



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΦΥΜΑΤΙΩΣΗ - ΝΕΕΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ»

ΕΥΜΟΡΦΙΑ ΣΧΟΙΝΑ

ΙΑΤΡΟΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΩΝ/ΝΟΣ ΔΗΜΑΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ(Επιβλέπων)

ΑΣΠΑΣΙΑ ΤΣΕΖΟΥ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ(Μέλος Τριμελούς Επιτροπής)

ΒΑΡΒΑΡΑ ΤΡΑΧΑΝΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ.....(Μέλος Τριμελούς Επιτροπής)

ΛΑΡΙΣΑ, 2019



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

**«TUBERCULOSIS – RECENT DEVELOPMENTS IN DIAGNOSIS AND
THERAPY»**

Στη μνήμη του πατέρα μου Αθ. Αθ. Σχοινά,

Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας συγγραφικά την εργασία μου και, συγχρόνως, ένα ταξίδι γνώσεων, με διάρκεια ανάλογη του μεταπτυχιακού προγράμματος, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω εκ βάθρων την κα Ασπασία Τσέζου, καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, τμήμα Ιατρικής, σχολή Επιστημών Υγείας, Παν/μιο Θεσσαλίας, που αποφάσισε την συμμετοχή μου στο πρόγραμμα και την εκπόνηση της παρούσας εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κων/νο Δήμα, αναπληρωτή καθηγητή Φαρμακολογίας, τμήμα Ιατρικής, σχολή Επιστημών Υγείας, Παν/μιο Θεσσαλίας και επιβλέποντα της εργασίας για την υπομονή, την καθοδήγηση και την κριτική του στάση. Ευχαριστώ την κα Βαρβάρα Τραχανά, επίκουρο καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας, τμήμα Ιατρικής, σχολή Επιστημών Υγείας, Παν/μιο Θεσσαλίας και το λοιπό διδακτικό προσωπικό για το ενδιαφέρον να μεταδώσουν τη γνώση. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την αμέριστη υποστήριξη όλο το παραπάνω διάστημα.

Περίληψη

Η Φυματίωση αποτελεί παγκοσμίως την 1^η αιτία θανάτου από λοιμώδη αίτια και τη 2^η αιτία θανάτου μετά το σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS), προκαλώντας 2,0 εκατομμύρια θανάτους ανά έτος κυρίως, στον αναπτυσσόμενο κόσμο. Η αλόγιστη και ακατάλληλη χρήση των αντιβιοτικών οδήγησαν σε εμφάνιση των ανθεκτικών μορφών της νόσου (MDR/XDR-TB). Παρά την βελτίωση των μεθόδων διάγνωσης (ταχύτερες και περισσότερο ευαίσθητες), ιδίως με την εισαγωγή των νεότερων διαγνωστικών τεχνικών (ADA, IGRAs, NAATs), η ανίχνευση TB λοίμωξης σε ειδικές κατηγορίες πληθυσμού (παιδιά, ασθενείς με ανοσοκαταστολή) και η διαφοροδιάγνωση ενεργούς και λανθάνουσας νόσου, εν πολλοίς, παραμένουν προβληματικές. Οι πρόσφατες γνώσεις, με τη συμβολή της Γενετικής, τη δομής και βιοσύνθεσης του μυκοβακτηριδιακού τοιχώματος αποτέλεσαν το υπόβαθρο για την ανάπτυξη νεότερων αντιφυματικών, όμως το μυκοβακτηρίδιο της Φυματίωσης ανέπτυξε με τη σειρά του μηχανισμούς αντοχής. Οι ελλειπείς γνώσεις της ανοσιακής απόκρισης αποτελούν τροχοπέδη στην ανάπτυξη αποτελεσματικών εμβολίων, παρατείνοντας τη διάρκεια των κλινικών δοκιμών. Νεότερα δεδομένα, όπως η σημασία του μικροβιώματος, η ανοσιακή απόκριση και η χρήση βιοδεικτών, μπορεί να συμβάλλουν ουσιαστικά στη διάγνωση και θεραπεία της νόσου.

Abstract

Tuberculosis is one of the world's most common infectious diseases and the second cause of death after immunodeficiency syndrome (AIDS). Despite the introduction of new methods for detecting and identifying *Mycobacterium tuberculosis* (ADA, IGRAs, NAATs) along with the conventional ones (direct examination, cultures) the diagnosis of TB infection, especially of latent TB, continues to pose considerable difficulty. Inadequate dosing and incomplete treatment regimens have fueled the rise of multidrug-resistant Tuberculosis (MDR-TB) and have turned the necessity of discovering novel drugs into an absolute emergency. Examples include the recently approved bedaquiline and delamanid as well as others agents (including vaccines) in clinical and preclinical development pipeline.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Ευχαριστίες.....	3
Περίληψη.....	4
Abstract.....	5
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	14
A1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....	14
A2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ.....	15
A3. ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΝΟΣΟΥ.....	16
A3.1. ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΒ.....	16
A3.2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΒΑΚΙΛΛΟΥ.....	16
A3.3. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ.....	18
A3.3.1. Πρωτοπαθής Λοίμωξη – αρχική επαφή.....	18
A3.3.2. Δευτεροπαθής Λοίμωξη – λανθάνουσα φάση.....	19
A3.3.3. Κλινικά Χαρακτηριστικά.....	20
A4. ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΝΟΣΟΥ.....	20
A4.1. ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	20
A4.2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	20
A4.2.1. Χρώσεις μικροσκοπικών παρασκευασμάτων.....	21
A4.2.2. Καλλιέργειες βιολογικών υλικών.....	22
A4.2.3. Βιοχημικές δοκιμασίες.....	23
A4.2.4. Έλεγχοι ευαισθησίας των αντιβιοτικών.....	24
A4.2.4.1. Μέθοδος αραίωσης των αντιβιοτικών σε άγαρ (MOP–method of proportion).....	25
A4.2.4.2. Μέθοδος αραίωσης των αντιβιοτικών σε υγρό θρεπτικό υλικό (MGIT–Mycobacterial Growth Indicator Tube).....	25
A4.2.4.3. Μικροσκοπική μέθοδος ανίχνευσης αντοχής (MODS–microscopy observation drug susceptibility).....	25
A4.2.5. Μοριακές Μέθοδοι.....	25

A5. ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΒ.....	26
A5.1. ΑΝΤΙΦΥΜΑΤΙΚΑ – ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ.....	26
A5.2. ΑΝΟΣΟΠΡΟΦΥΛΑΞΗ (Εμβολιασμός).....	27
A5.3. ΧΗΜΕΙΟΠΡΟΦΥΛΑΞΗ.....	28
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	29
B1. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΤΟΙΧΩΜΑΤΟΣ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ.....	29
B1.1. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΠΕΠΤΙΔΟΓΛΥΚΑΝΗΣ (PG) – νεότερα δεδομένα.....	32
B1.2. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑΚΗΣ ΑΡΑΒΙΝΟΓΑΛΑΚΤΑΝΗΣ (AG) – νεότερα δεδομένα.....	35
B1.3. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (MA) – νεότερα δεδομένα.....	39
B2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΤΩΝ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ.....	40
B2.1. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ (ΕΓΓΕΝΟΥΣ) ΑΝΤΟΧΗΣ ΤΟΥ <i>Mtb</i> ΣΤΑ ΑΝΤΙΦΥΜΑΤΙΚΑ.....	42
B2.2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΚΤΗΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΤΟΥ <i>Mtb</i> ΣΤΑ ΑΝΤΙΦΥΜΑΤΙΚΑ	47
B2.2.1. Τροποποίηση του στόχου δράσης του αντιβιοτικού.....	47
B2.2.2. Αναστολή της ενζυματικής ενεργοποίησης του προφαρμάκου.....	48
B2.2.3. Υπερέκφραση του στόχου δράσης του αντιβιοτικού.....	49
B3. MDR/XDR-TB: ΟΡΙΣΜΟΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ, ΑΙΤΙΑ, ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	50
B3.1. HIV & MDR-TB.....	53
B4. ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΒ – ΝΕΟΤΕΡΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ.....	54
B4.1. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΗΣ ΑΠΑΜΙΝΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΔΕΝΟΣΙΝΗΣ (Adenosine deaminase – ADA).....	54
B4.1.1. στο πλευριτικό υγρό (φυματιώδης πλευρίτιδα).....	56
B4.1.2. στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (φυματιώδης μηνιγγίτιδα).....	56
B4.1.3. στο ασκитικό υγρό (φυματιώδης περιτονίτιδα).....	56
B4.1.4. στον ορό αίματος.....	56

B4.2. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ γ -ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΗΣ (Interferon gamma Release Assays – IGRAs).....	57
B4.2.1. QuantiFERON-TB Gold In Tube test (Cellestis Ltd, Carnegie, Victoria, Australia).....	57
B4.2.2. T-SPOT-TB test (Oxford Immunotech, Oxford, UK).....	58
B4.3. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ (Nucleic acid amplification tests – NAATs).....	59
B4.3.1. Gen Probe Amplified Mtb Direct test, AMTD (Gen Probe Inc., San Diego, California, USA).....	60
B4.3.2. Amplicator Mtb test (Roche Molecular Systems, Branchburg, N.J., USA).....	60
B4.3.3. COBAS Amplicator (Roche Diagnostic Systems, Mannheim, Germany).....	60
B4.3.4. GenoType Mycobacteria Direct (Hain LifeScience, GmbH, Nerhren, Germany).....	60
B4.3.5. Accuprobe-Mycobacteria Culture Identification test (Gen Probe Inc., San Diego, California, USA).....	61
B4.3.6. Inno-Lipa Mycobacteria (Innogenetics, Ghent, Belgium).....	61
B4.3.7. Genotype Mycobacterium CM (common species) & AS (additional species) (Hain LifeScience, GmbH, Nerhren, Germany).....	61
B4.4. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΦΥΜΑΤΙΚΑ.....	62
B4.4.1. INN0 LiPARif.TB test (Innogenetics, Ghent, Belgium).....	63
B4.4.2. GenoTypeMTBDR plus test (Hain LifeScience, Nerhren, Germany).....	63
B4.4.3. Xpert MTB test (Cepheid Inc., Sunnyvale, California, USA).....	65
B4.5. ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ.....	66
B4.5.1. miRNAs – snRNAs.....	66
B5. ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΒ - ΝΕΟΤΕΡΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ.....	68
B5.1. ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ (Diarylquinolones & Respiratory chain Antagonists).....	68
B5.1.1. Βεδακιλίνη (Bedaquiline, TMC-207), oral.....	69
B5.1.2. Q203 (Imidazopyridine QcrB inhibitors), oral.....	70
B5.2. ΝΙΤΡΟΙΜΙΔΑΖΟΛΕΣ (Nitroimidazoles).....	71

B5.2.1. Δελαμανίδη (Delamanid, QPC-67683), oral.....	72
B5.2.2. Πρετομανίδη (Pretomanid, PA-824), oral.....	73
B5.3. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥ ENZYMOY DprE1 (DprE1 Inhibitors).....	74
B5.3.1. Βενζοθειαζόνες (Benzothiazones, BTZs), oral.....	74
B5.3.2. (1,4)-Αζαινδόλες (1,4-Azaindoles), oral.....	75
B5.3.3. Αναστολείς της Mtb βιομεμβράνης & TCA1, oral.....	75
B5.4. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΑΝΤΑΓΙΑΣ ΕΞΟΔΟΥ MmpL3 (MmpL3 Inhibitors).....	76
B5.4.1. SQ109, oral.....	76
B5.5. ΟΞΑΖΟΛΙΔΙΝΟΝΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΟΣΥΝΘΕΣΗΣ....	78
B5.6.1. Λινεζολίδη (Linezolid), oral.....	78
B5.6.2. Τεδιζολίδη (Tedizolid), oral.....	78
B5.6.3. Σουτεζολίδη (Sutezolid), oral.....	79
B5.6.4. Δελπαζολίδη (Delpazolid, LCB01-O371), oral.....	79
B5.7. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ LEUCYL-tRNA ΣΥΝΘΑΣΗΣ (LeuRS-inhibitors), oral	79
B5.8. ΕΜΒΟΛΙΑ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ ΣΕ ΣΤΑΔΙΑ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ.....	80
B5.8.1. VPM1002 (Vakzine Projekt Management/VPM, GmbH, TBVI).....	81
B5.8.2. MTBVAC (University of Zaragoza & Biofabri, Spain, TBVI).....	82
B5.8.3. MVA85A/AERAS-485 (University of Oxford, TBVI).....	82
B5.8.4. M72 +AS01 (GSK, Aeras).....	82
B5.8.5. MYCOBACTERIUM VACCAE (AnHui Longcom, China).....	83
B6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	84
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	85

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η ιστορία της φυματίωσης στο ανθρώπινο είδος, ξεκινάει από τους προϊστορικούς χρόνους. Πιθανότατα, η πρώτη μετάδοση του βακτηρίου σε άνθρωπο να έγινε από επιμολυσμένα βοοειδή. Η συνάφεια ανθρώπων και ζώων στις πρώιμες αγροτικές κοινότητες συνέβαλε στην αρχική εγκατάσταση της νόσου στον περιορισμένο αριθμό των κατοίκων. Η επώαση του μικροβίου στα ασθενέστερα μέλη της εκάστοτε κοινότητας και η εκδήλωση νόσου, στη συνέχεια, ανέδειξε την πνευμονική φυματίωση ως επικρατούσα μορφή μεταξύ των ανθρώπων [1]. Οι μετακινήσεις μικρών ή μεγαλύτερων ομάδων, βοσκών και γεωργών, προς λιγότερο κορεσμένες περιοχές για νομή ή εγκατάσταση, προκάλεσαν ταυτόχρονη μεταφορά της νόσου. Στο πέρασμα των χρόνων, η αύξηση του πληθυσμού και της πυκνότητας συνοίκησης στις αναπτυσσόμενες πόλεις, η αύξηση του διαμετακομιστικού εμπορίου και των συναλλαγών, επέτειναν τη διάδοση της ασθένειας. Στην προϊστορική περίοδο την ύπαρξη νόσου φανερώνουν φυματιώδεις αλλοιώσεις των οστών σε αιγυπτιακές μούμιες, ηλικίας 5000 ετών ενώ στους ιστορικούς χρόνους ο Ιπποκράτης ο Κώος (460–359 π.Χ.) εισάγει τον όρο “φθίση”, που παραμένει στη διεθνή ορολογία μέχρι το 19^ο αιώνα.

Στις 24 Μαρτίου 1882, στο Βερολίνο, ο ιατρός Robert Koch ανακοινώνει την ανακάλυψη του βακτηριδίου της φυματίωσης (βάκιλος του Koch), αποδεικνύει το μολυσματικό χαρακτήρα της νόσου και καταρρίπτει τη βαθεία εδραιωμένη αντίληψη περί κληρονομικότητας. Το 1854 ιδρύεται το πρώτο σανατόριο στην Ευρώπη (Gorbesdorf, Γερμανία) και ακολουθούν άλλα, που θα παραμείνουν σε λειτουργία, μέχρι το πρώτο ήμισυ του 20ου αιώνα. Στον ελλαδικό χώρο ιδρύεται στην Αθήνα, το 1902, από την Σοφία Σλήμαν, το σανατόριο “Σωτηρία”, ως το πρώτο λαϊκό σανατόριο και ακολουθείται από την ίδρυση, το 1909, στο Πήλιο, του σανατορίου “Ζωοδόχος Πηγή” από τον ιατρό Γεώργιο Καραμάνη [2]. Η ανακάλυψη του BCG εμβολίου (1921) και η εισαγωγή των αντιφυματικών στη θεραπευτική (Στρεπτομυκίνη 1944) περιόρισαν την εξάπλωση της νόσου, που, τελευταίως, επανακάμπτει απειλητικά.

A2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Παρά τον χαμηλό επιπολασμό της νόσου των τελευταίων δεκαετιών (πρωτικοί δείκτες τα τελευταία 40 έτη), ήδη από την δεκαετία του 80', η Φυματίωση επανήλθε απειλητικά στο προσκήνιο και σύμφωνα με τα νεότερα δεδομένα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO 2017), αναδείχθηκε σε 1^η αιτία θανάτου από λοιμώδη αίτια και 2^η αιτία θανάτου μετά το σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS), προκαλώντας περίπου 2,0 εκατομμύρια θανάτους ανά έτος, κυρίως στον αναπτυσσόμενο κόσμο. Το 95% των νέων περιπτώσεων λοίμωξης και θανάτων από τη νόσο συμβαίνει σε χώρες όπως η Ινδία, η Κίνα, η Νιγηρία, η Ινδονησία και το Πακιστάν. Υπολογίζεται ότι σήμερα το 1/3 του πληθυσμού παγκοσμίως έχει προσβληθεί από τη νόσο (~ 2,0 δισεκατομμύρια άνθρωποι), ενώ τα 2/3 των περιστατικών της φυματίωσης σημειώνονται στις μεγαλουπόλεις της Ασίας, όπου η εξάπλωση της HIV-λοίμωξης και ο βαθμός διαμόλυνσης της TB είναι εξαιρετικά υψηλά. Το 2013, ο Π.Ο.Υ. κατέγραψε 9,0 εκατομμύρια νέα περιστατικά, μεταξύ των οποίων τα 3,3 εκατομμύρια αποτελούσαν γυναίκες, τα 1,1 εκατομμύρια αποτελούσαν HIV-ασθενείς και 550000 αποτελούσαν τα παιδιά. Το ίδιο έτος (2013), ο Π.Ο.Υ. κατέγραψε 1,5 εκατομμύρια θανάτους από τη νόσο παγκοσμίως, από τους οποίους 510000 θάνατοι αφορούσαν το γυναικείο φύλο, 450000 θάνατοι τους HIV-ασθενείς και 80000 θάνατοι σημειώθηκαν στην παιδική ηλικία, ενώ το 2014 ένα εκατομμύριο παιδιά ηλικίας 0–14 ετών νόσησαν και 140000 απεβίωσαν. Το 2015, ο Π.Ο.Υ. κατέγραψε 10,4 εκατομμύρια νέα περιστατικά TB λοίμωξης, από τα οποία, τα 4,8 εκατομμύρια αφορούσαν ανθεκτικές μορφές της νόσου και παρουσίαζαν θνησιμότητα 30%. Τα κύρια αίτια αυτής της ανάκαμψης (δεν εξαιρούνται οι αναπτυσσόμενες χώρες της Δύσης) αποτελούν α) το χαμηλό βιοτικό επίπεδο, β) η αυξανόμενη αστικοποίηση, γ) οι ελλειμματικές παροχές υγείας, δ) οι μετακινήσεις πληθυσμών (μετανάστευση, διεθνή ταξίδια), ε) οι συνθήκες συγχρωτισμού (τρόφιμοι ασύλων, φυλακών, στρατός), ενώ ειδικές κατηγορίες υψηλού κινδύνου, μαζί με τους μετανάστες και τους κλειστούς πληθυσμούς, αποτελούν τα παιδιά, οι ηλικιωμένοι, οι ασθενείς με ανοσοανεπάρκεια (οι HIV-ασθενείς είναι 20–30 φορές πιο επιρρεπείς) και οι επαγγελματίες υγείας. Ο Π.Ο.Υ. υιοθέτησε προγράμματα περιορισμού της νόσου (Directly Observed Treatment

and short-course drug therapy programs–DOTS) π.χ. παγκόσμιο πρόγραμμα κατά της Φυματίωσης 2006–2015 (“Stop TB Partnership 2006–2015), με τελικό σκοπό να εξαλείψει τη νόσο από πρόβλημα δημόσιας υγείας, έως το 2050 (<1 περίπτωση/10⁶ άτομα) [5].

A3. ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΝΟΣΟΥ

Προκαλείται από είδη του συμπλέγματος Μυκοβακτηριδίων (*Mtb* complex) της φυματίωσης (τάξη: Actinomycetales, οικογένεια Mycobacteriaceae, γένος *Mycobacterium*), με κύριο εκπρόσωπο το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης (*Mycobacterium tuberculosis–Mtb*) ή βάκιλο του Koch. (*Mtb* complex=*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. carnettii*, *M. africanum*, *M. microti*) [4].

A3.1. ΟΡΙΣΜΟΣ TB

Λοιμώδης νόσος του αναπνευστικού συστήματος, που προσβάλλει, κυρίως, το μέσο και τους κατώτερους λοβούς του πνεύμονος ή τα κορυφαία και πρόσθια τμήματα των άνω λοβών (δυσνητικά προσβάλλει οποιοδήποτε όργανο), όπου τα μυκοβακτηρίδια βρίσκουν πρόσφορες συνθήκες για την ανάπτυξή τους όπως αυξημένη πυκνότητα οξυγόνου (αερόβια βακτήρια). Η διασπορά της νόσου γίνεται ανθρωπογενώς (ο άνθρωπος αποτελεί τη μόνη, φυσική δεξαμενή του *Mtb*), με την αερογόνο οδό, δηλαδή με την εισπνοή μολυσμένων σταγονιδίων (πυρήνες) και σπανίως διασπείρεται αιματογενώς, μέσω τραύματος ή μέσω του πεπτικού συστήματος. Οι πυρήνες των σταγονιδίων έχουν διάμετρο 1–10 μm, περιέχουν μικρό αριθμό μυκοβακτηριδίων (<10) και εγκαθίστανται στις κυψελίδες, όπου παραμένουν μολυσματικοί για διάστημα 8–10 ημερών [3], [4].

A3.2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΒΑΚΙΛΛΟΥ

Πρόκειται για ακίνητα, μη σπορογόνα, αερόβια, βραδέως αναπτυσσόμενα βακτήρια (>7 ημέρες επώασης σε καλλιεργητικά μέσα), μεγέθους 0,2–0,6 μm x 1–10 μm, με κυτταρικό τοίχωμα, πλούσιο σε λιπίδια και κηρούς, που ευθύνεται για την αργή τους ανάπτυξη [3]. Τα μυκοβακτηρίδια χρειάζονται περίπου 12–24 ώρες για να ολοκληρώσουν την κυτταρική τους διαίρεση (εξηγεί γιατί τα αντιφυματικά χορηγούνται μία φορά ημερησίως), ενώ, για τα λοιπά βακτήρια, ο χρόνος διαίρεσης περιορίζεται σε 15–60 min. Το κυτταρικό τοίχωμα τους είναι πλούσιο

σε λιπίδια (μυκολικά οξέα), που αποτελούν το 60% του ξηρού βάρους τους και προσδίδουν στην επιφάνεια του κυττάρου έντονα υδρόφοβο χαρακτήρα. Τα μυκοβακτηρίδια διατάσσονται σε ζεύγη, παράλληλες σειρές ή σωρούς και αναπτύσσονται κατά κανόνα άχρωμες αποικίες. Χρωματίζονται δύσκολα με τις χρώσεις Gram & Giemsa [χρωματίζονται ως GRAM(+)] και αποχρωματίζονται δυσκολότερα με όξινα διαλύματα (χρώση Ziehl-Neelsen–οξεάντοχα βακτήρια). Αναπτύσσονται ενδοκυττάρια, προσβάλλοντας τα μονοκύτταρα-μακροφάγα των τελικών αεραγωγών, εμποδίζοντας τη σύντηξη λυσοσώματος-φαγοσώματος και την επακόλουθη καταστροφή τους.

Άτυπες μορφές: Εδώ ανήκουν τα άτυπα (λοιπά) μυκοβακτηρίδια, με ποικίλο ρυθμό ανάπτυξης (μερικά είναι ταχέως αναπτυσσόμενα, <7 ημέρες επώασης σε θρεπτικά μέσα π.χ. *M. fortuitum*, *M. chelonae*). Διακρίνονται με βάση την ικανότητα παραγωγής χρωμογόνων αποικιών σε 1) Μη χρωμογόνα, που δεν παράγουν χρωστικές π.χ. *M. avium* complex (MAC), *M. ulcerans* και σε 2) Χρωμογόνα, που αναπτύσσουν κίτρινες αποικίες: 2α) Φωτοχρωμογόνα – παράγουν χρωστικές μόνο στο φως π.χ. *M. kansasii*, *M. marinum*, 2β) Σκοτοχρωμογόνα – παράγουν χρωστικές, τόσο στο φως, όσο και στο σκοτάδι, π.χ. *M. xenopi*, *M. flavescens* κ.α. (Πίνακας Α1) [3]. Τα περισσότερα είδη των άτυπων μυκοβακτηριδίων είναι σαπρόφυτα του εδάφους και ορισμένα είναι αυστηρά παθογόνα, όπως τα είδη του *M. avium* complex, το *M. ulcerans*, ενώ τα λοιπά περιστασιακά παθογόνα, προκαλώντας ευκαιριακές λοιμώξεις, κυρίως, σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς. Οι χρωμογόνες ή μη ιδιότητες, παράλληλα με τις βιοχημικές δοκιμασίες, αποτελούν διαγνωστικό εργαλείο ταυτοποίησης των ειδών του μυκοβακτηριδίου (συμβατικοί μέθοδοι ταυτοποίησης των μυκοβακτηριδίων) [4].

ΠΙΝΑΚΑΣ Α1. ΑΤΥΠΑ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑ (NMT ή MOTT)

ΜΗ ΧΡΩΜΟΓΟΝΑ	ΧΡΩΜΟΓΟΝΑ	
	ΦΩΤΟΧΡΩΜΟΓΟΝΑ	ΣΚΟΤΟΧΡΩΜΟΓΟΝΑ
<i>M. avium</i> complex (MAC)	<i>M. kansasii</i>	<i>M. gordonae</i>
<i>M. ulcerans</i>	<i>M. asiaticum</i>	<i>M. scrofulaceum</i>
<i>M. xenopi</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. szulgai</i>
<i>M. haemophilum</i>	<i>M. simiae</i>	<i>M. smegmatis</i>
<i>M. malmoensae</i>		

M. shimoidei

M. genavense

M. terrae complex

M. fortuitum

complex

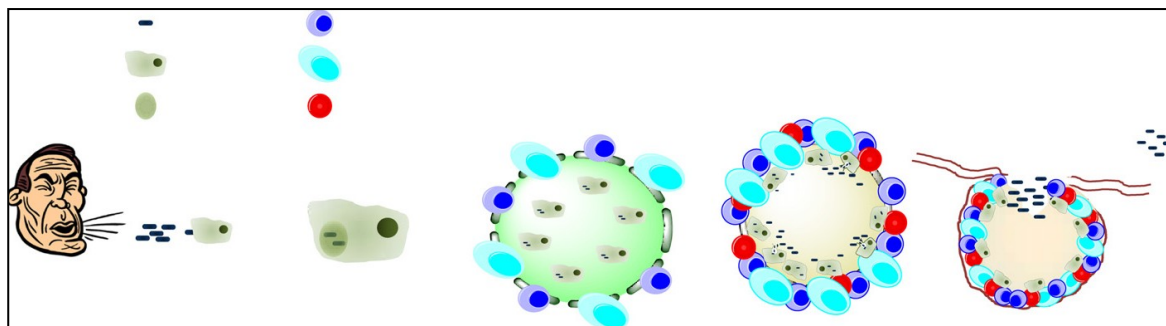
A3.3. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η νόσος προσβάλλει κύρια τους πνεύμονες (~85% των περιπτώσεων λοίμωξης αφορούν πνευμονική TB), χωρίς να αποκλείονται οι εξωπνευμονικές εντοπίσεις στην αρχή της λοίμωξης, κυρίως με αιματογενή διασπορά του *Mtb*, σε λεμφαδένες, υπεζωκότα (φυματιώδης πλευρίτιδα), οστά – αρθρώσεις, Κ.Ν.Σ. (φυματιώδης μηνιγγίτιδα), νεφρούς και ουρογεννητικό σύστημα (~15% των περιπτώσεων TB) [3].

A3.3.1. Πρωτοπαθής Λοίμωξη – αρχική επαφή

Τα μυκοβακτηρίδια φαγοκυτταρώνονται από τα κυψελιδικά (ιστικά) μακροφάγα των τελικών αεραγωγών, πολλαπλασιάζονται εντός του φαγοσώματος, εμποδίζοντας τη σύντηξη με το λυσόσωμα και τελικά, λύουν το φαγοκύτταρο. Μακροφάγα του αίματος (μονοπύρηννα) μεταναστεύουν στην περιοχή με αποτέλεσμα επαναλαμβανόμενοι κύκλοι φαγοκυττάρωσης – κυτταρικής καταστροφής, ενώ, παράλληλα, προσβλημένα μακροφάγα διασπείρονται αιματογενώς σε εγχώριους λεμφαδένες (παρεγχυματική λεμφαγγειίτιδα) και σε άλλους ιστούς (νεφροί, οστά, σπλήνα, Κ.Ν.Σ.) [3]. Αναπτύσσεται κοκκιοματώδης φλεγμονή, με συσσώρευση ουδετερόφιλων και λεμφοκυττάρων του αίματος, μεταμόρφωση των μακροφάγων σε πολypύρηννα γιγαντοκύτταρα (κύτταρα Langhans), που εξελίσσεται σε κεντρική νέκρωση της βλάβης (τυροειδές φύμα) και σπηλαιοποίηση, όταν το νεκρωτικό περιεχόμενο αποβάλλεται στους βρόγχους (διαβρογχική διασπορά). Σημειώνουμε ότι η δυνατότητα του *Mtb* και του *M. leprae* να προκαλούν χρόνια ή λανθάνουσα νόσο οφείλεται στη ικανότητα τους να λαθροβιούν στα φαγοσώματα των μακροφάγων, εκτός αν τα τελευταία ενεργοποιηθούν από τις κυτοκίνες των T-λεμφοκυττάρων. Η ανάπτυξη κυτταρικής ανοσίας του ξενιστή (3–6 εβδομάδες), μέσω ενεργοποίησης των CD4/CD8 T-λεμφοκυττάρων ανακόπτει την περαιτέρω εξέλιξη και οδηγεί σε ίαση στο 90% των περιπτώσεων προσβολής, ενώ ποσοστό 5% των ασθενών θα

αναπτύξει ενεργό νόσο (μέσα σε 2 χρόνια) και το άλλο 5% θα αναπτύξει νόσο σε δεύτερο χρόνο (δευτεροπαθής TB) [3], [4].



α. εισπνοή β. λαθροβίωση γ. προσέλκυση δ. ενεργοποίηση ε. ρήξη

Εικόνα A1: Παθοφυσιολογία της TB λοίμωξης – α) εισπνοή των μυκοβακτηριδίων β) λαθροβίωση εντός των φαγοσωμάτων των μακροφάγων γ) προσέλκυση ουδετερόφιλων και λεμφοκυττάρων δ) ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων και λύση των μακροφάγων ε) ρήξη του φυματίου και απελευθέρωση των μυκοβακτηριδίων στο πνευμονικό παρέγχυμα (Hoagland et al. *Advanced Drug Delivery Reviews* 102(2016) Fig.1)

43.3.2. Δευτεροπαθής Λοίμωξη – λανθάνουσα φάση

Πρόκειται για αναζωπύρωση παλαιάς λοίμωξης (μετά από διάστημα μηνών ή ετών) σε ασθενείς με πρωτοπαθή λοίμωξη ή εμφάνιση νόσου σε άτομα εμβολιασμένα με BCG και εμφανίζεται σε μειωμένη ανοσολογική απόκριση του ξενιστή, όπως ανοσοκαταστολή νόσου ή θεραπείας (χρόνια νοσήματα, HIV λοίμωξη, κακοήθειες), ηλικία (γήρας, παιδική ηλικία). Η δευτεροπαθής λοίμωξη εμφανίζεται, κυρίως, σε ενήλικες ενώ, η πρωτοπαθής σε παιδιά και εφήβους [3].

43.3.3. Κλινικά Χαρακτηριστικά

Ήπια και μη ειδικά κατά την έναρξη της νόσου, όπως πυρετός, απώλεια βάρους, αίσθημα κακουχίας, νυχτερινοί ιδρώτες, ξηρός βήχας προσλαμβάνουν αργότερα ειδικότερο χαρακτήρα, με παραγωγή πτυέλων (παραγωγικός βήχας) και εκδήλωση αιμόπτυσης (συχνά σε διηθήσεις των κορυφαίων τμημάτων των πνευμόνων).

A4. ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΝΟΣΟΥ

A4.1. ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Βασίζεται στο ιστορικό, τα κλινικά σημεία, τα απεικονιστικά ευρήματα και τη δερμοαντίδραση φυματίνης (δοκιμασία Mantoux ή Tuberculin skin test–TST): πρόκειται για δερμοαντίδραση που προκαλείται από την έγχυση ενδοδερμικά (εσωτερικό τμήμα αντιβραχίονα) 5 μονάδων φυματίνης ή ισοδύναμα 0,1μg PPD (purified protein derivative). Βασίζεται σε όψιμη υπερευαισθησία του δέρματος, μετά από έκθεση σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα μυκοβακτηριδίων (πρωτεϊνικά αντιγόνα). Το PPD αποτελεί αδρό εκχύλισμα καλλιεργημάτων του *Mtb* και περιέχει περισσότερα από 200 αντιγόνα, πολλά κοινά με το *M. bovis* (*M. bovis* BCG) και πολλά άτυπων μυκοβακτηριδίων (NTM). Η δοκιμασία είναι θετική, όταν στο σημείο έγχυσης εμφανίζεται σκληρία και ερυθρότητα διαμέτρου >10 mm (3–4 εβδομάδες μετά την έκθεση στο μυκοβακτηρίδιο). Είναι σημαντική για τον εντοπισμό των μολυσμένων από το *Mtb* ατόμων (προληπτική αντιφυματική αγωγή), ενώ μικρότερης διαμέτρου σκληρίας δεν αποκλείει την έκθεση στο *Mtb* (π.χ. ανοσοκαταστολή), καθώς και την έκθεση σε άτυπα μυκοβακτηρίδια. Έτσι, σε HIV οροθετικούς ασθενείς η δοκιμασία θεωρείται θετική στα 5 mm, σε επαγγελματίες υγείας στα 10 mm (φαινόμενο ανοσοενίσχυσης–boosting) και στον γενικό πληθυσμό στα 15mm. Δεν διαχωρίζει ενεργό νόσο από λανθάνουσα λοίμωξη, γιατί είναι θετική και στις δύο περιπτώσεις [3], [4].

