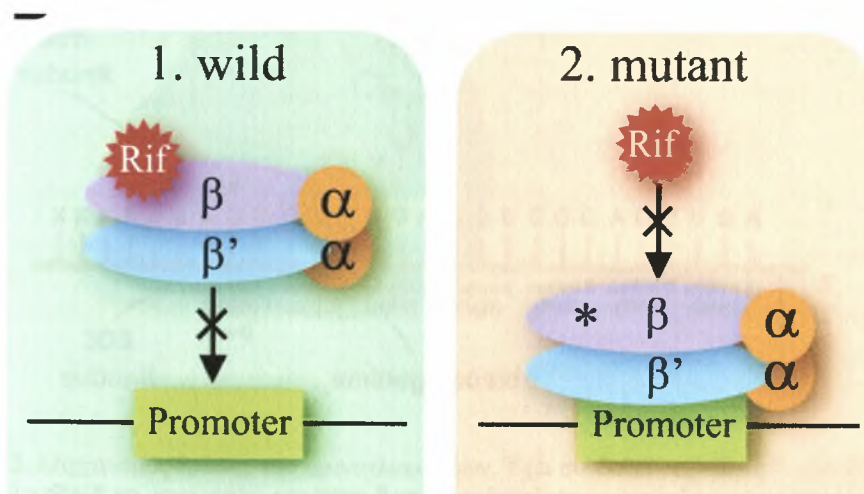
Απορροφάται ικανοποιητικά όταν χορηγείται per os. Η RIF μεταβολίζεται στο ήπαρ μέσω ακετυλίωσης. Η ίδια και ο αποακετυλιωμένος ενεργός μεταβολίτης της απεκκρίνονται στη χολή. Στο έντερο επαναροφάται μόνο η ίδια και επαναλαμβάνει αυτόν τον εντεροηπατικό κύκλο. Μ' αυτόν τον τρόπο το 60% αποβάλλεται στα κόπρανα ενώ το 30% στα ούρα. Η λήψη τροφής μειώνει την επαναρρόφηση του φαρμάκου από το πεπτικό. Σημειωτέον ότι τα ούρα, τα κόπρανα, τα δάκρυα, προσλαμβάνουν έντονο πορτοκαλί χρώμα (Θεοχαρίδης Θ.Κ., 1997). Συνδέεται σε ποσοστό 60% έως 90% με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, διαχέεται δε σε όλους τους ιστούς και τα υγρά του οργανισμού σε υψηλές συγκεντρώσεις (Hardman, Joel G., et al., 2001). Φθάνει το υψηλότερό της επίπεδο στο πλάσμα μέσα σε τρεις ώρες. Επίσης, περνά τον πλακούντα και απεκκρίνεται στο μητρικό γάλα. Δεν περνά φυσιολογικά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό ενώ επί φλεγμονής διέρχεται τις μήνιγγες και εμφανίζει συγκέντρωση στο ΕΝΥ (≈4% εκείνης του πλάσματος).

Παρενέργειες

Η πιο σοβαρή αρνητική επίπτωση είναι ηπατοτοξικότητα. Γι' αυτό, οι ασθενείς που λαμβάνουν ριφαμπικίνη συχνά υποβάλλονται σε αρχική και σε συχνές δοκιμασίες ηπατικής λειτουργίας για την ανίχνευση ηπατικής βλάβης. Γίνεται έλεγχος του επιπέδου των τρανσαμινασών, της αλκαλικής φωσφατάσης και της χολερυθρίνης. Επίσης, μπορεί να προκαλέσει μια σειρά από ανεπιθύμητες ενέργειες όταν λαμβάνονται ταυτόχρονα με άλλα φάρμακα (Collins, et al., 1985). Οι πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνουν πυρετό, γαστρεντερικές διαταραχές, ναυτία, νεφρίτιδας, εξάνθημα, και ανοσολογικές αντιδράσεις. Επίσης, εκκρίνεται στο μητρικό γάλα, γι' αυτό ο θηλασμός θα πρέπει να αποφεύγεται. Προσδίδει πορτοκαλί χροιά στις εκκρίσεις του οργανισμού (ούρα), γεγονός το οποίο αν και μπορεί προκαλέσει ανησυχία στους ασθενείς, δε σχετίζεται με μια νοσηρή κατάσταση.

Αντοχή στην ριφαμπικίνη

Ριφαμπικίνη ανθεκτικών βακτηρίων παραγωγή του RNA με ελαφρά διαφορετική β υπομονάδα δομές οι οποίες δεν μπορούν εύκολα να αναστέλλεται από το φάρμακο (O'Sullivan DM, et al., 2005). Η μετάλλαξη αφορά το γονίδιο *rpoB* που εμπλέκεται στην βιοσύνθεση των μυκολικών οξέων (Εικόνα 11).



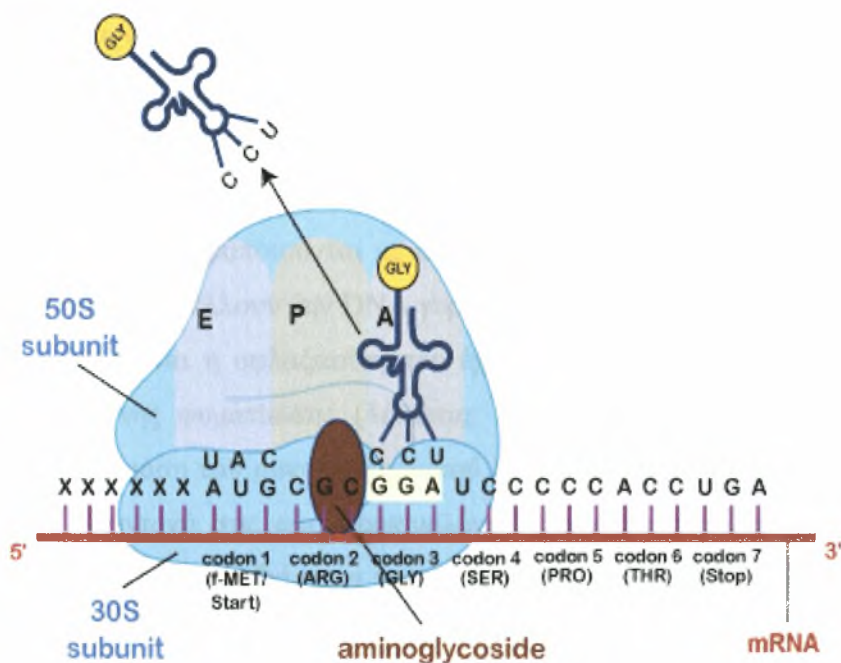
Εικόνα 11. Μηχανισμός δράσης της ριφαμπικίνης σε *M.tuberculosis* με άγριου τύπου RNA πολυμεράση (1) και με μεταλλαγμένου τύπου RNA πολυμεράσης (2).

12.3 ΛΟΙΠΑ ΑΝΤΙΦΥΜΑΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

Η **στρεπτομυκίνη** ήταν το πρώτο αποτελεσματικό φάρμακο για τη θεραπεία της φυματίωσης και ανακαλύφθηκε από το Waksman το 1944. Οι θάνατοι μειώθηκαν κατά 50%. Ήταν το μόνο διαθέσιμο φάρμακο έως το 1952.

Ανήκει στις αμινογλυκοσίδες οι οποίες αποτελούνται από μία ομάδα σακχάρων και μια αμινο-ομάδα. Βέβαια, ο ρόλος των αμινογλυκοσιδών έχει μειωθεί, λόγω της τοξικότητάς τους και την ανθεκτικότητα πολλών στελεχών.

Η δράση της στρεπτομυκίνης είναι να προσδένονται μη αντιστρεπτά στην υπομονάδα 30S του ριβοσωματικού RNA του μυκοβακτηρίου, εμποδίζοντας την μεταφορά του πεπτιδυλο-tRNA από τη θέση P στην θέση A. Η τελευταία δεν εκκενώνεται και αποτρέποντας έτσι τη συνεχή επιμήκυνση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (Lewin, 2004).



Εικόνα 12. Μηχανισμός δράσης των αμινογλυκοσίδων. Έχει συνδεθεί στην θέση P εμποδίζοντας το πεπτιδυλο-tRNA να μεταφερθεί στη θέση P και έτσι διακόπτεται η σύνθεση του πεπτιδίου.

Δεν απορροφούνται από το πεπτικό σύστημα γι' αυτό χορηγείται παρεντερικά και ενδομυϊκά. Οι σπουδαιότερες παρενέργειες είναι η ωτοτοξικότητα και η νεφροτοξικότητα (ακουστική και αιθουσαία). Οι δυο κυριότεροι μηχανισμοί της

βακτηριακής αντοχής είναι: (1) η μειωμένη βακτηριακή διαπερατότητα που οφείλεται σε μεταβολές της βακτηριακής κυτταρικής μεμβράνης και (2) η παραγωγή διαφόρων ενζύμων που αδρανοποιούν τις αμινογλυκοσίδες. Τα ένζυμα που τις αδρανοποιούν είναι υδρολυτικά και προσθέτουν σε αυτές ειδικές ομάδες οι οποίες είναι ανίκανες να φτάσουν στα βακτηριακά ριβοσώματα.

Η **εθαμβουτόλη** είναι ένα συνθετικό αντιφυματικό φάρμακο και βακτηριοστατικό κατά των μυκοβακτηρίων που προβλέπονται για τη θεραπεία της φυματίωσης. Δρα στους πολλαπλασιαζόμενους βακίλλους, παρεμποδίζοντας το σχηματισμό του κυτταρικού τοιχώματος. Η δόση καθορίζεται από το σωματικό βάρος του ασθενούς. 1mg/kg αποτελεί τη μέγιστη δοσολογία ανεξάρτητα του σωματικού βάρους. Χορηγείται συνήθως σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα φυματίωση, όπως ισονιαζίδη, ριφαμπικίνη και πυραζιναμίδη. Μεγάλη σημασία έχει σε συνδυασμό με INH και RIF στη θεραπεία της φυματίωσης τόσο σε άτομα με προδιαθεσικούς παράγοντες για ηπατοτοξικότητα, όσο και σε περιπτώσεις όπου οι μικροβιακοί πληθυσμοί δεν είναι εξαιρετικά μεγάλοι.

Ανθεκτικότητα στην εθαμβουτόλη τα μυκοβακτηρία μπορεί να αναπτύξουν σε σύντομο χρονικό διάστημα. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *embB* μπορούν να οδηγήσουν σε ανθεκτικότητα του *M.tuberculosis* στην εθαμβουτόλη (Ashok Rattan et al, 1998).

Τέλος, οι **φλουοροκινολόνες** είναι μια οικογένεια συνθετικών αντιβιοτικών ευρέος φάσματος. Χρησιμοποιούνται με αποτελεσματικότητα κατά της φυματίωσης και συγκεκριμένα αναστέλλουν την DNA γυράση των μυκοβακτηρίων. Η πιο γνωστή φλουοροκινολόνη είναι η οφλαξασίνη που έχει ανασταλτικές ιδιότητες έναντι του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης (Μπάστας κ.αλ., 1997). Οι φλουοροκινολόνες αναστέλλουν τη γυράση του μυκοβακτηριακού DNA και έχει βακτηριοκτόνο δράση (Page, 2000). Η αντοχή στις φλουοροκινολόνες μπορεί να εξελίσσονται με ταχείς ρυθμούς ακόμη και κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *gyrA* μπορεί να οδηγήσουν σε ανθεκτικότητα του *M.tuberculosis* στις φλουοροκινολόνες.

Ειδικό Μέρος

1. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η εφαρμογή μοριακών μεθόδων στην διάγνωση της φυματίωσης τόσο στη ταυτοποίηση του μικροοργανισμού σε επίπεδο γένους και είδους όσο και στην ανίχνευση γονιδίων αντοχής σε διάφορα αντιφυματικά φάρμακα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν κλινικά δείγματα ασθενών με υποψία φυματίωσης από την περιοχή Θεσσαλίας.

Συγκεκριμένα, οι στόχοι ήταν οι εξής:

1. Απομόνωση και καλλιέργεια για παρουσία μυκοβακτηριδίου σε κλινικά δείγματα.
2. Ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων σε επίπεδο γένους και είδους.
3. Ταυτοποίηση του *M.tuberculosis complex* στα διάφορα είδη.
4. Ανίχνευση γονιδίων αντοχής των *M.tuberculosis complex* στα δυο κύρια αντιφυματικά φάρμακα (ριφαμπικίνη και ισονιαζίδη) και σύγκριση με τα αποτελέσματα του κλασσικού αντιβιογράμματος.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκαν κλινικά δείγματα που συγκεντρώθηκαν τα έτη 2008-2009 από ασθενείς του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (ΠΓΝΛ). Από αυτή την πολυκλινική μελέτη τελικά στα 97 δείγματα των ασθενών διαγνώστηκε πνευμονική και εξωπνευμονική φυματίωση μέσω απομόνωσης σε καλλιέργεια και μοριακής ταυτοποίησης του *M.tuberculosis complex*.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η μοριακή μέθοδος η οποία χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη ήταν ένας συνδυασμός αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και υβριδισμού. Ο συνδυασμός PCR και υβριδισμού επιλέχτηκε διότι με τη τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης έχουμε μεγαλύτερη αναισθησία ενώ με τον υβριδισμό μεγαλύτερη ειδικότητα.

2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Γενικά

Τα περισσότερα κλινικά δείγματα που αποστέλλονται στο εργαστήριο για πιθανή διάγνωση φυματίωσης προέρχονται κυρίως από ασθενείς με πνευμονική φυματίωση με αποτέλεσμα να είναι κυρίως πτύελα και βρογχικές εκκρίσεις. Αυτά τα βιολογικά υλικά έχουν αρκετή βλέννη πράγμα το οποίο σημαίνει ότι έχουν υψηλό ιξώδες και μειωμένη ρευστότητα. Επακόλουθο αυτού είναι η απαραίτητη αρχική επεξεργασία αυτών ώστε να γίνουν ρευστά και κατάλληλα για τα επόμενα βήματα. Η επεξεργασία αυτή ονομάζεται ρευστοποίηση και γίνεται τόσο για την καλλιέργεια σε ειδικά καλλιεργητικά υγρά όσο και για τη μοριακή διάγνωση.

Υλικά

Για την ρευστοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε Πρωτεΐνωση K της εταιρείας Sigma-Aldrich (USA) και υδατόλουτρο της BIOLine scientific (Greece). Για την επεξεργασία των υγρών δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε φυγόκεντρος Mini Spin

της εταιρεία Eppendorf. Απαραίτητα υλικά επίσης ήταν τα εξής: eppendorf, πιπέτες (Gilson), ακροφύσια (Gilson).

Αρχή μεθόδου

Η πρωτεΐνάση K είναι ένα ένζυμο πέψης και μέλος της οικογένειας των σερινοπρωτεασών, διότι κρίσιμο ρόλο στην κατάλυση παίζει η δραστική σερίνη 195. Η δραστηρότητα της αυξάνεται σε υψηλές θερμοκρασίες έως 65°C (Lubert S., 1997).

Πειραματική Διαδικασία

Τα κλινικά δείγματα τα οποία είναι παχύρρευστα, έχουν πήγματα ή είναι αιματηρά, όπως γαστρικό, πτύελα, βρογχικές εκκρίσεις υφίστανται ρευστοποίηση με Proteinase K και επώαση σε υδατόλουτρο στους 56°C για ένα 24ωρο μέχρι την πλήρη διαλυτοποίησή τους. Ενδιάμεσα ανακίνηση του δείγματος με vortex που βοηθάει την ρευστοποίηση.

Τα υγρά δείγματα όπως ούρα, πλευριτικό, αρθρικό φυγοκεντρούνται στις 13.000rpm για το 10min και λαμβάνεται του υπερκείμενο, για την απομόνωση από το ίζημα.

2.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA

Γενικά

Το DNA είναι το γενετικό υλικό όλων των μικροοργανισμών και σε αυτό βασίζονται οι μοριακές τεχνικές. Η απομόνωση του σε καθαρή μορφή και χωρίς άλλες ουσίες είναι προϋπόθεση για κάθε επόμενη διαδικασία για την αποφυγή ουσιών που αναστέλλουν την δράση της DNA πολυμεράσης και οδηγούν σε μερική ή καθόλου ενίσχυση του προϊόντος. Οι διαδικασίες απομόνωσης ποικίλουν ανάλογα με το είδος του προϊόντος.

Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της εταιρείας Precision System Science Co., Ltd. Απαραίτητα υλικά επίσης ήταν τα εξής: eppendorf, πιπέτες (Gilson), ακροφύσια (Gilson).

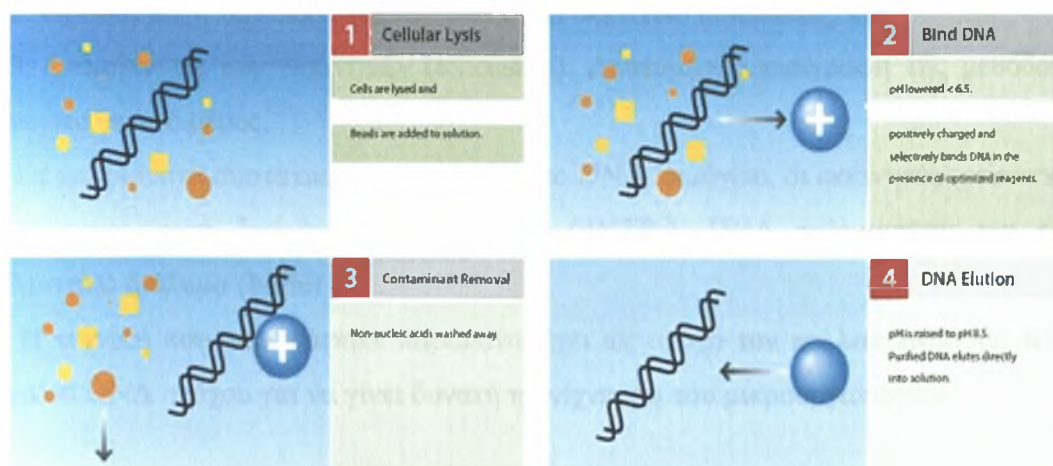
Αργή μεθόδου

Το DNA βρίσκεται στο εσωτερικό των κυττάρων. Για να μπορέσει να απομονωθεί είναι απαραίτητο να διασπαστούν οι κυτταρικές μεμβράνες και οι μεμβράνες των υποκυτταρικών οργανιδίων όπως ο πυρήνας, απελευθερώνοντας το σε διαλυτή μορφή. Σημαντικό βήμα είναι η απομόνωση του από τα άλλα μακρομόρια, όπως RNA και πρωτεΐνες. Στην παρούσα μελέτη η απομόνωση βασίζεται στο αρνητικό φορτισμένο DNA και στην τεχνολογία των μαγνητικών σφαιρών, οι οποίες είναι θετικά φορτισμένες και προσροφούν το DNA.