A4.2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Περιλαμβάνει τις μικροσκοπικές χρώσεις των παρασκευασμάτων, τις βιοχημικές δοκιμασίες ταυτοποίησης, τις καλλιέργειες των βιολογικών υλικών, τους ελέγχους ευαισθησίας των αντιβιοτικών και, τέλος, τις νεότερες, μοριακές τεχνικές ανίχνευσης λοίμωξης και ευαισθησίας.

A4.2.1. Χρώσεις μικροσκοπικών παρασκευασμάτων

Το παρασκεύασμα (συνήθως πτύελα) χρωματίζεται με την χρώση Ziehl-Neelsen (Z-N), ειδική χρώση για τα οξεάντοχα βακτήρια (Franz Ziehl & Friedrich Neelsen, 1882). Αρχικά, το παρασκεύασμα χρωματίζεται με θερμαινόμενο φαινικούχο διάλυμα φουξίνης (φαινικούχος φουξίνη) – 1^η χρωστική (κόκκινη) και

αποχρωματίζεται με όξινη αλκοόλη (οξινισμένη αλκοόλη 95⁰, 3%). Στη συνέχεια, χρωματίζεται εκ νέου με διάλυμα κυανού του μεθυλενίου κατά Loeffler – 2^η χρωστική (μπλε). Τα μυκοβακτηρίδια προσλαμβάνουν την κόκκινη χρωστική (φουξίνη) και δεν αποχρωματίζονται από την όξινη αλκοόλη (οξεοάντοχα), γι' αυτό βάφονται κόκκινα, ενώ τα λοιπά στοιχεία π.χ. κύτταρα βάφονται μπλε [8]. Η τεχνική παρουσιάζει υψηλή ειδικότητα (>98%), αφού είναι θετική για τα οξεοάντοχα βακτήρια (όχι μόνο τα μυκοβακτηρίδια), αλλά χαμηλή ευαισθησία (55%), κυρίως λόγω δείγματος φτωχού σε μικροοργανισμούς (απαιτούνται 10⁶ βάκιλοι/ml δείγματος, για θετικό αποτέλεσμα χρώσης, ενώ αν το δείγμα περιέχει 10⁴/ml ή 10³/ml τα ποσοστά είναι 60% και 10%, αντίστοιχα) ή λόγω κακού χειρισμού των δειγμάτων (καθυστερημένη μεταφορά, παρατεταμένος αποχρωματισμός). Σημειώνουμε ότι το 50% των δειγμάτων θετικής καλλιέργειας παρουσιάζει αρνητική χρώση για οξεοάντοχα.

Χρώση Kinyoun: χρησιμοποιεί τα ίδια χρωστικά διαλύματα με τη χρώση Ziehl-Neelsen με μόνη διαφορά ότι το φαινικόχο δ/μα της φουξίνης δεν θερμαίνεται στο 1ο στάδιο της χρώσης (δεν πλεονεκτεί έναντι της προηγούμενης).

Φθορίζουσα χρώση auramine O (auramine-rhodamine): χρησιμοποιεί φθορίζουσα χρωστική (δ/μα ουραμίνης-ροδαμίνης) για να χρωματίσει τα μυκοβακτηρίδια, που φθορίζουν, με χρώμα πορτοκαλί-κόκκινο σε σκοτεινό πεδίο. Προσφέρει κατά 10% μεγαλύτερη ευαισθησία, αφού τα φθορίζοντα βακτήρια γίνονται ευκολότερα αντιληπτά. Για αυτό τον λόγο, νεότερες οδηγίες συνιστούν την ευρεία χρήση της και την αντικατάσταση του οπτικού μικροσκοπίου ή του μικροσκοπίου φθορισμού από το μικροσκόπιο με φωτοδίοδο (light emitting diode – LED fluorescence microscopy) [6], [7].

4.2.2. Καλλιέργειες βιολογικών υλικών

Βιολογικά υγρά, όπως πύελα, αίμα, ούρα, ENY, δείγματα βιοψίας εμβολιάζονται (αυτούσια ή μετά από επεξεργασία) σε στερεά ή υγρά θρεπτικά μέσα, ειδικά για την ανάπτυξη των μυκοβακτηριδίων, στους 37C⁰, σε κεκλιμένη θέση και ατμόσφαιρα 10% CO₂, ενώ μερικά από τα καλλιεργητικά μέσα τοποθετούνται σε σκοτεινό θάλαμο για την ανάπτυξη των άτυπων ειδών [8]. Προηγείται η επεξεργασία των βιολογικών δειγμάτων, που περιλαμβάνει την ρευστοποίηση, την

ομογενοποίηση και την απολύμανση με ειδικούς παράγοντες, που καταστέλλουν την ανάπτυξη των λοιπών μικροβίων. Η ανάπτυξη των μυκοβακτηριδίων απαιτεί εμπλουτισμένα, καλλιεργητικά υλικά, όπως το στερεό θρεπτικό Loewenstein-Jensen (BioMerieux, France) με βασικά συστατικά το λεύκωμα και την λεκιθίνη. Στα στερεά μέσα το *Mtb* χρειάζεται 4–6 εβδομάδες για να αναπτυχθεί, ενώ σε υγρά υλικά (π.χ. ζωμός Middlebrook 7H12, ζωμός Middlebrook 7H9) ο χρόνος ανάπτυξης μειώνεται σε 1–3 εβδομάδες. Ο ζωμός 7H9 Middlebrook Broth Base 0,47% w/v (MGIT-960, Becton Dickinson, USA) περιέχει ενισχυτικό παράγοντα (Growth Supplement, OADC), αποτελούμενο από ολεϊκό οξύ (συμβάλλει στον μεταβολισμό των μυκοβακτηριδίων), αλβουμίνη (δεσμεύει τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, που είναι τοξικά για τα μυκοβακτηρίδια), δεξτρόζη (αποτελεί πηγή ενέργειας) και καταλάση (εξουδετερώνει τα υπεροξειδία του θρεπτικού υλικού), γεγονός που εξηγεί την αυξημένη συχνότητα ανάπτυξης άτυπων μυκοβακτηριδίων, σε σχέση με τις καλλιέργειες σε στερεά υλικά [9]. Επίσης, περιέχει λυοφιλοποιημένα αντιβιοτικά (PANTA: Polymyxin B για Gram-αρνητικά, Azlocillin για Ψευδομονάδες, Nalidixic acid για Gram-αρνητικά, Trimethoprim για Gram-αρνητικά & Gram-θετικά και Amphotericin B για μύκητες), που μειώνουν σημαντικά τις επιμολύνσεις, σε σχέση με τις καλλιέργειες των στερεών υλικών [9]. Το ήμι-αυτοματοποιημένο σύστημα Bactec 460 (BD Diagnostics, Maryland, USA) αποτελεί ραδιομετρική μέθοδο για την ανίχνευση ραδιοσημασμένου $^{14}\text{CO}_2$, που απελευθερώνεται από την ανάπτυξη των μυκοβακτηριδίων στο σημασμένο με ραδιοάνθρακα (ζωμός Middlebrook 7H12), υγρό, θρεπτικό υλικό. Αντικαταστάθηκε από το αυτοματοποιημένο σύστημα Bactec MGIT-960, που ανιχνεύει εκπομπή φθορίζουσας ακτινοβολίας (365nm), λόγω μείωσης του οξυγόνου, από την ανάπτυξη μυκοβακτηριδίων σε φιαλίδια MGIT (ζωμός Middlebrook 7H9). Τα φιαλίδια αυτά περιέχουν στον πυθμένα σιλικόνη εμπλουτισμένη με άλας ρουθενίου (φθορίζουσα ουσία) και δεν αποβάλλουν ραδιενέργεια [9]. Παρά την υψηλή ειδικότητα (98%), η ευαισθησία των μεθόδων στερεών καλλιεργειών παραμένει χαμηλή (~80%), καθώς 20% των ασθενών με ενεργό νόσο δεν εμφανίζει θετική καλλιέργεια. Επίσης, σημαντικό μειονέκτημα των στερεών καλλιεργειών αποτελεί ο παρατεταμένος χρόνος επώασης, ενώ των υγρών η αδυναμία άμεσης επισκόπησης των αποικιών. Ο ΠΟΥ

συνιστά το συνδυασμό καλλιέργειας *Mtb* σε στερεό και υγρό θρεπτικό μέσο, ακόμη και σε χώρες οικονομικά ασθενέστερες [10].

A4.2.3. Βιοχημικές δοκιμασίες

Προηγείται η ανάπτυξη του στελέχους σε καλλιέργεια και η απομόνωσή του σε καθαρή μορφή. Οι βιοχημικές δοκιμασίες, που πραγματοποιούνται για την ταυτοποίηση των ειδών των μυκοβακτηριδίων είναι οι εξής: α) παραγωγή και συσσώρευση νιασίνης (νικοτινικού οξέος), δοκιμασία θετική για το *Mtb* και αρνητική για τα λοιπά είδη, β) παραγωγή θερμοανθεκτικής καταλάσης, δοκιμασία αρνητική για το *Mtb* (παράγει μικρή ποσότητα θερμοευαίσθητης καταλάσης) και θετική για τα λοιπά είδη. γ) δοκιμασία ουρέασης, θετική για τα βραδέως αναπτυσσόμενα μυκοβακτηρίδια, δ) δοκιμασία αναγωγής των νιτρικών, επίσης θετική για τα βραδέως αναπτυσσόμενα είδη και ε) λοιπές δοκιμασίες (παραγωγή πυραζιναμιδάσης, υδρόλυση Tween 80, αναγωγή τελουρικού, αντίδραση αρυλσουλφατάσης). Οι βιοχημικές δοκιμασίες μαζί με μικροσκόπηση (χρώσεις) και τα χαρακτηριστικά των αποικιών στις καλλιέργειες (χρώμα, θερμοκρασία επώασης, είδος υλικού) αποτελούν τις συμβατικές μεθόδους της εργαστηριακής διάγνωσης για την ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων (πίνακας Α2.).

ΠΙΝΑΚΑΣ Α2. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ *(δελτίο βιοχημικών δοκιμασιών, ΓΝΝΘΑ ΣΩΤΗΡΙΑ-ΕΚΑΜ, Καράμπελας-pdf)*.

Species	Growth in less than 7 days	Pigment Formation		Niacin 1 hr	Nitrate Reduction	Catalase Activity			Tween Hydrolysis (days)	Tellurite Reduction in 3 days	Growth on 5% NaCl 3-da	Arylsulfatase 2-wk	Growth on MacConkey Agar	Clinical Significance
		Dark	Light			Rm Temp	SQ mm	pH7 68°						
<i>M. tuberculosis</i>	-	-	-	-	+ 3/5+	S	<45	-	>5	-	-	-	-	+
<i>M. bovis</i>	-	-	-	-	-	S	<45	-	>5	-	-	-	-	+
<i>M. kansasii</i>	-	-	+	+	- 3/5+	R	>45	+	<5	-	-	-1+	-	+
<i>M. marinum</i>	+	-	+	+	V	S	<45	+	<5	-	-	-2+	4+	+
<i>M. simiae</i>	-	-	+	+	+	R	>45	+	>5	-	-	-	-	+
<i>M. scrofulaceum</i>	-	+	+	-	-	R	>45	+	-	-	-	-	-	+
<i>M. gordonae</i>	-	+	+	-	-	R	>45	+	5-10	-	-	+	-	-
<i>M. szulgai</i>	-	+	+	**	-	R	>45	+	>5	-	-	-1+	+	+
<i>M. flavescens</i>	+	+	+	-	+	R	>45	+	5-10	-	+	-	-4+	-
<i>M. avium</i> complex***	-	-	-	-	-	S	<45	+	-	+	-	-	-1+	+
<i>M. ulcerans</i>	-	-	-	-	-	R	>45	+	-	-	-	-	-	+
<i>M. xenopi</i>	-	+	+	-	-	S	<45	+	-	-	-	+	2/5+	+
<i>M. gastri</i>	-	-	-	-	-	S	<45	-	5-10	-	-	-	-	-
<i>M. terrae</i> complex	-	-	-	-	-	R	>45	+	5-10	-	-	-	-2+	-
<i>M. triviale</i>	-	-	-	-	-	R	>45	+	5-10	-	+	+	3/5+	-
<i>M. fortuitum</i>	+	-	-	-	-	R	>45	+	+	V	+	+/2+	3/5+	+
<i>M. chelonae</i>	+	-	-	-	V	R	>45	+	-	V	V	2/3+	4/5+	+
<i>M. smegmatis</i>	+	-	-	-	-	R	>45	+	<5	+	+	-	3+	-
<i>M. phlei</i>	+	+	+	-	-	R	>45	+	<5	+	+	-	-3+	-
<i>M. vaccae</i>	+	+	+	+	-	R	>45	+	<5	V	+	-	3+	-

* See Key Tables II-V for additional differential tests.

** *M. szulgai* may be photochromogenic when grown at 25° C.

*** *M. avium* complex includes *M. intracellulare*.

Key to symbols:
 - = usually negative
 + = negative, rarely positive
 ± = positive, rarely negative
 + = usually positive
 V = variable
 R = rapid
 S = slow
 Space = lack of information.

A4.2.4. Έλεγχοι εναισθησίας των αντιβιοτικών

Προηγείται η ανάπτυξη του στελέχους στα καλλιεργητικά υλικά και ακολουθεί η απομόνωση του σε καθαρή μορφή. Περιλαμβάνουν τις παρακάτω μεθόδους:

A4.2.4.1. Μέθοδος αραιώσης των αντιβιοτικών σε άγαρ (MOP–method of proportion)

Αποτελεί τη μέθοδο αναφοράς (μέθοδος των αναλογιών) των κλινικών εργαστηρίων για τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά και πραγματοποιεί υποδιπλάσιες αραιώσεις των μητρικών διαλυμάτων των αντιβιοτικών σε αποστειρωμένο H₂O.

A4.2.4.2. Μέθοδος αραιώσης των αντιβιοτικών σε υγρό θρεπτικό υλικό (MGIT–Mycobacterial Growth Indicator Tube)

Αποτελεί, επίσης, μέθοδο αναφοράς των κλινικών εργαστηρίων για τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά και συνιστά τροποποίηση της παραπάνω μεθόδου αραιώσεων σε ζωμό αντί για άγαρ. Με τις παραπάνω μεθόδους προσδιορίζονται η ΕΑΠ/MIC (ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα) και η ΕΒΠ/MBC (ελάχιστη βακτηριοκτόνο πυκνότητα), απαραίτητοι παράμετροι για την θεραπευτική των λοιμώξεων.

A4.2.4.3. Μικροσκοπική μέθοδος ανίχνευσης αντοχής (MODS–microscopy observation drug susceptibility)

Χρησιμοποιεί ζωμό Middlebrook 7H9 με αντιφυματικά για ανάπτυξη του *Mtb* και ανίχνευση αντοχής σε χρόνο ανάλογο του MGIT (7 ημέρες), ευαισθησία μεθόδου 95–97,8% και ειδικότητα 100% [7]. Η μέθοδος εφαρμόζεται εναλλακτικά, όπου δεν μπορούν να εφαρμοστούν μοριακές μέθοδοι λόγω κόστους.

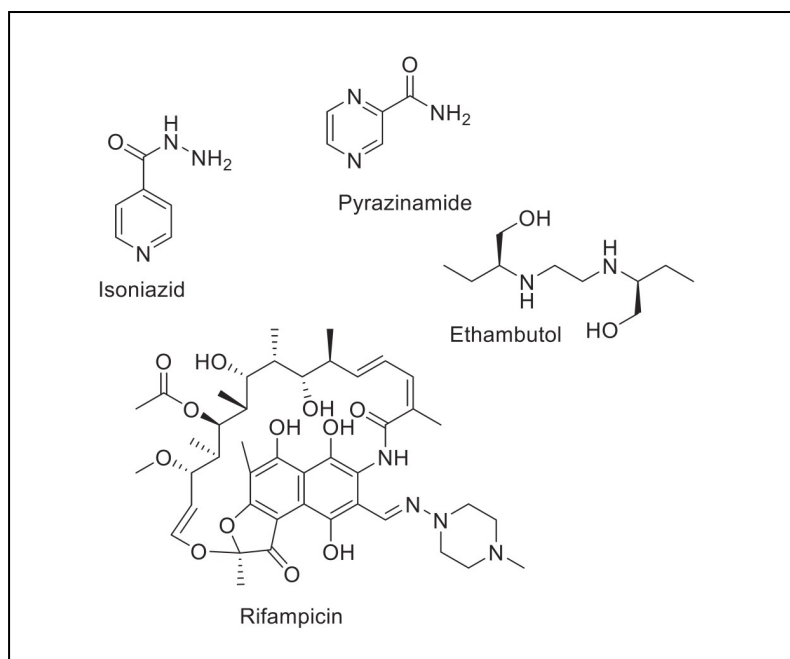
A4.2.5. Μοριακές Μέθοδοι

Βασίζονται στην αρχή του ανάστροφου υβριδισμού και μπορούν να ανιχνεύσουν ταυτόχρονα TB λοίμωξη και αντοχή σε αντιφυματικά. Δεν προϋποθέτουν την ανάπτυξη του στελέχους σε καλλιέργεια, καθώς εφαρμόζονται τόσο σε καλλιέργειες, όσο και απευθείας στα κλινικά δείγματα (π.χ. LiPARif.TB-Line probe array, που ανιχνεύει αντοχή σε ριφαμπικίνη). Η ανάπτυξή τους θα γίνει εκτενέστερα στο ειδικό μέρος.

A5. ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΒ

A5.1. ΑΝΤΙΦΥΜΑΤΙΚΑ – ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ

Τα θεραπευτικά σχήματα περιλαμβάνουν τη χορήγηση δύο (2) τουλάχιστον αντιφυματικών φαρμάκων για την αποφυγή επιλογής ανθεκτικών στελεχών κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Τα σχήματα είναι συνήθως τετραπλά, χορηγούνται για διάστημα έξι μηνών (εξάμηνο σχήμα), που μπορεί να παραταθεί έως 24 μήνες και περιλαμβάνουν 1) την ισονιαζίδη, INH (5 mg/kg/μέρα–max 300mg) 2) την ριφαμπικίνη, RIF (10mg/kg/μέρα–max 600mg), 3) την πυραζιναμίδα, PZA (20–30mg/kg/μέρα, max 2g), για το πρώτο δίμηνο), 4) την εθαμβουτόλη, EMB στους ενήλικες (25mg/kg/μέρα, για το πρώτο δίμηνο ή μέχρι να αρνητικοποιηθούν τα αποτελέσματα των δοκιμών ευαισθησίας και μετά 15mg/kg/μέρα–max 1600mg), ή 5) τη στρεπτομυκίνη, SM στα παιδιά (20–40mg/kg/μέρα), έως τα αποτελέσματα των δοκιμών ευαισθησίας να αρνητικοποιηθούν.



Εικόνα A2: Ισονιαζίδη, Ριφαμπικίνη, Πυραζιναμίδα και Εθαμβουτόλη – τα κυριότερα αντιφυματικά (D.T.Hoagland et al., A.D.D.R., 2016, 102:55-72)

Το παραπάνω τετραπλό εξάμηνο σχήμα (HRZE) είναι αποτελεσματικό και στην περίπτωση που το μυκοβακτηρίδιο παρουσιάσει αντοχή στην ισονιαζίδη. Στους ασθενείς που δεν λαμβάνουν PZA, εναλλακτικά χορηγείται εννεάμηνο σχήμα INH–RIF. Σε ασθενείς με ενεργό νόσο και αποτελέσματα εργαστηριακών

εξετάσεων αρνητικά (αρνητική Z-N, αρνητική καλλιέργεια) εφαρμόζεται τετράμηνη θεραπεία με INH–RIF–PZA για την αποφυγή ανάπτυξης ανθεκτικών στελεχών. Οι ίδιοι περίπου κανόνες εφαρμόζονται και για την θεραπεία των παιδιών. Απαραίτητη είναι η απομόνωση των ασθενών με θετική Z-N, μέχρι την αρνητικοποίηση της εξέτασης (15–20 ημέρες μετά την έναρξη θεραπείας), όπως επίσης και των ασθενών με λοίμωξη από ανθεκτικά στελέχη, λόγω του κινδύνου μετάδοσης, αλλά και του δυσχερούς της θεραπείας τους. Η θεραπεία των λοιμώξεων από άτυπα μυκοβακτηρίδια (σε ανοσοκατασταλμένους) αποτελεί ειδικό μέρος (γίνεται μνεία παρακάτω). Η συμμόρφωση των ασθενών καθ’ όλη τη διάρκεια της θεραπείας, είναι κρίσιμη, τόσο για την επιτυχία της αγωγής, όσο και για την αποφυγή εμφάνισης των ανθεκτικών μορφών της νόσου. Οι κυριότερες παρενέργειες των αντιφυματικών παρατίθενται στον πίνακα Α3.

ΠΙΝΑΚΑΣ Α3. ΚΥΡΙΟΤΕΡΕΣ ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΦΥΜΑΤΙΚΩΝ

ΑΝΤΙΦΥΜΑΤΙΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ		
ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ	ΠΡΩΤΕΥΟΝΤΑ	ΔΕΥΤΕΡΕΥΟΝΤΑ
ΗΠΑΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ	ΙΣΟΝΙΑΖΙΔΗ(INH)	ΠΑΡΑΑΜΙΝΟΣΑΛΙΚΥΛΙΚΟ ΟΞΥ(PAS)
ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΓΕΣ	ΡΙΦΑΜΠΙΚΙΝΗ(RIF)	ΕΘΕΙΟΝΑΜΙΔΗ(ΕΤΗ)
ΗΠΑΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ	ΠΥΡΑΖΙΝΑΜΙΔΗ(PZA)	ΚΥΚΛΟΣΕΡΙΝΗ(CS)
	ΕΘΑΜΒΟΥΤΑΛΗ(ΕΜΒ)	ΚΑΠΡΕΟΜΥΚΙΝΗ ΚΑΝΑΜΥΚΙΝΗ(KAN)
ΩΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ		ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΙΝΗ (SM)
ΝΕΦΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ		

Α5.2. ΑΝΟΣΟΠΡΟΦΥΛΑΞΗ (Εμβολιασμός)

Πραγματοποιείται, κυρίως, στην παιδική ηλικία (6–7 έτη), σε παιδιά με αρνητική τη δοκιμασία Mantoux, με ενδοδερμική έγχυση στο βραχίονα του εμβολίου BCG (Bacille Calmette Guerin), που προέρχεται από ζώντες, εξασθενημένους βακίλους του είδους *M. bovis*. Η εξασθένηση των μικροοργανισμών επιτυγχάνεται μετά από συνεχείς ανακαλλιέργειες του στελέχους, ώστε να μειωθεί η λοιμογόνος δύναμη τους. Σημειώνεται ότι το *Mtb* έχει ταυτόσημο γενετικό υλικό με το *M. bovis*,

διαφέρουν μόνο στις φυσικές τους ιδιότητες, όπως, επίσης, τόσο το *M. bovis*, όσο και τα λοιπά μέλη του συμπλέγματος *M. tuberculosis*, σπάνια προκαλούν νόσο στον άνθρωπο. Το εμβόλιο παρασκευάστηκε από τους Calmette-Guerrin στο Ινστιτούτο Pasteur και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1921. Προφυλάσσει σε σημαντικό βαθμό από την νόσο (αποτελεσματικότητα 80%), περιορίζει ακόμα περισσότερο τις επιπλοκές και τις εξωπνευμονικές εντοπίσεις, χωρίς, όμως, να καταλείπει εφ' όρου ζωής ανοσία (η δοκιμασία Mantoux αρνητικοποιείται 5–10 έτη μετά τον εμβολιασμό). Μετά τον επιτυχή εμβολιασμό το άτομο εκδηλώνει θετική την αντίδραση φυματίνης σε διάστημα 3–6 μηνών. Η χορήγηση του εμβολίου αντενδείκνυται αυστηρά σε ανοσοκαταστολή και HIV λοίμωξη.

A5.3. ΧΗΜΕΙΟΠΡΟΦΥΛΑΞΗ

Προβλέπεται για τις παρακάτω περιπτώσεις: 1. άτομο που πρόσφατα θετικοποιεί την αντίδραση φυματίνης (σοβαρή πιθανότητα λανθάνουσας λοίμωξης) 2. άτομο που ήρθε σε σημαντική έκθεση με το *Mtb*, π.χ. μέλη της οικογένειας του ασθενή 3. άτομο σε ανοσοκαταστολή με θετική την αντίδραση φυματίνης 4. οροθετικό άτομο, με $CD4 < 100$ κύτταρα/μλ. Συνίσταται στην χορήγηση INH, για χρονικό διάστημα 6 έως 12 μήνες, ενώ ως πιθανή παρενέργεια σημειώνεται η εμφάνιση ηπατοτοξικότητας. Η χημειοπροφύλαξη δεν συνιστάται μετά από έκθεση σε άτυπα μυκοβακτηρίδια.

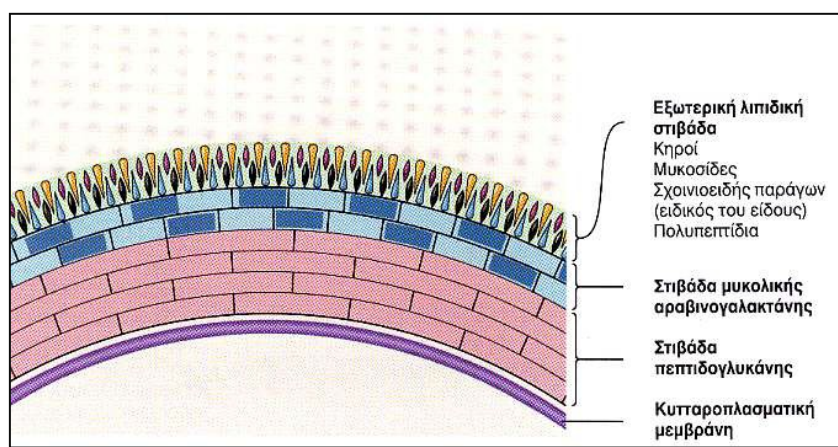
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B1. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΤΟΙΧΩΜΑ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ

Αρκετές από τις πρώιμες γνώσεις για τη δομή του κυτταρικού τοιχώματος του *Mtb* προέκυψαν τις δεκαετίες 1960 και 1970, από μελέτες των επιστημόνων του πανεπιστημίου της Οσάκα στην Ιαπωνία (Yamamura, Kato, Azuma) και του CNRS (National Center De La Recherche Scientifique) της Γαλλίας (Lederer et al 1975) και συνεχίστηκαν την δεκαετία του ογδόντα από τις εργασίες του Minnikin (Minnikin 1982), που προτείνει την αρχιτεκτονική δομή του μυκοβακτηριδιακού τοιχώματος, όπως την γνωρίζουμε σήμερα [11]. Έκτοτε, ακολούθησε μακρά περίοδος σιγής, αλλά οι τελευταίες εξελίξεις στον τομέα της Γενετικής, με την χαρτογράφηση του γενώματος του *Mtb* και των άλλων μυκοβακτηριδίων και η πρόοδος των τεχνικών ανάλυσης (NMR, mass spectral analysis), οδήγησαν σε πιο ολοκληρωμένη γνώση της δομής και της σύνθεσης των συστατικών του τοιχώματος, καθώς και των κυριότερων γονιδίων που ρυθμίζουν την διαδικασία παραγωγής τους [12].

Το εξωτερικό περίβλημα των μυκοβακτηριδίων (cell envelope), σχηματικά μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις δομές: α) την εξωτερική μεμβράνη ή κυτταρικό τοίχωμα, που αποτελεί τον πρώτο παράγοντα αντίστασης του μικροοργανισμού στους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή (λυσοζύμη, κυτοκίνες), β) τον περιπλασματικό χώρο (periplasmic space), που βρίσκεται μεταξύ κυτταρικού τοιχώματος και κυτταροπλασματικής μεμβράνης και περιέχει διάφορα αδρανοποιητικά ένζυμα και γ) την εσωτερική μεμβράνη ή κυτταροπλασματική, που αποτελείται από διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων και μεμβρανικές πρωτεΐνες, και διαφοροποιείται σε σχέση με τη μεμβράνη των λοιπών βακτηρίων από την παρουσία γλυκολιπιδίων (μυκοσίδες), όπως οι μαννοσίδες της φωσφατυδυλινοσιτόλης (PIMs), που είναι λιπογλυκάνες της μαννάνης (πολυσακχαρίτης της D-μαννόζης). Το κυτταρικό τοίχωμα (cell wall), με τη σειρά του, χωρίζεται σε δύο τμήματα α) το κατώτερο τμήμα ή σύμπλεγμα της μυκολικο-αραβινογαλακτανο-πεπτιδογλυκάνης (mAGP-complex): βρίσκεται πάνω από την κυτταροπλασματική μεμβράνη και αποτελείται από το στρώμα της πεπτιδογλυκάνης (μουρεΐνη), ομοιοπολικά συνδεδεμένο με το στρώμα της αραβινογαλακτάνης και αυτό με τη σειρά του, μέσω φωσφοεστερικών

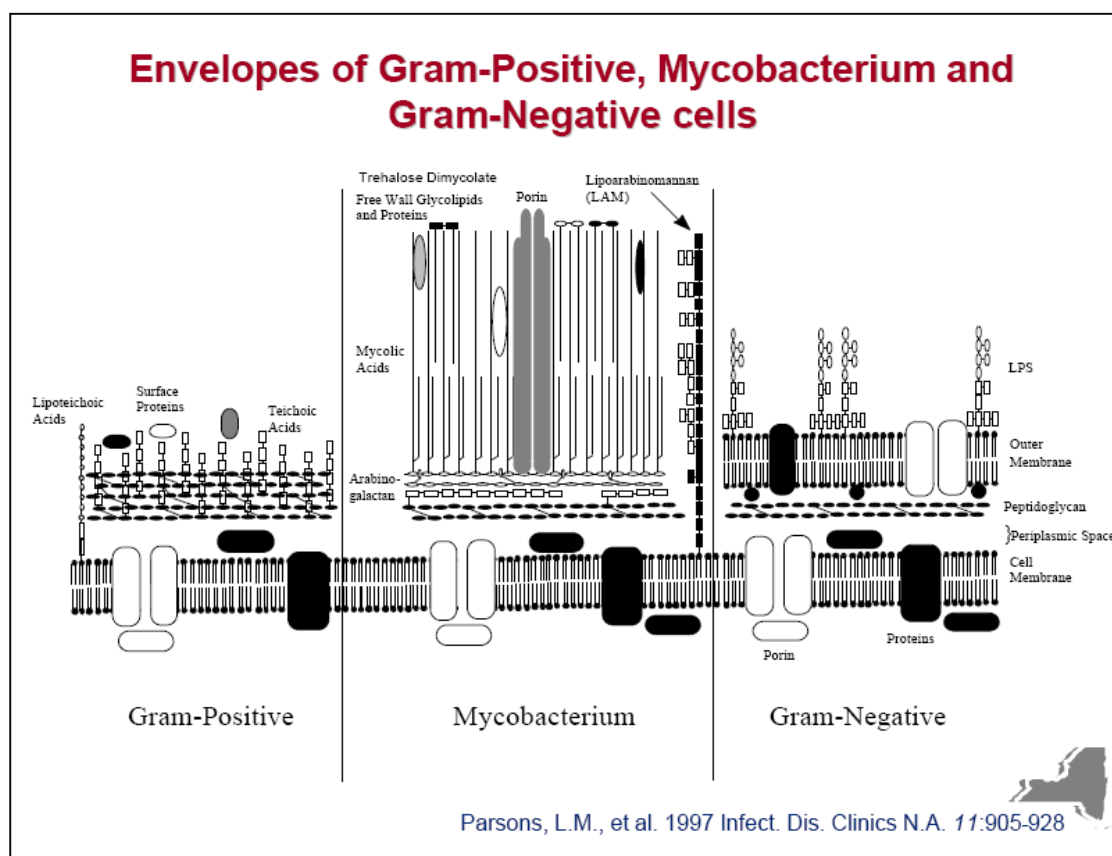
δεσμών, με τα μυκολικά οξέα του κυτταρικού τοιχώματος. Τα μυκολικά οξέα ανήκουν στα β-υδροξυ λιπαρά οξέα και αποτελούνται από δύο αλυσίδες, την μακρά ή β-αλυσίδα (μέχρι και 60 άτομα άνθρακα) και την κοντή ή α-αλυσίδα (20 και παραπάνω άτομα άνθρακα), ανάλογα με το είδος των μυκοβακτηριδίων και β) το ανώτερο τμήμα, που αποτελείται από ελεύθερα λιπίδια, λιπαρών οξέων με μακριές αλυσίδες, συμπληρωματικές ως προς τις κοντές, α-αλυσίδες των μυκολικών οξέων και λιπαρών οξέων με κοντές αλυσίδες, συμπληρωματικές ως προς τις αντίστοιχες μακριές των μυκολικών οξέων. Διάσπαρτα, στο κυτταρικό τοίχωμα βρίσκονται α) οι τοιχωματικές πρωτεΐνες (πορίνες), β) οι μαννοσίδες της φωσφατιδυλνισιτόλης (PIMs), όπως η λιπομαννάνη (lipomannan-LM) και η λιποαραβινομαννάνη (lipoarabinomannan-LAM), γ) οι κηροί (εστέρες λιπαρών οξέων με αλκοόλες) του τοιχώματος των μυκοβακτηριδίων, που έχουν ως βασικά συστατικά τις φθιοκερόλες και τα μυκοκεροσικά οξέα (π.χ. κηρός D) και δ) ο σχοινιοειδής παράγοντας ή διμυκολική τρεαλόζη (cord factor/TDM), δηλαδή γλυκολιπίδιο, που αποτελείται από ένα μόριο τρεαλόζης (δισακχαρίτης γλυκόζης), ενωμένο με εστερικό δεσμό με δύο μόρια μυκολικών οξέων (διεστέρας τρεαλόζης).



Εικόνα Β1.: Δομή του μυκοβακτηριδιακού τοιχώματος και των συστατικών της εξωτερικής λιπιδικής στιβάδας. (Parsons, L.M. et al.1997, *Inf.Dis.Clinics N.A.*, 11:905-928)

Τα παραπάνω συστατικά του μυκοβακτηριδιακού τοιχώματος, όπως λιπίδια, πρωτεΐνες, λιπογλυκάνες αποτελούν τα διαλυτά στοιχεία του και λειτουργούν ως σηματοδοτικά μόρια και ως παράγοντες αντιγονικότητας (σχοινιοειδής παράγων,

LAM), ενώ το mAGP σύμπλεγμα αποτελεί το αδιάλυτο στοιχείο (ίζημα), ζωτικής σημασίας για τη βιωσιμότητα του μικροβιακού κυττάρου (διατηρεί το σχήμα και το περιεχόμενο του κυττάρου, επιτρέπει την επιβίωση σε ανισοτονικό περιβάλλον και είναι απαραίτητο για την λαθροβίωση του μικροοργανισμού). Παράλληλα, η δομή και η βιοσύνθεση του mAGP-complex αποκτούν μείζονα σημασία στο πλαίσιο ανάπτυξης νεότερων αντιφυματικών φαρμάκων.



Εικόνα Β2.: Δομή του μυκοβακτηριδιακού τοιχώματος – Σύγκριση του Mtb τοιχώματος με Gram(+) και Gram(-) βακτήρια. (Parsons, L.M., et al.1997, *Inf.Dis.Clinics N.A.*, 11:905-928)

Β1.1. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΠΕΠΤΙΔΟΓΛΥΚΑΝΗΣ (PG) – νεότερα δεδομένα

Γενικά, η πεπτιδογλυκάνη (μουρεΐνη ή μουκοπεπτίδιο) των βακτηρίων είναι βιοπολυμερές πολυσακχαρίτη, αποτελούμενο από ευθείες (πολυοσιδικές) αλυσίδες, οι οποίες σχηματίζονται από την εναλλαγή σύνδεσης ενός μορίου N-

ακέτυλο-γλυκοζαμίνης (N-acetylglucosamine–GlcNAc) με ένα μόριο N-ακέτυλο-μουραμικού οξέος (N-acetyl-muramic acid–MurNAc), ενωμένα με β -(1→4) γλυκοσιδικό δεσμό (εδώ δρα η λυσοζύμη). Οι πολυοσιδικές αλυσίδες (100–200 μόρια) συνδέονται μεταξύ τους με βραχείες, τετραπεπτιδικές αλυσίδες, που φέρουν την εξής αλληλουχία: L-R₁ + D-Glu + L-R₃ + D-Ala, όπου D-Glu το γλουταμινικό οξύ, D-Ala η αλανίνη, ενώ L-R₁ και L-R₃ διάφορα αμινοξέα, με την αλληλουχία των αμινοξέων να είναι πάντα του τύπου L₁-D₂-L₃-D₄, εκτός αν περιέχει γλυκίνη (Gly). Τα τετραπεπτίδια συνδέονται με το μουραμικό οξύ στην μία άκρη τους (L-R₁ ή D-Ala), ενώ, στην άλλη άκρη τους, με το διπλανό τετραπεπτίδιο (L-R₁ + L-R₃), είτε απευθείας, είτε μέσω πεπτιδικής γέφυρας (π.χ. ολιγοπεπτίδιο γλυκίνης) με πεπτιδικούς δεσμούς (εδώ δρουν οι β-λακτάμες). Ο βαθμός αντοχής του στρώματος της πεπτιδογλυκάνης είναι συνάρτηση της πυκνότητας του, η οποία, με την σειρά της, εξαρτάται από το μέγεθος των πολυοσιδικών αλυσίδων, τον αριθμό των τετραπεπτιδίων και των πεπτιδικών δεσμών, καθώς και των υδρογονικών δεσμών, που μπορεί να δημιουργηθούν μέσα στο μόριο της πεπτιδογλυκάνης [13]. Αυτή η βασική δομή διαφοροποιείται, όσον αφορά την μυκοβακτηριδιακή πεπτιδογλυκάνη στα εξής σημεία:

1) το μουραμικό οξύ συμμετέχει στη δομή με δύο μορφές, ως N-ακέτυλο-μουραμικό οξύ (MurNAc) και ως N-γλυκόλυκο-μουραμικό οξύ (N-glycolyl-muramic acid – MurNGly) και αυτή η διαφοροποίηση συναντάται μόνο στην πεπτιδογλυκάνη του *Mtb* και του *M. smegmatis*, παρέχοντας δυνατότητα για επιπλέον δεσμούς υδρογόνου και περαιτέρω ενδυνάμωση του στρώματος της πεπτιδογλυκάνης, ενώ, παράλληλα, προστατεύει το τοίχωμα από τη δράση της λυσοζύμης [11], [14], [15], [16], [17].

2) οι πλάγιες, τετραπεπτιδικές αλυσίδες περιέχουν την εξής αλληλουχία αμινοξέων: L-alaninyl (L-R₁) + D-isoglutaminyl (D-R₂) + meso-diaminopimelyl (L-R₃) + D-alanine (D-R₄), όπου στη θέση L-R₃, το μεσο-διαμινοπιμελικό οξύ (DAP) αποτελεί κοινό στοιχείο στα Gram(-) βακτήρια και στα μυκοβακτηρίδια, ενώ τα Gram(+) βακτήρια περιέχουν L-λυσίνη στην ίδια θέση. Επιπλέον, οι πεπτιδικοί δεσμοί (cross links) δημιουργούνται μεταξύ των τετραπεπτιδίων (χωρίς την παρουσία ενδιάμεσης πεπτιδικής γέφυρας, όπως στα Gram+), στα εξής σημεία, μεταξύ μεσο-διαμινοπιμελικού οξέος (DAP) και D-αλανίνης (L-R₃ + D-

R₄), όπως είναι σύνηθες στα προκαρυωτικά, αλλά και μεταξύ 2 μορίων DAP, γειτονικών τετραπεπτιδίων (ιδιότυπο χαρακτηριστικό), δηλαδή L-R₃ + L-R₃ [18], [19], [20], [21]. Η παρουσία των διασταυρούμενων πεπτιδικών δεσμών (cross links) στην πεπτιδογλυκάνη των μυκοβακτηριδίων ανέρχεται σε ποσοστό 70–80% (Matsushashi 1966), ενώ για τα λοιπά βακτήρια, το παραπάνω ποσοστό περιορίζεται μόλις στο 50% του συνόλου [22]. Από την πλευρά τους, οι ιδιότυποι L-R₃ + L-R₃ πεπτιδικοί δεσμοί παίζουν σημαντικό ρόλο στην λαθροβίωση του *Mtb*, αφού ανευρίσκονται αυξημένοι στο κυτταρικό τοίχωμα των λαθροβιούντων μικροοργανισμών, ενώ η κατηγορία των ενζύμων, που είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία τους (L,D-τρανσπεπτιδάσες ή Ldt), έχει συνδεθεί με αντοχή σε β-λακταμικά αντιβιοτικά (π.χ. αμοξικιλίνη, καρβαπενέμες) και αποτελεί πιθανό θεραπευτικό στόχο [23], [24].

3) μία επιπρόσθετη διαφορά με την πεπτιδογλυκάνη των λοιπών βακτηρίων είναι η σύνδεση των μουραμικών οξέων της PG με την γαλακτάνη, μέσω φωσφοδιεστερικού δεσμού, μεταξύ της υδροξυλομάδας του άνθρακα C6 του μουραμικού οξέος (MurNGly) και της συνδετικής μονάδας (α -L-rhamnopyranose-(1→3)- α -D-GlcNAc(1→P) linker unit) της αραβινογαλακτάνης [25]. Η βιοσύνθεση της μυκοβακτηριδιακής πεπτιδογλυκάνης (PG) περιλαμβάνει τρία στάδια: α) το κυτταροπλασματικό β) το μεμβρανικό και γ) το περιπλασματικό στάδιο. Στο πρώτο στάδιο (κυτταροπλασματικό) μια σειρά από βιοχημικές αντιδράσεις οδηγούν στην βιοσύνθεση του UDP-N-ακέτυλο-μουραμικού οξέος (UDP-MurNAc) ως τελικό προϊόν, που, στη συνέχεια, μετά την προσθήκη των αμινοξέων (πρόδρομο μόριο), θα μεταφερθεί, με τη βοήθεια ενός λιπιδιακού μεταφορέα (φωσφολιπίδιο), μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, στον περιπλασματικό χώρο. Η όλη διαδικασία ξεκινάει στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου (κυτταροπλασματικό στάδιο), από ένα κυστίδιο μουρεΐνης, με την ενεργοποίηση (start point) του γλυκονουκλεοτιδίου UDP-GlcNAc [21]. Το UDP-GlcNAc (UDP-N-ακέτυλο-γλυκοζαμίνη) συνθέτεται από το μόριο της 6-φώσφορο-D-φρουκτόζης σε τέσσερα βήματα, με την βοήθεια τριών ενζύμων, α) του ενζύμου GlnS, (αμινοτρανσφεράση, που μετατρέπει την 6-φώσφορο-D-φρουκτόζη σε 1-φώσφορο-D-γλυκοζαμίνη), β) του ενζύμου GlnM, (μουτάση, που καταλύει την μετατροπή της 1-φώσφορο-D-γλυκοζαμίνη σε 6-φώσφορο-D-γλυκοζαμίνη) και γ) του ενζύμου GlnU (τρανσφεράση, που λειτουργεί διττά ως

ένζυμο, με το αμινοτελικό άκρο του να ακετυλιώνει το μόριο της 6-φώσφορο-D-γλυκοζαμίνης, ενώ, με το καρβοξυτελικό του άκρο, να ουριδιλιώνει το μόριο της 1-φώσφορο-N-ακέτυλο-γλυκοζαμίνης), οδηγώντας στην βiosύνθεση του UDP-GlcNAc. Τα παραπάνω ένζυμα αποτελούν μελλοντικούς φαρμακευτικούς στόχους ενώ, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός, ότι η φωσφορυλίωση ενός κατάλοιπου θρεονίνης στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης GlmU, μέσω της PknB, (κινάση σερίνης-θρεονίνης), αλλοιώνει την λειτουργικότητα του ενζύμου [21], [26]. Σημειώνουμε, ότι τα γονίδια, που κωδικοποιούν τα ένζυμα GlmM και GlmU, μελετήθηκαν στον οργανισμό *M. smegmatis* [27], [28], ενώ, το αντίστοιχο γονίδιο, που κωδικοποιεί το ένζυμο GlmS δεν έχει ακόμη μελετηθεί. Στη συνέχεια, από το μόριο του UDP-GlcNAc συνθέεται το τελικό προϊόν, το UDP-MurNAc (UDP-N-ακέτυλο-μουραμικό οξύ), μέσω μιας διαδικασίας δύο βημάτων, που χρησιμοποιεί δύο ένζυμα (MurA, MurB). Το ένζυμο MurA (πυρουβυλτρανσφεράση) καταλύει την μεταφορά του φωσφοενολοπυρουβικού οξέος στο μόριο του UDP-GlcNAc και αποτελεί στόχο δράσης της φωσφομυκίνης (αντιβιοτικό ευρέως φάσματος), που αδρανοποιεί το ένζυμο, αλκυλιώνοντας ένα ενεργό κατάλοιπο κυστίνης. Το *Mtb* παρουσιάζει εγγενή αντοχή στη φωσφομυκίνη, επειδή στην θέση της κυστίνης το μυκοβακτηριδιακό ένζυμο φέρει ασπαρτικό οξύ [29]. Το ένζυμο MurB (αναγωγή) χρησιμοποιεί το NADPH ως δότη ηλεκτρονίων, για να οδηγήσει στη σύνθεση του UDP-MurNAc ως τελικό προϊόν, ενώ η δράση του έγινε γνωστή από μελέτες (in silico homology modeling and molecular dynamics simulations) προσομοίωσης [30], [21]. Αμέσως μετά τη βiosύνθεση των σακχάρων ακολουθεί η συνένωσή τους με τις πεπτιδικές αλυσίδες των αμινοξέων από τις ενδοκυττάριας, ATP-εξαρτώμενες, λιγάσες του μουραμικού οξέος (MurC, MurD, MurE & MurF) και η δημιουργία των πρόδρομων μορίων μονοσακχαρίτη-πενταπεπτιδίου. β) Στο επόμενο στάδιο (μεμβρανικό), τα πρόδρομα αυτά μόρια μεταφέρονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, με τη βοήθεια ενός λιπιδιακού μεταφορέα (φωσφολιπίδιο). Το σύμπλεγμα πρόδρομο μόριο-λιπιδιακός μεταφορέας θα ενωθεί με ένα μόριο N-ακέτυλο-γλυκοζαμίνης, καταλήγοντας στο σχηματισμό συμπλέγματος δισακχαρίτη-πενταπεπτιδίου-μεταφορέα, με ταυτόχρονη αποδέσμευση του λιπιδιακού μεταφορέα. γ) Στο τελικό στάδιο (περιπλασματικό) ο δισακχαρίτη-πενταπεπτιδίου ενώνεται με τα λοιπά μόρια της πεπτιδογλυκάνης, συμβάλλοντας

στην επιμήκυνσή του πολυμερούς και, με αυτό τον τρόπο, στην πάχυνση του κυτταρικού τοιχώματος. Σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, στο τελικό στάδιο (περιπλασματικό), φαίνεται να διαδραματίζουν οι πενικιλίνο-δεσμευτικές πρωτεΐνες (PBPs), όπως π.χ. οι P_{on}A1 και P_{on}A2, που κωδικοποιούνται από τα αντίστοιχα γονίδια *Rn0050* και *Rn3682*, έχουν διττό ενζυματικό ρόλο (λειτουργούν ως τρανσπεπτιδάσες και ως γλυκοσιδάσες αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τον λιπιδιακό μεταφορέα), συμβάλλουν στη διατήρηση του κυτταρικού σχήματος, τη λαθροβίωση του μικροοργανισμού και συμμετέχουν σε υδρολυτικές διαδικασίες επαναδιάταξης της πεπτιδογλυκάνης, επιβεβαιώνοντας το δυναμικό και μεταβαλλόμενο χαρακτήρα της βιοσύνθεσής της. Σημειώνουμε ότι, νεότερες μελέτες εκτιμούν την τρισδιάστατη δομή της πεπτιδογλυκάνης να αποτελείται τόσο από παράλληλα, αλλεπάλληλα στρώματα με την κυτταροπλασματική μεμβράνη, όσο και από διαφραγμάτια, διαμερισματοποιώντας επιπλέον τον περιπλασματικό χώρο, αυξάνοντας την αντοχή του κυτταρικού τοιχώματος και διευκολύνοντας την κυτταρική διαίρεση [21], [30], [31].

B1.2. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΑΡΑΒΙΝΟΓΑΛΑΚΤΑΝΗΣ (AG) – νεότερα δεδομένα

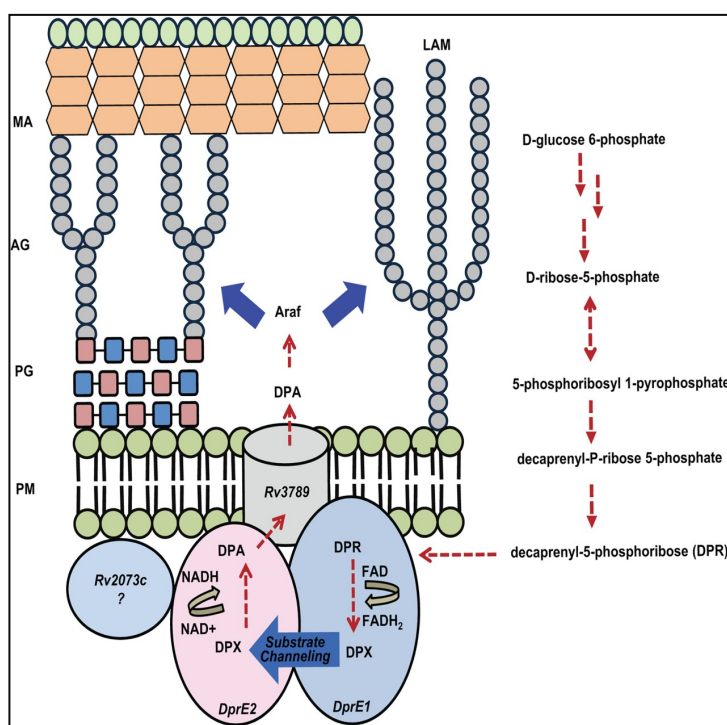
Γενικά, η αραβινογαλακτάνη των μυκοβακτηριδίων είναι υδρόφοβο βιοπολυμερές (ετεροδιμερές πολυσακχαρίτη), αποτελούμενο από τα σάκχαρα αραβινόζη και γαλακτόζη, που συμμετέχουν στην κυκλική μορφή τους (δακτύλιοι φουρανόζης), ως D-arabinofuranosyl (D-Araf) και D-galactofuranosyl (D-Galf) αντίστοιχα. Το σύμπλεγμα της AG αποτελεί το ενδιάμεσο στρώμα για την σύνδεση της PG με τα μυκολικά οξέα του κυτταρικού τοιχώματος. Αποτελεί περίπου 35% της συνολικής μάζας του κυτταρικού τοιχώματος των μυκοβακτηριδίων και συνδέεται, κατά διαστήματα, με μέρος των μουραμικών οξέων της PG (ποσοστό 10–15%), μέσω φωσφοδιεστερικών δεσμών [21], [33], [34], [35], [36], [37]. Το βιοπολυμερές της AG των μυκοβακτηριδίων είναι μοναδικό στο είδος του, τόσο για το είδος των σακχάρων, που σχηματίζουν τη δομή του (οι δακτύλιοι φουρανόζης της αραβινόζης και της γαλακτόζης είναι ασυνήθεις στη φύση και το σάκχαρο της ραμνόζης της συνδετικής μονάδας δεν υπάρχει στον ανθρώπινο οργανισμό), όσο και για τον τρόπο που αυτά συνενώνονται μεταξύ τους, όχι ως μονάδες σακχάρων

επαναλαμβανόμενες (repeating units), αλλά ως επαναλαμβανόμενα δομικά (repeating structural motifs) μοτίβα [12],[38]. Ειδικότερα, το υδρόφοβο βιοπολυμερές της AG αποτελείται από 3 βασικά συστατικά: α) την συνδετική μονάδα (α -L-rhamnopyranose-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcNAc(1 \rightarrow P) linker unit): πρόκειται για ένα δισακχαρίτη, που σχηματίζεται από την συνένωση ενός μορίου ραμνόζης (L-rhap) σε κυκλική μορφή (δακτύλιος πυρανόζης) και ενός μορίου N-ακέτυλο-γλυκοζαμίνης (GlcNAc), ενωμένα με α (1 \rightarrow 3) γλυκοσιδικό δεσμό β) τις διακλαδούμενες αλυσίδες της αραβινάνης (arabinan), που σχηματίζονται από την συνένωση των μορίων της αραβινόζης (D-Araf) με βάση το εξής δομικό μοτίβο [β -D-Araf-(1 \rightarrow 2)- α -D-Araf]₂-3,5- α -D-Araf-(1 \rightarrow 5)- α -D-Araf, δηλαδή αποτελούνται από μία ραχοκοκαλιά σακχάρων αραβινόζης (D-Araf), ενωμένα με α (1 \rightarrow 5) γλυκοσιδικό δεσμό και σακχάρων αραβινόζης (D-Araf), ενωμένα με α (1 \rightarrow 3) γλυκοσιδικό δεσμό, που ενώνονται μεταξύ τους με α (3 \rightarrow 5) γλυκοσιδικό δεσμό, έτσι ώστε (3,5- α -D-Araf) να αποτελεί το σημείο διακλάδωσης της αλυσίδας. Επιπλέον, στο σημείο διακλάδωσης προστίθεται και άλλη αλυσίδα σακχάρων (D-Araf), ενωμένα με α (1 \rightarrow 5) γλυκοσιδικό δεσμό, ενώ τα σάκχαρα στα τελικά άκρα της αλυσίδας (μη ανάγοντα άκρα-non reducing termini), συνενώνονται με β -(1 \rightarrow 2) γλυκοσιδικό δεσμό. γ) την ευθεία αλυσίδα της γαλακτάνης (galactan), που σχηματίζεται από την συνένωση 30 περίπου μορίων γαλακτόζης (D-Galf), με εναλλασσόμενους β -(1 \rightarrow 5) και β -(1 \rightarrow 6) γλυκοσιδικούς δεσμούς, δηλαδή με βάση το εξής δομικό μοτίβο [β -D-Galf-(1 \rightarrow 5)- β -D-Galf-(1 \rightarrow 6)]_n, όπου n 30 [12], [21], [37], [38]. Σημειώνουμε ότι, τα 2/3, περίπου, των αλυσίδων της αραβινάνης είναι συνδεδεμένα με το συμπλέγμα της γαλακτάνης (Brennan 2003) και, συγκεκριμένα, τμήματα αλυσίδων D-αραβινάνης, καθένα αποτελούμενο από 23 D-Araf σάκχαρα, συνδέονται σε τρία σημεία της γαλακτάνης, ειδικότερα στο όγδοο, δέκατο και δωδέκατο σάκχαρο (D-Galf) της αλυσίδας της γαλακτάνης [COH-5 των β -D-Galf-(1 \rightarrow 6)] ενώ, με την σειρά της, η γαλακτάνη συνδέεται με την ραμνόζη της συνδετικής μονάδας και μέσω αυτής, με μέρος των μουραμικών οξέων (MurNGly) της πεπτιδογλυκάνης [12], [21], [25].

Η βιοσύνθεση των βασικών συστατικών (LU, arabinan & galactan) της αραβινογαλακτάνης (AG) πραγματοποιείται συνολικά, ως σύμπλεγμα δομών, πάνω σε ένα λιπίδιο-μεταφορέα (polyprenyl-P carrier lipid – πρόκειται για φωσφολιπίδιο, αποτελούμενο από 50 άτομα άνθρακα), ξεκινώντας με τη

βιοσύνθεση της συνδετικής μονάδας (LU), παράλληλα, με την ταυτόχρονη επιμήκυνση των αλυσίδων της αραβινάνης και της γαλακτάνης, ενόσω το πρόδρομο αυτό σύμπλεγμα λιπιδίου-AG, μεταφέρεται, διαμέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, στον περιπλασματικό χώρο [12]. Ειδικότερα, η βιοσύνθεση του δισακχαρίτη της συνδετικής μονάδας (LU) περιλαμβάνει δύο στάδια, αρχικά την προσθήκη του σακχάρου GlcNAc-P στο φωσφολιπίδιο, από το μόριο δότη σακχάρων UDP-GlcNAc, σχηματίζοντας το γλυκολιπίδιο-1 (C₅₀-P-P-GlcNAc ή GL-1), μέσω μίας τρανσφεράσης (*α-N*-acetylglucosaminyltransferase, *Rv1302*) και, στην συνέχεια, την προσθήκη της ραμνόζης στο γλυκολιπίδιο-1, σχηματίζοντας το γλυκολιπίδιο-2 (GL-2), μέσω της τρανσφεράσης της ραμνόζης (ramnosyltransferase), με τους αναστολείς της βιοσύνθεσης της ραμνόζης (inhibitors of *rmlABCD*) να αποτελούν πολλά υποσχόμενη φαρμακευτική κατηγορία [21], [39], [40], [41], [42]. Ομοίως, η βιοσύνθεση της γαλακτάνης περιλαμβάνει δύο στάδια, αρχικά τη σύνθεση του UDP-Galp (UDP-γαλακτόζη ως δακτύλιος πυρανόζης), χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το UDP-Glcp (UDP-γλυκόζη ως δακτύλιος πυρανόζης), με τη βοήθεια μίας επιμεράσης (UDP-glucose-4-epimerase, *Rv3634*) και, στην συνέχεια, την μετατροπή του UDP-Galp σε UDP-Galf (θα αποτελέσει τον δότη των μονάδων γαλακτόζης-Galf) με τη δράση μίας μουτάσης (πρόκειται για το φλαβοένζυμο UDP-galactopyranose mutase, *Rv3809c*) [21], [43], [44], [45]. Τέλος, η βιοσύνθεση της αραβινάνης ακολουθεί το γραμμικό μονοπάτι των πεντοζών, ξεκινώντας από το μόριο της γλυκόζης (6 phosphate-D-glucose), και εμπλέκει μία σειρά από μεμβρανικές γλυκοσυλοτρανσφεράσες (glycosyltransferases), χρησιμοποιώντας ως μοναδικό υπόστρωμα των παραπάνω ενζύμων και ενεργοποιημένο δότη των σακχάρων της αραβινόζης (D-Araf) της AG και του LAM, συνδεδεμένο με τον λιπιδιακό μεταφορέα, το μόριο DPA (decaprenylphosphoryl-β-D-arabinose) [21], [46], [47], [48]. Η εθαμβουτόλη (EMB), ως αντιφυματικό πρώτης γραμμής, δρα, αναστέλλοντας τα παραπάνω ένζυμα, ενώ η υπερέκφραση των γονιδίων τους (overexpression of *embA*, *embB*) προσφέρει αντοχή στο αντιβιοτικό. Ο επιμερισμός του DPA από το πρόδρομο μόριο DPR (decaprenylphosphoryl-β-D-ribose) αποτελεί κομβικό σημείο της διαδικασίας, που περιλαμβάνει δύο στάδια (two-step epimerization process) και χρησιμοποιεί δύο σημαντικά ένζυμα-φαρμακευτικούς στόχους, το Dpre1 και το Dpre2 [21], [53]. Το Dpre1 (*Rv3790*)

είναι μία FAD-εξαρτώμενη οξειδάση (φλαβοένζυμο), που οξειδώνει το μόριο DPR στον ενδιάμεσο μεταβολίτη DPK (decaprenylphosphoryl-2-keto-ribose), ενώ το Dpre2 (*Rv3791*) είναι μία NAD-εξαρτώμενη αναγωγή, που ανάγει το ενδιάμεσο μόριο DPK στο τελικό μόριο DPA[21], [53]. Οι βενζοθειαζόνες (Benzothiazones/BTZs) αποτελούν νεότερη κατηγορία αντιφυματικών, που δρουν, αναστέλλοντας το Dpre1. Η μικροβιοκτόνος δράση τους, όπως έδειξαν πρόσφατες μελέτες, δεν συνίσταται στην αδυναμία βιοσύνθεσης του DPA, αλλά στη συσσώρευση του DPR, που οδηγεί τον μικροοργανισμό σε λαθροβίωση [21], [49]. Τέλος, η μεταστοφή του DPA, που συνθέτεται στο εσωτερικό άκρο της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (εικόνα B3), ώστε να αποδώσει τα σάκχαρα στον περιπλασμικό χώρο, γίνεται με τη βοήθεια της DPA-φλιπάσης (*Rv3789*) [21], [53].



Εικόνα B3: Δομή, δυναμική και αλληλεπίδραση των ενζύμων DprE1 και DprE2 στη βιοσύνθεση της AG (*Structure, Dynamics & Interaction of MTB DprE1- DprE2 by Molecular Modeling, Simulation, & Electrostatic Studies*. Bhutani, S. Loharch, P. Gupta, R. Madathil, R. Parkesh. *journal.pone0119771*, 19/03/15).

B1.3. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (ΜΑ) – νεότερα δεδομένα

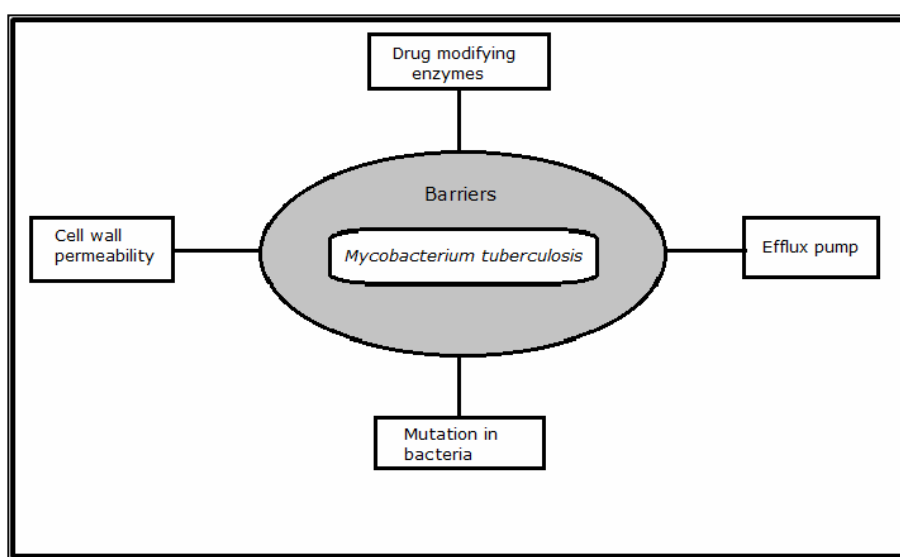
Γενικά, τα μυκολικά οξέα, αποτελούν με βάση την ποικιλότητα και την πολυπλοκότητά τους, συστατικά χαρακτηριστικά του γένους και του είδους των βακτηρίων [51]. Πρόκειται για επιμήκη μόρια λιπαρών οξέων (α-αλκυλ, β-υδροξυ-λιπαρά οξέα), με σκελετό έως και 90 άτομα άνθρακα. Αποτελούν βασικό συστατικό της εξωτερικής στοιβάδας των μυκοβακτηριδίων και διαφοροποιούνται σε τάξεις, ανάλογα με το είδος. Το *Mtb* περιέχει τρεις βασικές κατηγορίες ΜΑ: α) τα α-μυκολικά οξέα, που αποτελούν τα κυριότερα και πιο διαδεδομένα μεταξύ των μυκοβακτηριδίων, με συνηθέστερο μήκος 76–86 άτομα άνθρακα, β) τα κετο-μυκολικά οξέα, διαδεδομένα σε σαπροφυτικά και παθογόνα είδη μυκοβακτηριδίων και γ) τα μεθοξυ-μυκολικά οξέα, που απαντώνται σε αργά πολλαπλασιαζόμενα (λαθροβιούντα) παθογόνα μυκοβακτηρίδια. Οι μακριές ανθρακικές αλυσίδες των ΜΑ, μετά από εκδιπλώσεις τοποθετούνται παράλληλα, προς τον επιμήκη άξονα του κυττάρου, σχηματίζοντας λιπιδική μεμβράνη πάχους 7–8 nm. Ανάλογα με την οργάνωση της κυτταρικής μεμβράνης, τα ΜΑ μπορούν να επιδείξουν α) αντίσταση στον χημικό τραυματισμό και την αφυδάτωση, β) χαμηλή διαπερατότητα σε υδρόφοβα αντιβιοτικά, γ) δυνατότητα σχηματισμού βιομεμβρανών και δ) ικανότητα αντίστασης – αντοχής, εντός του ξενιστή, συμβάλλοντας στην επιβίωση του μικροβίου. Τα ΜΑ υπάρχουν με τρεις μορφές στην εξωτερική μεμβράνη: α) ως μέρος του μυκοβακτηριδιακού τοιχώματος, ομοιοπολικά συνδεδεμένα με την ΑG, β) ως εστέρες (μόνο- ή δι-εστέρες) μορίων σακχαριτών π.χ. TDM και γ) ως ελεύθερα ΜΑ. Της βιοσύνθεσης των ΜΑ, προηγείται η σύνθεση των λιπαρών οξέων, που γίνεται με τη συνδρομή των συνθασών (Fatty Acid Synthases I & II) των λιπαρών οξέων. Σημειώνουμε ότι υπάρχουν δύο διαφορετικοί δρόμοι για την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων (FAS), τα θηλαστικά χρησιμοποιούν τον FAS I δρόμο, ενώ τα βακτήρια τον FAS II. Τα είδη των μυκοβακτηριδίων διαθέτουν και τους δύο δρόμους (FAS I & FAS II), παρουσιάζοντας διακριτή υποομάδα συνθετασών του FAS II δρόμου, για τη βιοσύνθεση μυκολικών οξέων με ιδιαίτερα μακρές αλυσίδες [52]. Τα ένζυμα των FAS-I & FAS-II, με επαναλαμβανόμενες αντιδράσεις τροποποίησης – προσθήκης παράγουν πρόδρομα μόρια, που καταλήγουν σε ώριμα ΜΑ. Ειδικότερα, ο μηχανισμός FAS-I παράγει δύο ειδών μόρια, ένα πρόδρομο μόριο με C16–C18

ανθρακική αλυσίδα και άλλο ένα με ανθρακική αλυσίδα C24–C26. Το μόριο C24–C26 θα αποτελέσει τη βάση του μικρού α -βραχίονα των MA, ενώ το μόριο C16–C18, εισερχόμενο στον μηχανισμό επιμήκυνσης FAS-II, θα αποτελέσει πρόδρομο για την σύνθεση του επιμήκους βραχίονα των MA, ειδικότερα του μερομυκολικού οξέος [52].