Πειραματική Διαδικασία

Για την εκχύλιση του DNA είτε από κλινικά δείγματα είτε από στελέχη μικροβίων χρησιμοποιήθηκε το αυτόματο σύστημα Magtration System 12GC και MegaZorb DNA Common Kit-200N (Εικόνα 13). Συγκεκριμένα το τελευταίο πραγματοποιεί την εξής διαδικασία (Εικόνα 14):

1. Απελευθέρωση του DNA σε διαλυτή μορφή,
2. Προσθήκη μαγνητικών σφαιρών οι οποίες αποτελούνται από θετικά φορτισμένο υλικό και σχηματίζουν ιονικό δεσμό με το αρνητικό φορτίο του DNA.
3. Πλύσεις με ειδικά διαλύματα για να απομακρυνθούν τα υπόλοιπα μακρομόρια,
4. Τέλος σε καθαρό erpendorf εκλούεται το DNA με μείωση του pH μέσω προσθήκης ειδικού αντιδραστηρίου.



Εικόνα 13. Η βασική αρχή και τα βήματα για την απομόνωση του DNA του *M.tuberculosis*. 1) Λύση των κυττάρων 2) Πρόσδεση του DNA στις μαγνητικές σφαίρες, 3) Απομάκρυνση των υπολοίπων μακρομορίων με την πλύση, 4) Έκλυση του DNA.



Εικόνα 14. Εκχύλιση του DNA. Στην εικόνα απεικονίζονται τα βήματα με την ακριβή σειρά πραγματοποιούνται στο αυτόματο σύστημα Magtration 12GC.

2.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Γενικά

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια διαδικασία που έχει ως στόχο την ενίσχυση του τμήματος DNA που θέλουμε να ανιχνεύσουμε. Το μέγεθος του τμήματος που ενισχύουμε συνήθως είναι περίπου 10kb αν και υπάρχουν εναλλακτικές μορφές PCR που ενισχύουν μέχρι 40kb. Η ενίσχυση του τμήματος επιτυγχάνεται σε 30 μέχρι 40 κύκλους εναλλασσόμενων θερμοκρασιών. Ένας πλήρης κύκλος περιλαμβάνει τρία στάδια:

1. Αποδιάταξη του DNA (denaturation)
2. Προσαρμογή των εκκινητήρων στο DNA εκμαγείο (annealing) και
3. Επιμήκυνση των εκκινητών (extension). Λεπτομερής περιγραφή της μεθόδου έγινε στο γενικό μέρος.

Τα απαραίτητα συστατικά της PCR είναι το DNA εκμάγειο, οι εκκινητές (primers), τα τριφωσφορικά δεσοξυριβονοκλεοτίδια (dNTPs), DNA πολυμεράση και το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer).

Η τεχνική που περιγράφηκε παραπάνω έχει ως στόχο τον πολλαπλασιασμό του αρχικού DNA στόχου για να γίνει δυνατή η ανίχνευση του μικροοργανισμού.

Υλικά

Για την PCR των CM, MTBC και MTBDRplus χρησιμοποιήθηκαν Taq DNA πολυμεράση 1u/μl, 10X Taq Buffer με KCl και MgCl₂ 25mM της εταιρείας

Fermentas. Επίσης χρησιμοποιήθηκε WFI (Water For Injection, Στείρος, ελεύθερος ενδοτοξίνης διαλύτης) της εταιρείας Demos S.A. (Greece).

Οι εκκινητές (PNM – Primer Nucleotide Mix) ήταν όλοι της εταιρείας HAIN και ήταν οι εξής:

- i. PNM CM: εκκινητές για την ανίχνευση των μυκοβακτηρίων *M.avium spp.*, *M.chelonae*, *M.abscessus*, *M.fortuitum*, *M.gordonae*, *M.intracellulare*, *M.scrofulaceum*, *M.interjectum*, *M.kansasii*, *M.malmoense*, *M.peregrinum*, *M.marinum/M.ulcerans*, *M.tuberculosis complex* και *M.xenopi*,
- ii. PNM MTBC: εκκινητές για την ανίχνευση του κάθε είδους
- iii. PNM MTBDRplus: εκκινητές για την ανίχνευση μεταλλάξεων των γονιδίων *rpoB*, *kaiG* και *inhA* που σχετίζονται με αντοχή σε ριφαμπικίνη και ισονιαζίδη.

Ο θερμικός κυκλοποιητής ήταν ο DNA Engine Peltier Thermal Cycler της εταιρείας BIO-RAD. Σε συσκευή καθέτου νηματικής ροής κλάσης II έγινε η προετοιμασία της PCR. Απαραίτητα υλικά επίσης ήταν τα εξής: erpendorf, πιπέτες (Gilson), ακροφύσια (Gilson).

Αρχή Μεθόδου

Η παρούσα μελέτη βασίζεται σε multiplex PCR, η οποία περιγράφηκε πρώτη φορά το 1988 από τους Chamberlain *et al.* Πρόκειται για μια παραλλαγή της PCR, με την οποία επιτυγχάνεται η ταυτόχρονη ενίσχυση πολλών περιοχών. Γι' αυτό το σκοπό χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα σε μια αντίδραση περισσότερα από ένα ζευγάρια εκκινητών.

✓ PCR CM

Η multiplex PCR CM μπορεί να ανιχνεύσει τα ακόλουθα είδη κοινών μυκοβακτηρίων: *M.avium spp.*, *M.chelonae*, *M.abscessus*, *M.fortuitum*, *M.gordonae*, *M.intracellulare*, *M.scrofulaceum*, *M.interjectum*, *M.kansasii*, *M.malmoense*, *M.peregrinum*, *M.marinum/M. ulcerans*, *M.tuberculosis complex* και *M.xenopi*. Στην παρούσα μελέτη σκοπός είναι η εύρεση των κλινικών δειγμάτων που περιέχουν *M.tuberculosis complex*.

✓ PCR MTBC

Η multiplex PCR MTBC μπορεί να ανιχνεύσει τα ακόλουθα είδη μυκοβακτηριδίων της φυματώσεως: *M.africanum*, *M.bovis BCG*, *M.bovis ssp. bovis*, *M.bovis ssp. caprae*, *M.microti* και *M.tuberculosis/M. canettii*.

✓ PCR MTBDRplus

Η multiplex PCR MTBDRplus μπορεί να ανιχνεύσει ευαισθησία ή αντοχή των μυκοβακτηριδίων της φυματίωσης στην ριφαμπικίνη και την ισονιαζίδη.

Όπως προαναφέρθηκε στο γενικό μέρος στον μηχανισμό δράσης, η ισονιαζίδη δρα ενεργοποιώντας την καταλάση και συνδέεται με την ενυλο-ACP ρεδουκτάση γι' αυτό μεταλλάξεις στα γονίδια *katG* και *inhA* αντίστοιχα επιβεβαιώνουν αντοχή σε αυτή. Η διαφορά που υπάρχει ανάμεσα στα δυο γονίδια είναι ότι όταν υπάρχει μετάλλαξη στο γονίδιο *inhA* η αντοχή στην ισονιαζίδη είναι χαμηλού επιπέδου, ενώ στο γονίδιο *katG* είναι υψηλού επιπέδου.

Όσον αφορά την ριφαμπικίνη όπως προαναφέρθηκε στο γενικό μέρος δρα και αναστέλλει την RNA πολυμεράση των βακτηριακών κύτταρων μέσω δέσμευσης της στη βήτα-υπομονάδα της πολυμεράσης και άρα μεταλλάξεις στο γονίδιο *rpoB* επιβεβαιώνουν αντοχή σε αυτή.

Πειραματική διαδικασία

Στη συσκευή καθέτου νηματικής ροής κλάσης II για να αποφευχθούν οι μολύνσεις, προετοιμάστηκε το master mix για κάθε δείγμα σε 45μl. Από το εκχυλισμένο DNA κάθε δείγματος λαμβάνονται 5 μl για ενζυμική ενίσχυση σε τελικό όγκο 50 μl. Το master mix για κάθε δείγμα αποτελείται από τα εξής αντιδραστήρια (**Πίνακας 1**):

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Ποσότητα σε μl</i>
PNM	35 μl
10X Taq Buffer	5 μl
MgCl ₂ 25mM	3 μl
Taq DNA πολυμεράση	0.4 μl
H ₂ O (WFI)	1.6 μl
Τελικός Όγκος	45 μl

Πίνακας 1. Η σύσταση του κάθε αντιδραστηρίου για το master mix του εκάστοτε δείγματος.

Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται δύο επιπλέον δείγματα-μάρτυρες (controls), ο αρνητικός και ο θετικός μάρτυρας οι οποίοι περιέχουν όλα τα υλικά της PCR εκτός του εκχυλισμένου DNA. Αντί του τελευταίου στον αρνητικό μάρτυρα λαμβάνονται 5μl WFI με σκοπό τον έλεγχο πιθανής επιμόλυνσης της αντίδρασης κατά την

προετοιμασία. Στον θετικό μάρτυρα λαμβάνονται 5μl ενός παλιότερου θετικού δείγματος για σύγκριση του με πιθανό θετικό δείγμα με σκοπό την πιστοποίηση του θετικού δείγματος και ταυτόχρονα ως ένδειξη της σωστής ενίσχυσης του τμήματος που μας ενδιαφέρει από το *M.tuberculosis*. Η αντίδραση επωάζεται σε κατάλληλο πρόγραμμα (που έχει το όνομα MYCO από τη λέξη Mycobacterium) του κυκλοποιητή.

Ενίσχυση τμήματος γονιδίων

Για την ενίσχυση του τμήματος χρησιμοποιήθηκαν πολλαπλοί εκκινητές σημασμένοι με βιοτίνη που διατίθενται με το εμπορικό kit από την εταιρεία Hain. Κάθε φορά ενισχύουν χαρακτηριστικές περιοχές ανάλογα με το στόχο, δηλαδή **α)** πολλαπλοί εκκινητές **CM** για το κάθε είδος μυκοβακτηριδίου, **β)** πολλαπλοί εκκινητές **MTBC** για κάθε είδος του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης, **γ)** πολλαπλοί εκκινητές **MTBDRplus** για τα γονίδια *rpoB*, *katG* και *inhA*.

Η ενίσχυση του τμήματος πραγματοποιήθηκε σε εξής πρόγραμμα (Πίνακας 2):

ΣΤΑΔΙΟ	ΧΡΟΝΟΣ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΚΥΚΛΟΙ
Αρχική αποδιάταξη	15 min	95°C	1
Μετουσίωση	30 sec	95°C	10
Υβριδισμός	2 min	58°C	
Μετουσίωση	25 sec	95°C	20
Υβριδισμός	40 sec	53°C	
Επιμήκυνση	40 sec	70°C	
Τελική επιμήκυνση	8 min	70°C	1

Πίνακας 2. Το πρόγραμμα της PCR για τα μυκοβακτήρια.

Τα προϊόντα της PCR αποθηκεύονται στους +40 °C μέχρι -20 °C.

2.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA

Γενικά

Ηλεκτροφόρηση ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο ένα μόριο με καθαρό φορτίο θα μετακινηθεί σ' ένα ηλεκτρικό πεδίο και το παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το 1807 από Reuss (*Reuss, 1809*). Μόρια πρωτεϊνών ή νουκλεϊκών οξέων τα οποία διαφέρουν ως προς το μέγεθος, το ηλεκτρικό φορτίου και το σχήμα κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες μέσα σ' ένα ηλεκτρικό πεδίο και έτσι μπορούν να διαχωριστούν διατηρώντας τις βιολογικές ιδιότητες τους. Πρόκειται για μια απλή, γρήγορη και ικανή να διαχωρίζει μίγματα τμημάτων DNA που δεν μπορούν να διαχωριστούν με άλλες τεχνικές. Η επιλογή του πηκτώματος βασίζεται στο μέγεθος του DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί και από την διακριτική ικανότητα που θέλουμε να επιτύχουμε (*Watson J. et al, 2007*).

Κάθε δείγμα DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί αναμειγνύεται με μικρή ποσότητα (περίπου 7μl) χρωστικής βρωμοφαινόλης, το ονομαζόμενο διάλυμα φόρτωσης (loading dye) και τοποθετείται στα πηγαδάκια του πηκτώματος. Η χρωστική από τη μια καθιστά ορατά τα δείγματα για την εύκολη τοποθέτησή τους στα πηγαδάκια του πηκτώματος και από την άλλη γίνονται βαρύτερα ώστε να καθιζάνουν στα πηγαδάκια.

Υλικά

Για την παρασκευή της πηκτώματος αгарόζης χρησιμοποιήθηκαν TBE Buffer 10X της εταιρείας Ambion, SeaKem LE Agarose της Cambrex και Ethidium bromide soln, 10 mg/ml της Research Organics. Το TBE (Ambion) είναι ρυθμιστικό διάλυμα με pH 8.3 το οποίο αποτελείται από 10.8 g/l Tris, 5.5 g/l βορικό οξύ και 0.002M EDTA.

Για την ηλεκτροφόρηση τα υλικά προέρχονται από την εταιρεία Fermentas και είναι 6X DNA Loading Dye Solution (0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης) και GeneRuler 100bp DNA Ladder και από την Thermo Electron Co προέρχεται η συσκευή ηλεκτροφόρησης είναι η EC105-LVD Submarine Gel System Classic και τροφοδοτικό τάσης της EC105-LVD. Για την απεικόνιση των ζωνών χρησιμοποιήθηκε λάμπα UV MiniBisPro της Bio-Imaging Systems. Απαραίτητα υλικά επίσης ήταν τα εξής: φούρνος μικροκυμάτων, κωνική φιάλη 250 ml, «χτενάκια» στερεοποίησης πηκτώματος, πιπέτα (gilson), ακροφύσια (gilson) και παραφίλμ.

Αρχή μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια διαδικασία κατά την οποία το αρνητικά φορτισμένο μόριο του DNA κινείται μέσα σε πορώδες πήκτωμα αγαρόζης. Στην συγκεκριμένη εργασία ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, διότι είναι καταλληλότερο για την ηλεκτροφόρηση μεγάλων τμημάτων DNA καθώς και για μεγάλες διαφορές μεγέθους τμημάτων που πρόκειται να διαχωριστούν.

Το αρνητικά φορτισμένο DNA μετακινείται από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο. Τα μικρότερα μόρια μετακινούνται γρηγορότερα από τα βαρύτερα.

Σκοπός της ηλεκτροφόρησης στην παρούσα φάση είναι η επιβεβαίωση της σωστής και επιτυχημένης ενίσχυσης του DNA για να συνεχιστεί ο υβριδισμός. Σε περίπτωση απουσίας ζωνών κυρίως στο θετικό μάρτυρα σημαίνει ότι δεν θα εμφανιστούν ζώνες ούτε στον υβριδισμό.

Πειραματική Διαδικασία

Το κατάλληλο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης για το DNA των μυκοβακτηρίων είναι το πήκτωμα αγαρόζης 2%, το οποίο παρασκευάζεται ως εξής (**Εικόνα 15**):

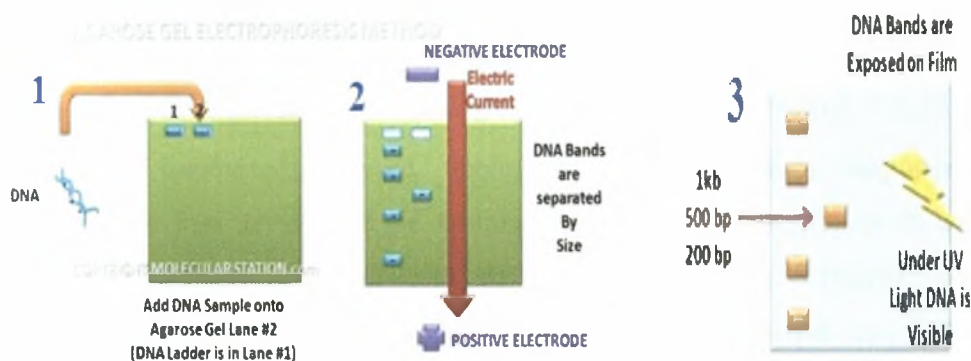
1. Σε κωνική φιάλη διαλύονται 2g αγαρόζης και 10 ml διαλύματος TBE 10X σε 90ml WFI.
2. Η αγαρόζη τήκεται με βρασμό σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 10 λεπτά (μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη).
3. Αναμονή λίγων λεπτών για πέσει η θερμοκρασία του διαλύματος περίπου στους 55°C ώστε το διάλυμα να μην επηρεάσει το πλαστικό εκμαγείο.
4. Προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, EtBr σε τελική συγκέντρωση 0.5 µg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο προστίθεται για να είναι ορατές οι ζώνες σε ακτινοβολία UV, γιατί αυτό παρεμβάλλεται ανάμεσα στα νουκλεοτίδια και φθορίζει όταν διεγείρεται με UV.
5. Σε δοχείο σχήματος τετραγώνου ή ορθογωνίου τοποθετούνται τα «χτενάκια» για να δημιουργηθούν τα «πηγάδια» για το φόρτωμα των δειγμάτων.
6. Στο δοχείο ρίχνεται προσεκτικά το διάλυμα της αγαρόζης.
7. Αναμονή περίπου 30 λεπτών για την πήξη της αγαρόζης η οποία επιτυγχάνεται με την πτώση της θερμοκρασίας της.
8. Αφαίρεση της «χτένας» όταν είναι πλήρως στερεοποιημένο πήκτωμα αγαρόζης.
9. Εμβάπτιση του πηκτώματος σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει 1X TBE.

10. Κάθε δείγμα DNA τοποθετείται στα πηγαδάκια του πηκτώματος χωρίς χρήση χρωστικής αφού τα δείγματα είναι χρώματος ροζ πράγμα που τα καθιστά ορατά από και διευκολύνει την τοποθέτησή τους στα πηγαδάκια του πηκτώματος.

11. Στο πρώτο πηγαδάκι τοποθετείται ο μάρτυρας (DNA ladder) στα πηγαδάκια του πηκτώματος.

12. Εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση 100V για 15 λεπτά από το τροφοδοτικό.

13. Έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη (UV) ακτινοβολία γίνεται άμεσα ορατές οι ζώνες του DNA μέσω του ηλεκτρονικού υπολογιστή.



Εικόνα 15. Ηλεκτροφόρηση για πήκτωμα αραρόζης 2%. (1) Φόρτωση των δειγμάτων σε πήκτωμα αραρόζης, (2) Μετακίνηση των δειγμάτων βάση μεγέθους από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο, (3) Έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη (UV) ακτινοβολία για να γίνουν άμεσα ορατές οι ζώνες του DNA.

Τα προϊόντα της PCR μετά την ηλεκτροφόρηση που φαίνονται ως ζώνες του DNA μέσω του ηλεκτρονικού υπολογιστή περιγράφονται παρακάτω για την κάθε μια περίπτωση ξεχωριστά:

CM: Το προϊόν της PCR για οποιοδήποτε είδος μυκοβακτηρίου θα δώσει δυο ζώνες, οι οποίες θα αντιπροσωπεύουν τον μάρτυρα είδους (Genus Control) σε μήκος περίπου 230 bp και τον γενικό μάρτυρα (Universal Control) στις 200 bp.

MTBC: Το προϊόν της PCR για οποιοδήποτε είδος *M.tuberculosis* θα εμφανίσει τρεις ζώνες, οι οποίες θα αντιπροσωπεύουν το γενικός μάρτυρας (Universal Control) με μήκος 215bp, το γονίδιο γυράσης B στις 152 bp και 203 bp. Επίσης τα στελέχη BCG εμφανίζουν μια επιπλέον ζώνη στις 117bp.

MTBDRplus: Το προϊόν της PCR του μυκοβακτηρίου της φυματίωσης θα εμφανίσει πέντε ζώνες, οι οποίες θα αντιπροσωπεύουν το γενικό μάρτυρα (Universal Control) με μήκος 115bp, το μάρτυρα ενίσχυσης (Amplification Control) στις 63bp και τα γονίδια *groB* στις 166bp, *katG* στις 120bp και *inhA* στις 110bp.

2.5 ΑΝΑΣΤΡΟΦΟΣ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ

Γενικά

Οι τεχνικές του υβριδισμού στηρίζονται στην ιδιότητα του DNA να αποδιατάσσεται. Κάθε μόριο DNA περιέχει πολλά ζεύγη βάσεων, ώστε υπό φυσιολογικές συνθήκες οι συμπληρωματικές αλυσίδες μιας διπλής έλικας να μην διαχωρίζονται ποτέ αυθόρμητα. Το 1960-1961 οι Marmur, Doty και Schildkrant απέδειξαν ότι οι δυο συμπληρωματικές αλυσίδες του DNA μπορούν να αποχωριστούν με θερμότητα σε αλκαλικό περιβάλλον, σχηματίζοντας δυο μονόκλινα μόρια. Οι δυο αλυσίδες αποδιατάσσονται πλήρως όταν σπάσουν όλοι οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών νουκλεοτιδίων ($A = T, G \equiv C$).

Ο όρος αποδιάταξη γενικά υποδηλώνει ότι η φυσική διαμόρφωση ενός μακρομορίου έχει μετατραπεί σε κάποια άλλη μορφή. Η θερμοκρασία στην οποία έχουν αποδιαταχθεί τα μισά από τα μόρια DNA ενός δείγματος ονομάζεται θερμοκρασία τήξης. Η τιμή εξαρτάται από την περιεκτικότητα των βάσεων G-C. Επειδή κάθε ζεύγος G-C συνδέεται με τρεις δεσμούς υδρογόνου, είναι σταθερότερο από ένα ζεύγος A-T, το οποίο συνδέεται με δυο. Όσα περισσότερα ζεύγη G-C περιέχει ένα μόριο DNA τόσο περισσότερη ενέργεια απαιτείται για την αποδιάταξη των δυο αλυσίδων του (Watson J. et al, 2007).

Μετά την αποδιάταξη, τα μονόκλινα τμήματα που είναι συμπληρωματικά έχουν την τάση να δημιουργούν υβρίδια. Με τον υβριδοποίηση χαρακτηρίζουμε το ζευγάρι δυο μονόκλωνων μορίων DNA ή RNA, ή μονόκλωνων αλυσίδων DNA με μονόκλωνες αλυσίδες RNA. Αποτελεί από τις πιο χρήσιμες τεχνικές της μοριακής βιολογίας. Επίσης η τεχνική αυτή μπορεί να επεκταθεί επιτρέποντας την αλληλεπίδραση οποιωνδήποτε συμπληρωματικών αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων και τη δημιουργία δίκλωνης δομής.

Υλικά

Τα υλικά προέρχονται από τα εμπορικά kit Genotype CM, Genotype MTBC, Genotype MTBDRplus της εταιρείας HAIN και είναι τα εξής: DEN (Denaturation Solution), HYB (Hybridization Buffer), STR (Stringent Wash Solution), SUB-C (Substrate Concentrate), CON-C (Conjugate Concentrate), RIN (Rince Solution), ταινίες υβριδοποίησης – νιτροκυτταρίνης και στριπάκια με 12 πηγαδάκια.

Απαραίτητα είναι επίσης WFI (Water For Injection, Στείρος, ελεύθερος ενδοτοξίνης διαλύτης) (Demos S.A., Greece), πιπέτα (gilson), ακροφύσια (gilson), πουαράκια και δοχείο για ρήψη υγρών (Εικόνα 16).



Εικόνα 16. Απεικονίζονται τα υλικά του εμπορικού kit της HAIN.

Αργή μεθόδου

Βασίζεται στην αποδιάταξη των προϊόντων της PCR και στην υβριδοποίηση αυτών με έναν αριθμό ολιγονουκλεοτιδικων ανιχνευτών που βρίσκονται ακινητοποιημένοι ως παράλληλες γραμμές σε μια ταινία νιτροκυτταρίνης. Οι ανιχνευτές σημαίνονται με φθορίζουσες ουσίες για τον εντοπισμό τους. Υπάρχουν διάφοροι τύποι σηματοδότησης ενζυμικές, χημικές ή συνθετικές (Maththews and Kricka 1988, Keller and Manak 1989, Leary and Ruth, 1989). Στην συγκεκριμένη πειραματική μελέτη χρησιμοποιείται ενζυμική σήμανση, στρεπταβιδίνης - αλκαλική φωσφατάση.

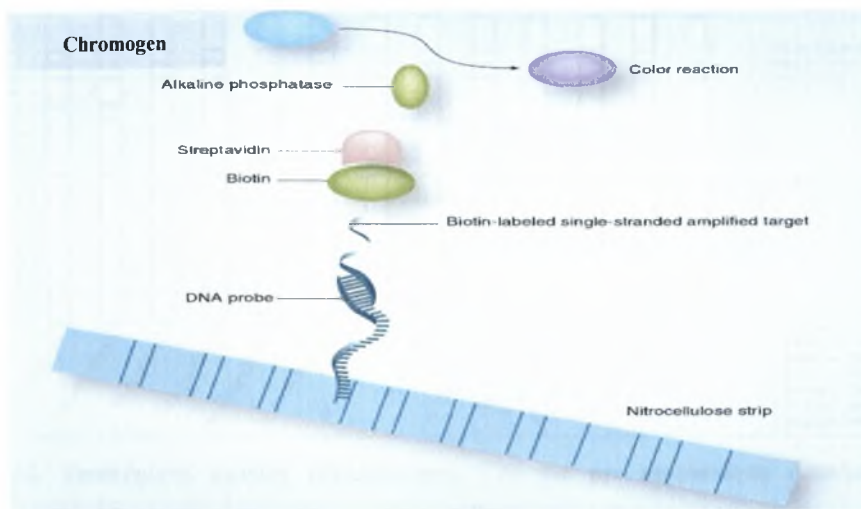
Τα απαραίτητα συστατικά μιας αντίδρασης υβριδισμού είναι: το μόριο DNA στόχο, οι ακριβής συνθήκες για την υβριδοποίηση, οι ανιχνευτές (probes), το μόριο-σηματοδότησης.

Πειραματική Διαδικασία

Τα στάδια του ανάστροφου υβριδισμού είναι απολύτως όμοια για τις τέσσερις αντιδράσεις: CM, MTBC, MTBDR plus.

Συνοπτικά τα στάδια υβριδοποίησης είναι τα ακόλουθα:

1. Σε κάθε πηγαδάκι στην άκρη των βυθισμάτων προσθέτουμε 20μl DEN.
2. Προσθήκη 20 μl από το προϊόν της PCR πιπετάροντας ώστε να ομοιογενοποιηθούν.
3. Επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Προσθήκη 1ml διαλύματος HYB Buffer και ελαφρά ανακίνηση μέχρι να ανακατευτούν. Με αυτό επιτυγχάνεται χημική αποδιάταξη των προϊόντων της ενίσχυσης.
5. Τοποθέτηση των ταινιών νιτροκυτταρίνης (strips) στο διάλυμα σε κάθε βύθισμα με τις γραμμές προς τα πάνω, αφού πρώτα έχουμε αριθμήσει την ταινία. Απαραίτητο είναι η τοποθέτηση ολόκληρης της ταινίας στο διάλυμα. Σε αυτό το στάδιο γίνεται υβριδοποίηση των μονόκλωνων αλυσίδων με τους συμπληρωματικούς ιχνηθέτες που βρίσκονται ακινητοποιημένοι στις ταινίες. Αυτό επιτυγχάνεται με ανακίνηση και επώαση για 30min σε 45 °C.
6. Πλύσιμο των ταινιών με την προσθήκη 1ml STR διαλύματος, ανάδευση και επώαση για 15min σε 45°C και με RIN για 1min για απομάκρυνση των μη υβριδοποιημένων αλυσίδων.
7. Προσθήκη CON-C διαλύματος που περιέχει ένζυμο (streptavidin-conjugated alkaline phosphatase) το οποίο προσδένεται στο υβριδοποιημένο μόριο (Εικόνα 17).
8. Προσθήκη κατάλληλου SUB-C διαλύματος το οποίο περιέχει υπόστρωμα (Dimethyl Sulfoxide) με το οποίο το ένζυμο αντιδρά και παράγει χρώμα. Έτσι, οι ζώνες στις οποίες έχει σχηματιστεί το σύμπλοκο DNA-στόχος/ιχνηθέτης χρωματίζονται.



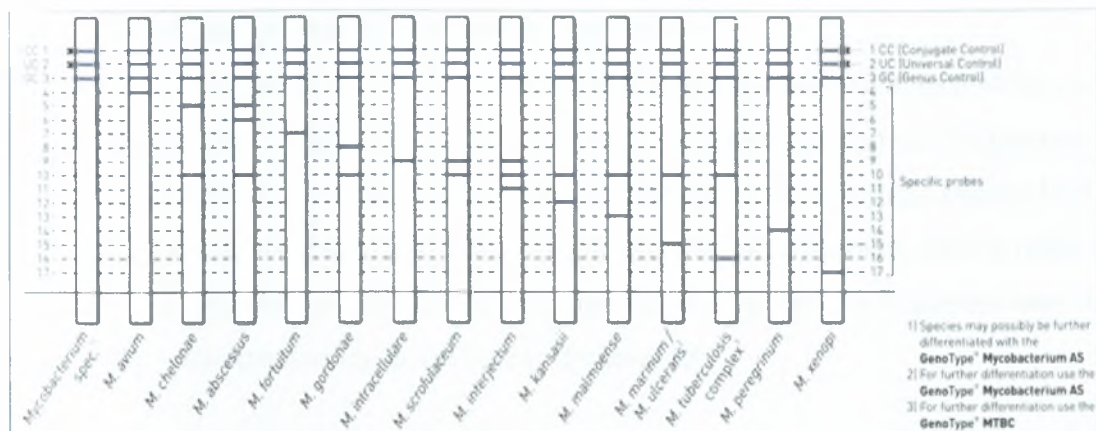
Εικόνα 17. Ανάστροφος Υβριδισμός. Η ζώνη της ταινίας υβριδισμού-νιτροκυτταρίνης αποτελείται από τον ανιχνευτή DNA ο οποίος συνδέεται με το ένζυμο (streptavidin-conjugated alkaline phosphatase) το οποίο αντιδρά με το υπόστρωμα και προσδίδει το χρώμα στη ζώνη καθιστώντας την ορατή.

9. Οι ζώνες που χρωματίστηκαν συγκρίθηκαν με ένα υπόδειγμα (το οποίο περιέχονταν στο εμπορικό kit της εταιρία HAIN). Για κάθε αντίδραση ανάστροφου υβριδισμού, δηλαδή CM, MTBC, MTBDRplus υπάρχει συγκεκριμένη ταινία υβριδοποίησης. Η κάθε ταινία είναι φτιαγμένη για να ανιχνεύει συγκεκριμένα γονίδια του μυκοβακτηρίου έχοντας διαφορετικό στόχο κάθε φορά. Συγκεκριμένα οι ταινίες υβριδισμού: α) **CM**: ταυτοποιούν το είδος του μυκοβακτηρίου και χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση και τη διάκριση των *M.tuberculosis* από τα υπόλοιπα μυκοβακτήρια, β) **MTBC**: ταυτοποιούν το είδος του *M.tuberculosis complex*, γ) **MTBDRplus**: ανιχνεύουν την ύπαρξη αντοχής ή ευαισθησίας στα γονίδια *rpoB*, *katG*, *inhA*.

Ταινίες Υβριδισμού

➤ **CM (Common Mycobacterium)**

Στην ταινία υβριδισμού CM υπάρχουν 17 ακινητοποιημένοι ανιχνευτές ως παράλληλες γραμμές (ζώνες). Οι τρεις πρώτες ζώνες είναι μάρτυρες (controls): 1^η Μάρτυρας Σύζευξης (Conjugate Control, CC), 2^η Γενικός Μάρτυρας (Universal Control, UC), 3^η Μάρτυρας Είδους (Genus Control, GC). Οι υπόλοιπες από την ζώνη 4 μέχρι την 17 είναι ειδικοί ανιχνευτές οι οποίοι μόνοι τους ή σε συνδυασμό δυο μέχρι τέσσερις ζώνες ταυτοποιούν το είδος του μυκοβακτηρίου (Εικόνα 18).



Εικόνα 18. Υποδείγματα ταινιών υβριδοποίησης CM για την ταυτοποίηση διαφόρων ειδών μυκοβακτηρίων. Σε κάθε ταινία παρουσιάζεται η ζώνη ή ζώνες που πρέπει να εμφανιστούν σε περίπτωση παρουσίας κάποιου από τα συγκεκριμένα μυκοβακτήρια στο κλινικό δείγμα.

a. Μάρτυρας Σύζευξης (Conjugate Control, CC)

Είναι η πρώτη ζώνη στην ταινία υβριδισμού CM. Είναι δείκτης της πρόσδεσης του ενζύμου (streptavidin-conjugated alkaline phosphatase) στο υβριδοποιημένο μόριο και της αντίδρασης του υποστρώματος (Dimethyl Sulfoxide) με το ένζυμο προς παραγωγή χρώματος. Η εμφάνιση της πιστοποιεί την σωστή διεκπεραίωση του υβριδισμού. Είναι εμφανής ακόμη και σε αρνητικά δείγματα.

b. Γενικός Μάρτυρας (Universal Control, UC)

Είναι η δεύτερη ζώνη στην ταινία υβριδισμού CM. Είναι δείκτης όλων των γνωστών μυκοβακτηρίων και των μελλών από τα gram-θετικά βακτήρια με υψηλού ποσοστού G+C. Αν δεν εμφανιστεί η συγκεκριμένη ζώνη άλλα εμφανιστεί η ζώνη μάρτυρας σύζευξης, τότε πρέπει να ελεγχτεί αντιστοιχία με κάποιο άλλο βακτηριακό είδος εκτός αυτών.

c. Μάρτυρας Είδους (Genus Control, GC)

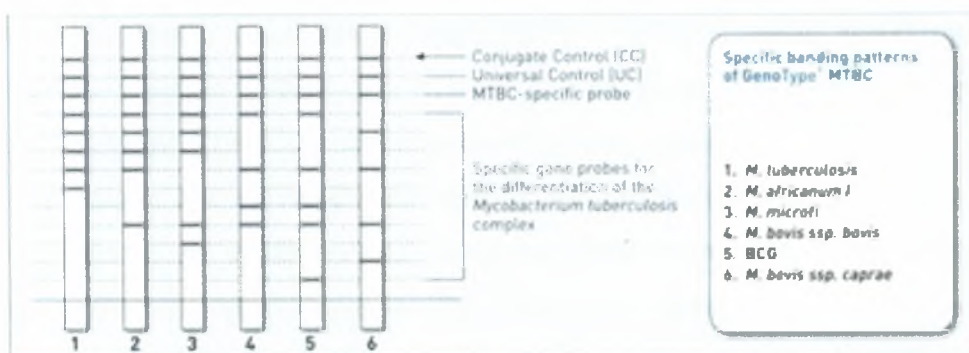
Είναι η τρίτη ζώνη στην ταινία υβριδισμού CM. Είναι δείκτης όλων των ειδών του *Mycobacterium*.

d. Άλλες ζώνες

Είναι ειδικοί ανιχνευτές χαρακτηριστικών περιοχών του γονιδιώματος του κάθε είδους μυκοβακτηρίου.

➤ **MTBC (*Mycobacterium tuberculosis complex*)**

Στην ταινία υβριδισμού MTBC υπάρχουν 13 ακινητοποιημένοι ανιχνευτές ως παράλληλες γραμμές (ζώνες). Οι τρεις πρώτες είναι ζώνες μάρτυρες: 1^η Μάρτυρας Σύζευξης (Conjugate Control, CC), 2^η Γενικός Μάρτυρας (Universal Control, UC), 3^η MTBC – ειδικοί ανιχνευτές (MTBC - specific probes). Οι υπόλοιπες από τη ζώνη 4 μέχρι την 13 είναι ειδικοί ανιχνευτές οι οποίοι σε συνδυασμό 7 ή 8 ταυτοποιούν το είδος του μυκοβακτηρίου της φυματίωσης (**Εικόνα 19**).



Εικόνα 19. Υποδείγματα ταινιών υβριδοποίησης MTBC για τον είδους του μυκοβακτηρίου της φυματίωσης. Σε κάθε ταινία παρουσιάζονται οι ζώνες που πρέπει να εμφανιστούν σε περίπτωση παρουσίας κάποιου από τα συγκεκριμένα μυκοβακτήρια της φυματίωσης στο κλινικό δείγμα.

a. Μάρτυρας Σύζευξης (Conjugate Control, CC)

Είναι η πρώτη ζώνη στην ταινία υβριδισμού MTBC και έχει περιγράψει παραπάνω, στη ζώνη υβριδισμού CM.

b. Γενικός Μάρτυρας (Universal Control, UC)

Είναι η δεύτερη ζώνη στην ταινία υβριδισμού MTBC και έχει περιγράψει παραπάνω, στη ζώνη υβριδισμού CM.

c. MTBC-ειδικός ανιχνευτής (MTBC-specific probe)

Είναι η τρίτη ζώνη στην ταινία υβριδισμού MTBC. Είναι δείκτης όλων των ειδών του *M. tuberculosis complex*.

d. Άλλες ζώνες

Είναι ειδικοί ανιχνευτές χαρακτηριστικών περιοχών του γονιδιώματος του κάθε είδους μυκοβακτηρίου της φυματίωσης.