B2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΤΩΝ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ

Η αντοχή των μυκοβακτηριδίων στα αντιβιοτικά ακολουθεί τους νόμους της αυτόματης μετάλλαξης και χωρίζεται σε δύο κύριες κατηγορίες α) την ενδογενή ή φυσική αντοχή (intrinsic drug resistance) και β) την επίκτητη αντοχή (acquired drug resistance). Η πρώτη (ενδογενής) αποτελεί εγγενή ιδιότητα του είδους, που οφείλεται κυρίως στη δομή – οργάνωση του μικροβιακού κυττάρου και αφορά όλα τα κύτταρά του, ανεξαρτήτως συνθηκών απομόνωσης. Είναι πάντα μεταβιβάσιμη στους απογόνους (κάθετη μετάδοση), γιατί είναι χρωμοσωμική (η οριζόντια μετάδοση είναι σπάνια ή ανύπαρκτη) και καθορίζει τους αρχέγονους τύπους (wild-type) του είδους σε σχέση με τα αντιβιοτικά [13]. Το είδος *Mtb* παρουσιάζει ενδογενή αντοχή σε πολλά αντιβιοτικά (β -λακταμικά, φωσφομυκίνη) και οι κυριότεροι μηχανισμοί με τους οποίους το επιτυγχάνει, είναι μέσω του ιδιότυπου κυτταρικού τοιχώματος και των αδρανοποιητικών ενζύμων, που περιέχει στον περιπλασματικό του χώρο. Η δεύτερη (επίκτητη) αντοχή αφορά συγκεκριμένα μόνο στελέχη του *Mtb* (και όχι το σύνολο των κυττάρων του), που μέσω γενετικών αλλαγών (de novo μεταλλάξεις) αποκτούν αντοχή στα αντιφυματικά, με κυριότερους μηχανισμούς την τροποποίηση ή υπερέκφραση του στόχου δράσης του αντιβιοτικού ή την αδρανοποίηση σε στάδιο προφαρμάκου. Καθορίζει σαφείς φαινότυπους αντοχής των μεταλλαγμένων στελεχών, διαφορετικούς του φαινοτύπου φυσικής αντοχής, που χαρακτηρίζει τα wild-type βακτήρια. Σημειώνουμε ότι η επίκτητη αντοχή του *Mtb* είναι αποκλειστικά αποτέλεσμα αυθόρμητων μεταλλάξεων (de novo) του γονιδιώματός του [54] και δεν οφείλεται σε μεταφορά γονιδίων αντοχής (οριζόντια μεταφορά), μέσω άλλων κυττάρων (π.χ. εισαγωγή γονιδίων από πλασμίδια, τρανσποζόνια) ενώ, μεταφορά γενετικού υλικού, που παρατηρείται μεταξύ των διάφορων ειδών των μυκοβακτηριδίων, δεν έχει αποδειχθεί ότι προσδίδει αντοχή σε αντιφυματικά [55]. Η κάθετη μετάδοση είναι δυνατή, αλλά, μερικές φορές, είναι τυχαία, όπως στην

περίπτωση απουσίας πίεσης επιλογής (παρουσία αντιβιοτικού), που επιτρέπει την σταθεροποίησή της [13]. Η παρουσία των αντιβιοτικών προκαλεί πίεση στα βακτήρια, ενεργοποιώντας, τόσο τους μεταλλακτικούς μηχανισμούς, όσο και τους φυσιολογικούς μηχανισμούς άμυνας των μικροοργανισμών. Τέτοιες μεταλλακτικές τροποποιήσεις συνεπάγονται ένα κάποιο κόστος επιβίωσης του μικροοργανισμού (fitness cost), που, γενικότερα, μεταφράζεται, συνήθως, ως πτώση της *in vivo* ανάπτυξης του (σε σχέση με τα wild-type βακτήρια), ειδικότερα δε στο *Mtb*, πολύ συχνά, ως μείωση της λοιμογόνου δράσης του (transmission). Ως αντιστάθμισμα στο κόστος επιβίωσης, παρατηρούνται δευτερεύουσες μεταλλάξεις (compensatory mutations), που, από μόνες τους, δεν προσδίδουν αντοχή, αλλά, μπορούν να λειτουργήσουν επιστατικά (φαινόμενο επίστασης) με τα μεταλλαγμένα γονίδια αντοχής, διαφοροποιώντας το αποτέλεσμα της δράσης των φαρμάκων ή ενισχύοντας την ανάπτυξη του μικροοργανισμού [56].



Εικόνα Β4.: Σχηματική περιγραφή των κυριοτέρων μηχανισμών αντοχής του *Mtb* (*Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* (2014) 3(8) 528-546)

Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η παρουσία των γονιδίων *rpoA* και *rpoC* σε στελέχη (compensatory mutations) ανθεκτικά στη ριφαμπικίνη (RIF-resistant strains, MDR-TB), από την Ρωσία [56]. Η παρουσία των δύο παραπάνω γονιδίων λειτουργεί επιστατικά, μετριάζοντας το κόστος επιβίωσης από την βασική μετάλλαξη του *rpoB* γονιδίου, υπεύθυνη για την αντοχή στη RIF, μέσω

τροποποίησης της β-αλυσίδας της RNA-πολυμεράσης. Η αντοχή στη RIF οφείλεται σε ποσοστό >95% σε μεταλλάξεις σε μια μικρή περιοχή 81 βάσεων του *rpoB* γονιδίου που κωδικοποιούν για τα αμινοξέα 511-533 του πολυπεπτιδίου της β-υπομονάδας [57]. Αντιθέτως, η αντοχή στην INH οφείλεται σε μεταλλάξεις που επηρεάζουν αρκετά γονίδια, εντοπίζονται, όμως, με μεγαλύτερη συχνότητα, είτε στο κωδικόνιο 315 του *katG* γονιδίου (50-95%), είτε στην ρυθμιστική περιοχή του *inhA* γονιδίου (20-35%) [57]. Τελευταία, παρατηρήθηκε και περίπτωση διασταυρούμενης αντοχής (cross resistance) στο *Mtb*, δηλαδή αντοχής απέναντι σε μία τάξη αντιβιοτικών, που επηρεάζει και άλλες τάξεις, με κοινό στόχο δράσης. Είναι η περίπτωση ανάπτυξης μηχανισμού αντοχής στη βεδακιλίνη (νεότερο αντιφυματικό), μέσω μετάλλαξης που οδηγεί στην υπερέκφραση της αντλίας εξόδου MmpL5 και, που παράλληλα, οδηγεί σε διασταυρούμενη αντοχή στην κλοφαζιμίνη. Πρέπει να σημειωθεί ότι αρκετές μελέτες των μηχανισμών αντοχής του *Mtb*, χρησιμοποίησαν, ως μοντέλα-μικροοργανισμούς, άτυπα είδη των μυκοβακτηριδίων, αφενός για λόγους βιοασφάλειας, αφετέρου, λόγω του βραχύτερου χρόνου ανάπτυξής τους, με κυριότερο εκπρόσωπο το *M. smegmatis*, που φέρει γονιδίωμα περίπου 1,5 φορές μεγαλύτερο του γονιδιώματος του *Mtb* [54].

B2.1. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ (ΕΓΓΕΝΟΥΣ) ΑΝΤΟΧΗΣ *Mtb* ΣΤΑ ΑΝΤΙΦΥΜΑΤΙΚΑ

α) Κυτταρικό τοίχωμα του μυκοβακτηριδίου – πορίνες: το τοίχωμα του *Mtb* είναι παχύ, κηρώδες, πλούσιο σε λιπίδια και, επομένως, εξαιρετικά υδρόφοβο. Επιτρέπει την διόδο των λιπόφιλων ουσιών και περιέχει μικρό αριθμό πορινών (πρώτη γραμμή άμυνας). Οι πορίνες είναι πρωτεΐνες, σε σχήμα πόρου ή καναλιού, που περιέχουν νερό και επιτρέπουν την παθητική διάχυση, διαμέσου του τοιχώματος, των υδρόφιλων μορίων (π.χ. υδρόφιλες β-λακτάμες), με μοριακό βάρος μικρότερο από 600 daltons (μικρά μόρια). Υπάρχουν διαφορετικοί τύποι πορινών και συχνά συνυπάρχουν στο κυτταρικό τοίχωμα των βακτηριδίων. Είναι δομικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των μυκοβακτηριδίων και των Gram(-) βακτηριδίων, ενώ απουσιάζουν εντελώς από το τοίχωμα των Gram(+) βακτηρίων. Η συμπαγής δομή, που δημιουργείται, περιορίζει σημαντικά την ελαστικότητα της εξωτερικής μεμβράνης του μυκοβακτηριδίου, αλλά το

χαρακτηριστικό αυτό τροποποιείται, όταν οι συνθήκες το απαιτούν, κυρίως με αυξομείωση του αριθμού των πορινών. Ετερόλογη έκφραση της πορίνης MspA του *M. smegmatis* στο κυτταρικό τοίχωμα του *Mtb*, οδηγεί σε μείωση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) για αρκετά υδρόφιλα αντιβιοτικά (μακρολίδες, τετρακυκλίνες, κινολόνες), αποδεικνύοντας τον σημαντικό ρόλο των πορινών στη διακίνηση των υδρόφιλων μορίων [58]. Ομοίως, η πορίνη CphT του κυτταρικού τοιχώματος του *Mtb*, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διακίνηση θρεπτικών ουσιών, στη λαθροβίωση του μικροοργανισμού και στην ευαισθησία του στα υδρόφιλα αντιβιοτικά, γεγονός που επαληθεύεται από τις πολλές, διαφορετικές, μη συνώνυμες μεταλλάξεις στο γονίδιο *Rv3903c*, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη [59].

β) Ενζυματική αδρανοποίηση των αντιβιοτικών με

β1.αδρανοποιητικά ένζυμα του περιπλασματικού χώρου π.χ. υδρολάσες, όπως η πρωτεΐνη BlaC (β-λακταμάση): το γονιδίωμα του *Mtb* παράγει μία μόνο, ευρέος φάσματος, τάξης A, β-λακταμάση, την BlaC, που υδρολύει τον β-λακταμικό δακτύλιο των λακταμικών αντιβιοτικών, συμπεριλαμβάνοντας και τις καρβαπενέμες, και βρίσκεται, είτε ελεύθερη στον περιπλασματικό χώρο, είτε συνδεδεμένη, ως λιποπρωτεΐνη, στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής του μεμβράνης. Η ενδογενής αντοχή των μυκοβακτηριδίων στην πενικιλίνη και στα β-λακταμικά αντιβιοτικά είχε παρατηρηθεί από παλιά (Abraham et al.1941), όμως, τελευταία, παρατηρήθηκε ότι η δράση της BlaC αναστέλλεται από τους αναστολείς των β-λακταμασών, όπως το κλαβουλανικό οξύ (Wang, Cassidy & Sacchetini 2006) και, αν αυτό αποδειχθεί – υπάρχουν μελέτες με θετικά αποτελέσματα – μπορεί η χρήση τους να αποτελέσει εναλλακτική μορφή θεραπείας για την MDR/XDR TB [54], [60], [61], [62].

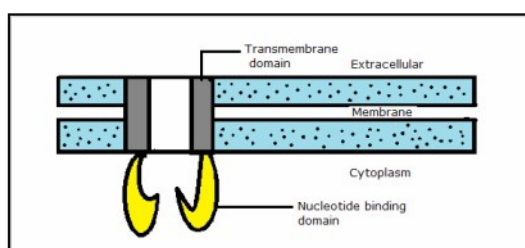
β2. με τρανσφεράσες, όπως η πρωτεΐνη Eis (enhanced intracellular survival protein) – πρόκειται για ενδοκυττάρια πρωτεΐνη, με ρόλο ακετυλοτρανσφεράσης, που ακετυλιώνει αμινικές ομάδες του αντιβιοτικού (NH₂) και αδρανοποιεί την καναμυκίνη A (αμινογλυκοσίδη) και την καπρεομυκίνη (κυκλικό πεπτίδιο) [54], [63], [64]. Μεταλλάξεις στον υποκινητή του γονιδίου της Eis οδηγούν σε υπερέκφραση της πρωτεΐνης, μηχανισμός που προσφέρει χαμηλού βαθμού αντοχή

στα προαναφερθέντα αντιβιοτικά (όχι στις λοιπές αμινογλυκοσίδες) και παράλληλα, φαίνεται να λειτουργεί ως ενδιάμεσο στάδιο για την ανάκτηση αντοχής υψηλού βαθμού στις αμινογλυκοσίδες και τα κυκλικά πεπτίδια [54], [63], [65]. Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ένας νέος μηχανισμός αντοχής στο *Mtb*, μέσω μίας μεθυλοτρανσφεράσης (γονίδιο *Rv0560c*), που μεθυλιώνει το παράγωγο 14 της πυριδο-βενζιμιδαζόλης (αντιμικροβιακός παράγοντας, που εμποδίζει τη σύνθεση της μυκολικής αραβινογαλακτάνης) και το αδρανοποιεί [54], [66].

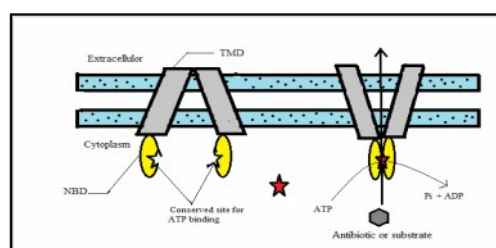
γ) Ενζυματική τροποποίηση του στόχου δράσης του αντιβιοτικού, όπως με την μεθυλοτρανσφεράση Erm37, που μεθυλιώνει την αδενοσίνη των θέσεων 2057-2059 του 23S τμήματος του ριβοσωμικού RNA του *Mtb* (23SrRNA), παρεμποδίζοντας έτσι την πρόσδεση του αντιβιοτικού στο ριβόσωμα και προσδίδοντας κατά αυτόν τον τρόπο αντοχή στα μακρολιδικά αντιβιοτικά [54], [67], [68]. Το 23SrRNA περιέχει 2904 ριβονουκλεοτίδια ως μονή άλυσο RNA και αποτελεί τμήμα της μεγάλης υπομονάδας (50S) του ριβοσώματος. Εμπεριέχει την περιοχή δράσης της πεπτιδοτρανσφεράσης (V περιοχή – V domain), που ενώνει τα πεπτίδια κατά την μετάφραση και αποτελεί την πιο κοινή περιοχή-στόχο δράσης των αντιβιοτικών, που αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση (π.χ. μακρολίδες, αμινογλυκοσίδες). Μία άλλη περίπτωση εγγενούς αντοχής στο *Mtb*, μέσω του προαναφερθέντος μηχανισμού είναι η περίπτωση της φωσφομυκίνης. Η φωσφομυκίνη, λόγω του μικρού της μεγέθους, διαπερνά το μυκοβακτηριδιακό τοίχωμα, μέσω των πορινών, ενώ διέρχεται της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, μέσω συστημάτων ενεργητικής μεταφοράς και αναστέλλει σε αρχικό στάδιο (κυτταροπλασματικό) τη βιοσύνθεση της πεπτιδογλυκάνης. Η αναστολή συμβαίνει, λόγω της αδρανοποίησης του ενζύμου της πυρουβυλ-τρανσφεράσης από το αντιβιοτικό, μέσω της αλκυλίωσης ενός αμινοξέος (κυστίνη) της πεπτιδικής αλυσίδας, αλλά και λόγω ομοιότητας του μορίου του φαρμάκου με το φυσιολογικό υπόστρωμα του ενζύμου, το γλυκεροφωσφορικό. Το *Mtb*, τοποθετώντας το ασπартικό οξύ στη θέση της κυστίνης, τροποποιεί το στόχο δράσης του φαρμάκου, δηλαδή το ένζυμο, αδρανοποιώντας ουσιαστικά το αντιβιοτικό [54].

δ) Συστήματα εξώθησης – αντλίες εξόδου (efflux pumps): το *Mtb* παρουσιάζει πληθώρα διαφορετικών συστημάτων εξώθησης, πρόκειται για μεμβρανικές

πρωτεΐνες, που ανήκουν κυρίως στις τάξεις της υπερικογένειας της ATP binding cassette–ABC superfamily αλλά και σε λοιπές οικογένειες όπως MFS-major facilitator superfamily, RND-resistance nodulation & cell division proteins και SMR-small drug resistance proteins [69], [70], [71], [72]. Τα συστήματα εξόδου (πίνακας 1) αποτελούν, επίσης, πλαστικό χαρακτηριστικό του *Mtb*, δηλαδή, παρουσιάζουν αυξομείωση στον αριθμό τους [73], [74], [75]. Μπορούν να αποβάλλουν διάφορα μόρια και το πλείστο των αντιφυματικών, περιλαμβάνοντας τη στρεπτομυκίνη, τη ριφαμπικίνη (RIF), την ισονιαζίδη (INH), την κλοφαζιμίνη, τη βεδακιλίνη, τις φθοριοκινολόνες (FQ) και την εθαμβουτόλη (EMB) ενώ, ταυτόχρονα, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενδοκυττάρια ανάπτυξη των μυκοβακτηριδίων στα μακροφάγα [76], [77]. Τα αντιφυματικά διεγείρουν την έκφραση των συστημάτων εξώθησης, χωρίς, όμως, να υπάρχει γενικό πλαίσιο και με σημαντικές διαφορές μεταξύ των στελεχών του μικροοργανισμού [73], [74].



Εικόνα Β5.α.



Εικόνα Β5.β.

Εικόνα Β5.α.: Δομή του ABC μεμβρανικού μεταφορέα & **Εικόνα Β5.β.:** Μηχανισμός δράσης του ABC μεμβρανικού μεταφορέα – σύνδεση του υποστρώματος με το διαμεμβρανικό τμήμα (TDM) του μεταφορέα προκαλεί δομικές αλλαγές στο νουκλεοτιδικό τμήμα (NBD), με επακόλουθη δέσμευση του ATP. Αυτό, με τη σειρά του, προκαλεί δομικές αλλαγές του TDM, υδρόλυση του ATP και εξωκύτωση του υποστρώματος (*Int.J.Curr. Microbiol.App.Sci* (2014) 3(8) 528-546)

Σημειώνουμε, εδώ, το παράδειγμα της βεδακιλίνης, όπου, πρόσφατα, ανακαλύφθηκε και δεύτερος μηχανισμός (ο άλλος μηχανισμός είναι με μεταλλάξεις στο γονίδιο της ATP-συνθετάσης), με τον οποίο το *Mtb* αποκτά αντοχή στο συγκεκριμένο φάρμακο. Ο μηχανισμός αυτός προκύπτει, μέσω μεταλλάξεων αυξορρύθμισης της έκφρασης αντλιών εξόδου (mutational upregulation of efflux pump–MmpL5), προσδίδοντας, παράλληλα, διασταυρούμενη αντοχή και στην κλοφαζιμίνη [78], [79]. Συγκεκριμένα,

μεταλλάξεις στον υποκινητή του γονιδίου *MmpR*, οδηγούν σε υπερέκφραση της πολύ-υποστρωματικής αντλίας εξόδου *MmpL5* [54], [80], [81], [82]. Επειδή, οι αντλίες εξόδου παίζουν σημαντικό ρόλο, τόσο στη λαθροβίωση των μυκοβακτηρίων στα μακροφάγα, όσο και στην αντοχή στα αντιφυματικά, εξετάζεται το ενδεχόμενο της χρήσης των αναστολέων των αντλιών εξόδου (efflux pump inhibitors–EPIs), ώστε να περιορίσουν τη λοίμωξη και να αυξήσουν την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Στον πίνακα Β1. περιγράφονται οι κυριότερες μεταλλάξεις των συστημάτων εξόδου του *Mtb*, οι οικογένειες των συστημάτων εξόδου, καθώς και οι τάξεις των αντιβιοτικών, στις οποίες προσδίδουν αντοχή.

Table.1 MTB efflux pumps associated with drug resistance

Family	Efflux Pump	Resistant to drug	References
ABC	Rv2686c-Rv2687c- Rv2688c	FQ	Pasca et al., 2004, Takiff et al., 1994
ABC	dirA and dirB	norfloxacin, streptomycin, chloramphenicol, tetracycline, erythromycin, ethambutol, norfloxacin, streptomycin, chloramphenicol and anthracyclines	Choudhuri et al., 2002
ABC	Rv1217c-Rv1218c	biaryl piperazines, bisaniolinopyrimidines novobiocins, pyrazolones, pyrroles and pyridines	Balganesh et al., 2010
ABC	Rv1456c-Rv1457c- Rv1458c	one of the first line drugs like isoniazid, rifampicin, streptomycin, ethambutol.	Hao et al., 2011
MFS	Rv1634	FQ	De Rossi et al. (2002)
MFS	Tap	aminoglycosides & tetracycline	Ainsa et al., (1998), De Rossi et al., (2002)
MFS	Rv2459 (JefA)	INH & ethambutol	Gupta et al., (2010) De Rossi et al., (2002)
MFS	Rv2333c (Stp)	spectinomycin & tetracycline	Ramon Garcia et al., 2007 De Rossi et al., 2002
MFS	Rv2846c (EfpA)	EtBr, acriflavine, ciprofloxacin & gentamicin	Li et al., 2004 De Rossi et al., 2002
RND	MmpL7	INH	Camacho et al., 2001 Domenech et al., 2005, Lamichhane et al. 2005 Pasca et al. 2005, Rodrigues et al. 2011; Sasseti and Rubin, 2003
RND	MmpL10	azole	Milano et al. 2009
SMR	Mmr (Rv3065)	TPP1, EtBr, erythromycin, acriflavine, safranin O and pyronin Y	De Rossi et al., 1998

ABC-ATP binding cassette; MFS- major facilitator superfamily; SMR- small multidrug resistance; RND-
 resistance-nodulation-cell division; INH- isoniazid; RIF- rifampicin; FQ- fluoroquinolone; TPP1-
 tetraphenyl phosphonium; EtBr- ethidium bromide.

B2.2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΚΤΗΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ *Mtb*

B2.2.1. Τροποποίηση του στόχου δράσης του αντιβιοτικού

Αποτελεί τον πιο κοινό μηχανισμό επίκτητης αντοχής στο *Mtb*, που προσφέρει αντοχή υψηλού βαθμού στα περισσότερα αντιφυματικά, όπως ισονιαζίδη (γονίδιο *inhA*), ριφαμπικίνη (γονίδιο *rpoB*), φθοριοκινολόνες (γονίδια *gyrA/B*), αμινογλυκοσίδες (γονίδιο *rrs*), κυκλικά πεπτίδια (δες πίνακα Β2.). Προκαλείται, είτε από μη συνώνυμες μεταλλάξεις των γονιδίων, που κωδικοποιούν τον στόχο

δράσης, είτε από αντικατάσταση νουκλεοτιδίων στο οπερόνιο, που κωδικοποιεί το ριβοσωμιακό RNA. Το οπερόνιο (operon) αποτελεί λειτουργική μονάδα DNA, που περιέχει σύνολο γονιδίων, υπό τον έλεγχο ενός μόνου υποκινητή, ώστε τα γονίδια να μεταγράφονται και να μεταφράζονται μαζί, συνεπώς να εκφράζονται όλα ή καθόλου. Για παράδειγμα, το *Mtb* αποκτά αντοχή στη RIF, μεταλλάσσοντας την β-αλυσίδα της DNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης, (περιοχή 81 bp του γονιδίου *rpoB*), μειώνοντας έτσι τη χημική συγγένεια του αντιβιοτικού με το στόχο δράσης του και παρεμποδίζοντας την ένωσή του με αυτό (Campbell et al.2001). Το 95% των ανθεκτικών στη RIF στελεχών φέρουν μεταλλάξεις σε αυτή την περιοχή του γονιδίου, ενώ μόνο το 25–30% των ανθεκτικών στη INH στελεχών φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *inhA* (αλλαγή στόχου δράσης). Τέτοιες μεταλλακτικές τροποποιήσεις, μπορεί να προσφέρουν αντοχή στα βακτήρια, έχουν όμως και κόστος (fitness cost), αφού, συνήθως, μειώνουν τη λειτουργικότητα και την επιβίωση του βακτηρίου, όταν αυτό δεν εκτίθεται στο αντιβιοτικό, σε σχέση με τα μη μεταλλαγμένα στελέχη (wild type) [54].

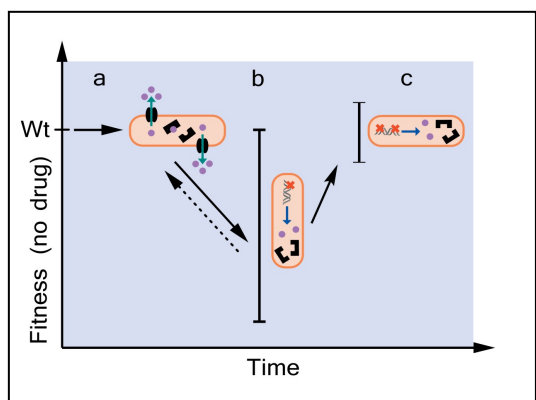
B2.2.2. Αναστολή της ενζυματικής ενεργοποίησης του προφαρμάκου

Είναι η περίπτωση της INH (γονίδιο *KatG*), της PZA (γονίδιο *pncA*), της εθειοναμίδης, του PAS και των δύο νεότερων αντιφυματικών, της δελαμανίδης και της πρετομανίδης (νιτροϊμιδαζόλης). Το 50–90% των ανθεκτικών στην INH στελεχών φέρουν μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 315 του γονιδίου *KatG*. Τα ένζυμα, που μετέχουν στον μεταβολισμό των φαρμάκων, συχνά, δεν είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη και επιβίωση του μικροοργανισμού, έτσι ώστε να διευρύνεται, τόσο το είδος, όσο και η έκταση των γενετικών αλλαγών του γονιδιώματος του *Mtb*, με τις οποίες αντιστέκεται (large mutational target size). Αυτές περιλαμβάνουν σημειακές μεταλλάξεις, μεταθέσεις ή ελλείμματα, εισαγωγή κινητών γενετικών στοιχείων και μεταλλάξεις στον υποκινητή των γονιδίων σύνθεσης των ενζύμων, που οδηγούν σε μικρότερη παραγωγή τους και, συνεπώς, αντοχή στο φάρμακο (αυξάνουν την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του φαρμάκου – MIC). Για παράδειγμα, τα PZA ανθεκτικά στελέχη του *Mtb*, προκαλούν διάφορες μεταλλάξεις στο γονίδιο *pncA* (large target size), υπεύθυνο για την σύνθεση του ενζύμου, που μεταβολίζει την πυραζιναμίδα σε πυραζινοϊκό οξύ (ενεργή μορφή), επειδή το συγκεκριμένο ένζυμο δεν επηρεάζει

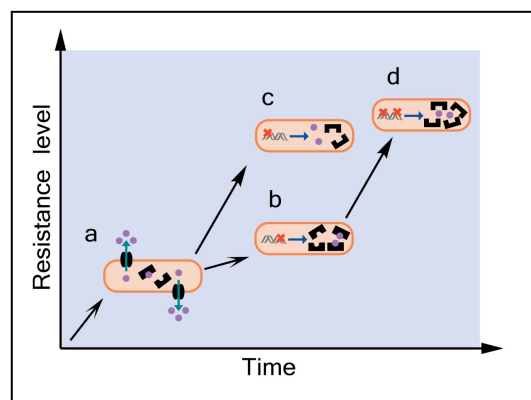
την ανάπτυξη του μυκοβακτηριδίου. Ομοίως, στην περίπτωση της δελαμανίδης και της πρετομανίδης, το εύρος των πιθανών στόχων για μεταλλάξεις είναι εκτεταμένο (large mutational target size) [54].

B2.2.3. Υπερέκφραση του στόχου δράσης του αντιβιοτικού

Προκαλείται, είτε μέσω μεταλλάξεων στους μεταγραφικούς αναστολείς, είτε μέσω μεταλλάξεων στους υποκινητές, των γονιδίων στόχων των αντιβιοτικών και αναστέλλει τη δράση του αντιβιοτικού, λόγω υπερπληθώρας του στόχου δράσης του. Αυτός ο μηχανισμός προσφέρει χαμηλού βαθμού αντοχή σε αντιφυματικά π.χ. ισονιαζίδη (μεταλλάξεις στον υποκινητή του γονιδίου *inhA*), κυκλοσερίνη (οξαζολιδινόνη) και εξουδετερώνεται εύκολα με αύξηση της δοσολογίας του φαρμάκου. Αποτελεί ενδιάμεσο βήμα για ανάπτυξη υψηλού βαθμού αντοχής, που επιτυγχάνεται μέσω των άλλων δύο μηχανισμών [54].



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1: ΚΟΣΤΟΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ / ΧΡΟΝΟΣ



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2: ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΝΤΟΧΗΣ / ΧΡΟΝΟΣ

Εικόνα Β6.α: Διάγραμμα 1 - επίπεδα επιβίωσης (απουσία αντιβιοτικού) των μεταλλαγμένων στελεχών, όπου (a) καλή επιβίωση με μηχανισμό αντλίας εξόδου, (b) μείωση της επιβίωσης σε μετάλλαξη τροποποίησης στόχου δράσης, (c) επαναφορά της ανάπτυξης, παρουσία δευτερεύουσας (compensatory) μετάλλαξης (x=μετάλλαξη) & **Εικόνα Β6.β:** Διάγραμμα 2 - επίπεδα αντοχής των διαφορετικών μηχανισμών, όπου (a) χαμηλού βαθμού αντοχή της αντλίας εξόδου, (b) ενδιάμεσου βαθμού αντοχή της μεταλλακτικής υπερέκφρασης στόχου δράσης, (c) υψηλού βαθμού αντοχή της μεταλλακτικής τροποποίησης στόχου δράσης, (d) υψηλότετη βαθμού αντοχή της συνύπαρξης δύο μεταλλακτικών μηχανισμών, τροποποίησης και υπερέκφρασης του στόχου δράσης. (Gygli et al.FEMS M.R.,2017,41/3:354-373)

Οι κυριότερες μεταλλακτικές τροποποιήσεις του *Mtb*, μέσω των μηχανισμών ενδογενούς και επίκτητης αντοχής, όπως περιγράφηκαν παραπάνω, σημειώνονται στον πίνακα Β2., που ακολουθεί.

ΠΙΝΑΚΑΣ Β2. *Mtb* ΜΕΤΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΑΝΤΟΧΗΣ_(*Gygli et al.FEMS M.R.,2017,41/3:354-373*)

Antibiotic	Target gene	Resistance mechanism	Reference
Rifampicin	<i>rpoB</i>	Drug target alteration	Telenti et al. (1993)
Isoniazid	<i>katG</i>	Abrogated prodrug activation	Heym et al. (1995)
	<i>inhA</i>	Drug target alteration	Banerjee et al. (1994); Morlock et al. (2003); Hazbón et al. (2006)
	<i>inhA</i> promotor	Drug target overexpression	Morlock et al. (2003); Hazbón et al. (2006)
Ethambutol	<i>embB</i>	Drug target alteration	Sreevatsan et al. (1997)
Pyrazinamide	<i>pncA</i>	Abrogated prodrug activation	Konno, Feldmann and McDermott (1967); Scorpio and Zhang (1996)
Ethionamide	<i>inhA</i>	Drug target alteration	Banerjee et al. (1994); Morlock et al. (2003); Hazbón et al. (2006)
	<i>inhA</i> promotor	Drug target overexpression	Morlock et al. (2003); Hazbón et al. (2006)
	<i>ethA</i>	Abrogated prodrug activation	Morlock et al. (2003)
Fluoroquinolones	<i>gyrA/B</i>	Drug target alteration	Takiff et al. (1994); Xu et al. (1996); Malik et al. (2012)
Streptomycin	<i>rrs</i>	Drug target alteration	Meier et al. (1994); Maus, Plikaytis and Shinnick (2005a)
	<i>rpsL</i>	Drug target alteration	Nair et al. (1993); Meier et al. (1994)
Amikacin	<i>rrs</i>	Drug target alteration	Alangaden et al. (1998); Maus, Plikaytis and Shinnick (2005a)
Kanamycin A	<i>rrs</i>	Drug target alteration	Alangaden et al. (1998)
	<i>eis</i> promotor	Overexpression of drug inactivating enzyme	Kambli et al. (2016)
Capreomycin	<i>rrs</i>	Drug target alteration	Maus, Plikaytis and Shinnick (2005a)
	<i>tlyA</i>	Abrogation of drug target methylation	Maus, Plikaytis and Shinnick (2005b); Monshupanee et al. (2012)
P-aminosalicylic acid	<i>thyA</i>	Drug target bypassing	Zhao et al. (2014); Minato et al. (2015)
	<i>folC</i>	Abrogation of prodrug activation	Zhao et al. (2014); Minato et al. (2015)
Cycloserine	<i>ald</i>	Overabundance of drug target substrate	Desjardins et al. (2016)
	<i>alr</i>	Drug target alteration	Desjardins et al. (2016)
	<i>alr</i> promotor	Drug target overexpression	Desjardins et al. (2016)
Bedaquiline	<i>atpE</i>	Drug target alteration	Huitric et al. (2010)
	Promotor/ <i>mmpR</i>	Overexpression of efflux pump MmpL5	Hartkoorn, Uplekar and Cole (2014); Bloemberg et al. (2015)
Linezolid	<i>rplC</i>	Drug target alteration	Beckert et al. (2012)
	<i>rrl</i>	Drug target alteration	Hillemann, Rusch-Gerdes and Richter (2008)
Delamanid/pretomanid	<i>ddn</i>	Abrogation of prodrug activation	Manjunatha et al. (2006); Bloemberg et al. (2015); Haver et al. (2015)
	<i>fgd1</i>	Abrogation of prodrug activation	
	<i>fbiA/B/C</i>	Abrogation of prodrug activation	
Clofazimine	Promotor/ <i>mmpR</i>	Overexpression of efflux pump MmpL5	Hartkoorn, Uplekar and Cole (2014); Bloemberg et al. (2015)

B3. ΑΝΘΕΚΤΙΚΗ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗ (MDR/XDR-TB)

Η χορήγηση της κατάλληλης αντιφυματικής θεραπείας αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο στον επιδημιολογικό έλεγχο εξάπλωσης της νόσου στο γενικό πληθυσμό και αποτρέπει τη δημιουργία ανθεκτικών στελεχών. Η εμφάνιση των ανθεκτικών μορφών της νόσου, μετά το 1990, οφείλεται πρωτίστως σε αποτυχία της φαρμακευτικής αγωγής (ανεπαρκή σχήματα σε διάρκεια και δοσολογία, ελλιπής έλεγχος αντοχής και μη συμμόρφωση του ασθενούς) και δευτερευόντως σε οικονομικά και πολιτικά αίτια όπως η μετανάστευση πληθυσμών, ιδίως από χώρες ενδημικές για τη νόσο (Ασία, Αφρική), το χαμηλό βιοτικό επίπεδο, η

αποδιοργάνωση των υπηρεσιών υγείας κ.α. Η συνύπαρξη και άλλων νοσημάτων μπορεί, επίσης, να συμβάλλει στην αποτυχία της χημειοθεραπείας. Κάθε πληθυσμός μυκοβακτηριδίων, περιλαμβάνει εξ'αρχής μικρό αριθμό ανθεκτικών στελεχών, δηλαδή στελεχών με εγγενή αντοχή, χωρίς προηγούμενη έκθεση σε αντιβιοτικά, που υπολογίζεται για την INH σε 1 ανθεκτικό βάκιλλο/10⁵ πληθυσμό βακίλων, για τη RIF σε 1/10⁷, για τη SM σε 1/10⁶ και για την EMB σε 1/10⁵ (πρωτοπαθής ανθεκτικότητα) [83]. Η πιθανότητα ανάπτυξης αντοχής σε δύο αντιφυματικά από τυχαίες μεταλλάξεις ενός πληθυσμού βακίλων υπολογίζεται από ως γινόμενο των παραπάνω αναλογιών π.χ. για την INH και τη RIF ισοδυναμεί με 1/10⁵ x 1/10⁷ = 1/10¹². Η πρωτοπαθής ανθεκτικότητα σε ένα μόνο αντιφυματικό σπάνια αποτελεί αιτία αποτυχίας της αντιφυματικής θεραπείας, εφόσον χορηγούνται τρία φάρμακα [84]. Στη συνέχεια παρατίθενται οι ορισμοί της πρωτοπαθούς και δευτεροπαθούς αντοχής καθώς και των περιπτώσεων πολυανθεκτικότητας (MDR/XDR-TB).