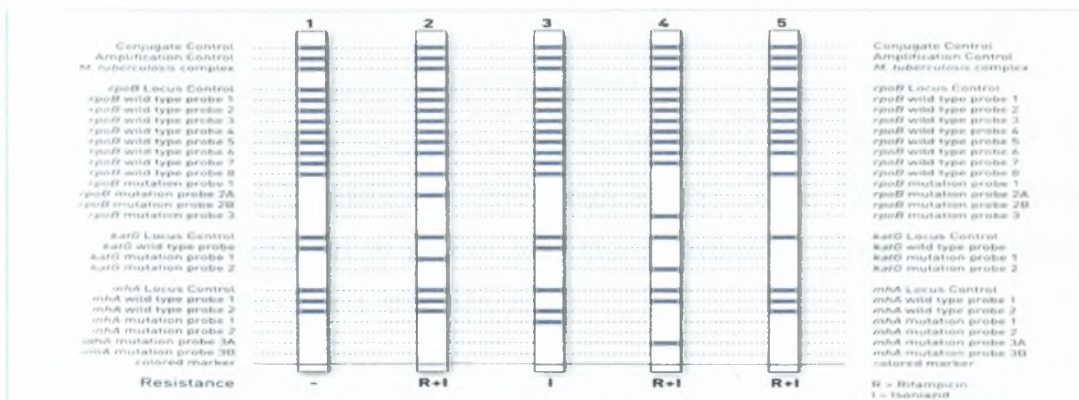
➤ MTBDRplus

Οι ταινίες νιτροκυτταρίνης MTBDRplus περιέχουν 26 ακινητοποιημένους ανιχνευτές ως παράλληλες γραμμές (ζώνες). Οι έξι πρώτες ζώνες είναι μάρτυρες (controls) ενίσχυσης και υβριδισμού: 1^η Μάρτυρας Σύζευξης (Conjugate Control, CC), 2^η Μάρτυρας Ενίσχυσης (Amplification Control, AC), 3^η *M.tuberculosis complex* και οι υπόλοιπες τρεις είναι μάρτυρες περιοχών των γονιδίων *rpoB*, *katG*, *inhA* η κάθε μια.

Όσον αφορά τη ριφαμπικίνη, η ευαισθησία ταυτοποιείται με την εμφάνιση οχτώ ζωνών για το γονίδιο *rpoB* άγριου-τύπου (WT1 – WT8) οι οποίες περικλείουν την περιοχή του γονιδίου *rpoB*, ενώ η αντοχή σε αυτή ταυτοποιείται με την εμφάνιση μιας των τεσσάρων ζωνών για το γονίδιο *rpoB* μεταλλαγμένου τύπου.

Όσον αφορά την ισονιαζίδη σε χαμηλή συγκέντρωση η ευαισθησία σε αυτή ταυτοποιείται με την εμφάνιση μιας ζώνης του γονιδίου *katG* άγριου τύπου (WT1), η οποία περικλείει την περιοχή του γονιδίου *katG*, ενώ η αντοχή σε αυτή ταυτοποιείται με την εμφάνιση μιας των δυο ζωνών για το γονίδιο *katG* μεταλλαγμένου τύπου.

Όσον αφορά την ισονιαζίδη σε υψηλή συγκέντρωση, η ευαισθησία σε αυτή ταυτοποιείται με την εμφάνιση δυο ζωνών για το γονίδιο *inhA* άγριου-τύπου (WT1-2) οι οποίες περικλείουν την περιοχή του γονιδίου *inhA*, ενώ η αντοχή σε αυτή ταυτοποιείται με την εμφάνιση μιας των τεσσάρων ζωνών για το γονίδιο *inhA* μεταλλαγμένου τύπου (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. Ταινίες υβριδοποίησης για την ανίχνευση αντοχής στα αντιβιοτικά ριφαμπικίνη και ισονιαζίδη (*Mycobacterium MTBDRplus*, Hain) των μυκοβακτηρίων της φυματίωσης. (1)Υπόδειγμα χρωματισμού των ζωνών σε περίπτωση ευαισθησίας στην ριφαμπικίνη και ισονιαζίδη, (2) ανθεκτικότητα στην ριφαμπικίνη και ισονιαζίδη (3) ευαισθησίας στην ριφαμπικίνη και ανθεκτικότητα στην ισονιαζίδη (4) ανθεκτικότητα στην ριφαμπικίνη και ισονιαζίδη (5) ανθεκτικότητα στην ριφαμπικίνη και ισονιαζίδη.

a. Μάρτυρας Σύζευξης (Conjugate Control, CC)

Είναι η πρώτη ζώνη στην ταινία υβριδισμού MTBDRplus και έχει περιγράψει παραπάνω, στη ζώνη υβριδισμού CM.

b. Μάρτυρας Ενίσχυσης (Amplification Control, AC)

Είναι η δεύτερη ζώνη στην ταινία υβριδισμού MTBDRplus. Είναι η ένδειξη της ύπαρξης ενισχυμένων τμημάτων DNA. Σε περίπτωση απουσίας ζώνης σημαίνει ότι δεν διεκπεραιώθηκε σωστά η εκχύλιση του DNA ή/και η ενίσχυση του ή/και κάποιος αναστολέας υπάρχει στο δείγμα.

c. *M.tuberculosis complex* (TUB)

Είναι η τρίτη ζώνη στην ταινία υβριδισμού MTBDRplus. Αποτελεί δείκτη ύπαρξης κάποιου είδους του *Mycobacterium tuberculosis complex*. Σε περίπτωση που δεν εμφανιστεί ζώνη σημαίνει ότι στο δείγμα δεν υπάρχει μυκοβακτήριο και άρα το τεστ είναι ακατάλληλο.

d. Μάρτυρες Περιοχών (*rpoB.katG.inhA*) - Locus Controls

Είναι ζώνες που δείχνουν χαρακτηριστικές συγκεκριμένες περιοχές του γονιδίου και πρέπει να εμφανίζονται πάντα. Αν ούτε οι ζώνες μάρτυρες περιοχών ούτε οι ζώνες-ανιχνευτές άγριου τύπου ή μεταλλαγμένου ενός ή τριών γονιδίων δεν εμφανιστούν τότε δεν μπορούμε να εξαγάγουμε συμπεράσματα.

e. Αγρίου τύπου ανιχνευτές (Wild type probes)

Οι αγρίου τύπου ανιχνευτές σχετίζονται με τα γονίδια *rpoB*, *katG* και *inhA*. Τα κωδικόνια 505 έως 533 οριοθετούν την περιοχή που εντοπίζεται το γονίδιο *rpoB*, στο κωδικόνιο 315 εντοπίζεται το γονίδιο *katG* και τα κωδικόνια 15 και 16 οριοθετούν την περιοχή που εντοπίζεται το γονίδιο *inhA*.

f. Μεταλλαγμένοι Ανιχνευτές (Mutation probes)

Οι μεταλλαγμένοι ανιχνευτές ανήκουν στα γονίδια *rpoB* (Πίνακας 3), *katG* (Πίνακας 4) και *inhA* (Πίνακας 5) και περιέχουν μερικές από τις πιο κοινές ανεκτικότητες σε συγκεκριμένες περιοχές.

Σε περίπτωση μετάλλαξης το προϊόν ενίσχυσης δεν προσδένεται σε αγρίου τύπου ανιχνευτή. Η απουσία σήματος τουλάχιστον ενός ανιχνευτή άγριου τύπου ή παρουσία

τουλάχιστον ενός μεταλλαγμένου τύπου ανιχνευτή είναι ένδειξη ανθεκτικότητας του συγκεκριμένου στελέχους στη ριφαμπικίνη και στην ισονιαζίδη.

Γονίδιο	Όνομα ζώνης υβριδισμού μετάλλαξης	Περιοχή μετάλλαξης	Αντικατάσταση βάσης	Αντικατάσταση αμινοξέος
<i>rpoB</i>	MUT1	D516V	GAC → GTC	Hsp → Val
	MUT2A	H526V	GAC → TAC	His → Tyr
	MUT2B	H526D	CAC → GAC	His → Asp
	MUT3	S531L	TCG → TGG	Ser → Leu

Πίνακας 3. Στο γονίδιο *rpoB* υπάρχουν τέσσερις ζώνες που αντιστοιχούν σε τέσσερις περιοχές μετάλλαξης. Στον πίνακα παρουσιάζονται οι μεταλλάξεις της συγκεκριμένης βάσης που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένο αμινοξύ.

Γονίδιο	Όνομα ζώνης υβριδισμού μετάλλαξης	Περιοχή μετάλλαξης	Αντικατάσταση βάσης	Αντικατάσταση αμινοξέος
<i>katG</i>	MUT1	S315T1	AGC → ACC	Ser → Thr
	MUT2	S315T2	AGC → AGA	Ser → Thr

Πίνακας 4. Στο γονίδιο *katG* υπάρχουν δυο ζώνες που αντιστοιχούν σε δυο περιοχές μετάλλαξης. Στον πίνακα παρουσιάζονται οι μεταλλάξεις της συγκεκριμένης βάσης που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένο αμινοξύ.

Γονίδιο	Όνομα ζώνης υβριδισμού μετάλλαξης	Περιοχή μετάλλαξης
<i>inhA</i>	MUT1	C15T
	MUT2	A16G
	MUT3A	T8C
	MUT3B	T8A

Πίνακας 5. Στο γονίδιο *inhA* υπάρχουν τέσσερις ζώνες που αντιστοιχούν σε τέσσερις περιοχές μετάλλαξης.

2.6 ANTIBIOΓΡΑΜΜΑ

Γενικά

Η εκρίζωση της φυματίωσης στηρίζεται κατά βάσει στη θεραπεία με αντιφυματική αγωγή, με κύρια αντιφυματικά φάρμακα την ισονιαζίδη και τη ριφαμπικίνη. Τα τελευταία χρόνια η ταυτόχρονη χρήση πολλών αντιφυματικών φαρμάκων καθιστά τη φυματίωση ένα σοβαρό πρόβλημα για την δημόσια υγεία (*Barenfanger, J. 1993*) και περισσότερο δύσκολη και πολυδάπανη. Έτσι, η ταχεία ανίχνευση των ανθεκτικών στελεχών είναι σημαντική για την αποτελεσματικότητα των ασθενών.

Στις εξετάσεις αντιμυκοβακτηριακής ευαισθησίας χρησιμοποιούνται ευρέως τρεις κλασσικοί μέθοδοι για τον έλεγχο της ευαισθησίας στελεχών *Mycobacterium tuberculosis* στα αντιβιοτικά και είναι οι εξής:

1^η Μέθοδος αραιώσης των αντιβιοτικών σε υγρό θρεπτικό υλικό (BACTEK MGIT 960 SIRE),

2^η Μέθοδος διάχυσης του αντιβιοτικού στο άγαρ με το E-test και

3^η Μέθοδος αναλογιών και αραιώσεων των αντιβιοτικών σε άγαρ (Method of proportion, MOP).

Η πρώτη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη και θα αναλυθεί στη συνέχεια.

Η δεύτερη μέθοδος στηρίζεται στο συνδυασμό της διάχυσης του αντιβιοτικού σε άγαρ και των αραιώσεων του αντιβιοτικού σε άγαρ. Η ταινία E-test είναι λεπτή, πλαστική, χωρίς πόρους και περιλαμβάνει μια σειρά διαδοχικών συγκεντρώσεων του αντιβιοτικού. Σε κάθε ταινία αναγράφεται βαθμονομημένη κλίμακα που αντιστοιχεί σε MIC (μg/mL), δηλαδή στη μικρότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που δεν επιτρέπει την ορατή ανάπτυξη του μικροοργανισμού και καλείται ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα του αντιβιοτικού (Minimum Inhibitory Concentration, MIC).

Η τρίτη μέθοδος MOP (Μέθοδος Αναλογιών) χρησιμοποιεί Middlebrook και Cohn 7H10 Agar. Με τη μέθοδο αυτή συγκρίνονται οι μετρήσεις αποικιών σε υλικά που περιέχουν και δεν περιέχουν φάρμακο. Η αντοχή σε ένα φάρμακο ανιχνεύεται όταν 1% ή μεγαλύτερου ποσοστού του πληθυσμού μυκοβακτηρίων είναι ανθεκτικά σε στη συγκέντρωση του φαρμάκου που εξετάζεται. Τα αποτελέσματα είναι διαθέσιμα μετά από 21 μέρες επώασης.

Η εξέταση BACTEC MGIT 960 SIRE παρέχει το αποτέλεσμα ευαισθησίας στις 4 μέχρι 21 μέρες. Επιπλέον, η μέθοδος επιτρέπει στις περισσότερες περιπτώσεις την αναφορά των κατάλληλων αποτελεσμάτων αντιβιοτικής ευαισθησίας νωρίτερα από τη διαδικασία MOP. Ωστόσο τα διαθέσιμα αποτελέσματα βγαίνουν μετά από μερικές μέρες γεγονός που ενισχύει την αναγκαιότητα εισαγωγής μοριακών μεθόδων για την ύπαρξη ή όχι μεταλλάξεων σε γονίδια που σχετίζονται με αντοχή σε διάφορα αντιφυματικά φάρμακα.

Υλικά

Τα υλικά προέρχονται από το εμπορικό kit BACTEC MGIT 960 SIRE της εταιρεία Becton, Dickinson and Company είναι τα εξής: ένα φιαλίδιο λυοφιλοποιημένης ισονιαζίδη (33.2μg) και ριφαμπικίνη (332μg) και φιαλίδια συμπληρώματος SIRE supplement. Το τελευταίο περιέχει 20ml Middlebrook εμπλουτισμένο με Ελαιϊκό Οξύ 0.6gr, Βόειος λευκωματίνη 50gr, Δεξτρόζη 20g, Καταλάση 0.03gr. Επίσης χρησιμοποιούνται σωλήνες σωλήνες BBL MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) των 7ml της ίδιας εταιρείας.

Τα αντιβιοτικά με λυόφιλη μορφή διατηρούνται στο ψυγείο (2-8°C). Μετά τη διαλυτοποίηση τα διαλύματα των αντιβιοτικών θα πρέπει να διατηρούνται στην κατάψυξη (-20°C) μέχρι 6 μήνες, χωρίς όμως να υπερβαίνουν την ημερομηνία λήξης της συσκευασίας. Από τη στιγμή που θα ξεπαγώσει το διάλυμα των αντιβιοτικών και θα χρησιμοποιηθεί το υπόλοιπο απορρίπτεται και δεν ξαναχρησιμοποιείται. Το συμπλήρωμα δαιτηρείται στο ψυγείο και στο σκοτάδι. Δεν πρέπει να παγώνετε ή να υπερθερμένεται το προϊόν.

Αρχή μεθόδου

Οι σωλήνες BBL MGIT των 7ml περιέχουν τροποποιημένο 7H9 Middlebrook υγρό μέσο καλλιέργειας το οποίο διευκολύνει την ανάπτυξη και ανίχνευση των μυκοβακτηρίων. Επίσης περιέχουν στον πυθμένα τους σιλικόνη εμποτισμένη με μια φθορίζουσα ένωση. Η τελευταία είναι ευαίσθητη στην παρουσία του οξυγόνου που είναι διαλυμένο στο υγρό υλικό. Η αρχική συγκέντρωση του οξυγόνου μπλοκάρει την εκπομπή από τη φθορίζουσα ένωση και είναι δυνατή η ανίχνευση ελάχιστου φθορισμού. Αργότερα, ζωντανά ενεργά μυκοβακτήρια καταναλώνουν το οξυγόνο και η ποσότητα του μειώνεται οδηγώντας τη φθορίζουσα ένωση να φθορίζει.

Το εμπορικό kit BACTEC MGIT AST SIRE είναι ένα ποιοτικό τεστ 4-5 ημερών. Πρόκειται για μια γρήγορη ποσοτική διαδικασία για ευαισθησία τεστ για *Mycobacterium tuberculosis* για καλλιέργεια ισονιαζίδη και ριφαμπικίνη. Η δοκιμασία βασίζεται στην ανάπτυξη κάποιου στελέχους *Mycobacterium tuberculosis* σε ένα σωληνάριο που περιέχει αντιβιοτικά και συγκρίνεται με ένα σωληνάριο που δεν περιέχει. Η σύσταση MGIT 960 συνεχώς ελέγχει τον φθορισμό από τους σωλήνες που περιέχουν τα αντιβιοτικά συγκρινόμενος με τον φθορισμό του Growth Control (Μάρτυρα Ανάπτυξης) χρησιμοποιείται από ειδική συσκευή για να ανιχνεύσει τα αποτελέσματα της ευαισθησίας. Η συσκευή αυτόματα ερμηνεύει τα αποτελέσματα χρησιμοποιώντας αλγόριθμους (οι οποίοι συγκρίνουν την ανάπτυξη στο σωλήνα με το αντιβιοτικό με τον σωλήνα χωρίς αντιβιοτικό) και τα ανθεκτικά ή ευαίσθητα στελέχη ανακοινώνονται από το μηχάνημα.

Πειραματική Διαδικασία

Το πρώτο βήμα είναι η προετοιμασία των αντιβιοτικών του εμπορικού kit για τον έλεγχο αντοχής γίνεται ως εξής:

1. Ανασύσταση του περιεχομένου του φιαλιδίου λυοφιλοποιημένης ισονιαζίδης με 4mL στείρου απεσταγμένου νερού για την παρασκευή ενός stock διαλύματος συγκέντρωσης 8.3 μg/ml. Το τελευταίο μοιράζεται σε ποσότητα 120μL σε σωληνάρια erpedorf και τοποθετούνται στην κατάψυξη.
2. Ανασύσταση του περιεχομένου του φιαλιδίου λυοφιλοποιημένης ριφαμπικίνης με 4mL στείρου απεσταγμένου νερού για την παρασκευή ενός stock διαλύματος συγκέντρωσης 83 μg/ml. Το τελευταίο μοιράζεται σε ποσότητα 120μL σε σωληνάρια erpedorf και τοποθετούνται στην κατάψυξη.

Να σημειωθεί ότι τα σωληνάρια και τα φιαλίδια θα πρέπει να ελέγχονται για τυχόν ενδείξεις μόλυνσης ή αλλοίωσης. Απορρίπτονται και δεν χρησιμοποιούνται σωληνάρια ή φιαλίδια των οποίων η όψη είναι ακατάλληλη ή/και εάν τα σωληνάρια MGIT παρουσιάζουν φθορισμό πριν από τη χρήση.

Το επόμενο βήμα είναι η προετοιμασία των δειγμάτων για τον επακόλουθο ενοφθαλμισμό εξέτασης. Τα κλινικά δείγματα που με την μέθοδο CM ταυτοποιήθηκαν θετικά για *M.tuberculosis complex* εμβολιάστηκαν επίσης σε σωληνάριο MGIT. Για τον έλεγχο αντοχής το φιαλίδιο MGIT πρέπει να χρησιμοποιηθεί την επόμενη που θα χαρακτηριστεί θετικό (ημέρα 1) έως και την 5^η ημέρα. Η ημέρα που θα χαρακτηριστεί το σωληνάριο θετικό ορίζεται ημέρα 0.

Ο επακόλουθος ενοφθαλμισμός για την εξέταση ευαισθησίας των θετικών δειγμάτων πραγματοποιείται αφού ελεγχθεί η πιθανή ύπαρξη επιμόλυνσης αυτών. Συγκεκριμένα, μικρή ποσότητα από αυτό εμβολιάζεται σε αιματούχο Agar, επωάζετε στους 37°C σε διοξείδιο του άνθρακα. Η διαδικασία συνεχίζεται στα καθαρά δείγματα. Επίσης οι θετικοί σωλήνες 3^{ης} έως 5^{ης} υφίστανται αραιώση 1:5, δηλαδή 1 ml από θετικό φιαλίδιο προστίθεται σε 4ml στείρου φυσιολογικού ορού, οι άνω της 5^{ης} ημέρας εμβολιάζονται σε νέο σωλήνα MGIT μέχρι να γίνει θετικός, ενώ της 1^{ης} και 2^{ης} ημέρας χρησιμοποιούνται.

Στην συνέχεια ακολουθεί η προετοιμασία και ο ενοφθαλμισμός των δειγμάτων, αφού πρώτα γίνει έλεγχος και απόρριψη των φιαλιδίων με πιθανές επιμολύνσεις ή φθορές. Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Επισήμανση τριών σωλήνων MGIT των 7ml για κάθε θετική με μυκοβακτηρίδιο καλλιέργεια. Ο πρώτος που αντιστοιχεί στον μάρτυρα ανάπτυξης επισημάνετε ως GC (Growth Control), ο δεύτερος που αντιστοιχεί στην ισονιαζίδη ως INH και ο τρίτος της ριφαμπικίνης ως RIF.
2. Τοποθέτηση των σωλήνων με τη σειρά που αναφέρθηκε στις ειδικές υποδοχές.
3. Σε συσκευή καθέτου νηματικής ροής κλάσης II (στείρες συνθήκες) προσθέτονται 800μl SIRE supplement σε κάθε σωλήνα και 100μl από το διάλυμα INH και RIF στον αντίστοιχο σωλήνα MGIT, ενώ στον σωλήνα GC δεν προστίθεται κανένα αντιβιοτικό (Πίνακας 6).

<i>Αντιβιοτικό</i>	<i>Συγκέντρωση αντιβιοτικού μετά την ανασύσταση</i>	<i>Όγκος αντιβιοτικού που προστίθεται στο σωλήνα MGIT</i>	<i>Τελική συγκέντρωση στο σωλήνα MGIT</i>
Ισονιαζίδη	8.3 μg/ml	100 μl	0.1 μg/ml
Ριφαμπικίνη	83 g/ml	100 μl	1.0 μg/ml

Πίνακας 6. Οι προβλεπόμενες συγκεντρώσεις για ριφαμπικίνη και ισονιαζίδη σύμφωνα με το CDC.

4. Σε συσκευή καθέτου νηματικής ροής κλάσης II (στείρες συνθήκες) η προετοιμασία και ο ενοφθαλμισμός του σωλήνα μάρτυρα ανάπτυξης γίνεται ως εξής: προσθήκη 100μL από το βακτηριακό εναιώρημα σε 10ml στείρου φυσιολογικού ορού, καλή ανάμιξη για την παρασκευή εναιωρήματος 1:100 Μάρτυρα Ανάπτυξης, ενοφθαλμισμός 0.5 ml εναιωρήματος από το 1:100 εναιώρημα του GC στο σωλήνα MGIT με την επισήμανση GC.

5. Σε συσκευή καθέτου νηματικής ροής κλάσης II (στείρες συνθήκες) ο εμβολιασμός σωλήνων με αντιβιοτικά γίνεται ως εξής: διανομή 0.5ml του μυκοβακτηριακού εναιωρήματος σε καθένα από τους δυο σωλήνες των αντιβιοτικών (INH, RIF), καλό κλείσιμο των σωληναρίων και καλή ανάμιξη.
6. Εισαγωγή του σετ AST στον MGIT χρησιμοποιώντας την επιλογή του σετ AST σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Επιβεβαίωση ότι η σειρά των σωληναρίων στον AST set μεταφορέα είναι η σωστή και αντιστοιχεί στην σωστή θέση.
7. Έλεγχος για μυκοβακτηριακή επιμόλυνση ως εξής: Εμβολιασμός 0.1 ml από το μυκοβακτηριακό εναιώρημα σε τριβλίο αιματούχο agar, τοποθέτηση σε πλαστική σακούλα, επώαση σε 35° C-37° C για 48 ώρες. Σε περίπτωση απουσίας επιμόλυνσης επιτρέπεται η διαδικασία να συνεχιστεί, αλλιώς ακύρωση της διαδικασίας και επανάληψη με καθαρές καλλιέργειες.

Αποτελέσματα

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Για τη μοριακή ταυτοποίηση μυκοβακτηριδίων τα οποία απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα ασθενών με υποψία φυματίωσης στη Θεσσαλία και την ανίχνευση γονιδίων αντοχής σε στελέχη *M.tuberculosis* εξετάστηκε μια πληθώρα δειγμάτων τα οποία συγκεντρώθηκαν τη χρονική περίοδο 2008 μέχρι 2009. Τα δείγματα προέρχονταν από τις κλινικές και τα εξωτερικά ιατρεία του ΠΓΝΛ, του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, του Γενικού Νοσοκομείου Βόλου και του Γενικού Νοσοκομείου Λαμίας.

I. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΟΥ ΤΗΣ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ

Μέθοδος CM

Αρχικά με μοριακή μέθοδο η οποία περιλάμβανε το συνδυασμό αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και υβριδισμού έγινε ταυτοποίηση των μυκοβακτηρίων. Από τα 121 δείγματα στα 97 ταυτοποιήθηκε *M.tuberculosis complex*, ενώ τα υπόλοιπα ήταν άτυπα μυκοβακτηρίδια (πίνακας 7). Στον πίνακα 8 παρουσιάζονται τα βιολογικά υλικά που ταυτοποιήθηκε το *M.tuberculosis complex*.

<i>Μυκοβακτήρια</i>	<i>Αριθμός Δειγμάτων</i>
<i>M. tuberculosis complex</i>	97
<i>M. fortuitum</i>	12
<i>M. gordonae</i>	7
<i>M.intracellulare</i>	3
<i>M.avium</i>	2
Σύνολο	121

Πίνακας 7. Αριθμός των δειγμάτων στα οποία ταυτοποιήθηκαν το κάθε είδος μυκοβακτηριδίου..

Όπως προκύπτει από τον παραπάνω πίνακα το μυκοβακτήριο της φυματίωσης απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε σε ποσοστό 80,17% στο σύνολο των κλινικών δειγμάτων. Στο υπόλοιπο ποσοστό 19,83% ανηχτεύτηκαν τα εξής άτυπα μυκοβακτήρια, *M.fortuitum* (9,91%), *M.gordonae* (5,79%), *M.intracellulare* (2,48%) και *M.avium* (1,65%).

<i>Υλικό Δειγμάτων</i>	<i>Αριθμός Δειγμάτων</i>
Γαστρικό	16
Πτύελα	49
Βρογχικές Εκκρίσεις	18
Πλευριτικό	6
Αρθρικό	2
Πύο	4
Ούρα	2
Σύνολο	97

Πίνακας 8. Συνολικός αριθμός και το αντίστοιχο βιολογικό υλικό των δειγμάτων στα οποία απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε το *M. tuberculosis*.

Όπως προκύπτει από το σύνολο των αποτελεσμάτων το μυκοβακτήριο της φυματίωσης απομονώθηκε στα πτύελα σε ποσοστό 50,52%, σε βρογχικές εκκρίσεις 18,56%, στα γαστρικά υγρά 16,49%, σε πλευριτικά υγρά 6,19%, σε πύο 4,12%, στο αρθρικό 2,06% και στα ούρα 2,06%.

II. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ *M.TUBERCULOSIS COMPLEX* ΣΤΑ ΔΙΑΦΟΡΑ

ΕΙΔΗ

Μέθοδος MTBC

Μετά την εύρεση των θετικών δειγμάτων σε *M.tuberculosis complex* ελέγχθηκε το είδος του συγκεκριμένου μυκοβακτηρίου σε κάθε δείγμα. Στα 97 δείγματα έγινε ταυτοποίηση του είδους του μυκοβακτηρίου της φυματίωσης με PCR και υβριδισμό. Τα αποτελέσματα που πήραμε ήταν τα εξής: στα 97 δείγματα ταυτοποιήθηκαν 96 στελέχη *M.tuberculosis/M.canettii* και 1 *M.bovis BCG*. Όμως, δεν βρέθηκε κανένα θετικό δείγμα σε κάποιο από τα υπόλοιπα είδη: *M.africanum*, *M.bovis ssp. bovis*, *M.bovis ssp. caprae* και *M.microti*.

<i>Είδη M.tuberculosis complex</i>	<i>Αριθμός</i>	<i>Ποσοστό</i>
<i>M.tuberculosis/M.canettii</i>	96	98.97%
<i>M. africanum</i>	0	0
<i>M. microti</i>	0	0
<i>M. bovis BCG</i>	1	1.03%
<i>M.bovis ssp. bovis</i>	0	0
<i>M.bovis ssp. caprae</i>	0	0
Σύνολο	97	100%

Πίνακας 9. Αποτέλεσμα ταυτοποίησης του είδους των *M.tuberculosis complex*.

Όπως προκύπτει από τον **πίνακα 9** το 98.97% των στελεχών ήταν *M.tuberculosis/M.canettii* και το 1.03% *M.bovis BCG*. Τα αποτελέσματα αυτά είναι συμβατά και με άλλες μελέτες που έχουν διεξαχθεί στη χώρα μας.

III. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗ ΡΙΦΑΜΠΙΚΙΝΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΙΣΟΝΙΑΖΙΔΗ

Ο έλεγχος αντοχής στα κύρια αντιφυματικά φάρμακα 97 στελεχών *M.tuberculosis complex* που απομονώθηκαν από διαφορετικούς ασθενείς έγινε με τις μεθόδους MTBDRplus και αντιβιογράμμα (BACTEC MGIT 960). Η MTBDRplus είναι και μια πιο γρήγορη, δίνοντας αποτελέσματα σε 24 ώρες. Το αντιβιογράμμα επίσης είναι μια γρήγορη ποιοτική μέθοδος για την ανίχνευσης αντοχής των μυκοβακτηριδίων και αποτελέσματα μπορούμε να έχουμε εντός 4-15 ημερών. Σε ένα σύνολο αριθμού 97 απομονωθέντων στελεχών *M.tuberculosis complex* έγινε έλεγχος αντοχής σε δυο πρώτης επιλογής αντιφυματικά φάρμακα ισονιαζίδη (INH) και ριφαμπικίνη (RIF) με τις μεθόδους που προαναφέρθηκαν.

α) Μέθοδος MTBDR plus

Σε όλα τα στελέχη που ταυτοποιήθηκαν ως *M.tuberculosis complex* έγινε η δοκιμασία αντοχής σε ριφαμπικίνη και σε ισονιαζίδη. Για να αποσαφηνίσουμε τους μηχανισμούς που ενοχοποιούνται για την ανθεκτικότητα έναντι των δυο αντιβιοτικών, αρχικά προχωρήσαμε στην απομόνωση του γενετικού υλικού των υπό

μελέτη στελεχών χρησιμοποιώντας κυρίως το αυτόματο σύστημα Magtration 12GC σε συνδυασμό με το Magtration-MagaZorb DNA Common Kit-200 N και εν συνεχεία εφαρμόστηκε η μοριακή μέθοδος που ήταν συνδυασμός δυο, PCR και υβριδισμού.

Για την **ριφαμπικίνη** υπεύθυνο είναι το γονίδιο *rpoB*, το οποίο σε κάποια δείγματα έφερε μεταλλάξεις. Στο 96,91% των δειγμάτων δεν ανιχνεύτηκε μετάλλαξη στο γονίδιο *rpoB* ενώ σε ποσοστό 3,09% βρέθηκαν μεταλλάξεις (**Πίνακας 10**). Η ύπαρξη μεταλλαγμένου τύπου γονιδίου *rpoB* σε κάποια στελέχη *M.tuberculosis complex* αποδεικνύει την ανθεκτικότητα αυτών στη ριφαμπικίνη.

Γονίδιο <i>rpoB</i>	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό
Χωρίς Μετάλλαξη	94	96,91%
Με Μετάλλαξη	3	3,09%
Σύνολο	97	100%

Πίνακας 10. Αποτελέσματα μοριακής ταυτοποίησης των γονιδίων *rpoB* αγρίου και μεταλλαγμένου τύπου, άρα ανίχνευση των στελεχών που είναι ευαίσθητα και ανθεκτικά στην ριφαμπικίνη αντίστοιχα.

Για την **ισονιαζίδη** υπεύθυνα είναι δυο γονίδια, *katD* και *inhA*. Μεταλλάξεις στο πρώτο γονίδιο σχετίζονται με αντοχή σε υψηλή συγκέντρωση ισονιαζίδης ενώ μεταλλάξεις στο δεύτερο γονίδιο σχετίζονται με αντοχή σε χαμηλή συγκέντρωση ισονιαζίδης.

Όσον αφορά το γονίδιο *katG*, στο 95,88% των δειγμάτων δεν ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις, ενώ στο 4,12% ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις (**Πίνακας 11**). Όσον αφορά το γονίδιο *inhA* στο 98,97% των δειγμάτων δεν ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις και στο 1.03% ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις (**Πίνακας 12**). Η ύπαρξη μεταλλαγσεων σε οποιοδήποτε γονίδιο (*katG*, *inhA*) ή/και των δυο γονιδίων σε κάποιο στέλεχος *M.tuberculosis* αποδεικνύει ανθεκτικότητα αυτού στη ισονιαζίδη.

Γονίδιο <i>katG</i>	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό
Χωρίς Μετάλλαξη	93	95,88%
Με Μετάλλαξη	3	3,09%
Σύνολο	97	100%

Πίνακας 11. Αποτελέσματα μοριακής ταυτοποίησης των γονιδίων *katG* αγρίου και μεταλλαγμένου τύπου, άρα ταυτοποίηση των στελεχών που είναι ευαίσθητα και ανθεκτικά σε υψηλή συγκέντρωση ισονιαζίδης αντίστοιχα.

<i>Γονίδιο inhA</i>	<i>Αριθμός δειγμάτων</i>	<i>Ποσοστό</i>
Χωρίς Μετάλλαξη	96	98,97%
Με Μετάλλαξη	1	1.03%
Σύνολο	97	100%

Πίνακας 12. Αποτελέσματα μοριακής ταυτοποίησης των γονιδίων katG αγρίων και μεταλλαγμένου τύπου, άρα ταυτοποίηση των στελεχών που είναι ευαίσθητα και ανθεκτικά σε υψηλή συγκέντρωση ισονιαζίδης αντίστοιχα.

Από τους δυο πίνακες μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι το συνολικό ποσοστό των στελεχών *M.tuberculosis complex* που είναι ανθεκτικά στην ισονιαζίδα είναι 2,58% και ευαίσθητα 97,42%.

Στελέχη MTBC	Αντιβιοτικά	
	Ριφαμπικίνη (RIF)	Ισονιαζίδα(INH)
90	ευαίσθητα	ευαίσθητα
3	ανθεκτικά	ευαίσθητα
2	ευαίσθητα	υψηλή αντοχή
1	ευαίσθητα	χαμηλή αντοχή
1	ανθεκτικά	υψηλή αντοχή

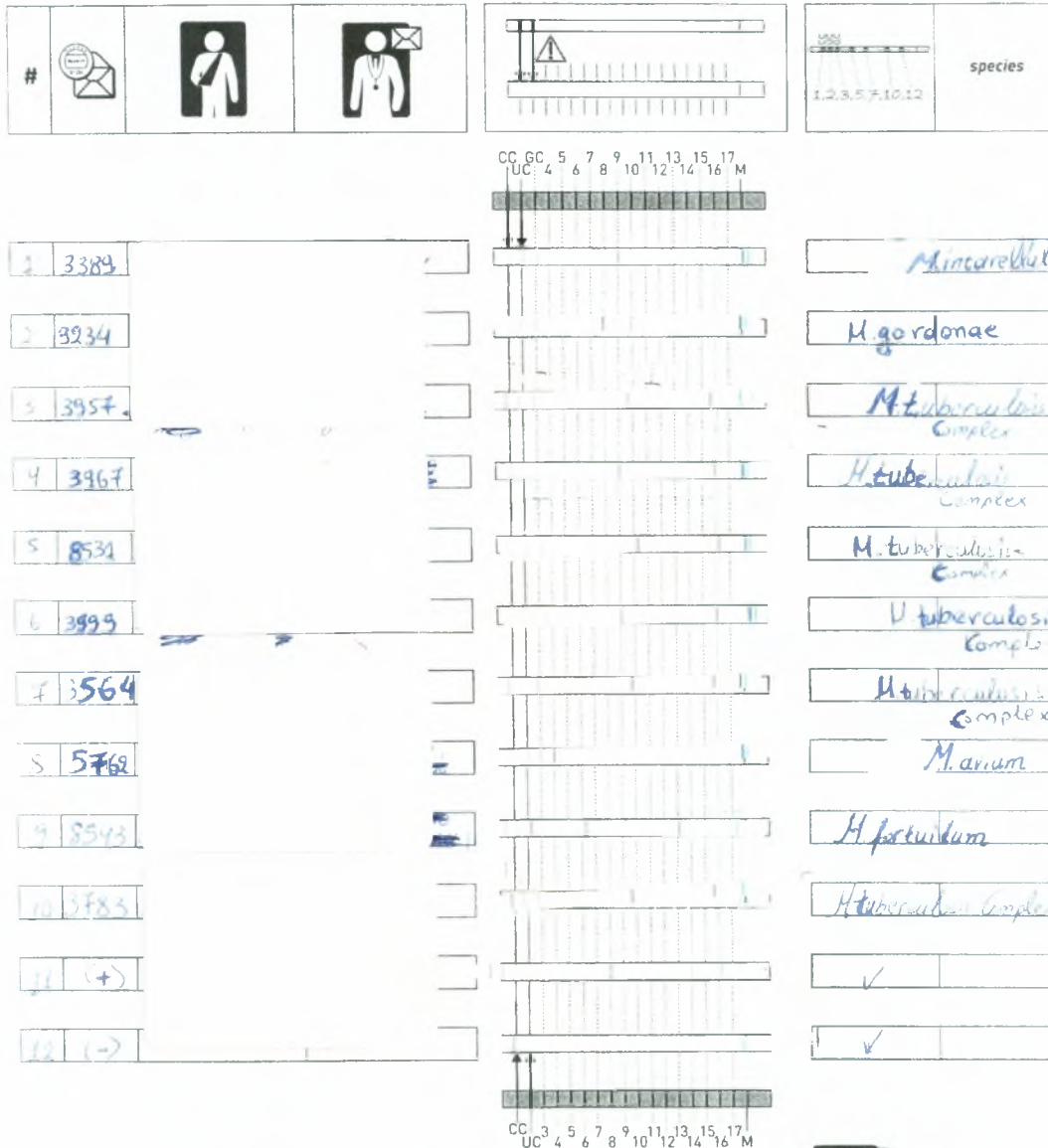
Πίνακας 13. Συγκεντρωτικός πίνακας των αποτελεσμάτων μοριακής ταυτοποίησης.