Ορολογία των περιπτώσεων αντοχής και των ανθεκτικών μορφών της TB νόσου:

1. Πρωτοπαθής ανθεκτικότητα (primary resistance): αντοχή σε αντιφυματικά σε ασθενείς που δεν έχουν λάβει αντιφυματική αγωγή.

2. Δευτεροπαθής ή επίκτητη ανθεκτικότητα (acquired resistance): αντοχή σε αντιφυματικά σε ασθενείς που έχουν λάβει στο παρελθόν αντιφυματική αγωγή.

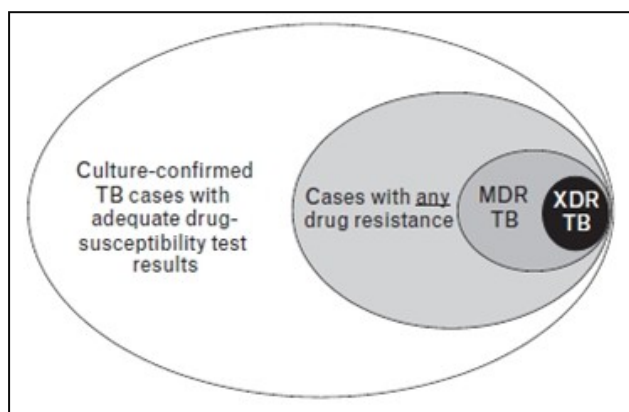
3. Μονοανθεκτικότητα (monoresistance): αντοχή μόνο σε ένα από τα πέντε πρωτεύοντα αντιφυματικά (INH, RIF, PZA, EMB, SM)

4. Σύνθετη αντοχή (co-resistance): αντοχή που εμφανίζεται σε δύο ή περισσότερες τάξεις αντιβιοτικών.

Περιπτώσεις σύνθετης αντοχής:

4α. Πολυανθεκτικότητα (Multidrug resistance – MDR-TB): παράλληλη αντοχή σε INH και RIF ή και σε άλλης κατηγορίας αντιφυματικό φάρμακο π.χ. κινολόνες. Η MDR-TB διαχωρίζεται σε περίπτωση χωρίς προηγηθείσα αντιφυματική αγωγή και σε περίπτωση με προηγηθείσα αντιφυματική αγωγή (MDR-TB = resistance to INH and RIF, +/- resistance to fluoroquinolones).

4β. Υπερανθεκτικότητα ή εκτεταμένη αντοχή (Extensively drug resistance – XDR-TB): παράλληλη αντοχή σε INH, RIF, κινολόνες και σε ένα από τα τρία ενέσιμα (αμικασίνη, καναμυκίνη, καπρεομυκίνη) αντιβιοτικά (XDR-TB = resistance to INH, RIF, fluoroquinolones + second line injectable antibiotics).



Εικόνα B7.: Σχηματική περιγραφή της MDR/XDR-TB σε σχέση με την DS-TB

Οι βασικές αρχές για τη θεραπεία της πολυανθεκτικής φυματίωσης (MDR-TB) περιλαμβάνουν τα παρακάτω [84]: 1. Δεν χρησιμοποιούνται αντιφυματικά με γνωστή την εμφάνιση αντοχής, 2. Όσα αντιφυματικά έχουν ήδη χορηγηθεί ως θεραπεία θεωρούνται αμφίβολης αποτελεσματικότητας μέχρι τα αναμενόμενα αποτελέσματα των μεθόδων ευαισθησίας, 3. Ακρογωνιαίος λίθος της θεραπείας είναι τα ενέσιμα αντιβιοτικά καπρεομυκίνη και αμικασίνη (αμινογλυκοσίδες), που χορηγούνται σε δόση 15mg/kg/ημέρα (max 1g), για ασθενείς <60 ετών και σε δόση 10mg/kg/ημέρα (max 0,75g), για ασθενείς >60 ετών, με διάρκεια θεραπείας τουλάχιστον 8 μήνες (και οπωσδήποτε 4 μήνες μετά την αρνητικοποίηση των πτυέλων), 4. Απαραίτητα περιλαμβάνεται στο θεραπευτικό σχήμα αναπνευστική κινολόνη (εφόσον δεν έχει ήδη χορηγηθεί) με προτίμηση στη μοξιφλοξασίνη (400mg/ημερησίως) και τη λεβοφλοξασίνη (1000mg/ημερησίως), 5. Από τα 2^{ης} γραμμής αντιφυματικά προτιμάται η Εθειοναμίδη (Eto), σε δόση 15–20mg/kg/ημέρα (max 1g), η Κυκλοσερίνη (Cs), 10–15mg/kg/ημ. και το Παρα-αμινοσαλικυλικό οξύ (PAS) 8–12gr/ημ.. Εναλλακτικά μπορεί να χορηγηθούν Κλοφαζιμίνη (Cfz) 100–200mg/ημ., Λινεζολίδη (Lzd) 600mg/ημ., Ριφαμπουτίνη (Rfb) 5mg/kg/ημ. (max 300mg), Αμοξικιλίνη / κλαβουλανικό οξύ (Amx/Clv) 875/125mg X 2/ημ. και από τα νεότερα αντιφυματικά βεδακιλίνη και δελαμανίδη.

(βλέπε B5.1.1. & B5.2.1.) Μετά τα αποτελέσματα των ελέγχων ευαισθησίας προστίθεται κάθε φάρμακο με επιβεβαιωμένη ευαισθησία και αφαιρείται τυχόν με επιβεβαιωμένη αντοχή. Στόχος της θεραπευτικής αγωγής για MDR-TB είναι η δημιουργία ενός τετραπλού σχήματος, που να περιλαμβάνει αντιφυματικά με βακτηριοκτόνο δράση, μεταξύ των οποίων μία ενέσιμη αμινογλυκοσίδη και μία αναπνευστική κινολόνη, για διάστημα 9 μηνών (9–24 μήνες). Σημειώνουμε ότι το 50% των περιπτώσεων MDR-TB εμφανίζει αντοχή σε αντιφυματικά 2ης γραμμής [WHO 2017]. Σε περίπτωση υπερανθεκτικής Φυματίωσης (XDR-TB) οι παραπάνω βασικές αρχές θεραπείας διαφοροποιούνται ως εξής [84]: 1. Χρησιμοποιείται οποιοδήποτε αντιφυματικό από τα πρωτεύοντα (INH, RIF, PZA, EMB & Rfb), στο οποίο το *Mtb* παραμένει ευαίσθητο, 2. Προστίθενται πάντα ενέσιμη αμινογλυκοσίδη (καπρεομυκίνη ή αμικασίνη) και αναπνευστική κινολόνη (γίνεται απαραίτητα έλεγχος ευαισθησίας), 3. Προστίθενται επιπλέον δευτερεύοντα αντιφυματικά όπως Εθειοναμίδη (Eto), η Κυκλοσερίνη (Cs), και το Παρα-αμινοσαλικυλικό οξύ (PAS) και 4. Εάν δεν έχει συμπληρωθεί θεραπευτικό σχήμα 4–6 φαρμάκων προστίθενται τα λοιπά αντιφυματικά (Cfz, Lzd, Amx/Clv, Βεδακιλίνη, Δελαμανίδη). Στις γυναίκες με MDR-TB συστήνεται η αποφυγή εγκυμοσύνης, λόγω πιθανής μετάδοσης της λοίμωξης στο έμβρυο, ενώ στις εγκυμονούσες συνιστάται η έναρξη της θεραπείας να γίνεται το δεύτερο τρίμηνο και αντενδεικνύεται η χορήγηση αμινογλυκοσίδης, λόγω κινδύνου τερατογένεσης. Σε ηλικιωμένους ασθενείς (>65 ετών), ασθενείς με ηπατικές νόσους και σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια τα παραπάνω θεραπευτικά σχήματα τροποποιούνται με ανάλογη μείωση της δοσολογίας και της διάρκειας θεραπείας [84].

B3.1. HIV & MDR-TB

Υπολογίζεται ότι από τα 2/3 του πληθυσμού, παγκοσμίως, που έχουν προσβληθεί με TB νόσο, τα 11.000.000 είναι HIV(+) ασθενείς. Η ανοσοκαταστολή που προκαλεί η HIV λοίμωξη (ποσοτικές και λειτουργικές διαταραχές των CD4 T-λεμφοκυττάρων) δυσκολεύει τη διάγνωση της ενεργού TB, αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης λανθάνουσας TB και επιταχύνει τη φυσική εξέλιξη της νόσου. Πρόσφατες μελέτες ανακάλυψαν ότι το *Mtb*, διεγείροντας την παραγωγή των TNF- α , IL-6, δημιουργεί ένα μικροπεριβάλλον που διευκολύνει τον

πολλαπλασιασμό του ιού [84], [85]. Σε ασθενείς HIV(+) με TB λοίμωξη (πνευμονική & εξωπνευμονική) χορηγείται ως αντιφυματική θεραπεία το τετραπλό σχήμα HRZE, ταυτόχρονα με την αντιρετροϊκή αγωγή και με την προϋπόθεση το απομονωθέν στέλεχος να είναι ευαίσθητο στα χορηγούμενα αντιφυματικά. Η διάρκεια της θεραπείας ορίζεται στους εννέα μήνες ή πρέπει να συνεχίζεται έξι μήνες μετά την αρνητικοποίηση των καλλιιεργειών. Ο συνδυασμός αντιφυματικής και αντιρετροϊκής αγωγής βελτιώνει σημαντικά την πρόγνωση αλλά απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή, λόγω αλληλεπίδρασης των αντιρετροϊκών με τις ριφαμυκίνες (RIF & Rfb). Το παραπάνω θεραπευτικό σχήμα σε ασθενείς HIV(+) με MDR-TB τροποποιείται ως εξής: 1. Προστίθενται μία αμινογλυκοσίδη (αμικασίνη ή καπρεομυκίνη) και μία αναπνευστική κινολόνη (μοξιφλοξασίνη ή λεβοφλοξασίνη) με διάρκεια θεραπείας του δεκαοκτώ μήνες και 2. Προστίθενται κορτικοστεροειδή σε συμμετοχή του ΚΝΣ ή του περικαρδίου [85].

B4. ΔΙΑΓΝΩΣΗ TB – ΝΕΟΤΕΡΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

Η ανάγκη για ταχύτερη και αξιόπιστη ανίχνευση και ταυτοποίηση της TB λοίμωξης οδήγησε στην ανάπτυξη των νεότερων διαγνωστικών μεθόδων. Οι διάφορες μέθοδοι προσδιορισμού συγκέντρωσης του ενζύμου ADA (βιοδείκτης) χρησιμοποιούνται από την δεκαετία του ογδόντα (1978), ενώ οι μοριακές μέθοδοι (NAATs) άρχισαν να εφαρμόζονται από την δεκαετία του ενενήντα (1987).

B4.1. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΗΣ ΑΠΑΜΙΝΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΔΕΝΟΣΙΝΗΣ (Adenosine deaminase – ADA)

Γενικά, η απαμινάση της αδενοσίνης είναι ένζυμο που συμμετέχει στον καταβολισμό των πουρινών και υδρολύει την αδενοσίνη σε ινοσίνη και αμμωνία. Το ένζυμο βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα και η δραστηριότητα του είναι αυξημένη στα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα. Η συγκέντρωση του αυξάνεται σημαντικά σε ενεργοποίηση της κυτταρικής ανοσίας από τα μυκοβακτηριδιακά αντιγόνα και συμβάλλει περαιτέρω στη διαφοροποίηση των κυτταρικών πληθυσμών. Διακρίνεται σε δύο ισοένζυμα, ADA-1 και ADA-2 με διαφορετικό MB, διαφορετικό pH δράσης, διαφορετική κινητική, αλλά παρόμοια συγγένεια με το υπόστρωμα [86]. Το ADA-2 αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο ποσοστό (75%) της συνολικής δράσης του ADA στον ορό των υγείων, παρουσιάζει μεγαλύτερη

συγγένεια με το υπόστρωμα της αδενοσίνης και βρίσκεται ειδικά μόνο στα μακροφάγα και μονοκύτταρα, όπου υπερεκφράζεται μετά την προσβολή τους από κάποιο μικροοργανισμό (βακτήριο, ιό ή πρωτόζωο). Η Km του ADA-2 είναι 200×10^{-5} M και το pH δράσης 6,5. Το ADA-1 αντιπροσωπεύει το μικρότερο ποσοστό (15%) της συνολικής δράσης του ADA, παρουσιάζει παρόμοια συγγένεια με το υπόστρωμα της αδενοσίνης όσο και με το υπόστρωμα της 2-δεοξαδενοσίνης, βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα και αυξάνει σε φλεγμονές και παραπνευμονικές συλλογές. Η Km είναι $5,2 \times 10^{-5}$ M και το pH δράσης 7–7,5 [86]. Η μέτρηση της συγκέντρωσης της ADA δεν αποτελεί ειδική εξέταση διάγνωσης TB, καθώς αυξημένη συγκέντρωση του ενζύμου παρατηρείται, επίσης, σε φλεγμονές και λοιμώξεις (ενδοκαρδίτιδα, λοίμωξη από HIV, λοίμωξη από βρουκέλλα, μικροβιακή πνευμονία), παραπνευμονικές συλλογές, εμπυήματα, ηπατοπάθειες και αυτοάνοσα νοσήματα αλλά επικουρικό διαγνωστικό εργαλείο, που αυξάνει την ευαισθησία της εργαστηριακής διάγνωσης, ιδίως στις εξωπνευμονικές μορφές της, που η ευαισθησία των συμβατικών μεθόδων είναι πολύ χαμηλή π.χ. στην πλευριτική φυματίωση η ευαισθησία για τη χρώση Z-N κυμαίνεται από 0–1% και αντίστοιχα για την καλλιέργεια από 11%–50% [87], [88]. Η ενεργότητα της απαμινάσης της αδενοσίνης μπορεί να προσδιοριστεί τόσο σε βιολογικά υγρά ασθενών με TB (πλευριτικό υγρό, ορός, ENY κ.α.), όσο και σε αναπνευστικά δείγματα (πτύελα, BAL).

Η πιο γνωστή μέθοδος προσδιορισμού ολικής συγκέντρωσης της ADA είναι η χρωματογραφική μέθοδος Giusti & Galanti, εφαρμόζεται από το 1978 στα εξής κλινικά δείγματα: πλευριτικό υγρό, ασκτικό υγρό, ENY, ορός αίματος, BAL, πτύελα και αποτελεί οικονομικό, γρήγορο και αξιόπιστο διαγνωστικό εργαλείο, με σημαντικό διαγνωστικό όφελος ακόμα και όταν οι λοιπές εξετάσεις είναι αρνητικές. Προσδιορίζει ποσοτικά τη συγκέντρωση της NH_3 , που παράγεται από την υδρόλυση της αδενοσίνης, μέσω της ADA, σε ινοσίνη και NH_3 (αντίδραση Berthlot – δείκτης ινδοφαινόλη), με βάση την εξίσωση: 1 Unit ADA ισούται με την ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την παραγωγή 1 mmol NH_3 (σε 1 min.) από την αδενοσίνη σε καθορισμένες συνθήκες [89]. Το αποτέλεσμα υπολογίζεται από τον τύπο: $\frac{E \text{ δείγματος} - E \text{ τυφλού δείγματος}}{E \text{ standard} - E \text{ αντιδραστηρίου}} \times 50$ (U/L) και είναι θετικό όταν $\text{ADA} > 40$ U/L. Η μέθοδος

παρουσιάζει συνολικά ευαισθησία 90-100% και ειδικότητα 89–100% (ποσοστά παρόμοια με τις μεθόδους IGRAs, αλλά με λιγότερο κόστος), ενώ για τα επιμέρους κλινικά δείγματα, η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου διαμορφώνονται:

B4.1.1. στο πλευριτικό υγρό (φυματιώδης πλευρίτιδα)

Θετική ADA, υψηλή LDH και λεμφοκυτταρικός τύπος κυττάρων του πλευριτικού υγρού διασφαλίζουν ευαισθησία και ειδικότητα σχεδόν 100% για τη διάγνωση πλευριτικής TB. Εναλλακτικά ο συνδυασμός ADA και LDH έχει ευαισθησία 91,4% και ειδικότητα 100% [90]. Η ευαισθησία της ADA στο πλευριτικό υγρό μειώνεται σε ανοκατασταλαμένους και σε ασθενείς με αντοχή σε αντιφυματικά φάρμακα [91], [92].

B4.1.2. στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (φυματιώδης μηνιγγίτιδα)

Σύμφωνα με την μελέτη των Kashyap και συν.(2003-2004), σε ασθενείς με φυματιώδη μηνιγγίτιδα (θετικές χρώσεις και θετικές καλλιέργειες), η ευαισθησία (Se) της μεθόδου ήταν 82% και η ειδικότητα (Sp) 83%, με τα δείγματα να θεωρούνται θετικά όταν ADA>11,39 U/L/min [93].

B4.1.3. στο ασκитικό υγρό (φυματιώδης περιτονίτιδα)

Ο υπολογισμός της ADA προσφέρει ταχεία διάγνωση με ευαισθησία 100% και ειδικότητα 92–100%. Παρατηρήθηκαν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα σε κίρρωτικούς ασθενείς, με χαμηλή συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών ασκιτικού υγρού [94].

B4.1.4. στον ορό αίματος

Σε μελέτη των Lamsal & συν.(2007) παρατηρήθηκε αυξημένη δράση της ADA σε ασθενείς με φυματιώδη πλευριτική συλλογή, συγκριτικά με ασθενείς με άλλης φύσεως πλευριτική συλλογή (κακοήθειες), καθώς και με υγιείς. Η ουδός για την ADA στον ορό ήταν 25 U/L/min, η Se της μεθόδου 72,41% και η Sp 81,53% [89].
ε) στα αναπνευστικά δείγματα: μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Ιράν (2008), σε τρεις ομάδες ασθενών (ασθενείς με TB, ασθενείς από άλλη αιτία, υγιείς), έδειξε Se της χρωματογραφικής μεθόδου σε δείγματα BAL 57% και Sp 84% [95]. Σε

μελέτες υπολογισμού της ADA σε πτύελα ασθενών με πνευμονική TB, η Se της μεθόδου κυμαίνεται από 32–44%, ενώ η Sp από 86,4–96.6% [96].

B4.2. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ γ -ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΗΣ (Interferon gamma Release Assays – IGRAs)

Μέχρι πρόσφατα, η διάγνωση της λανθάνουσας φυματίωσης βασίζονταν αποκλειστικά στην εξέταση δερματικής ευαισθησίας σε αντιγόνα του *Mtb* (Tuberculin Skin Test, TST), η οποία, όμως συχνά είναι ψευδώς θετική, είτε λόγω προηγηθέντος BCG-εμβολιασμού, είτε λόγω έκθεσης σε άτυπα μυκοβακτηρίδια (NTM) [97]. Η ερευνητική προσπάθεια στις αρχές της δεκαετίας του 1990 για την ανάπτυξη μιας μεθοδολογίας ανίχνευσης της παραγωγής γ -ιντερφερόνης (Interferon gamma Releasing Assays, IGRAs) από τα ευαισθητοποιημένα σε αντιγόνα του *Mtb*, T-λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος, η οποία να αποτελεί την *in vitro* εκδοχή της TST, χωρίς να παρουσιάζει τα μειονεκτήματά της, οδήγησε στην ανάπτυξη δύο συστημάτων: της μεθόδου QuantiFERON-TB Gold In Tube test (Cellestis Ltd, Carnegie, Victoria, Australia) και της μεθόδου T-SPOT-TB test (Oxford Immunotec, Oxford, UK) [97], [98] [99]. Οι δύο μέθοδοι βασίζονται στην αρχή ότι τα ευαισθητοποιημένα T-λεμφοκύτταρα παράγουν γ -ιντερφερόνη, όταν έρθουν σε επαφή με μυκοβακτηριδιακά αντιγόνα και χρησιμοποιούν για να διεγείρουν την παραγωγή της, τις πρωτεΐνες Early Secretory Antigenic Target-6 (ESTAT-6), Culture Filtrate Protein-10 (CFP-10) και TB7.7(p4), που κωδικοποιούνται από γονίδια εντός της περιοχής RD1 (region of difference 1) του *Mtb* γονιδιώματος [97]. Τα παραπάνω γονίδια δεν υπάρχουν σε στελέχη του εμβολίου BCG ή στα περισσότερα NTM (πλην των *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. szulgai*) και, επομένως, η ειδικότητα των μεθόδων παραγωγής γ -ιντερφερόνης είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την TST [100]. Η μέτρηση της παραγόμενης γ -ιντερφερόνης γίνεται α) άμεσα, δηλαδή με ποσοτική ανίχνευση της κυτοκίνης με τη μεθοδολογία Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent Assay (ELISA) για το QuantiFERON-TB test και β) έμμεσα, με υπολογισμό των T-λεμφοκυττάρων που παράγουν γ -ιντερφερόνη με τη μεθοδολογία Enzyme-Linked-Immuno-Spot Assay (ELISPOT) για το T-SPOT-TB test [97], [100].

B4.2.1. QuantiFERON-TB Gold In Tube test (Cellestis Ltd, Carnegie, Victoria, Australia)

Η μέθοδος χρησιμοποιεί ως κλινικό δείγμα ολικό αίμα και μεθοδολογία ELISA για την μέτρηση της παραγόμενης γ-ιντερφερόνης. Η συλλογή του αίματος γίνεται σε 3 ειδικά σωληνάρια – μάρτυρες, α) φιαλίδιο αντιγόνων φυματίωσης που περιέχει τα μυκοβακτηριδιακά αντιγόνα ESAT-6, CFP-10 και TB7.7(p4), β) φιαλίδιο μιτογόνου ουσίας – θετικός μάρτυρας και γ) φιαλίδιο χωρίς *Mtb* αντιγόνα – αρνητικός μάρτυρας. Ακολουθεί ανάδευση, επώαση (37° C, 16–24h), φυγοκέντρηση του δείγματος (2000–3000 RCF, 15min) και διαχωρισμός του υπερκείμενου πλάσματος για μέτρηση της γ-ιντερφερόνης (το ποσό εκφράζεται σε διεθνείς μονάδες, IU/ml). Θετική θεωρείται η εξέταση όταν η παραγωγή της γ-ιντερφερόνης στο φιαλίδιο αντιγόνων φυματίωσης υπερβαίνει κατά πολύ τη μηδενική τιμή της κυτοκίνης στο φιαλίδιο άνευ αντιγόνων (αρνητικός μάρτυρας). Το φιαλίδιο μιτογόνου ουσίας (θετικός μάρτυρας) χρησιμεύει για έλεγχο της απόκρισης στα μιτογόνα (χαμηλή απόκριση, όπως σε ανεπάρκεια λεμφοκυττάρων, ισοδυναμεί με απροσδιόριστο αποτέλεσμα) [97].

B4.2.2. T-SPOT-TB test (Oxford Immunotech, Oxford, UK)

Η μέθοδος χρησιμοποιεί ως κλινικό δείγμα λευκά αιμοσφαίρια του περιφερικού αίματος και μεθοδολογία ELISPOT για τον υπολογισμό του αριθμού των T-λεμφοκυττάρων που παρήγαγαν γ-ιντερφερόνη [97]. Πρόκειται για ποιοτική μέθοδο κυτταροκαλλιέργειας, όπου τα απομονωμένα λευκά υπόκεινται σε έκθεση στην μιτογόνο ουσία (phytohemagglutinin, PHA) χρησιμοποιώντας έναν αρνητικό μάρτυρα και δύο ξεχωριστά σύνολα-panel μυκοβακτηριδιακών αντιγόνων (panel A/ESAT-6 και panel B/CFP-10) [97]. Η παραγόμενη γ-ιντερφερόνη δεσμεύεται αρχικά από ειδικά αντιγόνα στην επιφάνεια της μεμβράνης και στη συνέχεια, με την προσθήκη ενός δεύτερου αντισώματος (υπόστρωμα) κατακρημνίζεται, δημιουργώντας ένα μπλε σημείο (spot) στην επιφάνεια της μεμβράνης [97]. Η αξιολόγηση του αριθμού των μπλε σημείων παρέχει το μέτρο παραγωγής της γ-ιντερφερόνης από τα T-λεμφοκύτταρα και υπολογίζεται αφαιρώντας τον αριθμό των σημείων του αρνητικού μάρτυρα (Nil) από τον αριθμό των σημείων σε κάθε panel [97]. Θετικό θεωρείται το αποτέλεσμα αν panel A μείον αρνητικό μάρτυρα και/ή panel B μείον Nil ≥ 8 σημεία και αρνητικό εάν (panel A μείον Nil) + (panel

B μείον Nil) ≤ 4 σημεία [97]. Αποτελέσματα με τιμές μεταξύ 5–7 σημείων θεωρούνται ότι ανήκουν στην «γκρίζα ζώνη» και κρίνονται ως απροσδιόριστα, ενώ η εξέταση πρέπει να επαναλαμβάνεται με νέα λήψη δείγματος και εφόσον το αποτέλεσμα παραμένει απροσδιόριστο χρησιμοποιούνται επιπλέον διαγνωστικές δοκιμασίες και κλινικά ή επιδημιολογικά δεδομένα [97].

Στα πλεονεκτήματα των μεθόδων IGRA ανήκουν α) η υψηλή ειδικότητα, ειδικά σε πληθυσμούς με TST ψευδώς θετική, λόγω προηγμένου BCG εμβολιασμού ή λόγω έκθεσης σε NTM (επαγγελματίες υγείας) και β) η υψηλή αρνητική προγνωστική αξία (αρνητική εξέταση σε υγιή ασθενή αποκλείει την νόσο). Στα μειονεκτήματα περιλαμβάνονται α) η αδυναμία διάγνωσης ενεργούς ή λανθάνουσας TB (πρέπει να συνυπολογίζονται τα κλινικά και ακτινολογικά ευρήματα), β) η μεγάλη συχνότητα απροσδιόριστων αποτελεσμάτων σε ανοσοκατασταλαμένους ασθενείς και παιδιά (αντιστρόφως ανάλογη της ηλικίας) και γ) το υψηλότερο κόστος και οι απαιτητικότερες τεχνικές [97]. Σε πολλές χώρες (κυρίως στην Ευρώπη) εφαρμόζεται η στρατηγική των δύο σταδίων (two-step approach), ιδίως για περιπτώσεις ελέγχου επαφών ή προηγμένου εμβολιασμού, δηλαδή αρχική διερεύνηση με TST, και εφόσον είναι θετική ή αναξιόπιστη, επιβεβαίωση με IGRAs [97], [101].

B4.3. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ (Nucleic acid amplification tests – NAATs)

Είναι μέθοδοι PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης), οι οποίες χρησιμοποιούν εκκινητές (primers), για να επιτύχουν τον θερμικό πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας στόχου, μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων αποδιάταξης, σύνδεσης με τους εκκινητές και επιμήκυνσης του DNA [83]. Βασίζονται στην αρχή του ανάστροφου υβριδισμού (reverse hybridization) και χρησιμοποιούν ειδικούς ανιχνευτές (probes), δηλαδή αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδίων, συμπληρωματικές ως προς την ζητούμενη αλληλουχία γενετικού υλικού, που είναι ειδική για κάθε είδος μυκοβακτηριδίων (υβρίδιο). Αποτελούν ισχυρό διαγνωστικό εργαλείο ανίχνευσης TB λοίμωξης και ταυτοποίησης του είδους των μυκοβακτηριδίων, ενώ μπορούν, παράλληλα, να ανιχνεύσουν αντοχή σε αντιφυματικά. Περιορίζουν το χρόνο διάγνωσης σε ώρες ή ημέρες (αντί εβδομάδων που χρειάζονται οι συμβατικές μέθοδοι) και απαιτούν

ελάχιστο αριθμό βακίλων για την ανίχνευσή τους (10^4 /ml βάκιλοι για θετική χρώση, 10^2 – 10^3 /ml βάκιλοι για θετική καλλιέργεια και μόνο 1 βάκιλος/ml για θετική PCR) [83]. Το Κέντρο Ελέγχου Νοσημάτων στις ΗΠΑ (Center for Disease Control, Atlanta, Georgia, USA) προτείνει την εφαρμογή των NAATs για όλα τα δείγματα πτυέλων, ύποπτων για TB, από το πρώτο κιάλας δείγμα που αποστέλλεται στο εργαστήριο, ανεξάρτητα του αποτελέσματος (θετικό ή αρνητικό) της μικροσκοπικής εξέτασης (χρώσης) [5]. Υπάρχουν διάφορες, διαθέσιμες στο εμπόριο δοκιμασίες, εγκεκριμένες από το FDA (US Food & Drug Administration Center), που εφαρμόζονται, είτε σε δείγματα πτυέλων με θετική μικροσκόπηση, είτε ανεξαρτήτως αποτελέσματος μικροσκόπησης όπως:

B4.3.1. Gen Probe Amplified Mtb Direct test, AMTD (Gen Probe Inc., San Diego, California, USA)

Η δοκιμασία εφαρμόζεται σε δείγματα πτυέλων με αρνητική ή θετική τη μικροσκοπική εξέταση (χρώση) και βασίζεται στη μέθοδο Transcription Mediated Amplification (TMA), που στοχεύει στον πολλαπλασιασμό ριβοσωμιακού RNA του *Mtb* (16S rRNA), με τη δράση μιας αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase) [83]. Η μέθοδος ολοκληρώνεται με τη χρήση ενός σωληναρίου, απαιτεί ισοθερμικό πολλαπλασιασμό και ανιχνεύει $<10^3$ αντίγραφα rRNA, ποσότητα που ισοδυναμεί με 1 βάκιλο σε δείγματα χωρίς χλωρίδα και σε 5 βάκιλους σε δείγματα με χλωρίδα [83].

B4.3.2. Amplicator Mtb test (Roche Molecular Systems, Branchburg, N.J., USA)

Είναι μέθοδος PCR, που εφαρμόζεται μόνο σε δείγματα πτυέλων με θετική μικροσκοπική εξέταση (χρώση) και στοχεύει στον πολλαπλασιασμό του ριβοσωμιακού 16S rRNA του *Mtb*. Στους ενήλικες, η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου υπολογίζεται στο 90% και 95%, αντίστοιχα [83].

B4.3.3. COBAS Amplicator (Roche Diagnostic Systems, Mannheim, Germany)

Η μέθοδος αποτελεί την αυτοματοποιημένη εκδοχή της παραπάνω δοκιμασίας και είναι αναγνωρισμένη από τον οργανισμό FDA (USA) να εφαρμόζεται σε δείγματα πτυέλων με θετική μικροσκοπική εξέταση (χρώση) και σε ασθενείς που δεν έχουν λάβει φαρμακευτική αγωγή [83].

B4.3.4. GenoType Mycobacteria Direct (Hain LifeScience, GmbH, Nerhren, Germany)

Η μέθοδος επιτρέπει την άμεση ανίχνευση και ταυτόχρονη ταυτοποίηση των MTB complex, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. malmoensae*, και *M. kansasii* με την τεχνική NASBA (nucleic acid sequenced based amplification), η οποία στηρίζεται στο συνδυασμό ανάστροφου υβριδισμού και ανιχνευτών γραμμικής διάταξης [9], [83].

B4.3.5. Accuprobe-Mycobacteria Culture Identification test (Gen Probe Inc., San Diego, California, USA)

Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή του υβριδισμού και χρησιμοποιεί DNA ανιχνευτές. Εφαρμόζεται σε θετικές καλλιέργειες και ανιχνεύει τα MTB complex, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. gordonae* και *M. kansasii* [83].