Όπως παρουσιάζονται στον **πίνακα 13** τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της ανίχνευσης αντοχής στη ριφαμπικίνη και στην ισονιαζίδα είναι τα εξής: α) 92,78% των στελεχών ήταν ευαίσθητα και στα δυο αντιβιοτικά, β) 3,09% των στελεχών ήταν ανθεκτικά στη ριφαμπικίνη και ευαίσθητα στην ισονιαζίδα, γ) 2,06% % των στελεχών ήταν ευαίσθητα στη ριφαμπικίνη και υψηλή αντοχή στην ισονιαζίδα δ) 1,03% των στελεχών ήταν ευαίσθητα στη ριφαμπικίνη και χαμηλή αντοχή στην ισονιαζίδα ε) 1,03% των στελεχών ήταν ανθεκτικά στη ριφαμπικίνη και υψηλή αντοχή στην ισονιαζίδα.

GenoType® Mycobacterium CM/AS 12

VER 1.0
00299-0507-02-3

dd mm yyyy
02 05 2019



LOT _____ HYB _____ min STR _____ min SUB _____ min

Εικόνα 21. Ενδεικτικό αποτέλεσμα ανάστροφον υβριδισμού για τα κοινά μυκοβακτηρίδια (*Common Mycobacteria, CM*). Όλα είναι *M. tuberculosis* complex εκτός από τα δείγματα που είναι *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. avium* spp. και *M. intracellulare* τα οποία και αποκλείστηκαν από τις περαιτέρω διαδικασίες.



GenoType® MTBC 12

VER 1.X

REF: 1107-02-A

18 07 2005
dd mm yyyy

#	Icon 1	Icon 2	Warning	Species
1 21			CC UC 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M	<i>M. tuberculosis</i> / <i>M. canettii</i>
2 45				<i>M. tuberculosis</i> / <i>M. canettii</i>
3 55				<i>M. tuberculosis</i> / <i>M. canettii</i>
4 56				<i>M. tuberculosis</i> / <i>M. canettii</i>
5 5f				<i>M. tuberculosis</i> / <i>M. canettii</i>
6 58				<i>M. tuberculosis</i> / <i>M. canettii</i>
7 59				<i>M. tuberculosis</i> / <i>M. canettii</i>
8 60				<i>M. tuberculosis</i> / <i>M. canettii</i>
9 61				<i>M. tuberculosis</i> / <i>M. canettii</i>
10 69				<i>M. tuberculosis</i> / <i>M. canettii</i>
11 65				<i>M. bovis</i> BCG
12 66				<i>M. tuberculosis</i> / <i>M. canettii</i>

LOT _____ HYB _____ min STR _____ min SUB _____ min

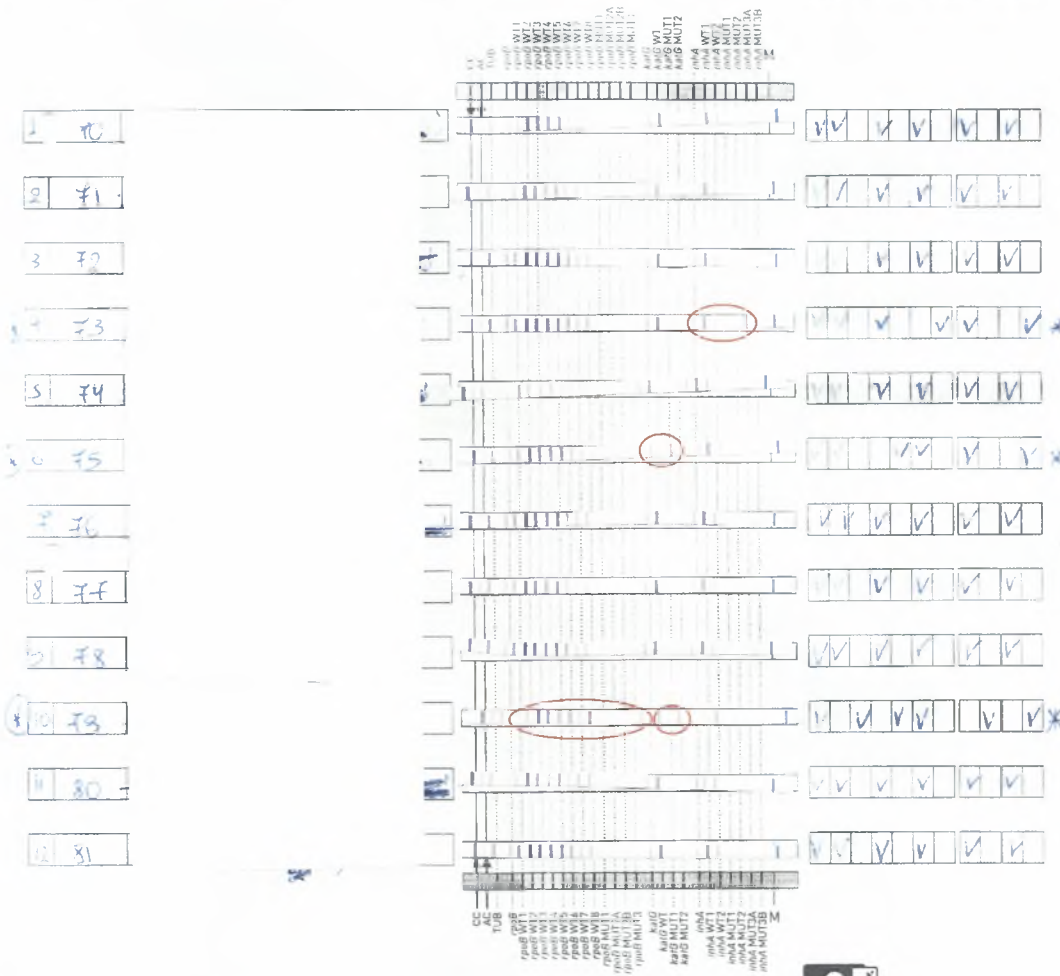
Εικόνα 22. Ενδεικτικό αποτέλεσμα ανάστροφου υβριδισμού για τα μυκοβακτήρια της φυματίωσης (*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC). Όλα είναι *M. tuberculosis*/*M. canettii* εκτός από το 11 που είναι *M. bovis* BCG.

GenoType® MTBDRplus 12

VER 1.0
00304-0507-02-2

14 07 2009
dd mm yyyy

#				TUB	RMP	INH
				rpoB-WT	sensitive	sensitive
				rpoB-MUT	resistant	resistant
				katG-WT		
				katG-MUT		
				inhA-WT		
				inhA-MUT		



LOT _____ HYB _____ min STR _____ min SUB _____ min

Εικόνα 24. Ενδεικτικό αποτέλεσμα ανάστροφου υβριδισμού για ευαισθησία ή ανοχή στην ριφαμπικίνη και ισονιαζίδη (MTBDRplus). Οι κόκκινοι κύκλοι περιλαμβάνουν ζώνες που αντιστοιχούν σε ανοχή σε ισονιαζίδη ή ριφαμπικίνη. Τα δείγμα 4 και 10 είναι ανθεκτικά σε ισονιαζίδη υψηλής συγκέντρωσης, το 6 επίσης σε ισονιαζίδη χαμηλής συγκέντρωσης και το 10 είναι ανθεκτικό στη ριφαμπικίνη. Τα δείγματα 1,2,3,5,7,8,9,11 και 12 είναι ευαίσθητα σε ριφαμπικίνη και ισονιαζίδη.

β) Αντιβιόγραμμα

Η ανίχνευση της αντοχής στην ριφαμπικίνη και στην ισονιαζίδη έγινε επίσης με αντιβιόγραμμα. Μια διαδικασία χρονοβόρα συγκριτικά με την μοριακή μέθοδο που προαναφέρθηκε, η οποία διαρκεί από 4 μέχρι 15 ημέρες. Σε σωλήνες MGIT προστέθηκε διάλυμα ισονιαζίδης και ριφαμπικίνης κατάλληλο για την ανίχνευση αντοχής και εναιώρημα από την θετική καλλιέργεια μυκοβακτηρίου *M.tuberculosis complex*.

Για την ριφαμπικίνη ανιχνεύτηκε ευαισθησία σε ποσοστό 97,94% και αντοχή σε ποσοστό 2,06% (Πίνακας 14).

<i>Ριφαμπικίνη</i>	<i>Αριθμός δειγμάτων</i>	<i>Ποσοστό</i>
Ευαισθησία	95	97,94%
Αντοχή	2	2,06%
Σύνολο	97	100%

Πίνακας 14. Έλεγχος αντοχής στη ριφαμπικίνη με αντιβιόγραμμα.

Για την ισονιαζίδη ανιχνεύτηκε σε ποσοστό ευαισθησία 92,78% και αντοχή σε ποσοστό 7,22% (Πίνακας 15).

<i>Ισονιαζίδη</i>	<i>Αριθμός δειγμάτων</i>	<i>Ποσοστό</i>
Ευαισθησία	90	92,78%
Αντοχή	7	7,22%
Σύνολο	97	100%

Πίνακας 15. Έλεγχος αντοχής στην ισονιαζίδη με αντιβιόγραμμα.

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ MTBDRplus-MGIT

<i>Αντιβιοτικά</i>	<i>Ευαισθησία</i>		<i>Ανθεκτικότητα</i>	
	<i>MTBDRplus</i>	<i>MGIT</i>	<i>MTBDRplus</i>	<i>MGIT</i>
Ριφαμπικίνη	96,91%	97,94%	3,09%	2,06%
Ισονιαζίδη	97,42%	92,78%	2,58%	7,22%

Πίνακας 16. Συγκριτικός πίνακας των αποτελεσμάτων ευαισθησίας και αντοχής στη ριφαμπικίνη και ισονιαζίδη.

Όπως παρατηρούμε στον παραπάνω **πίνακα 16**, στη ριφαμπικίνη παρουσίασαν αντοχή 2,06% των στελεχών στο αντιβιογράμμα και 3,09% στην μοριακή μέθοδο (MTBDRplus), ενώ στην ισονιαζίδη παρουσίασαν αντοχή 7,22% των στελεχών στο αντιβιογράμμα και 2,58% στην μοριακή μέθοδο.

Ριφαμπικίνη Μέθοδοι	Ευαισθησία	Ειδικότητα
MTBDRplus	100%	100%
Αντιβιογράμμα	67%	100%

Πίνακας 17. Συγκριτικός πίνακας ευαισθησίας και ειδικότητας στη ριφαμπικίνη.

Ισονιαζίδη Μέθοδοι	Ευαισθησία	Ειδικότητα
MTBDRplus	57,1%	100%
Αντιβιογράμμα	100%	100%

Πίνακας 18. Συγκριτικός πίνακας ευαισθησίας και ειδικότητας στην ισονιαζίδη.

Όπως προκύπτει από τους **πίνακες 17 και 18**, βρέθηκε ότι η μέθοδος είναι ευαίσθητη σε ποσοστό 67% (2/3). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι υπάρχουν μεταλλάξεις οι οποίες δεν εμφανίζουν αντοχή στο αντιβιοτικό. Όσον αφορά την ισονιαζίδη το αντιβιογράμμα είναι ευαίσθητο σε ποσοστό 100% και η μέθοδος MTBDRplus στην ισονιαζίδη είναι ευαίσθητη σε ποσοστό 57,1% (4/7). Όσον αφορά την ισονιαζίδη φαίνεται ότι και κάποιοι άλλοι μηχανισμοί πέρα από αυτούς που ανιχνεύσαμε στην παρούσα μελέτη ευθύνονται για αντοχή σε ισονιαζίδη.

Τονίζεται ότι μόνο ένα στέλεχος από όλα τα στελέχη που μελετήθηκαν εμφάνισε ταυτόχρονα αντοχή σε ριφαμπικίνη και ισονιαζίδη. Το στέλεχος αυτό απομονώθηκε από ασθενή από την Αφρική όπου κυκλοφορούν πολυανθεκτικά στελέχη μυκοβακτηρίων (*W.H.O 2009*).

Συζήτηση

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η φυματίωση είναι μια νόσος που ταλαιπωρεί το ανθρώπινο είδος από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα και εξακολουθεί να είναι θανατηφόρος παρά τη χρήση του εμβολίου BCG και την εισαγωγή αντιφυματικών φαρμάκων. Σήμερα, η ανάπτυξη της αντοχής του μυκοβακτηρίου της φυματίωσης στα αντιφυματικά φάρμακα έχει μεγαλώσει το πρόβλημα (Smith I, 2003). Η αύξηση της νοσηρότητας από φυματίωση σε συνδυασμό με την εμφάνιση πολυανθεκτικών στελεχών την τελευταία δεκαετία οδήγησε σε αύξηση του ενδιαφέροντος για εισαγωγή μεθόδων ταχείας ανίχνευσης, ταυτοποίησης και ελέγχου ευαισθησίας των μυκοβακτηριδίων στα αντιφυματικά φάρμακα με σκοπό τη γρήγορη διάγνωση και θεραπεία, διότι ως γνωστό με την κλασική καλλιέργεια οι μικροοργανισμοί αυτοί αναπτύσσονται αργά. Έτσι, οι μοριακές διαγνωστικές τεχνικές είναι απαραίτητο εργαλείο στη διάγνωση μυκοβακτηριακών λοιμώξεων (Fredricks DN & Relman DA, 1999).

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκαν μοριακές μέθοδοι οι οποίες περιλάμβαναν συνδυασμό αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και υβριδισμό για ταυτοποίηση των μυκοβακτηρίων που απομονώθηκαν από ασθενείς με πιθανή φυματίωση και ανίχνευση των γονιδίων αντοχής σε δυο κύρια αντιφυματικά φάρμακα (ριφαμπικίνη και ισονιαζίδη). Σε πληθώρα προηγούμενων μελετών έχουν εφαρμοσθεί οι μοριακές τεχνικές και ειδικότερα η PCR, για τη βελτίωση της διάγνωσης μυκοβακτηριακών λοιμώξεων (Manjunath et al, 1991, Pao et al, 1990, Wilson et al, 1993, Sritharan V and Barker RH, 1991). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικά τρεις μοριακοί μέθοδοι. Η πρώτη ήταν η μέθοδος CM, για την ταυτοποίηση όλων των μυκοβακτηρίων, τόσο του *M.tuberculosis complex* όσο και των άτυπων. Η δεύτερη ήταν η μέθοδος MTBC, όπου όσα μυκοβακτηρίδια ανήκουν στο *M.tuberculosis complex* διαχωρίστηκαν στα διάφορα είδη όπως *M.tuberculosis/M.canettii*, *M.africanum*, *M.bovis BCG*, *M.bovis ssp. bovis*, *M.bovis ssp. caprae*, *M.microti*. Η τρίτη ήταν η MTBDRplus για την ανίχνευση γονιδίων αντοχής σε ριφαμπικίνη και σε ισονιαζίδη.

Για την ταυτοποίηση των μυκοβακτηρίων αρχικά διαχωρίσαμε τα στελέχη *M.tuberculosis complex* από αυτά των άτυπων μυκοβακτηριδίων με τη μέθοδο CM. Απομονώθηκαν 97 στελέχη θετικά σε *M.tuberculosis complex* ενώ τα υπόλοιπα ήταν άτυπα μυκοβακτήρια. Συγκεκριμένα, ταυτοποιήθηκαν τα εξής άτυπα μυκοβακτηρίδια

M. fortuitum (9,91%), *M. gordonae* (5,79%), *M. intracellulare* (2,48%) και *M. avium* (1,65%). Τα τελευταία χρονιά έχουν δημοσιευτεί πολλές άλλες μελέτες όπου ταυτοποιήθηκαν τα *M. tuberculosis complex* και τα άτυπα μυκοβακτήρια με τη μέθοδο CM. Τα συχνότερα άτυπα μυκοβακτήρια που δημοσίευσαν οι Gitti Z. et al. (2006) ήταν τα *M. fortuitum* (31/76), *M. gordonae* (23/76) και *M. avium* (9/76) και *M. intracellulare* (2/76), ομοίως με την μελέτη μας. Για τους Elvira Richter et al (2006) τα πιο συχνά ήταν *M. avium* (5/156), *M. gordonae* (8/156), *M. kansasii* (7/156), *M. intracellulare* (8/156) και *M. fortuitum* (6/156). Επιπλέον οι Makinen et al (2006) δημοσίευσαν ως πιο κοινά άτυπα τα *M. avium* (42/211), *M. gordonae* (23/211), *M. intracellulare* (25/211), *M. fortuitum* (9/211). Παρατηρούμε ότι τα αποτελέσματα των τριών δημοσιεύσεων ήταν παρόμοια με της δικής μας μελέτης. Συμπεραίνουμε ότι η μέθοδος αυτή έχει αυξημένη ειδικότητα στα συχνότερο εμφανιζόμενα μυκοβακτήρια, δηλαδή μπορεί να συγκρίνει, να διαχωρίσει και να ταυτοποιήσει ταυτόχρονα μεγάλο αριθμό μυκοβακτηρίων τα οποία έχουν υψηλή συγγένεια μεταξύ τους (Elvira Richter et al, 2006).

Στην συνέχεια όσα μυκοβακτηρίδια βρέθηκε ότι ανήκουν στο *M. tuberculosis complex* ταυτοποιήθηκαν στα διάφορα είδη με τη μέθοδο MTBC. Τα αποτελέσματα ήταν η ανεύρεση του *M. tuberculosis/M. canettii* σε ποσοστό 98,97% και του *M. bovis BCG* σε ποσοστό 1,03%. Σε σύγκριση με παλιότερη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Κρήτη, βρέθηκαν ίδια ποσοστά για το *M. tuberculosis/M. canetti* (98,97%) ενώ για το *M. bovis* ταυτοποιήθηκε διαφορετικός υποτύπος, ο *M. bovis subsp. caprae* σε ποσοστό 1,03% (Neonakis et al, 2007). Παρατηρούμε ότι οι τιμές των ποσοστών δεν αποκλίνουν πολύ μεταξύ τους. Η ύπαρξη κατά κύριο λόγο του *M. tuberculosis/M. canettii* έγκειται στο γεγονός ότι τα δείγματα προέρχονται από Έλληνες ασθενείς. Αυτό επιβεβαιώνει τη θεωρία ότι πρόκειται για στελέχη που βρίσκονται κατά κύριο λόγο στην Ευρώπη και ενισχύεται από το γεγονός ότι ανήκουν σε στελέχη που εμφανίζονται στην ίδια Ελλάδα. Η απουσία των *M. africanum* φανερώνει ότι πρόκειται για στελέχη που προσβάλλουν κατά κύριο λόγο Αφρικανούς και όχι Ευρωπαίους. Όσον αφορά τα στελέχη *M. bovis* μεταδίδονται από τα βοοειδή και από το μη παστεριωμένο γάλα σε σπάνιες περιπτώσεις όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα της μελέτης μας. Το συγκεκριμένο στέλεχος προσβάλλει κατά κύριο λόγο τα θηλαστικά (Kubica et al., 2003).