B4.3.6. Inno-Lipa Mycobacteria (Innogenetics, Ghent, Belgium)

Είναι μέθοδος ανάστροφου υβριδισμού (reverse hybridization), που χρησιμοποιεί ανιχνευτές γραμμικής διάταξης και ανιχνεύει, κυρίως, άτυπα μυκοβακτηρίδια, όπως τα MAIS complex (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*) τα *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. genovense*, *M. simiae*, *M. chelonae*, *M. ulcerans*, *M. avium sbs paratuberculosis*, *M. silvaticum*, *M. mageritense*, *M. fortuitum* και το MTB complex [83].

B4.3.7. Genotype Mycobacterium CM (common species) & AS (additional species) (Hain LifeScience, GmbH, Nerhren, Germany)

Αποτελεί μοριακή μέθοδο ανάστροφου υβριδισμού, που χρησιμοποιεί ιχνηθέτες γραμμικής διάταξης για την ταυτοποίηση των άτυπων μυκοβακτηριδίων (13 συχνότερα και 16 σπανιότερα είδη) [83].

Παρόλη την υψηλή ειδικότητα των μεθόδων NAATs, στην πράξη η ευαισθησία τους αποδεικνύεται μικρότερη, έτσι η συνολική ευαισθησία των NAATs σε δείγματα πτυέλων με θετική χρώση είναι 95%, σε δείγματα πτυέλων με αρνητική χρώση 66–72% και σε δείγματα με αρνητική χρώση και θετική καλλιέργεια είναι 50–95% [5], [102], [103]. Οι μοριακές τεχνικές εφαρμόζονται και σε εξωπνευμονικά δείγματα όπως α) σε πλευριτικό υγρό για τη διάγνωση φυματιώδους πλευρίτιδας (εξέταση εκλογής αποτελεί η βιοψία υπεζωκότα) με

ευαισθησία και ειδικότητα μεθόδου 62% και 98% αντίστοιχα [104]. Η μέθοδος ADA σε συνδυασμό με τις μοριακές μεθόδους μπορεί να αυξήσει επιπλέον το ποσοστό διάγνωσης της φυματιώδους πλευρίτιδας [105], β) σε ENY (φυματιώδη μηνιγγίτιδα) με Se και Sp των NAATs 56% και 98% αντίστοιχα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η εφαρμογή των NAATs σε δείγμα ούρων για ανίχνευση μυκοβακτηριδιακού DNA (transrenal DNA/tr-DNA) και διάγνωση πνευμονικής TB. Η εφαρμογή της μεθόδου προϋποθέτει την προτυποποίηση του τρόπου συλλογής και συντήρησης των ούρων, της μεθόδου απομόνωσης του DNA, των συνθηκών πολλαπλασιασμού και του τρόπου ανίχνευσης του προϊόντος πολλαπλασιασμού [106]. Οι μοριακές τεχνικές απαιτούν εξειδικευμένο τεχνολογικό εξοπλισμό για την εφαρμογή τους και δεν παρέχουν την δυνατότητα απομόνωσης του μικροοργανισμού. Για να απλουστεύσει την εφαρμογή τους η Eiken Chemical Company (Japan) ανέπτυξε τη μεθοδολογία loop mediated isothermal amplification (LAMP) – 1998, που δεν απαιτεί θερμικό κυκλοποιητή (θερμοκύκλοτρο) ή κατάψυξη για την συντήρηση των αντιδραστηρίων, ενώ οπτικοποιεί το αποτέλεσμα με τη χρήση φθοριοχρώματος (calcein). Η μέθοδος παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία (97–100%) σε δείγματα με θετική χρώση και θετική καλλιέργεια, ενώ σε δείγματα με αρνητική τη χρώση και θετική τη καλλιέργεια το ποσοστό ευαισθησίας είναι χαμηλό (49%) [107], [108].

B4.4. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΦΥΜΑΤΙΚΑ

Βασίζονται στην αρχή του ανάστροφου υβριδισμού (μέθοδοι PCR & real-time PCR) για την ταυτόχρονη ανίχνευση TB λοίμωξης και αντοχής σε αντιφυματικά. Αποτελούν μέρος της στρατηγικής ελέγχου και περιορισμού της νόσου και εφαρμόζονται τόσο σε καλλιέργειες, όσο και σε κλινικά δείγματα με θετική χρώση, ιδίως αν υπάρχει ισχυρή υποψία πολυανθεκτικής TB [109]. Ανιχνεύουν τις μεταλλάξεις στο *rpoB* γονίδιο (κωδικοποιεί την β-υποομάδα της RNA-πολυμεράσης), που είναι υπεύθυνες για αντοχή στην RIF και τις μεταλλάξεις στο *katG* γονίδιο (κωδικοποιεί την καταλάση-υπεροξειδάση) και *inhA* γονίδιο (κωδικοποιεί το ένζυμο enoyl-ACP-reductase, απαραίτητο για την βιοσύνθεση των μυκολικών οξέων), που είναι υπεύθυνες για αντοχή στη INH. Ειδικότερα,

B4.4.1. INNO LiPARif.TB test (Innogenetics, Ghent, Belgium)

Μέθοδος που ανιχνεύει ταυτόχρονα λοίμωξη από *Mtb* και αντοχή στη RIF, για τις συχνότερες μεταλλάξεις στο *rpoB* γονίδιο, στα κωδικόνια 512-513, 514-517, 517-518, 525, 526 και 531 των αμινοξέων του πολυπεπτιδίου της β-υποομάδας της RNA-πολυμεράσης. Μελέτη των Morgan et al., που συγκεντρώνει τα αποτελέσματα 15 εργασιών, εμφανίζει ευαισθησία (Se) της μεθόδου σε θετικές καλλιέργειες 82–100% και ειδικότητα (Sp) 92–100%, ενώ σε κλινικά δείγματα Se 80–100% και Sp 100%, αντίστοιχα [110].

B4.4.2. GenoTypeMTBDR plus test (Hain LifeScience, Nehren, Germany)

Μέθοδος ανιχνεύει αντοχή στη RIF, εντοπίζοντας τις συχνότερες μεταλλάξεις στο *rpoB* γονίδιο στις θέσεις 516, 526 και 531 και στη INH εντοπίζοντας τις αντίστοιχες στο *katG* γονίδιο (κωδικόνιο 315) και *inhA* γονίδιο (υποκινητής του *inhA* γονιδίου). Στηρίζεται στον υβριδισμό προϊόντων PCR σε προσκολλημένους σε ταινίες νιτροκυτταρίνης ιχνηθέτες, που ανιχνεύουν τις μεταλλαγμένες θέσεις των γονιδίων. Οκτώ ιχνηθέτες καλύπτουν την περιοχή των 81bp του *rpoB* γονιδίου (οι τέσσερις αφορούν τις πιο συχνές μεταλλάξεις), τρεις ιχνηθέτες τις μεταλλάξεις του *katG* γονιδίου (ένας ιχνηθέτης καλύπτει την αγρίου τύπου αλληλουχία στο 315 κωδικόνιο) και έξι ιχνηθέτες τις μεταλλάξεις του *inhA* γονιδίου (δύο ιχνηθέτες την αγρίου τύπου αλληλουχία στον υποκινητή και τέσσερις τις πιο συχνές μεταλλάξεις της συγκεκριμένης περιοχής) [57]. Η μετάλλαξη αναγνωρίζεται από την απουσία σήματος στον αντίστοιχο «αγρίου τύπου» ιχνηθέτη της ταινίας και την εμφάνιση σήματος στον αντίστοιχο ιχνηθέτη για την μετάλλαξη που ελέγχεται [57]. Η Se και Sp της μεθόδου για την RIF ανέρχεται σε 98,4% και 98,9% αντίστοιχα, ενώ για την INH μειώνεται σε 88,7% και 99,2% [83]. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι δείκτες Se και Sp, στην περίπτωση της RIF, δεν παρουσιάζουν ετερογένεια, ανάλογα με το είδος του βιολογικού υλικού (καλλιέργεια ή κλινικό δείγμα), ενώ, αντιθέτως, στην περίπτωση της INH παρατηρείται ετερογένεια [83]. Το τμήμα μοριακής διάγνωσης του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Μυκοβακτηριδίων (EKAM, ΓΝΝΘΑ "Η Σωτηρία") πραγματοποίησε το διάστημα Σεπτέμβριος 2007–Δεκέμβριος 2009 ανάλυση 953 στελεχών *Mtb*, που καλλιεργήθηκαν σε στερεά (L-J) και υγρά υλικά (BACTEC MGIT-960), με τη μέθοδο MTBDR-plus. Συνολικά, ανιχνεύθηκαν 52 στελέχη με

μεταλλάξεις στο *vroB* γονίδιο, 67 στο *katG* γονίδιο, 27 *inhA* γονίδιο και 4 στα *katG* & *inhA* γονίδια, ενώ από το σύνολο, 36 στελέχη ήταν πολυανθεκτικά (3,7%) [57]. Οι μεταλλάξεις στον υποκινητή του *inhA* γονιδίου δεν επηρεάζουν τη δομή και λειτουργία του γονιδιακού προϊόντος, αλλά τον βαθμό έκφρασής του και συνεπώς, προσφέρουν χαμηλού βαθμού στην INH. Ο εντοπισμός του πολυμορφισμού 1341C>T στο *vroB* γονίδιο (αντικατάσταση της C με T στη θέση 1341) δημιουργεί συνώνυμο κωδικόνιο, που δεν αλλάζει την αλληλουχία των αμινοξέων και την λειτουργικότητα της πρωτεΐνης, έτσι ώστε τα πολυμορφικά στελέχη να είναι ευαίσθητα στην RIF [57]. Υπό διερεύνηση παραμένει η προέλευση των πολυμορφικών στελεχών, δηλαδή εάν προήλθαν από διασπορά ή αν προϋπήρχαν στον ελλαδικό χώρο. Τα αποτελέσματα της μελέτης παρατίθενται στους πίνακες B3. & B4., που ακολουθούν.

ΠΙΝΑΚΑΣ Β3. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΟ *vroB* ΓΟΝΙΔΙΟ (Π. Ιωαννίδης κ.α., *Μοριακές τεχνικές για την ανίχνευση αντοχής του Mtb σε INH και RIF: η εμπειρία του ΕΚΑΜ, (2010), ΔΕΜΕ, 50(2):175-182, πίνακας 1*).

MTBDRplu	Μετάλλαξη	Στελέχη	%	MTBDRplu	Μετάλλαξη	Στελέχη	%
Wildes		901	94.5	ΔWT7	H526R	1	0.1
MUT3	S531L	29	3.0		L511P,	1	0.1
					D516G		1
ΔWT7	1341C>T	7	0.7	ΔWT2/WT	L511P,	1	0.1
					M515V		1
MUT2A	H526Y	2	0.2	ΔWT8	S531F	1	0.1
							1
ΔWT7	H526N	2	0.2	ΔWT3/WT	D516Y	1	0.1
							1
ΔWT8	S531W	2	0.2	MUT2B	H526C	1	0.1
							1
ΔWT3	513dupF	1	0.1	ΔWT7	H526D	1	0.1
							1
MUT1	D516V	1	0.1	ΔWT7	H526L	1	0.1

Επεξήγηση μεταλλάξεων: S531L-Ser531Leu, 1341C>T-αντικατάσταση C με T στη θέση 1341, H526Y-His526Tyr, H526N-His526Asn, S531W-Ser531Trp, 513dupF-διπλασιασμός της Phe στη θέση 513, D516V-Asp516Val, H526R-His526Arg, L511P & D516G-Leu511Pro & Asp516Gly, L511P & M515V-Leu511Pro & Met515Val, S531F-Ser531Phe, D516Y-Asp516Tyr, H526C-His526, H526D-His526Asp, H526L-His526Le

B4.4.3. Xpert MTB test (Cepheid Inc., Sunnyvale, California, USA)

Αποτελεί αυτοματοποιημένη μέθοδο, που ταυτόχρονα ανιχνεύει, με real-time PCR το DNA του *Mtb* (δηλ. TB λοίμωξη) και με ανάστροφο υβριδισμό τις μεταλλαγμένες περιοχές του *rpoB* γονιδίου, που είναι υπεύθυνες για αντοχή στην RIF. Χρησιμοποιεί πέντε σημασμένους ιχνηθέτες, που καλύπτουν την περιοχή των 81 βάσεων του *rpoB* γονιδίου και εφαρμόζεται άμεσα σε δείγματα πτυέλων [83].

ΠΙΝΑΚΑΣ Β4. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΑ *katG*, *inhA* ΓΟΝΙΔΙΑ_(II. Ιωαννίδης κ.α., Μοριακές τεχνικές για την ανίχνευση αντοχής του *Mtb* σε INH και RIF: η εμπειρία του ΕΚΑΜ, (2010), ΔΕΜΕ, 50(2):175-182, πίνακας 2).

MTBDRplu s	Μετάλλαξη	Στελέχ η	%	MTBDRplu s	Μετάλλαξη	Στελέχ η	%
Wilde type		885	89.7				
<i>katG</i> MUT1	<i>KatG</i> S315T1	64	6.7	<i>katG</i> MUT1 + WT <i>katG</i>	<i>KatG</i> S315T1 + WT <i>katG</i>	1	0.1
<i>katG</i> MUT2	<i>KatG</i> S315T2	1	0.1	<i>InhA</i> MUT1	<i>inhA</i> [- 15C>T]	22	2.3
<i>katG</i> ΔWT	<i>KatG</i> S315I	1	0.1	<i>InhA</i> ΔWT1	<i>inhA</i> [- 17G>T]	1	0.1
<i>katG</i> MUT1	<i>KatG</i> S315T1 + , <i>inhA</i> [-	2	0.2	<i>InhA</i> MUT2	<i>inhA</i> [- 16A>G]	1	0.1

<i>inhA</i> [-	15C>T]						
15C>T]							
<i>katG</i>	<i>KatGS315T1</i>	1	0.1	<i>InhA</i>	<i>inhA</i> [-	1	0.
MUT1	+	,		MUT3A	8T>C]		1
<i>DinhA</i>	<i>inhA</i> [-						
	34C>T]						
<i>katG</i>	<i>KatGS315T1</i>	1	0.1	<i>InhA</i> MUT1	<i>inhA</i> [-	2	0.
MUT1	+	,		+ WT <i>InhA</i>	15C>T],		2
<i>inhA</i> ΔWT2	8T>G]				WT <i>InhA</i>		

Επεξήγηση μεταλλάξεων: S315T1-Ser315Thr(ACC), S315T2-Ser315Thr(ACA), S315I-Ser315Ile, -15C>T [αντικατάσταση της C με T στην θέση -15, στον υποκινητή του γονιδίου], -34C>T [ομοίως, στην θέση -34 του υποκινητή], -8T>C [αντικατάσταση της T με C στην θέση -8 του υποκινητή], -17G>T [αντικατάσταση της G με T, θέση -17 του υποκινητή], -16A>G [αντικατάσταση της A με T, θέση -16 του υποκινητή].

B4.5. ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ

Πρόκειται για δοκιμασίες που επιδιώκουν να ανιχνεύσουν γρήγορα και με χαμηλό κόστος ασθενείς με νόσο, αντοχή στα αντιβιοτικά, μη ανταπόκριση στη θεραπεία (λόγω μεταβολισμού) και να διαχωρίσουν ενεργό από λανθάνουσα νόσο καθώς και την πιθανότητα αναζωπύρωσής της. Μπορεί να λειτουργήσουν και ως δοκιμασίες «παρά την κλίνη του ασθενούς» (point of care test). Αφορούν ανίχνευση α) αντισωμάτων, β) κυτοκινών, που επάγουν την παραγωγή γ-ιντερφερόνης, όπως CTX χημειοκίνη IP-10 γ) αντιγόνων π.χ. αντιγόνο T-λεμφοκυττάρων (με ιδιότητα αιμοσυγκολλητίνης), σχετιζόμενο με λανθάνουσα TB [5].

B4.5.1. miRNAs – snRNAs

Τα miRNAs (microRNAs) και τα snRNAs (small nuclear RNAs) είναι μικρά, μη κωδικά μόρια RNA, που λειτουργούν ως ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης (επιγενετικός μηχανισμός). Καταστέλλουν την μετάφραση του mRNA στα ριβοσώματα, επειδή ως μονόκλιωνα μόρια RNA και συμπληρωματικά (πλήρως ή μερικώς) ως προς το mRNA του γονιδίου στόχου, συνδέονται με αυτό και οδηγούν, είτε σε αποδόμηση του mRNA-στόχου, είτε σε πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης (μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν

είτε ως βιοδείκτες για τη διάγνωση, πρόγνωση και παρακολούθηση της νόσου (circulating miRNAs), είτε ως θεραπευτικά μόρια (ενδοκυττάρια miRNAs) και η μελέτη της έκφρασή τους πραγματοποιείται με τις μικροσυτοιχίες (microarrays). Την τελευταία δεκαετία πολλές μελέτες επιχειρούν να διερευνήσουν τον ρόλο τους και την χρησιμότητά τους ως βιοδείκτες (πίνακας Β5.) σε ασθενείς με TB λοίμωξη, π.χ. διαφοροποιημένη έκφραση των miRNAs για την διάγνωση μεταξύ ενεργούς και λανθάνουσας νόσου [111]. Μελέτη των Rajaram et al., 2011, διαπίστωσε ότι το μόριο της λιπομαννάνης (LM), στο τοίχωμα επιθετικών (virulent) στελεχών *Mtb* διέγειρε την έκφραση του miR-125b στα ανθρώπινα μακροφάγα, ενώ το LM του τοιχώματος επιθετικών στελεχών *M. smegmatis* την έκφραση του miR-155, αντίστοιχα, συμπεραίνοντας ότι μεταξύ συγγενών ειδών μυκοβακτηριδίων υπάρχει διαφοροποιημένη έκφραση των miRNAs, που, ενδεχομένως, οδηγεί σε διαφοροποιημένη ανοσιακή απόκριση. Παράλληλα, το miR-155, αποτελεί πιθανό θεραπευτικό μόριο, επειδή αφενός συμμετέχει θετικά στην ρύθμιση της διέγερσης των ανοσιακά κατεσταλμένων NK-κυττάρων σε ασθενείς με TB (μελέτη των Zhang et al., 2015) και, αφετέρου, ενεργοποιεί μηχανισμούς αυτοφαγίας για την απομάκρυνση των μυκοβακτηριδίων (Wang et al., 2013). Μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε παιδιά με TB (Wang et al., 2015) διαπίστωσε μειωμένη έκφραση του miR-31 στα μακροφάγα των νοσούντων παιδιών, σε σχέση με τα υγιή και αρνητική συσχέτιση της έκφρασης του miR-31 με τα επίπεδα ορού των κυτοκινών (IL-6, TNF- α , IFN). Το miR-93 αποτελεί επίσης, πιθανό, θεραπευτικό μόριο, όταν διαπιστώθηκε η ιδιότητα του να εξουδετερώνει κυκλοφορούντα miRNAs στον ορό TB ασθενών (Barry et al., 2015). Πάντως, η χρήση των miRNAs δεν αποκλείει το ενδεχόμενο παρενεργειών, καθώς δεν είναι ειδικά, αλλά κάθε mi-RNA μπορεί να συνδεθεί με διαφορετικά mRNAs (<200) και επιβάλλει την διεξαγωγή περαιτέρω έρευνας για την αποσαφήνιση του ρόλου τους [111].

ΠΙΝΑΚΑΣ Β5. ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΩΝ mi-RNAs ΩΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ (Naveed et al., *miRNAs in TB, frontiers in Medicine, 2018, V9(602), 1-14*).

ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

mi-

ΜΕΛΕΤΕΣ

RNAs/BIOΔΕΙΚΤΕΣ		
Μακροφάγα	<i>miR-125b, miR-155</i>	Rajanam et al., 2011
Μακροφάγα	<i>miR-29a, miR-361-5p</i>	Draz et al., 2014
Μακροφάγα	<i>miR-31</i>	Wang et al., 2015
Ορός	<i>miR-4433b-5p, miR-424-5p, miR-199b-5p,</i>	Wang et al., 2016
Ολικό Αίμα	<i>miR-1, miR-31, miR-156, miR-10a, miR-146a, miR-125b, miR-150, miR-29,</i>	Zhou et al., 2016
Μακροφάγα	<i>miR-144</i>	Lu et al., 2016
Ορός	<i>miR-424-5p, miR-493-5p, miR-296-5p, miR-377-5p, miR-191-5p, miR-3680-5p</i>	Meng et al., 2014
T-κύτταρα	<i>miR-144</i>	Liu et al., 2011
Ολικό Αίμα	<i>miR-424, miR-365</i>	Wang et al., 2011

B5. ΘΕΡΑΠΕΙΑ TB - ΝΕΟΤΕΡΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

Μετά από μία μακρά περίοδο αδράνειας (τα τελευταία 30 χρόνια) στην έρευνα για την ανακάλυψη αντιφυματικών παραγόντων, η αύξηση του επιπολασμού της νόσου παγκοσμίως και η εμφάνιση των ανθεκτικών μορφών (MDR/XDR-TB) οδήγησαν σε δραστηριοποίηση των φαρμακευτικών οργανισμών (υπό την εποπτεία του WHO) για την ανάπτυξη νεότερων θεραπευτικών μορίων, ώστε να αντιμετωπιστεί επιτυχώς το πρόβλημα. Ιδανικά, τα νεότερα αντιφυματικά θα πρέπει να πληρούν τα παρακάτω κριτήρια: α) νέο μηχανισμό δράσης (διαφορετικό των λοιπών), ώστε να μην παρατηρείται διασταυρούμενη αντοχή με άλλες τάξεις αντιφυματικών, β) ταχεία βακτηριοκτόνο δράση, που θα μειώσει τη διάρκεια της αγωγής, γ) καλές ιδιότητες φαρμακοδυναμικής (PD) και φαρμακοκινητικής (PK), που θα επιτρέπουν την εφάπαξ, από του στόματος (oral), ημερησίως χορήγησή τους, δ) ελάχιστες έως μηδενικές αλληλεπιδράσεις με άλλους παράγοντες, ώστε να χορηγούνται σε σχήματα και ταυτόχρονα με αντιρετροϊκή αγωγή και ε) άριστο προφίλ ασφάλειας, που θα επιτρέπει τη χορήγησή τους σε παιδιά και εγκύους [56]. Στο κεφάλαιο που ακολουθεί, γίνεται γνωριμία με τις κυριότερες και πολλά υποσχόμενες τάξεις των νεότερων αντιφυματικών (σε φάση κλινικών και

προκλινικών δοκιμών), αναπτύσσονται οι μηχανισμοί δράσης τους, αναλύονται παράμετροι της φαρμακοδυναμικής και φαρμακοκινητικής των μορίων, επισημαίνονται μηχανισμοί αντοχής και τυχόν παρενέργειες και αναδεικνύονται προκλήσεις (εκλεκτικότητα δράσης) και προοπτικές (σχεδίαση παραγόντων) του όλου εγχειρήματος.

B5.1. ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ (Diarylquinolones & Respiratory chain Antagonists)

Γενικά, οι κινολόνες αποτελούν μικρά, υδρόφιλα μόρια που διέρχονται το κυτταρικό τοίχωμα μέσω των πορινών, ενώ τα μόρια με κάποιο βαθμό υδροφοβίας διαχέονται μέσω της λιπιδικής στοιβάδας του κυτταρικού τοιχώματος με την βοήθεια των λιποσακχαριτών και εισάγονται στο κυτταρόπλασμα, μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, με παθητική διάχυση, μη κορέσιμη [13]. Στους προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς προκαλούν γρήγορη αναστολή της DNA σύνθεσης, αναστέλλοντας την δράση ενζύμων που συμμετέχουν στην υπερελίκωση του DNA (DNA-γυράσες, DNA-τοποισομεράσες) και έχουν βακτηριοκτόνο δράση.

B5.1.1. Βεδακιλίνη (Bedaquiline, TMC-207), oral

Αποτελεί νεότερο αντιφυματικό της τάξης των κινολονών (diarylquinolones), μέλος της οικογένειας των ναφθαλινών και παράγωγο της ιμιδαζοπυριδίνης (imidazo-1,2- α -pyridine compound). Είναι μεγάλο, λιπόφιλο (υδρόφοβο) μόριο, με χημικό τύπο $C_{32}H_{31}BrN_2O_2$ και M.B. 555,516 gr/ml. Το 2016 η βεδακιλίνη βρισκόταν (μαζί με την δελαμανίδα και την πρετομανίδα) σε φάση 3 κλινικών δοκιμών, αλλά, ήδη από το 2012 (Δεκέμβριος 2012), μετά από «υπό όρους» έγκριση (conditional marketing approval) από τον Αμερικανικό, φαρμακευτικό οργανισμό—FDA (Food and Drug Administration, U.S.A.) και τον Ευρωπαϊκό ομόλογό του EMA (European Union's European Medicines Agency) εισήχθη στην κλινική θεραπευτική (SIRTURO, *Janssen Therap.*, tb100mg) για την θεραπεία της MDR-TB.(WHO 2017). Παρουσιάζει έναν εντελώς νέο μηχανισμό δράσης, ώστε να μη παρατηρούνται περιπτώσεις διασταυρούμενης αντοχής με λοιπά αντιφυματικά (π.χ. 1^{ης} γραμμής, όπως INH, RIF), που στοχεύει (αναστέλλει) τον ενεργειακό μεταβολισμό του *Mtb* [56]. Ειδικότερα, δρα στον F₀F₁ δακτύλιο (rotor ring) της ATP-συνθάσης (ένζυμο της αναπνευστικής αλυσίδας) του *Mtb*

(συνδέεται με την c-υπομονάδα του F₀F₁ δακτυλίου) και αναστέλλει εκλεκτικά την δράση του ενζύμου, απαραίτητο για την παραγωγή ενέργειας στους ενεργούς και τους λαθροβιούντες μικροοργανισμούς, χωρίς να επηρεάζει τα υπόλοιπα προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα (εκλεκτικότητα δράσης) [56]. Τα λαθροβιούντα μυκοβακτηρίδια καταφέρνουν να επιβιώνουν, με ενεργειακή διατήρηση των κυτταρικών τους δομών, χρησιμοποιώντας μία δεξαμενή από ATP μόρια που προέρχεται από την δράση της ATP-συνθάσης (ή ATP-συνθετάσης). Επομένως, η ιδιότητα της βεδακιλίνης να αναστέλλει την δράση του συγκεκριμένου ενζύμου την καθιστά εξαιρετική επιλογή για την θεραπεία της λανθάνουσας TB [56]. Η βεδακιλίνη παρουσιάζει άριστη βακτηριοκτόνο τόσο σε ευαίσθητα, όσο και σε ανθεκτικά στελέχη *Mtb*, με την ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (MIC) να ορίζεται στα 0,03 µg/ml για τα πρώτα (DS-strains) και στα 0,12 µg/ml για τα δεύτερα (DR-strains) [56]. Χορηγείται σε θεραπευτικό σχήμα (συνδυασμός με λοιπά αντιφυματικά, όπως δελαμανίδη) για την αντιμετώπιση της πνευμονικής MDR-TB στους ενήλικες (>18 ετών) ως εξής: βεδακιλίνη, από το στόμα (per os), αρχικά 400mg ημερησίως, για 2 εβδομάδες και στη συνέχεια 200mg, 3 φορές την εβδομάδα, για 22 εβδομάδες (χρόνος θεραπείας 24 εβδομάδες – εξάμηνο σχήμα) [112]. Το φάρμακο μεταβολίζεται από το κυτόχρωμα CYP3A4 (ισοένζυμο 3A4, κυτόχρωμα P450-CYP) και παρουσιάζει φαρμακοκινητικές αλληλεπιδράσεις με φάρμακα που μεταβολίζονται με παρόμοιο τρόπο, όπως π.χ. η RIF, που ελαττώνει την δραστηριότητα της βεδακιλίνης [56]. Στις παρενέργειες της βεδακιλίνης περιλαμβάνονται η (ήπια έως μέτρια) τρανσαμιναιμία (ηπατοτοξικότητα), η αρθραλγία, η αιμόπτυση, το θωρακικό άλγος και η παράταση του QT διαστήματος στο ΗΚΓ, επομένως συνιστάται επιφυλακτικότητα στην ταυτόχρονη χορήγησή της με φθοριοκινολόνες ή μακρολίδες, που εμφανίζουν καρδιοτοξικότητα ή με άλλα φάρμακα που αναστέλλουν την λειτουργία του CYP3A4 και αυξάνουν την τοξικότητα της δράσης της [56]. Το *Mtb* ανέπτυξε δύο μηχανισμούς αντοχής έναντι της βεδακιλίνης, τροποποιώντας τον στόχο δράσης του φαρμάκου, μέσω μετάλλαξης στο γονίδιο της ATP-συνθετάσης (γονίδιο *atpE*) και υπερεκφράζοντας την αντλία εξόδου MmpL5, μέσω μεταλλάξεων στον υποκινητή του γονιδίου *MmpR*, πετυχαίνοντας, παράλληλα και διασταυρούμενη αντοχή στην κλοφαζιμίνη [80], [81], [82].

B5.1.2. Q203 (Imidazopyridine QcrB inhibitors), oral

επίσης, αποτελεί παράγωγο της ιμιδαζοπυριδίνης (imidazopyridine amide) και ανακαλύφθηκε, προσφάτως, μετά από φαρμακευτικές μελέτες (medicinal chemistry optimization at a high-throughput screen – HITS) των αντίστοιχων παραγώγων σε ανθρώπινα, μολυσμένα μακροφάγα [56], [113]. Τα παράγωγα της ιμιδαζοπυριδίνης παρουσιάζουν βακτηριοκτόνο δράση σε *Mtb* ανθεκτικά στελέχη, τόσο *in vivo* (εντός των μακροφάγων), όσο και *in vitro* (καλλιεργητικά μέσα) και, λόγω των παραπάνω ιδιοτήτων τους, αποτελούν καλή δεξαμενή για την ανάπτυξη νεότερων αντιφυματικών [56], [113]. Το Q203 μπήκε σε φάση 1 κλινικών δοκιμών (NCT02530710) το 2017, ενώ το 2018 πέρασε σε φάση 2 κλινικών δοκιμών και αναπτύσσεται από την φαρμακευτική εταιρία Qurient Therapeutics (Gyeonggi-do, Korea) [114]. Αναστέλλει το κυτόχρωμα bc1 της αναπνευστικής αλυσίδας του *Mtb* (σύμπλοκη δομή, που αποτελείται από το κυτόχρωμα b, το κυτόχρωμα c1 και την πρωτεΐνη RISP), στοχεύοντας, ειδικά το κυτόχρωμα b (QcrB) της σύμπλοκης δομής [56], [113]. Το κυτόχρωμα bc1 αποτελεί απαραίτητο συστατικό της αναπνευστικής αλυσίδας μεταφοράς πρωτονίων και ηλεκτρονίων με τελικό στόχο την παραγωγή ενέργειας, μέσω σύνθεσης ATP (η μεταφορά των πρωτονίων παρέχει την απαραίτητη ενέργεια για την περιστροφή του δακτυλίου F₀F₁ της ATP-συνθάσης). Το Q203 προκαλεί ταχεία πτώση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ATP, με IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) στα 1,1 Nm και διαταράσσει την ομοιοστασία των λαθροβιούντων μυκοβακτηριδίων, με IC₅₀ στα 10,0 Nm) [56], [113]. Οι παραπάνω παράμετροι είναι φαρμακοδυναμικά ανώτερες έναντι της βεδακιλίνης, γεγονός που εξηγεί την άριστη βακτηριοκτόνο δράση του Q203 σε πειραματικά μοντέλα χρόνιας TB λοίμωξης [56], [113]. Από όλα τα παράγωγα της ιμιδαζοπυριδίνης που εξετάστηκαν (περίπου 477), το Q203 παρουσιάζει την μέγιστη βακτηριοκτόνο δράση, τόσο *in vivo* (εντός των μακροφάγων) με MIC₅₀ (half minimal inhibitory concentration) στα 0,28 Nm, όσο και *in vitro* (ζωμός broth) με MIC₅₀ στα 2,70 Nm [56]. Επιπλέον, δεν παρουσιάζει κυτταροτοξικότητα ή καρδιοτοξικότητα (βλέπε βεδακιλίνη), δεν αναστέλλει τα ισοένζυμα του κυτοχρώματος P450 και δεν αποτελεί υπόστρωμα ή αναστολέα της P-gP αντλίας εξόδου, ώστε να παρουσιάζει φαρμακοκινητικές αλληλεπιδράσεις. Είναι, ωστόσο, εξαιρετικά λιπόφιλο μόριο (όπως και η βεδακιλίνη) με ισχυρή πρόσδεση στις πρωτεΐνες του αίματος [56]. Αναμένεται να ακολουθήσουν και

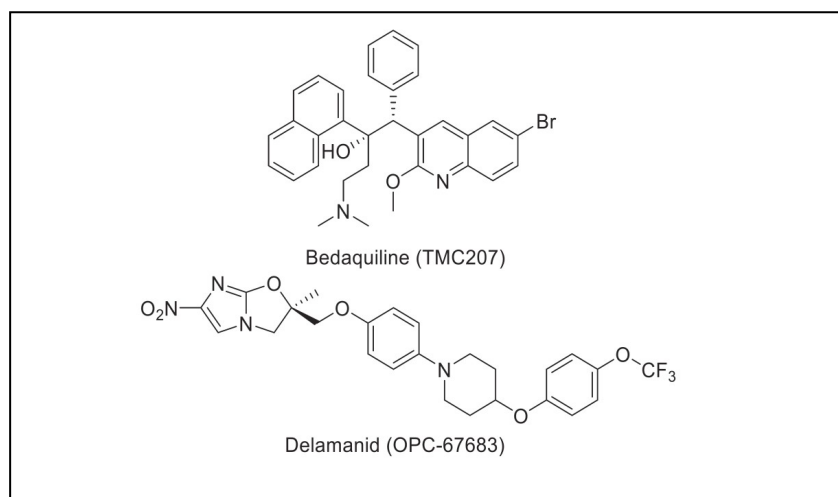
άλλες κλινικές μελέτες, σε συνδυασμό με αντιφυματικά 2ης γραμμής, στοχεύοντας την μείωση του χρόνου θεραπείας της MDR-TB [56].

B5.2. ΝΙΤΡΟΙΜΙΔΑΖΟΛΕΣ (Nitroimidazoles)

Γενικά, οι 5-νίτρο-ιμιδαζόλες (όπως και τα νιτροφουράνια) αποτελούν προφάρμακα, και για να ασκήσουν τη βακτηριοκτόνο δράση τους, πρέπει, πρώτα να ενεργοποιηθούν, με αναγωγή των νιτροομάδων τους ($\text{NO}_2 \rightarrow \text{NH}_2$), από τους ενδοκυττάριους μεταφορείς ηλεκτρονίων (αναπνευστική αλυσίδα) των βακτηρίων [13]. Στους προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς προκαλούν θραύση των αλυσίδων DNA και δημιουργία ελεύθερων τμημάτων, ενώ στο *Mtb* προκαλούν αναστολή της βιοσύνθεσης του κυτταρικού του τοιχώματος και αναστολή της παραγωγής ενέργειας από το κύτταρο.

B5.2.1. Δελαμανίδα (Delamanid, QPC-67683), oral

Αποτελεί νεότερο αντιφυματικό της τάξης των νιτροιμιδαζολών και είναι παράγωγο της νιτρο-διυδρο-ιμιδαζοοξαζόλης [115]. Το 2016 η δελαμανίδα ήταν σε φάση 3 κλινικών δοκιμών, αλλά το 2014, έλαβε υπό όρους έγκριση (conditional marketing approval) από τον Αμερικανικό, φαρμακευτικό οργανισμό FDA (Food and Drug Administration, U.S.A.) και ακολούθως, έγινε εισαγωγή του φαρμάκου στη κλινική θεραπευτική [114]. Αποτελεί προφάρμακο, που ενεργοποιείται με τη δράση μιας νιτροαναγωγάσης του *Mtb* (F_{420} -deazoflavin-dependent nitroreductase) και αναστέλλει τη βιοσύνθεση των μυκολικών οξέων του κυτταρικού τοιχώματος [115]. Είναι δραστική σε ευαίσθητους *Mtb* πληθυσμούς *in vitro* και *in vivo*, αλλά η βακτηριοκτόνος δράσης της σε ανθεκτικά στελέχη *Mtb* παραμένει αμφιλεγόμενη και επομένως, δεν συνιστάται ως μονοθεραπεία για τις περιπτώσεις MDR/XDR TB (η αποτελεσματικότητα της δελαμανίδης εξετάζεται από μελέτες, όπου χορηγείται συνδυαστικά με λοιπά αντιφυματικά σε εξάμηνα σχήματα για την θεραπεία της MDR/XDR TB) [112]. Το *Mtb* ανέπτυξε μηχανισμούς αντοχής έναντι των νιτροιμιδαζολών (δελαμανίδα, πρετομανίδα), με αδρανοποίηση σε στάδιο προφαρμάκου (γονίδια *ddn*, *fgd1*, *fbxA/B/C*).



Εικόνα B8.: Βεδακιλίνη και Δελαμανίδη – νεότερα αντιφυματικά για MDR-TB.
(D.T.Hoagland et al., A.D.D.R., 2016, 102:55-72)

B5.2.2. Πρετομανίδη (Pretomanid, PA-824), oral

αποτελεί νεότερο αντιφυματικό της τάξης των νιτροιμιδαζολών και είναι παράγωγο της μετρονιδαζόλης (nitroimidazole-oxazine) [115]. Βρίσκεται σε φάση 3 τριών κλινικών δοκιμών (NCT02333799, NCT02589782, NCT03086486) και αναπτύσσεται από την μη κυβερνητική οργάνωση (ΜΚΟ) Global TB Alliance (NY, USA). Αποτελεί προφάρμακο, που ενεργοποιείται με την δράση της ίδιας νιτροαναγωγάσης του *Mtb* (F_{420} -deazoflavin-dependent nitroreductase) και αναστέλλει την βιοσύνθεση των μυκολικών οξέων, ενώ, παράλληλα, παράγοντας τοξικά οξείδια του αζώτου, μπλοκάρει την λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας του μικροοργανισμού [115]. Είναι δραστική, τόσο σε ευαίσθητους πληθυσμούς *Mtb*, in vitro και in vivo, όσο και σε ανθεκτικά στελέχη *Mtb* (πιθανώς, λόγω αναστολής της παραγωγής ενέργειας, που είναι απαραίτητη στη λανθάνουσα φάση) και συνιστάται ως θεραπεία, αφενός για την DS-TB και αφετέρου για περιπτώσεις MDR/XDR-TB π.χ. μελέτη (randomized Early Bactericidal Activity study), που χορήγησε πρετομανίδη ως μονοθεραπεία σε ασθενείς ($n=69$) με DS-TB, για χρονικό διάστημα μόλις 14 ημερών και σε δόσεις, από του στόματος, καθημερινά των 200mg, 600mg, 1000mg και 1200mg διαπίστωσε καλή ανεκτικότητα του φαρμάκου στις διαφορετικές δοσολογίες και εξίσου καλή αποτελεσματικότητα [115], [116]. Άλλες μελέτες έδειξαν την ισχυρή βακτηριοκτόνο δράση της πρετομανίδης σε συνδυασμό με άλλα αντιφυματικά

(θεραπευτικό σχήμα πρετομανίδης / μοξιφλοξασίνης / πυραζιναμίδης ή θεραπευτικό σχήμα βεδακιλίνης / πρετομανίδης / πυραζιναμίδης / κλοφαζιμίνης συγκριτικά με την βεδακιλίνη ως μονοθεραπεία ή με το σχήμα βεδακιλίνης / πυραζιναμίδης) για την θεραπεία της MDR-TB, με σημαντική μείωση της διάρκειας της αγωγής (από 18-24 μήνες σε 4-6 μήνες) [112], [117]. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα της πρετομανίδης είναι η δυνατότητά της να χορηγείται ταυτόχρονα με αντιρετροϊκή αγωγή σε HIV-ασθενείς με TB νόσο [112].

B5.3. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥ ENZYMOY DprE1 (DprE1 Inhibitors)

Οι DprE1-αναστολείς αναστέλλουν τη δράση του φλαβοενζύμου DprE1 (decaprenylphosphoryl-β-D-ribose2-epimerase1) που καταλύει τον επιμερισμό του DPR (decaprenylphosphoryl-β-D-ribofuranose) σε DPK (decaprenylphosphoryl-2-keto-β-D-erythro-pentofuranose) και επομένως, αναστέλλουν την βιοσύνθεση της αραβινογαλακτάνης του μυκοβακτηριδιακού τοιχώματος (βλέπε κεφάλαιο B1. δομή και βιοσύνθεση αραβινογαλακτάνης). Ο ρόλος – κλειδί του DprE1 στη βιοσύνθεση του τοιχώματος, η υψηλή μεταβολική απόδοση (turn-over) του ενζύμου, η ύπαρξη νουκλεόφιλων κατάλοιπων στο ενεργό του κέντρο και η παρουσία του εσωτερικά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (δεν απαιτείται ενδοκυττάρια μεταφορά) το καθιστούν εξαιρετικό στόχο για την ανάπτυξη νεότερων αντιφυματικών [56].

B5.3.1. Βενζοθειαζόνες (Benzothiazones, BTZs), oral

Αποτελούν την πρώτη κατηγορία DprE1 αναστολέων που μελετήθηκε, μετά την ανακάλυψη τους σε whole cell phenotypic MIC screens [56]. Συνδέονται ομοιοπολικά με το ενεργό κέντρο του DprE1 και προκαλούν μη αντιστρεπτή αναστολή του ενζύμου [56]. Αποτελούν προφάρμακα, που ενεργοποιούνται με αναγωγή μιας αρωματικής νιτροομάδας του μορίου τους από τον μεταβολικό μηχανισμό του Mtb. Το αναχθέν (ενδιάμεσο) προϊόν που παράγεται (nitrosoarene intermediate) είναι το δραστικό μόριο, που αλληλοεπιδρά με ένα κατάλοιπο κυστίνης του ενεργού κέντρου του ενζύμου και αναστέλλει την δράση του [56]. Σημειώνουμε ότι ο μεταβολικός μηχανισμός του ανθρώπου δεν μπορεί να ενεργοποιήσει το φάρμακο και επομένως, η χορήγηση τους στον άνθρωπο είναι σχετικά ασφαλής [56]. Οι BTZs παρουσιάζουν ισχυρή βακτηριοκτόνο δράση σε

διάφορα πειραματικά μοντέλα όπως *in vivo* και *ex vivo* μοντέλα μουρέϊνης (οφείλεται, κυρίως, σε ενδοκυττάρια συσσώρευση του DPR, παρά σε αδυναμία βιοσύνθεσης του DPA), δεν προκαλούν ογκογένεση (negative Ames test for DNA mutagenesis) και προτείνονται για την θεραπεία της MDR/XDR-TB [56], [112]. Παρουσιάζουν συνεργική δράση με την βεδακιλίνη [56]. Το μόριο PTZ 169 / Macozinone (NCT03036163) αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα των BTZs, αναπτύσσεται από τον μη κερδοσκοπικό οργανισμό Innovative Medicine for TB Foundation – Im4TB (Lausanne, Switzerland) και βρίσκεται σε φάση I/II κλινικών δοκιμών [118]. Το *Mtb* ανέπτυξε αντοχή στις βενζοθειαζόνες, με μηχανισμό τροποποίησης του στόχου δράσης, μέσω σημειακής μετάλλαξης σε κατάλοιπο κυστίνης στη θέση 387 του DprE1 (Cys387Ser ή Cys387Gly) [115]. Σημειώνουμε ότι ο μηχανισμός αντοχής του *Mtb* στις νιτροιμιδαζόλες, μέσω αδρανοποίησης σε στάδιο προφαρμάκου, δεν προσφέρει διασταυρούμενη αντοχή στις βενζοθειαζόνες, επειδή ανάγονται από διαφορετικές νιτροαναγωγάσες.

B5.3.2. (1,4)-Αζαινδόλες (1,4-Azaindoles), oral

Αποτελούν την δεύτερη κατηγορία DprE1-αναστολέων και είναι παράγωγα της ιμιδαζοπυριδίνης (imidazopyridine) [56]. Ανακαλύφθηκαν, μέσω ενός scaffold-morphing approach, από την φαρμακευτική εταιρία AstraZeneca (Waltham, USA) και στη συνέχεια αναπτύσσονται από την ΜΚΟ Global TB Alliance [56]. Τα παράγωγα της ιμιδαζοπυριδίνης δεν παρουσίαζαν αρχικά βακτηριοκτόνο δράση, αλλά μετά από πολλαπλές τροποποιήσεις (multiple scaffold morphs) προέκυψαν οι αζαινδόλες με βελτιωμένες την βακτηριοκτόνο δράση και την μεταβολική σταθερότητα [56]. Αυτή η ομάδα μορίων (σε αντίθεση με τις BTZs) δεν συνδέεται ομοιοπολικά με το ενεργό κέντρο του DprE1, προκαλώντας αντιστρεπτή αναστολή του ενζύμου και εξηγεί γιατί δεν εμφανίζουν διασταυρούμενη αντοχή με τις BTZs, παρά τον κοινό στόχο δράσης [56]. Σημαντική παρενέργεια της δράσης τους αποτελεί η αναστολή της ανθρώπινης β-φωσφοδιεστεράσης (PDE6) των φωτοϋποδοχέων του ματιού και η απώλεια της όρασης μετά από παρατεταμένη χορήγηση (αντίστοιχη παρενέργεια εμφανίζει και η EMB) [56].

B5.3.3. Αναστολείς της *Mtb* βιομεμβράνης & TCA1, oral

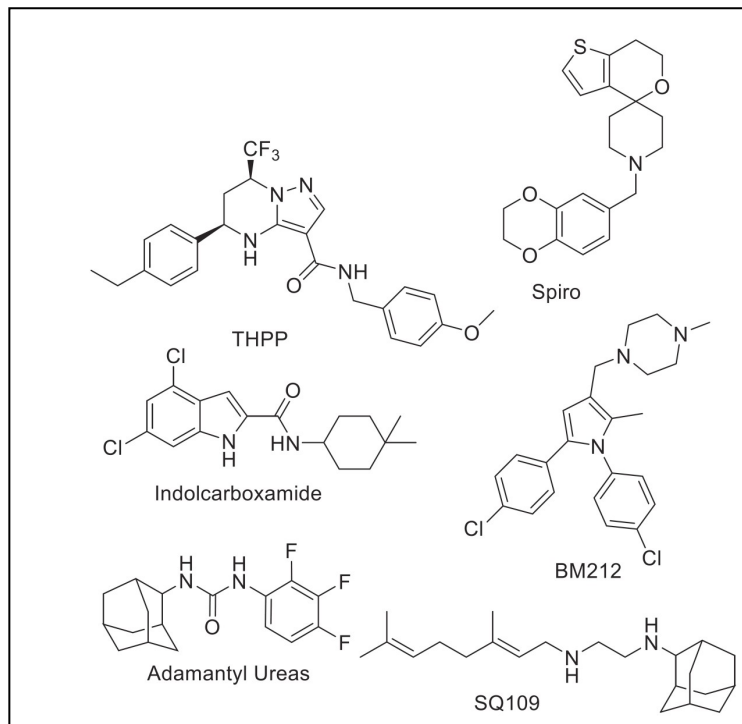
Μία τρίτη κατηγορία DprE1-αναστολέων ανακαλύφθηκε πρόσφατα, μέσω clever screen, από προσπάθειες που έγιναν για την εύρεση αναστολέων ανάπτυξης της μυκοβακτηριδιακής βιομεμβράνης (*Mtb* biofilm) [56]. Στην κατηγορία αυτή ανήκει το μόριο TCA1, με βακτηριοκτόνο δράση σε ευαίσθητα αλλά και ανθεκτικά στελέχη *Mtb*, τόσο σε ενεργό, όσο και σε λανθάνουσα φάση, ενώ, παράλληλα αναστέλλει την ανάπτυξη βιοφίλμ. Δεν παρατηρείται διασταυρούμενη αντοχή με τις BTZs, παρά τον κοινό στόχο δράσης (οι BTZs δεν παρουσιάζουν βακτηριοκτόνο δράση σε *Mtb* λαθροβιούντες μικροοργανισμούς) και αποτελεί πολλά υποσχόμενη επιλογή για την θεραπεία της MDR/XDR-TB. Η ιδιότητα του TCA1 να είναι δραστικό στα λαθροβιούντα μυκοβακτηρίδια, πιθανώς να οφείλεται σε αναστολή ενός δεύτερου στόχου δράσης, της πρωτεΐνης MoeW (involved in molybdenum cofactor biosynthesis), που εκφράζεται μόνο στο γονιδίωμα του *Mtb* (όχι των λοιπών μυκοβακτηριδίων ή των άλλων βακτηρίων) και είναι απαραίτητη για την αναγωγική δραστηριότητα σε καταστάσεις stress (υποξία, παρουσία οξειδίων του αζώτου), που σχετίζονται με λαθροβίωση [56].

B5.4. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΑΝΤΛΙΑΣ ΕΞΟΔΟΥ MmpL3 (MmpL3 Inhibitors)

Η αντλία εξόδου MmpL3 ανήκει στην MmpL (Mycobacterial membrane protein Large) οικογένεια πρωτεϊνών, που περιλαμβάνει μεμβρανικά συστήματα εξόδου μεταβολιτών του *Mtb*, από το κυτταρόπλασμα στον εξωκυττάριο χώρο [56]. Το γονιδίωμα του *Mtb* περιέχει 12 γονίδια που εκφράζουν τις πρωτεΐνες της MmpL οικογένειας, που με την σειρά της ανήκει στην RND (Resistance-Nodulation-Division) υπεροικογένεια πρωτεϊνών, με ρόλο απαραίτητο για την επιβίωση και λαθροβίωση του μικροοργανισμού [56]. Η MmpL3 είναι απαραίτητη για την έξοδο στον περιπλασματικό χώρο των μυκολικών οξέων ως μονοεστέρες τρεαλόζης και αναστολή της δράσης της συνεπάγεται αναστολή της βιοσύνθεσης του μυκοβακτηριδιακού τοιχώματος, αποτελώντας ελκυστικό στόχο για ανάπτυξη νεότερων αντιφυματικών [56].

B5.4.1. SQ109, oral

Πρόκειται για μία διαμίνη (diamine), ανάλογη της εθαμβουτόλης (EMB) και αποτελεί τον πλέον μελετημένο MmpL3 αναστολέα (μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε whole-cell phenotypic screens) [56]. Προέκυψε από την ανάγκη εύρεσης παράγοντα με βακτηριοκτόνο δράση ανώτερη της EMB (η EMB παρουσιάζει την μικρότερη βακτηριοκτόνο δράση από τα αντιφυματικά 1^{ης} γραμμής) [56]. Ολοκλήρωσε τη φάση 2, δύο κλινικών δοκιμών (NCT01785186, NCT01218217) και αναπτύσσεται από τις φαρμακευτικές εταιρίες Sequella Inc., USA και Infectex Ltd, Russia [118]. Εμφανίζει εντελώς νέο μηχανισμό δράσης, διαφορετικό της EMB (αναδρομική μελέτη σε SQ109 resistant mutants), που προκαλεί, αφενός, αδυναμία σύνδεσης των μυκολικών οξέων στην αραβινογαλακτάνη, λόγω άμεσης αναστολής της βιοσύνθεσης του TDM (σχοινοειδής παράγων) και αφετέρου, ενδοκυττάρια συσσώρευση του πρόδρομου μορίου TMM (μονομυκολική τρεαλόζη), λόγω αναστολής της λειτουργίας της αντλίας MmpL3 [112]. Είναι, επίσης, δραστικό τόσο σε λαθροβιούντα μυκοβακτηρίδια, που δεν χρειάζεται να βιοσυνθέσουν το κυτταρικό τους τοίχωμα, όσο και σε λοιπά βακτήρια και μύκητες, που δεν βιοσυνθέτουν μυκολικά οξέα, πιθανώς, μέσω άλλων μηχανισμών δράσης, όπως αναστολή της κυτταρικής αναπνοής ή της παραγωγής ATP [56]. Οι παραπάνω ιδιότητες δίνουν την δυνατότητα στο SQ109 να χορηγηθεί, τόσο για την θεραπεία της MDR-TB, όσο και για την θεραπεία λοιμώξεων από λοιπούς μικροοργανισμούς (βρίσκεται σε φάση 2 κλινικής δοκιμής για θεραπεία εκρίζωσης του *Helicobacter pylori* – NCT01252108) [118].



Εικόνα Β9.: Αναστολείς της αντλίας εξόδου MmpL3 – νεότερη τάξη αντιφυματικών με ποικιλία δομών (D.T.Hoagland et al., *A.D.D.R.*, 2016, 102:55-72).

-

B5.5. ΟΞΑΖΟΛΙΔΙΝΟΝΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΟΣΥΝΘΕΣΗΣ

Οι οξαζολιδιόνες αποτελούν αναστολείς της πρωτεϊνοσύνθεσης και συνδέονται στην περιοχή V (V-domain) του 23S rRNA (μονή αλυσος 2904 ριβονουκλεοτιδίων), τμήμα της μεγάλης υπομονάδας (50S) του ριβοσώματος.

B5.6.1. Λινεζολίδη (Linezolid), oral

Είναι συνθετικό αντιβιοτικό, ανήκει στην πρώτη γενιά της συγκεκριμένης τάξης και εισήλθε στην κλινική θεραπευτική το 2002, για την θεραπεία λοιμώξεων (κυρίως πνευμονικών) από ανθεκτικά GRAM(+) βακτήρια (MRSA, MRSE, VRE). Αναστέλλει την έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης και συνδέεται με την γουανίνη της θέσης 2576 της περιοχής V, του 23S rRNA, στη μεγάλη υπομονάδα (50S) του ριβοσώματος. Η θέση σύνδεσης της λινεζολίδης στο ριβόσωμα (G2576) είναι διαφορετική από τις θέσεις σύνδεσης των λοιπών αναστολέων της πρωτεϊνοσύνθεσης (π.χ. αμινογλυκοσίδες, τετρακυκλίνη, μακρολίδες) και, επομένως, δεν παρουσιάζει διασταυρούμενη ανοχή με αυτές τις τάξεις των

αντιβιοτικών. Εμφανίζει *in vivo* βακτηριοκτόνο δράση έναντι ανθεκτικών *Mtb* στελεχών (παρά, την *in vitro* και σε πειραματικά μοντέλα ποντικών μέτρια δράση της) και προτάσσεται άτυπα για την θεραπεία της MDR-TB [56]. Πρόσφατη μελέτη διαπίστωσε ύφεση στο 87% του συνόλου ασθενών με XDR-TB, μετά από εξαμηνιαία θεραπεία χορήγησης λινεζολίδης 300-600 mg ημερησίως, ενώ τέσσερις ασθενείς εμφάνισαν αντοχή στο αντιβιοτικό [112], [119]. Μειονέκτημα αποτελούν οι ποικίλες παρενέργειες της λινεζολίδης, όπως μυελοκαταστολή και κυτταροπενία (λόγω αναστολής της πρωτεϊνοσύνθεσης στα μιτοχόνδρια), γαστρεντερικές διαταραχές, ραβδομύλυση, οπτική και περιφερική νευροπάθεια, που περιορίζουν σημαντικά το διάστημα χορήγησης (< 2 εβδομάδων) και οδηγούν σε αναζήτηση νεότερων γενιών με ισχυρότερη δράση και ασφαλέστερο προφίλ [56].

B5.6.2. Τεδιζολίδη (Tedizolid), oral

Προφάρμακο με βακτηριοστατική δράση, που ενεργοποιείται από τις φωσφατάσες του ορού ή του εντέρου και αναστέλλει την πρωτεϊνοσύνθεση (50S υπομονάδα του ριβοσώματος) [112]. Μελέτη, που χορήγησε σχήμα Τεδιζολίδης και ACH-70 (isothiazoloquinolone) σε μολυσμένα, με ανθεκτικά στελέχη, THP-1 μακροφάγα, έδειξε σημαντική μείωση της ενδοκυττάριας ανάπτυξης των μυκοβακτηριδίων, ανάλογη της δράσης του σχήματος ριφαμπικίνης και μοξιφλοξασίνης [112], [120].

B5.6.3. Σουτεζολίδη (Sutezolid), oral

Ανήκει στις νεότερες οξαζολιδινόνες (δεύτερης γενιάς) και είναι ανάλογη της λινεζολίδης. Αναπτύσσεται από τις TB Alliance και Sequella Inc. (USA) και ολοκλήρωσε την φάση 2 κλινικών δοκιμών (NCT01225640) [118]. Χορηγείται από το στόμα (oral), σε μία δόση των 600mg ή 1200mg, ημερησίως και είναι σχετικά ασφαλής και καλά ανεκτή [121].

B5.6.4. Δελπαζολίδη (Delpazolid, LCB01-O371), oral

Νεότερη οξαζολιδινόνη, αναπτύσσεται από την LegoChem και βρίσκεται σε φάση 2 κλινικών δοκιμών (NCT02836483) [118].

B5.7. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ LEUCYL-tRNA ΣΥΝΘΑΣΗΣ (LeuRS-inhibitors), oral

Το ένζυμο της Leucyl-tRNA συνθάσης καταλύει την ATP-εξαρτώμενη ένωση της L-λευκίνης (Leu) με το tRNA και είναι απαραίτητο για την μετάφραση και την πρωτεϊνοσύνθεση [56]. Βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα των προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών κυττάρων (και στα μιτοχόνδρια), ως τμήμα συμπλέγματος πολυσυνθετασών (multisynthetase complex) και αλληλεπιδρά με την αργινίνη-tRNA-συνθάση, μέσω του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης. Οι αναστολείς της LeuRS είναι μικρά, υδρόφιλα μόρια, που παγιδεύουν, μέσω ομοιοπολικής σύνδεσης, το tRNA της LeuRS, περίπου 30 Å πιο μακριά από την ενεργή του θέση, αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση [56]. Παρουσιάζουν εκλεκτικότητα δράσης, επειδή η δομή της ενεργής θέσης σύνδεσης της LeuRS είναι μοναδική για κάθε είδος βακτηρίου [56]. Οι αναστολείς LeuRS (boron containing inhibitors) ανήκουν στις οξαμπορόλες (oxaboroles) και αναπτύσσονται τις Anacor Pharmaceuticals (Palo Alto) και GSK (Middlesex, UK) τόσο για μυκητιάσεις, όσο και βακτηριακές λοιμώξεις από GRAM(-) [56], [122], [123], [124]. Επίσης, ερευνάται η βακτηριοκτόνος δράσης τους, σε *in vivo* πειραματικά μοντέλα μωρεΐνης, τόσο σε οξεία TB, όσο και σε χρόνια TB, με θετικά αποτελέσματα σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (<10mg/kg/ημερησίως) [56]. Παράλληλα, εμφανίζουν καλή βιοδιαθεσιμότητα και καλή φαρμακοκινητική [56].

B5.8. ΕΜΒΟΛΙΑ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ ΣΕ ΣΤΑΔΙΑ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ

Η αύξηση των περιπτώσεων φυματίωσης παγκοσμίως, η εμφάνιση των ανθεκτικών μορφών της νόσου (MDR/XDR TB) καθώς και η περιορισμένη αποτελεσματικότητα του BCG εμβολίου σε ασθενείς με ανοσοκαταστολή ή χρόνιες παθήσεις (π.χ. σακχαρώδης διαβήτης) επιτάσσει την ανάγκη εξεύρεσης ενός νέου αποτελεσματικότερου εμβολίου, που θα καλύπτει επαρκώς τις παραπάνω περιπτώσεις και θα οδηγήσει την νόσο σε δραστικό περιορισμό ή και εξάλειψη. Ήδη από το 2000 δεκατέσσερα νέα εμβόλια για τη φυματίωση βρίσκονται σε διάφορα στάδια κλινικών δοκιμών και τριανταπέντε σε προκλινικές μελέτες, μεταξύ των οποίων το M.Vaccae, που ολοκλήρωσε την φάση 3 (phase III) κλινικών δοκιμών και ακόμη τρία που ολοκληρώνουν το δεύτερο στάδιο (phase IIb) της φάσης 2 (πίνακας B6.) Τα νέα εμβόλια χρησιμοποιούν, για να

ενισχύσουν την περιορισμένη αποτελεσματικότητα του BCG εμβολίου, διαφορετικές στρατηγικές ανοσοποίησης, και διακρίνονται σε α) εμβόλια “τύπου” Prime (VPM1002 & MTBVAC) – χρησιμοποιούν ζώντα, ανασυνδυασμένα στελέχη BCG (rBCG) ή γενετικά εξασθενημένα στελέχη *Mtb*, για περισσότερη ασφάλεια και αποτελεσματικότητα, β) εμβόλια “τύπου” Prime-boost (MVA85A/AERAS-485 & M72+AS01) – ενισχύουν (boost) την ανοσία απέναντι σε ειδικά αντιγόνα ανασυνδυασμένων στελεχών BCG (rBCG) ή γενετικών εξασθενημένων στελεχών *Mtb*, χρησιμοποιώντας ιϊκούς φορείς (viral vectors) ή εμβόλια υπομονάδας με ανοσοενισχυτικά (adjuvanted subunit vaccines). Αυτού του τύπου εμβόλια μπορούν να χορηγηθούν στη νεογνική ηλικία ή κατά την διάρκεια της εφηβείας για ενίσχυση της ανοσίας και γ) “θεραπευτικά εμβόλια” (*M. vaccae*), δηλαδή εμβόλια με θεραπευτικό χαρακτήρα, που συνεργούν με τα αντιφυματικά, για να μειώσουν τον χρόνο θεραπείας της ενεργού ή λανθάνουσας νόσου (immunotherapeutic vaccines) [125]. Επισημαίνουμε ότι τα εμβόλια που περιέχουν ζώντες εξασθενημένους ή αδρανοποιημένους μικροοργανισμούς επιτυγχάνουν καλύτερη ανοσοποίηση, σε σχέση με τα εμβόλια που περιέχουν κεκαθαρωμένα αντιγόνα. Μία άλλη στρατηγική ανοσοποίησης των νεότερων εμβολίων διερευνά την αποτελεσματικότητα της ενεργοποίησης της κυτταρικής ανοσίας, μέσω, κυρίως, των Th1 κυτοκινών (IFN γ , TNF α , IL-2), που παράγουν τα CD4 και CD8 T-λεμφοκύτταρα και αναστέλλουν την ανάπτυξη του *Mtb* [125]. Η στρατηγική αυτή διαφέρει των περισσότερων εμβολίων, που επιτυγχάνουν ενεργοποίηση της χυμικής ανοσίας, δηλαδή την παραγωγή αντισωμάτων από τα B-λεμφοκύτταρα.

B5.8.1. VPM1002 (Vakzine Projekt Management/VPM, GmbH, TBVI)

Ανήκει στα εμβόλια “τύπου” Prime και αποτελείται από ζώντα, ανασυνδυασμένα στελέχη BCG (rBCG), που υπερεκφράζουν συγκεκριμένα μυκοβακτηριδιακά αντιγόνα. Βρίσκεται σε φάση 2 (phase IIb) κλινικών δοκιμών (πίνακας B6), που εξετάζουν την αποτελεσματικότητα του εμβολίου σε νεογνά, HIV(-) και παρουσιάζει ασφαλές προφίλ και ανοσιακή απόκριση (δραστηριότητα CD4/CD8 T-λεμφοκυττάρων) ανάλογη ισοδύναμης δόσης BCG. Το VPM1002 αποτελεί ένα από τα λίγα εμβόλια υπό ανάπτυξη για νεογνά και βρέφη, καθώς η πλειοψηφία των υπολοίπων απευθύνεται σε εφήβους και ενήλικες, που απαρτίζουν την πλειονότητα

των περιπτώσεων TB. Εξετάζεται το ενδεχόμενο διεύρυνσης των μελετών και σε ομάδες νεογνών HIV(+) [125].

ΠΙΝΑΚΑΣ Β6. ΥΠΟΨΗΦΙΑ ΕΜΒΟΛΙΑ ΣΕ ΣΤΑΔΙΑ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ (*Global Report on Tuberculosis Vaccines, 2018*)

Discovery	Preclinical	Phase I	Phase IIa	Phase IIb	Phase III
Approximately 20 novel TB vaccine strategies in development, several R&D Partners, TBVI	rCMV Oregon Health and Sciences University, Vir Biotechnology, Aeras	MVA85A (ID, Aerosol) University of Oxford, TBVI	RUTI Archivel Pharma, TBVI	VPM1002 VPM, SII, MPIIB, TBVI	M.Vaccae AnHui Longcom
	H64 + CAF01 SSI, TBVI	ChAdOx1.85A MVA85A University of Oxford	H56 : IC31 [®] SSI, Valneva, Aeras	M72 + AS01E GSK, Aeras	
	rBCGΔais1/zmp1 University of Zurich, Aeras, TBVI	Ad5 Ag85A McMaster University, Can Sino	H4 : IC31 [®] SSI, Sanofi Pasteur, Aeras	DAR-901 Dartmouth University, Aeras	
	ChAdOxPPE15 University of Oxford, TBVI	MVA85A-IMX313 University of Oxford, Imaxio	ID93 + GLA-SE IDRI, Aeras		
	Therapeutic vaccine –MVA platform Transgene SA, TBVI		TB/FLU-04L Research Institute for Biological Safety Problems, Kazakhstan		
	CysVac2/Advax University Sydney, TBVI		MTBVAC Biofabri, University of Zaragoza, TBVI		
	ChAd3/MVA prime/boost - Aeras, GSK, Transgene				

Source: Discovery-Preclinical: TBVI. Phase I-III: TAG pipeline report, Aeras clinical TB vaccine pipeline, updated September 2017

B5.8.2. MTBVAC (University of Zaragoza & Biofabri, Spain, TBVI)

Ανήκει στα εμβόλια “τύπου” Prime που αποτελούνται από ζώντα, γενετικά εξασθενημένα στελέχη Mtb, το γονιδίωμα των οποίων στερείται (deletion of genes) δύο λοιμογόνων γονιδίων (*phoP* & *fadD26*). Βρίσκεται σε φάση 2 (phase IIa) κλινικής δοκιμής (πίνακας Β6.) που εξετάζει την αποτελεσματικότητα του εμβολίου σε νεογνά HIV(-) σε σχέση με το BCG. Το MTBVAC και το VPM1002 είναι από τα λίγα “υπό ανάπτυξη” εμβόλια για νεογνά και βρέφη, αλλά, σε αντίθεση με το VPM1002, επειδή είναι εμβόλιο ζώντων μικροοργανισμών, δεν συνιστάται η πειραματική χορήγησή του σε νεογνά και βρέφη HIV(+) [125].