Τα 97 θετικά στελέχη σε *M.tuberculosis complex* απομονώθηκαν στα πτύελα σε ποσοστό 50,51%, στις βρογχικές εκκρίσεις 18,56%, στα γαστρικά υγρά 16,49%, στα πλευριτικά υγρά 6,19%, στο πύο 4,12%, στο αρθρικό 2,06% και στα ούρα 2,06%. Το μεγαλύτερο ποσοστό θετικών δειγμάτων ήταν πτύελα και βρογχικών εκκρίσεων η φυματίωση είναι μια νόσος που προσβάλλει κατά κυρίως τους πνεύμονες και σπανιότερα άλλα όργανα.

Μέχρι σήμερα υπάρχουν μόνο τρεις δημοσιευμένες μελέτες όσον αφορά την ανθεκτικότητα των *M.tuberculosis complex* στην Ελλάδα. Στην πρώτη μελέτη των *Trakada et al.* έγινε αποτίμηση της κατάστασης του *M.tuberculosis* στην περιοχή της Πάτρας (*Trakada G. et al, 2004*). Στην δεύτερη των *Kanavaki et al.*, αποτιμήθηκε η αντοχή του *M.tuberculosis* στην ριφαμπικίνη, ισονιαζίδη και μελετήθηκε επίσης η πολυανθεκτικότητα μεταξύ Ελλήνων και μεταναστών χρησιμοποιώντας δείγματα προερχόμενα κυρίως από την ασθενείς που ζούσαν στην Αθήνα. Στην τρίτη μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε στην Κρήτη από τους *Neonakis et. al* (*Neonakis et al, 2007*), έγινε ανίχνευση της αντοχής σε στελέχη *M.tuberculosis* σε αυτό το νησί. Όταν συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα μας (INH: 4,11% και RMP: 3%) με αυτά της πρώτης μελέτης υπήρξαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στα ποσοστά αντοχής μεταξύ των ανθεκτικών (*Kanavaki S et al, 2006*). Μια πιθανή εξήγηση για τα χαμηλά ποσοστά αντοχής της μελέτης μας είναι η απουσία μεταναστών στην περιοχή μας.

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης και των άλλων μελετών μπορούμε να οδηγηθούμε στο συμπέρασμα ότι η ριφαμπικίνη είναι ένα φάρμακο που εμφανίζει ανθεκτικότητα σε μικρότερο βαθμό από ότι η ισονιαζίδη στην Ελλάδα. Αντιθέτως, σε προηγούμενες μελέτες σε άλλες χώρες αποδείχτηκε ότι η ανθεκτικότητα στη ριφαμπικίνη παρουσιάζεται λιγότερο συχνά από την ισονιαζίδη (*Pablos-Mendez et al, 1994–1997, Scorpio, A., and Y. Zhang. 1996*).

Παρόμοιες έρευνες όσων αφορά την αντοχή των *M.tuberculosis complex* σε ριφαμπικίνη και ισονιαζίδη πραγματοποιήθηκαν και σε άλλες χώρες της Ευρώπης. Στην Γερμανία, οι *Hillemann et al* (2007) δημοσίευσαν για τη ριφαμπικίνη και την ισονιαζίδη ανθεκτικότητα σε ποσοστό 91.7% και 73% αντίστοιχα και στην Ιταλία για τους *Miotto et al.*(2008), η αντοχή στην ισονιαζίδη βρέθηκε σε ποσοστό 79,1 % και στη ριφαμπικίνη 91.7%. Επιπλέον, οι *Lacoma et al* (2008) δημοσίευσαν ανθεκτικότητα στη ριφαμπικίνη σε ποσοστό 91.7% και στην ισονιαζίδη 73%.

Οι *Heym et al.* (1994) και *Wattersson et al.*(1998) παρατήρησαν ότι η αντοχή στην ριφαμπικίνη εμφανίζεται συνήθως μαζί με αντοχή στην ισονιαζίδη

(πολυανθεκτικότητα). Συμπέρασμα που στην παρούσα μελέτη δεν επιβεβαιώθηκε, διότι μόνο ένα από τα τρία ανθεκτικά δείγματα εμφάνισε ταυτόχρονα αντοχή στη ριφαμπικίνη και στην ισονιαζίδη.

Στην παρούσα εργασία η ευαισθησία της μοριακής μεθόδου σε σχέση με το κλασσικό αντιβιογράμμα ήταν 57,1% για την ισονιαζίδη και 100% για την ριφαμπικίνη, ενώ η ειδικότητα ήταν 100% για τα δυο αντιφυματικά. Παρόμοιες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί σε πολλά εργαστήρια στην υψηλότερη καταλήγοντας σε διαφορετικά συμπεράσματα συγκριτικά με τη δική μας. Οι *Freddie Bwanga et al. (2009)* απέδειξαν αυξημένη ευαισθησία (100%) για την ισονιαζίδη, άλλα μικρότερη ειδικότητα (96%), ενώ για την ριφαμπικίνη η ειδικότητα και η ευαισθησία ήταν όμοιες (99%). Σε άλλη μια δημοσίευση οι *Ling et al. (2008)* παρουσίασαν όμοιο ποσοστό ευαισθησίας και ειδικότητας για τη ριφαμπικίνη (98% και 99%) και ειδικότητας για την ισονιαζίδη (100%), άλλα η ευαισθησία για την ισονιαζίδη ήταν αυξημένη σε ποσοστό 84%. Σε μια επιπλέον η ευαισθησία και η ειδικότητα για αντοχή στη ριφαμπικίνη και ισονιαζίδη ήταν 96.2%, 97.4% και 90.7%, 83.3% αντίστοιχα (*Vladyslav Nikolayevskyy et al, 2009*). Σε μια τελευταία έρευνα στην Βόρεια Αφρική η αντοχή στην ριφαμπικίνη ήταν χαμηλότερη από τη δική μας και υψηλότερη για την ισονιαζίδη (*Barnard M et al, 2008*).

Πολυανθεκτικότητα στην παρούσα μελέτη βρέθηκε μόνο σε ένα στέλεχος, το οποίο ήταν το μοναδικό δείγμα ασθενούς που καταγόταν από την Αφρική. Αυτό είναι λογικό διότι στην Αφρική τα περισσότερα στελέχη είναι ανθεκτικά σε ριφαμπικίνη και ισονιαζίδη ταυτόχρονα (*W.H.O. 2009*). Οι ασθενείς μολύνονται από ανθεκτικά στελέχη των μυκοβακτηριδίων της φυματίωσης σε πολλά φάρμακα ταυτόχρονα σπάνια. Η θεραπεία αυτών είναι περισσότερο τοξική και ακριβή από τη θεραπεία των ασθενών που μολύνονται από ευαίσθητα μυκοβακτήρια (*Goble et al, 1993, Mahmoudi et al, 1993*).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Οι μοριακές μέθοδοι είναι σημαντικό εργαλείο για τη διάγνωση των μυκοβακτηριακών λοιμώξεων.
- Η γρήγορη ταυτοποίηση του υπεύθυνου μικροοργανισμού, μέχρι και 2 ώρες, σε συνδυασμό με τη γνώση της επιδημιολογίας της αντοχής στην περιοχή, συμβάλλει στην εφαρμογή της κατάλληλης θεραπείας.
- Η μοριακή μέθοδος CM (PCR-υβριδισμός) είναι ιδιαιτέρως χρήσιμη στην ταυτοποίηση άτυπων μυκοβακτηριδίων και μυκοβακτηριδίων της φυματίωσης. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγεται η άσκοπη χορήγηση αντιφυματικής θεραπείας.
- Η μοριακή μέθοδος MTBC (PCR-υβριδισμός) είναι ιδιαιτέρως χρήσιμη για επιδημιολογικούς σκοπούς στην ταυτοποίηση του είδους του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης. Στην Ελλάδα κυκλοφορεί το είδος *M.tuberculosis/M.canettii*.
- Η μοριακή μέθοδος MTBDRplus (PCR-υβριδισμός) είναι μια γρήγορη μέθοδος ανίχνευσης αντοχής σε ριφαμπικίνη και ισονιαζίδη, δεδομένου ότι το κλασσικό αντιβιογράμμα απαιτεί δυο βδομάδες μέχρι την ολοκλήρωση του.
- Η μοριακή μέθοδος MTBDRplus (PCR-υβριδισμός) έχει μεγάλη ευαισθησία για ανίχνευση αντοχής στην ριφαμπικίνη, ενώ λιγότερο για την ισονιαζίδη.
- Σύμφωνα λοιπόν με τα αποτελέσματα της μελέτης μας η αντοχή στην ριφαμπικίνη και στην ισονιαζίδη είναι χαμηλή στην περιοχή της Θεσσαλίας.

Περίληψη

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια παγκόσμια αναζωπύρωση της φυματίωσης γεγονός που οδήγησε στην αύξηση της διεθνούς ενδιαφέροντος έρευνας με σκοπό τον περιορισμό της μετάδοσης των μυκοβακτηριδιακών λοιμώξεων. Ώθηση στην έρευνα αυτή δίνει η εισαγωγή στην κλινική διάγνωση γρήγορων και ευαίσθητων μοριακών μεθόδων. Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκαν μοριακές μέθοδοι με σκοπό τη διάγνωση της φυματίωσης τόσο στην ταυτοποίηση του μικροοργανισμού σε επίπεδο γένους και είδους όσο στην ανίχνευση γονιδίων αντοχής σε διάφορα αντιφυματικά φάρμακα σε κλινικά δείγματα ασθενών με υποψία φυματίωσης στην περιοχή της Θεσσαλίας την περίοδο 2008-2009. Οι μοριακοί μέθοδοι αυτοί ήταν συνδυασμός αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και υβριδισμού. Ο συνδυασμός PCR και υβριδισμού επιλέχτηκε διότι με τη τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης έχουμε μεγαλύτερη ευαισθησία ενώ με τον υβριδισμό μεγαλύτερη ειδικότητα. Η πρώτη μοριακή μέθοδος ήταν η μέθοδος CM με την οποία ταυτοποιήθηκαν 97 στελέχη *M.tuberculosis complex*. Τα υπόλοιπα 24 στελέχη ταυτοποιήθηκαν στα επόμενα άτυπα μυκοβακτήρια *M.fortuitum*, *M.gordoniae*, *M.intracellulare* και *M.avium*. Η δεύτερη ήταν η μέθοδος MTBC με την οποία διαχωρίζονται τα *M.tuberculosis complex* στα διάφορα είδη *M.africanum*, *M.bovis BCG*, *M.bovis ssp. bovis*, *M.bovis ssp. caprae*, *M.microti* και *M.tuberculosis/M. canettii*. Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε το είδος *M.tuberculosis/M.canettii* σε ποσοστό 98,97% και το είδος *M.bovis BCG* σε ποσοστό 1,03%. Η τρίτη ήταν η μέθοδος MTBDRplus με την οποία ανιχνεύτηκαν γονίδια αντοχής στη ριφαμπικίνη και στην ισονιαζίδη των στελεχών *M.tuberculosis complex*. Το γονίδιο που σχετίζεται με την έκφραση αντοχής στην ριφαμπικίνη βρέθηκε σε ποσοστό 3,09%, το γονίδιο που σχετίζεται με αντοχή σε υψηλή συγκέντρωση ισονιαζίδης 3,09% και το γονίδιο που σχετίζεται με αντοχή σε χαμηλή συγκέντρωση ισονιαζίδης 1.03%. Η ευαισθησία της μοριακής μεθόδου για την ριφαμπικίνη ήταν 100% ενώ για την ισονιαζίδη ήταν 57,1%. Η ειδικότητα της μοριακής μεθόδου και για τα δυο αντιφυματικά φάρμακα ήταν 100%. Συμπερασματικά, λοιπόν στην περιοχή της Θεσσαλίας τα ποσοστά αντοχής για τη ριφαμπικίνη και την ισονιαζίδη είναι χαμηλά.

Βιβλιογραφία

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αντωνιάδης Α., Αντωνιάδης Γρ., Γεγάκης Ν., Τσελέντης Ι. 1999. Ιατρική Μικροβιολογία. 2^{ος} Τόμος. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη.

Γουργουλιάνης Κ., Μπουρος Δ. 2002. Νόσοι του Αναπνευστικού Συστήματος. 5^η Έκδοση (S.J. Bourke, R.A.L. Brewis). Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιανού Α.Ε. ISBN:960-394-161-1.

Δημητρακόπουλος Γ.Ο. 1987. Εισαγωγή στην Κλινική Μικροβιολογία και τα Λοιμώδη Νοσήματα. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη.

Δημητρακόπουλος Γ.Ο. 1987. Ιατρική Βακτηριολογία. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη.

Θεοχαρίδης Θ.Κ. 1997. Φαρμακολογία. Βασικές έννοιες στην κλινική πράξη. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας.

Κούζης Α. 1929. Ιστορία της Ιατρικής. Αθήνα.

Λαμέρας Ι. Αι περί ιατρικής γνώσης του Αριστοτέλους. Αθηνά 1967.

Λεμπέσης Ι. 1983. Η ιστορία της φυματίωσης. Από την Προϊστορική Περίοδο ως την ανακάλυψη του βακίλλου του KOCH. Διδακτορική διατριβή. Αθήνα.

Λιώκης Θ. 1974. Φυματιολογία- Πνευμονιολογία. Αθήνα.

Μπάστας Α., Τάτσης Γ. 1997. Φαρμακοδυναμική αντιφυματικών φαρμάκων. Εκδόσεις Ελληνικής Πνευμονολογικής Εταιρείας. Αθήνα.

Ιπποκράτους Άπαντα, Τόμος Β' Αφορισμοί. Εκδόσεις Μαρτίνου. Αθήνα 1969.

Παπαβασιλείου Ι., Ρόζος Β. 1979. Εγχειρίδιο Ιστορίας της Ιατρικής. Αθήνα.

Ροζος Β. 1973. Η φυματίωσης παρά Ιπποκράτη και Γαληνώ. Αθήνα.

Σωκράτης Ι. Τζάρτος, 2004. QuantiFERON-TB Gold

Σωτηρίου Α. Ράπτη. 2006. Εσωτερική Παθολογία. 1^{ος} Τόμος. 2^η Έκδοση. Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισινού Α.Ε. ISBN: 960-394-418-1.

Agarwal et al. 2005. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 4:18.

Alao AO, Yolles JC. 1998. Isoniazid-induced psychosis. *The Annals of Pharmacotherapy* 32 (9): 889–91.

Alito A, Morcillo N, Scipioni S, Dolmann A, Romano M, Cataldi A, et al. 1999. The IS6110 restriction fragment length polymorphism in particular multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains may evolve too fast for reliable use in outbreak investigation. *J. Clin. Microbiol.* 37: 788-791.

Ashok Rattan, Awdhesh Kalia, and Nishat Ahmad. 1998. Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular Perspectives.

Barenfanger, J. 1993. Making your lab safe against multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Newsl.* 15:76-80.

Bariety, Coury, Fayard. 1963. *Histoire de la Medicine.* Paris.

Barnard M, Albert H, Coetzee G, O'Brien R, Bosman ME. 2008. Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in a high-volume public health laboratory in South Africa. *Am J Respir Crit Care Med.* 177(7):787-792.

Bhamidi S. 2009. Mycobacterial Cell Wall Arabinogalactan. *Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends.*

Bishop J. 1966. Some recent papers on the history of tuberculosis. *Tubercule, Lond.* 46, 301.

Brandau, S., and A. Bohle. 2001. Therapy of bladder cancer with BCG: the mechanism behind a successful immunotherapy. *Mod. Asp. Immunobiol.* 2: 37–41.

Brosch, R., S. V. Gordon, M. Marmiesse, P. Brodin, C. Buchrieser, K. Eiglmeier, T. Garnier, C. Gutierrez, G. Hewinson, K. Kremer, L. M. Parsons, A. S. Pym, S. Samper, D. van Soolingen, and S. T. Cole. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis complex*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:3684–3689.

Bwanga Freddie, Sven Hoffner, Melles Haile, and Moses L Joloba. 2009. Direct susceptibility testing for multi drug resistant tuberculosis: A meta-analysis.

Castiglioni A. 1961. Ιστορία της Ιατρικής. Μινώταυρος. Αθήνα.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2000. Division of Tuberculosis Elimination. Core Curriculum on Tuberculosis: What the Clinician Should Know. 4th edition.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2005. Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* New York City, 2001–2004. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 54:605–608.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2005. Surveillance Slide Set.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2006. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs—worldwide, 2000–2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 55 (11): 301–5.

Collins, R Douglas. 1985. Atlas of Drug Reactions. New York, NY: ChurchillLivingstone, pp. 123.

Conville, P.S., J.F. Keiser, and F.G. Witebsky. 1989. Mycobacterium caused by simultaneous infection with *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* detected by analysis of a BACTEC 13A bottle with the Gen-Probe kit, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 12, 217-19.

Conzalez, R., and B.A. Hanna. 1987. Evaluation of Gen-Probe DNA hybridization systems for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-intracellulare*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 8, 69-77.

Cousins, D. V., R. Bastida, A. Cataldi, V. Quse, S. Redrobe, S. Dow, P. Duignan, A. Murray, C. Dupont, N. Ahmed, D. M. Collins, W. R. Butler, D. Dawson, D. Rodriguez, J. Loureiro, M. I. Romano, A. Alito, M. Zumarraga, and A. Bernardelli. 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:1305–1314.

David, H. L., M. T. Jahan, A. Jumin, J. Grandry, and E. H. Lehman. 1978. Numerical taxonomy analysis of *Mycobacterium africanum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28:464–472

Davies PD. 2003. The world-wide increase in tuberculosis: how demographic changes, HIV infection and increasing numbers in poverty are increasing tuberculosis. *Annals of medicine* 35 (4): 235–43.

Davies PDO, Yew WW, Ganguly D, et al. 2006. Smoking and tuberculosis: the epidemiological association and pathogenesis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100 (4): 291–8.

Deborah A. Nickerson, Robert Kaiser, Stephen Lappin, Jason Stewartt, Leroy Hood, And Ulf Landegrent. 1990. Automated DNA diagnostics using an ELISA-based oligonucleotide ligation assay, *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* Vol. 87, pp. 8923-8927.

Domenech, P., Barry, C. E.III & Cole, S. T. 2001. *Mycobacterium tuberculosis* in the post-genomic age. *Curr Opin Microbiol* 4, 28-34.

Drake, T. A., J. A. Hindler, G. W. Berlin, and D. A. Bruckner. 1987. Rapid identification of *Mycobacterium avium* complex in culture using DNA probes. *J. Clin. Microbiol.* 25:1442-1445.

Dubos R. και Dubos J. 1953. The white plague. Tuberculosis, man and society. Little Brown and Co. Boston.

Durek, C., E. Richter, A. Basteck, S. Rusch-Gerdes, J. Gerdes, D. Jocham, and A. Bohle. 2001. The fate of bacillus Calmette-Guerin after intravesical instillation. J. Urol. 165:1765–1768

Eisenach, Kathleen D., et al. 1990. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. J. Infect. Dis. 161:977-981.

Eisenach K D, J T Crawford and J H Bates. 1988. Repetitive DNA sequences as probes for *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol. 26(11): 2240-2245

Eisenach, K. D., Sifford, M.D., Cave, M.D., et al. 1991. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction. Am. Rev. Resp. Dis. 144: 1160-1163

Eisenstein BI. 1990. The polymerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. N Engl J Med. 332:178-183.

Elbir H, Abdel-Muhsin AM, Babiker A. 2008. A one-step DNA PCR-based method for the detection of *Mycobacterium tuberculosis complex* grown on Lowenstein-Jensen media. Am. J. Trop. Med. Hyg. 78 (2): 316–7.

Erlich, Henry, W Ford Doolittle, Volker Neuhoff, and et al. 1973. Molecular Biology of Rifomycin. New York, NY: MSS Information Corporation, pp. 44-45, 66-75, 124-130.

Elvira Richter, Sabine Ru"sch-Gerdes, and Doris Hillemann. 2006. Evaluation of the GenoType Mycobacterium Assay for Identification of Mycobacterial Species from Cultures, Journal Of Clinical Microbiology. p. 1769–1775.

Fauci, Braunwald, Kasper, Hauser, Longo, Jameson, Loscalzo. 2008. Principles of international medicine. 17th edition.

Fine, P. E. 1995. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet* 346:1339-1345.

Frank Ryan. 1992. Tuberculosis: The greatest story never tol. Swift Publishers.

Fredricks DN & Relman DA. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. *CID* 1999, 29:475-488.

Ghosh, Jaydip, Pontus Larsson, Bhupender Singh, B M Fredrik Pettersson, Nurul M Islam, Sailendra Nath Sarkar, Santanu Dasgupta, y Leif A Kirsebom. 2009. Sporulation in mycobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, no. 26 (Junio 30): 10781-10786.

Goble, M., M. D. Iseman, L. A. Madsen, D. Waite, L. Ackerson, and C. R. Horsburgh. 1993. Treatment of 171 patients with pulmonary tuberculosis resistant to isoniazid and rifampin. *N. Engl. J. Med.* 328:527–532

Godreuil S, Tazi L, Banuls AL. 2007. Pulmonary tuberculosis and *Mycobacterium tuberculosis*: modern molecular epidemiology and per spectives. In: Tibayrenc M, editor. *Encyclopedia of infectious diseases: modern methodologies.* New Jersey:Wiley-Liss. p.1–29

Griffith D, Kerr C. 1996. "Tuberculosis: disease of the past, disease of the present". *J Perianesth Nurs* 11 (4): 240–5.

Grmek M. D. 1989. Οι ασθένειες στην αυγή του δυτικού πολιτισμού, Εκδόσεις Χατζηνικολή Ι.

Hans L Riede. 2009. Fourth-generation fluoroquinolones in tuberculosis. *Lancet* 373 (9670): 1148–1149.

Hardman, Joel G., Lee E. Limbird, and Alfred G. Gilman, eds. 2001. Rifampin. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10th ed. United States of America: The McGraw-Hill Companies. pp. 1277-1279.

Herrmann J, Lagrange P. 2005. Dendritic cells and *Mycobacterium tuberculosis*: which is the Trojan horse? *Pathol Biol (Paris)* 53 (1): 35–40.

Hershkovitz, I, Donoghue, HD, Minnikin, DE, Besra, GS, Lee, OY, Gernaey, AM, Galili, E, Eshed, V et al. 2008. Detection and Molecular Characterization of 9000-Year-Old *Mycobacterium tuberculosis* from a Neolithic Settlement in the Eastern Mediterranean.

Heym, B., N. Honore, C. Truffot-Pernot, A. Banerjee, C. Schurra, W. R. Jacobs, Jr., J. D. A. van Embden, J. H. Grosset, and S. T. Cole. 1994. Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis: a molecular study. *Lancet* 344:293–298.

Hillemann D, Rusch-Gerdes S, Richter E. 2007. Evaluation of the GenoType MTBDRplus assay for rifampicin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 45(8):2635-2640.

Hippocrates. 2006.

Houben E, Nguyen L, Pieters J. 2006. Interaction of pathogenic mycobacteria with the host immune system. *Curr Opin Microbiol* 9 (1): 76–85.

Jaggi's O.P. 1961. Chest disease in ancient Hinu medicine, *Indian J. Chest Dis.* 3, 124.

Jensen F. 1932. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr., Abt. 1 Orig.*, 125:222.

- Jha P, Jacob B, Gajalakshmi V, et al.** 2008. A nationally representative case-control study of smoking and death in India. *N Engl J Med* 358 (11): 1137–1147.
- Kanavaki S, Mantadakis E, Nikolaou S, Papavassiliou A, Karambela S, Anagnostou S, Falagas ME, Samonis G.** (2006) Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in different populations in Greece during 1993-2002. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2006 May;10(5):559-64.
- Keller, G.H. and Manak, M.M.** 1989. *DNA Probes*, Stockton Press. New York.
- Lacoma A., Garcia-Sierra N., Prat C., Ruiz-Manzano J., Haba L., Rose's S., Maldonado J., and Domínguez J.** 2008. GenoType MTBDRplus Assay for Molecular Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Strains and Clinical Samples.
- Koneman E.W., Allen St. D., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Winn W.C.** 1992. *Diagnostic Microbiology*. Lippincott Company. 16:703-752.
- Konno, K., F. M. Feldmann, and W. McDermott.** 1967. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *Am. Rev. Respir. Dis.* 95: 461–469.
- Konomi N, Lebwohl E, Mowbray K, Tattersall I, Zhang D.** 2002. Detection of mycobacterial DNA in Andean mummies. *J Clin Microbiol* 40 (12): 4738–40.
- Kramer R. And Tyagi S.** 1996. Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.* 14: 303-308.
- Kubica, T., S. Rusch-Gerdes, and S. Niemann.** 2003. *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* caused one-third of human *M. bovis*-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. *J. Clin. Microbiol.* 41: 3070–3077.
- Kumar, Vinay; Abbas, Abul K., Fausto, Nelson & Mitchell, Richard N.** 2007. *Robbins Basic Pathology* (8th ed.). Saunders Elsevier. pp. 516–522.
- Leake D.C.** 1952. *The old egyptian medical papyri.*

Leary, J.J. and Ruth, J.L. 1989. Nonradioactive labeling of nuclei acid probes, in *Nucleic Acid and Monoclonal Antibody Probes*, (eds, B. Swaminathan and G. Prakash). Dakker. New York. pp. 33-57.

Lehmann, K.B. and Rudolf Neumann. 1896. *Lehmann's Med. Handatlaten, X. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speciellen bakteriologischen Diagnostik.* J. F. Lehmann, Miinchen. 1 Aufl. 2: 1-448.

Le Flèche, P., Fabre, M., Denoeud, F., Koeck, J. L. & Vergnaud, G. 2002. High resolution, on-line identification of strains from the *Mycobacterium tuberculosis complex* based on tandem repeat typing. *BMC Microbiol* 2, 37

Lewin, B. 2004. *Genes VIII.* Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.

Lim, S.D., J. Lopez, E.Ford, and J.M. Janda 1991. Genotyping identification of pathogenesis *Mycobacterium* species by using a monradioactive oligonucleotide probe, *Journal of Clinical Microbiology.* 29, 1276-78.

Ling DI, Zwerling AA, Pai M. 2008. GenoType MTBDR assays for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: a meta-analysis. *Eur Respir J.* 32(5):1165-1174.

Long, James W. 1991. *Essential Guide to Prescription Drugs 1992.* New York: HarperCollins Publishers. pp. 925–929.

Lowenstein, E. 1931. *Zentralbl. Bakteriol. Parasetenk. Infektionskr.,* 120:127.

Lowenstein, E. 1933. *Ann. Inst. Pasteur.* 50:161.

Lubert Stryer. 1997. *Βιοχημεία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. Τόμος Ι.*

Mahmoudi, A., and M. D. Iseman. 1993. Pitfalls in the care of patients with tuberculosis. *JAMA* 270:65–68.

Makinen J., Marjamaki M., Marttila H. and Soini H. 2006. Evaluation of a novel strip test, GenoType Mycobacterium CM/AS, for species identification of mycobacterial cultures. *Clinical Microbiology and Infection*. p.478–495

Manjunath N, Shankar P, Rajan L, Bhargava A, Saluja S, and Shriniwas. 1991. Evaluation of polymerase chain reaction for the diagnosis of tuberculosis. *Tubercle* 72:21-27.

Matthews, J. A. & Kricka, L. J. 1988. Analytical strategies for the use of DNA probes. *Analytical Biochemistry* 169, 1-25.

McIlleron H, Willemsse M, Werely CJ, et al. 2009. Isoniazid plasma concentrations in a cohort of South African children with tuberculosis: implications for international pediatric dosing guidelines. *Clinical Infectious Diseases* 48 (11): 1547–53.

McMurray DN 1996. Mycobacteria and Nocardia. in Baron S *et al.* (eds.). *Baron's Medical Microbiology* (4th ed.). Univ of Texas Medical Branch.

Meachen N.G. A short history of tuberculosis. London 19.

Meyer H, Mally J. On hydrazine derivatives and pyridine carbonic acids (in German). *Monatshefte Chemie verwandte Teile anderer Wissenschaften* 23: 393–414.

Michael T. Madican, John M. Martinko, Jack Parker. 2005. Βιολογία των Μικροοργανισμών. Τόμος Ι., Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.

Miotto P, Piana F, Cirillo DM, Migliori GB. 2008. Genotype MTBDRplus: a further step toward rapid identification of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 46(1):393-394.

Morce D., Brothwell D, and Ucko P. 1964. Tuberculosis in ancient Egypt, *Amer. Rev. Tuberc.* 90, 524.

Morce D. 1967. Tuberculosis. *Disease in Antiquity*, 249, 271.

- Morse DI.** 1996. Directly observed therapy for tuberculosis. 312: 719-20.
- Mullis, K. B., and F. A. Faloon.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-350.
- Mullis KB.** 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am.* 262:56-65.
- Musial, C. E., L. S. Tice, L. Stockman, and G. D. Roberts.** 1988. Identification of mycobacteria from culture by using the Gen-Probe Rapid Diagnostic System for *Mycobacterium avium complex* and *Mycobacterium tuberculosis complex*. *J. Clin. Microbiol.* 26:2120-2123.
- Myers TW, Gelfand DH.** 1991. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry.* 30:7661-66.
- Meachen N.G.** 1936. A short history of tuberculosis, London
- Neonakis I. K. & Gitti Z. & Petinaki E. & Maraki S. & Spandidos D. A.** 2007. Evaluation of the GenoType MTBC assay for differentiating 120 clinical *Mycobacterium tuberculosis complex* isolates.
- Nicas M, Nazaroff WW, Hubbard A.** 2005. Toward understanding the risk of secondary airborne infection: emission of respirable pathogens. *J Occup Environ Hyg* 2 (3): 143–54.
- Niemann, S., E. Richter, and S. Rusch-Gerdes.** 2000. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis complex* by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. *J. Clin. Microbiol.* 38:152–157.
- Niemann, S., E. Richter, and S. Rusch-Gerdes.** 2002. Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *Caprae* Aranaz et al.

1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae*. comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:433–436.

O'Reilly LM, Daborn CJ. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis.* 76 Suppl 1:1–46.

O'Sullivan, D. M., McHugh, T. D., Gillespie, S. H. 2005. Analysis of *rpoB* and *pncA* mutations in the published literature: an insight into the role of oxidative stress in *Mycobacterium tuberculosis* evolution. *J Antimicrob Chemother* 55: 674-679.

Pablos-Mendez, A., M. C. Raviglione, A. Laszlo, N. Binkin, H. L. Rieder, F. Bustreo, D. L. Cohn, C. S. B. Lambregts-van Weezenbeek, S. J. Kim, P. Chaulet, and P. Nunn. 1998. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994–1997.

Pallone KA, Goldman MP, Fuller MA. 1993. "Isoniazid-associated psychosis: case report and review of the literature". *The Annals of Pharmacotherapy* 27 (2): 167–70.

Pao CC, Yen TS, You JB, Maa JS, Fiss EH, and Chang CH. 1990. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. *J. Clin. Microbiol.* 28:1877-1880.

Patrinos George P., Wilhelm Ansorge, 2005. Μοριακή Διαγνωστική. Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισσιανού Α.Ε.

Piery M., Roshem J. 1931.: Histoire de la tuberculose, Doin et Cie, Paris

Prodinge WM, Brandstatter A, Naumann L, Pacciarini M, Kubica T, Boschioli ML, Aranaz A, Nagy G, Cvetnic Z, Ocepek M, Skrypnyk A, Erler W, Niemann S, Pavlik I, Moser I. 2005. Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *J Clin Microbiol* 43:4984–4992

Restrepo BI. 2007. Convergence of the tuberculosis and diabetes epidemics: renewal of old acquaintances. *Clin. Infect. Mol. Dis.* 45 (4): 436–8.

Reuss, F.F. 1809. *Mem.Soc.Imperiale Naturalistes de Moscow.* 2, 327.

Roring, S. M. M., Brittain, D., Bunschoten, A. E., Hughes, M. S., Skuce, R. A., van Embden, J. D. A. & Neill, S. D. 1998. Spacer oligotyping of *Mycobacterium bovis* isolates compared to typing by restriction fragment length polymorphism analysis using PGRS, DR and IS6110. *Vet Microbiol* 61, 111±120.

Rossman MD, Mac Gregor RR. Tuberculosis: Clinical management and new challenges.

Ryan KJ, Ray CG. 2004. *Sherris Medical Microbiology.* 4th ed. McGraw Hill.

Saiki RK, Gelfand S, Stoffel SJ, Scharf R, Higuchi GT, Horn KB, et al. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239:487-91.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230:1530-4.

Sakula. A. 1882. Robert Koch: centenary of the discovery of tubercle bacillus.

Scorpio, A., and Y. Zhang. 1996. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/ nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat. Med.* 2:662–667.

Sensi P, Margalith P, Timbal MT. 1959. Rifomycin, a new antibiotic preliminary report. *Farmaco Ed Sci* 14: 146–147.

Smith I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinic Microbiol Reviews.* 3(16):463-496.

Spence DP, Hotchkiss J, Williams CS, Davies PD. 1993. Tuberculosis and poverty. *BMJ (Clinical research ed.)* 307 (6907): 759–61.

Sritharan V, and Barker RH. 1991. A simple method for diagnosing *M. tuberculosis* infection in clinical samples using PCR. *Mol. Cell. Probes.* 5:385-395.

S. T. Cole, Brosch R., Parkhill J., Garnier T. et al. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537-544.

Suarez J, Ranguelova K, Jarzecki AA, et al. 2009. An oxyferrous heme/protein-based radical intermediate is catalytically competent in the catalase reaction of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG). *The Journal of Biological Chemistry* 284 (11): 7017–29.

Trakada, G. Tsiamita, M. Spiropoulos, K. 2004. Drug-resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Patras, Greece. *Monaldi Arch Chest Dis*, 61:65-70.

Van Deutekom H, Supply P, de Haas PE, Willery E, Hoijng SP, Locht C, Coutinho RA, van Soolingen D. 2005. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat analysis, a more accurate method for identifying epidemiological links between patients with tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 43(9):4473-4479.

Van Embden J. D. A., M. D. Cave, J. T. Crawford, J. W. Dale, K. D. Eisenach, B. Gicquel, P. W. M. Hermans, C. Martin, R. McAdam, T. M. Shinnick, and P. M. Small. 1993. *J. Clin. Microbiol.* 31:406–409.

Van Soolingen, D. A. G. M. van der Zanden, P. E. W. de Haas, G. T. Noordhoek, A. Kiers, N. A. Foudraine, F. Portaels, A. H. Kolk, K. Kremer, and J. D. A. van Embden. 1998. Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers. *J. Clin. Microbiol.* 36:1840–1845.

Van Soolingen D, Hermans PWM, de Haas PEW, Sol DR, van Embden A. 1991. The occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis complex* strains: Evaluation of IS dependent DNA polymorphisms as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 29: 2578-2586.

Van Soolingen, T. Hoogenboezem, P. E. W. de Haas, P. W. M. Hermans, M. A. Koedam, K. S. Teppema, P. J. Brennan, G. S. Besra, F. Portaels, J. Top, L. M. Schouls, and J. D. A. van Embden. 1997. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis complex*, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 1236–1245.

Vladyslav Nikolayevskyy, Yanina Balabanova, Tatyana Simak, Nadezhda Malomanova, Ivan Fedorin and Francis Drobniowski. 2009. Performance of the Genotype MTBDRPlus assay in the diagnosis of tuberculosis and drug resistance in Samara, Russian Federation.

Vet J.A.M. and Marras S.A. 2005. Design and optimization of molecular beacon real-time polymerase chain reaction assays. *Methods Mol. Biol.* 288: 273-290.

Vet J.A.M., Majitha A.R., Marras S.A., Tyagi S., Dube S., Poisez B.J., and Kramer F.R. 1999. Multiplex detection of four pathogenic retroviruses using molecular beacons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 6394-6399.

Watson, D.J., Caudy, A.A, Myers, R.M. and Witkowski, J.A. 2007. Ανασυνδασμένο DNA. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.

Watterson, S. A., S. M. Wilson, M. D. Yates, and F. A. Drobniowski. 1998. Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 36:1969–1973

Wayne, L. G., and G. P. Kubica. 1986. The mycobacteria, p. 1435–1457. In P. H. A. Sneath and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2.

Wedlock D. N., M. A. Skinner, G. W. de Lisle, and B. M. Buddle. 2002. Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. *Microbes Infect.* 4:471–480

Wehri, W., J. Neusch, F. Kneusel, And Ai. Staehelin. 1968. *Biochim. Biophys. Acta.* 157: 215.

Wilson, SM, McNerney R, Nye PM, Godfrey-Faussett PD, Stoker NG, and Voller A. 1993. Progress toward a simplified polymerase chain reaction and its application to diagnosis of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 31:776-782.

Winn-Deen, E.S. and D.M. Iovannisci. 1991. Sensitive fluorescence method for detecting DNA ligation amplification products. *Clin. Chem.* 37: 1522-1523.

World Health Organization (W.H.O.) 2007. TB infection and TB disease.

World Health Organization (W.H.O.) 2009. Tuberculosis.

Zhang, Y.S., Mazurek, G.H., Cave, M.D. et al. 1992. Dna polymorphisms in strain *Mycobacterium tuberculosis* analyzed by pulsed-field gel electrophoresis—a tool for epidemiology, *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 1551-56.

Zink A., Sola C., Reischl U., Grabner W., Rastogi N., Wolf H., Nerlich A. 2003. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis complex* DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. *J Clin Microbiol* 41 (1): 359–67.

Zoe Gitti, Ioannis Neonakis, Garyfallia Fanti, Fanourios Kontos, Sofia Maraki, and Yiannis Tselentis. 2006. Use of the GenoType Mycobacterium CM and AS Assays To Analyze 76 Nontuberculous Mycobacterial Isolates from Greece. *Journal of clinical microbiology.* p. 2244–2246.