B5.8.3. MVA85A/AERAS-485 (University of Oxford, TBVI)

Ανήκει στα εμβόλια “τύπου” Prime Boost και αποτελείται από ανασυνδυασμένο στέλεχος του γενετικά τροποποιημένου ιού Ankara (virus Ankara/MVA), που εκφράζει το *Mtb* αντιγόνο Ag85A. Το MVA85A επιχειρεί να ενισχύσει την ανοσία σε εμβολιασθέντες με BCG πληθυσμούς, που φέρουν ανοσιακή μνήμη του αντιγόνου Ag85A. Τα πρώτα αποτελέσματα σε μελέτες ζώων ήταν ενθαρρυντικά όσον αφορά τα επίπεδα παραγωγής Th1 κυτοκινών (IFN γ , TNF α , IL-2), από ενεργοποίηση των CD4 T-λεμφοκυττάρων, μετά την έκθεση στο αντιγόνο Ag85A. [125], [126]. Παρόλα αυτά, κλινική δοκιμή (phase Ib, 2012) σε ομάδα 2794 BCG εμβολιασθέντων, HIV(-), νεογνών (4–6 μηνών) απέτυχε να αποδείξει την αποτελεσματικότητα του εμβολίου για προφύλαξη από *Mtb* λοίμωξη (-3,8%) και προστασία από TB νόσο (17,3%) [125], [127]. Δεύτερη κλινική μελέτη (phase Ib), στη Νότια Αφρική και τη Σενεγάλη, επιχειρεί να μελετήσει την αποτελεσματικότητα του MVA85A σε ομάδα BCG εμβολιασθέντων ενηλίκων, HIV(+) [125], [128].

B5.8.4. M72 +AS01 (GSK, Aeras)

Ανήκει στα εμβόλια “τύπου” Prime Boost και αποτελείται από δύο *Mtb* αντιγόνα (32A & 39A) και τον ανοσοενισχυτικό παράγοντα AS01. Το εμβόλιο εμφανίζει ασφαλές προφίλ (κλινικές μελέτες, φάση I/IIa) και φαίνεται να διεγείρει την ενεργοποίηση διαφορετικών πληθυσμών T-λεμφοκυττάρων (CD4/CD8 & Treg cells) με επακόλουθη παραγωγή κυτοκινών (Th1, Th17) σε ικανοποιητικά επίπεδα [125], [129]. Άλλες τρεις κλινικές μελέτες (φάση IIa) εξετάζουν την αποτελεσματικότητα του σε διαφορετικούς πληθυσμούς, ομάδα νεογνών από την Γκάμπια, ομάδα ενηλίκων, HIV(+) από την Ινδία και ομάδες TB ασθενών από τη Ταϊλάνδη και την Εστωνία [125], [130].

B5.8.5. MYCOBACTERIUM VACCINAE (AnHui Longcom, China)

Ανήκει στα εμβόλια “θεραπευτικού τύπου”, που επιδιώκει να συντομεύσει τον χρόνο θεραπείας της πνευμονικής TB. Βρίσκεται σε φάση 3 κλινικών δοκιμών από την Κινέζικη φαρμακευτική εταιρία, αλλά έχουν διατυπωθεί ενστάσεις για την αποτελεσματικότητά του (Cochrane Collaboration review, 2003) [131], [132].

Σημαντικοί περιορισμοί στην ανάπτυξη των νεότερων εμβολίων παραμένουν η ανεπαρκής γνώση της ανοσιακής απόκρισης που επιτάσσει μακράς διάρκειας κλινικές δοκιμές και οι ελλειματικοί πόροι, που δεν επιτρέπουν την παράλληλη έρευνα στα λιγιστά εξειδικευμένα ερευνητικά κέντρα.

B6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας τα δεδομένα της παρούσας εργασίας επισημαίνουμε ως κυριότερα σημεία:

1. την επείγουσα ανάγκη αντιμετώπισης της Φυματίωσης, που αναδείχθηκε σε μείζον πρόβλημα της παγκόσμιας υγείας, προσβάλλοντας το 1/3 του συνολικού πληθυσμού της γης,

2. την αδυναμία των νεότερων διαγνωστικών μεθόδων να ανιχνεύσουν TB λοίμωξη σε ειδικούς πληθυσμούς και να διαχωρίσουν ενεργό από λανθάνουσα νόσο,

3. την ανάπτυξη *Mtb* αντοχής στα νεότερα αντιφυματικά (βεδακιλίνη, δελαμανίδη), που προέκυψαν από πρόσφατες μελέτες της δομής και βιοσύνθεσης του μυκοβακτηριδιακού τοιχώματος,

4. την αύξηση των περιπτώσεων ανθεκτικής νόσου (MDR/XDR-TB) και τη δυσχέρεια θεραπευτικής αντιμετώπισης,

5. την ελλιπή γνώση της ανοσιακής απόκρισης στη λοίμωξη, που περιορίζει την ανάπτυξη αποτελεσματικών εμβολίων και παρατείνει τη διάρκεια των κλινικών δοκιμών, αυξάνοντας τις δαπάνες,

6. την ανάγκη εξεύρεσης πόρων για περαιτέρω έρευνα, την ανάγκη διεύρυνσης της συνεργασίας ερευνητικών κέντρων και φαρμακευτικών εταιριών και την ανάγκη ενημέρωσης της παγκόσμιας κοινότητας και εφαρμογής των προγραμμάτων ελέγχου και περιορισμού της νόσου.

Η μελέτη παράπλευρων πεδίων, όπως η χρήση των mi-RNAs ως βιοδείκτες διάγνωσης και θεραπείας TB, η γνώση των μηχανισμών ενεργοποίησης της ανοσιακής απόκρισης σε TB λοίμωξη, ο ρόλος του μικροβιώματος και των γενετικών πολυμορφισμών ξενιστή-μικροοργανισμού στην εξέλιξη της νόσου αναμένεται να συμβάλλει ουσιαστικά στην αποτελεσματικότερη διάγνωση και θεραπεία.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] *K. Manchester, Tuberculosis and Leprosy in Antiquity: an interpretation, Medical History, (1984), 28:162-173*
- [2] *Κ. Μόσχου, Το σανατόριο “Ζωοδόχος Πηγή” και ο ιδρυτής του, ιατρός Γεώργιος Καραμάνης, 2002–2003*
- [3] *Σ. Ράπτης, Εσωτερική Παθολογία, (1998), 1(10):423-426*
- [4] *Α. Αντωνιάδης κ.α., Ιατρική Μικροβιολογία, (2005), 2(13):145-157*
- [5] *Γ. Βρυώνη κ.α. Παγκόσμια Ημέρα Φυματίωσης, 24 Μαρτίου: “Εξάλειψη της Φυματίωσης: όλοι μαζί μπορούμε”! Τελευταίες για την τεκμηριωμένη διάγνωση της Φυματίωσης, (2010), ΔΕΜΕ, 50(2):103-106.*
- [6] *RM. Anthony et al. Light emitting diodes for auramine O fluorescence microscope screening of Mtb, (2006), Int. J. Tuberc. Lung Dis. 10:1060-1062.*
- [7] *B.J. Marais et al. Use of Light emitting diode fluorescence microscope to detect acid-fast bacilli in sputum, (2008), Clin. Infect. Dis., 47:203-207.*
- [8] *Α. Αρσένη, Εξετάσεις των υγρών του σώματος, Γενικές Εξετάσεις & Καλλιέργειες, (2000), 5:184-200*
- [9] *Σ. Μαμούχα κ.α. Εργαστηριακή διερεύνηση λοιμώξεων από μυκοβακτηρίδια σε τριτοβάθμιο Νοσοκομείο-αποτελέσματα πέντε ετών (2005-2009), (2010), ΔΕΜΕ, 50(2):133-141.*
- [10] *World Health Organization. Report on conclusions and recommendations. Strategic and Technical Advisory Group for tuberculosis, Geneva: WHO, 2007.*
- [11] *Brennan PJ, Nikaido H., The envelope of mycobacteria, Annu Rev Biochem. (1995), 64:29-63.*
- [12] *Brennan PJ., Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis., Tuberculosis (Edinb), 2003; 83(1-3):91-97.*
- [13] *Francois Jehl et al., από το αντιβιογράμμα στη συνταγογραφία, Biomerieux.*
- [14] *Delphi Chatterjee, Cynthia M. Bozic, Michael McNeilS, and Patrick J. Brennan Structural Features of the Arabinan Component of the*

Lipoarabinomannan of Mycobacterium tuberculosis THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (1991), 266(15):9652-9660.

[15] Sebabrata Mahapatra, Dean C. Crick & Patrick J. Brennan, Comparison of the UDP-N-Acetylmuramate: L-Alanine Ligase Enzymes from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae*, *J Bacteriol.* 2000 Dec; 182(23):6827–6830.

[16] Sebabrata Mahapatra, Hataichanok Scherman, Patrick J. Brennan, and Dean C. Crick*, N Glycolylation of the Nucleotide Precursors of Peptidoglycan Biosynthesis of *Mycobacterium* spp. Is Altered by Drug Treatment, *J Bacteriol.* 2005 Apr; 187(7): 2341–2347.

[17] Jon B. Raymond‡§, Sebabrata Mahapatra¶, Dean C. Crick¶, and Martin S. Pavelka, Jr.‡ Identification of the *namH* Gene, Encoding the Hydroxylase Responsible for the N-Glycolylation of the Mycobacterial Peptidoglycan THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 280, No. 1, Issue of January 7, pp. 326–333, 2005

[18] J M Ghuyssen, Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism., *Bacteriol Rev.* 1968 Dec; 32(4 Pt 2): 425–464.

[19] J.F.Petit et al., Chemical structure of the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. I — Isolation and partial characterization of the peptidoglycan, *Biochemical and Biophysical Research Communications* Volume 35, Issue 4, 22 May 1969, Pages 478–485.

[20] Wietzerbin-Falzspan, J., Das, B. C., Azuma, I., Adam, A., Petit, J.-F. & Lederer, E. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40, 5

[21] Luke J. Alderwick, James Harrison, Georgina S. Lloyd, and Helen L. Birch, The Mycobacterial Cell Wall—Peptidoglycan and Arabinogalactan, *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015;5:a021113.

[22] Waldemar Vollmer and Joachim-Volker Holtje‡, The Architecture of the Murein (Peptidoglycan) in Gram-Negative Bacteria: Vertical Scaffold or Horizontal Layer(s)?‡, *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, Sept. 2004, p. 5978–5987

- [23] Ji-Young Kim et al., *Noncanonical Autophagy Promotes the Visual Cycle*, *Cell* 154, 365–376, July 18, 2013.
- [24] Maia K. Schoonmaker, William R. Bishai, Gyanu Lamichhane, *Nonclassical Transpeptidases of Mycobacterium tuberculosis Alter Cell Size, Morphology, the Cytosolic Matrix, Protein Localization, Virulence, and Resistance to β -Lactams*, *Journal of Bacteriology* p. 1394–1402 April 2014 Volume 196 Number 7.
- [25] McNeil MR, Daffé M, Brennan PJ (1990) Evidence for the nature of the link between arabinogalactan and peptidoglycan of mycobacterial cell walls., *J Biol Chem* 265: 18200–18206
- [26] Parikh A, et al. PknB-mediated phosphorylation of a novel substrate, N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase, modulates its acetyltransferase activity. *J Mol Biol* 386: 451–464
- [27] Li X, Yang Y, Zhou F, Zhang Y, Lu H, et al., *SLC11A1 (NRAMP1) Polymorphisms and Tuberculosis Susceptibility: Updated Systematic Review and MetaAnalysis*, journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0015831
- [28] Zhang W, Jones VC, Scherman MS, Mahapatra S, Crick D, Bhamidi S, Xin Y, McNeil MR, Ma Y (2008) Expression, essentiality, and a microtiter plate assay for mycobacterial *GlmU*, the bifunctional glucosamine, *Int J Biochem Cell Biol* 40:2560–2571
- [29] De Smet KAI, Kempell KE, Gallagher A, Duncan K, Young DB., *Alteration of a single amino acid residue reverses fosfomycin resistance of recombinant MurA from Mycobacterium tuberculosis*, *Microbiology* (1999), 145, 3177–3184
- [30] Kumar V, Saravanan P, Arvind A, Mohan CG. 2011. Identification of hotspot regions of MurB oxidoreductase enzyme using homology modeling, molecular dynamics and molecular docking techniques., *J Mol Model* 17: 939–953.

- [31] Hett EC, Chao MC, Rubin EJ. 2010. Interaction and modulation of two antagonistic cell wall enzymes of mycobacteria. *PLoS Pathog* 6: e1001020.
- [32] Maria-Magdalena Patru, Martin S Pavelka A Role for the Class A Penicillin, *Journal of bacteriology* • June 2010.
- [33] Misaki A, Yukawa S. 1966. Studies on cell walls of mycobacteria. II. Constitution of polysaccharides from BCG cell walls. *J Biochem (Tokyo)* 59: 511–520.
- [34] Azuma I, Kimura H, Niinaka T, Aoki T, Yamamura Y. 1968. Chemical and immunological studies on mycobacterial polysaccharides. 1. Purification and properties of polysaccharides from human tubercle bacilli. *J Bacteriol* 95:263–271.
- [35] Kanetsuna F. 1968. Chemical analyses of mycobacterial cell walls. *Biochim Biophys Acta* 158: 130–143.
- [36] Kanetsuna F, Imaeda T, Cunto G. 1969. On the linkage between mycolic acid and arabinogalactan in phenol-treated mycobacterial cell walls. *Biochim Biophys Acta* 173: 341–344.
- [37] Amar, C. & Vilkas, E. (1973). (Isolation of arabinose phosphate from the walls of *Mycobacterium tuberculosis* H 37 Ra) *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 277, 1949-1951.
- [38] McNeil M, Wallner SJ, Hunter SW, Brennan PJ. 1987. Demonstration that the galactosyl and arabinosyl residues in the cell-wall arabinogalactan of *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium tuberculosis* are furanoid. *Carbohydr Res* 166: 299–308.
- [39] Ma Y, Mills JA, Belisle JT, Vissa V, Howell M, Bowlin K, Scherman MS, McNeil M. 1997. Determination of the pathway for rhamnose biosynthesis in mycobacteria: Cloning, sequencing and expression of the *Mycobacterium tuberculosis* gene encoding α -D-glucose-1-phosphate thymidyltransferase. *Microbiology* 143: 937–945.
- [40] Ma Y, Stern RJ, Scherman MS, Vissa VD, Yan W, Jones VC, Zhang F, Franzblau SG, Lewis WH, McNeil MR. 2001. Drug targeting *Mycobacterium*

tuberculosis cell wall synthesis: Genetics of dTDP-rhamnose synthetic enzymes and development of a microtiter plate-based screen for inhibitors of conversion of dTDP-glucose to dTDP-rhamnose. Antimicrob Agents Chemother 45: 1407–1416.

[41] Li W, Xin Y, McNeil MR, Ma Y. 2006. *rmlB and rmlC genes are essential for growth of mycobacteria. Biochem Biophys Res Commun 342: 170–178.*

[42] Jin Y, Xin Y, Zhang W, Ma Y. 2010. *Mycobacterium tuberculosis Rv1302 and Mycobacterium smegmatis MSMEG_4947 have WecA function and MSMEG_4947 is required for the growth of M. smegmatis. FEMS Microbiol Lett 310: 54–61.*

[43] Lemaire HG, Muller-Hill B. 1986. *Nucleotide sequences of the gal E gene and the gal T gene of E. coli. Nucleic Acids Res 14: 7705–7711.*

[44] Weston A, Stern RJ, Lee RE, Nassau PM, Monsey D, Martin SL, Scherman MS, Besra GS, Duncan K, McNeil MR. 1997. *Biosynthetic origin of mycobacterial cell wall galactofuranosyl residues. Tuber Lung Dis 78: 123–131.*

[45] Pan F, Jackson M, Ma Y, McNeil M. 2001. *Cell wall core galactofuran synthesis is essential for growth of mycobacteria. J Bacteriol 183: 3991–3998.*

[46] Wolucka BA, McNeil MR, de Hoffmann E, Chojnacki T, Brennan PJ. 1994. *Recognition of the lipid intermediate for arabinogalactan/arabinomannan biosynthesis and its relation to the mode of action of ethambutol on mycobacteria. J Biol Chem 269: 23328–23335.*

[47] Xin Y, Lee RE, Scherman MS, Khoo KH, Besra GS, Brennan PJ, McNeil M. 1997. *Characterization of the in vitro synthesized arabinan of mycobacterial cell walls. Biochim Biophys Acta 1335: 231–234.*

[48] Alderwick LJ, Radmacher E, Seidel M, Gande R, Hitchen PG, Morris HR, Dell A, Sahm H, Eggeling L, Besra GS. 2005. *Deletion of Cg emb in Corynebacteriaceae leads to a novel truncated cell wall arabinogalactan, whereas inactivation of Cg-ubiA results in an arabinan-deficient mutant with a cell wall galactan core. J Biol Chem 280:32362–32371.*

[49] Grover S, Alderwick LJ, Mishra AK, Krumbach K, Marienhagen J, Eggeling L, Bhatt A, Besra GS. 2014. *Benzothiazinones mediate killing of*

Corynebacterineae by blocking decaprenyl phosphate recycling involved in cell wall biosynthesis. *J Biol Chem* 289: 6177-6187.

[50] Larrouy-Maumus G, Skovierova H, Dhouib R, Angala SK, Zuberogoitia S, Pham H, Villela AD, Mikusova K, Noguera A, Gilleron M, et al. 2012. A small multidrug resistance-like transporter involved in the arabinosylation of arabinogalactan and lipoarabinomannan in mycobacteria. *J Biol Chem* 287: 39933–39941.

[51] Hedia Marrakchi, Marie-Antoinette Laneelle and Mamadou Daffe, *Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond*, *Cell *Chemistry & Biology* (2014), 21:67-80

[52] Pawelczyk J, Kremer L. *The Molecular Genetics of Mycolic Acid Biosynthesis*, (2014), 29 p 611-631, In Hatfull G, Jacobs W (ed), *Molecular Genetics of Mycobacteria, Second Edition*.

[53] Mikusova K, Huang H, Yagi T, Holsters M, Vereecke D, D’Haeze W, Scherman MS, Brennan PJ, McNeil MR, Crick DC. 2005. Decaprenylphosphoryl arabinofuranose, the donor of the D-arabinofuranosyl residues of mycobacterial arabinan, is formed via a two-step epimerization of decaprenylphosphoryl ribose. *J Bacteriol* 187: 8020–8025.

[54] Sebastian M. Gygli et al. *Antimicrobial resistance in Mycobacterium tuberculosis: mechanistic and evolutionary perspectives FEMS Microbiology Reviews*, fux011, 41, 2017, 354-373

[55] da Silva Rabello MC, Matsumoto CK, de Almeida LGP et al. *First description of natural and experimental conjugation between mycobacteria mediated by a linear plasmid. PLoS One* 2012;7:1–8.

[56] Daniel T. Hoagland, Jiuyu Liua, Robin B. Lee a, Richard E. Lee a, *New agents for the treatment of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis Advanced Drug Delivery Reviews* 102 (2016) 55–72

[57] Π. Ιωαννίδης κ.α., *Μοριακές τεχνικές για την ανίχνευση αντοχής του Mtb στα δύο πρωτεύοντα αντιφυματικά INH και RIF: η εμπειρία του EKAM*, (2010), *ΔΕΜΕ*, 50(2):175-182.

- [58] Mailaender C, Reiling N, Engelhardt H et al. The MspA porin promotes growth and increases antibiotic susceptibility of both *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* 2004;150:853–64.
- [59] Danilchanka O, Sun J, Pavlenok M et al. An outer membrane channel protein of *Mycobacterium tuberculosis* with exotoxin activity. *P Natl Acad Sci USA* 2014;111:6750–5.
- [60] Chambers HF, Moreau D, Yajko D et al. Can penicillins and other beta-lactam antibiotics be used to treat tuberculosis? *Antimicrob Agents Ch* 1995;39:2620–4.
- [61] Hugonnet J-E, Tremblay LW, Boshoff HI et al. Meropenem-clavulanate is effective against extensively drugresistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* (80-) 2009; 323:1215–8.
- [62] Payen MC, De Wit S, Martin C et al. Clinical use of the meropenem-clavulanate combination for extensively drugresistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung D* 2012;16:558–60.
- [63] Zaunbrecher MA, Sikes RD, Metchock B et al. Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase *eis* confers kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *P Natl Acad Sci USA* 2009;106:20004–9.
- [64] Houghton JL, Green KD, Pricer RE et al. Unexpected N-acetylation of capreomycin by mycobacterial *Eis* enzymes. *J Antimicrob Chemoth* 2013;68:800–5.
- [65] Kambli P, Ajbani K, Nikam C et al. Correlating *rrs* and *eis* promoter mutations in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* with phenotypic susceptibility levels to the second-line injectables. *Int J Mycobacteriol* 2016;5:1–6.
- [66] Warriar T, Kapilashrami K, Argyrou A et al. N-methylation of a bactericidal compound as a resistance mechanism in *Mycobacterium tuberculosis*. *P Natl Acad Sci USA* 2016;113:E4523–30.

- [67] Buriankova K, Doucet-Populaire F, Dorson O et al. Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Antimicrob Agents Ch* 2004;48:143–50.
- [68] Madsen CT, Jakobsen L, Buriankova K et al. Methyltransferase Erm(37) slips on rRNA to confer atypical resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 2005;280:38942–7.
- [69] Paulsen IT, Chen J, Nelson KE et al. Comparative genomics of microbial drug efflux systems. *J Mol Microb Biotech* 2001;3:145–50.
- [70] Louw GE, Warren RM, Gey van Pittius NC et al. A balancing act: efflux/influx in mycobacterial drug resistance. *Antimicrob Agents Ch* 2009;53:3181–9.
- [71] Louw GE, Warren RM, Gey van Pittius NC et al. Rifampicin reduces susceptibility to ofloxacin in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* through efflux. *Am J Resp Crit Care* 2011;184:269–76.
- [72] da Silva PEA, von Groll A, Martin A et al. Efflux as a mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunol Med Mic* 2011;63:1–9.
- [73] Gupta AK, Katoch VM, Chauhan DS et al. Microarray analysis of efflux pump genes in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* during stress induced by common antituberculous drugs. *Microb Drug Resist* 2010;16:21–8.
- [74] Adams KN, Takaki K, Connolly LE et al. Drug tolerance in replicating mycobacteria mediated by a macrophage-induced efflux mechanism. *Cell* 2011;145:39–53.
- [75] Li G, Zhang J, Guo Q et al. Efflux pump gene expression in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *PLoS One* 2015;10:e0119013.
- [76] Anthony Malinga L, Stoltz A. Efflux pump mediated second-line tuberculosis drug resistance. *Mycobacterial Dis* 2016;6, DOI: 10.4172/2161-1068.1000222.

- [77] Lamichhane G, Tyagi S, Bishai WR. Designer arrays for defined mutant analysis to detect genes essential for survival of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse lungs. *Infect Immun* 2005;73:2533–40.
- [78] Somoskovi A, Bruderer V, Hömke R, Bloemberg GV, Böttger EC. A mutation associated with clofazimine and bedaquiline cross-resistance in MDR-TB following bedaquiline treatment. *Eur Respir J*. 2014 published online Oct 30. DOI:10.1183/09031936.00142914.
- [79] Andries K, Villellas C, Coeck N, et al. Acquired resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to bedaquiline. *PLoS One*. 2014;9:e102135.
- [80] Milano A, PascaMR, Proveddi R et al. Azole resistance in *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by the *MmpS5–MmpL5* efflux system. *Tuberculosis* 2009;89:84–90.
- [81] Hartkoorn RC, Uplekar S, Cole ST. Cross-resistance between clofazimine and bedaquiline through upregulation of *MmpL5* in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Ch* 2014;58:2979–81.
- [82] Bloemberg GV, Keller PM, Stucki D et al. Acquired resistance to bedaquiline and delamanid in therapy for tuberculosis. *N Engl J Med* 2015;373:1986–8.
- [83] Σ. Καναβάκη κ.α. Η μικροβιολογική διάγνωση της ενεργούς φυματίωσης στα παιδιά: η εμπειρία του ΕΚΑΜ, (2010), ΔΕΜΕ, 50(2):157-168.
- [84] ΚΕΕΛΠΝΟ Κατευθυντήριες οδηγίες για τη θεραπεία της φυματίωσης στους ενήλικες, Αθήνα, ΚΕΕΛΠΝΟ 2014.
- [85] ΚΕΕΛΠΝΟ Κατευθυντήριες οδηγίες για τη διάγνωση και αντιμετώπιση της φυματίωσης-HIV λοίμωξης, Αθήνα, ΚΕΕΛΠΝΟ 2014.
- [86] Σ. Μαμούχα κ.α., Προσδιορισμός και διαγνωστική αξία των επιπέδων της απαμινάσης της αδενοσίνης στη φυματίωση (2010), ΔΕΜΕ, 50(2):125-132.
- [87] R. Krenke et al. Pleural fluid adenosine deaminase and interferon Gamma as diagnostic toolw in tuberculous pleurisy. *J Physiol Phaemacol* 2008, 59(6):349-360

- [88] O.J. Cordero, F.J. Salgado, M. Nogueira Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2 in biological fluids *Eur Respir J* 1997; 10: 2186–2187 DOI: 10.1183/09031936.97.10092186
- [89] M. Lamsal et al Diagnostic utility of adenosine deaminase (ADA) activity in pleural fluid and serum of tuberculous and non-tuberculous respiratory disease patients. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* 38(2):363-9 · April 2007
- [90] M. Ghanei et al. Simple Method for Rapid Diagnosis of Tuberculosis Pleuritis: A Statistical Approach *Asian cardiovascular & thoracic annals* 12(1):23-9 · April 2004
- [91] K. Baba et al. Adenosine Deaminase Activity Is a Sensitive Marker for the Diagnosis of Tuberculous Pleuritis in Patients with Very Low CD4 Counts *PLoS One*. 2008; 3(7): e2788.
- [92] Hsu WHI, Chiang CD, Huang PL. Diagnostic value of pleural adenosine deaminase in tuberculous effusions of immunocompromised hosts. *J Formos Med Assoc.* 1993 Jul;92(7):668-70.
- [93] RS Kashyap et al. Cerebrospinal fluid adenosine deaminase activity: A complimentary tool in the early diagnosis of tuberculous meningitis *Cerebrospinal Fluid Res.* 2006; 3: 5.
- [94] Fernandez-Rodriguez CMI, Perez-Arguelles BS, Ledo L, Garcia-Vila LM, Pereira S, Rodriguez-Martinez D Ascites adenosine deaminase activity is decreased in tuberculous ascites with low protein content. *Am J Gastroenterol.* 1991 Oct;86(10):1500-3
- [95] A. Halvani, F. Binesh Adenosine Deaminase Activity in Bronchoalveolar Lavage Fluid in Patients with Smear-Negative Pulmonary TB, (2008) *Tanaffos* 7:45–49.
- [96] Dimakou, Hillas & Bakakos (2009) Dimakou K, Hillas G, Bakakos P. Adenosine deaminase activity and its isoenzymes in the sputum of patients with pulmonary tuberculosis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease.* 2009;13:744–748.

- [97] Δ. Παπαβέντσος κ.α., Μέθοδοι ανίχνευσης παραγωγής ιντερφερόνης-γ στη διάγνωση της φυματίωσης, (2010), ΔΕΜΕ, 50(2):109-121.
- [98] E. Lee, RS Holzman, *Evolution and current use of the tuberculin test*, (2002), *Clin. Infect. Dis.* 34:365-370.
- [99] A. Lalvani, *Spotting latent infection: the path to better tuberculosis control*, (2003), *Thorax* 58:916-918.
- [100] Al. Sorensen et al. *Purification and characterization of a low-molecular-mass antigen secreted by Mycobacterium tuberculosis*, (1995) *Infect Immun* 63:1710–1717.
- [101] Pai, M. *Guidelines on IGRAs: concordant or discordant. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease 2010 Vol.14 No.6, Supplement 1 pp.S64-S67*
- [102] S Greco, E Girardi, A Navarra, C Saltini *Current evidence on diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis Thorax 2006;61:783–790.*
- [103] Olga L. Sarmiento et al. *Assessment by Meta-Analysis of PCR for Diagnosis of Smear-Negative Pulmonary Tuberculosis JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, July 2003, p. 3233–3240.*
- [104] Madhukar Pai, Laura L Flores, Alan Hubbard, Lee W Riley & John M Colford Jr *Nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculous pleuritis: a systematic review and meta-analysis BMC Infectious Diseases volume 4, Article number: 6 (2004)*
- [105] J Dinnes, J Deeks, H Kunst, A Gibson, E Cummins, N Waugh, F Drobniewski, and A Lalvani. *A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection Health Technol Assess 2007; 11:1-196.*
- [106] C. Green et al. *Rapid diagnosis of tuberculosis through the detection of mycobacterial DNA in urine by nucleic acid amplification methods Lancet Infectious Diseases, (2009), 9(8):505-511.*

- [107] CC. Boehme et al. *Operational Feasibility of Using Loop-Mediated Isothermal Amplification for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Microscopy Centers of Developing Countries*, *J Clin Microbiol* (2007), 45:1936-1940.
- [108] BD Pandey et al. *Development of an in-house loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of Mycobacterium tuberculosis and evaluation in sputum samples of Nepalese patients*. *J Med Microbiol* (2008), 57:439-443.
- [109] WHO. *Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk with multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) policy statement*. Geneva, Switzerland: WHO 2008.
- [110] M Morgan, S Kalantri, L Flores, and M Pai. *A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis: a systematic review and meta-analysis*. *BMC Infect Dis* 2005;5:62.
- [111] Naveed Sabir et al. *miRNAs in Tuberculosis: New Avenues for Diagnosis and Host-Directed Therapy*. *Frontiers in Microbiology* (2018) 9(602):1-14.
- [112] Harish Thanu Subramanian, Meena Kumari K, and Amberkar Mohan Babu V *Newer Drugs and Targets in Tuberculosis*. May–June 2016 *RJPBCS* 7(3) Page No. 831
- [113] Tummino PJI, Copeland RA. *Residence time of receptor-ligand complexes and its effect on biological function*. *Biochemistry*. 2008 May 20;47(20):5481-92.
- [114] WHO, *ANTIBACTERIAL AGENTS IN CLINICAL DEVELOPMENT An analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis*, WHO 2017, p26-27.
- [115] Jineetkumar Gawad, Chandrakant Bonde *Current Affairs, Future Perspectives of Tuberculosis and Antitubercular Agents Indian Journal of tuberculosis* (2018) 65:15-22.
- [116] Villemagne B, Crauste C, Flippe M, et al. *Tuberculosis: the drug development pipeline at a glance*. *Eur J Med Chem*. 2012;51:1-16.
- [117] Diacon AH, Dawson R, von Groote-Bidlingmaier F, Symons G, Venter A, Donald P R, et al. *The Lancet* 2012;380(9846) :986-993.

- [118] *WHO 2018 Update of antibacterial agents in clinical development*, 2018.
- [119] Lee M, Lee J, Carroll MW, Choi H, Min S, Song T, et al. *N Engl J Med* 2012; 367(16) : 1508-1518.
- [120] Molina-Torres CA, Barba-Marines A, Valles-Guerra O, Ocampo-Candiani J, Cavazos-Rocha N, Pucci MJ, et al. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2014; 13:13.
- [121] D'Ambrosio L, Centis R, Sotgiu G, Pontali E, Spanevello A, Migliori G B. *ERJ Open Research* 2015; 1(1):00010-2015.
- [122] F.L. Rock, W. Mao, A. Yaremchuk, M. Tukalo, T. Crépin, H. Zhou, Y.-K. Zhang, V. Hernandez, T. Akama, S.J. Baker, J.J. Plattner, L. Shapiro, S.A. Martinis, S.J. Benkovic, S. Cusack, M.R.K. Alley, *An antifungal agent inhibits an aminoacyl-tRNA synthetase by trapping tRNA in the editing site*, *Science* 316 (2007) 1759-1761.
- [123] Q.-H. Hu, R.-J. Liu, Z.-P. Fang, J. Zhang, Y.-Y. Ding, M. Tan, M. Wang, W. Pan, H.-C. Zhou, E.-D. Wang, *Discovery of a potent benzoxaborole-based anti-pneumococcal agent targeting leucyl-tRNA synthetase*, *Sci. Rep.* 3 (2013).
- [124] V. Hernandez, T. Crépin, A. Palencia, S. Cusack, T. Akama, S.J. Baker, W. Bu, L. Feng, Y.R. Freund, L. Liu, M. Meewan, M. Mohan, W. Mao, F.L. Rock, H. Sexton, A. Sheoran, Y. Zhang, Y.-K. Zhang, Y. Zhou, J.A. Nieman, M.R. Anugula, E.M. Keramane, K. Savariraj, D.S. Reddy, R. Sharma, R. Subedi, R. Singh, A. O'Leary, N.L. Simon, P.L. De Marsh, S. Mushtaq, M. Warner, D.M. Livermore, M.R.K. Alley, J.J. Plattner, *Discovery of a novel class of boron-based antibacterials with activity against Gram-negative bacteria*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 57 (2013) 1394-1403.
- [125] Mike Frick, *The tuberculosis vaccine pipeline 30 June 2013 Pipeline report, TB coinfection, Vaccines and microbicides*.
- [126] McShane H. *Boosting BCG with MVA85A - clinical trials and efficacy data. Paper presented at: TB Vaccines Third Global Forum; 2013 March 25–27; Cape Town, South Africa.*

- [127] Tameris M, Hatherhill M, Landry B, et al. Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: a randomized, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet*. 2013;381(9871):1021-8.
- [128] McShane, Helen (Oxford University, Oxford, England). Personal communication with: Mike Frick (Treatment Action Group, New York, NY). 2013 March 27.
- [129] Day C, Tameris M, Mansoor N, et al. Induction and regulation of T cell immunity by the novel TB vaccine M72/AS01 in South African adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Jan 10. doi:10.1164/rccm.201208-1385OC.[Epub ahead of print].
- [130] Tait D. Progress of the M72/AS01E tuberculosis vaccine candidate into phase IIb efficacy trial. Paper presented at: TB Vaccines Third Global Forum; 2013 March 25–27; Cape Town, South Africa.
- [131] Evans, Tom. (Aeras, Rockville, MD). E-mail with: Mike Frick (Treatment Action Group, New York, NY). 2013 April 7.
- [132] de Bruyn G, Garner P. *Mycobacterium vaccae* immunotherapy for treating tuberculosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003;(1):CD001166. Review. doi:10.1002/14651858.CD001166.

